

CharitéCentrum 12 für Innere Medizin und Dermatologie
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie
Klinikdirektor: Professor Dr. med. Gerhard Krönke

Habilitationsschrift

Die diagnostische Bedeutung von SIGLEC1 als Biomarker der Typ I Interferonaktivierung bei systemischen Autoimmunerkrankungen

Erlangung der Venia legendi
für das Fach Innere Medizin und Rheumatologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Thomas Martin Rose
aus Berlin**

Eingereicht: August 2023
Dekan: Prof. Dr. med. Joachim Spranger
1. Gutachter: N.N.
2. Gutachter: N.N.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Das Interferonsystem	7
1.2	Die Bedeutung der Typ I IFN-Aktivierung am Beispiel des SLE.....	10
1.3	Typ I IFN-Biomarker	13
1.3.1	Genexpressionsanalyse und die Polymerasekettenreaktion zur Bestimmung der Typ I IFN-Aktivierung	14
1.3.2	Die durchflusszytometrische Bestimmung der Typ I IFN-Aktivierung.....	15
1.3.3	Immunoassays zur Bestimmung der Typ I IFN-Aktivierung	16
1.3.4	Weitere Möglichkeiten der Erfassung der Typ I IFN-Aktivierung.	16
1.4	Übersicht zu den untersuchten Erkrankungen	17
1.4.1	Der systemische Lupus erythematodes.....	17
1.4.2	Das primäre Sjögren-Syndrom.....	19
1.4.3	Der kongenitale autoimmune Herzblock	20
1.4.4	Die idiopathischen inflammatorischen Myopathien	21
1.4.5	Die systemische Sklerose.....	24
2	Eigene Arbeiten	27
2.1	Die diagnostische Bedeutung von SIGLEC1 beim SLE.....	27
2.1.1	Die Bedeutung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung	27
2.1.2	Die Bedeutung im Krankheitsverlauf.....	34
2.2	Die Typ I IFN-Aktivierung als Risikofaktor für die Entwicklung eines autoimmunen kongenitalen Herzblocks	45
2.4	Die diagnostische Bedeutung von SIGLEC1 bei den idiopathischen inflammatorischen Myopathien.....	52
2.4	Die diagnostische Bedeutung von SIGLEC1 bei der systemischen Sklerose	64
3	Diskussion	79
4	Zusammenfassung und Ausblick	92
5.	Literaturverzeichnis	95
6	Danksagung	104
7	Erklärung	105

Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
ANA	Antinukleäre Antikörper
AS	Antisynthetasesyndrom
BAFF	B-cell activating factor
BILAG 2004	British Isles Lupus Assessment Group - 2004 Index
CD	Cluster of Differentiation
CHB	Congenital Heart Block
CMAS	Childhood Myositis Assessment Scale
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns
DELFLIA	Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescence Immunoassay
DM	Dermatomyositis
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EULAR	European Alliance of Associations for Rheumatology
GAS	IFN- γ -activated sites
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IBM	Inclusion Body myositis
IFN	Interferon
IIM	Idiopathische inflammatorische Myopathien
IMNM	Immune-Mediated Necrotizing Myopathy
IRF	IFN-regulatory factor
IRF9	Interferon Regulatory Factor 9
ISGF3	Interferon-stimulated gene factor 3-complex
IP-10	Interferon- γ induced protein 10 kD
JAK	Januskinase
MCTD	Mixed Connective Tissue Disease
MHC	Major Histocompatibility Complex
MxA	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain

NF- κ B	Nuclear factor “ κ -light-chain-enhancer” of activated B cells
NLR	NOD-like receptors
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	Polymerase chain reaction
PGA	Physician global assessment
PM	Polymyositis
PRR	Pattern Recognition Receptors
pSS	Primäres Sjögren-Syndrom
RoB	Risk of Bias
RLR	Retinoic acid-inducible gene-I-like receptors
ROC	Receiver operating characteristics
Rt-PCR	Real time Polymerase chain reaction
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SIGLEC1	Sialic-acid IgG like lectin 1
Simoa®	Single molecule array
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
SSc	Systemische Sklerose
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TLR	Toll-like Rezeptor

1 Einleitung

Die Labordiagnostik spielt in der Rheumatologie zur Diagnosestellung und Verlaufsbeurteilung als auch zum Ausschluss einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung eine wichtige Rolle. Hierunter fallen Laborparameter, wie zum Beispiel das C-reaktive Protein und die Blutsenkungsgeschwindigkeit, sowie spezifischere Laborwerte, wie Rheumafaktoren, Antikörper gegen zyklische citrullinierte Peptide, antinukleäre Antikörper und ihre Spezifitäten, Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper und andere.

Eine Typ I Interferon (IFN)-Aktivierung spielt in der Pathophysiologie einiger systemischer Autoimmunerkrankungen, wie dem systemischen Lupus Erythematoses (SLE), dem primären Sjögren-Syndrom (pSS), der systemischen Sklerose (SSc) und den idiopathischen inflammatorischen Myopathien (IIM) eine zentrale Rolle.(1–3) Die Erfassung der Typ I IFN-Aktivierung stellt daher hinsichtlich der Diagnosestellung und Verlaufsbeurteilung einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung sowie zu deren Ausschluss einen möglichen labordiagnostischen Baustein in der Rheumatologie dar. Verschiedene Methoden kommen bei der Detektion der Typ I IFN-Aktivierung zur Anwendung, wie beispielsweise die Genexpressionsanalysen, Polymerase Chain Reaction (PCR)-Messungen verschiedener IFN-induzierter Transkripte, die Bestimmung IFN-regulierter Proteine über die Durchflusszytometrie oder durch die Bestimmung von Serumproteinen über Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescence Immunoassay (DELFI) oder single molecule array (Simoa®).(1,4–6) Es gibt bisher keinen

internationalen Standard oder Konsensus über die Art und Weise der Bestimmung der Typ I IFN-Aktivierung. Von Seiten der European Alliance of Associations for Rheumatology (EULAR) werden hier erste Anläufe unternommen.(5,7,8,8) In der klinischen Routine erfolgt die Bestimmung der Typ I IFN-Aktivierung bisher nur in wenigen spezialisierten Zentren.(9)

Sialic-acid IgG like lectin 1 (SIGLEC1), auch unter Cluster of Differentiation (CD) 169 bekannt, wurde als Teil der Typ I IFN-Signatur mittels zellspezifischer Microarray-Analysen von Monozyten beim SLE im Rahmen einer Gemeinschaftsarbeit der Rheumatologie der Charité-Universitätsmedizin und dem Deutschen Rheumaforschungszentrum (DRFZ) identifiziert.(10) Es zeigte sich, dass SIGLEC1 ein sehr stark hochreguliertes Typ I IFN-induziertes Transkript in Monozyten ist und dabei auf der Oberfläche dieser Zellen exprimiert wird.(10) Damit kann die Expressionsstärke mittels Durchflusszytometrie einfach und standardisiert bestimmt werden. In Folgeuntersuchungen konnte der mögliche Nutzen der SIGLEC1-Bestimmung vor allem beim SLE(1,11) und anderen systemischen Autoimmunerkrankungen (SSc, pSS, IIM) aufgezeigt werden, sowie beim autoimmunen kongenitalen Herzblock, den monogenetischen Interferonopathien und bei viralen Infektionskrankheiten, wie z.B. der Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2)-Infektion.(3,12–17) Die durchflusszytometrische Bestimmung der SIGLEC1-Expression wurde 2014 in das Labor Berlin - Charité Vivantes GmbH im Rahmen eines Innovationsförderungsprogramms eingeführt und hat sich seitdem als Routinelaborparameter in der Rheumatologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin etablieren können.

1.1 Das Interferonsystem

Das Immunsystem wird in ein angeborenes und ein erworbenes Immunsystem unterteilt. Beide Systeme verfügen über eine humorale und zelluläre Immunantwort und sind eng miteinander verwoben, damit eine effektive Infektionsabwehr erfolgen kann. Das angeborene Immunsystem reagiert dabei auf verschiedene Signale, die eine potentielle Gefahr für die Integrität der Zelle darstellen können. Hierunter fallen unter anderem spezifische Strukturmerkmale von Viren oder Bakterien (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs), intrazelluläre Moleküle (Damage Associated Molecular Patterns, DAMPs), aber auch Immunkomplexe, die über bestimmte Rezeptoren (Pattern Recognition Receptors, PRRs), wie z.B. Toll-like Rezeptoren (TLR), nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like Rezeptoren (NLR) und Retinoic acid-inducible gene-I-like Rezeptoren (RLR) eine intrazelluläre Kaskade in Gang setzen.(2,18,19) Je nach Stimulus kommt es zu unterschiedlichen Aktivierungswegen, beispielsweise des nuclear factor „ κ -light-chain-enhancer” of activated B cells (NF- κ B)-Signalweges oder zur Ausbildung eines Komplexes, bestehend aus verschiedenen IFN-regulatory factors (IRF), wie zum Beispiel IRF 3 und 7 oder IRF 7 und 7 (siehe Abbildung 1).(2,18,19) Kommt es in diesem Zusammenhang zur Typ I IFN-Aktivierung, dann werden nachfolgend verschiedene IFN produziert, die wiederum in der Lage sind, die Immunantwort über IFN-Rezeptoren zu verstärken.(2,18,19)

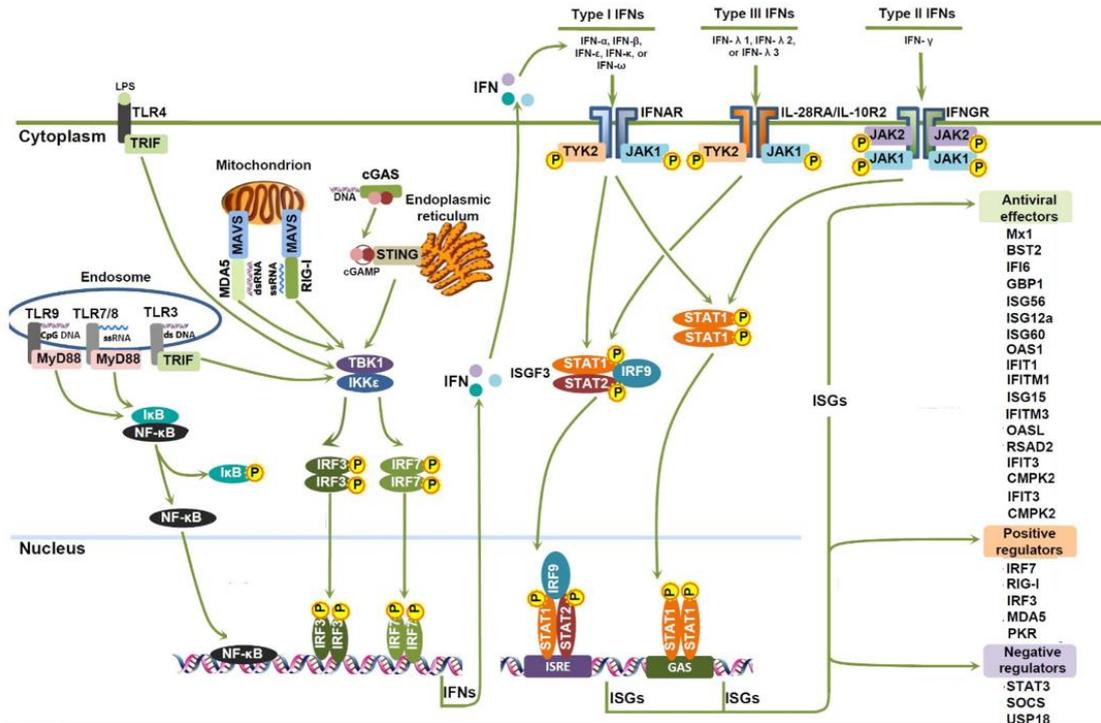
Es werden drei IFN-Typen unterschieden. Typ I IFN umfasst fünf Gruppen: IFN- α , β , ϵ , κ und ω ; IFN- α lässt sich dabei in weitere 12 unterschiedliche IFN- α Proteine untergliedern.(19,20) Die meisten Zellen sind in der Lage kleine Mengen Typ I IFN zu produzieren. Typ I IFN bindet an den IFN- α

Rezeptor. Bei Rezeptoraktivierung erfolgt eine intrazelluläre Signalkaskade über die Aktivierung von Tyrosinkinase und im Weiteren erfolgt die Formierung des Interferon-stimulated gene factor 3-complex (ISGF3) bestehend aus Signal Transducers and Activators of Transcription 1 und 2 (STAT1, STAT2), sowie Interferon Regulatory Factor 9 (IRF9). Der ISGF3 bindet an sogenannte response elements im Promoter IFN-stimulierter Gene und führt in der Konsequenz zur Transkription dieser Gene.(2,18,19)

Das Typ II IFN umfasst IFN- γ , welches u.a. von natürlichen Killerzellen (NK) und T-Zellen produziert wird. (2,19,21) Bei IFN- γ -Rezeptoraktivierung erfolgt eine intrazelluläre Signalkaskade, die ebenfalls über die Aktivierung von Tyrosinkinase und im Weiteren zur Ausbildung eines Komplexes führt, der aus zwei STAT1 Homodimeren besteht, die IFN- γ -activated sites (GASs) binden und im Verlauf zur Transkription Typ II IFN-regulierter Gene führen. (2,19,21) Dieser Aktivierungsweg kann auch durch Typ I IFN erfolgen.(2,19,21)

Typ III umfasst vier IFN- λ Subtypen, die vor allem von epithelialen Zellen und epithelialen Ursprungszellen, Hepatozyten und einigen Immunzellen, wie z.B. Makrophagen, produziert wird. Die Aktivierung und Wirkweise ähnelt dem vom Typ I IFN.(19,22)

Abbildung 1) Wege der IFN-Aktivierung. Die Verwendung der modifizierten open Access Grafik erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Lipeng Qiu.(23)



Retinoid acid inducible gene I (RIG-I), cyclic guanosine-monophosphate adenosine-monophosphate (cGAMP) synthase (cGAS), mitochondrial activator of virus signaling (MAVS), Toll-IL-1 receptor (TIR)-domain-containing adaptor inducing IFN- β (TRIF), myeloid differentiation primary response 88 (MyD88), stimulator of IFN genes (STING), IFN-stimulated genes (ISGs), melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5), Lipopolysaccharide (LPS). (TANK)-binding kinase-1 (TBK1), inhibitor of κ B (I κ B) kinase (IKK), IFN-stimulated response elements (ISREs), tyrosine kinase 2 (TYK2).

Mit der Aktivierung werden gleichzeitig inhibitorische Prozesse in die Wege geleitet, die auf allen IFN-Aktivierungsebenen, wie z.B. auf der Ebene der PRR, ISG, des Interferonrezeptors und des Januskinase (JAK)-STAT Signalweges wirken. Die IFN-Aktivierung und die damit verbundenen Effekte auf das Immunsystem werden in die Ausgangslage zurückgebracht.(18)

1.2 Die Bedeutung der Typ I IFN-Aktivierung am Beispiel des SLE

Bei einigen systemische Autoimmunerkrankungen zeigt sich, neben der Ausbildung von Autoantikörpern, eine Typ I IFN-Aktivierung.(1–3,5,6,13,24) Diese Aktivierung ist beim SLE besonders gut untersucht worden und wird im Folgenden im Kontext seiner pathophysiologischen Rolle und des therapeutischen Nutzens näher erläutert.

In Beobachtungsstudien konnte eine familiäre Häufung des SLE beobachtet werden, die eine genetische Prädisposition nahelegen. Diese genetische Komponente konnte auch in genomweiten Assoziationsstudien zum SLE festgestellt werden, in denen über 80 verschiedene Risiko-Gen-Loci festgestellt wurden.(25) Darunter befinden sich viele, die direkt oder indirekt die IFN-Signalwege betreffen.(19) Zusätzlich spielen epigenetische modulierende Mechanismen, Umwelteinflüsse, eine Immunaktivierung, z.B. durch virale Infektionen, und weitere Mechanismen eine Rolle. Durch verschiedene Prozesse kommt es zu einer initialen (Auto-) Antigenpräsentation und zur Ausbildung autoreaktiver Zelle.(26) Nach der präklinischen Initiierung, so wird vermutet, kommen immunologische Ereignisse hinzu, die dann zur Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Zytokine führen, die dann kumulativ verantwortlich für erste Symptome sind.(26) In Studien konnten Jahre vor dem Auftreten von Symptomen und der Diagnose bzw. Klassifikation eines SLE, Autoantikörper, erhöhte Konzentrationen verschiedener Mediatoren, wie IL5, IL6, IFN α und IFN- γ , gefunden werden.(27–29) Im zeitlichen Verlauf konnten vor Auftreten von Autoantikörpern erhöhte Konzentrationen von Zytokinen, wie IFN- γ , IL-5 und IL-6, festgestellt werden, die zunächst eine initiale T-Zellaktivierung

nahelegen. Im Weiteren kommt es dann zur Ausbildung von Autoantikörpern und nachfolgend zu einer Typ I IFN-Aktivierung.(28)

Die Typ I IFN-Aktivierung resultiert aus der genetischen Prädisposition und verschiedenen zusätzlichen Faktoren. Eine gängige Hypothese betrifft Veränderungen beim Zelltod und Abbau von Zelldebris, die sogenannte Clearance.(30–32). In der Pathophysiologie des SLE zeigen sich u.a. eine verstärkte Apoptoseneigung und eine verminderte Clearance apoptotischen Materials, die u.a. durch eine reduzierte DNase Aktivität und/oder eine eingeschränkte Phagozytose verursacht wird.(26,33,34) Das nicht abgebaute bzw. nicht ausreichend schnell abgebaute körpereigene Material, wie Zelldebris, Immunkomplexe und freie Nukleinsäuren, führen über verschiedene Aktivierungsmechanismen, z.B. über TLR, zu einer Typ I IFN-Aktivierung.(26,30) In diesem Kontext werden beispielsweise auch plasmazytoide dendritische Zellen aktiviert, die Typ I IFN im großen Maße produzieren. Die Aktivierung dieser plasmazytoiden dendritischen Zellen kann auch über netzartige Strukturen von neutrophilen Granulozyten, sogenannten Neutrophil Extracellular Traps (NETs), erfolgen, die bei Kontakt zu Pathogenen von ihnen ausgeworfen werden.(26) Neben der Aktivierung des Typ I IFN-Systems über PRR, werden dem Immunsystem (Auto-) Antigene präsentiert. Dadurch wird eine Kaskade in Gang gesetzt, die dazu führen kann, dass Autoantikörper durch autoreaktive Plasmazellen gebildet werden.(30) Diese Autoantikörper können wiederum selbst über verschiedene Mechanismen eine IFN-Antwort auslösen und damit diese weiter verstärken.(26)

Mit dieser Aktivierung sind eine ganze Reihe an Effekten im angeborenen und erworbenen Immunsystem beim SLE verbunden.(19,35) Typ I IFN erhöhen z.B. die Expression von Major Histocompatibility Complex (MHC) I auf Zellen, wodurch die Antigenpräsentation verstärkt wird.(19) Verschiedene für die Immunantwort wichtigen Moleküle, wie MHC-II, CD40, CD80 und CD86 werden außerdem hochreguliert und es kann dadurch zu einer gesteigerten Zytokinproduktion kommen.(19) Dendritische Zellen maturieren vermehrt zu potenten antigenpräsentierenden Zellen, was wiederum die Differenzierung naiver CD4+ T Zellen ermöglicht; dazu gehören auch autoreaktive T-Zellen. B-Zellen werden ebenfalls durch IFN aktiviert(36), können weiter ausdifferenzieren und führen in der Konsequenz zu einer vermehrten Antikörperproduktion.(37) Interferone führen darüber hinaus beim Monozyten zu einer vermehrten Produktion von B-cell activating factor (BAFF), was eine gesteigerte Antikörperproduktion zur Folge hat.(19) In der Summe kommt es zu einer sich selbst stimulierenden IFN-Schleife mit Auswirkungen auf nahezu alle Zellen des Immunsystems, welche beim SLE in eine z.T. auch chronische Typ I IFN-Aktivität umschlagen kann.

Klinisch zeigen sich Assoziationen zu einer hohen Typ I IFN-Aktivität mit unspezifischen Symptomen, wie Fieber, Abgeschlagenheit, Muskel- und Gelenkbeschwerden, die wir beim SLE, aber auch im Kontext von viralen Infektionen sehen.(38) Darüber hinaus führt die Typ I IFN-Aktivierung zu einer Unterdrückung des Knochenmarks mit Ausbildung einer Anämie, Leuko- und Thrombopenie, ebenfalls Merkmale einer erhöhten Krankheitsaktivität des SLE.(39) Weiterhin werden klinische Assoziationen der Typ I IFN-Aktivierung zu Gelenk-, Haut-, Nieren- und ZNS-Manifestationen beim SLE festgestellt.(19)

Die Typ I IFN-Aktivierung lässt sich über verschiedene Medikamente therapeutisch adressieren. Die Typ I IFN-Aktivierung kann beispielweise durch Hydroxychloroquin, Glukokortikoide und JAK-Inhibitoren (wie Baricitinib) beeinflusst werden.(15,40) Darüber hinaus steht seit Februar 2022 ein zugelassener monoklonaler Antikörper gegen den Typ I IFN-Rezeptor (Anifrolumab) zur Behandlung des SLE zur Verfügung.(41) In einer gepoolten post-hoc Analyse zweier randomisierter kontrollierter Studien, die auch zur Zulassung dieses Biologikums geführt haben, konnte gezeigt werden, dass vor allem Patientinnen und Patienten mit hoher Typ I IFN-Aktivierung klinisch von einer therapeutischen Blockade des Typ I IFN-Rezeptors profitieren.(42)

Die Bestimmung der Typ I IFN-Aktivierung mittels eines Biomarkers ermöglicht Einblicke in ablaufende immunologische Prozesse, ergänzt die bestehende rheumatologische Labordiagnostik und dient womöglich der Patientenstratifizierung im Kontext einer Therapie mit Anifrolumab.

1.3 Typ I IFN-Biomarker

Etwa 10% unseres Genoms reagiert auf Typ I IFN, so dass die Typ I IFN-Signatur hunderte von IFN regulierten Genen umfasst.(43) Durch die überlappenden intrazellulären Aktivierungswege der drei Interferontypen kommt es auch auf Transkriptionsebene zu einer Überlappung(44), die dazu führt, dass etwa 37% der Typ I IFN regulierten Gene spezifisch für eine Typ I IFN-Aktivierung sind.(44) Dies gilt es generell bei der Interpretation einer Typ I IFN-Aktivierung mittels Biomarkern zu berücksichtigen.

Eine Vielzahl an verschiedenen Methoden zur Erfassung der Typ I IFN-Aktivierung stehen zur Verfügung(5), die im Weiteren kursorisch erläutert werden.

1.3.1 Genexpressionsanalyse und die Polymerasekettenreaktion zur Bestimmung der Typ I IFN-Aktivierung

Das Auslesen der Typ I IFN-Aktivierung kann über Genexpressionsanalysen mittels DNA-Microarrays oder RNA Sequenzierung erfolgen.(10) Vereinfacht wird bei den DNA-Microarrays auf einem Objektträger Oligonukleotide (DNA-Fragmente) angeordnet. An diese DNA-Fragmente binden die aufgearbeiteten und mit Farbstoff markierten komplementären Oligonukleotide (cDNA) von Proben aus dem Blut oder Gewebe von Probandinnen und Probanden (Hybridisierung). Die gebundenen Oligonukleotide können dann mithilfe eines Lesegerätes ausgelesen werden und die Stärke des Signals gibt Aufschluss darüber, wie häufig diese Sequenz in der Probe enthalten war.(45) DNA-Microarrays und die RNA Sequenzierung werden bei den systemischen Autoimmunkrankheiten zur Genexpressionsanalyse der Typ I IFN Aktivierung eingesetzt.(5) Für die Erfassung einer Typ I IFN-Aktivierung reicht vermutlich die Bestimmung einiger weniger Transkripte aus. So erfolgt in vielen Studien(46) die Messung einer begrenzten Anzahl IFN induzierter Transkripte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR).(5,12) Dabei unterscheiden sich die Studien in der Auswahl und Anzahl der Transkripte, was insgesamt die direkte Vergleichbarkeit der Studienergebnisse erschwert und mit Herausforderungen verknüpft ist.(5,46) Mithilfe der Expressionsstärke

verschiedener IFN induzierter Transkripte kann dann auf Grundlage von Formeln die Berechnung eines IFN-Scores erfolgen.(4,5,47,48)

1.3.2 Die durchflusszytometrische Bestimmung der Typ I IFN-Aktivierung

SIGLEC1 (CD169) wurde beim SLE im Rahmen zellspezifischer Genexpressionsanalysen mittels Microarrays im Rahmen einer Gemeinschaftsarbeit der Rheumatologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin und dem DRFZ identifiziert.(10) Hierzu wurden Monozyten mittels magnetic-activated cell sorting (MACS) anhand der CD14 Positivität isoliert und die Typ I IFN induzierten, zellspezifischen Transkripte von SLE-Patientinnen und -Patienten mit denen von Gesunden verglichen. Es zeigte sich, dass SIGLEC1 stark hochreguliert und Teil der Typ I IFN-Aktivierung ist. SIGLEC1 wird im peripheren Blut nahezu ausschließlich auf Monozyten exprimiert, was die durchflusszytometrische Analyse auf CD14+ Monozyten ermöglicht.(49) Nach der Identifizierung von SIGLEC1 beim SLE folgten weitere Studien, in denen die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Bestimmung von SIGLEC1 bestätigt werden konnten.(1,11,36) Im Labor Berlin Charité Vivantes GmbH erfolgt die Messung seit 2014. Neben den systemischen Autoimmunkrankheiten wurde der Einsatz von SIGLEC1 auch bei anderen Krankheiten exploriert, wie z.B. bei viralen Infektionskrankheiten, wie Human Immunodeficiency Virus (HIV)(50) oder SARS-CoV-2(16), aber auch bei seltenen monogenetischen Interferonopathien.(12)

Weitere durchflusszytometrisch untersuchte Typ I IFN induzierte Proteine sind beispielsweise Tetherin (CD317), Interferon-induced GTP-binding protein Mx1 (MxA) und CD64.(5,51,52)

1.3.3 Immunoassays zur Bestimmung der Typ I IFN-Aktivierung

IFN- α kann im Serum direkt bestimmt werden. Dabei weisen der ELISA und DEFLIA bei der Detektion von IFN- α eine niedrige Sensitivität auf.(1) Der Simoa® kann IFN- α , aber auch andere Zytokine, in sehr niedriger Konzentration direkt nachweisen und ist damit eine vielversprechende Methode zur Bestimmung der direkten Typ I IFN-Aktivierung.(4,53,54)

Darüber hinaus werden eine Vielzahl von Proteinen durch Typ I IFN induziert. Hierzu gehören beispielsweise Interferon- γ induced protein 10 kD (IP-10) und Galectin-9, die beim SLE und der Dermatomyositis (DM) untersucht worden sind und einen Stellenwert in der Routinediagnostik zukünftig haben könnten.(1,55,56) Es gibt eine Vielzahl weiterer Proteine, die durch IFN reguliert und induziert werden, auf die im Einzelnen nicht weiter eingegangen wird.

