

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und
Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die durchflusszytometrische Messung von SIGLEC1: ein Typ-I-
Interferon-Biomarker bei idiopathischen inflammatorischen
Myopathien

The flow cytometric assessment of SIGLEC1: a type-I-interferon
biomarker in idiopathic inflammatory myopathies

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Manuel Graf

Datum der Promotion: 28.02.2025

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	iv
Abbildungsverzeichnis.....	v
Abkürzungsverzeichnis.....	vi
Abstract	1
Abstract – Deutsch.....	1
Abstract – English	2
1 Einleitung.....	4
1.1 Idiopathische inflammatorische Myopathien (IIM)	4
1.1.1 Epidemiologie	4
1.1.2 Pathogenese.....	4
1.1.3 Klinik	5
1.1.4 Diagnostik	6
1.1.5 Therapie.....	8
1.2 Typ-I-Interferone	9
1.2.1 Die Rolle von Typ-I-Interferonen bei Autoimmunerkrankungen.....	9
1.2.2 Methoden zur Messung von Typ-I-Interferonen.....	10
1.2.3 Typ-I-Interferone und zielgerichtete Therapien.....	11
1.3 Biomarker bei IIM.....	11
1.3.1 Etablierte Biomarker bei IIM	11
1.3.2 Typ-I-Interferone als Biomarker bei IIM	12
1.3.3 SIGLEC1 – ein Typ-I-Interferon-Biomarker bei IIM?.....	12
2 Methodik.....	14
2.1 Ethikvotum	14
2.2 Studienpopulation	14
2.3 Messung von Laborparametern	14

2.3.1	SIGLEC1	15
2.3.2	Autoantikörper	15
2.4	Messung von Krankheitsaktivität und Therapieansprechen	15
2.5	Die Bestimmung der Typ-I-Interferon-Aktivität in Muskelbiopsien mittels Immunohistochemie	16
2.6	Statistische Methoden	17
3	Ergebnisse	18
3.1	Studienpopulation und -charakteristika	18
3.2	SIGLEC1-Expression und CK in den Studiengruppen	19
3.3	Krankheitsaktivität vs. SIGLEC1 und CK	20
3.3.1	Querschnittanalyse	20
3.3.2	Längsschnittanalyse	21
3.4	SIGLEC1 und Therapieansprechen	23
3.5	SIGLEC1 und Prednisolon	24
3.6	Myositis-Spezifische Antikörper	25
3.6.1	Myositis-Spezifische Antikörper vs. SIGLEC1-Expression	26
3.6.2	Myositis-Spezifische Antikörper vs. CK	26
3.7	Vergleich zwischen der SIGLEC1-Expression auf Monozyten im Blut und der Expression von ISG15/MxA im Muskelgewebe.....	27
4	Diskussion	29
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	29
4.2	Einbettung der Ergebnisse in den aktuellen Forschungsstand.....	29
4.4	Stärken und Limitationen der Studie	32
4.5	Implikationen für die klinische Anwendung und zukünftige Forschung.....	33
5	Schlussfolgerungen	35
	Literaturverzeichnis	36
	Eidesstattliche Versicherung	45

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	46
Auszug aus der Journal Summary List.....	48
Druckexemplar der Publikation.....	49
Lebenslauf.....	67
Komplette Publikationsliste.....	68
Danksagung	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Antikörper bei IIM.....	6
Tabelle 2 Kriterien der EULAR/ACR Klassifikation für Patient*innen mit IIM.....	8
Tabelle 3 Studienpopulation	19
Tabelle 4 Längsschnittanalyse für Patient*innen mit DM.....	23

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Das Typ-Interferon-System und seine Messverfahren.....	10
Abbildung 2 Verlaufsdaten von zwei Patienten.....	22
Abbildung 3 SIGLEC1-Expression und Prednisolon.....	25
Abbildung 4 SIGLEC1 und CK vs. MSA bei IIM-Patient*innen mit aktiver Erkrankung..	27
Abbildung 5 Expression von SIGLEC1 im Blut und ISG15/MxA im Muskel.....	28

Abkürzungsverzeichnis

aDM – adulte Dermatomyositis

ARS – Aminoacyl-tRNA-Synthetase

AS – Anti-Synthetase Syndrom

betaST / standardized beta – Standardisierter Regressionskoeffizient (Beta-Wert)

BSG – Blutsenkungsgeschwindigkeit

CI – Konfidenzintervall

CK – Kreatinkinase (Creatine Kinase)

Cn1A – Cytosolic-nucleotidase-1A

CRP – C-reaktives Protein

DM – Dermatomyositis

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

EMG – Elektromyographie

EULAR/ACR – European Alliance of Associations for Rheumatology /American College of Rheumatology

GOT – Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

GPT – Glutamat-Pyruvat-Transaminase

HMGCR – 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase

IBM – Einschlusskörpermyositis (Inclusion Body Myositis)

IIM – Idiopathische Inflammatorische Myopathie

IMNM – Immunvermittelte Nekrotisierende Myopathie (Immune-Mediated Necrotizing Myopathy)

IVIG – intravenöse Immunglobuline

JAK – Januskinase

jDM – juvenile Dermatomyositis

LDH – Laktat-Dehydrogenase

MAA – Myositis-Assoziierte Antikörper (Myositis-Associated Antibodies)

MDA-5 – Melanoma Differentiation-Associated Protein 5

MRT – Magnetresonanztomographie

MSA – Myositis-Spezifische Antikörper (Myositis-Specific Antibodies)

MTX – Methotrexat

NXP2 – Nuclear Matrix Protein-2

OM – Overlap Myositis

PCR – Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)

PM – Polymyositis

RTqPCR – Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction

SAE – Sumo-Aktivierungs-Enzym

SIGLEC1 – Sialic Acid-Binding Ig-like Lectin 1

SLE – Systemischer Lupus Erythematodes

SRP – Signal Recognition Particle

STAT – Signal Transducers and Activators of Transcription

TIF1 γ – Transcriptional Intermediary Factor 1-gamma

Vs. – versus

Abstract

Abstract – Deutsch

Hintergrund

Typ-I-Interferone spielen bei idiopathischen inflammatorischen Myopathien (IIM) und anderen systemischen Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle für die Pathogenese und Aufrechterhaltung der Krankheitsaktivität. Im klinischen Alltag sind Typ-I-Interferon-Biomarker jedoch bisher nicht etabliert und es existiert kein Goldstandard für ihre Bestimmung. *Sialic Acid Binding Ig-like Lectine 1* (SIGLEC1) ist ein Typ-I-Interferon induziertes Oberflächenprotein auf Monozyten, lässt sich mittels Durchflusszytometrie bestimmen und ist daher ein potenzieller Biomarker für die Erfassung der Typ-I-Interferon-Aktivierung bei IIM.

Zielsetzung

In dieser Studie wurde untersucht, ob SIGLEC1 bei den IIM-Subtypen (Dermatomyositis, DM; Anti-Synthetase Syndrom, AS; immunvermittelte nekrotisierende Myopathie, IMNM; Einschlusskörpermyositis, IBM; Overlap Myositis, OM) erhöht ist. Ein weiteres Ziel dieser Studie war es, die Assoziation zwischen SIGLEC1 und der Krankheitsaktivität, dem Therapieansprechen, den Myositis-Spezifischen Antikörpern (MSA) sowie der Expression von Typ-I-Interferonen im Muskelgewebe zu untersuchen.

Methoden

In diese retrospektive Studie wurden juvenile und erwachsene Patient*innen mit IIM und mindestens einer durchflusszytometrischen Messung von SIGLEC1 auf Monozyten, die zwischen 2015 und 2020 an der Charité – Universitätsmedizin Berlin erfolgt ist, eingeschlossen. Kontrollgruppen aus Patient*innen mit Systemischem Lupus Erythematoses und Gesunden wurden aus separaten Datensätzen gebildet. Die Bewertung der Krankheitsaktivität erfolgte mittels *Physician Global Assessment* (PGA) und bei juvenilen Patient*innen zusätzlich mittels *Childhood Myositis Assessment Scale* (CMAS). Für die statistische Auswertung lagen Querschnitt- und Längsschnittdaten für SIGLEC1 sowie Kreatinkinase (CK) vor. In Muskelbiopsien wurde die Typ-I-Interferon-Aktivität immunhistochemisch mittels *Interferon-stimulated gene 15* (ISG15) und *Myxovirus resistance protein A* (MxA) bestimmt.

Ergebnisse

Insgesamt konnten 74 Patient*innen mit DM, AS, IBM oder IMNM eingeschlossen werden. Die SIGLEC1-Expression auf Monozyten war bei juvenilen und adulten Patient*innen mit DM signifikant erhöht. Bei diesen Patient*innen korrelierte die Expression sowohl mit der Krankheitsaktivität als auch mit dem Therapieansprechen. SIGLEC1 war der CK als Verlaufsparemeter überlegen. Eine signifikante Assoziation von SIGLEC1 mit einzelnen MSA konnte nicht festgestellt werden. Alle Patient*innen mit Nachweis von ISG15/MxA in der Muskelbiopsie zeigten eine erhöhte SIGLEC1-Expression auf Monozyten im Blut.

Schlussfolgerung

SIGLEC1 auf Monozyten war bei juvenilen und adulten Patient*innen mit DM signifikant erhöht und korrelierte sowohl im Querschnitt als auch im Längsschnitt mit der Krankheitsaktivität. Die durchflusszytometrische Messung von SIGLEC1 stellt damit einen potenziellen Biomarker bei der DM dar. Für die weitere Validierung von SIGLEC1 sind prospektive Studien mit direktem Vergleich zu anderen Typ-I-Interferon-Biomarkern erforderlich.

Abstract – English

Background

Type I interferons play an important role in the pathogenesis and sustainment of disease activity in idiopathic inflammatory myopathies (IIM). However, type I interferon biomarkers have not yet been established in routine clinical practice and there is no reference standard for their determination. Sialic acid binding Ig-like lectin 1 (SIGLEC1) is a type I interferon-induced surface protein on monocytes, which can be determined using flow cytometry and might be a candidate biomarker for the assessment of the type I interferon signature in IIM.

Objective

The aim of this study was to investigate whether SIGLEC1 is elevated in IIM subtypes (dermatomyositis, DM; antisynthetase syndrome, AS; immune-mediated necrotising myopathy, IMNM; inclusion body myositis, IBM; overlap myositis, OM). A further aim of

this study was to investigate whether there is an association between SIGLEC1 and disease activity, response to therapy, myositis-specific antibodies (MSA), and the expression of type I interferons in muscle tissue.

Methods

This retrospective study included juvenile and adult patients with IIM and at least one flow cytometric measurement of SIGLEC1 on monocytes, performed at the Charité - Universitätsmedizin Berlin between 2015 and 2020. Control groups with systemic lupus erythematosus and healthy individuals were analyzed separately. Disease activity was assessed using Physician Global Assessment (PGA) and, in juvenile patients, with the Childhood Myositis Assessment Scale (CMAS). Cross-sectional and longitudinal data for SIGLEC1 and creatine kinase (CK) was used for the statistical analysis. In muscle biopsies, type I interferon activity was determined by immunohistochemistry using interferon-stimulated gene 15 (ISG15) and myxovirus resistance protein A (MxA)

Results

Seventy-four patients with DM, AS, IBM or IMNM were included. SIGLEC1 on monocytes was significantly increased in juvenile and adult patients with DM. In these patients, SIGLEC1 correlated with both disease activity and treatment response. SIGLEC1 was superior to CK as a progression parameter. A significant association of SIGLEC1 with MSA could not be demonstrated. All patients with expression of ISG15/MxA in muscle biopsy had increased SIGLEC1 expression on monocytes in their blood.

Conclusion

SIGLEC1 expression on monocytes was significantly elevated in juvenile and adult patients with DM and correlated with disease activity - both in the cross-sectional and longitudinal analysis. Therefore, flow cytometric measurement of SIGLEC1 presents a potential biomarker in DM. For further validation of SIGLEC1, prospective studies with a direct comparison to other type I interferon biomarkers are necessary.

1 Einleitung

1.1 Idiopathische inflammatorische Myopathien (IIM)

Die Einteilung der idiopathischen inflammatorischen Myopathien (IIM) – auch als autoimmune Myositiden bezeichnet – unterliegt einem fortlaufenden Wandel. In der Erstbeschreibung sprachen Bohan und Peter im Jahre 1975 lediglich von Polymyositis (PM) und Dermatomyositis (DM),[1] die deutsche Leitlinie „Myositissyndrome“ von 2022 listet mittlerweile fünf weitere Unterformen auf: die juvenile Dermatomyositis (jDM), das Anti-Synthetase Syndrom (AS), die immunvermittelte nekrotisierende Myopathie (immune-mediated necrotizing myopathy, IMNM), die Einschlusskörpermyositis (inclusion body myositis, IBM) und die Overlap Myositis (OM).[2] Einige Autor*innen stellen die Polymyositis als eigenständige Diagnose in Frage, insbesondere unter histopathologischen Gesichtspunkten.[2–5]

1.1.1 Epidemiologie

Inzidenz und Prävalenz von IIM wurden in einer systematischen Übersichtsarbeit, in der Studienergebnisse von 1966 bis 2013 aus verschiedenen Ländern ausgewertet wurden, mit 1,16 bis 19 pro einer Millionen Einwohner*innen pro Jahr (Inzidenz) und 2,4 bis 33,8 pro 100.000 Einwohner*innen (Prävalenz) angegeben.[6] Die DM und AS kommen insgesamt am häufigsten vor. Bei Patient*innen mit einem Alter über 50 Jahren stellt die IBM die häufigste Entität dar.[2]

1.1.2 Pathogenese

Die Ätiologie der IIM ist bislang nicht geklärt. Als Triggerfaktoren wurden HLA-Genotypen und Virusinfektionen identifiziert. Die IIM-Subtypen scheinen sich in ihrer Pathogenese zu unterscheiden, ein wichtiges gemeinsames Merkmal ist jedoch der Nachweis von Autoantikörpern.[2,7,8] Für die DM spielen erhöhte Typ-I-Interferone eine wichtige Rolle in der Pathogenese (siehe Kapitel 1.2). Diese führen über verschiedene Mechanismen zu Entzündung und Atrophie von Muskelfasern.[9] Bei der IBM scheinen dagegen degenerative und entzündliche Prozesse Hand in Hand zu gehen.[10] Die IMNM kann durch eine medikamentöse Statin-Therapie ausgelöst werden.[8]