1.3.4 Weitere Möglichkeiten der Erfassung der Typ I IFN-Aktivierung

Der Nachweis einer Typ I IFN Aktivierung kann auch über Reporterzell-Assays erfolgen. Bei diesen sogenannten „WISH“-Zellen(57) werden die Reporterzellen mit Patientenserum inkubiert und im Weiteren wird das Signal, z.B. IFN induzierte Transkripte, über die PCR in den Reporterzelllysaten bestimmt. Weitere Verfahren sind beispielsweise die Messungen des zytopathischen Effekts durch IFN oder die immunhistochemische Anfärbung von MxA.(5)

1.4 Übersicht zu den untersuchten Erkrankungen

Der SLE, das pSS, die SSc, die IIM, mit ihren Subentitäten Antisynthetasesyndrom (AS), DM, Einschlusskörpermyositis (IBM), immunvermittelte nekrotisierende Myopathie (IMNM) und Polymyositis (PM) lassen sich anhand der klinischen Symptomatik, Antikörperprofile, bildgebender und anderer Verfahren sowie histopathologischer Gesichtspunkte aus Gewebeproben unterscheiden.

1.4.1 Der systemische Lupus erythematodes

Der SLE gilt als eine seltene chronisch-entzündliche, systemische Autoimmunkrankheit und betrifft vorwiegend Frauen im gebärfähigen Alter. Prinzipiell können alle Organe beim SLE betroffen sein. Besonders häufig wird eine Haut-, Gelenk- und Nierenmanifestation festgestellt. Die Prävalenz des SLE liegt in Deutschland bei 55 auf 100.000 Einwohnern.(58) Charakteristisch sind Autoantikörper gegen Zellkernbestandteile, sogenannte Antinukleäre Antikörper (ANA), die in der indirekten Immunfluoreszenz häufig ein homogenes Muster aufzeigen.(59) Hinter diesem Immunfluoreszenzmuster verbergen sich bestimmte Antikörper, die an verschiedene Zellkernantigene, wie Nukleosomen, Histone und doppelsträngige DNA binden. Antikörper gegen den Nukleosomen, dsDNA und Smith-Antigen (SM) spielen für die Diagnose des SLE eine wichtige Rolle und werden für die Verlaufsbeurteilung und Einschätzung der Krankheitsaktivität genutzt. Die SLE-Klassifikationskriterien der EULAR und des American College of Rheumatology (ACR) (60) sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Dabei sind die Voraussetzungen für die Anwendungen der Klassifikationskriterien zu berücksichtigen.

Tabelle 1) EULAR /ACR Klassifikationskriterien des SLE(60)

Voraussetzungen:

- ANA (HEp2-IFT) \geq 1:80 (einmaliger Nachweis ist ausreichend)
- Ein Kriterium wird nicht gewertet, wenn eine andere, wahrscheinlichere Ursache zugrunde liegt (z.B. Infektionen, Neoplasien, Medikamente oder andere Erkrankung)
- Ein Kriterium ist erfüllt, wenn es einmalig vorgekommen und dokumentiert ist
- Kriterien müssen nicht gleichzeitig vorliegen
- Es muss jedoch mindestens ein Kriterium aktuell vorhanden sein
- Innerhalb jeder Domäne geht nur der höchste Score in den Gesamtscore ein

Klinische Domäne und Kriterien:		Punkte
Konstitutionelle Symptome	Fieber	2
Haut	nicht vernarbende Alopezie	2
	orale Ulzera	2
	subakut-kutaner (SCLE) oder diskoider LE (DLE)	4
	akuter kutaner LE (ACLE)	6
Arthritis	Synovitis in \geq 2 Gelenken oder Druckschmerz in \geq 2 Gelenken + Morgensteifigkeit \geq 30 min.	6
Neurologie	Delirium	2
	Psychose	3
	Krampfanfälle	5
Serositis	Pleura- oder Perikarderguss	5
	Akute Perikarditis	6
Hämatologie	Leukopenie	3
	Thrombopenie	4
	Autoimmunhämolyse	4
Nieren	Proteinurie $>$ 0,5 g/24h	4
	Lupusnephritis (histologisch) Typ II, V	8
	Lupusnephritis (histologisch) Typ III, IV	10
Immunologische Domänen und Kriterien:		
Antiphospholipid-Antikörper	Anticardiolipin-Antikörper (aCL): $>$ 40 GPL oder Beta-2-Glykoprotein I (a β 2-GPI): $>$ 40 GPL oder positives Lupusantikoagulanz (LA)	2
Komplement	C3 ODER C4 vermindert	3
	C3 UND C4 vermindert	4
Hochspezifische Auto-Ak	Anti-dsDNA oder Anti-SM	6

Der SLE kann bei einer Summe von \geq 10 Punkten klassifiziert werden.

1.4.2 Das primäre Sjögren-Syndrom

Das pSS ist eine Autoimmunerkrankung, die mit einer Mund- und Augentrockenheit als wichtiges und zentrales klinisches Symptom einhergeht. Die Prävalenz des pSS liegt bei etwa 0,2% der erwachsenen Bevölkerung und stellt neben der rheumatoiden Arthritis eine der häufigeren systemischen Autoimmunerkrankung dar.(61)

Im Verlauf der Erkrankung kommt es als Folge der Entzündungsreaktion zu einer progredienten Zerstörung der Speicheldrüsen.(62) Dies führt zu einer zunehmenden Mund- und/oder Augentrockenheit, der sog. Sicca-Symptomatik, die für die betroffenen Patientinnen und Patienten sehr belastend ist und zu einer deutlichen Beeinflussung der Lebensqualität führt.(62) Es kann zudem zu einer vaginalen Trockenheit mit Dyspareunie kommen. Neben der glandulären Manifestation gibt es auch extraglanduläre Manifestationen, wie z.B. Lungen-, Nieren-, Nerven-, Gelenk- und Hautbeteiligung. Prinzipiell kann beim pSS jedes Organ betroffen sein.(62) Typische Autoantikörper sind gegen die Antigene Ro/SSA und La/SSB gerichtet. Diese zeigen anders als beim SLE ein fein gesprenkeltes nukleäres Immunfluoreszenzmuster in der ANA-Diagnostik. Patientinnen und Patienten mit einem pSS haben ein deutlich erhöhtes Risiko an einem Lymphom zu erkranken.(59,62) Tritt ein Sjögren-Syndrom neben anderen systemischen Autoimmunerkrankungen auf, wird häufig von einem sekundären Sjögren Syndrom gesprochen, wobei diese Nomenklatur kritisch gesehen wird.(63) Tabelle 2 zeigt die aktuellen Klassifikationskriterien zum pSS. Die Bedeutung der Antikörper gegen La/SSB sind mittlerweile in den Hintergrund getreten. Der Nachweis von Anti-Ro/SSA-Antikörpern sind mit dem Risiko eines neonatalen Lupus-Syndroms im Sinne einer diaplazentar übertragenen

Autoimmunkrankheit vergesellschaftet. Besonders relevant, wenn auch selten, ist hierbei die Entwicklung eines irreversiblen kongenitalen autoimmunen Herzblocks.(64) Eine Aufklärung über das Risiko der Entwicklung eines autoimmunen Herzblocks ist bei Vorliegen von Anti-Ro/SSA-Antikörpern bei Kinderwunsch sehr wichtig, da eine spezielle Überwachung der Schwangerschaft und der kardialen Entwicklung des Kindes im Mutterleib notwendig wird und eine Therapieeinleitung mit Hydroxychloroquin, einem Antimalariamittel zur Primärprophylaxe diskutiert werden sollte. Im folgenden Kapitel wird auf den kongenitalen autoimmunen Herzblock näher eingegangen.

Tabelle 2) ACR/EULAR Klassifikationskriterien des primären Sjögren-Syndroms von 2016(65)

Parameter:	Punkte
Speicheldrüsenbiopsie aus der Unterlippe mit fokaler lymphozytärer Sialadenitis und Fokus-Score mit ≥ 1 Fokus/ 4mm ²	3
Nachweis von Anti-Ro/SSA-Antikörpern	3
Okulärer Färbeindex ≥ 5 (oder van-Bijsterveld-Score ≥ 4) in mindestens einem Auge	1
Schirmer-Test ≤ 5 mm / 5 min in mindestens einem Auge Speichelflussmessung (unstimuliert) $\leq 0,1$ ml/min	1

Mindestens 4 Punkte müssen für die Klassifikation des pSS erfüllt werden.

1.4.3 Der kongenitale autoimmune Herzblock

Der kongenitale autoimmune Herzblock gehört zu den neonatalen Lupus-Syndromen. Die Inzidenz eines kongenitalen Herzblock liegt bei etwa 1: 20.000-30.000 Schwangerschaften und gilt daher als seltene Erkrankung.(64) Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine passiv

erworbene Autoimmunkrankheit.(64) Maternale Autoantikörper, die vornehmlich gegen Ro/SSA gerichtet sind, werden während der Schwangerschaft auf den Fetus im Mutterleib übertragen. Diese Antikörper können dann verschiedene Erkrankungen beim Neugeborenen auslösen. So kann es beim Neugeborenen zu erhöhten Leberwerten oder Blutbildveränderungen kommen, aber auch zu Hautveränderungen. Der Verlauf ist durch den Abbau maternaler Antikörper im Kind selbstlimitierend.(64) Anders verhält sich dies beim kongenitalen autoimmunen Herzblock. Bei ca. 2% der Anti-Ro/SSA exponierten Feten wird im 2. Trimenon ein Herzblock festgestellt.(64) Kommt es zum Nachweis eines Herzblocks, liegt bereits zu 80% der Fälle eine AV-Blockierung Grad III vor. In der Schwangerschaft muss daher bereits frühzeitig eine engmaschige Untersuchung erfolgen.(64) Bei der Geburt benötigt ein großer Anteil der Kinder einen Herzschrittmacher. Risikofaktoren für die Entwicklung eines kongenitalen autoimmunen Herzblocks sind u.a. vorangegangene Geburten mit einem kongenitalen autoimmunen Herzblock des Kindes, sowie hochtitrige Anti-Ro/SSA-Antikörper.(64) Eine Risikoreduktion kann durch die präventive Gabe von Hydroxychloroquin erzielt werden.(64,66,67)

1.4.4 Die idiopathischen inflammatorischen Myopathien

Die IIM umfassen verschiedene Autoimmunkrankheiten, die sich vornehmlich am Muskel manifestieren, aber auch andere Organe, wie die Haut und Lunge, befallen können. Die IIM sind insgesamt seltene Erkrankungen mit einer Inzidenz von 1,16 bis 19 auf eine Million Einwohner pro Jahr und einer Prävalenz von 2,4 bis 33,8 auf 100.000 Einwohner.(68) Die erste Einteilung

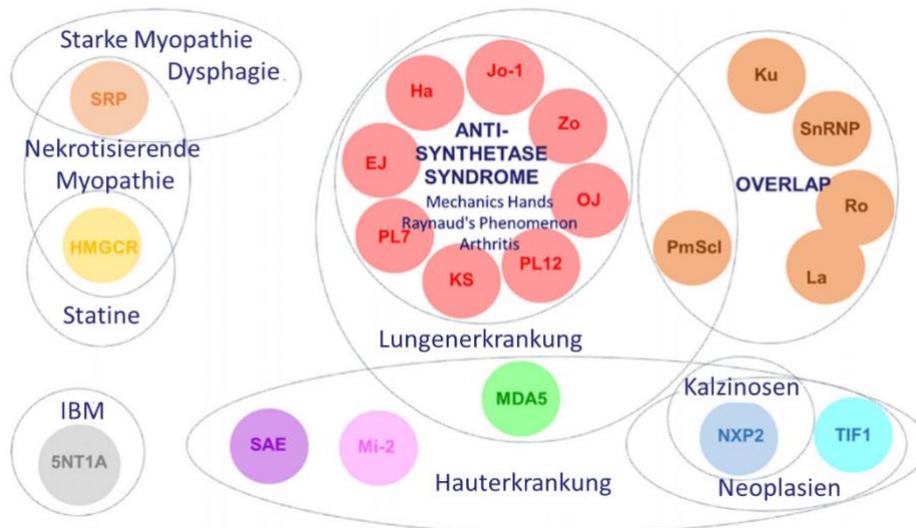
der IIM erfolgte von Peter und Bohan(69) und unterschied die DM von der PM. Im Verlauf der letzten Jahrzehnte konnten weitere Entitäten der IIM identifiziert werden. Hierzu gehören neben der DM, das AS, die IMNM, die IBM sowie die sogenannten Overlap-Myositiden (vgl. Abbildung 2). Die PM wird als eigenständige Entität mittlerweile angezweifelt bzw. als sehr seltene Erkrankung beschrieben.(70,71) Die Einteilung in die Untergruppen erfolgt auf Grundlage der klinischen Symptome, der Autoantikörper, der bildgebenden und elektrophysiologischen Verfahren und des histopathologischen Befundes aus einer Muskel- und ggf. Hautbiopsie. Es wurden 2017 Klassifikationskriterien der EULAR publiziert, die im Wesentlichen anhand eines Punktwertes zwischen gesicherter, wahrscheinlicher und möglicher IIM unterscheiden (vgl. Tabelle 3).(72) Die Kriterien umfassen jedoch nicht die IMNM und auch nicht die Overlap-Myositiden. Weiterhin fehlen wichtige Autoantikörper, so dass zukünftig weitere Studien unter Einschluss weiterer IIM-Subgruppen und Antikörperbefunde notwendig sind, um der großen Gruppe der IIM und ihrer Facetten gerecht zu werden. Einen Überblick über die Autoantikörper und mögliche klinische Assoziationen bei den IIM zeigt Abbildung 2.

Tabelle 3) Klassifikationskriterien der idiopathischen inflammatorischen Myopathien (72,73,73)

	Variablen	Ohne Biopsie	Mit Biopsie
Alter			
	Erstmanifestation von mit der Erkrankung assoziierten Symptomen ≥ 18 LJ. und < 40 . LJ	1,3	1,5
	Erstmanifestation von mit der Erkrankung assoziierten Symptomen ≥ 40 LJ.	2,1	2,2
Schwäche	Symmetrisch i.d.R. progredient, der proximalen oberen Extremitäten	0,7	0,7
	Symmetrisch i.d.R. progredient, der proximalen unteren Extremitäten	0,8	0,5
	Nackenflexoren sind verhältnismäßig schwächer als Nackenextensoren	1,9	1,6
	proximalen Beinmuskeln sind verhältnismäßig schwächer als die distalen Muskeln	0,9	1,2
Haut-manifestation	Heliotroper Ausschlag	3,1	3,2
	Gottron'sche Papeln	2,1	2,7
	Gottron-Zeichen	3,3	3,7
Dysphagie oder ösophageale Dysmotilität		0,7	0,6
Anti-Jo-1 (anti-Histidin-tRNA-Synthetase) Antikörper		3,9	3,8
	Erhöhte Creatinkinase (CK)	1,3	1,5
	Erhöhte Laktatdehydrogenase		
	Erhöhte Aspartataminotransferase		
	Erhöhte Alaninaminotransferase		
Muskelbiopsie			
	Endomysiale Infiltration mononukleärer Zellen, die die Muskelfasern umgeben, jedoch nicht in die Muskelfasern eindringen		1,7
	Perimysiale und/oder perivaskuläre Infiltration mononukleärer Zellen		1,2
	Perifaszikuläre Atrophie		1,9
	»rimmed vacuoles«		3,1

Abbildung 2) Autoantikörper im Kontext klinischer Assoziationen

(modifizierte Abbildung nach (73) mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons)



1.4.5 Die systemische Sklerose

Die SSc ist eine seltene systemische Autoimmunkrankheit mit einer Prävalenz von 3 bis 12 je 100.000 Einwohner.(74) In Folge verschiedener entzündlich-fibrosierender immunologischer Prozesse kommt es klinisch zu einer Hautsklerosierung und weiteren Manifestationen.(75) Unterschieden wird bei der Hautsklerose klinisch zwischen einer limitierten und einer diffusen Verlaufsform. Bei der limitierten Verlaufsform kommt es zu einer Hautsklerosierung distal des Ellenbogens und umfasst nicht den Körperstamm, während es bei der diffusen Verlaufsform auch proximal vom Ellenbogen zu sklerosierenden Hautveränderungen kommt.(74,75) In 1,5% bis 8 % der Fälle tritt eine systemische Sklerose ohne eine Hautbeteiligung

auf.(74) Bei einem Großteil der Erkrankten tritt ein Raynaud Syndrom früh im Krankheitsverlauf auf. Dies führt bei etwa der Hälfte der Patientinnen und Patienten im Verlauf der Erkrankung zu digitalen Ulzerationen.(74) Veränderungen im Bereich der Kapillaren der Nagelpfalz treten früh im Krankheitsverlauf auf und sind bei Organmanifestationen nahezu immer festzustellen. Diese Veränderungen lassen sich durch eine Kapillarmikroskopie im Bereich der Nagelpfalz gut untersuchen und sind auch Teil der Klassifikationskriterien.(74,76) Kardiopulmonale Manifestationen sind prognostisch besonders relevant, wie das Auftreten einer Myokarditis, einer interstitiellen Lungengerüsterkrankung oder einer pulmonal-arteriellen Hypertonie.(74). Eine gastrointestinale Manifestation wird ebenfalls häufig festgestellt, die mit Schluckbeschwerden und einer verlangsamten Magenentleerung einhergeht und im weiteren Verlauf zu einer Resorptionsstörung mit Gewichtsverlust führen kann.(74)

Im Autoimmunlabor können Antikörper u.a. gegen SCL70, Centromere und RNA Polymerase III festgestellt, sowie weiteren seltene Autoantikörper. Der jeweilige Autoantikörper weist z.T. eine enge Assoziation mit dem klinischen Phänotyp auf.(77) Die Klassifikationskriterien der SSc von 2013 sind aus der Tabelle 4 zu entnehmen.(78)

Tabelle 4) ACR/EULAR -Klassifikationskriterien für die systemische Sklerose; eine SSc kann bei Vorliegen von mindestens 9 Punkten klassifiziert werden. * Nur einer (der höhere) der beiden Score-Punkte zählt

Sklerodermie der Finger beider Hände und proximal der Fingergrundgelenke		9
Sklerodermie der Finger	Puffy fingers	2*
	Sklerodaktylie	4*
Fingerkuppen-Läsionen	Digitale Ulcera	2*
	grübchenförmige Narben	3*
Teleangiektasien		2
SSc-typisch abnormaler Kapillarmikroskopie-Befund		2
Lungenbeteiligung	Pulmonal-arterielle Hypertonie	2*
	Lungenfibrose	2*
Raynaud-Phänomen		3
SSc-typ. Autoantikörper (Centromer, Topoisomerase RNA-Polymerasen)		3

2 Eigene Arbeiten

2.1 Die diagnostische Bedeutung von SIGLEC1 beim SLE

2.1.1 Die Bedeutung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung

Zorn-Pauly, L., von Stuckrad, A.S.L., Klotsche, J., **Rose, T.**, Kallinich, T., Enghard, P., Ostendorf, L., Burns, M., Doerner, T., Meisel, C., Schneider, U., Unterwalder, N., Burmester, G., Hiepe, F., Alexander, T., Biesen, R., 2021. Evaluation of SIGLEC1 in the diagnosis of suspected systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* keab875.

Originalpublikation unter <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keab875>

In publizierten Vorarbeiten konnten wir eine Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und der Expressionshöhe von SIGLEC1 in der Querschnittsanalyse beim SLE feststellen.(1) Dabei zeigte sich, dass die Sensitivität, Patientinnen und Patienten mit sehr hoher Krankheitsaktivität zu detektieren, bei 100% lag und damit wesentlich höher war, als wir dies bei konventionellen Biomarkern, wie den Anti-dsDNA-Antikörpern oder den Komplementfaktoren C3/C4 feststellen konnten. Unter den eingeschlossenen Patientinnen und Patienten fanden sich einige mit gerade erst gestellter Diagnose. Diese Patientinnen und Patienten wiesen alle eine erhöhte SIGLEC1-Expression auf Monozyten auf. Dies zeigte sich auch beim juvenilen SLE.(17) Es wurde daher eine Studie konzipiert, in der Patientinnen und Patienten mit Verdacht auf das Vorliegen eines SLE eingeschlossen wurden, um dann den Stellenwert von SIGLEC1 für die Diagnosestellung zu ermitteln. In der Studie wurden insgesamt 232 Patienten mit Verdacht auf SLE eingeschlossen. Davon erfüllten 76 die Klassifikationskriterien der

EULAR / ACR. Diese 76 SLE Patientinnen und Patienten wurden dann hinsichtlich der diagnostischen Wertigkeit von SIGLEC1 mit der Kontrollkohorte verglichen und weiter untersucht. Es zeigte sich dabei, dass SIGLEC1 bei nahezu allen Patientinnen und Patienten mit Erstdiagnose SLE erhöht war. Der negative prädiktive Wert lag über >99% und die Likelihood-Ratio des Tests ergab einen Wert von 0,02. In die Klinik übersetzt heißt das, dass eine normale SIGLEC1-Expression auf Monozyten einen SLE als Erstdiagnose mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließt.

Originalpublikation unter <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keab875>

2.1.2 Die Bedeutung im Krankheitsverlauf

Rose, T., Grützkau, A., Klotsche, J., Enghard, P., Flechsig, A., Keller, J., Riemekasten, G., Radbruch, A., Burmester, G.-R., Dörner, T., Hiepe, F., Biesen, R., 2017. Are interferon-related biomarkers advantageous for monitoring disease activity in systemic lupus erythematosus? A longitudinal benchmark study. *Rheumatology (Oxford)* 56, 1618–1626.

Originalpublikation unter: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex220>

Für das Monitoring der Krankheitsaktivität von Patientinnen und Patienten mit SLE sind neben der klinischen Erfahrung, Krankheitsindices und Biomarker notwendig. Als Goldstandard für die Bestimmung der sogenannten serologischen Aktivität gelten Antikörper gegen doppelsträngige DNA (Anti-dsDNA) und die Spiegel der Komplementfaktoren 3 und 4 (C3/ C4). Untersuchungen zu Anti-dsDNA und C3 / C4 zeigen nur einen bedingten Nutzen bei einem niedrigen Evidenzgrad.(79) In der Pathogenese des SLE spielt, neben der Entwicklung von Autoantikörpern, die Typ I IFN Aktivierung eine wichtige Rolle. Ziel der Arbeit war es daher zu untersuchen, ob die Bestimmung von ausgewählten IFN-Biomarkern (SIGLEC1, IP-10 und IFN- α) vorteilhaft im Vergleich zu Anti-dsDNA sowie C3/C4 im Längsschnitt sind. Hierfür wurden 26 Patienten, die die ACR-Klassifikationskriterien(80) für den SLE erfüllten, über insgesamt 77 Visiten prospektiv begleitet. Die Krankheitsaktivität wurde durch den British Isles Lupus Assessment Group - 2004 Index (BILAG 2004) und den SLE disease activity index (SLEDAI) erhoben. Es zeigte sich in der longitudinalen Korrelationsanalyse, dass die IFN-Biomarker besser mit der Krankheitsaktivität im Längsschnitt korrelierten

als die konventionellen Biomarker Anti-dsDNA und Komplementspiegel. Weiterhin berechneten wir die longitudinale diagnostische Testgenauigkeit der verschiedenen Biomarker, um diese dann anhand der AUC, Sensitivität und Spezifität untereinander zu vergleichen. Konsekutive Patientenvisiten wurden hierzu anhand der Krankheitsaktivität in drei Gruppen unterteilt: steigende, gleichbleibende oder fallende Krankheitsaktivität. Zwischen diesen Gruppen konnten longitudinale Grenzwerte einzelner Biomarker mit Hilfe einer Receiver operating characteristics (ROC)-Analyse und dem Youden-Index berechnet sowie untereinander verglichen werden. Es zeigte sich, dass die IFN-Biomarker IP-10 und SIGLEC1 den konventionellen Biomarkern überlegen waren. Bei der Interpretation muss die kleine Fallzahl berücksichtigt werden, so dass Folgestudien notwendig sind, um auch die berechneten longitudinalen Grenzwerte zu validieren.

Originalpublikation unter: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex220>

2.2 Die Typ I IFN-Aktivierung als Risikofaktor für die Entwicklung eines autoimmunen kongenitalen Herzblocks

Lisney, A.R., Szelinski, F., Reiter, K., Burmester, G.R., **Rose, T.**, Dörner, T., 2017. High maternal expression of SIGLEC1 on monocytes as a surrogate marker of a type I interferon signature is a risk factor for the development of autoimmune congenital heart block. *Annals of the Rheumatic Diseases* annrheumdis-2016-210927.

Originalpublikation unter: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210927>

Die Entwicklung eines autoimmunen kongenitalen Herzblocks ist u.a. geknüpft an Autoantikörper gegen Ro/SSA, die über die plazentare Transzytose eine inflammatorische Reaktion am fetalen Herzens verursachen und einen irreversiblen AV-Block III° zur Folge haben können. Die Entwicklung eines solchen Herzblocks wird bei etwa einer von 20.000-30.000 Schwangerschaften festgestellt.(64) Antikörper gegen Ro/SSA finden sich in verschiedenen Autoimmunkrankheiten wieder, vornehmlich sind diese jedoch beim SLE und beim primären Sjögren-Syndrom vorzufinden. In unseren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die SIGLEC1-Expression auf Monozyten als Ausdruck einer Typ I IFN-Aktivierung bei diesen Erkrankungen häufig erhöht ist.(1,13) Wir vermuteten einen Zusammenhang zwischen der Typ I IFN-Aktivierung und der Entwicklung eines autoimmunen kongenitalen Herzblocks. Der Zusammenhang zwischen einer Typ I IFN-Aktivierung und der Ausbildung eines autoimmunen Herzblocks wurde zuvor nicht untersucht. Wir verglichen neun Schwangerschaften, bei denen postpartum ein autoimmuner kongenitaler Herzblock aufgetreten ist, mit 14 Schwangerschaften, bei denen ebenfalls Anti-Ro/SSA-Antikörper

nachweisbar waren, ohne das Auftreten eines Herzblocks mit weiteren 30 gesunden Schwangeren ohne Nachweis von Anti-Ro/SSA-Antikörpern. Wir konnten zeigen, dass alle Mütter, die ein Kind mit einem autoimmunen Herzblock zur Welt gebracht hatten, eine hohe Expression von SIGLEC1 auf Monozyten in der Durchflusszytometrie aufwiesen und sich von den Kontrollen signifikant unterschieden. Durch diese Arbeit konnte erstmalig ein Zusammenhang zwischen einer Typ I IFN-Aktivierung und der Entwicklung eines kongenitalen autoimmunen Herzblocks festgestellt werden. Weitere Studien konnten diesen Zusammenhang bestätigen und konsekutiv weitere pathophysiologische Prozesse aufklären.

Originalpublikation unter: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210927>

2.4 Die diagnostische Bedeutung von SIGLEC1 bei den idiopathischen inflammatorischen Myopathien

Graf, M., Stuckrad, S.L. von, Uruha, A., Klotsche, J., Zorn-Pauly, L., Unterwalder, N., Buttgereit, T., Krusche, M., Meisel, C., Burmester, G.R., Hiepe, F., Biesen, R., Kallinich, T., Stenzel, W., Schneider, U., **Rose, T.**, 2022. SIGLEC1 enables straightforward assessment of type I interferon activity in idiopathic inflammatory myopathies. RMD Open 8, e001934. Originalpublikation unter: <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2021-001934>

Die Typ I IFN-Aktivierung spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese bei Subtypen idiopathisch-inflammatorischer Myopathien. Durch Transkriptomanalysen im peripheren Blut von Patientinnen und Patienten mit IIM konnte eine Typ I IFN-Aktivierung festgestellt werden.(3) Vor allem bei Patienten und Patientinnen mit DM und AS zeigte sich eine besonders hohe Aktivierung. Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob SIGLEC1 als Typ I IFN-Aktivierungsmarker für die Erfassung der Krankheitsaktivität im Querschnitt und longitudinal nützlich ist. Hierzu wurden insgesamt 96 Patientinnen bzw. Patienten mit der Diagnose einer Myositis eingeschlossen, die in der Rheumatologie und in der Abteilung für Kinderrheumatologie in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin behandelt wurden. Es zeigte sich, dass die SIGLEC1-Expression auf Monozyten mit der Krankheitsaktivität der DM, gemessen am Physician Global Assessment (PGA) und am Childhood Myositis Activity Scale (CMAS),

korreliert. Diese Korrelation war sowohl im Querschnitt als auch im Längsschnitt feststellbar. Beim AS zeigten 42% der Patientinnen bzw. Patienten eine erhöhte SIGLEC1-Expression, die jedoch insgesamt nicht mit der Krankheitsaktivität korrelierte. Bei den IMNM konnte keine erhöhte SIGLEC1-Expression festgestellt werden, was mit der publizierten Literatur bezüglich einer Typ I IFN-Aktivierung übereinstimmt. Zwei Patienten in der Gruppe der IBM zeigten eine hohe SIGLEC1-Expression, die gleichzeitig aber auch Antikörper gegen U1RNP und Ro/SSA aufwiesen, so dass hier anzunehmen ist, dass pathophysiologisch möglicherweise zusätzliche andere immunologische Prozesse den Krankheitsverlauf beeinflussen, zumal bekannt ist, dass diese Autoantikörper eine Typ I IFN Aktivierung auslösen können. Daraus lässt sich zusammenfassend schließen, dass SIGLEC1 ein potentieller Biomarker für die Krankheitsaktivitätsbestimmung der DM darstellt und darüber hinaus für die Identifizierung von Patienten und Patientinnen mit einer Typ I IFN-Aktivierung von Nutzen sein könnte.

ORIGINAL RESEARCH

SIGLEC1 enables straightforward
assessment of type I interferon activity
in idiopathic inflammatory myopathies

Manuel Graf ¹, Sae Lim von Stuckrad,² Akinori Uruha,^{3,4} Jens Klotsche ⁵, Lydia Zorn-Pauly,¹ Nadine Unterwalder,⁶ Thomas Buttgereit,⁷ Martin Krusche ¹, Christian Meisel,⁶ Gerd R Burmester ¹, Falk Hiepe,¹ Robert Biesen,¹ Tilmann Kallinich ^{2,5}, Werner Stenzel,³ Udo Schneider,¹ Thomas Rose ¹

To cite: Graf M, von Stuckrad SL, Uruha A, et al. SIGLEC1 enables straightforward assessment of type I interferon activity in idiopathic inflammatory myopathies. *RMD Open* 2022;**8**:e001934. doi:10.1136/rmdopen-2021-001934

► Additional supplemental material is published online only. To view, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/rmdopen-2021-001934>).

Received 13 September 2021
Accepted 23 January 2022



© Author(s) (or their employer(s)) 2022. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to
Dr Thomas Rose;
thomas.rose@charite.de

ABSTRACT

Objective To evaluate sialic acid binding Ig-like lectin 1 (SIGLEC1) expression on monocytes by flow cytometry as a type I interferon biomarker in idiopathic inflammatory myopathies (IIM).

Methods We performed a retrospective analysis of adult and paediatric patients with the diagnosis of IIM. SIGLEC1 expression was assessed by flow cytometry and was compared with Physician Global Assessment or Childhood Myositis Assessment Scale disease activity scores. Mann Whitney U test and receiver operating characteristic curves were used for cross-sectional data analysis (n=96), two-level mixed-effects linear regression model for longitudinal analyses (n=26, 110 visits). Response to treatment was analysed in 14 patients within 12 months, using Wilcoxon test. SIGLEC1 was compared with interferon-stimulated gene 15/MxA status by immunohistochemical staining of muscle biopsies (n=17).

Results 96 patients with adult (a) and juvenile (j) dermatomyositis (DM, n=38), antisynthetase syndrome (AS, n=19), immune-mediated necrotising myopathy (IMNM, n=8), inclusion body myositis (IBM, n=9) and overlap myositis (n=22) were included. SIGLEC1 distinguished significantly between active and inactive disease with an area under the curve of 0.92 (95% CI 0.83 to 1) in DM and correlated with disease activity longitudinally (aDM: standardised beta=0.54, p<0.001; jDM: standardised beta=-0.70, p<0.001). Response to treatment in DM was associated with a decreasing SIGLEC1 (p<0.01, Wilcoxon test). SIGLEC1 was found upregulated in 8 of 19 patients with AS, 2 of 9 patients with IBM but not in IMNM.

Conclusion SIGLEC1 is a candidate biomarker to assess type I interferon activity in IIM and proved useful for monitoring disease activity and response to treatment in juvenile and adult DM.

INTRODUCTION

Idiopathic inflammatory myopathies are a group of autoimmune diseases that can affect the muscles, skin, lungs, joints and other organs. The EULAR/American College of Rheumatology (ACR) classification of 2017

Key messages

What is already known about this subject?

- There is an unmet need for type I interferon biomarkers in rheumatic musculoskeletal diseases.
- Sialic acid binding Ig-like lectin 1 (SIGLEC1) is part of the type I interferon signature and transcripts are upregulated in various autoimmune diseases (eg, SLE, dermatomyositis).
- SIGLEC1 is expressed on the surface of monocytes and thus is easily assessable by flow cytometry.

What does this study add?

- An activation of the type I interferon system in idiopathic inflammatory myopathies can be identified by flow cytometry analysing SIGLEC1 expression. SIGLEC1 correlated to disease activity and improvement under therapy in juvenile and adult dermatomyositis.

How might this impact on clinical practice or further developments?

- SIGLEC1 expression is a suitable biomarker for monitoring type I interferon activation in rheumatic musculoskeletal diseases, which has clinical implications for patient stratification and treatment decision making especially in the context of interferon inhibitory therapies.

divides them into dermatomyositis, polymyositis and inclusion body myositis.¹ However, increasing knowledge about subentities such as antisynthetase syndrome and immune-mediated necrotising myopathy, and the discovery of new myositis-specific autoantibodies, has led to even more differentiation. Furthermore, the existence of polymyositis has recently been challenged.²⁻⁴ Serum creatine kinase is used in clinical practice for diagnosis and monitoring of disease activity despite its shortcomings in subtypes of dermatomyositis.^{5,6}

Studies have pointed out a crucial role of type I interferons in the etiopathogenesis of connective tissue diseases such as systemic lupus erythematosus and idiopathic inflammatory myopathies,^{7,8} and therefore, have become therapeutic targets of interest.^{9–12} An upregulation of type I interferon-inducible transcripts was found in peripheral blood, muscle and skin biopsy specimens, particularly in patients with adult and juvenile dermatomyositis, showing a correlation with disease activity in adult and juvenile dermatomyositis.^{7,13–20} However, type I interferon activation varies individually and is frequently not present. Thus, an easy assessable type I interferon biomarker for patient stratification and disease activity monitoring in routine clinical diagnostics is highly needed.²¹

Analysing the type I interferon signature in whole blood, SIGLEC1 (sialic acid binding Ig-like lectin 1, CD169), although monocyte restricted, was found to be a highly upregulated transcript in patients with adult and juvenile dermatomyositis, systemic lupus erythematosus and various genetic interferonopathies.^{13, 22–25} However, the whole blood type I interferon signature is influenced by potentially disruptive factors (such as changes in immune blood cell distribution) that prevent optimal longitudinal comparative analysis.²⁶ Moreover, PCR testing and interpretation can be challenging and time-consuming. Hence, a cell-specific approach to analysing type I interferon activity by measuring cell surface expression of SIGLEC1 on monocytes by flow cytometry could be advantageous.²⁶ The utility of SIGLEC1 assessment by flow cytometry has been shown very recently in juvenile dermatomyositis,²⁷ adult and juvenile systemic lupus erythematosus,^{25, 28–31} systemic sclerosis,³² Sjögren's syndrome,³³ genetic interferonopathies³⁴ and viral infections including COVID-19,³⁵ but has not been analysed in adult dermatomyositis and other subtypes of idiopathic inflammatory myopathies.

The aim of this study was to analyse the usefulness of flow cytometric measurement of SIGLEC1 expression on monocytes as a biomarker for type I interferon activity in patients with idiopathic inflammatory myopathies, and to determine if SIGLEC1 expression in blood correlates with disease activity, specific autoantibody profiles, response to treatment and type I interferon activity in skeletal muscle biopsies.

MATERIALS AND METHODS

Study population

Adult and Paediatric Rheumatology of Charité - Universitätsmedizin Berlin's hospital electronic patient record system was searched (MG and TR) for patients with a diagnosis of dermatomyositis, polymyositis, antisynthetase syndrome, inclusion body myositis, immune-mediated necrotising myopathy or overlap myositis and at least one flow cytometric measurement of SIGLEC1 expression on monocytes during the period between July 2015 and May

2020. Control groups consisted of patients with systemic lupus erythematosus and healthy individuals.

Laboratory measurement of SIGLEC1 and autoantibodies

Blood samples for the analysis of SIGLEC1 (CD169) expression on monocytes, creatine kinase and autoantibody profiles were obtained on an outpatient or inpatient basis as part of routine diagnostics at the Charité - Universitätsmedizin Berlin, and they were analysed at Labor Berlin - Charité Vivantes.

SIGLEC1 expression in whole blood was determined by flow cytometry using a highly standardised quantitative assay (online supplemental eText S1), as described by Stuckrad *et al.*²⁸ The CD169/SIGLEC-1 assay is an accredited method according to EN ISO 15189. Standardisation procedure of this method is based on a protocol based on a flow cytometric assay to quantify HLA-DR expression on monocytes.³⁶ The lower limit of quantitation of this assay was 1200 monoclonal antibodies bound per cell (mAb/cell). The reference range for the expression of SIGLEC1 in healthy controls was determined to be less than 2400 mAb/cell.

Screening for IgG antinuclear antibodies (ANA) in human serum was performed as part of the routine diagnostics using the AESKUSLIDES ANA-HEp-2 indirect immunofluorescence assay from AESKU.GROUP (Wendelsheim, Germany). Qualitative determination of ANA (SS-A 52, SS-A 60, SS-B, RNP-70, Sm, RNP/Sm, Scl-70, centromere B and Jo1) in human serum was performed using the ANACombi ELISA from Orgentec (Mainz, Germany). Myositis-specific (anti-NXP2, anti-TIF1 γ , anti-MDA5, anti-SRP, anti-Mi2, anti-OJ, anti-EJ, anti-PL7, anti-PL12, anti-Jo1 and anti-SAE) and myositis-associated autoantibodies (anti-Ku, anti-PM75, anti-PM100 and anti-Ro52) were determined in serum using the EUROLINE Autoimmune Inflammatory Myopathies 16 Ag line immunoassay (Euroimmun, Lübeck, Germany). Anti-HMGCR antibodies were determined using QUANTA Flash (Inova Diagnostics, San Diego, California, USA).

Assessment of disease activity

Juvenile patients with idiopathic inflammatory myopathies were routinely evaluated with the Childhood Myositis Assessment Scale (CMAS) by a trained physiotherapist at the time of their visit, as described by Rider *et al.*³⁷ CMAS is a validated tool to measure muscle strength and endurance in juvenile idiopathic inflammatory myopathies.^{37,38} Physiotherapists were not informed about laboratory parameters, such as creatine kinase or SIGLEC1 expression. The Physician Global Assessment (PGA), with scores ranging from 0 (no disease activity) to 10 (high disease activity), was used to rate overall disease activity in juveniles and adults. If PGA data was missing in the medical records, it was determined retrospectively by two experienced rheumatologists (US and SLvS) based on all available information except for SIGLEC1 expression. Visit 1 was defined as the date of the patient's first

SIGLEC1 expression measurement at our clinic. We did not investigate an association of SIGLEC1 with clinical manifestations in dermatomyositis and antisynthetase syndrome since the heterogeneity of these diseases resulted in a low number of patients in each subgroup, which may result in false positive findings and invalid conclusions from statistical analysis.

Response to treatment analysis

To assess a clinically meaningful response to treatment in juvenile and adult patients with dermatomyositis we included all patients with (A) active disease (PGA ≥ 5) on the first visit (B) a follow-up visit in a time frame of 3 to 12 months and (C) reduction of PGA by at least 20% (as proposed by Rider *et al.*³⁹).

Assessment of type I interferon activity in muscle biopsies

Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) and myxovirus resistance protein A (MxA) reflect the type I interferon activity⁴⁰ and their protein expression can be assessed by immunohistochemical (IHC) analysis. Fixation of the muscle was done by standard cryofixation in methylbutane precooled in liquid nitrogen at a temperature of -120°C . The tissue was mounted on tissueTek on a cork plate and was moved in small circles for 60 s in the alcohol. Briefly, 7–8 μm cryosections of skeletal muscle biopsies were stained using MxA (Santa Cruz polyclonal, Mx1/2/3, H-285, sc-50509, 1:100) and ISG15 (Abcam, clone ab14374, 1:50) as the primary antibodies, and IHC analysis was performed using the iVIEW DAB (3,3'-diaminobenzidine) Benchm. Detection Kit 05266157001/760-091 (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA), as previously described.^{41 42} The kit specifically detects mouse IgG, IgM and rabbit IgG antibodies bound to antigen and the specific antibody is located by a biotin-conjugated secondary antibody. Following this, a streptavidin enzyme (streptavidin-HRP) conjugates with the biotin-bound secondary antibody and visualisation is made possible via hydrogen peroxide substrate and DAB, producing a brown precipitate. Appropriate biotinylated secondary antibodies were used for signal amplification, and visualisation of the reaction product was carried out on a Benchmark XT immunostainer (Ventana) using a standardised procedure. As previously described, MxA and ISG15 staining in the cytoplasm was considered positive except for necrotic or regenerating fibres. Fibres with equivocally faint staining were considered negative.^{41 42} Appropriate positive and negative controls (tissue reactions) were used where necessary. Additionally, normal muscle or physiological control (eg, staining of arterioles by C5b-9, MHC class I positivity of capillaries) were used as negative control for all reactions. Negative control staining with an irrelevant antibody is presented in online supplemental eFigure S8. Biopsies were included in this study only if performed within 7 days of SIGLEC1 measurement in blood.

Statistical analysis

Quantitative data are presented as mean (range) or median (IQR), and qualitative data are presented as

absolute numbers (percentage). The Mann-Whitney U test (MWU) was used to compare groups with non-normally distributed data. Spearman's rank test was used to evaluate correlations between SIGLEC1 or creatine kinase and disease activity scores (PGA, CMAS). Receiver operating characteristic curves were plotted to compare the capability of SIGLEC1 and creatine kinase to distinguish between active (PGA ≥ 5) and inactive disease (PGA < 5).

Longitudinal data analyses were performed using a two-level mixed-effects linear regression model. Standardised beta coefficients (betaST) were reported to compare the strength of association between the following parameters of interest: (1) CMAS score and SIGLEC1/creatinine kinase, respectively, in juvenile dermatomyositis and (2) PGA score and SIGLEC1/creatinine kinase, respectively, in adult dermatomyositis. Clinically meaningful response to treatment was analysed using Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Linear mixed models analyses were performed with STATA V.12.1, and Graphpad Prism V.9.1.2 was used for all other data analyses and graphs. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Patient and public involvement

Patients and/or the public were not involved in the design, conduct, reporting or dissemination of this research.

RESULTS

Study population

Seventy-four patients with confirmed diagnoses of idiopathic inflammatory myopathies were included (table 1) and 44 patients were excluded due to unclear diagnoses and/or insufficient clinical data. According to the EULAR/ACR criteria for idiopathic inflammatory myopathies,¹ 82.4%–100% of the patients with adult and juvenile dermatomyositis, antisynthetase syndrome and inclusion body myositis had a probable or definite diagnosis. This was the case for only 62.6% of the patients with immune-mediated necrotising myopathy, however, these diagnoses were conclusive according to clinical and morphological criteria, as discussed at the 224th ENMC International Workshop.⁴³ The 'overlap' group consisted of 22 patients with overlap myositis (n=16), mixed connective tissue disease (n=5) and systemic sclerosis (n=1). No patient with isolated polymyositis as an independent entity could be identified in the time frame of 5 years.

SIGLEC1 expression in inflammatory myopathies and control groups

Adult and juvenile dermatomyositis patients expressed high levels of SIGLEC1 (median, 5876 and 5272 mAb/cell) (figure 1 and table 1). SIGLEC1 was upregulated in all newly diagnosed juvenile dermatomyositis patients (n=4, median, 13735 mAb/cell) and in 77.8% (n=7) of the newly diagnosed adult dermatomyositis patients (n=9, median, 9812 mAb/cell). There was no significant

Table 1 Patient characteristics

Patient characteristics	Adult DM (n=21)	Juvenile DM (n=17)	AS (n=19)	IMNM (adult +juvenile) (n=8)	IBM (n=9)	Control 1: Overlap (adult +juvenile) (n=22)	Control 2: SLE (n=30)	Control 3: Healthy individuals (n=19)
Female, n (%)	10 (47.6)	9 (53)	10 (52.6)	3 (37.5)	6 (66.6)	20 (90.9)	26 (86.67)	10 (52.63)
Age at diagnosis, years, mean (range)	52.3 (20–84)	9 (2–16)	53.3 (17–77)	56.9 (6–86)	67 (52–79)	39.5 (10–77)	41.7 (19–70)	ND (18–62)
Time since first diagnosis*, n (%)								
<3 months	10 (47.6)	7 (41.2)	6 (31.6)	4 (50)	0	8 (36.4)	14 (46.7)	NA
3–12 months	3 (14.3)	2 (11.8)	5 (26.3)	2 (25)	1 (11)	3 (13.7)	3 (10)	NA
>12 months	8 (38)	8 (47.1)	8 (42.1)	2 (25)	8 (89)	11 (50)	13 (43.3)	NA
SIGLEC1 expression, mAb/cell, median (IQR)*	5876 (1211–10282)	5272 (1200–12691)	1580 (1200–3390)	1246 (1200–1853)	1949 (1306–4602)	1661 (1200–6915)	7947 (3695–11924)	1200 (1200–1200)
CK, U/l, median (IQR)*	109 (74.5–442.5), NR=1	218.5 (116.3–1988), NR=1	627 (102.3–2173), NR=1	2118 (445.8–4353)	497 (322.5–988.5), NR=1	421 (68–962.3), NR=4	62.5 (45.4–97.3)	ND
CRP, mg/L, median (IQR)*	4.95 (0.7–24), NR=1	0.8 (0.3–3.3), NR=2	5.5 (1.9–29.1), NR=1	2.75 (0.68–11.3), NR=2	3.3 (1.3–33), NR=1	3.0 (0.9–7.4), NR=2	2.4 (0.7–17.3)	ND
Biopsy-confirmed IIM diagnosis/performed biopsies	14/15	6/7	7/9	6/7	9/9	0/10	NA	NA
'Definite' or 'probable' IIM as per EULAR/ACR criteria, n (%)	19 (90.5)	13 (82.4)	17 (89.5)	5 (62.6)	9 (100%)	NA	NA	NA
PGA, mean (range)*	6 (2–10)	4.4 (0–8)	5.4 (2–9)	4.9 (2–8)	4.22 (3–6)	4.5 (3–9), NR=7	NA	NA
CMAS, mean (range)†	NA	35 (2–52), NR=4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SLEDAI-2k, mean (range)*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	6.6 (0–24)	NA
Prednisolone, no of patients (mean in mg/day on visit 1)	12 (66.1 mg/day)	9 (8.3 mg/day), NR=1	16 (13.3 mg/day)	4 (13.1 mg/day)	3 (7.5 mg/day)	9 (6.9 mg/day), NR=1	17 (NR)	NA
Other medication*, n (%)								
Hydroxychloroquine/chloroquine	1 (4.8)	2 (11.8)	3 (15.8)	–	–	3 (13.7)	10 (33.3)	NA
Intravenous immunoglobulin	2 (9.5)	2 (11.8)	1 (5.3)	1 (12.5)	1 (11.1)	–	–	NA
Methotrexate	1 (4.8)	6 (35.3)	3 (15.8)	1 (12.5)	1 (11.1)	4 (18.2)	1 (3.3)	NA
Rituximab	–	–	2 (10.5)	–	1 (11.1)	–	–	NA
JAK inhibitor	3 (14.3)	–	–	–	–	–	–	NA
MMF/CsA/Cyc/AZA	5 (23.8)	3 (17.6)	5 (26.3)	2 (25)	–	3 (13.7)	6 (20)	NA
No medication	8 (38.1)	7 (41.2)	3 (15.8)	4 (50)	5 (55.6)	10 (45.5)	13 (43.3)	19 (100)

*On first visit with assessment of SIGLEC1.

†On first visit with assessment of SIGLEC1 and CMAS.

ACR, American College of Rheumatology; AS, antisynthetase syndrome; AZA, azathioprine; CK, creatine kinase; CMAS, Childhood Myositis Assessment Scale; CRP, C reactive protein; CsA, ciclosporin; A; Cyc, cyclophosphamide; DM, dermatomyositis; IBM, inclusion body myositis; IIM, idiopathic inflammatory myopathies; IMNM, immune-mediated necrotising myopathy; JAK, Janus Kinase; Mab, monoclonal antibody; MCTD, mixed connective tissue disease; MMF, mycophenolate mofetil; n, absolute value; NA, not applicable; ND, not determined; NR, not reported; PGA, physician global assessment; SIGLEC1, sialic acid binding Ig-like lectin 1; SLE, systemic lupus erythematosus; SLEDAI-2k, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000.

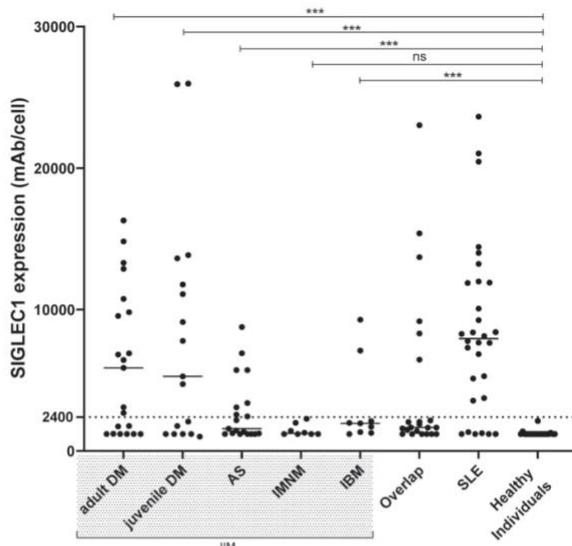


Figure 1 SIGLEC1 expression on monocytes of all patients at first visit. Horizontal bars show median values. Mann-Whitney U test was used to compare patients with the following idiopathic inflammatory myopathies (IIM)—adult (n=21) and juvenile (n=17) dermatomyositis (DM), antisynthetase syndrome (AS, n=18), immune-mediated necrotising myopathy (IMNM, n=8), inclusion body myositis (IBM, n=9)—with healthy individuals (n=19); ***p<0.001; ns, not significant; SIGLEC1, sialic acid binding Ig-like lectin 1; SLE, systemic lupus erythematosus.

difference in SIGLEC1 expression between adult/juvenile dermatomyositis and systemic lupus erythematosus (systemic lupus erythematosus vs adult dermatomyositis: $p=0.172$; systemic lupus erythematosus vs juvenile dermatomyositis: $p=0.485$; MWU). Elevated SIGLEC1 expression was observed in two patients with inclusion body myositis (both anti-Ro52⁺, one anti-U1RNP⁺ and anti-Ku⁺). In the overlap group, six patients showed elevated SIGLEC1 levels: four with mixed connective tissue disease (anti-U1RNP⁺), one with anti-Ku antibodies, and one with overlap to juvenile systemic lupus erythematosus. In patients with systemic lupus erythematosus, SIGLEC1 correlated with the systemic lupus erythematosus disease activity index-2k ($r=0.46$, $p=0.013$, Spearman's r).

SIGLEC1 expression and disease activity

To determine if SIGLEC1 expression is associated with disease activity, each subgroup of idiopathic inflammatory myopathies was divided into two groups by PGA score: PGA<5 (no to moderate disease activity) and PGA≥5 (moderate to severe disease activity) (figures 2 and 3). There was a significant difference between the two groups in adult dermatomyositis ($p<0.001$, MWU) and juvenile dermatomyositis ($p<0.001$, MWU). SIGLEC1 levels generally correlated with PGA levels in adult and juvenile dermatomyositis (adult dermatomyositis: $r=0.81$, $p<0.001$ and juvenile dermatomyositis:

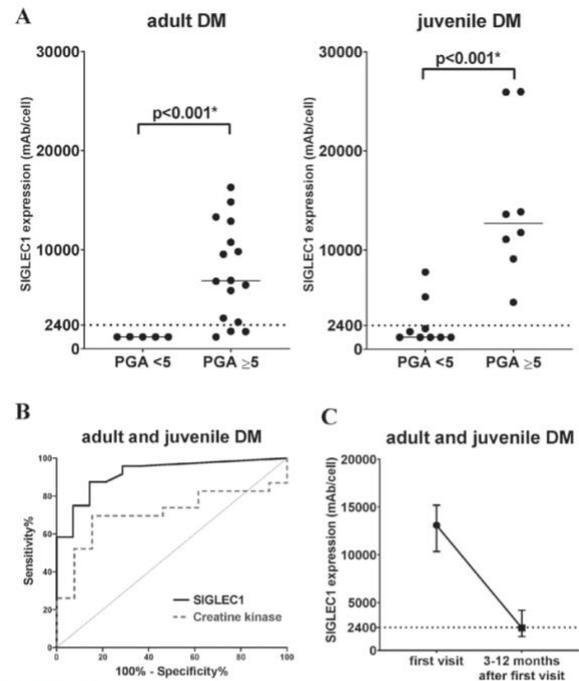


Figure 2 SIGLEC1 expression in DM patients (A) adult and juvenile DM subgroups (n=21/n=17) are separated by PGA score: PGA <5 (no to moderate disease activity) and PGA ≥5 (moderate to severe disease activity). Horizontal bars show median values; asterisks (*) represent significant results ($p<0.05$). The Mann-Whitney U test was used to compare groups. (B) Receiver operating characteristic curves for SIGLEC1 and creatine kinase in juvenile and adult DM (n=38). The curves show the ability of each biomarker to distinguish between patients with PGA ≥5 (moderate to severe disease activity) and PGA <5 (no to moderate disease activity): SIGLEC1: AUC=0.92, 95% CI 0.83 to 1; $p<0.001$; CK: AUC=0.71; 95% CI 0.54 to 0.89; $p=0.04$ (C) SIGLEC1 expression in adult and juvenile DM patients with a clinically meaningful improvement between the first visit and 3–12 months after the first visit (n=14, $p<0.01$, Wilcoxon test). The median and IQR for each time point is shown. AUC, area under the curve; DM, dermatomyositis; PGA, physician global assessment; SIGLEC1, sialic acid binding Ig-like lectin 1.