1.1.3 Klinik

Leitsymptom der IIM ist die proximal-symmetrische Muskelschwäche. Diese tritt in allen IIM-Subgruppen in unterschiedlicher Ausprägung auf. Bei der IBM sind jedoch auch distale Muskelgruppen betroffen.[2,8] Je nach IIM-Subtyp und Autoantikörper finden in weiteren Organsystemen Entzündungsprozesse statt, insbesondere in der Haut und der Lunge (siehe Tabelle 1). Patient*innen mit MDA5-positiver DM und Patient*innen mit AS haben ein hohes Risiko, eine interstitielle Lungenerkrankung zu entwickeln.[11] Die für die DM charakteristische Hautbeteiligung zeigt sich oft als initiales Symptom und äußert sich in Form eines Schmetterlingserythems, sowie Erythemen auf den Oberlidern im Brust-, Nacken- und oberen Rückenbereich (heliotropes Erythem). Zudem werden Gottron-Papeln (häufig streckseitenbetont über den Fingergelenken) vorgefunden.[2,8,12] Raynaud-Phänomen und Mechanikerhände („mechanic’s hands“) kommen klassischerweise bei Patient*innen mit AS vor.[11,12] Viele Patient*innen können zudem unter Dysphagie, Muskelschmerzen und Arthritis leiden. Prognostisch wichtig ist die Assoziation mit Karzinomerkrankungen, die vor allem für adulte DM-Patient*innen mit NXP2- oder TIF1 γ -Autoantikörpern nachgewiesen wurde (siehe Tabelle 1).[8,13]

Tabelle 1 Antikörper bei IIM

Antikörper	Myositis-Unterform	Häufigkeit*	Klinische Charakteristika			
			Muskulatur	Lunge	Haut	Karzinom
Myositis-spezifische Antikörper						
Anti-Mi2	DM	Erw.: 5 - 10 % Kind.: 4 - 10 %	+	-	+	?
Anti-MDA5	DM	Erw.: 1 - 30 % Kind.: 7%	-/+	++	+	-
Anti-TIF1γ	DM	Erw.: 7 % Kind.: 18 - 30 %	-/+	-	++	++ (nur Erw.)
Anti-NXP2	DM	Erw.: 2 - 17% Kind.: 15 - 20 %	++	-	+	+ (nur Erw.)
Anti-SAE	DM	Erw.: 3 % Kind.: 1 %	-/+	-	+	?
Anti-ARS - <i>Anti-Jo1</i> - <i>Anti-PL7</i> - <i>Anti-PL12</i> - <i>andere</i>	AS	Erw.: 20 - 30% Kind.: 2%	+	++	+	-
Anti-SRP	IMNM	Erw.: 2 % Kind.: 2 %	++	+	-/+	-
Anti-HMGCR	IMNM	Erw.: 6 % Kind.: 1 %	++	-	-/+	?
Anti-cn1A	IBM	Erw.: 4 – 21 % Kind.: 11 – 35 %	+	-	-	-
Myositis-assoziierte Antikörper						
Anti-Ro52	Overlap Myositis	Erw.: 25 % Kind.: 6 %	-	-	-	-
Anti-U1RNP	Overlap Myositis	Erw.: 10 % Kind.: 5 %	+	-	-	-
Anti-Ku	Overlap Myositis	Erw.: < 1 % Kind.: < 1 %	-	-	-	-
Anti-PmScl	Overlap Myositis	Erw.: 8 % Kind.: 5 %	+	+	-/+	-

Modifiziert nach Betteridge et al.,[14] Jordan et al.,[15] Myositis-Leitlinie 2022 [2] und McHugh et al.[11]; Erw., Erwachsene; Kind., Kinder. *die Häufigkeitsangaben variieren in der Literatur, die angegebenen Zahlen sind übernommen von Hugh et al.[11]

1.1.4 Diagnostik

Die Anamnese und körperliche Untersuchung stellen eine wichtige Grundlage für die Diagnostik dar. Neben der Inspektion der Haut ist vor allem die Erfassung der Muskelkraft essenziell, um auch den Verlauf der Erkrankung zu evaluieren. Hier hat sich der *Manual Muscle Test-8* (MMT-8) als nützlich erwiesen, beziehungsweise die *Childhood Myositis Assessment Scale* (CMAS) bei juvenilen Patient*innen mit DM. Ein wichtiger Bestandteil der Diagnostik ist die Bestimmung von Autoantikörpern. Hierbei werden die Myositis-

spezifischen (Myositis Specific Antibodies, MSA) und die Myositis-assoziierten Antikörper (Myositis Associated Antibodies, MAA) unterschieden. Einzelne MSA sind mit unterschiedlichen IIM-Subtypen assoziiert (siehe Tabelle 1). MSA-Antikörpertiter spielen für das Therapiemonitoring bislang keine Rolle. Laborchemisch ist, neben Entzündungsparametern (CRP, BSG), die Erhöhung der Kreatinkinase (CK) charakteristisch für die Myositiden. Besonders hohe CK-Werte sind bei Anti-SRP- und Anti-HMGCR-positiven IMNM zu erwarten.[11] Bei der DM kann auch eine normwertige CK vorliegen, insbesondere bei Patient*innen mit MDA-5- und TIF1γ-Autoantikörpern.[2,14]

Zur Darstellung von entzündlicher Aktivität, fettigem Umbau und/oder Atrophie der (proximalen Oberschenkel-)Muskulatur kann eine Magnetresonanztomographie (MRT) oder Sonographie durchgeführt werden. Kriterien der Indikationsstellung und Standardisierung für diese bildgebenden Verfahren sind jedoch bisher nicht klar definiert.[2,16] Mittels Elektromyographie (EMG) kann zwischen aktiver und chronischer Myopathie unterschieden werden, ebenso dient sie zur Abgrenzung gegenüber neuromuskulären Erkrankungen.[7] Prinzipiell sollte eine Muskelbiopsie angestrebt werden um die Diagnose zu bestätigen, aber auch um wichtige Differentialdiagnosen auszuschließen.

Für Studienzwecke wurde 2017 die EULAR/ACR-Klassifikation der IIM veröffentlicht.[17] Anhand definierter Kriterien (siehe Tabelle 2) wird dabei ein Punktwert errechnet, der die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer IIM angibt. Allerdings wurden keine Patient*innen mit AS und nur sehr wenige mit IMNM eingeschlossen und wichtige Autoantikörper fehlen, sodass weitere Studien hier notwendig sind.

Tabelle 2 Kriterien der EULAR/ACR Klassifikation für Patient*innen mit IIM

Alter bei Beginn der ersten Symptome

- 0 – 17
- 18 – 39
- 40+

Muskelschwäche

- Objektiv gemessene (i.d.R. zunehmende) symmetrische Schwäche der proximalen oberen Extremitäten
- Objektiv gemessene (i.d.R. zunehmende) symmetrische Schwäche der proximalen unteren Extremitäten
- Die Nackenbeugemuskel sind relativ gesehen schwächer als die Nackenstreckmuskeln
- In den Beinen ist die proximale Muskulatur relativ gesehen schwächer als die distale Muskulatur

Hautmanifestationen

- Heliotroper Ausschlag
- Gottron-Papeln
- Gottron-Zeichen

Andere klinische Manifestationen

- Dysphagie oder ösophageale Dysmotilität

Laborparameter

- Anti-Jo-1 (anti-Histidyl-tRNA synthetase)-Autoantikörper liegen vor
- Im Serum liegen erhöhte Werte vor, für:
 - Kreatinkinase (CK) *oder*
 - Laktatdehydrogenase (LDH) *oder*
 - Aspartat-Aminotransferase (ASAT/AST/SGOT) *oder*
 - Alanin-Aminotransferase (ALAT/ALT/SGPT)

Histopathologische Kriterien

- Endomysiale Infiltration durch mononukleären Zellen, die Muskelfasern umgeben, jedoch nicht in sie eindringen
- Perimysiale und/oder perivaskuläre Infiltration durch mononukleären Zellen
- Perifaszikuläre Atrophie
- Geränderte Vakuolen (*rinded vacuoles*)

Modifiziert und übersetzt nach Lundberg et al.[17] und <http://www.imm.ki.se/biostatistics/calculators/iim/>; letzter Zugriff: 05.12.2022, 10:19 Uhr.

1.1.5 Therapie

Zentraler Baustein der Therapie sind supportive Maßnahmen wie Rehabilitation, Physiotherapie, Ergotherapie und gegebenenfalls Logopädie. Weiterhin stehen verschiedene Medikamente zur Verfügung.[2] Die Akuttherapie erfolgt gemäß der

Myositis-Leitlinie von 2022 mit einem Prednisolonäquivalent und kann bei Bedarf mit einem Immunsuppressivum oder intravenösen Immunglobulinen (IVIG) kombiniert werden.[2] Die Langzeittherapie kann mit verschiedenen Immunsuppressiva durchgeführt werden (beispielsweise Azathioprin, Methotrexat [MTX] oder Mycophenolat-Mofetil [MMF]). Bei unzureichendem Ansprechen oder extramuskulärer Organbeteiligung kann eine Therapieeskalation mit zusätzlichen Immunsuppressiva beziehungsweise mittels Hinzunahme von Rituximab, Cyclophosphamid, Leflunomid oder Januskinase (JAK)-Inhibitoren (Tofacitinib, Baricitinib) erfolgen.[2] Die Therapie der IBM nimmt eine Sonderstellung ein, da Glukokortikoide und andere Immunsuppressiva bei dieser Erkrankung keinen gesicherten Nutzen haben. Neben dem Therapieversuch mit IVIG steht hier die symptomatische Therapie (insbesondere die regelmäßige Physiotherapie) im Vordergrund.[2]

Die Therapie der juvenilen Myositiden ähnelt der Therapie bei erwachsenen Myositis-Patient*innen, wobei Glukokortikoide und MTX hier zur Standardtherapie gehören.[2,18] Bei paraneoplastischer DM ist eine hämato-onkologische Behandlung in der Regel notwendig.

1.2 Typ-I-Interferone

1.2.1 Die Rolle von Typ-I-Interferonen bei Autoimmunerkrankungen

In der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen wie dem SLE und der DM wurde die Rolle der Typ-I-Interferone bereits beschrieben.[19,20] Interferone sind Zytokine und werden in Typ-I, Typ-II und Typ-III eingeteilt. Zu den Typ-I-Interferonen gehören unter anderem Interferon alpha (mit seinen 13 Subtypen) und Interferon beta.[21] Für die Synthese von Typ-I-Interferonen spielen dendritische Zellen eine große Rolle. Die Aktivierung der dendritischen Zellen verläuft über verschiedene Mechanismen. Vermutlich sind dabei Immunkomplexe relevant, die über Toll-like-Rezeptoren eine intrazelluläre Signalkaskade mit Aktivierung Interferon-stimulierter Gene auslösen. Weitere andere Typ-I-Interferon Aktivierungswege sind bekannt, wie z.B. über RIG-I. Neben der verstärkten Genexpression Interferon-regulierter Gene kommt es auch zu einer Produktion von Typ-I-Interferonen, die wiederum an Interferon-alpha/beta-Rezeptoren (IFNAR) binden, welche an der Oberfläche einer Vielzahl von Zellen zu finden sind.[21] Über den JAK-STAT-Signalweg werden daraufhin weitere Interferon-

stimulierte Gene aktiviert, die unter anderem eine vermehrte Antikörperproduktion und eine gesteigerte B- und T-Zellantwort verursachen.[22,23] Dadurch ergeben sich immunmodulatorische, aber auch antivirale und antitumorale Wirkungen.[22]

1.2.2 Methoden zur Messung von Typ-I-Interferonen

Bisher gibt es keinen Goldstandard zur Messung von Typ-I-Interferonen. Wie in Abbildung 1 dargestellt, kommen eine Reihe unterschiedlicher Verfahren in Frage, die die Aktivität des Typ-I-Interferon-Systems auf unterschiedlichen Ebenen messen. Mit dem Ziel der Harmonisierung von Studien zu Typ-I-Interferonen bei rheumatologischen Erkrankungen legten Burska et al. eine Übersichtsarbeit vor.[24] Die große Mehrzahl an Studien nutzten RNA microassays und qPCR zur Bestimmung von Scores aus Interferon-stimulierten Genen (ISGs). Eine weitere häufige Methode war die Verwendung von Immunoassays zur direkten Messung von Interferonen oder von Interferon-induzierten Proteinen. Die Durchflusszytometrie wurde in bisher 8 von 276 ausgewerteten Studien verwendet. Neben SIGLEC1 wurden unter anderem auch die Oberflächenproteine CD64 und MxA bestimmt.