$r=0.80$, $p<0.001$; Spearman's r) (online supplemental eFigure S3). We also analysed the capability of SIGLEC1 and creatine kinase to distinguish between PGA <5 and PGA ≥5 and found a high area under the curve (AUC) for SIGLEC1 in dermatomyositis (AUC=0.92, $p<0.001$) and both dermatomyositis subgroups (juvenile dermatomyositis: AUC=0.97, $p=0.001$; adult dermatomyositis: AUC=0.96, $p=0.002$). The AUC was lower for creatine kinase (dermatomyositis: AUC=0.71; $p=0.04$; juvenile dermatomyositis: AUC=0.94, $p=0.003$; adult dermatomyositis: AUC=0.60, $p=0.513$) (figure 2 and online supplemental eFigure S1). To identify the best cut-off point for SIGLEC1 in dermatomyositis, we applied the

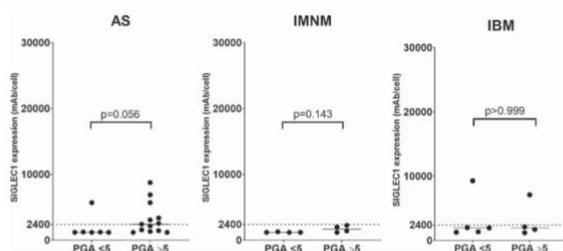


Figure 3 SIGLEC1 expression versus disease activity in AS, IMNM and IBM subgroups, separated by PGA score: PGA <5 (no to moderate disease activity) and PGA ≥5 (moderate to severe disease activity). Horizontal bars show median values. The Mann-Whitney U test was used to compare groups. AS, antisynthetase syndrome; IBM, inclusion body myositis; IMNM, immune-mediated necrotising myopathy; PGA, Physician Global Assessment; SIGLEC1, sialic acid binding Ig-like lectin 1.

Youden-index ($J = \text{sensitivity} + \text{specificity} - 1$) and found a lower threshold of 2383 mAb/monocyte (sensitivity 87,5%; specificity 85,71%), with a positive predictive value of 91.3%. In juvenile dermatomyositis, SIGLEC1 correlated with CMAS ($r = -0.57$, $p = 0.046$; Spearman's r) in cross-sectional analysis, while creatine kinase showed no significant correlation with CMAS ($r = -0.40$, $p = 0.180$, Spearman's r) (online supplemental eFigure S2).

In the longitudinal analyses based on a total of 65 visits by 12 juvenile dermatomyositis patients (SIGLEC1 vs CMAS) and 45 visits by 14 adult dermatomyositis patients (SIGLEC1 vs PGA), SIGLEC1 correlated with disease activity in juvenile (SIGLEC1 vs CMAS: $\text{betaST} = -0.70$, $p < 0.001$) and adult dermatomyositis (SIGLEC1 vs PGA: $\text{betaST} = 0.54$, $p < 0.001$) (table 2). The correlations between disease activity and SIGLEC1 were stronger than those between disease activity and creatine kinase in all analyses. The increase or decrease of SIGLEC1 between two consecutive visits was associated with changes in disease activity scores. Results for creatine kinase were not significant. Longitudinal graphs of biomarkers and disease activity are presented in online supplemental eFigure S4 and S5.

Fourteen patients with dermatomyositis (adult, $n = 6$ and juvenile, $n = 8$) fulfilled the inclusion criteria for our response to treatment analysis. Between the two visits, there was a significant reduction of SIGLEC1 expression (median of differences -10059 , IQR -6058 to -12152 , $p < 0.01$, Wilcoxon test) (figure 2). PGA scores between the respective visits improved by -76.5% (median of differences, IQR -63% to -91%). Medication for the treatment were as followed: Prednisolone ($n = 14$), Methotrexate ($n = 9$), Intravenous Immunoglobulin ($n = 9$), Hydroxychloroquine ($n = 4$), Azathioprine ($n = 3$), Cyclophosphamide ($n = 2$).

No significant correlation between SIGLEC1 and disease activity was detected in patients with antisynthetase syndrome, inclusion body myositis or immune-mediated

necrotising myopathy (figure 3 and online supplemental eFigure S3).

SIGLEC1 expression and myositis-specific autoantibodies

Subgroup analysis of juvenile and adult dermatomyositis patients with moderate to high disease activity (PGA ≥5) revealed elevated SIGLEC1 expression in 5/5 patients with TIF1 γ -antibodies, 6/7 with MDA5-antibodies, 4/5 with NXP2-antibodies and 2/3 with Mi2-antibodies. Those with immune-mediated necrotising myopathy-associated antibodies (anti-SRP, anti-HMGCR) had consistently low SIGLEC1 expression (figure 4).

Comparison of SIGLEC1 expression on monocytes with ISG15/MxA status in muscle tissue

Of the 17 muscle samples eligible for IHC staining (inclusion criteria: 7 days or less between SIGLEC1 measurement and muscle biopsy), 7 (41.2%) were positive for ISG15 and/or MxA. The average time between SIGLEC1-measurement and muscle biopsy was 3 days (range: 0–7 days). All muscle biopsy patients that were positive for ISG15/MxA (in staining) had elevated SIGLEC1 expression on monocytes in peripheral blood (figure 5), but one patient with antisynthetase syndrome had only minimal elevation (2449 mAb/cell). Three patients with upregulation of SIGLEC1 expression had a negative ISG15/MxA status and were diagnosed with dermatomyositis: one had anti-TIF1 γ antibodies, one did not have any myositis-specific autoantibodies, and one had anti-MDA5⁺ amyopathic dermatomyositis. One patient with inclusion body myositis who was positive for SIGLEC1 expression on monocytes and in IHC staining in muscle biopsy was also positive for anti-Ku, anti-U1RNP and anti-Ro52 antibodies (online supplemental eTable S1).

DISCUSSION

We found that SIGLEC1 expression on monocytes correlated with disease activity in patients with juvenile and adult dermatomyositis. Clinically meaningful improvement under therapy was associated with a significant decrease in SIGLEC1 expression. These results are in line with studies that analysed type I interferon transcripts,^{13–19} but with the advantage of being easily assessable by flow cytometry. Very recently, Lerkvaleekul *et al*²⁷ published data of SIGLEC1 in 21 patients with newly diagnosed juvenile dermatomyositis. They found, that SIGLEC1 expression correlated to disease activity and was superior to predict treatment response compared with an ISG score consisting of five genes. Our results validate the findings in juvenile dermatomyositis and by that underline the potential of SIGLEC1 in clinical routine diagnostics.

In our study, SIGLEC1 could distinguish between active and inactive disease in adult and juvenile dermatomyositis patients with a large AUC. In this context, published results in a comment suggest the utility of direct assessment of interferon by using a highly sensitive interferon-alpha single-molecule array (SIMOA) digital ELISA in

Table 2 Results of longitudinal analyses comparing SIGLEC1 and CK with disease activity scores (CMAS/PGA) for (A) 12 juvenile and (B) 14 adult dermatomyositis patients

A: Patients with juvenile dermatomyositis		
Do SIGLEC1/CK correlate with CMAS over time?		
CMAS—all values*	n=65 betaST=-0.70; p<0.001 95% CI -0.85 to -0.54	n=87 betaST=-0.39; p<0.001 95% CI -0.57 to -0.21
CMAS—visits with complete data (SIGLEC1 and CK)†	n=53 betaST=-0.65; p<0.001 95% CI -0.80 to -0.49	n=53 betaST=-0.50; p<0.001 95% CI -0.66 to -0.33
Is the change of SIGLEC1/CK associated with a change in CMAS? Change between visits (Δ Visit _{t-1} and visit _t):		
CMAS—all values*	n=28 betaST=-0.53; p<0.001 95% CI -0.77 to -0.29	n=41 betaST=-0.27; p=0.051 95% CI -0.62 to -0.08
CMAS—visits with complete data (SIGLEC1 and CK)†	n=16 betaST=-0.42; p<0.001 95% CI -0.71 to -0.14	n=16 betaST=-0.14; p=0.566 95% CI -0.39 to 0.11
B: Patients with adult dermatomyositis		
Do SIGLEC1/CK correlate with PGA over time?		
PGA—all values*	n=45 betaST=0.54; p<0.001 95% CI 0.34 to 0.74	n=41 betaST=0.17; p=0.149 95% CI -0.11 to 0.45
PGA—visits with complete data (SIGLEC1 and CK)†	n=41 betaST=0.52; p<0.001 95% CI 0.32 to 0.72	n=41 betaST=0.17; p=0.149 95% CI -0.11 to 0.45
Is the change of SIGLEC1/CK associated with a change in PGA? Change between visits (Δ visit _{t-1} and visit _t):		
PGA—all values*	n=31 betaST=0.48; p=0.003 95% CI 0.16 to 0.79	n=25 betaST=-0.10; p=0.634 95% CI -0.45 to 0.27
PGA—visits with complete data (SIGLEC1 and CK)†	n=25 betaST=0.60; p=0.001 95% CI 0.29 to 0.91	n=25 betaST=-0.10; p=0.634 95% CI -0.45 to 0.27

Statistical analysis was performed using a two-level mixed-effects linear regression model.

*SIGLEC1 and CK values were analysed independently of each other.

†Included only those visits where both biomarkers (SIGLEC1 and CK) were assessed (complete-case analysis).

betaST, standardised beta coefficient; CK, creatine kinase; CMAS, Childhood Myositis Assessment Scale; n, number of analysed values; PGA, Physician Global Assessment; SIGLEC1, sialic acid binding Ig-like lectin 1.

juvenile dermatomyositis.⁴⁴ SIMOA technology is of special interest, since direct measurement of interferon alpha using ELISA has been shown to have a low sensitivity in systemic lupus erythematosus.²⁹ A direct comparison of these two type I interferon biomarkers would be highly interesting, as they are both candidates for routine clinical diagnostics.

In this study, expression of SIGLEC1—which is mostly type I interferon regulated^{34–35}—was lower in antisynthetase syndrome than in dermatomyositis. It has been proposed that type II interferons might play a more prominent role in the etiopathogenesis of antisynthetase syndrome.^{40–46} However, Reed *et al* found high interferon scores (including IP-10, I-TAC and MCP-1) in patients with antisynthetase syndrome.⁴⁷ We also identified patients with high expression of SIGLEC1 indicating

a type I interferon response. This interesting finding warrants further investigation.

Two of our nine patients with inclusion body myositis exhibited high expression of SIGLEC1: both were positive for anti-Ro and one was also positive for anti-U1RNP autoantibodies, which are known to induce type I interferons.⁴⁸ Sjogren's syndrome could be excluded. One of these anti-U1RNP⁺ inclusion body myositis patients was also analysed for MxA/ISG15 in muscle tissue and showed an unusual positive staining on myofibers (cf. patient AD010). Data on the role of interferons in inclusion body myositis are inconsistent and need to be clarified.^{40–49–50} The detection of an activated type I interferon system might have important treatment implications in this debilitating chronic disease.

³Department of Neuropathology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Germany

⁴Department of Neurology, Tokyo Metropolitan Neurological Hospital, Fuchu, Tokyo, Japan

⁵German Rheumatism Research Center Berlin – a Leibniz Institute (DRFZ), Berlin, Germany

⁶Department of Immunology, Labor Berlin - Charité Vivantes GmbH, Berlin, Germany

⁷Department of Dermatology and Allergy, Dermatological Allergology, Allergie-Centrum-Charité, Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Germany

Twitter Martin Krusche @kruschmartin

Contributors Conceptualisation and manuscript preparation: MG and TR. Coordination of the study: TR. Acquisition of data: US, TR, SLvS, TK, RB, TB, MK and MG. Data of patients with systemic lupus erythematosus: RB and LZ-P. Data of healthy individuals: NU and CM. Data of immunohistochemical staining: AU and WS. Statistical analysis: JK, MG and TR. Preparation of figures and tables: MG and TR. Interpretation of the data: TR, US, MG, GRB, FH, AU, WS and TK. All authors commented on the manuscript draft and approved the final version of the manuscript. TR is responsible for the overall content as guarantor.

Funding This research was funded by the German Research Foundation (DFG, Transregio TRR130, Project 15).

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Not applicable.

Ethics approval Prior approval for this study was obtained from the local ethics committee of the Charité - Universitätsmedizin Berlin (application number: EA2/094/19). Informed consent was not necessary for this retrospective study.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement Data are available on reasonable request. The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

ORCID iDs

Manuel Graf <http://orcid.org/0000-0003-0475-0063>

Jens Klotsche <http://orcid.org/0000-0002-2954-5755>

Martin Krusche <http://orcid.org/0000-0002-0582-7790>

Gerd R Burmester <http://orcid.org/0000-0001-7518-1131>

Tilmann Kallinich <http://orcid.org/0000-0003-2404-9397>

Thomas Rose <http://orcid.org/0000-0003-3628-1775>

REFERENCES

- Lundberg IE, Tjärnlund A, Bottai M, et al. 2017 European League against Rheumatism/American College of rheumatology classification criteria for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies and their major subgroups. *Ann Rheum Dis* 2017;76:1955–64.
- Allenbach Y, Benveniste O, Goebel H-H, et al. Integrated classification of inflammatory myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2017;43:62–81.
- Mariampillai K, Granger B, Amelin D, et al. Development of a new classification system for idiopathic inflammatory myopathies based on clinical manifestations and myositis-specific autoantibodies. *JAMA Neurol* 2018;75:1528–37.
- Tanboon J, Uruha A, Stenzel W, et al. Where are we moving in the classification of idiopathic inflammatory myopathies? *Curr Opin Neurol* 2020;33:590–603.
- Mathur T, Manadan AM, Thiagarajan S, et al. The utility of serum aldolase in normal creatine kinase dermatomyositis. *J Clin Rheumatol* 2014;20:47–8.
- Allenbach Y, Uzunhan Y, Toquet S, et al. Different phenotypes in dermatomyositis associated with anti-MDA5 antibody: study of 121 cases. *Neurology* 2020;95:e70–8.
- Gallay L, Mouchiroud G, Chazaub B. Interferon-signature in idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 2019;31:634–42.
- Rose T, Dörner T. Drivers of the immunopathogenesis in systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2017;31:321–33.
- Ladislau L, Suárez-Calvet X, Toquet S, et al. Jak inhibitor improves type I interferon induced damage: proof of concept in dermatomyositis. *Brain* 2018;141:1609–21.
- Morand EF, Furie R, Tanaka Y, et al. Trial of Anifrolumab in active systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2020;382:211–21.
- Paik JJ, Casciola-Rosen L, Shin JY, et al. Study of tofacitinib in refractory dermatomyositis: an Open-Label pilot study of ten patients. *Arthritis Rheumatol* 2021;73:858–65.
- Kurasawa K, Arai S, Namiki Y, et al. Tofacitinib for refractory interstitial lung diseases in anti-melanoma differentiation-associated 5 gene antibody-positive dermatomyositis. *Rheumatology* 2018;57:2114–9.
- Huard C, Gullà SV, Bennett DV, et al. Correlation of cutaneous disease activity with type 1 interferon gene signature and interferon β in dermatomyositis. *Br J Dermatol* 2017;176:1224–30.
- Bilgic H, Ytterberg SR, Amin S, et al. Interleukin-6 and type I interferon-regulated genes and chemokines mark disease activity in dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 2009;60:3436–46.
- Greenberg SA, Higgs BW, Morehouse C, et al. Relationship between disease activity and type 1 interferon- and other cytokine-inducible gene expression in blood in dermatomyositis and polymyositis. *Genes Immun* 2012;13:207–13.
- Baechler EC, Bauer JW, Slattery CA, et al. An interferon signature in the peripheral blood of dermatomyositis patients is associated with disease activity. *Mol Med* 2007;13:59–68.
- O'Connor KA, Abbott KA, Sabin B, et al. Mxa gene expression in juvenile dermatomyositis peripheral blood mononuclear cells: association with muscle involvement. *Clin Immunol* 2006;120:319–25.
- Walsh RJ, Kong SW, Yao Y, et al. Type I interferon-inducible gene expression in blood is present and reflects disease activity in dermatomyositis and polymyositis. *Arthritis Rheum* 2007;56:3784–92.
- Reed AM, Peterson E, Bilgic H, et al. Changes in novel biomarkers of disease activity in juvenile and adult dermatomyositis are sensitive biomarkers of disease course. *Arthritis Rheum* 2012;64:4078–86.
- Greenberg SA. Dermatomyositis and type 1 interferons. *Curr Rheumatol Rep* 2010;12:198–203.
- Benveniste O, Goebel H-H, Stenzel W. Biomarkers in inflammatory Myopathies-An expanded definition. *Front Neurol* 2019;10:554.
- Rice GI, Melki I, Frémond M-L, et al. Assessment of type I interferon signaling in pediatric inflammatory disease. *J Clin Immunol* 2017;37:123–32.
- Rice GI, Forte GMA, Szykiewicz M, et al. Assessment of interferon-related biomarkers in Aicardi-Goutières syndrome associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, and ADAR: a case-control study. *Lancet Neurol* 2013;12:1159–69.
- Yao Y, Higgs BW, Morehouse C, et al. Development of potential pharmacodynamic and diagnostic markers for Anti-IFN- α monoclonal antibody trials in systemic lupus erythematosus. *Hum Genomics* 2009;2009. doi:10.4061/2009/374312. [Epub ahead of print: 17 Nov 2009].
- Biesen R, Demir C, Barkhudarova F, et al. Sialic acid-binding Ig-like lectin 1 expression in inflammatory and resident monocytes is a potential biomarker for monitoring disease activity and success of therapy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2008;58:1136–45.
- Strauß R, Rose T, Flint SM, et al. Type I interferon as a biomarker in autoimmunity and viral infection: a leukocyte subset-specific analysis unveils hidden diagnostic options. *J Mol Med* 2017;95:753–65.
- Lerkvaleekul B, Veldkamp SR, van der Wal MM, et al. Siglec-1 expression on monocytes is associated with the interferon signature in juvenile dermatomyositis and can predict treatment response. *Rheumatology* 2021:keab601.
- Stuckrad SLvon, Klotsche J, Biesen R, et al. SIGLEC1 (CD169) is a sensitive biomarker for the deterioration of the clinical course in childhood systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2020;29:1914–25.
- Rose T, Grützkau A, Hirsland H, et al. Ifn α and its response proteins, IP-10 and SIGLEC-1, are biomarkers of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1639–45.
- Aue A, Szelinski F, Weissenberg SY, et al. Elevated STAT1 expression but not phosphorylation in lupus B cells correlates with disease activity and increased plasmablast susceptibility. *Rheumatology* 2020;59:3435–42.
- Rose T, Grützkau A, Klotsche J, et al. Are interferon-related biomarkers advantageous for monitoring disease activity in



- systemic lupus erythematosus? A longitudinal benchmark study. *Rheumatology* 2017;56:1618–26.
- 32 York MR, Nagai T, Mangini AJ, *et al.* A macrophage marker, Siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and Toll-like receptor agonists. *Arthritis Rheum* 2007;56:1010–20.
- 33 Rose T, Szelinski F, Lisney A, *et al.* SIGLEC1 is a biomarker of disease activity and indicates extraglandular manifestation in primary Sjögren's syndrome. *RMD Open* 2016;2:e000292.
- 34 Orak B, Ngoumou G, Ebstein F, *et al.* SIGLEC1 (CD169) as a potential diagnostic screening marker for monogenic interferonopathies. *Pediatr Allergy Immunol* 2021;32:621–5.
- 35 Doehn J-M, Tabeling C, Biesen R, *et al.* CD169/SIGLEC1 is expressed on circulating monocytes in COVID-19 and expression levels are associated with disease severity. *Infection* 2021;49:757–62.
- 36 Döcke W-D, Höfllich C, Davis KA, *et al.* Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem* 2005;51:2341–7.
- 37 Rider LG, Werth VP, Huber AM, *et al.* Measures of adult and juvenile dermatomyositis, polymyositis, and inclusion body myositis: Physician and Patient/Parent Global Activity, Manual Muscle Testing (MMT), Health Assessment Questionnaire (HAQ)/Childhood Health Assessment Questionnaire (C-HAQ). *Arthritis Care Res* 2011;63:S118–57.
- 38 Huber AM, Feldman BM, Rennebohm RM, *et al.* Validation and clinical significance of the childhood myositis assessment scale for assessment of muscle function in the juvenile idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Rheum* 2004;50:1595–603.
- 39 Rider LG, Giannini EH, Harris-Love M, *et al.* Defining clinical improvement in adult and juvenile myositis. *J Rheumatol* 2003;30:603–17.
- 40 Pinal-Fernandez I, Casal-Dominguez M, Derfoul A, *et al.* Identification of distinctive interferon gene signatures in different types of myositis. *Neurology* 2019;93:e1193–204.
- 41 Uruha A, Allenbach Y, Charuel J-L, *et al.* Diagnostic potential of sarcoplasmic myxovirus resistance protein A expression in subsets of dermatomyositis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2019;45:513–22.
- 42 Uruha A, Nishikawa A, Tsuburaya RS, *et al.* Sarcoplasmic MxA expression: a valuable marker of dermatomyositis. *Neurology* 2017;88:493–500.
- 43 Allenbach Y, Mammen AL, Benveniste O, *et al.* 224th ENMC International workshop: Clinico-sero-pathological classification of immune-mediated necrotizing myopathies Zandvoort, the Netherlands, 14–16 October 2016. *Neuromuscul Disord* 2018;28:87–99.
- 44 Melki I, Devilliers H, Gitiaux C, *et al.* Circulating interferon- α measured with a highly sensitive assay as a biomarker for juvenile inflammatory myositis activity: Comment on the article by Mathian *et al.* *Arthritis Rheumatol* 2020;72:195–7.
- 45 Bourgoin P, Biéché G, Ait Belkacem I, *et al.* Role of the interferons in CD64 and CD169 expressions in whole blood: relevance in the balance between viral- or bacterial-oriented immune responses. *Immun Inflamm Dis* 2020;8:106–23.
- 46 Rigolet M, Hou C, Baba Amer Y, *et al.* Distinct interferon signatures stratify inflammatory and dysimmune myopathies. *RMD Open* 2019;5:e000811.
- 47 Reed AM, Crowson CS, Hein M, *et al.* Biologic predictors of clinical improvement in rituximab-treated refractory myositis. *BMC Musculoskelet Disord* 2015;16:257.
- 48 Savarese E, Chae O-wha, Trowitzsch S, *et al.* U1 small nuclear ribonucleoprotein immune complexes induce type I interferon in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Blood* 2006;107:3229–34.
- 49 Ekholm L, Vosslander S, Tjärnlund A, *et al.* Autoantibody specificities and type I interferon pathway activation in idiopathic inflammatory myopathies. *Scand J Immunol* 2016;84:100–9.
- 50 Roos A, Preusse C, Hathazi D, *et al.* Proteomic profiling unravels a key role of specific macrophage subtypes in sporadic inclusion body myositis. *Front Immunol* 2019;10:1040.

2.4 Die diagnostische Bedeutung von SIGLEC1 bei der systemischen Sklerose

Höppner, J., Casteleyn, V., Biesen, R., Rose, T., Windisch, W., Burmester, G.R., Siegert, E., 2022. SIGLEC-1 in Systemic Sclerosis: A Useful Biomarker for Differential Diagnosis. *Pharmaceuticals* 15, 1198.
Originalpublikation: <https://doi.org/10.3390/ph15101198>

Es wurde eine prospektive Studie von 203 Patientinnen und Patienten mit gesicherter SSc mit der Frage nach klinischen Assoziationen zur SIGLEC1 Expressionshöhe durchgeführt. Die SIGLEC1 Expressionshöhe bei der SSc wurde mit anderen systemischen Autoimmunkrankheiten und gesunden Probandinnen und Probanden verglichen. Es zeigte sich, dass die Expressionshöhe im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht ist, aber deutlich niedriger ist als beispielsweise bei Patientinnen und Patienten mit einem SLE. Es konnte eine Assoziation von SIGLEC1 mit einer reduzierten forcierten Vitalkapazität (FVC) festgestellt werden, aber nicht zu anderen Manifestationen, wie beispielsweise Muskel- oder Herzbeteiligung. Patientinnen und Patienten mit erhöhter SIGLEC1 Expression zeigten im Vergleich zu Patientinnen und Patienten ohne eine erhöhte SIGLEC1-Expression eine verminderte FVC auf. Auch bei der Hautbeteiligung, die mittels dem modified rodnan skin score (MRSS) erhoben wurde, konnte keine Assoziation zu einer erhöhten Expression von SIGLEC1 festgestellt werden. Es konnte eine deutlich erhöhte SIGLEC1 Expression bei Patientinnen und Patienten mit Mischkollagenose festgestellt werden. Zusammenfassend ist die diagnostische Bedeutung der Erfassung der Typ I IFN Aktivierung mittels

SIGLEC1 bei der SSc unklar. Die Assoziation mit der erniedrigten FVC ist interessant und muss in weiteren Studien untersucht werden. Klinische Studien, die die Wirksamkeit einer Typ I IFN inhibitorischen Therapie überprüfen, werden hier weitere Aufschlüsse zulassen.



Article

SIGLEC-1 in Systemic Sclerosis: A Useful Biomarker for Differential Diagnosis

Jakob Höppner ^{1,2}, Vincent Casteleyn ¹, Robert Biesen ¹, Thomas Rose ¹, Wolfram Windisch ², Gerd Rüdiger Burmester ¹ and Elise Siegert ^{1,3,*}

¹ Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité—Universitätsmedizin Berlin, 10117 Berlin, Germany

² Department of Pulmonology, Cologne Merheim Hospital, Kliniken der Stadt Köln gGmbH, Witten/Herdecke University, 51067 Cologne, Germany

³ Berlin Institute of Health at Charité—Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

* Correspondence: elise.siegert@charite.de

† Charité—Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin.



Citation: Höppner, J.; Casteleyn, V.; Biesen, R.; Rose, T.; Windisch, W.; Burmester, G.R.; Siegert, E. SIGLEC-1 in Systemic Sclerosis: A Useful Biomarker for Differential Diagnosis. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 1198. <https://doi.org/10.3390/ph15101198>

Academic Editors: Barbara Ruaro, Murray Baron, Edoardo Rosato, Romeo Martini and Marco Confalonieri

Received: 7 September 2022

Accepted: 24 September 2022

Published: 28 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Systemic Sclerosis (SSc) is a clinically heterogeneous disease that includes an upregulation of type I interferons (IFNs). The aim of this observational study was to investigate the IFN-regulated protein Sialic Acid-Binding Ig-like Lectin 1 (SIGLEC-1) as a biomarker for disease phenotype, therapeutic response, and differential diagnosis in SSc. Levels of SIGLEC-1 expression on monocytes of 203 SSc patients were determined in a cross-sectional and longitudinal analysis using multi-color flow cytometry, then compared to 119 patients with other rheumatic diseases and 13 healthy controls. SSc patients higher SIGLEC-1 expression on monocytes (2097.94 ± 2134.39) than HCs (1167.45 ± 380.93 ; $p = 0.49$), but significantly lower levels than SLE (8761.66 ± 8325.74 ; $p < 0.001$) and MCTD (6414.50 ± 1846.55 ; $p < 0.001$) patients. A positive SIGLEC-1 signature was associated with reduced forced expiratory volume ($p = 0.007$); however, we were unable to find an association with fibrotic or vascular disease manifestations. SIGLEC-1 remained stable over time and was independent of changes in immunosuppressive therapy. However, SIGLEC-1 is suitable for differentiating SSc from other connective tissue diseases. SIGLEC-1 expression on monocytes can be useful in the differential diagnosis of connective tissue disease but not as a biomarker for SSc disease manifestations or activity.

Keywords: Systemic Sclerosis; SIGLEC-1; biomarker; interferon; treatment; cytokines

1. Introduction

Systemic Sclerosis (SSc) is a rare connective tissue disease that is characterized by the triad of microangiopathy, fibrotic complications and immunological abnormalities that include both innate and adaptive immunity [1–3]. One of the autoimmune phenomena is the production of characteristic and distinct serum autoantibodies detected in most patients as well as the presence of inflammatory cells with a prominent type I interferon (IFN) signature in circulating and tissue-infiltrating immune cells [4–13].

Activation of the type I IFN pathway is present in several rheumatic diseases including systemic lupus erythematosus (SLE), primary Sjögren syndrome (pSS), rheumatoid arthritis (RA), and others. While the direct detection of IFNs in plasma using ELISA is problematic and unreliable, several previous studies have attempted to establish indirect interferon markers, such as IFN regulated proteins, as biomarkers indirect IFN-markers in rheumatic diseases [8–13]. As sialic acid binding Ig like lectin 1 (SIGLEC-1), an IFN-induced adhesion molecule on monocytes [14], is one of the most prominent type I IFN-regulated genes, it has been the most promising marker so far. In pSS, SIGLEC-1 expression on peripheral blood monocytes could characterize patients with extraglandular involvement and high

disease activity [15]. For myositis, SIGLEC-1 was found to be a candidate biomarker to assess type I IFN activity. It proved useful for monitoring disease activity and response to treatment in juvenile and adult dermatomyositis [16,17]. In addition, SIGLEC-1 has been shown to be elevated in RA [18], autoimmune thyroiditis [19], and primary biliary cholangitis (PBC) [20].

The most extensive data on the robustness of SIGLEC-1 as a biomarker for disease activity so far exists for SLE [21]. Biesen et al. were able to show that the frequency of SIGLEC-1-expressing monocytes correlates with disease activity and was inversely correlated with levels of complement factors. Moreover, glucocorticoid treatment resulted in a reduction in SIGLEC-1 expression in cells from adult patients with active SLE [22]. In addition, SIGLEC-1 expression was found to be a sensitive biomarker for adjusting disease activity in childhood SLE [23], and it has prognostic value for identifying SLE patients at risk for developing renal complications [13].

For SSc, the data is less clear. York et al. showed that IFN could induce SIGLEC-1 expression in SSc monocytes [10], and Farina et al. were able to show that SIGLEC-1 RNA expression in skin biopsies taken from fibrotic skin correlates with modified Rodnan skin score (mRSS) [24]. Moreover, Eloranta et al. found an association for IFN α and the interferon-inducible protein-10 (IP-10) in sera of SSc patients with cardiac involvement, signs of PAH, and a history of digital ulcers [25]. However, York et al. [10] and others were previously unable to demonstrate any differences with regard to skin involvement or organ complications in SSc patients for SIGLEC-1 expression on monocytes or soluble SIGLEC-1 in patient serum, respectively [13,26].

A further complication in SSc is that activity scores are poorly validated or can only be applied to specific subgroups, e.g., dcSSc [27]. Accordingly, it has been notoriously difficult to find appropriate biomarkers. Ideally, biomarkers that indicate general disease activity or specific organ manifestations, or that predict therapeutic response, would also be of great use in clinical practice.

The objective of the present study was to assess whether the expression of SIGLEC-1 on CD14⁺ cells via flow cytometry could serve as a useful biomarker for disease manifestation, including pulmonary or vascular complications and therapeutic response in SSc.

2. Results

2.1. Patients

203 SSc patients, 32 SLE, 16 pSS, 8 MCTD, 26 IIM, 14 UCTD, 23 RA, and 13 HCs were included in this study. Demographic data are shown in Table 1. Our SSc cohort was representative of the skewed proportion between females and males (84%/16%), as well as the proportions of patients with limited or diffuse cutaneous SSc and the age profile (46.67 ± 14.80 years at diagnosis) typical for Caucasian SSc patients (Table 2) [28]. A total of 115 SSc patients (56.7%) received immunosuppression, while 88 SSc patients were without immunosuppressive therapy. In addition, 28.9% of SSc patients on immunosuppressive therapy received hydroxychloroquine (in combination or alone). Comprehensive laboratory results were available for 97% of all SSc patients, pulmonary function test results were available for 83%, and echocardiography results for 60%.

As expected, SLE patients were slightly younger and pSS patients slightly older, which is in accordance with the expected age at disease onset for these conditions. Similarly, disease duration for UCTD patients is short, as many of them will later develop a distinct connective tissue disease.

Table 1. Demographic characteristics.

	SSc <i>n</i> = 203	SLE <i>n</i> = 32	pSS <i>n</i> = 16	MCTD <i>n</i> = 8	UCTD <i>n</i> = 14	IIM <i>n</i> = 26	RA <i>n</i> = 23	HC <i>n</i> = 13
Sex								
No. (%) female	171 (84.2)	28 (87.5)	15 (93.8)	8 (100.0)	9 (64.3)	16 (61.5)	17 (73.9)	10 (76.9)
No. (%) male	32 (15.8)	4 (12.5)	1 (6.2)	0 (0.0)	5 (35.7)	10 (38.5)	6 (26.1)	3 (23.1)
Age (mean ± SD; yrs)								
At diagnosis	57.84 ± 14.31	41.45 ± 12.70	66.00 ± 9.69	56.63 ± 19.15	58.93 ± 11.57	61.85 ± 14.42	62.44 ± 14.69	55.95 ± 15.49
Disease duration (mean ± SD; yrs)	10.15 ± 8.81	8.83 ± 8.58	8.17 ± 6.45	9.80 ± 9.42	0.50 ± 0.58	3.00 ± 2.77	10.72 ± 12.02	N/A
Antinuclear antibody positive, no. (%)	186 (92.1%)	31 (96.9%)	15 (93.7)	8 (100%)	12 (85.5)	15 (57.7)	8 (34.8%)	2 (15.3)

HC = healthy control; IIM = idiopathic inflammatory myositis; MCTD = mixed connective tissue disease; pSS = primary Sjögren's Syndrome; RA = rheumatoid arthritis; SD = standard deviation; SLE = Systemic lupus erythematosus; SSc = Systemic Sclerosis; UCTD = undifferentiated connective tissue disease; yrs = years; disease duration refers to the time since first non-Raynaud symptom in SSc.

Table 2. Clinical and serologic characteristics of SSc patients.

	All SSc Patients (<i>n</i> = 203)	Negative SIGLEC-1 Signature (<i>n</i> = 158)	Positive SIGLEC-1 Signature (<i>n</i> = 45)	<i>p</i> Value
Cutaneous subset—<i>n</i> (%)				
diffuse (dcSSc)	64 (31.5)	47 (29.7)	17 (37.8)	0.306
limited (lcSSc)	122 (60.1)	99 (62.7)	23 (51.1)	0.163
sine scleroderma (ssSSc)	17 (8.4)	12 (7.6)	5 (11.1)	0.453
Immunological findings				
ANA	186 (94.4)	147 (93.0)	39 (86.7)	0.825
ACA	71 (35.0)	58 (36.7)	13 (18.3)	0.332
Topo-1	76 (37.4)	58 (36.7)	18 (28.9)	0.687
RP3	16 (7.9)	11 (7.0)	5 (11.1)	0.339
SSc organ manifestations, <i>n</i> (%)				
Raynaud's phenomenon	181 (89.2)	144 (91.1)	37 (82.2)	0.090
ILD	91 (44.8)	70 (44.3)	21 (46.7)	0.779
PAH	19 (9.4)	15 (9.5)	4 (8.9)	0.902
DU	97 (47.8)	76 (48.1)	21 (46.7)	0.865
Cardiac involvement	12 (5.9)	7 (4.4)	5 (11.1)	0.094
SRC	8 (3.9)	5 (3.2)	3 (6.7)	0.287
Myositis	10 (4.9)	8 (5.1)	2 (4.4)	0.866
Laboratory values (mean ± SD)				
NT-pro-BNP— ng/L	451.09 ± 1174.33	392.14 ± 947.07	646.29 ± 1726.65	0.204
CRP—mg/dl	4.36 ± 9.70	4.00 ± 9.72	5.78 ± 9.60	0.279
Hb—mg/dl	13.10 ± 1.62	13.10 ± 1.62	13.15 ± 1.66	0.815
Neutrophil granulocytes	5.54 ± 2.63	5.66 ± 2.67	5.15 ± 2.46	0.275
Cardiopulmonary parameters (mean ± SD)				
FVC—%/exp.	89.27 ± 20.16	91.34 ± 20.10	81.40 ± 18.70	0.007
FEV1—%/exp.	86.30 ± 20.78	87.20 ± 21.53	83.00 ± 17.66	0.283
DLCO—%/exp.	57.29 ± 18.91	58.29 ± 19.49	53.49 ± 16.19	0.195
LVEF—%/exp.	62.27 ± 9.63	63.03 ± 9.08	59.44 ± 11.22	0.098

CRP, C-reactive protein; DLCO, diffusing capacity for carbon monoxide; FEV1, forced expiratory volume per second; FVC, forced vital capacity; Hb, hemoglobin; ILD, interstitial lung disease; L, liter; LVEF, left ventricular ejection fraction; *n*, number; NT-proBNP, N-terminal-pro-brain natriuretic peptide; PAH, pulmonary arterial hypertension; SRC, scleroderma renal crisis; %/exp, percent expected.

2.2. SIGLEC-1 Expression in SSc and Control Groups

Comparing SIGLEC-1 expression on CD14⁺ monocytes in the peripheral blood of SSc patients to HCs, nearly half of SSc patients (47.8%) had monocyte SIGLEC-1 expression which was barely above the level of the HCs. Statistically, the expression of SIGLEC-1 (molecules/monocyte) was not significantly increased in SSc patients compared with HCs (2097.94 ± 2134.39 vs. 1167.45 ± 380.93 , $p = 0.49$; Figure 1A).

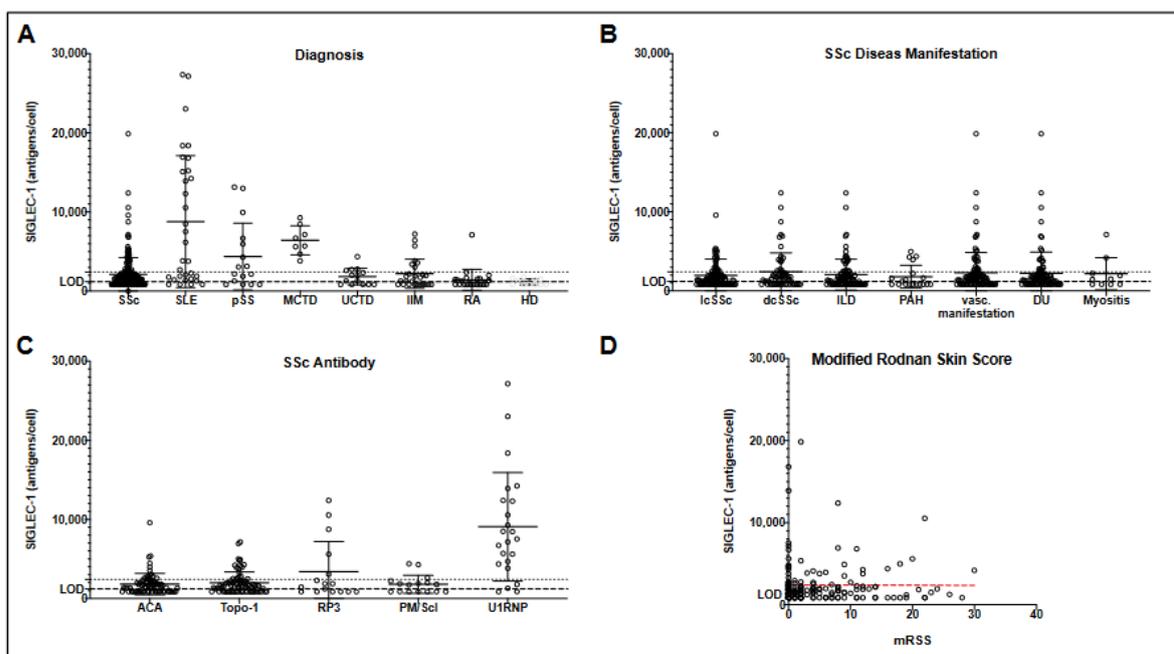


Figure 1. Expression analysis of sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 1 (CD169/SIGLEC-1) on circulating monocytes. (A): In patients with SSc, SLE, SS, MCTD, UCTD, IIM, RA, and HDs; (B): SSc disease manifestations, including limited (lcSSc) and diffuse (dcSSc) skin involvement, interstitial lung disease (ILD), pulmonary arterial hypertension (PAH), vascular manifestations (referring to PAH, digital ulcers, and scleroderma renal crisis), digital ulcers (DU), and SSc-associated myositis; (C): SSc specific antibodies, including anti-centromer antibodies (ACA), anti-topoisomerase-1 antibodies (Topo-1), RNA-polymerase 3 antibodies (RP3), PM/Scl and U1RNP antibodies. (D): Correlation of modified Rodnan Skin Score (mRSS) and SIGLEC-1. The dashed line indicates the lower detection limit of 1200 molecules/monocyte. Values below the limit of detection (LOD) are shown as $\text{LOD}/\sqrt{2}$. The dotted line indicates the reference range for SIGLEC-1 expression.

In SSc patients, there was no difference between those who were receiving immunosuppression and those who were not (2164.94 ± 2385.49 vs. 1962.54 ± 1417.75 , $p = 0.47$). In patients receiving hydroxychloroquine, there were also no differences when compared with those taking other immunosuppressive medications or with all SSc patients (with and without immunosuppression) (1510.60 ± 1157.08 vs. 2466.24 ± 2754.94 , $p = 0.34$ and 1510.60 ± 1157.08 vs. 2358.18 ± 2406.02 , $p = 0.24$).

When compared to other connective tissue diseases (CTDs) SIGLEC-1 expression was highest in SLE (8761.66 ± 8325.74), followed by MCTD (6414.50 ± 1846.55) and pSS (4371.69 ± 4227.89). RA (1425.22 ± 1312.69) and UCTD (1826.00 ± 1051.36) patients showed no elevated SIGLEC-1 expression when compared to HCs (1167.45 ± 380.93). Defining positive SIGLEC-1 expression as more than 2400 SIGLEC-1 molecules/monocyte, 45/203 (21.0%) SSc patients, 19/32 (59.4%) SLE, 8/16 (50.0%) pSS, 8/8 (100%) MCTD, 7/26 (26.9%) IIM, 4/14 (28.6%) UCTD, 1/23 (7.7%) RA, and 0/13 (0.0%) HCs had increased SIGLEC-1

levels. There was no correlation with either disease duration or age (r 0.007, r^2 0.00 and r 0.11, r^2 0.01) in SSc patients.

2.3. SIGLEC-1 Expression and SSc Manifestations

When comparing SIGLEC-1 expression of SSc patients according to the different organ manifestations, SIGLEC-1 positive SSc patients showed significantly impaired forced vital capacity (FVC) (81.39 ± 18.67 vs. 91.34 ± 20.09 ; $p = 0.007$); however, no differences were found regarding the prevalence of ILD (46.7% vs. 44.3%; $p = 0.779$), and there was no difference in absolute SIGLEC-1 expression between patients with and without ILD (2068.89 ± 1963.12 vs. 2129.13 ± 2266.90 ; $p = 0.427$) (Tab 2 and Figure 1B). When analyzing the different SSc manifestations according to SIGLEC-1 positivity, it could be found in 23/122 (18.9%) lcSSc patients; 17/64 (25.0%) dcSSc patients; 21/91 (19.8%) patients with ILD; 4/19 (21.1%) PAH patients; 26/111 (22.5%) patients with vascular complications including PAH, DU, and SRC, 21/97 (20.6%); and 2/10 (20.0%) patients with myositis (Table 2). SIGLEC-1 positive patients tended to a higher prevalence of cardiac involvement (11.1% vs. 4.4%; $p = 0.094$) and a reduced left ventricular ejection fraction (LVEF) (59.44 ± 11.22 vs. 63.03 ± 9.08 ; $p = 0.098$).

2.4. SIGLEC-1 Expression and SSc-Specific Autoantibodies

In U1RNP positive SSc patients, SIGLEC-1 expression was strongly increased (9055.04 ± 6862.59) compared to other SSc autoantibodies ($p = 0.003$). Moreover, compared to all SSc patients, RP3 positive patients tended to have increased SIGLEC-1 expression (3376.94 ± 3821.81 vs. 1984.86 ± 1899.83 , $p = 0.136$) (Figure 1C). Interestingly, this group showed a significantly higher mRSS compared to other SSc patients (13.38 ± 8.35 vs. 5.86 ± 6.70 , $p = 0.003$).

2.5. Association of SIGLEC-1 Expression and mRSS

When investigating all SSc patients included in our study, no correlation was detected between the level of SIGLEC-1 expression and skin involvement quantified by mRSS using a linear regression model (r^2 0.01 and r 0.09; Figure 1D). As mentioned above, there was no significant difference in SIGLEC-1 expression between dcSSc patients and lcSSc patients (2430.48 ± 2384.46 vs. 1959.05 ± 2089.78 , $p = 0.16$).

2.6. Longitudinal SIGLEC-1 Expression in Treated and Untreated SSc Patients

For 62 SSc patients, follow-up SIGLEC-1 measurements were available after an average of 281 days (± 175 days). The median change in SIGLEC-1 expression was 0.00 (interquartile range [IQR] 962.00). The vast majority ($n = 49$; 79.0%) of individuals with available longitudinal samples remained in their respective SIGLEC-1 high or low category over that follow-up period (Figure 2). Of the remaining patients, three increased from negative SIGLEC-1 to positive and ten patients changed vice versa. There were no significant changes in SIGLEC-1 expression over the follow-up period. This was also true for patients with constant immunosuppression and for patients without immunosuppression during follow-up (paired t -test $p = 0.30$ and $p = 0.05$; Figure 2A,B). Similarly, there was no effect of the change in therapy on SIGLEC-1 expression. Thus, no significant changes were found in either the case of escalation or de-escalation of immunosuppressive therapy (paired t -test $p = 0.48$ and $p = 0.57$; Figure 2C,D).

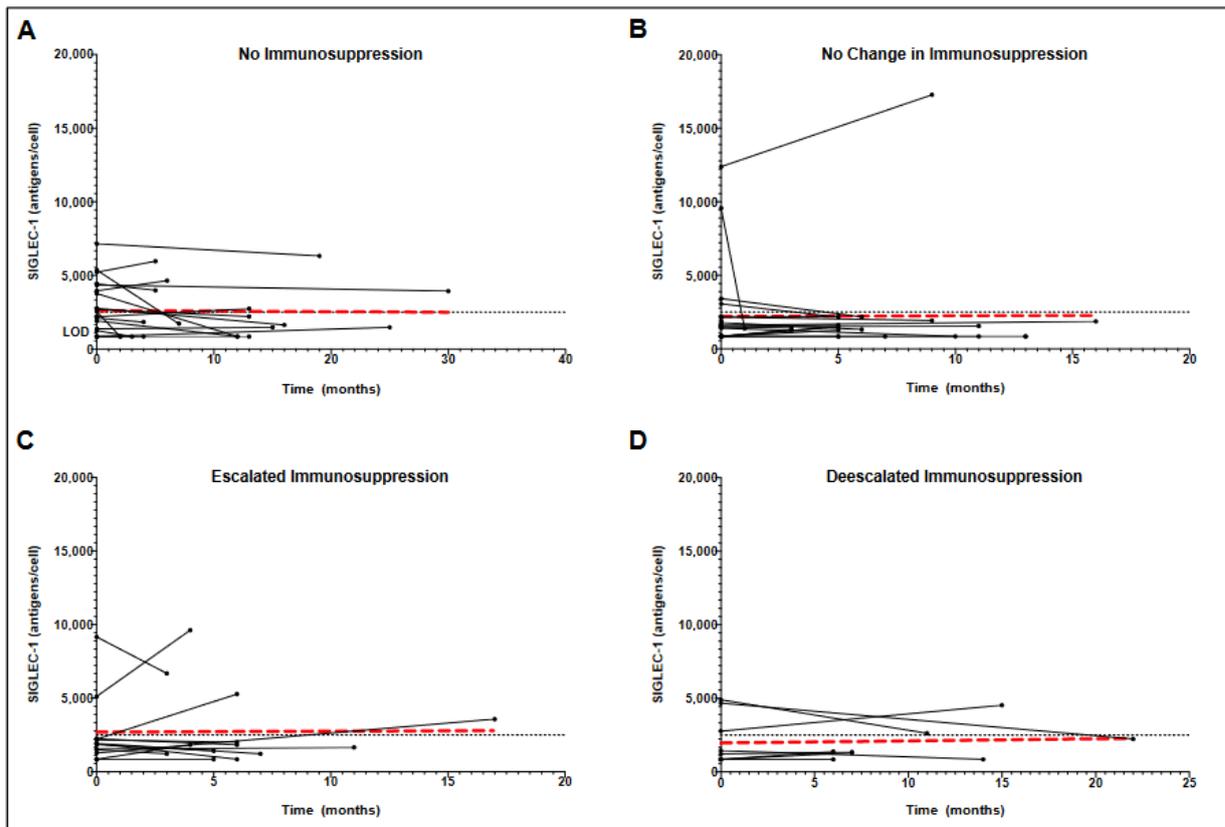


Figure 2. Longitudinal analysis of SIGLEC-1 expression of Systemic Sclerosis (SSc) patients without receiving immunosuppression (A), with unchanged immunosuppression (B), and with escalated (C) or deescalated (D) immunosuppressive therapy. The red dashed line represents the trend of all patients in the respective SSc group.

2.7. SIGLEC-1 as Biomarker in Differential Diagnosis of SSc

SIGLEC-1 expression was significantly increased in SLE and MCTD patients when compared with SSc (8761.66 ± 8325.74 vs. 2097.94 ± 2134.39 ; $p < 0.0001$ and 6414.50 ± 1846.55 vs. 2097.94 ± 2134.39 ; $p = 0.0003$). ROC analysis revealed a SIGLEC-1 expression of 4806 molecules/monocyte as optimal median cut point to differentiate SSc from SLE (sensitivity 93.1%, specificity 50.0%, area under the curve [AUC] = 0.76, Youden's index 0.43; Figure 3A), 3303 molecules/monocyte as optimal cut point to differentiate SSc from MCTD (sensitivity 85.71%, specificity 100%, AUC = 0.95, Youden's index 0.86; Figure 3B), and 3768 molecules/monocyte as optimal cut point to differentiate SSc from SLE or MCTD (sensitivity 87.68%, specificity 62.5%, AUC = 0.80, Youden's index 0.50; Figure 3C). Using our previously established cut-off value of more than 2400 SIGLEC-1 molecules/monocyte to distinguish between positive and negative SIGLEC-1 expression, the sensitivity to distinguish SSc from SLE is 78.33% and the specificity is 59.38% (AUC = 0.76, Youden's index 0.38); to distinguish SSc from MCTD, the sensitivity is 78.33% and the specificity is 100% (AUC = 0.95, Youden's index 0.78); and to distinguish SSc from SLE or MCTD, the sensitivity is 78.33% and the specificity is 67.5% (AUC = 0.80, Youden's index 0.46).

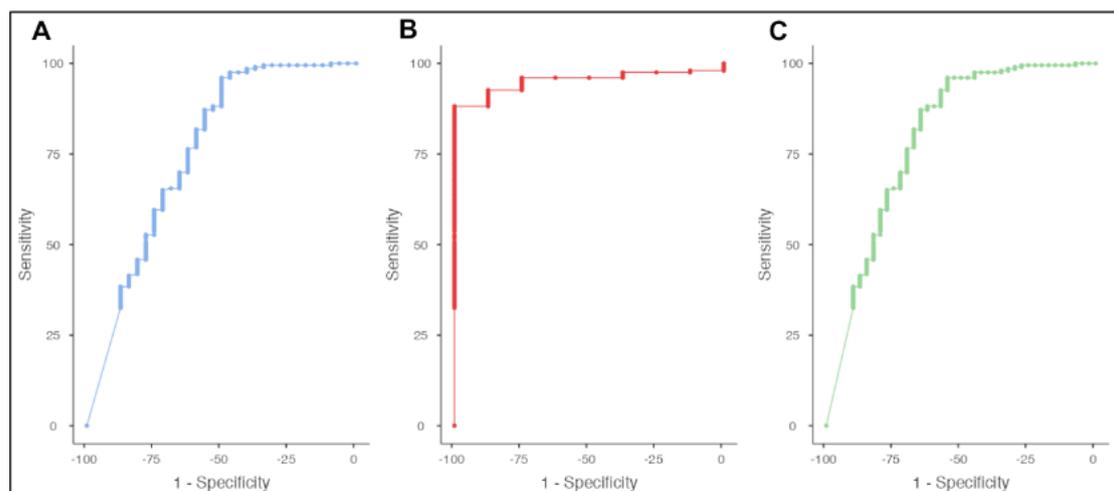


Figure 3. ROC curve analysis of SIGLEC-1 in SSc patients vs. SLE patients (A), SSc patients vs. MCTD patients (B), and SSc patients vs. SLE or MCTD patients (C).

3. Discussion

Over the last few decades, growing evidence suggesting activation of type I IFNs and their pathways in the pathogenesis of SSc has emerged [5,29–32]. Specifically, it was shown that SIGLEC-1 is upregulated both on SSc monocytes and on tissue macrophages [10,22]. Indeed, we could find a trend for elevated SIGLEC-1 expression on monocytes in SSc patients when compared to healthy controls, although we could not find statistical significance. However, this elevation was markedly lower than the one seen in other CTDs. In our study, a positive SIGLEC-1 signature was associated with a reduced FVC; however, we did not observe an association with ILD. In addition, patients with a positive SIGLEC-1 signature tended to have a higher prevalence of cardiac involvement alongside with a reduced LVEF. Our data regarding cardiac involvement fit previous results by Eloranta et al. [25]. However, we were unable to identify further associations. Moreover, we were unable to detect major changes in expression levels over time. A lack of association between SIGLEC-1 level and clinical phenotype has previously been reported by others within smaller cohorts [10,13]. Notably, unlike in dermatomyositis, we were also unable to detect any type-I IFN signature in muscle biopsies of SSc patients [33].