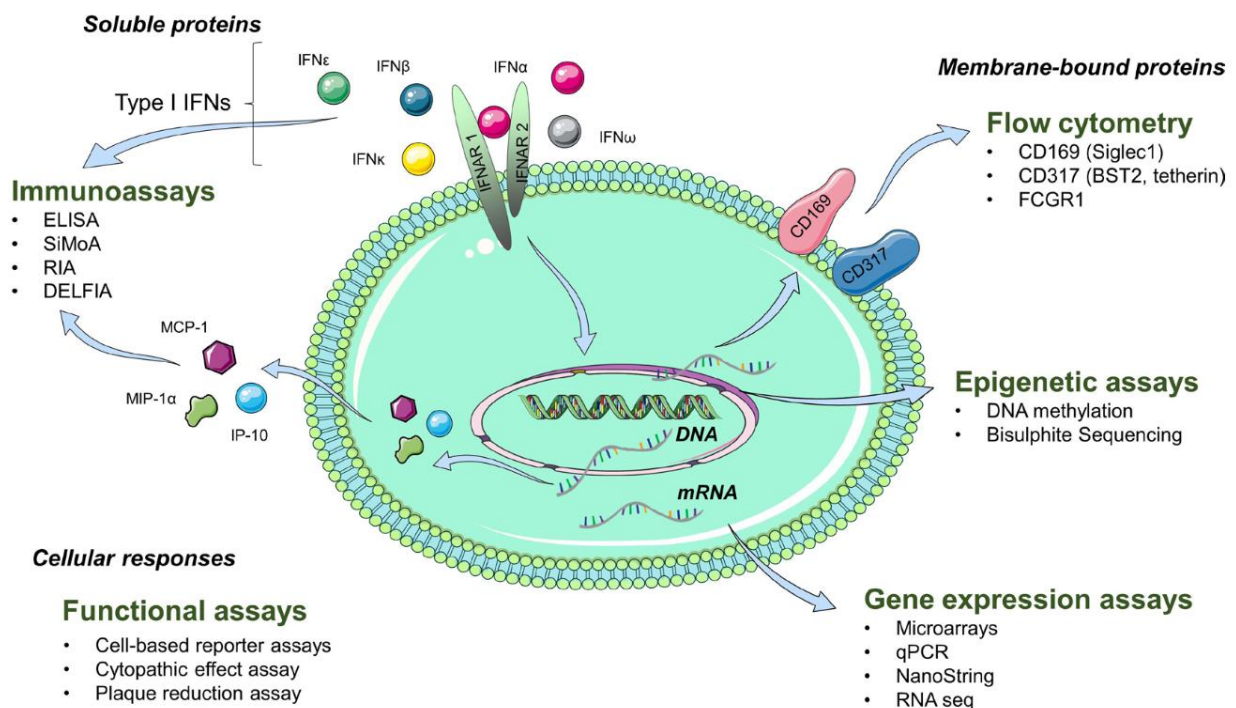


Abbildung 1 Das Typ-Interferon-System und seine Messverfahren. Die Abbildung zeigt die verschiedenen Ebenen des Typ-I-Interferon-Systems und mögliche Messverfahren. Abbildung unverändert übernommen aus Burska et al. (lizensiert unter CC BY 4.0)[24]

1.2.3 Typ-I-Interferone und zielgerichtete Therapien

Das Wissen um die Rolle von Typ-I-Interferonen bei IIM führt zu einem besseren Verständnis der Pathogenese und liefert auch Erkenntnisse für neue Therapieansätze. Die bei therapierefraktärem Verlauf (noch) experimentell einsetzbaren Medikamente Tofacitinib und Baricitinib blockieren die Januskinase (JAK) und unterbinden damit zu einem gewissen Teil die Typ-I-Interferon-Aktivität. Einige Fallberichte zeigten bei therapierefraktären juvenilen und adulten Patient*innen mit DM eine klinische Besserung unter Therapie mit JAK-Inhibitoren.[18,25–28]

1.3 Biomarker bei IIM

Biomarker können dazu dienen (frühzeitig) zu einer Diagnose zu kommen, Subgruppen einer Erkrankung zu unterscheiden, den Krankheitsverlauf und das Therapieansprechen zu überwachen, Krankheitsschübe frühzeitig zu erkennen und die Prognose abzuschätzen.[29,30]

1.3.1 Etablierte Biomarker bei IIM

Die CK dient im klinischen Alltag bislang als Routineparameter bei Verdacht auf eine Myositis, sowie zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs. Während bei der IMNM sehr hohe CK-Werte auftreten, können bei der DM und IBM die CK-Werte normwertig sein (insbesondere bei Patient*innen mit amyopathischer DM, anti-MDA5- und anti-TIF1 γ -positiver DM).[2,14] Erhöhte CK-Werte können aber auch nach sportlicher Aktivität, bei Myokardinfarkt, nicht-infektiösen Muskelerkrankungen (z.B. Muskeldystrophien), als Nebenwirkung von Medikamenten wie Statinen und anderen Ursachen einer Myolyse auftreten und gelten daher als unspezifisch.[29]

Zur Diagnosestellung und zur Abschätzung der Prognose der IIM haben sich die Myositis-spezifischen Antikörper (MSA) und Myositis-assoziierten Antikörper (MAA) etabliert.[29,30] Diese Antikörper sind zum Teil sehr spezifisch und erlauben eine erste Zuordnung (siehe Tabelle 1). Trotzdem sind sie als ein Baustein in der Diagnosefindung anzusehen und entfalten ihr Potential nur im Zusammenspiel mit Anamnese, körperlicher Untersuchung, Muskelbiopsieergebnissen und weiteren Untersuchungen.

1.3.2 Typ-I-Interferone als Biomarker bei IIM

Eine Erhöhung der Typ-I-Interferon-Aktivität im Blut, in Muskel- und Hautbiopsien bei Patient*innen mit IIM wurde bereits mehrfach nachgewiesen. Bei juvenilen und adulten Patient*innen mit DM konnte zudem eine Korrelation mit der Krankheitsaktivität gezeigt werden.[31–41] Die Änderung der Typ-I-Interferon-Aktivität bei Patient*innen mit DM/PM ist mit dem Rückgang der Krankheitsaktivität unter medikamentöser Therapie assoziiert. Über die Prognose der Erkrankung beziehungsweise des Therapieansprechens kann nach aktueller Studienlage mittels der Typ-I-Interferon-Aktivität bisher keine Aussage getroffen werden.[42]

Zur Messung der Typ-I-Interferon-Aktivität im Muskel eignet sich der immunhistochemische Nachweis von ISG15 und MxA.[32,43,44] Im Blut hat sich noch kein Typ-I-Interferon-Biomarker für den klinischen Alltag durchgesetzt. Die bis dato am häufigsten angewendeten Verfahren sind Immunoassays mit Messung von Interferon alpha oder beta, sowie die Messung von unterschiedlichen Scores von Interferon-stimulierten Genen mittels Microassay oder qPCR.[42] Es gibt jedoch noch kein standardisiertes Verfahren und keinen Konsens über die zu verwendenden Interferon-stimulierten Gene. Zudem scheinen die am stärksten hochregulierten Interferon-stimulierten Gene je nach Zelltyp und Gewebe unterschiedlich zu sein, auch innerhalb eines Patienten bzw. einer Patientin.[41]

1.3.3 SIGLEC1 – ein Typ-I-Interferon-Biomarker bei IIM?

Bei Patient*innen mit Systemischem Lupus Erythematodes (SLE) fanden Biesen et al. in Monozyten-spezifischen Transkriptomanalysen eine starke Hochregulierung von *Sialic Acid-Binding Ig-like Lectin 1* (SIGLEC1), als Teil der Typ-I-Interferon-Signatur.[45] SIGLEC1, auch bekannt als CD169 und Sialoadhäsion, ist ein transmembranes Zelloberflächenglykoprotein (siehe Abbildung 1). SIGLEC1 wird auf dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert und ermöglicht unter anderem die Zelladhäsion mit Granulozyten und B-Zellen.[46] Im Blut findet sich SIGLEC1 nur auf Monozyten. SIGLEC1 wird insbesondere von Typ-I-Interferonen hochreguliert.[47,48] In vitro führt die Stimulation von peripheren mononukleären Zellen mit Typ-I-induzierenden Toll-like-Rezeptoren zu einer vermehrten Expression von SIGLEC1 – und zwar sowohl auf mRNA-Ebene (gemessen mittels qPCR), als auch auf der Zelloberfläche von Monozyten (gemessen mittels Durchflusszytometrie).[47]

Die Durchflusszytometrie ist weit verbreitet und erlaubt eine schnelle Messung von SIGLEC1. Für einige autoimmune Krankheiten mit Typ-I-Interferon-Aktivierung wurde der Nutzen von SIGLEC1 als Biomarker gezeigt, unter anderem bei adultem und juvenilem SLE,[45,49–52] Systemischer Sklerose[47] und Sjögren Syndrom[53].

In Subgruppen der IIM wurde die Hochregulierung von SIGLEC1 als Teil der Typ-I-Interferon-Signatur bereits nachgewiesen.[54] Dies ließ vermuten, dass auch SIGLEC1 als Oberflächenprotein auf Monozyten vermehrt exprimiert wird und damit als Biomarker verwendet werden könnte, der zugleich mittels Durchflusszytometrie leicht zu bestimmen ist. Erste bestätigende Ergebnisse liegen für die juvenile DM vor.[55]

In dieser Arbeit untersuchten wir, ob SIGLEC1 als Typ-I-Interferon-induziertes Oberflächenprotein auf Monozyten bei den IIM-Subgruppen vermehrt exprimiert war. Darüber hinaus untersuchten wir, ob eine Korrelation von SIGLEC1 mit der Krankheitsaktivität und dem Therapieansprechen vorlag. Abschließend prüften wir, ob SIGLEC1 mit MSA im Blut und/oder der Typ-I-Interferon-Aktivität in Muskelbiopsien assoziiert war.

2 Methodik

Im Folgenden beschreibe ich die in Graf et al. verwendete Methodik.[56]

2.1 Ethikvotum

Für die Durchführung dieser retrospektiven Studie wurde im Vorfeld eine Zustimmung von der lokalen Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin eingeholt (EA2/094/19).

2.2 Studienpopulation

Zum Auffinden von Patient*innen wurden die elektronischen Patientenakten der Charité – Universitätsmedizin Berlin nach den Diagnosen DM, PM, AS, IMNM, IBM und Overlap Myositis durchsucht. Der Zeitraum wurde auf Juli 2015 bis Mai 2020 begrenzt, da die Implementierung von SIGLEC1 in das Routinelabor erst Ende 2014 erfolgte. Eingeschlossen wurden Patient*innen mit mindestens einer SIGLEC1-Messung. Für die Längsschnittanalyse wurden alle verfügbaren SIGLEC1-Messungen der/des jeweiligen Patient*in verwendet. Kontrollgruppen aus gesunden Proband*innen und Patient*innen mit SLE, Systemischer Sklerose und Mischkollagenose (mixed connective tissue disease, MCTD) setzten sich aus separaten Datensätzen zusammen. Zur Überprüfung der IIM-Diagnosen wendeten wir die von EULAR/ACR im Jahre 2017 definierten Klassifikationskriterien an (siehe Tabelle 2).[17] Wir nutzten hierfür das online verfügbare Formular der Unit of Biostatistics, Karolinska-Institut, Stockholm, Schweden (<http://www.imm.ki.se/biostatistics/calculators/iim/>; letzter Zugriff: 05.12.2022, 10:19 Uhr).

2.3 Messung von Laborparametern

Die Bestimmung von Blutwerten (SIGLEC1, CK, CRP, ASAT, ALAT, Antinukleäre Antikörper [ANA], MSA, MAA) erfolgte im Rahmen der Routinediagnostik während stationärer Aufenthalte oder ambulanter Vorstellungen in der rheumatologischen Fachambulanz der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Alle Laboranalysen wurden vom Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH durchgeführt.

2.3.1 SIGLEC1

Die durchflusszytometrische Messung der CD169/SIGLEC1-Expression auf Monozyten erfolgte mit Hilfe eines standardisierten, quantitativen Assays.[56] Diese Methodik wurde bereits in Stuckrad et al.[49] verwendet und ist im *eText S1 im Supplemental material* der beigefügten Originalpublikation von Graf et al.[56] detailliert beschrieben. Die Standardisierung dieser Methodik basiert auf einem durchflusszytometrischen Assay zur Quantifizierung der Expression von *Human Leukocyte Antigen – DR-Isotyp* (HLA-DR) auf Monozyten.[57] Die untere Nachweisgrenze betrug 1.200 gebundene monoklonale Antikörper pro Zelle (mAb/cell). Als oberer Grenzwert wurde 2.400 mAb/cell festgelegt. Für die Bestimmung der SIGLEC1-Expression auf Monozyten wurde EDTA-Vollblut verwendet. Wann immer möglich, wurden die Analysen am selben Tag innerhalb von vier Stunden nach der Blutentnahme durchgeführt. Ansonsten wurde das EDTA-Blut bei 2-8 °C gelagert und am nächsten Morgen getestet. Die SIGLEC1-Expression auf Monozyten in gelagertem EDTA-Blut (bei 2-8°C für maximal 24 Stunden) unterschied sich im Durchschnitt um weniger als 10 % im Vergleich zu frisch entnommenen und analysierten EDTA-Proben.

2.3.2 Autoantikörper

Antinukleäre Antikörper (ANA) wurden mit dem indirekten Immunfluoreszenz-Test AESKUSLIDES ANA-HEp-2 der AESKU.GROUP (Wendelsheim, Deutschland) im Serum bestimmt. Die qualitative Bestimmung der ANA (SS-A 52, SS-A 60, SS-B, RNP-70, Sm, RNP/Sm, Scl-70, centromere B und Jo1) erfolgte ebenfalls im Serum, mit ANACombi ELISA von Orgentec (Mainz, Deutschland). MSA (anti-NXP2, anti-TIF1 γ , anti-MDA5, anti-SRP, anti-Mi2, anti-OJ, anti-EJ, anti-PL7, anti-PL12, anti-Jo1, und anti-SAE) und MAA (anti-Ku, anti-PM75, anti-PM100 und anti-Ro52) wurden im Serum mit EUROLINE Autoimmune Inflammatory Myopathies 16 Ag line immunoassay (Euroimmun, Lübeck, Deutschland) bestimmt. QUANTA Flash (Inova Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA) wurde für die Detektion von HMGCR-Antikörpern verwendet.

2.4 Messung von Krankheitsaktivität und Therapieansprechen

Zur Messung der Krankheitsaktivität wurde für juvenile Patient*innen die *Childhood Myositis Assessment Scale* (CMAS) verwendet, wie in Rider et al. beschrieben.[58] Im CMAS Erhebungsbogen werden Punkte von 0 bis 52 vergeben, für Kategorien wie „Kopf

heben“, „Bein heben“, „Drehen von Rücken- in Bauchlage“ oder „Vierfüßlerstand“. Der CMAS eignet sich zur Messung von Muskelkraft, Körperfunktion und Ausdauer bei Patient*innen mit juvenilen Myositiden.[58,59] Der CMAS wurde in unserer Klinik von Physiotherapeut*innen routinemäßig für juvenile Myositis-Patient*innen erhoben. Den Physiotherapeut*innen lagen dabei keine Laborwerte vor. Für juvenile und erwachsene Patient*innen verwendeten wir zudem *Physician Global Assessment* (PGA) mit Werten von 0 (keine Krankheitsaktivität) bis 10 (hohe Krankheitsaktivität). Wenn kein PGA-Wert in den Patientenakten auffindbar war, wurde dieser retrospektiv von zwei erfahrenen Rheumatolog*innen festgelegt (Udo Schneider, Sae Lim von Stuckrad). Dafür hatten sie Zugriff auf alle relevanten Informationen (SIGLEC1 ausgenommen).

Als *visit 1* wurde der Zeitpunkt der ersten SIGLEC1-Messung in unserem Krankenhaus definiert. Zur Evaluation des klinisch relevanten Therapieansprechens bei Patient*innen mit juveniler und adulter DM schlossen wir alle Patient*innen ein mit (a) aktiver Erkrankung (PGA \geq 5) bei *visit 1* (b) Wiedervorstellung mit Messung von SIGLEC1 innerhalb von 3 bis 12 Monaten und (c) Reduktion des PGA-Wertes zwischen den beiden *visits* um mindestens 20% (nach Rider et al.[60]).

2.5 Die Bestimmung der Typ-I-Interferon-Aktivität in Muskelbiopsien mittels Immunohistochemie

Eingeschlossen wurden Muskelbiopsien von Patient*innen, bei denen maximal sieben Tage vor beziehungsweise nach Durchführung der Biopsie eine SIGLEC1-Messung im Blut stattgefunden hat. Mittels Immunohistochemie färbten wir Kryostatschnitte (7-8 μ m Dicke) von Skelettmuskelbiopsien mit den primären Antikörpern *myxovirus resistance protein A* (MxA, Santa Cruz polyclonal, Mx1/2/3, H-285, sc-50509, 1:100) und *interferon-stimulated gene 15* (ISG15, Abcam, clone ab14374, 1:50).[56] MxA und ISG15 zeigen die Typ-I-Interferon-Aktivität im Muskelgewebe an.[32,34] Die Analyse wurde mit iVIEW DAB (3,3'-diaminobenzidine) Detection Kit (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA) durchgeführt, wie bereits andernorts beschrieben.[33,44,56] Biotinylierte, sekundäre Antikörper wurden zur Signalverstärkung verwendet, die Visualisierung des Reaktionsproduktes wurde nach einem standardisierten Verfahren auf einem Benchmark XT immunostainer (Ventana) durchgeführt.[56] Wie auch in anderen Studien wurde die Färbung von MxA und ISG15 im Zytoplasma als positiv gewertet, außer bei nekrotischen

oder sich regenerierenden Fasern. Fasern mit lediglich schwacher Färbung wurden als negativ gewertet.[33,44,56]

2.6 Statistische Methoden

Kontinuierliche Variablen wurden mit Durchschnitt (Spannweite) oder Median (Interquartilsabstand) angegeben, kategoriale Daten mit Häufigkeiten (Prozente). Zum Vergleich von Gruppen mit nicht normalverteilten Daten wurde der Mann Whitney U-test (MWU) verwendet. Um die Korrelation zwischen Laborwerten (SIGLEC1, CK) und Krankheitsaktivität (PGA, CMAS) zu untersuchen, wurde der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient (Spearman's r) verwendet. Zur Bewertung der diagnostischen Güte von SIGLEC1 und CK, also inwiefern diese Tests zwischen aktiver ($PGA \geq 5$) und inaktiver Erkrankung ($PGA < 5$) unterscheiden können, wurden ROC-Kurven (receiver operating characteristics) erstellt. Längsschnittdaten wurden mittels gemischten Modells (two-level mixed-effects linear regression model) analysiert. Zum Vergleich der Stärke einer Assoziation wurden standardisierte Regressionskoeffizienten (Beta-Werte, β_{ST}) zwischen den folgenden Parametern angegeben: (a) CMAS und SIGLEC1 bzw. CK bei Patient*innen mit juveniler DM und (b) PGA und SIGLEC1 bzw. CK bei Patient*innen mit adulter DM. Der standardisierte Beta-Koeffizient kann zwischen den Variablen SIGLEC1 und CK verglichen werden. Der Koeffizient kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Je näher der Koeffizient bei -1 bzw. 1 liegt, desto stärker ist der Zusammenhang zwischen SIGLEC1 und Krankheitsaktivität bzw. CK und Krankheitsaktivität. Werte unter null stehen dabei für einen negativen und Werte über null für einen positiven Zusammenhang. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde für die Analyse von SIGLEC1 und Therapieansprechen verwendet. Ein p-Wert von unter 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. Die statistische Analyse der longitudinalen Daten erfolgte mit STATA 12.1. Für alle anderen statistischen Tests und die Erstellung von Graphen wurde Graphpad Prism Version 9.1.2 verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Studienpopulation und -charakteristika

Von 140 Patient*innen mit der (vorläufigen) Diagnose einer IIM wurden 74 Patient*innen mit DM, AS, IBM und IMNM in die Studie eingeschlossen (siehe Tabelle 3 im vorliegenden Manteltext und *Table 1* der beigefügten Originalpublikation von Graf et al.[56]). 44 Patient*innen wurden aufgrund von unzureichenden klinischen Informationen, einer unklaren Diagnose und/oder fehlender Messung der SIGLEC1-Expression ausgeschlossen. In die Kontrollgruppe 1 (Overlap) konnten 22 Patient*innen eingeschlossen werden, davon 16 mit Overlap-Myositis, fünf mit Mischkollagenose und eine*r mit Systemischer Sklerose. Es konnte kein*e Patient*in mit der gesicherten Diagnose einer Polymyositis eingeschlossen werden. Mit durchschnittlich 67 Jahren waren Patient*innen mit IBM bei Diagnosestellung am ältesten. In den Kontrollgruppen (SLE, Overlap) war der Anteil der Frauen mit 86,67% und 90,9% deutlich höher als in den IIM-Subgruppen (37,5% bis 66,6%). Bei Patient*innen mit IBM lag die Diagnosestellung zum Zeitpunkt der ersten SIGLEC1-Messung in unserer Klinik (*visit 1*) am längsten zurück (89% mit über 12 Monaten). In den anderen Gruppen, inklusive der Kontrollgruppen 1 und 2, hatten zwischen 31,6% und 50% der Patient*innen eine erste SIGLEC1-Messung (*visit 1*) spätestens 3 Monate nach Erstdiagnose. Die Anwendung der EULAR/ACR-Kriterien (siehe Tabelle 2)[17] für Patient*innen mit DM, AS und IBM ergab je nach Gruppe Werte zwischen 82,4% und 100% für “*probable*” beziehungsweise “*definitive diagnosis*”. Die niedrigste Übereinstimmung mit den EULAR/ACR-Kriterien lag in der Gruppe der IMNM vor, mit 62,6% (siehe Tabelle 3 im vorliegenden Manteltext und *Table 1* der beigefügten Originalpublikation von Graf et al.[56]). Die Diagnosen der erwachsenen Patient*innen mit IMNM stimmten jedoch mit den klinischen und morphologischen Kriterien zur Diagnosestellung einer IMNM überein, die beim 224. internationalen Workshop des Europäischen neuromuskulären Zentrums (engl. „European Neuromuscular Centre“, ENMC) vereinbart wurden.[61] Alle IBM-Diagnosen waren histologisch bestätigt.

Tabelle 3 Studienpopulation

	Adulte DM (n=21)	Juvenile DM (n=17)	AS (n=19)	IMNM (adulte+ juvenile) (n=8)	IBM (n=9)
Frauen, n (%)	10 (47,6%)	9 (53%)	10 (52,6%)	3 (37,5%)	6 (66,6%)
Alter bei Diagnosestellung, Lebensjahre, Durchschnitt (Spannweite)	52,3 (20-84)	9 (2-16)	53,3 (17-77)	56,9 (6-86)	67 (52-79)
Zeit seit Erstdiagnose ¹ , n (%)					
< 3 Monate	10 (47,6%)	7 (41,2%)	6 (31,6%)	4 (50%)	0
3 bis 12 Monate	3 (14,3%)	2(11,8%)	5 (26,3%)	2 (25%)	1 (11%)
> 12 Monate	8 (38%)	8 (47,1%)	8 (42,1%)	2 (25%)	8 (89%)
SIGLEC1 Expression, mAb/cell, Median (IQR) ¹	5876 (1211-10282)	5272 (1200-12691)	1580 (1200-3390)	1246 (1200-1853)	1949 (1306-4602)
ANA Titer ≥ 1:160, n (%)	13 (61,9%)	8 (47%)	11 (57,9%)	2 (25%)	5 (55,6%)
CK, U/l, Median (IQR) ¹	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
LDH, U/l, Median (IQR) ¹	369 (219,5-528,3), NR=3	312 (271,8-615,3), NR=1	348 (260-719), NR=4	359 (265,5-779), NR=3	307,5 (280,5-395,3), NR=1
CRP, mg/l, Median (IQR) ¹	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
Histologisch bestätigte Diagnose / durchgeführte Biopsien	14/15	6/7	7/9	6/7	9/9
“Definitive” oder “wahrscheinliche” IIM-Diagnose gemäß EULAR/ACR Kriterien, n (%)	19 (90,5%)	13 (82,4%)	17 (89,5%)	5 (62,6%)	9 (100%)
PGA, Durchschnitt (Spannweite) ¹	6 (2-10)	4,4 (0-8)	5,4 (2-9)	4,9 (2-8)	4,22 (3-6)
CMAS, Durchschnitt (Spannweite) ²	NA	35 (2-52), NR=4	NA	NA	NA
SLEDAI-2k, Durchschnitt (Spannweite) ¹	NA	NA	NA	NA	NA
Prednisolon, Anzahl der Patienten (Durchschnitt in mg/Tag bei <i>visit 1</i>)	12 (36,1 mg/Tag)	9 (8,3 mg/Tag), NR=1	16 (13,3 mg/Tag)	4 (13,1 mg/Tag)	3 (7,5 mg/Tag)
Andere Medikamente ¹ , n (%)					
Hydroxychloroquin/Chloroquin	1 (4,8%)	2 (11,8%)	3 (15,8%)	-	-
Intravenöse Immunglobuline	2 (9,5%)	2 (11,8%)	1 (5,3%)	1 (12,5%)	1 (11,1%)
MTX	1 (4,8%)	6 (35,3%)	3 (15,8%)	1 (12,5%)	1 (11,1%)
Rituximab	-	-	2 (10,5%)	-	1 (11,1%)
JAK Inhibitor	3 (14,3%)	-	-	-	-
MMF / CsA / Cyc / AZA	5 (23,8%)	3 (17,6%)	5 (26,3%)	2 (25%)	-
Keine Medikamente	8 (38,1%)	7 (41,2%)	3 (15,8%)	4 (50%)	5 (55,6%)

AZA, Azathioprin; CRP, C-reaktives Protein; CsA, Ciclosporin, Cyc, Cyclophosphamid; MMF, Mycophenolat-Mofetil, NA, nicht zutreffend, NR, nicht erhoben, SLEDAI-2k, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000. (1) bei *visit 1* (2) beim ersten *visit* mit Bestimmung von SIGLEC1 und CMAS. Übersetzt und modifiziert nach Graf et al.; Im Vergleich zu Graf et al. sind die Laborwerte „ANA Titer“ und „LDH“ hinzugefügt; für die Daten der Kontrollgruppen siehe Graf et al.[56]

3.2 SIGLEC1-Expression und CK in den Studiengruppen

Die höchste SIGLEC1-Expression lag in den Gruppen der juvenilen und adulten DM mit 5.272 und 5.876 mAb/cell vor sowie bei SLE (n=30) mit 7.947 mAb/cell (Median, siehe Tabelle 3 des Manteltextes und *Figure 1* der beigefügten Originalpublikation von Graf et al.[56]). Acht von 19 (42,1%) Patient*innen mit AS hatten eine Erhöhung der SIGLEC1-Expression (Gesamt: 1.580 mAb/cell, Median). In der IBM-Gruppe lag bei zwei von neun Patient*innen eine erhöhte SIGLEC1-Expression vor. Kein*e Patient*in mit IMNM hatte eine erhöhte SIGLEC1-Expression. In der Overlap-Gruppe fand sich bei 6 von 22 Patient*innen eine Erhöhung von SIGLEC1 (Gesamt: 1.661 mAb/cell, Median). Zwischen den Gruppen juvenile/adulte DM und SLE ergaben sich keine statistisch signifikanten

Unterschiede (SLE vs. adulte DM: $p=0,172$; SLE vs. juvenile DM: $p=0,485$; MWU). Alle juvenilen DM-Patient*innen mit einer SIGLEC1-Messung im Rahmen der Erstdiagnose hatten eine SIGLEC1-Erhöhung ($n=4$, Median, 13.735 mAb/cell). Bei erwachsenen DM-Patient*innen war dies bei 77,8% der Fall (7 von 9, Median, 9.812 mAb/cell).

Die CK war bei Patient*innen mit IMNM besonders hoch (2.118 U/l, Median). Der niedrigste Wert lag in der Gruppe der adulten DM vor (109 U/l, Median). Die CK war im Median bei 421 U/l in der Overlap-Gruppe und bei 62,5 U/l in der SLE-Gruppe. Für die gesunden Patient*innen lagen keine Daten zur CK vor.

3.3 Krankheitsaktivität vs. SIGLEC1 und CK

3.3.1 Querschnittanalyse

Zur Untersuchung der Assoziation zwischen SIGLEC1 und der Krankheitsaktivität unterteilten wir die IIM-Subtypen in jeweils zwei Gruppen: Patient*innen mit $PGA \geq 5$ (mittlere bis hohe Krankheitsaktivität) und $PGA < 5$ (niedrige bis mittlere Krankheitsaktivität). Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen lag bei der adulten DM ($p < 0,001$, MWU) und juvenilen DM ($p < 0,001$, MWU) vor (siehe *Figure 2* der beigefügten Originalpublikation von Graf et al.[56]). Bei AS, IMNM und IBM lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vor (AS: $p=0,056$; IMNM: $p=0,143$; IBM: $p > 0,999$) (siehe *Figure 3* der beigefügten Originalpublikation von Graf et al.[56]).

Zur Bewertung inwiefern SIGLEC1 und CK zwischen aktiver ($PGA \geq 5$) und inaktiver Erkrankung ($PGA < 5$) unterscheiden können, erstellten wir ROC-Kurven. Diese ergaben hohe Werte für SIGLEC1 bei DM insgesamt (juvenile und adulte DM zusammen, $AUC=0,92$, 95%-Konfidenzintervall: 0,83-1, $p < 0,001$) und auch für juvenile und adulte DM getrennt (juvenile DM: $AUC=0,97$, 95%-Konfidenzintervall: 0,9-1; $p=0,001$; adulte DM: $AUC=0,96$, 95%-Konfidenzintervall: 0,88-1; $p=0,002$). Die Werte der ROC-Kurven für die CK waren niedriger (DM gesamt: $AUC=0,71$; 95%-Konfidenzintervall: 0,54-0,89; $p=0,04$; juvenile DM: $AUC=0,94$, 95%-Konfidenzintervall: 0,8-1; $p=0,003$; adulte DM: $AUC=0,60$, 95%-Konfidenzintervall: 0,36-0,84; $p=0,513$) (siehe *Figure 2* und *eFigure S1* im *Supplemental material* der beigefügten Originalpublikation von Graf et al.[56]). Zur Identifikation des besten Cut-off-Wertes wendeten wir den Youden-Index an ($J =$

Sensitivität + Spezifität – 1). Dieser ergab einen unteren Cut-off-Wert von 2.383 mAb/cell (Sensitivität 87,5%; Spezifität 85,71%), mit einem positiven Vorhersagewert von 91,3%.