Evaluating the use of SIGLEC-1 as a marker of response to therapy, we found that SIGLEC-1 expression is largely independent of changes in immunosuppression in SSc patients. This is in contrast with previous findings in SLE or pSS, where an effect of immunosuppressive therapy on SIGLEC-1 expression could be seen [15,22]. We did not see any difference regarding SIGLEC-1 levels between patients receiving immunosuppressive treatment and patients who did not, including patients receiving hydroxychloroquine. In fact, hydroxychloroquine blocks Toll-like receptors (TLR) 7 and 9, and was shown to inhibit type I IFN production in SLE [34]. In addition, it was shown in pSS that hydroxychloroquine significantly reduces SIGLEC-1 expression [15]. In our cohort, SIGLEC-1 expression remained largely constant over time in SSc patients, even with increases or decreases in immunosuppressive therapy, including hydroxychloroquine or other drugs such as glucocorticoids, methotrexate, and rituximab which are known to decrease type-I IFN production.

Despite the fact that SIGLEC-1 expression on monocytes might not be a good biomarker in SSc, there are several reports that have demonstrated an upregulation of IFN-regulated proteins, including SIGLEC-1, in SSc skin and other organs affected by fibrotic complications. In biopsy studies, tissue expression of SIGLEC-1 correlated with mRSS [24]. Moreover,

microarray analysis of lung tissues derived from SSc patients revealed that expression of IRGs correlated with progressive ILD [35].

This finding is particularly relevant, as there are now several immunosuppressive medications that target IFN pathways, such as anifrolumab [36,37] and JAK inhibitors [38]. These new medications have shown great potential in the therapy of RA and SLE, and it has been shown that the baseline type I IFN signature predicts the response to anifrolumab therapy in SLE [36]. Interestingly, JAK inhibitors are effective in RA despite relatively low SIGLEC-1 expression [39]. Similarly, there are initial reports suggesting that JAK inhibitors and anifrolumab might have beneficial effects on both vascular and fibrotic manifestations of SSc [40–42].

Our negative findings might reflect the fact that we used a rather insensitive method to determine type-1 IFN activation. Firstly, the determination of several IRGs might be a more sensitive approach. Secondly, quantitative PCR might be more sensitive than the quantitative assessment of a single protein by immunohistochemistry, ELISA, or flow cytometry. Lastly, there might be a discrepancy between local, tissue-specific findings and systemic findings on peripheral blood cells. In line with this, Hesselstrand et al. showed in SSc that the plasma IFN signature remains relatively constant during paquinimod therapy, while the IFN signature in the skin decreases [43].

Limitations of this study include the fact that disease activity in SSc was not assessed by score, and thus there was a lack of correlation between disease activity in SSc and SIGLEC-1 expression. As mentioned earlier, reliable assessment of disease activity in SSc is a major challenge due to the lack of good established tools and scores. We therefore used disease complications as a parameter for disease severity. Nevertheless, even these complications show a great heterogeneity, and the significance must be interpreted with caution. In our cohort, we could not find any effect of immunosuppressive therapy. However, these data were collected in routine clinical practice and were not prospectively evaluated according to a fixed protocol. Another limitation is the small number of patients who were analyzed with newly diagnosed SSc. In these patients with very short disease duration, the benefits of SIGLEC-1 would be interesting and should be investigated in future studies. Nevertheless, we could not find a correlation between SIGLEC-1 and disease duration in the present data. Finally, it should be noted that our results refer to the systemic measurement of SIGLEC-1 in peripheral blood. Other data suggest that IFN markers in tissue may indeed have prognostic value.

Another potential role for SIGLEC-1 expression on monocytes is that of facilitating differential diagnoses. There is sometimes a challenge as to whether a patient with a suspected connective tissue disease has or develops SSc or SLE [44]. In this scenario, the fact that patients with SLE or MCTD showed significantly increased SIGLEC-1 expressions compared with patients with SSc can be used in combination with patients' clinical presentation, as well as the autoantibody profile, to guide early differential diagnosis. As ROC analysis showed, markedly increased SIGLEC-1 expression makes the diagnosis of SLE or MCTD much more likely. Moreover, clinical characteristics of CTD patients may evolve over time, which may result in a "clinical shift" from MCTD to another CTD such as SLE or SSc [45]. We demonstrated that MCTD and SLE patients showed significantly higher SIGLEC-1 expression than SSc patients. These findings fit with previous descriptions of the IFN signature in MCTD patients [4]. Hence, SIGLEC-1 expression could be a useful biomarker to attribute a patient with early and unspecific disease manifestations to a certain phenotype, and then base treatment decisions on this immunological information. Recently, Zorn-Pauly et al. investigated SIGLEC-1 in patients with suspected SLE and revealed that a negative test result for SIGLEC-1 is able to exclude SLE in suspected cases [46]. These data support our approach of using SIGLEC-1 expression to distinguish SSc from other CTDs such as SLE and MCTD.

The key findings of our study are that SIGLEC-1 expression on monocytes is mildly, but not significantly, elevated compared to healthy controls. We were also unable to find clear associations with clinical manifestations or with changes in immunosuppressive

therapy. However, SIGLEC-1 expression may be valuable in differentiating SSc from MCTD or SLE, and showed a clear association with anti-U1RNP antibodies.

4. Material and Methods

4.1. Study Design

For this observational longitudinal study, patients and healthy controls from our center at the Department of Rheumatology, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Germany were recruited. The study protocol was approved by the Charité—Universitätsmedizin Berlin Ethics Committee (EA1/179/17). Written informed consent was obtained from each patient. The study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

4.2. Patients

Patients were included in the study if they agreed to participate and were affected by one of the following rheumatic conditions: SSc, SLE, pSS, mixed connective tissue disease (MCTD), idiopathic inflammatory myositis (IIM), undifferentiated connective tissue disease (UCTD), or RA, and met the respective diagnostic or classification criteria for their rheumatic disease, or if they were healthy without any evidence of acute infection or chronic disease (HC = healthy controls). Diagnostic and classification criteria used were 2013 ACR/EULAR classification criteria for SSc [47], 2019 EULAR/ACR Classification Criteria for SLE [48], and 2016 ACR-EULAR classification criteria for pSS [49]. MCTD was diagnosed according to Alarcon-Segovia et al. [50], 2017 EULAR/ACR for IIM [51] and 2010 ACR/EULAR criteria for RA [52].

Demographic, clinical, and serological data were collected according to standardized procedures. For SSc patients, this included cutaneous subsets, age at onset of Raynaud's phenomenon, age at onset of first non-Raynaud's phenomenon symptom, disease duration, organ involvement, and immunosuppressive therapy at the time the blood samples were taken. Other variables collected included smoking history, digital ulcers (DU), calcinosis, highest mRSS, systemic hypertension, hyperlipidemia, diabetes mellitus, myocardial infarction, angina pectoris, stroke, transitory ischemic attack (TIA), periphery arterial disease (PAD), PAH, interstitial lung disease (ILD), scleroderma renal crisis (SRC), heart involvement, and myositis. Laboratory parameters (C-reactive protein [CRP], neutrophil count, hemoglobin, and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide [NT-proBNP]) were quantified from peripheral blood during clinical routines. Lung function was assessed via spirometry. Diffusing capacity for carbon monoxide (DLCO) was measured using the single-breath method. Spirometry and echocardiography were performed on all patients as part of the annual examinations. If the presence of ILD or PAH was clinically suspected or indicated by these examinations, high-resolution computed tomography (HRCT) or a right-sided heart catheterization was performed. PAH was defined as a mean pulmonary artery pressure of ≥ 25 mmHg and a pulmonary capillary wedge pressure of ≤ 15 mmHg on right-sided heart catheterization. ILD was defined as the presence of pulmonary fibrosis on a high-resolution computed tomography scan evaluated by experienced radiologists. For patients who presented to our centre several times, these data were collected again as part of a follow-up visit.

4.3. Multi-Color Flow Cytometry for SIGLEC-1 Validation

SIGLEC-1 on CD14-positive monocytes was measured as described previously [39]. In brief, EDTA-anticoagulated whole blood was incubated with 10 mL of mouse-anti-human antibody cocktail containing phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD169 monoclonal antibody (mAb) (labeled with a fluorochrome/protein ratio of 1:1), allophycocyanine (APC)-labeled anti-CD14 mAb and Krome Orange-labeled anti-CD45 mAb (all antibodies from Beckman Coulter, Krefeld, Germany). Red blood cells were then lysed by addition of 500 mL of Versa-Lysis solution (Beckman Coulter) to each reaction tube. After incubation, samples were centrifuged. Samples were then washed, acquired on a 10-color flow cytometer, and centrifuged again. They were then stained (Navios, Beckman Coulter) and analyzed

using the Navios software. During each analytical run, QuantiBRITE™ PE tubes (BD Biosciences) were used to convert the fluorescent channel 2 (FL2) mean fluorescent intensity (MFI) signals on CD14⁺ monocytes to monoclonal antibodies bound per cell (mAb/cell) values. FL2 MFI values and absolute values of PE molecules (as given by the manufacturer) for each QuantiBRITE™ bead population were used to perform linear least square regression analysis in order to determine the best calibration value. This was then used to convert the FL2 MFI values of monocytes in the analytical sample into the amount of PE-labeled CD169 mAb bound per monocyte (mAb/monocyte). The reference range for the expression of SIGLEC-1 in healthy controls was determined to be less than 2400 SIGLEC1 molecules/monocyte. SIGLEC-1 expression was assessed via flow cytometry with a detection limit of 1200 molecules/monocyte. Values below the limit of detection (LOD) are shown as LOD/ $\sqrt{2}$.

4.4. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed by using Jamovi version 2.3.1.6 for Mac (the jamovi project, 2021), retrieved from <https://www.jamovi.org> (accessed on 6 September 2022) and GraphPad Prism version 8.4.3 for Mac (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of mean if not otherwise indicated. Data were tested for normal distribution using the Shapiro-Wilk test. The Mann–Whitney U test (non-parametric) or the unpaired t-test (parametric) was performed for continuously distributed variables for the purpose of comparison between the two groups. For the follow-up data, the paired t-test was used, as well as the Wilcoxon rank test for validation. For comparison of more than two groups, data were analyzed by one-way ANOVA (parametric) followed by Dunnett's multiple comparisons test or Kruskal–Wallis test (non-parametric) followed by Dunn's multiple comparisons test. For categorical variables, either the chi-square test or Fisher's exact test was performed. A *p*-value of <0.05 was considered statistically significant. Receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed to define cut off values.

5. Conclusions

We demonstrated in a large cohort that patients with SSc show a slightly elevated SIGLEC-1 expression on monocytes compared to healthy controls, but SIGLEC-1 expression was much lower compared to other CTDs, such as SLE and MCTD. Our data on the use of SIGLEC-1 expression on monocytes as a marker for organ manifestations remain ambiguous, as we did not find any evidence supporting the use of SIGLEC-1 as a biomarker for disease activity or response to therapy in SSc. SIGLEC-1 expression levels remained largely constant during disease progression and were not significantly affected by changes in therapy. On the other hand, we found that SIGLEC-1 is valuable for the early differential diagnosis of SSc and may be helpful in distinguishing SSc from SLE or MCTD.

Author Contributions: Study design: E.S. and J.H.; data collection: J.H., T.R. and V.C.; data analysis: J.H. and E.S.; data interpretation: J.H., E.S., T.R. and R.B. drafting manuscript: J.H. and E.S.; revising manuscript content: V.C., T.R., R.B., W.W., and G.R.B.; Approving final version of manuscript: all authors; J.H. and E.S. take responsibility for the integrity of the data analysis. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: J.H. received the Peter-Scriba Scholarship from the German Society of Internal Medicine (DGIM). We acknowledge financial support from the Open Access Publication Fund of Charité—Universitätsmedizin Berlin and the German Research Foundation (DFG).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Universitätsmedizin Berlin Ethics Committee (protocol code EA1/179/17).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patients to publish this paper.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Denton, C.P.; Khanna, D. Systemic sclerosis. *Lancet* **2017**, *390*, 1685–1699. [CrossRef]
- Gabrielli, A.; Avvedimento, E.V.; Krieg, T. Scleroderma. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 1989–2003. [CrossRef] [PubMed]
- Allanore, Y.; Simms, R.; Distler, O.; Trojanowska, M.; Pope, J.; Denton, C.P.; Varga, J. Systemic sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2015**, *1*, 15002. [CrossRef] [PubMed]
- Assassi, S.; Mayes, M.D.; Arnett, F.C.; Gourh, P.; Agarwal, S.K.; McNearney, T.A.; Chaussabel, D.; Oommen, N.; Fischbach, M.; Shah, K.R.; et al. Systemic sclerosis and lupus: Points in an interferon-mediated continuum. *Arthritis Care Res.* **2010**, *62*, 589–598. [CrossRef]
- Psarras, A.; Emery, P.; Vital, E. Type I interferon-mediated autoimmune diseases: Pathogenesis, diagnosis and targeted therapy. *Rheumatology* **2017**, *56*, 1662–1675. [CrossRef]
- Skaug, B.; Assassi, S. Type I interferon dysregulation in Systemic Sclerosis. *Cytokine* **2019**, *132*, 154635. [CrossRef]
- Ewu, M.; Assassi, S. The Role of Type I Interferon in Systemic Sclerosis. *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 266. [CrossRef]
- Duan, H.; Fleming, J.; Pritchard, D.K.; Amon, L.M.; Xue, J.; Arnett, H.A.; Chen, G.; Breen, P.; Buckner, J.H.; Molitor, J.A.; et al. Combined analysis of monocyte and lymphocyte messenger RNA expression with serum protein profiles in patients with scleroderma. *Arthritis Care Res.* **2008**, *58*, 1465–1474. [CrossRef]
- Brkic, Z.; van Bon, L.; Cossu, M.; van Helden-Meeuwswen, C.G.; Vonk, M.C.; Knaapen, H.; Berg, W.V.D.; A Dalm, V.; Van Daele, P.L.; Severino, A.; et al. The interferon type I signature is present in systemic sclerosis before overt fibrosis and might contribute to its pathogenesis through high BAFF gene expression and high collagen synthesis. *Ann. Rheum. Dis.* **2015**, *75*, 1567–1573. [CrossRef]
- York, M.R.; Nagai, T.; Mangini, A.J.; Lemaire, R.; van Seventer, J.M.; Lafyatis, R. A macrophage marker, siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and toll-like receptor agonists. *Arthritis Care Res.* **2007**, *56*, 1010–1020. [CrossRef]
- Tan, F.K.; Zhou, X.; Mayes, M.D.; Gourh, P.; Guo, X.; Marcum, C.; Jin, L.; Arnett, F.C. Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotrophism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis patients. *Rheumatology* **2006**, *45*, 694–702. [CrossRef]
- Mondini, M.; Vidali, M.; De Andrea, M.; Azzimonti, B.; Airo, P.; D’Ambrosio, R.; Riboldi, P.; Meroni, P.L.; Albano, E.; Shoenfeld, Y.; et al. A novel autoantigen to differentiate limited cutaneous systemic sclerosis from diffuse cutaneous systemic sclerosis: The interferon-inducible gene IFI16. *Arthritis Care Res.* **2006**, *54*, 3939–3944. [CrossRef]
- Oliveira, J.J.; Karrar, S.; Rainbow, D.B.; Pinder, C.L.; Clarke, P.; García, A.R.; Al-Assar, O.; Burling, K.; Morris, S.; Stratton, R.; et al. The plasma biomarker soluble SIGLEC-1 is associated with the type I interferon transcriptional signature, ethnic background and renal disease in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* **2018**, *20*, 152. [CrossRef]
- Pillai, S.; Netravali, I.A.; Cariappa, A.; Mattoo, H. Siglecs and Immune Regulation. *Annu. Rev. Immunol.* **2012**, *30*, 357–392. [CrossRef]
- Rose, T.; Szelinski, F.; Lisney, A.; Reiter, K.; Fleischer, S.J.; Burmester, G.R.; Radbruch, A.; Hiepe, F.; Grützkau, A.; Biesen, R.; et al. SIGLEC1 is a biomarker of disease activity and indicates extraglandular manifestation in primary Sjögren’s syndrome. *RMD Open* **2016**, *2*, e000292. [CrossRef]
- Graf, M.; von Stuckrad, S.L.; Uruha, A.; Klotsche, J.; Zorn-Pauly, L.; Unterwalder, N.; Buttgerit, T.; Krusche, M.; Meisel, C.; Burmester, G.R.; et al. SIGLEC1 enables straightforward assessment of type I interferon activity in idiopathic inflammatory myopathies. *RMD Open* **2022**, *8*, e001934. [CrossRef]
- Lerkvaleekul, B.; Veldkamp, S.R.; van der Wal, M.M.; Schatorjé, E.J.H.; Kamphuis, S.S.M.; Berg, J.M.V.D.; Muller, P.C.E.H.; Armbrust, W.; Vastert, S.J.; Wienke, J.; et al. Siglec-1 expression on monocytes is associated with the interferon signature in juvenile dermatomyositis and can predict treatment response. *Rheumatology* **2021**, *61*, 2144–2155. [CrossRef]
- Xiong, Y.-S.; Cheng, Y.; Lin, Q.-S.; Wu, A.-L.; Yu, J.; Li, C.; Sun, Y.; Zhong, R.-Q.; Wu, L.-J. Increased expression of Siglec-1 on peripheral blood monocytes and its role in mononuclear cell reactivity to autoantigen in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **2013**, *53*, 250–259. [CrossRef]
- Wu, Y.; Guo, Q.; Gong, X.; Sun, W.; Zhang, W.; Zhao, W.; Yang, Y.; Fan, C.; Li, Y.; Teng, W.; et al. Increased expression of Siglec-1 on peripheral blood monocytes and its relationship with inflammatory reaction in autoimmune thyroiditis. *Chin. J. Endocrinol. Metab.* **2019**, *12*, 99–104.
- Bao, G.; Han, Z.; Yan, Z.; Wang, Q.; Zhou, Y.; Yao, D.; Gu, M.; Chen, B.; Chen, S.; Deng, A.; et al. Increased Siglec-1 Expression in Monocytes of Patients with Primary Biliary Cirrhosis. *Immunol. Investig.* **2010**, *39*, 645–660. [CrossRef]
- Rose, T.; Grützkau, A.; Klotsche, J.; Enghard, P.; Flechsig, A.; Keller, J.; Riemekasten, G.; Radbruch, A.; Burmester, G.-R.; Dörner, T.; et al. Are interferon-related biomarkers advantageous for monitoring disease activity in systemic lupus erythematosus? A longitudinal benchmark study. *Rheumatology* **2017**, *56*, 1618–1626. [CrossRef]
- Biesen, R.; Demir, C.; Barkhudarova, F.; Grün, J.R.; Steinbrich-Zöllner, M.; Backhaus, M.; Häupl, T.; Rudwaleit, M.; Riemekasten, G.; Radbruch, A.; et al. Sialic acid-binding Ig-like lectin 1 expression in inflammatory and resident monocytes is a potential biomarker for monitoring disease activity and success of therapy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res.* **2008**, *58*, 1136–1145. [CrossRef]

23. Von Stuckrad, S.L.; Klotsche, J.; Biesen, R.; Lieber, M.; Thumfart, J.; Meisel, C.; Unterwalder, N.; Kallinich, T. SIGLEC1 (CD169) is a sensitive biomarker for the deterioration of the clinical course in childhood systemic lupus erythematosus. *Lupus* **2020**, *29*, 1914–1925. [\[CrossRef\]](#)
24. Farina, G.; Lafyatis, D.; Lemaire, R. A four-gene biomarker predicts skin disease in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Arthritis Care Res.* **2010**, *62*, 580–588. [\[CrossRef\]](#)
25. Eloranta, M.-L.; Franck-Larsson, K.; Lövgren, T.; Kalamajski, S.; Rönnblom, A.; Rubin, K.; Alm, G.V.; Rönnblom, L. Type I interferon system activation and association with disease manifestations in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **2010**, *69*, 1396–1402. [\[CrossRef\]](#)
26. Christmann, R.B.; Hayes, E.; Pendergrass, S.; Padilla, C.; Farina, G.; Affandi, A.J.; Whitfield, M.L.; Farber, H.; Lafyatis, R. Interferon and alternative activation of monocyte/macrophages in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. *Arthritis Care Res.* **2011**, *63*, 1718–1728. [\[CrossRef\]](#)
27. Melsens, K.; De Keyser, F.; Decuman, S.; Piette, Y.; Vandecasteele, E.; Smith, V. Disease activity indices in systemic sclerosis: A systematic literature review. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2016**, *34*, 186–192.
28. Mierau, R.; Moinsadeh, P.; Riemekasten, G.; Melchers, I.; Meurer, M.; Reichenberger, F.; Buslau, M.; Worm, M.; Blank, N.; Hein, R.; et al. Frequency of disease-associated and other nuclear autoantibodies in patients of the German network for systemic scleroderma: Correlation with characteristic clinical features. *Arthritis Res. Ther.* **2011**, *13*, R172. [\[CrossRef\]](#)
29. Ciechomska, M.; Skalska, U. Targeting interferons as a strategy for systemic sclerosis treatment. *Immunol. Lett.* **2018**, *195*, 45–54. [\[CrossRef\]](#)
30. Ciechomska, M.; Cant, R.; Finnigan, J.; van Laar, J.M.; O'Reilly, S. Role of toll-like receptors in systemic sclerosis. *Expert Rev. Mol. Med.* **2013**, *15*, e9. [\[CrossRef\]](#)
31. Muskardin, T.L.W.; Niewold, T.B. Type I interferon in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2018**, *14*, 214–228. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Theofilopoulos, A.N.; Baccala, R.; Beutler, B.; Kono, D.H. Type I interferons (α/β) in immunity and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* **2005**, *23*, 307–336. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Siegert, E.; Uruha, A.; Goebel, H.-H.; Preuß, C.; Casteleyn, V.; Kleefeld, F.; Alten, R.; Burmester, G.R.; Schneider, U.; Höppner, J.; et al. Systemic sclerosis-associated myositis features minimal inflammation and characteristic capillary pathology. *Acta Neuropathol.* **2021**, *141*, 917–927. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Sacre, K.; A Criswell, L.; McCune, J.M. Hydroxychloroquine is associated with impaired interferon-alpha and tumor necrosis factor-alpha production by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* **2012**, *14*, R155. [\[CrossRef\]](#)
35. Christmann, R.B.; Sampaio-Barros, P.; Stifano, G.; Borges, C.L.; Carvalho, C.; Kairalla, R.; Parra, E.R.; Spira, A.; Simms, R.; Capellozzi, V.L.; et al. Association of Interferon- and Transforming Growth Factor β -Regulated Genes and Macrophage Activation With Systemic Sclerosis-Related Progressive Lung Fibrosis. *Arthritis Rheumatol.* **2013**, *66*, 714–725. [\[CrossRef\]](#)
36. Furie, R.; Khamashta, M.; Merrill, J.T.; Werth, V.P.; Kalunian, K.; Brohawn, P.; Illei, G.G.; Drappa, J.; Wang, L.; Yoo, S. Anifrolumab, an Anti-Interferon- α Receptor Monoclonal Antibody, in Moderate-to-Severe Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* **2017**, *69*, 376–386. [\[CrossRef\]](#)
37. Morand, E.F.; Furie, R.; Tanaka, Y.; Bruce, I.N.; Askanase, A.D.; Richez, C.; Bae, S.-C.; Brohawn, P.Z.; Pineda, L.; Berglind, A.; et al. Trial of Anifrolumab in Active Systemic Lupus Erythematosus. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 211–221. [\[CrossRef\]](#)
38. Kubo, S.; Nakayamada, S.; Sakata, K.; Kitanaga, Y.; Ma, X.; Lee, S.; Ishii, A.; Yamagata, K.; Nakano, K.; Tanaka, Y. Janus Kinase Inhibitor Baricitinib Modulates Human Innate and Adaptive Immune System. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1510. [\[CrossRef\]](#)
39. Burmester, G.R.; Blanco, R.; Charles-Schoeman, C.; Wollenhaupt, J.; Zerbini, C.; Benda, B.; Gruben, D.; Wallenstein, G.; Krishnaswami, S.; Zwillich, S.H.; et al. Tofacitinib (CP-690,550) in combination with methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to tumour necrosis factor inhibitors: A randomised phase 3 trial. *Lancet* **2013**, *381*, 451–460. [\[CrossRef\]](#)
40. Guo, X.; Higgs, B.; Bay-Jensen, A.C.; Karsdal, M.A.; Yao, Y.; Roskos, L.K.; White, W.I. Suppression of T Cell Activation and Collagen Accumulation by an Anti-IFNAR1 mAb, Anifrolumab, in Adult Patients with Systemic Sclerosis. *J. Invest. Dermatol.* **2015**, *135*, 2402–2409. [\[CrossRef\]](#)
41. Karalilova, R.V.; Batalov, Z.A.; Sapundzhieva, T.L.; Matucci-Cerinic, M.; Batalov, A.Z. Tofacitinib in the treatment of skin and musculoskeletal involvement in patients with systemic sclerosis, evaluated by ultrasound. *Rheumatol. Int.* **2021**, *41*, 1743–1753. [\[CrossRef\]](#)
42. You, H.; Xu, D.; Hou, Y.; Zhou, J.; Wang, Q.; Li, M.; Zeng, X. Tofacitinib as a possible treatment for skin thickening in diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Rheumatology* **2020**, *60*, 2472–2477. [\[CrossRef\]](#)
43. Hesselstrand, R.; Distler, J.H.W.; Riemekasten, G.; Wuttge, D.M.; Törngren, M.; Nyhlén, H.C.; Andersson, F.; Eriksson, H.; Sparre, B.; Tuveusson, H.; et al. An open-label study to evaluate biomarkers and safety in systemic sclerosis patients treated with paquinimod. *Arthritis Res. Ther.* **2021**, *23*, 204. [\[CrossRef\]](#)
44. Calderon, L.M.; Pope, J.E. Precursors to Systemic Sclerosis and Systemic Lupus Erythematosus: From Undifferentiated Connective Tissue Disease to the Development of Identifiable Connective Tissue Diseases. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 869172. [\[CrossRef\]](#)
45. Ortega-Hernandez, O.-D.; Shoenfeld, Y. Mixed connective tissue disease: An overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **2012**, *26*, 61–72. [\[CrossRef\]](#)

46. Zorn-Pauly, L.; von Stuckrad, A.S.L.; Klotsche, J.; Rose, T.; Kallinich, T.; Enghard, P.; Ostendorf, L.; Burns, M.; Doerner, T.; Meisel, C.; et al. Evaluation of SIGLEC1 in the diagnosis of suspected systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* **2021**, *61*, 3396–3400. [[CrossRef](#)]
47. Van den Hoogen, F.; Khanna, D.; Franssen, J.; Johnson, S.R.; Baron, M.; Tyndall, A.; Matucci-Cerinic, M.; Naden, R.P.; Medsger, T.A., Jr.; Carreira, P.E.; et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann. Rheum. Dis.* **2013**, *72*, 1747–1755. [[CrossRef](#)]
48. Aringer, M.; Costenbader, K.; Daikh, D.; Brinks, R.; Mosca, M.; Ramsey-Goldman, R.; Smolen, J.S.; Wofsy, D.; Boumpas, D.T.; Kamen, D.L.; et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* **2019**, *71*, 1400–1412. [[CrossRef](#)]
49. Shiboski, C.H.; Shiboski, S.C.; Seror, R.; Criswell, L.A.; Labetoulle, M.; Lietman, T.M.; Rasmussen, A.; Scofield, H.; Vitali, C.; Bowman, S.J.; et al. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren’s syndrome: A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Ann. Rheum. Dis.* **2017**, *69*, 35–45. [[CrossRef](#)]
50. Alarcon-Segovia, D.; Villarreal, M.; Kasukawa, R.; Sharp, G.C. Classification and diagnostic criteria for mixed connective tissue disease. In *Mixed Connective Tissue Disease and Anti-Nuclear Antibodies*; Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division): Amsterdam, The Netherlands, 1987; pp. 33–40.
51. Lundberg, I.E.; Tjärnlund, A.; Bottai, M.; Werth, V.P.; Pilkington, C.; De Visser, M.; Alfredsson, L.; A Amato, A.; Barohn, R.J.; Liang, M.H.; et al. 2017 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies and their major subgroups. *Ann. Rheum. Dis.* **2017**, *76*, 1955–1964. [[CrossRef](#)]
52. Kay, J.; Upchurch, K.S. ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatology* **2012**, *51* (Suppl. 6), vi5–vi9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3 Diskussion

Interferone spielen im Immunsystem unter anderem bei der Bekämpfung von Erregern eine zentrale Rolle. Verschiedene Trigger führen über intrazelluläre Signalwege zu einer Aktivierung und zu einer Produktion von Typ I IFN, die den Typ I IFN-Aktivierungsmechanismus weiter verstärken und weitere Zellen involvieren. Dies führt zu einer sehr breiten Immunreaktion, die im Wesentlichen nahezu alle Immunzellen erfasst. Diese Immunreaktion kann, wie am Beispiel des SLE aufgezeigt, unter bestimmten Voraussetzungen in eine „chronische“ Typ I IFN-Aktivierung umschlagen und sich hierdurch auch klinisch manifestieren. Die Typ I IFN-Aktivierung spielt darüber hinaus in der Pathophysiologie verschiedener anderer systemischer Autoimmunerkrankungen eine Rolle.(2,19,81–83)

Die routinemäßige Bestimmung der Typ I IFN-Aktivierung legt verschiedene klinische Anwendungsmöglichkeiten inner- und außerhalb der Rheumatologie nahe, die u.a. die Diagnosestellung, Beurteilung der Krankheitsaktivität, die Verlaufsbeurteilung und das Therapieansprechen betreffen. Im Folgenden werden diese Anwendungsmöglichkeiten vertiefend und im Kontext der Methodik für die Erfassung der Typ I IFN-Aktivierung erläutert.