SIGLEC1 korrelierte mit dem PGA bei juvenilen und adulten DM-Patient*innen (adulte DM: $r=0,81$, $p<0,001$ und juvenile DM: $r=0,80$, $p<0,001$; Spearman's r). Bei der AS, IMNM und IBM korrelierte SIGLEC1 nicht mit dem PGA (AS: $r=0,14$, $p=0,573$; IMNM: $r=0,56$, $p=0,146$; IBM $r=-0,02$; $p=0,975$). Bei Patient*innen mit juveniler DM korrelierte SIGLEC1 signifikant mit dem CMAS (SIGLEC1 vs. CMAS: $r=-0,57$, $p=0,046$; Spearman's r), dies war für die CK nicht der Fall (CK vs. CMAS: $r=-0,40$, $p=0,180$; Spearman's r) (siehe *eFigure S2* und *eFigure S3* im *Supplemental material* der beigefügten Originalpublikation von Graf et al.[56]). Bei Patient*innen mit SLE korrelierte SIGLEC1 mit dem *SLE disease activity index* (SLEDAI-2k) ($r=0,46$, $p=0,013$, Spearman's r).

3.3.2 Längsschnittanalyse

In der Längsschnittanalyse wurde die Korrelation von SIGLEC1 und CK mit der Krankheitsaktivität untersucht (CMAS bei jDM; PGA bei aDM). Die Analyse basierte auf den Daten von 12 juvenilen Patient*innen mit DM (insgesamt 65 Messpunkte für SIGLEC1 und 87 Messpunkte für CK) und 14 adulten Patient*innen mit DM (45 Messpunkte für SIGLEC1 und 41 Messpunkte für CK). SIGLEC1 korrelierte signifikant mit der Krankheitsaktivität bei Patient*innen mit juveniler DM (SIGLEC1 vs. CMAS: $\text{betaST}=-0,70$, $p<0,001$) und adulter DM (SIGLEC1 vs. PGA: $\text{betaST}=0,54$, $p<0,001$). Bei juveniler DM korrelierte die CK ebenfalls mit der Krankheitsaktivität (CK vs. CMAS: $\text{betaST}=-0,39$, $p<0,001$), die Korrelation zwischen PGA und CK bei erwachsenen Patient*innen mit DM war jedoch nicht signifikant ($\text{betaST}=0,17$, $p=0,149$). Die Erhöhung beziehungsweise der Rückgang von SIGLEC1 zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messpunkten war assoziiert mit der Änderung in der Krankheitsaktivität, sowohl bei erwachsenen als auch juvenilen Patient*innen mit DM. Für die CK waren die Ergebnisse hier nicht signifikant. SIGLEC1 korrelierte in allen Längsschnittanalysen stärker mit der Krankheitsaktivität (PGA bzw. CMAS) als die CK (siehe Tabelle 4). Die Längsschnittdaten sind in *eFigure S4* und *eFigure S5* im *Supplemental material* der beigefügten Originalpublikation von Graf et al.[56] als Graphen dargestellt, exemplarisch sind in Abbildung 2 die Daten von zwei Patienten zu sehen.

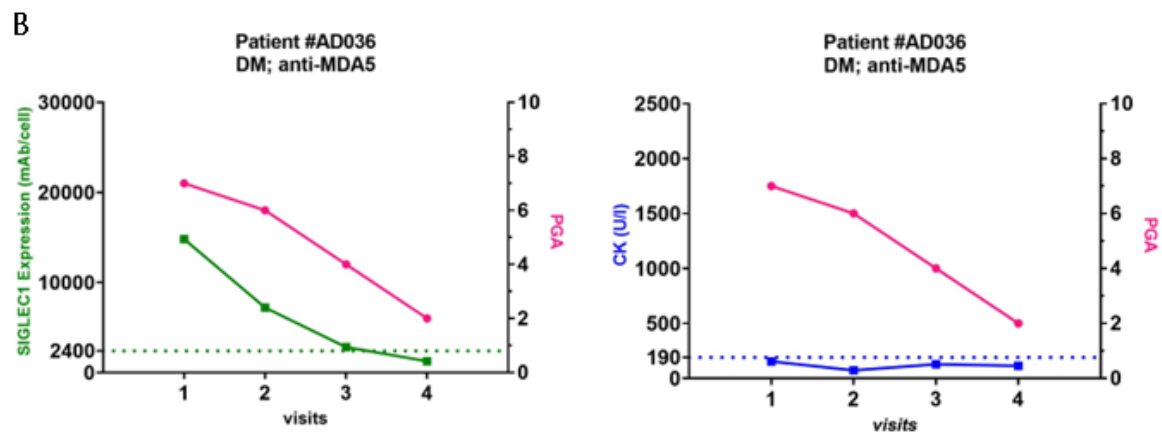
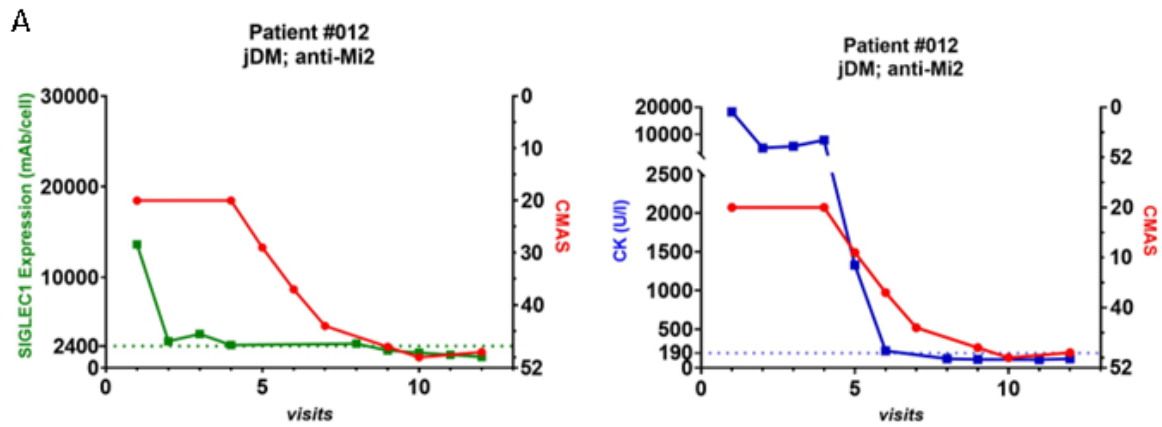


Abbildung 2 Verlaufsdaten von zwei Patienten. Auf der linken Y-Achse ist jeweils die SIGLEC1-Expression bzw. die CK angegeben (in grün bzw. blau). Auf der rechten Y-Achse ist jeweils die Krankheitsaktivität mittels CMAS bzw. PGA angegeben (in Rot bzw. Rosa). Der CMAS gibt Werte zwischen 0 (schwere Muskelbeteiligung) bis 52 (keine Muskelbeteiligung) an. Der PGA gibt Werte zwischen 0 (keine Krankheitsaktivität) bis 10 (hohe Krankheitsaktivität) an (A) Patient mit juveniler DM und Mi2-Autoantikörper (B) Patient mit adulter DM und MDA5-Autoantikörper.

Tabelle 4 Längsschnittanalyse für Patient*innen mit DM

A: DM, juvenile Patient*innen			
		SIGLEC1	Kreatinkinase (CK)
Korreliert SIGLEC1 bzw. CK mit CMAS im Verlauf?			
CMAS	alle <i>visits</i> ¹	n=65 betaST=-0,70 p<0,001	n=87 betaST=-0,39 p<0,001
CMAS	nur <i>visits</i> mit Daten für beide Biomarker ²	n=53 betaST=-0,65 p<0,001	n=53 betaST=-0,50 p<0,001
Ist die Veränderung ($\Delta \text{visit}_{t-1}$ und visit_t) von SIGLEC1 bzw. CK mit der Veränderung im CMAS assoziiert?			
CMAS	alle <i>visits</i> ¹	n=28 betaST=-0,53 p<0,001	n=41 betaST=-0,27 p=0,051
CMAS	nur <i>visits</i> mit Daten für beide Biomarker ²	n=16 betaST=-0,42 p<0,001	n=16 betaST=-0,14 p=0,566
B: DM, erwachsene Patient*innen			
		SIGLEC1	Kreatinkinase (CK)
Korreliert SIGLEC1 bzw. CK mit PGA im Verlauf?			
PGA	alle <i>visits</i> ¹	n=45 betaST=0,54 p<0,001	n=41 betaST=0,17 p=0,149
PGA	nur <i>visits</i> mit Daten für beide Biomarker ²	n=41 betaST=0,52 p<0,001	n=41 betaST=0,17 p=0,149
Ist die Veränderung ($\Delta \text{visit}_{t-1}$ und visit_t) von SIGLEC1 bzw. CK mit der Veränderung im PGA assoziiert?			
PGA	alle <i>visits</i> ¹	n=31 betaST=0,48 p=0,003	n=25 betaST=-0,10 p=0,634
PGA	nur <i>visits</i> mit Daten für beide Biomarker ²	n=25 betaST=0,60 p=0,001	n=25 betaST=-0,10 p=0,634

(A) juvenile und (B) erwachsene Patient*innen mit DM. (1) alle *visits* wurden eingeschlossen, bei denen Werte für SIGLEC1 und/oder CK vorlagen (2) nur *visits* mit Werten für SIGLEC1 und CK wurden eingeschlossen. betaST, standardisierter Regressionskoeffizient; n, Anzahl; p, p-Wert; Übersetzt und modifiziert nach Graf et al.[56]

3.4 SIGLEC1 und Therapieansprechen

Wir untersuchten, ob das Therapieansprechen (Reduktion des PGA um mindestens 20%) mit dem Rückgang von SIGLEC1 assoziiert war. In diese Analyse konnten 14

Patient*innen mit DM eingeschlossen werden, davon sechs adulte und acht juvenile. Zwischen dem ersten und zweiten Messpunkt lag eine signifikante Reduktion der SIGLEC1-Expression vor (Veränderung im Median um -10.059 mAb/cell, IQR -6.058 mAb/cell bis -12.152 mAb/cell, $p < 0,01$, Wilcoxon-Test) (siehe *Figure 2* der beigefügten Originalpublikation von Graf et al.[56]). Die Krankheitsaktivität (PGA) zwischen den beiden Messpunkten verringerte sich deutlich (Veränderung im Median um -76,5%, IQR -63% bis -91%). Alle Patient*innen, die in die Analyse eingeschlossen wurden ($n=14$), hatten bereits Prednisolon erhalten. Die zusätzlich verabreichten Medikamente waren MTX ($n=9$), IVIG ($n=9$), Hydroxychloroquin ($n=4$), Azathioprin ($n=3$) und Cyclophosphamid ($n=2$).

3.5 SIGLEC1 und Prednisolon

Wir verglichen die SIGLEC1-Expression zwischen allen DM-Patient*innen (juvenile und adulte) mit und ohne Einnahme von Prednisolon bei *visit 1*. Hier zeigte sich eine niedrigere SIGLEC1-Expression in der Gruppe mit Prednisolon, jedoch ohne statistische Signifikanz. In die anschließende Analyse wurden nur Patient*innen mit aktiver Erkrankung eingeschlossen. Hier fand sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 3). Eine signifikante Korrelation zwischen SIGLEC1 und der Prednisolon-Dosis pro Tag bei *visit 1* ließ sich nicht nachweisen ($r=-0.2$, $p=0.23$, Spearman's rank).

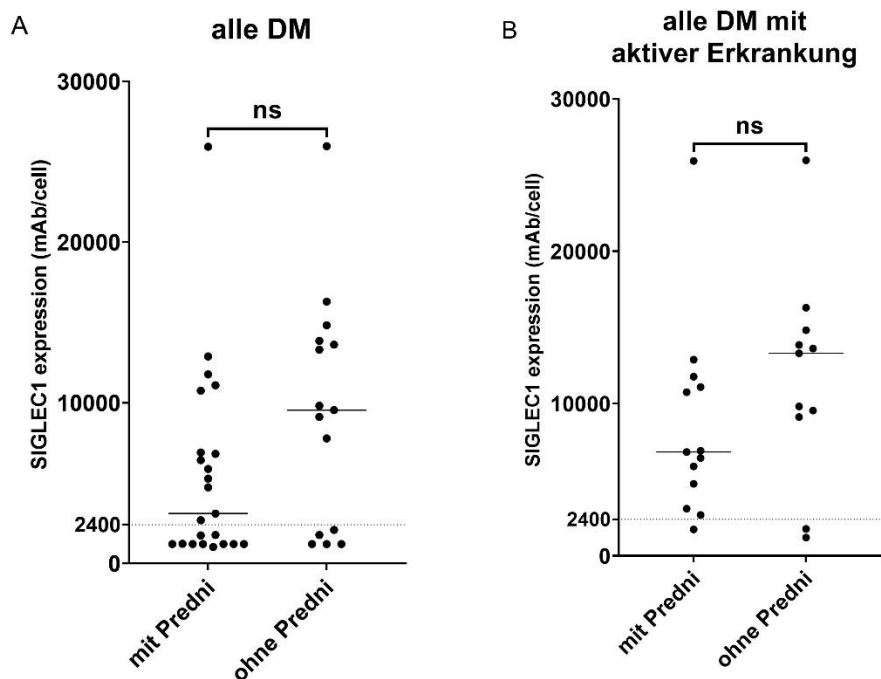


Abbildung 3 SIGLEC1-Expression und Prednisolon. Die Abbildung zeigt die SIGLEC1-Expression bei visit 1 bei bereits etablierter Therapie mit Prednisolon vs. ohne Prednisolon. (A) bei allen juvenilen und adulten Patient*innen mit DM (n=38): Median 3.096 mAb/cell (mit Prednisolon) vs. 9545 mAb/cell (ohne Prednisolon), $p=0,0546$, MWU. (B) bei allen juvenilen und adulten Patient*innen mit DM und aktiver Erkrankung (PGA ≥ 5 , n=24): Median 6.816 mAb/cell (mit Prednisolon) vs. 13.301 mAb/cell (ohne Prednisolon), $p=0,1339$, MWU; eigene Darstellung

3.6 Myositis-Spezifische Antikörper

Unter den juvenilen Patient*innen mit DM war der NXP2-Autoantikörper (n=6) am häufigsten, bei sechs Patient*innen wurde kein MSA detektiert. Bei adulten Patient*innen mit DM waren anti-MDA5 (n=6) und anti-TIF1 γ (n=6) am häufigsten, bei zwei Patient*innen konnte kein MSA nachgewiesen werden. Bei 17 von 19 Patient*innen mit AS konnten Anti-Jo1-Autoantikörper nachgewiesen werden. Patient*innen mit U1RNP-Autoantikörpern hatten überwiegend (4 von 5) die Diagnose einer Mischkollagenose und waren der Overlap-Gruppe zugeordnet. Ein Patient mit U1RNP war histopathologisch der IBM zuzuordnen.

Die Verläufe der Längsschnittanalyse sind in *eFigure S4* und *eFigure S5* des *Supplemental material* der beigefügten Originalpublikation von Graf et al. dargestellt.[56] Hier lassen sich die SIGLEC1- und CK-Verläufe bei DM-Patient*innen je nach Autoantikörper (MSA) nachvollziehen. In Abbildung 2 sind exemplarisch zwei Verläufe dargestellt (1x Mi2, 1x MDA5).

3.6.1 Myositis-Spezifische Antikörper vs. SIGLEC1-Expression

Zur Untersuchung, ob die SIGLEC1-Expression je nach MSA Unterschiede aufwies, führten wir eine Subgruppenanalyse durch. In Abbildung 4A ist die SIGLEC1-Expression aller Patient*innen mit IIM und aktiver Erkrankung bei *visit 1* zu sehen, unterteilt nach MSA. *Figure 4B* der beigefügten Originalpublikation von Graf et al.[56] zeigt zudem die SIGLEC1-Expression bei Patient*innen mit inaktiver Erkrankung. In der Gruppe der Patient*innen mit aktiver Erkrankung ergab sich eine erhöhte SIGLEC1-Expression bei 5 von 5 Patient*innen mit TIF1 γ -Autoantikörpern, 6 von 7 mit MDA5-Autoantikörpern, 4 von 5 mit NXP2-Autoantikörpern, und 2 von 3 mit Mi2-Autoantikörpern (alle assoziiert mit DM). Bei Patient*innen mit aktiver Erkrankung und AS-assoziierten Autoantikörpern kamen erhöhte Werte für die SIGLEC1-Expression bei anti-Jo1 (5 von 11), anti-PL-12 (2 von 2) und anti-PL-7 (1 von 1) vor. Die mit IMNM assoziierten Autoantikörper anti-SRP und anti-HMGCR waren nicht mit einer Erhöhung der SIGLEC1-Expression assoziiert. Eine Assoziation mit dem zusätzlichen Vorliegen von MAA (anti-Ro52, anti-Ku, anti-U1RNP) ließ sich nicht nachweisen. Alle Patient*innen mit U1RNP-Antikörpern hatten eine hohe SIGLEC1-Expression (n=5, 12.327 mAb/cell, Durchschnitt), ohne dass sich eine Assoziation zur Krankheitsaktivität ergeben hat.

3.6.2 Myositis-Spezifische Antikörper vs. CK

Abbildung 4B stellt die CK aller Patient*innen mit IIM und aktiver Erkrankung (PGA \geq 5) bei *visit 1* dar, unterteilt nach MSA. Bei Patient*innen mit MDA5- und TIF1 γ -Autoantikörpern lag bei lediglich 1 von 5 beziehungsweise 2 von 5 eine erhöhte CK (>190 U/l) vor. Besonders hohe CK-Werte zeigten sich bei 2 von 3 Patient*innen mit Mi2-Autoantikörpern. Die CK-Werte der Patient*innen mit U1RNP-Antikörpern waren erhöht, mit einem Durchschnitt von 646,5 U/l (ein fehlender Wert).

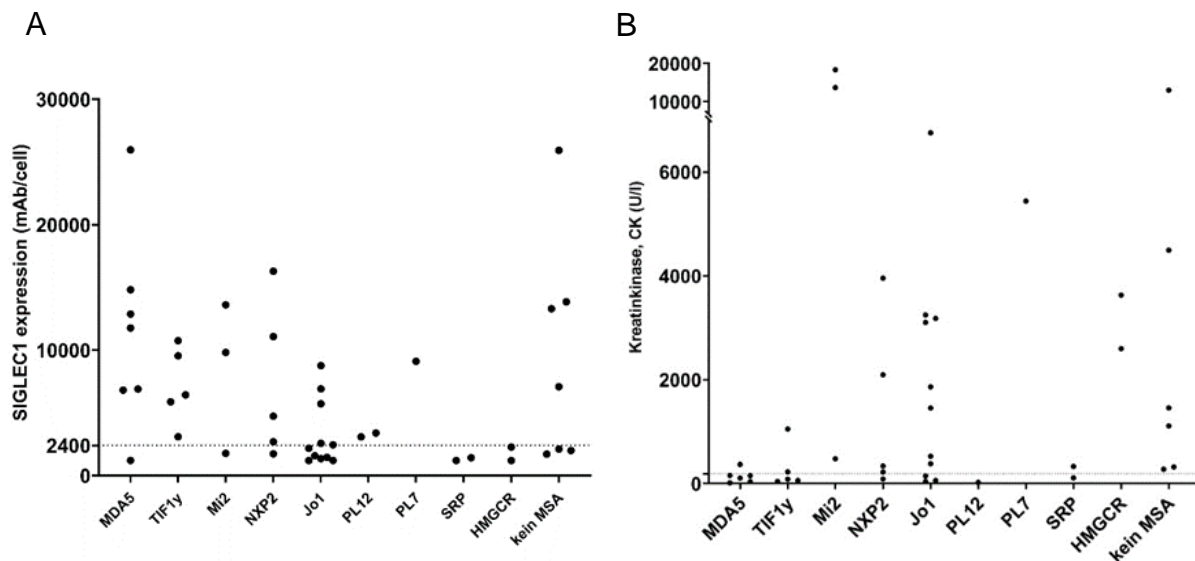


Abbildung 4 SIGLEC1 und CK vs. MSA bei IIM-Patient*innen mit aktiver Erkrankung (A) Die Abbildung zeigt SIGLEC1 aller IIM-Patient*innen mit aktiver Erkrankung (PGA \geq 5) bei visit 1 (n=45), unterteilt nach Myositis Spezifischem Antikörper (MSA). Die gestrichelte Linie gibt den Grenzwert von 2400 mAb/cell an. **Abbildung modifiziert nach Graf et al.[56] (B)** Die Abbildung zeigt die Kreatinkinase (CK) aller IIM-Patient*innen mit aktiver Erkrankung (PGA \geq 5) bei visit 1 (n=42), unterteilt nach MSA. Fehlende Werte (n=3) in den Gruppen „PL7“, „MDA5“, „kein MSA“; die gestrichelte Linie gibt den Grenzwert von 190 U/l an; zur Übersichtlichkeit wurde die Y-Achse in zwei Abschnitte mit unterschiedlicher Skalierung unterteilt (0-7.000 U/l und 7.000 bis 20.000 U/l); eigene Darstellung.

3.7 Vergleich zwischen der SIGLEC1-Expression auf Monozyten im Blut und der Expression von ISG15/MxA im Muskelgewebe

17 Patient*innen hatten eine Muskelbiopsie und eine SIGLEC1-Messung im Blut mit maximal 7 Tagen Abstand zueinander und konnten in die Analyse eingeschlossen werden (aDM: n=6; jDM: n=2; AS: n=3; IMNM: n=1; IBM: n=1; Overlap: n=4). In sieben von 17 Muskelbiopsien (41,2%) konnte eine vermehrte Expression von ISG15 und/oder MxA nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5A). Exemplarisch sind die Färbungen von drei Patient*innen und eine*r gesunden Proband*in in der Abbildung 5B dargestellt. Alle Patient*innen mit Nachweis von ISG15/MxA in der Muskelbiopsie hatten eine erhöhte SIGLEC1-Expression auf Monozyten im Blut, bei einem der Patienten lag jedoch lediglich eine minimale Erhöhung vor (Patient AD030 mit AS; MSA: anti-Jo1; MAA: anti-Ro52, anti-PM-Scl100; 2.449 mAb/cell). Drei Patient*innen mit SIGLEC1-Erhöhung im Blut waren negativ für ISG15/MxA im Muskel – bei aktiver Erkrankung (PGA 7/8/10). Diese hatten eine anti-TIF1y-positive DM, eine anti-MDA5-positive DM ohne Muskelbeteiligung und eine DM ohne MSA (siehe dazu auch *eTable S1 im Supplemental material* der beigefügten Originalpublikation von Graf et al.[56]). Die durchschnittliche Zeit zwischen der SIGLEC1-Messung im Blut und der Entnahme der Muskelbiopsie waren drei Tage (Spannweite: 0-7 Tage).[56]

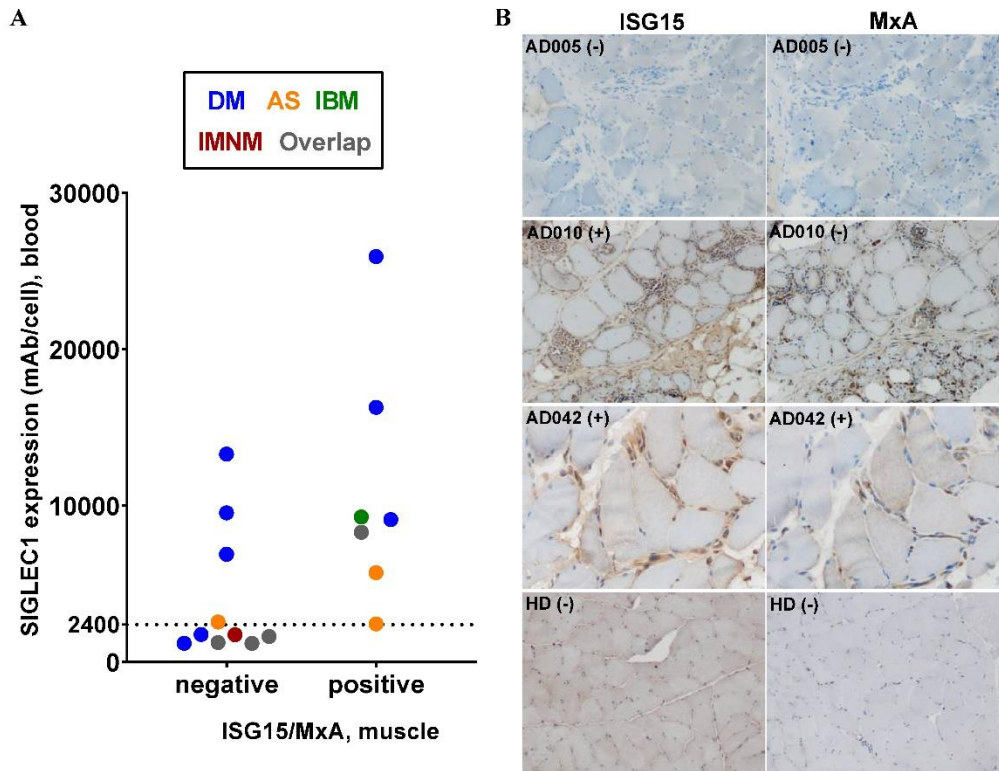


Abbildung 5 Expression von SIGLEC1 im Blut und ISG15/MxA im Muskel (A) Vergleich zwischen SIGLEC1 im Blut mit der Expression von ISG15/MxA im Muskel (n=17) (B) exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbungen von drei Patient*innen und einem Gesunden; Patient AD005 (adulte DM; kein MSA; MAA: anti-Ro52; SIGLEC1: 13.301 mAb/cell) hatte trotz erhöhtem SIGLEC1 im Blut keine ISG15/MxA-Färbung im Muskel. Patient AD010 (IBM; kein MSA, MAA: anti-Ro52, anti-U1RNP, anti-Ku; SIGLEC1: 9.281 mAb/cell) hatte eine positive Färbung für MxA, eine ISG15-Färbung war jedoch nur auf einigen Makrophagen zu sehen, Muskelfasern waren nicht angefärbt. Bei Patient AD042 (adulte DM, MSA: anti-NXP2; kein MAA; SIGLEC1: 16.295 mAb/cell) ließ sich sowohl ISG15 als auch MxA anfärben.[56] HD, healthy donor. Abbildung übernommen aus Graf et al.[56]

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die SIGLEC1-Expression auf Monozyten war bei Patient*innen mit DM signifikant erhöht und korrelierte sowohl bei adulten als auch bei juvenilen DM-Patient*innen mit der Krankheitsaktivität. Bei AS, IMNM und IBM war die SIGLEC1-Expression dagegen nicht signifikant erhöht. Ein klinisch relevantes Therapieansprechen (Reduktion des PGA) ging bei DM-Patient*innen mit dem Rückgang von SIGLEC1 einher. Eine Assoziation von bestimmten MSA und SIGLEC1 ließ sich nicht nachweisen. Alle Patient*innen mit Typ-I-Interferon-Aktivität in der Muskelbiopsie hatten eine erhöhte SIGLEC1-Expression im Blut.

4.2 Einbettung der Ergebnisse in den aktuellen Forschungsstand

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine Korrelation der SIGLEC1-Expression mit der Krankheitsaktivität bei Patient*innen mit DM. Dies bestätigt zahlreiche Studien, die die Typ-I-Interferon-Aktivität bei der DM mit anderen Methoden untersucht haben.[31–40]

Es gibt bisher nur wenige Längsschnittuntersuchungen, die eine Korrelation der Typ-I-Interferon-Aktivität mit der Krankheitsaktivität über mehr als zwei Messpunkte hinaus untersuchten. In ihrem Umfang ist unsere Analyse mit der von Greenberg et al. vergleichbar.[36] Ihnen lagen 53 Messpunkte von insgesamt 12 erwachsenen Patient*innen mit DM/PM vor. Sie untersuchten ein Set aus 13 Typ-I-Interferon-stimulierten Genen im Blut mittels qtPCR und fanden eine signifikante Korrelation mit einem retrospektiv festgelegten Krankheitsaktivitätsscore. Die in unserer Studie nachgewiesene Korrelation von SIGLEC1 mit der Krankheitsaktivität basiert auf den Daten von 26 juvenilen und adulten DM-Patient*innen mit insgesamt 110 Messpunkten.

Lerkvaleekul et al. untersuchten die SIGLEC1-Expression auf Monozyten bei 21 Patient*innen mit neu diagnostizierter, juveniler DM – ebenfalls mittels Durchflusszytometrie.[55] Die Querschnittanalyse ergab eine Korrelation von SIGLEC1 mit der Krankheitsaktivität. Zur Messung der Krankheitsaktivität wurden ebenfalls PGA und CMAS, sowie zusätzlich ein Score zur Messung der Hautbeteiligung (The Cutaneous Assessment Tool, CAT) verwendet. Lerkvaleekul et al. konnten zudem zeigen, dass SIGLEC1 in der Vorhersage des Therapieansprechens einem mittels RT-qPCR

gemessenen Score aus fünf Interferon-stimulierten Genen (MX1, IFI44, IFI44L, LY6E, IFIT3) überlegen war. Unsere Studie ergab ebenfalls die Korrelation von SIGLEC1 mit der Krankheitsaktivität. Zusätzlich konnten wir diesen Zusammenhang für die Längsschnittdaten zeigen.