SIGLEC1 zum Zeitpunkt der Diagnosestellung:

Die Frage nach dem Vorliegen einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung ist ein häufiger Vorstellungsgrund in der Rheumatologie. Neben der Anamnese, den klinischen Symptomen, sowie der körperlichen Untersuchung nehmen Laborparameter hier eine wichtige Rolle ein. Beim

SLE sind u.a. die Laborparameter Komplementfaktoren 3 und 4, ANA und Anti-dsDNA für die Diagnosefindung wichtig.(84) Eine hohe Sensitivität eines Laborwertes dient häufig dem Ausschluss einer Erkrankung, während eine hohe Spezifität der Diagnosestellung dient. Ein positiver ANA-Test weist beispielsweise eine sehr hohe Sensitivität beim SLE auf(60,85), so dass ein positiver ANA-Test eine wichtige Eingangsvoraussetzung für die EULAR/ACR SLE-Klassifikationskriterien von 2019 ist.(60) Die hohe Sensitivität des ANA-Tests dient bei einem negativen Testergebnis zum Ausschluss der Diagnose SLE. Ein positiver ANA-Test findet sich jedoch auch bei vielen anderen systemischen Autoimmunerkrankungen wieder und ist daher unspezifisch, so dass bei positivem ANA- Befund Folgetests notwendig werden. Eine weitere Differenzierung der nachweisbaren SLE-Autoantikörper, wie z.B. die Anti-Smith (SM) Antikörper, sind weniger sensitiv, weisen dafür aber eine sehr hohe Spezifität auf(86) und sind für die Diagnosestellung wichtig. In diesem Kontext haben wir die diagnostische Wertigkeit von SIGLEC1 bei der Diagnosestellung ermittelt und konnten feststellen, dass über 98% der Patientinnen und Patienten eine erhöhte Expression von SIGLEC1 zum Zeitpunkt der Diagnosestellung aufwiesen und SIGLEC1 damit sehr sensitiv ist. Zusammen mit weiteren Analysen konnte geschlussfolgert werden, dass eine normale Expression von SIGLEC1 die Verdachtsdiagnose SLE mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließt.(85) Die Ergebnisse waren im Vergleich zum ANA-Test in etwa vergleichbar. Bezüglich der diagnostischen Wertigkeit konnte beim juvenilen SLE ähnliches beobachtet werden. So fand sich bei allen in die Studie eingeschlossenen Kindern (n=16) eine erhöhte SIGLEC1-Expression zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.(17) Der ANA-Test ist für die Rheumatologie

unentbehrlich, weist jedoch auch einige Besonderheiten auf, denn die Prävalenz eines positiven ANA-Tests steigt mit zunehmendem Alter und verschiedene Medikamente können ANA induzieren(59), so dass die Bestimmung der Typ I IFN-Aktivierung bei Verdacht auf Vorliegen eines SLE, zusätzlich zum ANA-Test, nützlich sein könnte.

Bei der juvenilen Form der DM konnte ebenfalls eine sehr hohe Sensitivität zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mittels SIGLEC1- Messung festgestellt werden. In einer prospektiven Studie wurde SIGLEC1 in einer Arbeitsgruppe aus den Niederlanden untersucht. Bei Kindern, die an einer juvenilen DM erkrankten, zeigten alle Kinder (n=21) eine deutlich erhöhte SIGLEC1-Expression in der Durchflusszytometrie.(14) In unserer Analyse konnten wir dies bei Kindern mit DM zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ebenso feststellen, bei jedoch insgesamt kleinerer Fallzahl.(3) Bei der adulten DM zeigte sich in unserer Studie für SIGLEC1 zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein heterogenes Bild. Wir konnten eine Sensitivität von 77,8% berechnen. Der Stellenwert von SIGLEC1 bei der adulten Form der DM bei Diagnosestellung ist daher weiter zu untersuchen. Letztlich befinden sich unter der Diagnose DM verschiedene Subtypen mit unterschiedlichen Autoantikörpern und klinischen Konstellationen, die sich hinsichtlich des Therapieansprechens und der Prognose z.T. deutlich unterscheiden.

Der Stellenwert von SIGLEC1 zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eines pSS und der SSc ist nicht untersucht worden.(13)

In der Pädiatrie der Charité – Universitätsmedizin Berlin wurde die SIGLEC1-Expression auf Monozyten zur Identifizierung seltener monogenetische Interferonopathien wissenschaftlich untersucht.(12) In einer Kohorte seltener monogenetischer Interferonopathien (n=9) zeigte sich bei allen Erkrankten

eine deutlich erhöhte SIGLEC1-Expression auf Monozyten. Die durchflusszytometrischen Daten der SIGLEC1-Expression wurden auch mit den Ergebnissen aus der PCR-Analyse IFN-induzierter Transkripte verglichen, die sehr gut miteinander korrelierten. Inwiefern die SIGLEC1-Expression eine ausreichend hohe Sensitivität aufweist, um alle Interferonopathien zuverlässig zu identifizieren, ist in größeren Kohorten zu prüfen. Einen ersten wichtigen Hinweis auf eine Interferonopathie im Kindes- und auch Erwachsenenalter kann die erhöhte SIGLEC1-Expression jedoch geben.(12,87) Eine Typ I IFN- Aktivierung kann bei verschiedenen Erkrankungen festgestellt werden, so dass die Erhöhung von SIGLEC1 zunächst unspezifisch ist und für die Diagnosestellung einer systemischen Autoimmunkrankheit allein nicht genügt.

Unserer und andere publizierten Daten über die Assoziation der Typ I IFN- Aktivierung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei systemischen Autoimmunkrankheiten müssen insgesamt mit Vorsicht interpretiert werden, so kommen die Autoren einer systematischen Literaturanalyse zu der Einschätzung, dass viele der eingeschlossenen Studien einem hohen Risk of Bias (RoB) unterliegen und keine der eingeschlossenen Studien (n=188) ein geeignetes Studiendesign aufwies, um die diagnostische Leistungsfähigkeit adäquat zu evaluieren. Die stärkste Evidenz konnte hier beim SLE festgestellt werden mit einer niedrigen Assoziationsstärke.(6) Um die Fragestellung der Typ I IFN Aktivierung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung adäquat zu beantworten sind weitere Studien z.B. unter Einschluss von präklinischen (sogenannten at risk) Patientinnen und Patienten notwendig.

SIGLEC1 und die Korrelation zur Krankheitsaktivität:

Die Evaluation der Krankheitsaktivität gestaltet sich beim SLE durch verschiedene Faktoren komplex. So spielt neben der Krankheitsaktivität, die Evaluation des bereits entstandenen Schadens eine wichtige Rolle. Dazu kommen differentialdiagnostische Überlegungen, wie Infektionen und auch Nebenwirkungen verschiedener Medikamente. In der Evaluation sind daher auch Laborwerte nötig. Hierbei spielen die Komplementfaktoren C3c und C4c sowie die Anti-dsDNA eine wichtige Rolle.

An einen Typ I IFN-Aktivierungsmarker ergeben sich u.a. Fragestellungen an die Korrelation zur Krankheitsaktivität im Quer- und Längsschnitt und an das Monitoring des Therapieansprechens.

Untersuchungen zur Typ I IFN-Aktivierung beim SLE mittels der Analyse IFN induzierter Transkripte, Zytokine oder IFN- α konnten zeigen, dass die Typ I IFN-Aktivierung mit der Krankheitsaktivität korreliert.(48,53,56,88) Dies konnte auch im Kontext der Bestimmung von SIGLEC1 beim SLE festgestellt werden. Die Expressionshöhe von SIGLEC1 korreliert dabei, gemessen an verschiedenen Krankheitsaktivitätsindices, mit der Krankheitsaktivität.(1,36,49,17) In der Bestimmung der Krankheitsaktivitäts-assoziierten Sensitivität von SIGLEC1 zeigte sich bei schwer erkrankten SLE-Patientinnen und -Patienten eine Sensitivität von 100 %, bei Erkrankten mit moderater Krankheitsaktivität lag diese bei 84 % und bei milder Krankheitsaktivität bei 78 % und war sensitiver als die untersuchten Standardlaborparameter, wie Anti-dsDNA und Komplementfaktoren C3c/C4c.(1) Wir konnten darüber hinaus auch in der longitudinalen Arbeit eine Korrelation zur Krankheitsaktivität feststellen. Erstmals wurden

longitudinale Grenzwerte für die untersuchten Biomarker im Kontext der Krankheitsaktivität berechnet und damit auch die longitudinale Sensitivität und Spezifität ermittelt.(11) Longitudinale Grenzwerte und die damit verbundenen labordiagnostischen Parameter, wie Sensitivität und Spezifität sind hilfreich, um die Relevanz steigender oder fallender Antikörper klinisch besser zu beurteilen. In unserer Analyse zeigte sich, dass SIGLEC1 sensitiver in der Erfassung der zunehmenden und abnehmenden Krankheitsaktivität im zeitlichen Verlauf war, als die Parameter Komplementfaktor C3, C4 oder die Anti-dsDNA.(11)

Neben der Erfassung der Typ I IFN-Aktivierung im Kontext der Krankheitsaktivität beim SLE, könnte die Erfassung der Typ I IFN-Aktivierung auch für Stratifizierung von Patienten für die Therapie mit IFN-inhibitorischen Medikamenten sinnvoll sein. Im Februar 2022 wurde ein monoklonaler Antikörper gegen den Typ I IFN-Rezeptor (Anifrolumab) für die Behandlung des SLE mit moderater und schwer Krankheitsaktivität auf Grundlage von zwei randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Phase III Studien (TULIP-1 und TULIP-2) durch die EMA zugelassen.(89) SLE-Patientinnen und Patienten mit einer hohen Typ I IFN-Aktivierung haben von der Therapie mit Anifrolumab mehr profitiert als Patientinnen und Patienten mit niedriger Aktivierung im Vergleich zu Placebo.(90) Um diese Typ I IFN-inhibitorische Therapie zielgerecht einzusetzen, scheint die Bestimmung der Typ I IFN-Aktivierung im klinischen Alltag sinnvoll. Bisher fehlt es hier jedoch an Empfehlungen zur Stratifizierung. Neben der Stratifizierung von Patientinnen und Patienten sind verschiedene weitere Fragestellungen im klinischen Alltag unter der Therapie mit Anifrolumab denkbar, wie die Intervallstreckung der Applikation nach Erreichen einer Remission bis hin zur Steigerung der

Dosierung bei Fortbestehen einer Typ I IFN-Aktivität und persistierenden Beschwerden. Der Nutzen der SIGLEC1-Bestimmung zum Monitoring des Typ I IFN-inhibitorischen Effekts von Anifrolumab muss jedoch noch gezeigt werden. Weiterhin bleibt zu untersuchen, ob die Quantifizierung der Typ I IFN-Aktivierung sinnvoll ist, da in den Zulassungsstudien zu Anifrolumab nur zwischen IFN Score high und low unterschieden wurde.

Zusammenfassend erscheint die Implementierung eines Biomarkers zur Erfassung der Typ I IFN-Aktivierung über die Bestimmung von SIGLEC1 beim SLE für die Diagnosestellung und die Krankheitsaktivitätserfassung sowie zur Verlaufsbeurteilung von Patientinnen und Patienten sinnvoll. Der Beitrag für eine individualisierte Therapiesteuerung im Rahmen einer IFN inhibitorischen Therapie muss jedoch noch gezielt untersucht werden.

Beim primären Sjögren-Syndrom konnten wir eine Korrelation der SIGLEC1-Expression mit der Krankheitsaktivität und eine Assoziation einer erhöhten SIGLEC1-Expression mit extraglandulären Manifestationen feststellen. In der Gruppe der Patientinnen und Patienten ohne eine extraglanduläre Manifestation konnten wir bei einigen Probanden eine Typ I IFN-Aktivierung feststellen, ohne dass abschließend klar ist, was dies für den weiteren Krankheitsverlauf bedeutet.⁽¹³⁾ Die weitere Verlaufsbeurteilung dieser Patientinnen und Patienten könnte darüber Aufschluss geben, ob eine erhöhte SIGLEC1 Expression ein Risiko für die Entwicklung einer extraglandulären Manifestation darstellt.

Die IIM werden in verschiedene Untergruppen eingeteilt, die sich nicht nur im klinischen Verlauf unterscheiden, sondern auch hinsichtlich des therapeutischen Ansprechens und ihrer Prognose.

Die klinische Einschätzung der Krankheitsaktivität kann herausfordernd sein, da u.a. die klinische Bestimmung der Muskelkraft untersucherabhängig ist und auch Laborwerte, wie die Creatinkinase (CK) nicht immer zuverlässig und daher nur bedingt für die Verlaufsbeurteilung der IIM geeignet ist. Die Typ I IFN-Aktivierung wurde in diesen Erkrankungen breit mittels verschiedener Methoden wie Micorarray oder PCR-Analysen IFN-induzierter Transkripte untersucht, wobei insbesondere für die DM eine Korrelation zur Krankheitsaktivität festgestellt werden konnte.(82,91) Wir haben die SIGLEC1-Expression bei den IIM untersucht und konnten diese sowohl bei juvenilen als auch erwachsenen Patientinnen und Patienten mit Dermatomyositis im Quer- und Längsschnitt feststellen. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass die Bestimmung der Typ I IFN-Aktivierung besser mit der Krankheitsaktivität im Verlauf korreliert als die CK.(3) Die SIGLEC1-Expression bei der juvenilen DM wurde 2021 auch von einer anderen Arbeitsgruppe untersucht.(14) Die Gruppe untersuchte neben SIGLEC1, CXCL10, Galectin 9, einen IFN-Score bestehend aus fünf Genen (MX1, IFI44, IFI44L, LY6E, IFIT3) mittels PCR zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Diese Biomarker wurden untereinander verglichen mit dem Ergebnis, dass die SIGLEC1-Expression sensitiver war, eine Therapieintensivierung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung anzuzeigen, als der IFN-Score. (14)

Neben der DM konnten wir eine erhöhte SIGLEC1-Expression bei 42% der Patientinnen und Patienten mit Antisynthetase-Syndrom vorfinden sowie bei zwei von neun Patientinnen und Patienten mit IBM. Eine Korrelation zur Krankheitsaktivität konnten wir hier jedoch nicht feststellen.

Eine hohe Assoziation zwischen der Typ I IFN-Aktivierung und der Krankheitsaktivität beim SLE, der DM, dem pSS und auch der SSc konnte in der bereits zitierten systematischen Literaturanalyse (s.o.) festgestellt werden.(6) Bei der SSc konnten wir keine klare Assoziation zur Krankheitsaktivität feststellen. Warum bei der SSc trotz hoher Fallzahl keine klare Korrelation aufzufinden war, bleibt weiter zu prüfen. Es kann angenommen werden, dass die Bestimmung von SIGLEC1 bei der SSc möglicherweise nicht sensitiv genug ist, denn eine Assoziation zwischen der Typ I IFN Aktivierung und der Krankheitsaktivität bei der SSc konnte vor allem beim Einsatz von Immunoassays und Microarrays festgestellt werden. Die Assoziation von SIGLEC1 zur FVC ist interessant und muss weiter untersucht werden.

SIGLEC1 und das Therapieansprechen

Bezüglich des Therapieansprechens konnten wir bei der DM zeigen, dass SIGLEC1 unter einer immunsuppressiven Therapie mit klinischem Ansprechen abfällt.(3) Diese Assoziation konnte bei 50-75 % der Studien im Rahmen der systematischen Literaturanalyse ebenfalls festgestellt werden. Hier wurden vor allem Immunoassays (n=3) bei der Methode eingeschlossen.(6) Insgesamt besteht laut den Autoren ein hoher RoB.(6) Beim SLE konnte diese Assoziation ebenfalls festgestellt werden. Hier ist der RoB aufgrund der eingeschlossenen, randomisierten klinischen Studien niedriger.(6) Beim SLE konnte zudem auch eine hohe Assoziationsstärke (>75 %) zwischen Typ I IFN-Aktivierung und Prognose festgestellt werden, so zeigen verschiedene Studien, dass eine Typ I IFN- Aktivierung prädiktive

für Krankheitsschübe ist.(6) Der RoB ist hier z.T. sehr niedrig. Vorrangig wurde diese Assoziation mit Immunoassays und PCR untersucht.

SIGLEC1 zur Risikoeinschätzung eines autoimmun bedingten kongenitalen Herzblocks

Für Schwangere mit einem pSS oder einem subklinischen Bild mit Nachweis von Anti-Ro/SSA-Antikörpern ist der Nachweis einer erhöhten SIGLEC1-Expression prognostisch möglicherweise relevant. Der Nachweis einer Typ I IFN-Aktivierung stellt einen potentiellen Risikofaktor für die Entwicklung eines CHB dar.(15) Bei neun untersuchten Schwangerschaften, bei denen ein CHB festgestellt werden konnte, zeigte sich bei allen neun Schwangeren eine erhöhte SIGLEC1-Expression auf Monozyten. Diese Ergebnisse haben dazu geführt, dass der pathophysiologische Mechanismus beim CHB um eine, zuvor nicht untersuchte, Typ I IFN-Hypothese, erweitert werden konnte. Der Stellenwert von Typ I IFN in der Pathogenese des CHB verfestigt sich seitdem und wird als ein wichtiger Bestandteil in der Pathogenese des CHB angenommen. Eine Typ I IFN- Aktivierung, inklusive dem Nachweis einer erhöhten SIGLEC1-Expression im Nabelschnurblut von Neugeborenen mit Nachweis maternalen Anti-Ro/SSA-Antikörper konnte festgestellt werden. Weiterhin konnte bei verstorbenen Feten mit CHB eine Typ I IFN-Aktivierung im Herzgewebe nachgewiesen werden.(67) Neben der Typ I IFN-Aktivierung spielen weitere Faktoren eine Rolle, da nicht alle Föten von Patientinnen mit Nachweis von Anti-Ro/SSA-Antikörpern und einer Typ I IFN-Aktivierung einen CHB erleiden. Weitere Studien, auch zum Stellenwert von SIGLEC1 oder anderen Typ I IFN-Biomarkern sind daher beim CHB notwendig, um eine bessere Risikoeinschätzung bei Schwangeren mit Nachweis von Anti-

Ro/SSA-Antikörpern hinsichtlich des Risikos der Entwicklung eines CHB vorzunehmen.

SIGLEC1 bei viralen Erkrankungen:

Virusinfektionen rufen z.T eine starke IFN-Antwort hervor. Die Typ I IFN-Aktivierung mittels SIGLEC1-Expression wurde im Rahmen der Coronavirus-Pandemie (SARS-CoV-2) untersucht. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass bei 93,7% der SARS-CoV-2 Infektionen eine deutlich erhöhte SIGLEC1-Expression nachgewiesen werden konnte.(92) In einer weiteren Studie war eine niedrige bzw. normale SIGLEC1-Expression mit einem schweren Verlauf der Erkrankung assoziiert,(16) so dass hier möglicherweise neutralisierende Antikörper gegen IFN vorlagen, die eine Expression von Typ I IFN und in der Konsequenz SIGLEC1-Expression, verhinderten.(93) Bei den nicht schwer Erkrankten konnte eine Korrelation zwischen der Viruslast und der SIGLEC1-Expression festgestellt werden.(16) SIGLEC1 wurde auch bei HIV-Infizierten untersucht.(16,50) Bei HIV zeigte sich neben dem Nachweis einer erhöhten SIGLEC1-Expression eine Korrelation mit der Viruslast.(50)

Inwiefern ein Typ I IFN-Biomarker, wie SIGLEC1, hilfreich bei der Beurteilung viraler Infekte ist bzw. sogar eine Unterscheidung zwischen viraler von bakterieller Infektion ermöglicht, bleibt zu untersuchen.

Die Methodik zur Erfassung der Typ I IFN-Aktivierung:

Die wissenschaftliche Datenlage bezüglich der Typ I IFN-Aktivierung in der Pathophysiologie verschiedener entzündlich rheumatischer Erkrankungen ist umfangreich. Es wurden wichtige klinische Fragestellungen zur

Diagnosestellung, Verlaufsbeurteilung der Krankheitsaktivität und Messung des Therapieansprechen untersucht, die eine Implementierung eines Biomarkers zur Erfassung der Typ I IFN-Aktivierung in der Routinediagnostik sinnvoll erscheinen lassen.(5,6,8)

Bei der Auswahl der Methode zur Erfassung der Typ I IFN-Aktivierung müssen verschiedene Punkte, wie der Anwendungsbereich berücksichtigt werden.(8) So ergeben sich für das Routinelabor naturgemäß andere Anforderungen als für den Forschungsbereich. Während die Microarray-Technologie für die Forschung von großer Bedeutung ist und hierüber die Identifizierung von SIGLEC1 beim SLE gelungen ist(10), ist sie für die klinische Routineanwendung nur bedingt geeignet, da sie zeitaufwändig und kostspielig ist. Weiterhin ist die Vergleichbarkeit von Daten verschiedener Microarrays untereinander herausfordernd, jedoch notwendig, um eine Standardisierung zu erzielen. Diese Nachteile sind überwindbar, aber für den Routineeinsatz, im Vergleich zu anderen methodischen Möglichkeiten, vermutlich jedoch zum aktuellen Zeitpunkt noch zu groß, um diese Technologie im größeren Maßstab zu implementieren.

In verschiedenen Studien erfolgt deshalb die Bestimmung der Typ I IFN-Aktivierung über die Messung bestimmter IFN induzierter Transkripte mittels PCR, so auch in den Zulassungsstudien zu Anifrolumab.(42) Dabei unterscheiden sich die Studien, die IFN induzierte Transkripte zum Nachweis einer Typ I IFN-Aktivierung nutzen, hinsichtlich der Auswahl und Anzahl der Transkripte, aber auch bei der Berechnung eines sogenannten IFN-Scores.(5,46) Ein Vorteil ergibt sich aus der Lagerung gefrorenen Blutes mit der Option, die Analyse zu einem späteren Zeitpunkt, möglicherweise im Batch, zu realisieren oder die Proben an andere Labore zu verschicken. Ein

möglicher Nachteil ergibt sich aus der Verwendung von Vollblut oder PBMC, denn für die Analyse werden alle Immunzellsubpopulationen im Blut zunächst lysiert und im Weiteren werden IFN induzierten Transkripte analysiert. Die Immunzellsubpopulationen weisen jedoch eine zellspezifische Typ I IFN-Signatur auf(46), so dass es bei der gemeinsamen Analyse zu Ungenauigkeiten kommen kann, wenn sich beispielsweise Zellpopulationen über die Zeit durch Therapien oder auch durch die Krankheitsaktivität verändern.(5,46,94) Dies ist einer der möglichen Gründe, warum die Typ I IFN-Signatur aus dem Vollblut nicht mit der longitudinalen Krankheitsaktivität beim SLE korreliert(88,95), während dies bei der Untersuchung von SIGLEC1 und IFN- α (Simoa®, DELFIA) festgestellt werden konnte.(4,11,38) Eine zell-spezifische Bestimmung der Typ I IFN-Aktivierung von Monozyten oder eine serologische umgeht die oben genannte Problematik(46) und ist in diesem Zusammenhang gegenüber der Bestimmung der Typ I IFN-Signatur aus dem Vollblut oder PBMC möglicherweise vorteilhaft.(4,46)

Die durchflusszytometrische Bestimmung der SIGLEC1-Expression auf Monozyten unterliegt einigen Herausforderungen. So führen verschiedene kommerziell erwerblich Antikörper gegen SIGLEC1, die mit unterschiedlichen Fluorochromen konjugiert sind, sowie Durchflusszytometer- und Geräteeinstellungen, zu potenziell unterschiedlich hohen Intensitätssignalen am Endgerät, dem Durchflusszytometer. Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist dadurch erschwert. Eine Standardisierung ist jedoch möglich und erfolgt im Labor Berlin Charité Vivantes GmbH u.a. durch den Einsatz von sogenannten Beads, die die Kalibrierung des Geräts über die Zeit und eine genaue Quantifizierung des Signal ermöglichen.(96) Dadurch können Ergebnisse in hoher Qualität valide repliziert werden.

Die Bestimmung von Serumproteinen gilt in der Labordiagnostik als besonders geeignetes Verfahren, da neben der zumeist einfachen Probenaufbewahrung und Versendung, eine valide Standardisierung vorgenommen werden kann. Darüber hinaus bestehen Skalierungsmöglichkeiten, die einen kosteneffektiven und flächenweiten Einsatz erlauben. In diesem Kontext sind die Bestimmung des löslichen SIGLEC1(97), Galectin-9(55,98) oder die direkte Bestimmung von IFN α über die Simoa®-Technologie(4,53,54) aktuell interessante und vielversprechende Optionen zur Erfassung der Typ I IFN-Aktivierung.