Bei Patient*innen mit AS war die Expression von SIGLEC1 niedriger als bei Patient*innen mit DM. In einigen Studien wurde gezeigt, dass für die Ätiopathogenese der AS vermehrt Typ-II-Interferone eine Rolle spielen.[32,62] Reed et al. und Pinal-Fernandez et al. fanden hingegen auch eine erhöhte Typ-I-Interferon-Aktivität im Blut beziehungsweise in Muskelbiopsien von Patient*innen mit AS.[32,63] Auch in unserer Studienpopulation hatten einige AS-Patient*innen (42,1%) eine hohe SIGLEC1-Expression. Da SIGLEC1 überwiegend durch Typ-I-Interferone reguliert wird,[48,64] spricht dies für eine Typ-I-Interferon-Aktivität auch bei AS. Hier stellt sich vor allem die Frage, ob es sich um Subtypen von AS handelt. Die Rolle von Typ-I-Interferonen bei AS sollte daher weiter untersucht werden.

Nur zwei von neun Patient*innen mit IBM hatten eine erhöhte SIGLEC1-Expression. Beide waren positiv für Ro-Autoantikörper und einer zusätzlich für U1RNP-Autoantikörper. Für Anti-Ro und U1RNP-Autoantikörper wurde bereits eine Assoziation mit Typ-I-Interferonen nachgewiesen.[65] Der Patient mit Antikörpern gegen U1RNP zeigte auch in der immunhistologischen Untersuchung der Muskelbiopsie (MxA/ISG15) eine Typ-I-Interferon-Aktivität (Patient AD010, siehe Abbildung 5). Studienergebnisse bezüglich der Typ-I-Interferone bei IBM sind bisher widersprüchlich.[32,66,67] Die IBM wird noch immer spät diagnostiziert und der Krankheitsverlauf lässt sich medikamentös kaum beherrschen.[2] Ob der Nachweis einer erhöhten Typ-I-Interferon-Aktivität bei einzelnen IBM-Patient*innen zusätzliche Therapieoptionen bietet, muss weiter erforscht werden.

Bei Patient*innen mit IMNM war die SIGLEC1-Expression nicht erhöht. Bisher liegen nur wenige Studien vor, die die Interferon-Aktivität bei Patient*innen mit IMNM untersucht haben. Diese zeigten eine – wenn überhaupt – geringe Erhöhung sowohl der Typ-I- als auch der Typ-II-Interferon-Aktivität in Muskelbiopsien.[32]

Bisher gibt es nur wenige Studien, die Unterschiede zwischen einzelnen MSA und der Typ-I-Interferon-Signatur erforscht haben. Während Allenbach et al. und Soponkanaporn et al. eine niedrigere Aktivität von Interferon-stimulierten Genen in Muskelbiopsien bei

Patient*innen mit MDA5-positiver DM fanden, konnten Pinal-Fernandez et al. keine Unterschiede zwischen den verschiedenen MSA finden.[32,68,69] Andere Studien wiesen eine besonders hohe Interferon-Aktivität im Blut beziehungsweise in Hautbiopsien von MDA5-positiven DM-Patient*innen nach.[70,71] Reed et al. kamen dagegen zu dem Ergebnis, dass bei Patient*innen mit Anti-Synthetase-, TIF1 γ - und Mi-2-Autoantikörpern die höchste Typ-I-Interferon-Aktivität im Blut vorliegt.[63] Ein Vergleich der Studien ist nur eingeschränkt möglich, da auch hier unterschiedliche Methoden zur Messung der Interferon-Aktivität verwendet wurden. Unsere Ergebnisse zeigten die höchste SIGLEC1-Expression bei Patient*innen mit MDA5- und TIF1 γ -positiver DM. Insgesamt konnten wir jedoch keine klare Assoziation von MSA und SIGLEC1 finden. Das Vorliegen bestimmter Autoantikörper allein lässt somit noch keine Aussage über die Typ-I-Interferon-Aktivierung zu, sodass die Bestimmung eines Typ-I-Interferon-Biomarkers hier zusätzliche Informationen liefert.

Für die Überwachung der Krankheitsaktivität ergaben die vorliegenden Daten eine Überlegenheit von SIGLEC1 gegenüber der CK bei Patient*innen mit juveniler und adulter DM. Demgegenüber stellt die CK bei Patient*innen mit klassischerweise hohen CK-Werten wie bei IMNM und AS einen guten Verlaufsparemeter dar.[29] Die CK ist ein unspezifischer Parameter und ist unter anderem nach körperlichem Training, bei medikamentös-toxischem Muskelschaden und anderen Ursachen von Myopathien erhöht.[29] In den Daten der vorliegenden Studie hatten Patient*innen mit MDA5- und TIF1 γ -positiver DM eine hohe SIGLEC1-Expression, aber zumeist keine CK-Erhöhung. Normwertige CK wurde bei Patient*innen mit den genannten Autoantikörpern auch in anderen Studien bereits beschrieben.[14,72], womit der Detektion einer Typ-I-Interferon-Aktivierung ein gewisser Nutzen zukommen würde. Dennoch ist auch die SIGLEC1-Expression unspezifisch und wird von anderen Faktoren wie beispielsweise viralen Erkrankungen beeinflusst. Die Kombination mit weiteren diagnostischen Parametern wie der klinischen Symptomatik, Autoantikörpern und Informationen aus Muskelbiopsien sind deshalb nötig, um die Diagnose einer IIM zu sichern.

In unserer Studie hatten alle Patient*innen mit erhöhter Expression von ISG15 und/oder MxA in der Muskelbiopsie eine erhöhte SIGLEC1-Expression im Blut. Drei Patient*innen mit DM (MDA5/TIF1 γ /ohne MSA) hatten bei aktiver Erkrankung zwar eine erhöhte Typ-I-Interferon-Aktivität im Blut, aber nicht im Muskel. Im Gegensatz dazu zeigten Walsh et al., dass bei Patient*innen mit DM einige Interferon-induzierte Gene (wie ISG15 und MxA)

zwar stark hochreguliert im Muskel aber nur gering im Blut zu finden sind.[34] Möglicherweise ist von einer unterschiedlichen Interferon-Signatur und -Aktivität je nach Zelltyp und Gewebe auszugehen,[41] beispielsweise bei Patient*innen mit geringer Haut-/Muskelbeteiligung sowie bei Vorliegen bestimmter Antikörper wie MDA5. Gallay et al. plädieren daher für ein gewebespezifisches Panel aus Interferon-stimulierten Genen.[41] Die klinischen oder therapeutischen Implikationen sind hier jedoch noch unklar.

4.4 Stärken und Limitationen der Studie

Mit der vorliegenden Arbeit können wir einige der bisherigen Ergebnisse von Studien bestätigen, die die Typ-I-Interferon-Signatur bei IIM untersucht haben. Im Unterschied zu anderen Typ-I-Interferon Biomarkern ist SIGLEC1 mittels Durchflusszytometrie bestimmbar und könnte damit leicht für den klinischen Alltag etabliert werden. Eine Stärke unserer Studie ist die relativ hohe Anzahl an Proband*innen sowie die Erfassung der Verlaufsdaten im Längsschnitt. Wir konnten sowohl für adulte als auch für juvenile Patient*innen signifikante Ergebnisse finden. Als eine der ersten Studien untersuchten wir, ob eine Korrelation der Typ-I-Interferon-Aktivität im Blut und im Muskel vorliegt.

Eine Limitation der Studie ist, dass in den retrospektiven Daten für erwachsene Patient*innen keine ausreichend verfügbaren klinischen Scores zur Messung der Muskelkraft vorlagen, wie es bei juvenilen Patient*innen in Form des CMAS der Fall war. Wir griffen daher auf den PGA zurück, der jedoch zumeist retrospektiv erfasst werden musste. Um einen möglichen Bias zu minimieren wurden die fehlenden PGA-Werte von zwei behandelnden Rheumatolog*innen festgelegt, die für den SIGLEC1-Wert verblindet waren. Letztlich wäre die prospektive Erfassung des *Manual Muscle Test-8* (MMT-8) für die Erfassung der Muskelkraft ein objektiveres Instrument gewesen, auch um die Aussagekraft der Studie zu erhöhen. Zusätzlich wäre eine vergleichende Analyse verschiedener Typ-I-Interferon-Biomarker interessant gewesen, die aufgrund des retrospektiven Designs unserer Studie nicht durchgeführt werden konnte.

Zusätzlich konnten einige Analysen nur mit wenigen Patient*innen durchgeführt werden. Insbesondere die Analyse der Assoziation einzelner MSA mit der SIGLEC1-Expression war hierdurch limitiert.

Durch die Therapie mit Glukokortikoiden kann die Typ-I-Interferon-Signatur reduziert werden, was zugleich ein wichtiger therapeutischer Effekt ist.[45,49,51,73] Bei

Patient*innen mit DM zeigte sich in unserer Studie kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit und ohne Behandlung mit Prednisolon. Dennoch lässt sich der Einfluss von Prednisolon (und anderen immunsupprimierenden Medikamenten) insbesondere bei den Längsschnittdaten nicht vollständig ausschließen.

Weiterhin muss bei der Interpretation von SIGLEC1 im klinischen Alltag beachtet werden, dass das Typ-I-Interferon-System nicht spezifisch für autoimmune Erkrankungen ist. So wurde die Hochregulierung von SIGLEC1 beispielsweise auch für die koronare Herzkrankheit[74] und virale Infektionen beschrieben.[75,76]

4.5 Implikationen für die klinische Anwendung und zukünftige Forschung

Wie oben beschrieben, wurde die Erhöhung der Typ-I-Interferon-Aktivität bei der DM und anderen autoimmunen Erkrankungen bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen. Bisher hat sich jedoch keine Methode bzw. kein Biomarker zur Messung der Typ-I-Interferon-Aktivität im Blut für den klinischen Alltag durchgesetzt. Ein solcher Biomarker könnte im klinischen Alltag für die Stratifizierung von Patient*innen, die Überwachung der Krankheitsaktivität oder einer Interferon-inhibitorischen Therapie sowie des Therapieansprechens Anwendung finden. In einer Übersichtsarbeit von Rodriguez-Carrio et al. wurde auf die fehlende Harmonisierung und Standardisierung der verschiedenen Methoden zur Messung von Typ-I-Interferonen eingegangen.[77] Dies dürfte mit dafür verantwortlich sein, dass die Messung der Typ-I-Interferon-Aktivität bisher nicht im klinischen Alltag Einzug gehalten hat. Zur Harmonisierung der Studien und ihrer Ergebnisse wurden sogenannte *EULAR points to consider* vorgeschlagen. Diese betonen beispielsweise, dass verschiedene Methoden auch verschiedene Phasen in der Aktivierung des Interferon-Systems messen und daher unterschiedliche Informationen mit sich bringen können. Bisher kann kein Messverfahren die Gesamtheit der Typ-I-Interferon-Aktivierung abbilden. Weiterhin gibt es für die Typ-I, Typ-II und Typ III-Interferone zwar unterschiedliche Rezeptoren, im komplexen System der Signalkaskaden kommt es jedoch zu einer Überlappung. Die Effekte der Interferone lassen sich daher nicht vollständig trennen. Weiterhin betonen die *points to consider*, dass zwar die Aktivierung des Typ-I-Interferon-Systems bei Erkrankungen wie SLE oder IIM mit der Krankheitsaktivität korreliert, der Nutzen für den klinischen Alltag jedoch noch nicht hinlänglich geklärt ist.[77]

Bisher werden insbesondere *gene scores* verwendet, um die Aktivität des Typ-I-Interferon-Systems zu messen. Ein aktueller Vorschlag zur Harmonisierung der *gene scores* beinhaltet sechs Interferon-stimulierte Gene: SIGLEC1, IFI27 (Interferon alpha inducible protein 27), IFI44L (Interferon induced protein 44 like), IFIT1 (Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1), ISG15 und RSAD2 (radical S-adenosyl methionine domain containing 2).[78] Insgesamt sind *gene scores* jedoch schwierig zu standardisieren und reagieren träge auf Veränderungen.[79] In Transkriptomdaten konnte eine erhöhte Expression von SIGLEC1 nachgewiesen werden.[54] SIGLEC1 gilt als Teil der Typ-I-Interferon-Signatur.[47,48,64] In unserer Studie verwendeten wir die Durchflusszytometrie zur Messung der SIGLEC1-Expression auf Monozyten. Diese Methode steht bereits in vielen Laboren zur Verfügung.

Ergebnisse aus der direkten Messung von Interferonen mittels konventionellem ELISA bei Patient*innen mit SLE zeigten bisher eine niedrige Sensitivität.[50] Eine weitere Möglichkeit besteht in der direkten Messung von Interferon alpha im Serum mittels SIMOA (interferon-alpha single-molecule array), einem hochsensitiven digitalen ELISA. Dies wurde bereits für verschiedene autoimmune Erkrankungen inklusive der juvenilen DM untersucht.[80,81] Ein Vergleich zwischen der durchflusszytometrischen Messung von SIGLEC1 und der direkten Messung von Interferon alpha mittels SIMOA wäre sehr interessant, da beide vielversprechende Biomarker für den klinischen Alltag darstellen. Insgesamt bleibt noch ungeklärt, auf welcher Ebene die Messung des Typ-I-Interferon-Systems stattfinden sollte, um ein möglichst repräsentatives Ergebnis über seine Gesamtheit zu erhalten.

5 Schlussfolgerungen

Die durchflusszytometrische Messung der SIGLEC1-Expression auf Monozyten im peripheren Blut gibt Auskunft über die individuelle Typ-I-Interferon-Aktivität bei Patient*innen mit IIM und korreliert mit der Krankheitsaktivität und dem Therapieansprechen bei juveniler und adulter DM. Wie bereits für andere inflammatorische rheumatische Erkrankungen gezeigt, stellt SIGLEC1 damit für Patient*innen mit DM einen vielversprechenden Typ-I-Interferon-Biomarker für den klinischen Alltag dar.