Bisher gibt es keinen internationalen Standard zur Erfassung der Typ I IFN-Aktivierung. Es gibt hier eine erste Initiative von Seiten der EULAR.(7,8) In einer von der Initiative durchgeführten, systematischen Literaturanalyse wurden die verschiedenen Assays zur Erfassung der Typ I IFN-Aktivierung untersucht.(6) Es konnte insgesamt eine große Vielfalt an Tests festgestellt werden und eine große methodische Heterogenität im Kontext der Analysen und Ergebnisse.(5,6,8) Es zeigten sich eine Reihe an verschiedenen Schwächen beim Studiendesign und der klinischen Validierung, die z.T. einem hohen RoB unterliegen. In der systematischen Literaturanalyse konnte abschließend kein Typ I IFN-Aktivierungsmarker (einschließlich SIGLEC1) identifiziert werden, der alle klinischen Bedürfnisse erfüllen konnte.(6) Daraus folgt, dass weitere Studien notwendig sind, um die routinemäßige Implementierung von IFN-Biomarkern voranzutreiben.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Für das Immunsystem ist die Typ I IFN-Aktivierung für eine geordnete immunologische Antwort auf Reize wichtig. Einige systemische Autoimmunerkrankungen weisen eine Typ I IFN-Aktivierung auf.(2) Die Analyse der Typ I IFN-Aktivierung ermöglicht einen Einblick in ablaufende, immunologische Prozesse, so dass die Bestimmung der Typ I IFN-Aktivierung über die Labordiagnostik sinnvoll sein könnte. SIGLEC1 ist Teil dieser Typ I IFN-Aktivierung und wurde in zellspezifischen Transkriptomanalysen von Monozyten beim SLE identifiziert.(49) SIGLEC1 wird auf der Oberfläche von Monozyten exprimiert und kann über die Durchflusszytometrie gemessen werden. Im Rahmen einer Innovationsförderung erfolgte 2014 die Implementierung von SIGLEC1 in die Routinediagnostik der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

SIGLEC1 wurde bei verschiedenen nicht-rheumatischen und rheumatischen Erkrankungen und hier im Rahmen verschiedener Anwendungsmöglichkeiten, wie z.B. dem Stellenwert zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, der Erfassung der Krankheitsaktivität und bei der Verlaufsbeurteilung untersucht.(3,13,36,99,100) Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung konnte eine hohe Sensitivität vor allem beim juvenilen und adulten SLE und bei der juvenilen Dermatomyositis festgestellt werden.(3,14,85) Bei diesen beiden Erkrankungen und dem primären Sjögren-Syndrom zeigen sich außerdem eine Korrelation zur Krankheitsaktivität.(13,100) Beim SLE war die Korrelation von SIGLEC1 zur Krankheitsaktivität besser, als die der konventionellen Biomarker, wie Anti-dsDNA oder die Komplementfaktoren C3 und C4. Die Typ I IFN-Aktivierung korrelierte ebenfalls mit der klinischen Krankheitsaktivität im Längsschnitt beim SLE und der DM.(3,11,100)

Neben diesen Ergebnissen, ergeben sich Hinweise darauf, dass die Typ I IFN-Aktivierung auch ein Risikofaktor für die Entwicklung eines kongenitalen autoimmunen Herzblocks im Rahmen eines neonatalen Lupussyndroms darstellt und pathophysiologisch involviert ist.(15) Weitere Anwendungen von SIGLEC1 wurden z.B. im Rahmen monogenetischer Interferonopathien oder COVID-19 von anderen Arbeitsgruppen aufgezeigt.(12,16) Die Durchflusszytometrie wird in sehr vielen Laboren eingesetzt, so dass eine Implementierung von SIGLEC1 in bestehende Labore umsetzbar erscheint. Die Messung kann darüber hinaus kostengünstig und standardisiert erfolgen.

Das Potential von Typ I IFN-Aktivierungsmarker, so auch von SIGLEC1 für den klinischen Einsatz ist ausgesprochen groß. Für eine breite Implementierung und Ausschöpfung dieses Potentials sind weitere Studien sinnvoll. Mit zunehmender Evidenz wird das Bewusstsein für den Nutzen der Bestimmung einer Typ I IFN-Aktivierung in der klinischen Medizin und der Labormedizin weiter geschärft, was dazu beiträgt den routinemäßigen Einsatz eines Typ I IFN-Aktivierungsmarker innerhalb und außerhalb der Rheumatologie voranzubringen.

5. Literaturverzeichnis

1. Rose T, Grutzkau A, Hirseland H, Huscher D, Dahnrich C, Dzionek A, u. a. IFN and its response proteins, IP-10 and SIGLEC-1, are biomarkers of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1. Oktober 2013;72(10):1639–45.
2. Rönnblom L, Eloranta ML. The interferon signature in autoimmune diseases. *Curr Opin Rheumatol*. März 2013;25(2):248–53.
3. Graf M, Stuckrad SL von, Uruha A, Klotsche J, Zorn-Pauly L, Unterwalder N, u. a. SIGLEC1 enables straightforward assessment of type I interferon activity in idiopathic inflammatory myopathies. *RMD Open*. 1. Februar 2022;8(1):e001934.
4. Wahadat MJ, Qi H, van Helden-Meeuwsen CG, Huijser E, van den Berg L, van Dijk-Hummelman A, u. a. Serum IFN α 2 levels are associated with disease activity and outperform IFN-I gene signature in a longitudinal childhood-onset SLE cohort. *Rheumatology*. 14. Dezember 2022;keac698.
5. Burska A, Rodríguez-Carrio J, Biesen R, Dik WA, Eloranta ML, Cavalli G, u. a. Type I interferon pathway assays in studies of rheumatic and musculoskeletal diseases: a systematic literature review informing EULAR points to consider. *RMD Open*. März 2023;9(1):e002876.
6. Rodríguez-Carrio J, Burska A, Conaghan PG, Dik WA, Biesen R, Eloranta ML, u. a. Association between type I interferon pathway activation and clinical outcomes in rheumatic and musculoskeletal diseases: a systematic literature review informing EULAR points to consider. *RMD Open*. März 2023;9(1):e002864.
7. EULAR | ongoing initiatives [Internet]. [zitiert 14. Juli 2022]. Verfügbar unter: https://www.eular.org/ongoing_initiatives.cfm
8. Rodríguez-Carrio J, Burska A, Conaghan PG, Dik WA, Biesen R, Eloranta ML, u. a. 2022 EULAR points to consider for the measurement, reporting and application of IFN-I pathway activation assays in clinical research and practice. *Annals of the Rheumatic Diseases* [Internet]. 1. März 2023 [zitiert 23. März 2023]; Verfügbar unter: <https://ard.bmj.com/content/early/2023/02/28/ard-2022-223628>
9. Nombel A, Foray AP, Garnier L, Lombard C, Hachulla E, Bader-Meunier B, u. a. Assessment of type I interferon response in routine practice in France in 2022. *RMD Open*. 1. Juni 2023;9(2):e003211.
10. Biesen R, Demir C, Barkhudarova F, Grün JR, Steinbrich-Zöllner M, Backhaus M, u. a. Sialic acid-binding Ig-like lectin 1 expression in inflammatory and resident monocytes is a potential biomarker for monitoring disease activity and success of therapy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*.

1. April 2008;58(4):1136–45.
11. Rose T, Grützkau A, Klotsche J, Enghard P, Flechsig A, Keller J, u. a. Are interferon-related biomarkers advantageous for monitoring disease activity in systemic lupus erythematosus? A longitudinal benchmark study. *Rheumatology (Oxford)*. 1. September 2017;56(9):1618–26.
12. Orak B, Ngoumou G, Ebstein F, Zieba B, Goetzke CC, Knierim E, u. a. SIGLEC1 (CD169) as a potential diagnostic screening marker for monogenic interferonopathies. *Pediatr Allergy Immunol*. 25. Oktober 2020;
13. Rose T, Szelinski F, Lisney A, Reiter K, Fleischer SJ, Burmester GR, u. a. SIGLEC1 is a biomarker of disease activity and indicates extraglandular manifestation in primary Sjögren's syndrome. *RMD Open*. 2016;2(2):e000292.
14. Lerkvaleekul B, Veldkamp SR, van der Wal MM, Schatorjé EJH, Kamphuis SSM, van den Berg JM, u. a. Siglec-1 expression on monocytes is associated with the interferon signature in juvenile dermatomyositis and can predict treatment response. *Rheumatology [Internet]*. 13. August 2021 [zitiert 13. September 2021];(keab601). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keab601>
15. Lisney AR, Szelinski F, Reiter K, Burmester GR, Rose T, Dörner T. High maternal expression of SIGLEC1 on monocytes as a surrogate marker of a type I interferon signature is a risk factor for the development of autoimmune congenital heart block. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 13. Mai 2017;annrhumdis-2016-210927.
16. Doehn JM, Tabeling C, Biesen R, Saccomanno J, Madlung E, Pappe E, u. a. CD169/SIGLEC1 is expressed on circulating monocytes in COVID-19 and expression levels are associated with disease severity. *Infection [Internet]*. 6. April 2021 [zitiert 27. April 2021]; Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s15010-021-01606-9>
17. Stuckrad SL von, Klotsche J, Biesen R, Lieber M, Thumfart J, Meisel C, u. a. SIGLEC1 (CD169) is a sensitive biomarker for the deterioration of the clinical course in childhood systemic lupus erythematosus. *Lupus*. Dezember 2020;29(14):1914–25.
18. Porritt RA, Hertzog PJ. Dynamic control of type I IFN signalling by an integrated network of negative regulators. *Trends in Immunology*. März 2015;36(3):150–60.
19. Rönnblom L, Leonard D. Interferon pathway in SLE: one key to unlocking the mystery of the disease. *Lupus Science & Medicine*. 1. August 2019;6(1):e000270.
20. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*. Dezember 2004;202(1):8–32.
21. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to

- interferon-gamma. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:749–95.
22. Vilcek J. Novel interferons. *Nat Immunol.* Januar 2003;4(1):8–9.
 23. Qiu L, Wang T, Tang Q, Li G, Wu P, Chen K. Long Non-coding RNAs: Regulators of Viral Infection and the Interferon Antiviral Response. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2018 [zitiert 14. Juli 2022];9. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01621>
 24. York MR, Nagai T, Mangini AJ, Lemaire R, van Seventer JM, Lafyatis R. A macrophage marker, siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and toll-like receptor agonists. *Arthritis & Rheumatism.* 1. März 2007;56(3):1010–20.
 25. Chen L, Morris DL, Vyse TJ. Genetic advances in systemic lupus erythematosus: an update. *Current Opinion in Rheumatology.* Mai 2017;1.
 26. Rose T, Dörner T. Drivers of the immunopathogenesis in systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2017;31(3):321–33.
 27. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, u. a. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *New England Journal of Medicine.* 2003;349(16):1526–33.
 28. Munroe ME, Lu R, Zhao YD, Fife DA, Robertson JM, Guthridge JM, u. a. Altered type II interferon precedes autoantibody accrual and elevated type I interferon activity prior to systemic lupus erythematosus classification. *Annals of the Rheumatic Diseases.* November 2016;75(11):2014–21.
 29. Lu R, Munroe ME, Guthridge JM, Bean KM, Fife DA, Chen H, u. a. Dysregulation of innate and adaptive serum mediators precedes systemic lupus erythematosus classification and improves prognostic accuracy of autoantibodies. *Journal of Autoimmunity.* 1. November 2016;74:182–93.
 30. Wahren-Herlenius M, Dörner T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. *The Lancet.* 2013;382(9894):819–31.
 31. Gaipal US, Munoz LE, Grossmayer G, Lauber K, Franz S, Sarter K, u. a. Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *Journal of Autoimmunity.* 1. März 2007;28(2):114–21.
 32. Svensson B. Occurrence of deficient monocyte yeast cell phagocytosis in presence of rheumatic sera. *Scand J Rheumatol Suppl.* 1980;31:21–7.
 33. Batu ED. Monogenic systemic lupus erythematosus: insights in pathophysiology. *Rheumatol Int.* Oktober 2018;38(10):1763–75.
 34. Martínez Valle F, Balada E, Ordi-Ros J, Vilardell-Tarres M. DNase 1 and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews.* 1. Mai 2008;7(5):359–63.
 35. Schoggins JW. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annu*

Rev Virol. 29. September 2019;6(1):567–84.

36. Aue A, Szelinski F, Weißenberg SY, Wiedemann A, Rose T, Lino AC, u. a. Elevated STAT1 expression but not phosphorylation in lupus B cells correlates with disease activity and increased plasmablast susceptibility. *Rheumatology*. 1. November 2020;59(11):3435–42.
37. Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Plasma Cell Differentiation through Type I Interferon and Interleukin 6. *Immunity*. August 2003;19(2):225–34.
38. Bengtsson AA, Sturfelt G, Truedsson L, Blomberg J, Alm G, Vallin H, u. a. Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies. *Lupus*. 2000;9(9):664–71.
39. Peck–Radosavljevic M, Wichlas M, Homoncik–Kraml M, Kreil A, Hofer H, Jessner W, u. a. Rapid suppression of hematopoiesis by standard or pegylated interferon- α . *Gastroenterology*. Juli 2002;123(1):141–51.
40. Dörner T, Tanaka Y, Petri MA, Smolen JS, Wallace DJ, Dow ER, u. a. Baricitinib-associated changes in global gene expression during a 24-week phase II clinical systemic lupus erythematosus trial implicates a mechanism of action through multiple immune-related pathways. *Lupus Science & Medicine*. 1. Oktober 2020;7(1):e000424.
41. EMA. European Medicines Agency. 2021 [zitiert 1. August 2022]. Saphnelo. Verfügbar unter: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/saphnelo>
42. Vital EM, Merrill JT, Morand EF, Furie RA, Bruce IN, Tanaka Y, u. a. Anifrolumab efficacy and safety by type I interferon gene signature and clinical subgroups in patients with SLE: post hoc analysis of pooled data from two phase III trials. *Ann Rheum Dis*. Juli 2022;81(7):951–61.
43. Chasset F, Dayer JM, Chizzolini C. Type I Interferons in Systemic Autoimmune Diseases: Distinguishing Between Afferent and Efferent Functions for Precision Medicine and Individualized Treatment. *Frontiers in Pharmacology* [Internet]. 2021 [zitiert 13. Januar 2022];12. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2021.633821>
44. Hertzog P, Forster S, Samarajiwa S. Systems Biology of Interferon Responses. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. Januar 2011;31(1):5–11.
45. Biesen R, Häupl T. DNA-Microarrays. *Z Rheumatol*. 1. November 2011;70(9):803–8.
46. Strauß R, Rose T, Flint SM, Klotsche J, Häupl T, Peck-Radosavljevic M, u. a. Type I interferon as a biomarker in autoimmunity and viral infection: a leukocyte subset-specific analysis unveils hidden diagnostic options. *J Mol Med*. Juli 2017;95(7):753–65.

47. Lambers WM, de Leeuw K, Doornbos-van der Meer B, Diercks GFH, Bootsma H, Westra J. Interferon score is increased in incomplete systemic lupus erythematosus and correlates with myxovirus-resistance protein A in blood and skin. *Arthritis Res Ther.* 2019;21:260.
48. Yao Y, Higgs BW, Morehouse C, de los Reyes M, Trigona W, Brohawn P, u. a. Development of Potential Pharmacodynamic and Diagnostic Markers for Anti-IFN- α Monoclonal Antibody Trials in Systemic Lupus Erythematosus. *Hum Genomics Proteomics* [Internet]. 17. November 2009 [zitiert 27. Januar 2016];2009. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2950308/>
49. Biesen R, Demir C, Barkhudarova F, Grün JR, Steinbrich-Zöllner M, Backhaus M, u. a. Sialic acid-binding Ig-like lectin 1 expression in inflammatory and resident monocytes is a potential biomarker for monitoring disease activity and success of therapy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism.* 2008;58(4):1136–45.
50. Rempel H, Calosing C, Sun B, Pulliam L. Sialoadhesin Expressed on IFN-Induced Monocytes Binds HIV-1 and Enhances Infectivity. *PLOS ONE.* 16. April 2008;3(4):e1967.
51. Maria NI, Brkic Z, Waris M, van Helden-Meeuwsen CG, Heezen K, van de Merwe JP, u. a. MxA as a clinically applicable biomarker for identifying systemic interferon type I in primary Sjogren's syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 1. Juni 2014;73(6):1052–9.
52. El-Sherbiny YM, Md Yusof MY, Psarras A, Hensor EMA, Kabba KZ, Dutton K, u. a. B Cell Tetherin: A Flow Cytometric Cell-Specific Assay for Response to Type I Interferon Predicts Clinical Features and Flares in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatology.* 2020;72(5):769–79.
53. Mathian A, Mouries-Martin S, Dorgham K, Devilliers H, Barnabei L, Salah EB, u. a. Monitoring Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus With Single-Molecule Array Digital Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Quantification of Serum Interferon- α . *Arthritis & Rheumatology.* 2019;71(5):756–65.
54. Huijser E, Göpfert J, Brkic Z, van Helden-Meeuwsen CG, Jansen S, Mandl T, u. a. Serum interferon- α 2 measured by single-molecule array associates with systemic disease manifestations in Sjögren's syndrome. *Rheumatology.* 1. Mai 2022;61(5):2156–66.
55. van den Hoogen LL, van Roon JAG, Mertens JS, Wienke J, Lopes AP, de Jager W, u. a. Galectin-9 is an easy to measure biomarker for the interferon signature in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* Dezember 2018;77(12):1810–4.
56. Bauer JW, Petri M, Batliwalla FM, Koeuth T, Wilson J, Slattery C, u. a. Interferon-Regulated Chemokines as Biomarkers of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity: A Validation Study. *Arthritis Rheum.* Oktober

2009;60(10):3098–107.

57. Hua J, Kirou K, Lee C, Crow MK. Functional assay of type I interferon in systemic lupus erythematosus plasma and association with anti-RNA binding protein autoantibodies. *Arthritis & Rheumatism*. 2006;54(6):1906–16.
58. Schwarting A, Friedel H, Garal-Pantaler E, Pignot M, Wang X, Nab H, u. a. The Burden of Systemic Lupus Erythematosus in Germany: Incidence, Prevalence, and Healthcare Resource Utilization. *Rheumatol Ther*. März 2021;8(1):375–93.
59. Rose T, Dörner T. Antinukleäre Antikörper in der Diagnostik rheumatischer Erkrankungen. *Z Rheumatol*. Juni 2020;79(5):447–58.
60. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, u. a. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*. September 2019;78(9):1151–9.
61. Westhoff G, Zink A. [Epidemiology of primary Sjögren’s syndrome]. *Z Rheumatol*. Februar 2010;69(1):41–9.
62. Fox RI. Sjögren’s syndrome. *The Lancet*. 2005;366(9482):321–31.
63. Mavragani CP, Moutsopoulos HM. Primary versus Secondary Sjögren Syndrome: Is It Time To Reconsider These Terms? *The Journal of Rheumatology*. 1. Juli 2019;46(7):665–6.
64. Brito-Zerón P, Izmirly PM, Ramos-Casals M, Buyon JP, Khamashta MA. The clinical spectrum of autoimmune congenital heart block. *Nat Rev Rheumatol*. Mai 2015;11(5):301–12.
65. Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, u. a. 2016 ACR-EULAR Classification Criteria for primary Sjögren’s Syndrome: A Consensus and Data-Driven Methodology Involving Three International Patient Cohorts. *Arthritis Rheumatol*. Januar 2017;69(1):35–45.
66. Izmirly P, Kim M, Friedman DM, Costedoat-Chalumeau N, Clancy R, Copel JA, u. a. Hydroxychloroquine to Prevent Recurrent Congenital Heart Block in Fetuses of Anti-SSA/Ro-Positive Mothers. *J Am Coll Cardiol*. 21. Juli 2020;76(3):292–302.
67. Ambrosi A, Thorlacius GE, Sonesson SE, Wahren-Herlenius M. Interferons and innate immune activation in autoimmune congenital heart block. *Scand J Immunol*. Januar 2021;93(1):e12995.
68. Meyer A, Meyer N, Schaeffer M, Gottenberg JE, Geny B, Sibilía J. Incidence and prevalence of inflammatory myopathies: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)*. Januar 2015;54(1):50–63.
69. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and Dermatomyositis: (First of Two

Parts). *N Engl J Med*. 13. Februar 1975;292(7):344–7.

70. Leclair V, Lundberg IE. New Myositis Classification Criteria—What We Have Learned Since Bohan and Peter. *Curr Rheumatol Rep* [Internet]. 2018 [zitiert 15. Januar 2020];20(4). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5857275/>

71. Tanboon J, Uruha A, Stenzel W, Nishino I. Where are we moving in the classification of idiopathic inflammatory myopathies? *Current Opinion in Neurology*. Oktober 2020;33(5):590–603.

72. Lundberg IE, Tjärnlund A, Bottai M, Werth VP, Pilkington C, Visser M de, u. a. 2017 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies and their major subgroups. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(12):1955–64.

73. Betteridge Z, McHugh N. Myositis-specific autoantibodies: an important tool to support diagnosis of myositis. *Journal of Internal Medicine*. 2016;280(1):8–23.

74. Pope JE, Denton CP, Johnson SR, Fernandez-Codina A, Hudson M, Nevskaya T. State-of-the-art evidence in the treatment of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*. April 2023;19(4):212–26.

75. Pathophysiology of systemic sclerosis: current understanding and new insights [Internet]. [zitiert 15. August 2023]. Verfügbar unter: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/1744666X.2019.1614915?needAccess=true&role=button>

76. Smith V, Vanhaecke A, Herrick AL, Distler O, Guerra MG, Denton CP, u. a. Fast track algorithm: How to differentiate a “scleroderma pattern” from a “non-scleroderma pattern”. *Autoimmunity Reviews*. 1. November 2019;18(11):102394.

77. Höppner J, Tabeling C, Casteleyn V, Kedor C, Windisch W, Burmester GR, u. a. Comprehensive autoantibody profiles in systemic sclerosis: Clinical cluster analysis. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2023 [zitiert 8. August 2023];13. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.1045523>

78. Hoogen F van den, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, u. a. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1. November 2013;72(11):1747–55.

79. Mosca M, Tani C, Aringer M, Bombardieri S, Boumpas D, Brey R, u. a. European League Against Rheumatism recommendations for monitoring patients with systemic lupus erythematosus in clinical practice and in observational studies. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1. Juli 2010;69(7):1269–74.

80. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, u. a. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* November 1982;25(11):1271–7.
81. Brkic Z, Maria NI, van Helden-Meeuwsen CG, van de Merwe JP, van Daele PL, Dalm VA, u. a. Prevalence of interferon type I signature in CD14 monocytes of patients with Sjögren’s syndrome and association with disease activity and BAFF gene expression. *Annals of the rheumatic diseases.* 2013;72(5):728–35.
82. Bolko L, Jiang W, Tawara N, Landon-Cardinal O, Anquetil C, Benveniste O, u. a. The role of interferons type I, II and III in myositis: A review. *Brain Pathology.* 2021;31(3):e12955.
83. Gottenberg JE, Cagnard N, Lucchesi C, Letourneur F, Mistou S, Lazure T, u. a. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren’s syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006;103(8):2770–5.
84. Fanouriakis A, Kostopoulou M, Alunno A, Aringer M, Bajema I, Boletis JN, u. a. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 29. März 2019;annrheumdis-2019-215089.
85. Zorn-Pauly L, von Stuckrad ASL, Klotsche J, Rose T, Kallinich T, Enghard P, u. a. Evaluation of SIGLEC1 in the diagnosis of suspected systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 27. November 2021;keab875.
86. Flechsig A, Rose T, Barkhudarova F, Strauss R, Klotsche J, Dährnich C, u. a. What is the clinical significance of anti-Sm antibodies in systemic lupus erythematosus? A comparison with anti-dsDNA antibodies and C3. *Clin Exp Rheumatol.* 3. März 2017;
87. Erbliche Interferonopathie [Internet]. [zitiert 8. September 2022]. Verfügbar unter: <https://www.trillium.de/zeitschriften/trillium-immunologie/archiv/ausgaben-2018/heft-42018/aus-der-klinischen-forschung/nerven-und-rheuma-quo-vadis/erbliche-interferonopathie.html>
88. Petri M, Singh S, Tesfasyone H, Dedrick R, Fry K, Lal PG, u. a. Longitudinal expression of type I interferon responsive genes in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 10. Januar 2009;18(11):980–9.
89. Tanaka Y, Tummala R. Anifrolumab, a monoclonal antibody to the type I interferon receptor subunit 1, for the treatment of systemic lupus erythematosus: an overview from clinical trials. *Mod Rheumatol.* Januar 2021;31(1):1–12.
90. Morand EF, Furie R, Tanaka Y, Bruce IN, Askanase AD, Richez C, u. a. Trial of Anifrolumab in Active Systemic Lupus Erythematosus. *New England Journal of Medicine.* 16. Januar 2020;382(3):211–21.
91. Benveniste O, Goebel HH, Stenzel W. Biomarkers in Inflammatory

Myopathies—An Expanded Definition. *Front Neurol* [Internet]. 2019 [zitiert 17. Juni 2020];10. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2019.00554/full>

92. Bedin AS, Makinson A, Picot MC, Mennechet F, Malergue F, Pisoni A, u. a. Monocyte CD169 Expression as a Biomarker in the Early Diagnosis of Coronavirus Disease 2019. *The Journal of Infectious Diseases*. 15. Februar 2021;223(4):562–7.

93. Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, Michailidis E, Hoffmann HH, Zhang Y, u. a. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 23. Oktober 2020;370(6515):eabd4585.

94. Whitney AR, Diehn M, Popper SJ, Alizadeh AA, Boldrick JC, Relman DA, u. a. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 18. Februar 2003;100(4):1896–901.

95. Landolt-Marticorena C, Bonventi G, Lubovich A, Ferguson C, Unnithan T, Su J, u. a. Lack of association between the interferon- α signature and longitudinal changes in disease activity in systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1. September 2009;68(9):1440–6.

96. Pannu KK, Joe ET, Iyer SB. Performance evaluation of QuantiBRITE phycoerythrin beads. *Cytometry*. 1. Dezember 2001;45(4):250–8.

97. Oliveira JJ, Karrar S, Rainbow DB, Pinder CL, Clarke P, Rubio García A, u. a. The plasma biomarker soluble SIGLEC-1 is associated with the type I interferon transcriptional signature, ethnic background and renal disease in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy* [Internet]. Dezember 2018 [zitiert 28. Februar 2020];20(1). Verfügbar unter: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-018-1649-1>

98. Wienke J, Enders FB, Lim J, Mertens JS, Hoogen LL van den, Wijngaarde CA, u. a. Galectin-9 and CXCL10 as Biomarkers for Disease Activity in Juvenile Dermatomyositis: A Longitudinal Cohort Study and Multicohort Validation. *Arthritis & Rheumatology*. 2019;71(8):1377–90.

99. Rose T, Grützkau A, Klotsche J, Enghard P, Flechsig A, Keller J, u. a. Are interferon-related biomarkers advantageous for monitoring disease activity in systemic lupus erythematosus? A longitudinal benchmark study. *Rheumatology*. 1. September 2017;56(9):1618–26.

100. Rose T, Grützkau A, Hirsland H, Huscher D, Dähnrich C, Dzionek A, u. a. IFN α and its response proteins, IP-10 and SIGLEC-1, are biomarkers of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 10. Januar 2013;72(10):1639–45.

6 Danksagung

In der Onlineversion wurde der Text der Danksagung gelöscht.

7 Erklärung

gemäß § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité – Universitätsmedizin Berlin

Hiermit erkläre ich, dass - weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde, - die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden, - mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Datum

Unterschrift