Literaturverzeichnis

1. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and Dermatomyositis: (First of Two Parts). *N Engl J Med.* 13. Februar 1975;292(7):344–7.
2. Wiendl H., Schmidt J. (federführend), Myositissyndrome, S2k-Leitlinie, 2022; in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online: <https://dgn.org/leitlinie/143> (abgerufen am 10.12.2022)
3. Lundberg IE, de Visser M, Werth VP. Classification of myositis. *Nat Rev Rheumatol.* Mai 2018;14(5):269–78.
4. Tanboon J, Uruha A, Stenzel W, Nishino I. Where are we moving in the classification of idiopathic inflammatory myopathies? *Curr Opin Neurol.* Oktober 2020;33(5):590–603.
5. Mariampillai K, Granger B, Amelin D, Guiguet M, Hachulla E, Maurier F, Meyer A, Tohmé A, Charuel JL, Musset L, Allenbach Y, Benveniste O. Development of a New Classification System for Idiopathic Inflammatory Myopathies Based on Clinical Manifestations and Myositis-Specific Autoantibodies. *JAMA Neurol.* 1. Dezember 2018;75(12):1528–37.
6. Meyer A, Meyer N, Schaeffer M, Gottenberg JE, Geny B, Sibia J. Incidence and prevalence of inflammatory myopathies: a systematic review. *Rheumatology.* 1. Januar 2015;54(1):50–63.
7. Dalakas MC. Inflammatory Muscle Diseases. Longo DL, Herausgeber. *N Engl J Med.* 30. April 2015;372(18):1734–47.
8. Lundberg IE, Fujimoto M, Vencovsky J, Aggarwal R, Holmqvist M, Christopher-Stine L, Mammen AL, Miller FW. Idiopathic inflammatory myopathies. *Nat Rev Dis Primer.* Dezember 2021;7(1):86.
9. Day J, Otto S, Proudman S, Hayball JD, Limaye V. Dysregulated innate immune function in the aetiopathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmun Rev.* 1. Januar 2017;16(1):87–95.
10. Greenberg SA. Inclusion body myositis: clinical features and pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol.* Mai 2019;15(5):257–72.
11. McHugh NJ, Tansley SL. Autoantibodies in myositis. *Nat Rev Rheumatol.* Mai 2018;14(5):290–302.
12. Lega JC, Reynaud Q, Belot A, Fabien N, Durieu I, Cottin V. Idiopathic inflammatory myopathies and the lung. *Eur Respir Rev.* 1. Juni 2015;24(136):216–38.
13. Fiorentino DF, Chung LS, Christopher-Stine L, Zaba L, Li S, Mammen AL, Rosen A, Casciola-Rosen L. Most patients with cancer-associated dermatomyositis have antibodies to nuclear matrix protein NXP-2 or transcription intermediary factor 1γ. *Arthritis Rheum.* November 2013;65(11):2954–62.

14. Betteridge Z, Tansley S, Shaddick G, Chinoy H, Cooper RG, New RP, Lilleker JB, Vencovsky J, Chazarain L, Danko K, Nagy-Vincze M, Bodoki L, Dastmalchi M, Ekholm L, Lundberg IE, McHugh N. Frequency, mutual exclusivity and clinical associations of myositis autoantibodies in a combined European cohort of idiopathic inflammatory myopathy patients. *J Autoimmun.* 1. Juli 2019;101:48–55.
15. Jordan B, Hanisch F, Zierz S. Myositiden. *Nervenheilkunde.* 2011;30(10):776–86.
16. Kubínová K, Mann H, Vrána J, Vencovský J. How Imaging Can Assist with Diagnosis and Monitoring of Disease in Myositis. *Curr Rheumatol Rep.* Oktober 2020;22(10):62.
17. Lundberg IE, Tjärnlund A, Bottai M, Werth VP, Pilkington C, Visser M de, Alfredsson L, Amato AA, Barohn RJ, Liang MH, Singh JA, Aggarwal R, Arnardottir S, Chinoy H, Cooper RG, Dankó K, Dimachkie MM, Feldman BM, Torre IGD, Gordon P, Hayashi T, Katz JD, Kohsaka H, Lachenbruch PA, Lang BA, Li Y, Oddis CV, Olesinska M, Reed AM, Rutkowska-Sak L, Sanner H, Selva-O'Callaghan A, Song YW, Vencovsky J, Ytterberg SR, Miller FW, Rider LG, International Myositis Classification Criteria Project consortium, The Euromyositis register and The Juvenile Dermatomyositis Cohort Biomarker Study and Repository (JDRG) (UK and Ireland). 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.
18. Hinze C. Juvenile Dermatomyositis – was gibt es Neues? *Z Für Rheumatol.* September 2019;78(7):627–35.
19. Rose T, Dörner T. Drivers of the immunopathogenesis in systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2017;31(3):321–33.
20. Arshanapalli A, Shah M, Veerula V, Somani AK. The role of type I interferons and other cytokines in dermatomyositis. *Cytokine.* Juni 2015;73(2):319–25.
21. Rönnblom L, Eloranta ML. The interferon signature in autoimmune diseases. *Curr Opin Rheumatol.* März 2013;25(2):248.
22. Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol.* Januar 2014;14(1):36–49.
23. Chen K, Liu J, Cao X. Regulation of type I interferon signaling in immunity and inflammation: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 1. September 2017;83:1–11.
24. Burska A, Rodríguez-Carrio J, Biesen R, Dik WA, Eloranta ML, Cavalli G, Visser M, Boumpas DT, Bertias G, Wahren-Herlenius M, Rehwinkel J, Frémond ML, Crow MK, Rönnblom L, Conaghan PG, Versnel M, Vital E. 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.
25. Ladislau L, Suárez-Calvet X, Toquet S, Landon-Cardinal O, Amelin D, Depp M, Rodero MP, Hathazi D, Duffy D, Bondet V, Preusse C, Biennvenu B, Rozenberg F, Roos A, Benjamim CF, Gallardo E, Illa I, Mouly V, Stenzel W, Butler-Browne G,

- Benveniste O, Allenbach Y. JAK inhibitor improves type I interferon induced damage: proof of concept in dermatomyositis. *Brain*. 1. Juni 2018;141(6):1609–21.
26. Aeschlimann FA, Frémond ML, Duffy D, Rice GI, Charuel JL, Bondet V, Saire E, Neven B, Bodemer C, Balu L, Gitiaux C, Crow YJ, Bader-Meunier B. A child with severe juvenile dermatomyositis treated with ruxolitinib. *Brain*. 1. November 2018;141(11):e80.
 27. Papadopoulou C, Hong Y, Omoyinmi E, Brogan PA, Eleftheriou D. Janus kinase 1/2 inhibition with baricitinib in the treatment of juvenile dermatomyositis. *Brain*. 1. März 2019;142(3):e8–e8.
 28. Voyer TL, Gitiaux C, Bodemer C, Melki I, Quartier P, Aeschlimann F, Isapof A, Herbeuval JP, Bondet V, Charuel JL, Duffy D, Rodero MP, Bader-Meunier B. JAK inhibitors are effective in a subset of patients with juvenile dermatomyositis: a monocentric retrospective study. :8.
 29. Benveniste O, Goebel HH, Stenzel W. Biomarkers in Inflammatory Myopathies—An Expanded Definition. *Front Neurol*. 4. Juni 2019;10:554.
 30. Cassius C, Le Buanec H, Bouaziz JD, Amode R. Biomarkers in Adult Dermatomyositis: Tools to Help the Diagnosis and Predict the Clinical Outcome. *J Immunol Res*. 14. Januar 2019;2019:1–15.
 31. Wong D, Kea B, Pesich R, Higgs BW, Zhu W, Brown P, Yao Y, Fiorentino D. Interferon and biologic signatures in dermatomyositis skin: specificity and heterogeneity across diseases. *PLoS One*. 2012;7(1):e29161.
 32. Pinal-Fernandez I, Casal-Dominguez M, Derfoul A, Pak K, Plotz P, Miller FW, Milisenda JC, Grau-Junyent JM, Selva-O'Callaghan A, Paik J, Albayda J, Christopher-Stine L, Lloyd TE, Corse AM, Mammen AL. Identification of distinctive interferon gene signatures in different types of myositis. *Neurology*. 17. September 2019;93(12):e1193–204.
 33. Uruha A, Nishikawa A, Tsuburaya RS, Hamanaka K, Kuwana M, Watanabe Y, Suzuki S, Suzuki N, Nishino I. Sarcoplasmic MxA expression: A valuable marker of dermatomyositis. *Neurology*. 31 2017;88(5):493–500.
 34. Walsh RJ, Kong SW, Yao Y, Jallal B, Kiener PA, Pinkus JL, Beggs AH, Amato AA, Greenberg SA. Type I interferon-inducible gene expression in blood is present and reflects disease activity in dermatomyositis and polymyositis. *Arthritis Rheum*. November 2007;56(11):3784–92.
 35. Baechler EC, Bauer JW, Slattery CA, Ortmann WA, Espe KJ, Novitzke J, Ytterberg SR, Gregersen PK, Behrens TW, Reed AM. An Interferon Signature in the Peripheral Blood of Dermatomyositis Patients is Associated with Disease Activity. *Mol Med*. Januar 2007;13(1–2):59–68.
 36. Greenberg SA, Higgs BW, Morehouse C, Walsh RJ, Kong SW, Brohawn P, Zhu W, Amato A, Salajegheh M, White B, Kiener PA, Jallal B, Yao Y. Relationship between disease activity and type 1 interferon- and other cytokine-inducible gene expression

- in blood in dermatomyositis and polymyositis. *Genes Immun.* April 2012;13(3):207–13.
37. Huard C, Gullà SV, Bennett DV, Coyle AJ, Vleugels RA, Greenberg SA. Correlation of cutaneous disease activity with type 1 interferon gene signature and interferon β in dermatomyositis. *Br J Dermatol.* Mai 2017;176(5):1224–30.
 38. Bilgic H, Ytterberg SR, Amin S, McNallan KT, Wilson JC, Koeuth T, Ellingson S, Newman B, Bauer JW, Peterson EJ, Baechler EC, Reed AM. Interleukin-6 and type I interferon-regulated genes and chemokines mark disease activity in dermatomyositis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(11):3436–46.
 39. O'Connor KA, Abbott KA, Sabin B, Kuroda M, Pachman LM. MxA gene expression in juvenile dermatomyositis peripheral blood mononuclear cells: association with muscle involvement. *Clin Immunol Orlando Fla.* September 2006;120(3):319–25.
 40. Reed AM, Peterson E, Bilgic H, Ytterberg SR, Amin S, Hein MS, Crowson CS, Ernste F, Gillespie EB. Changes in novel biomarkers of disease activity in juvenile and adult dermatomyositis are sensitive biomarkers of disease course. *Arthritis Rheum.* 2012;64(12):4078–86.
 41. Gallay L, Mouchiroud G, Chazaud B. Interferon-signature in idiopathic inflammatory myopathies: *Curr Opin Rheumatol.* November 2019;31(6):634–42.
 42. Rodríguez-Carrio J, Burska A, Conaghan PG, Dik WA, Biesen R, Eloranta ML, Cavalli G, Visser M, Boumpas DT, Bertias G, Wahren-Herlenius M, Rehwinkel J, Frémond ML, Crow MK, Ronnblom L, Vital E, Versnel M. 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.
 43. Greenberg SA. Dermatomyositis and Type 1 Interferons. *Curr Rheumatol Rep.* Juni 2010;12(3):198–203.
 44. Uruha A, Allenbach Y, Charuel JL, Musset L, Aussy A, Boyer O, Mariampillai K, Landon-Cardinal O, Rasmussen C, Bolko L, Maisonobe T, Leonard-Louis S, Suzuki S, Nishino I, Stenzel W, Benveniste O. Diagnostic potential of sarcoplasmic myxovirus resistance protein A expression in subsets of dermatomyositis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2019;45(5):513–22.
 45. Biesen R, Demir C, Barkhudarova F, Grün JR, Steinbrich-Zöllner M, Backhaus M, Häupl T, Rudwaleit M, Riemekasten G, Radbruch A, Hiepe F, Burmester GR, Grützkau 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 Rheum.* 2008;58(4):1136–45.
 46. Eakin AJ, Bustard MJ, McGeough CM, Ahmed T, Bjourson AJ, Gibson DS. Siglec-1 and -2 as potential biomarkers in autoimmune disease. *PROTEOMICS – Clin Appl.* 2016;10(6):635–44.

47. 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 Rheum.* März 2007;56(3):1010–20.
48. Bourgoin P, Biéché G, Belkacem IA, Morange PE, Malergue F. 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(1):106–23.
49. von Stuckrad SL, 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.* Dezember 2020;29(14):1914–25.
50. Rose T, Grutzkau A, Hirseland H, Huscher D, Dahnrich C, Dzionek A, Ozimkowski T, Schlumberger W, Enghard P, Radbruch A, Riemekasten G, Burmester GR, Hiepe F, Biesen R. IFNalpha and its response proteins, IP-10 and SIGLEC-1, are biomarkers of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* Oktober 2013;72(10):1639–45.
51. Aue A, Szelinski F, Weißenberg SY, Wiedemann A, Rose T, Lino AC, Dörner T. Elevated STAT1 expression but not phosphorylation in lupus B cells correlates with disease activity and increased plasmablast susceptibility. *Rheumatology.* 1. Mai 2020;keaa187.
52. Rose T, Grutzkau A, Klotsche J, Enghard P, Flechsig A, Keller J, Riemekasten G, Radbruch A, Burmester GR, Dörner T, Hiepe F, Biesen R. Are interferon-related biomarkers advantageous for monitoring disease activity in systemic lupus erythematosus? A longitudinal benchmark study. *Rheumatol Oxf Engl.* 01 2017;56(9):1618–26.
53. Rose T, Szelinski F, Lisney A, Reiter K, Fleischer SJ, Burmester GR, Radbruch A, Hiepe F, Grutzkau A, Biesen R, Dörner T. SIGLEC1 is a biomarker of disease activity and indicates extraglandular manifestation in primary Sjogren's syndrome. *RMD Open.* 2016;2(2):e000292.
54. Rice GI, Melki I, Frémond ML, Briggs TA, Rodero MP, Kitabayashi N, Oojageer A, Bader-Meunier B, Belot A, Bodemer C, Quartier P, Crow YJ. Assessment of Type I Interferon Signaling in Pediatric Inflammatory Disease. *J Clin Immunol.* 2017;37(2):123–32.
55. Lerkvaleekul B, Veldkamp SR, van der Wal MM, Schatorjé EJH, Kamphuis SSM, van den Berg JM, Hissink Muller PCE, Armbrust W, Vastert SJ, Wienke J, Jansen MHA, van Royen-Kerkhof A, van Wijk F. Siglec-1 expression on monocytes is associated with the interferon signature in juvenile dermatomyositis and can predict treatment response. *Rheumatology (Oxford).* 5. Mai 2022;61(5):2144–55.
56. Graf M, von Stuckrad SL, Uruha A, Klotsche J, Zorn-Pauly L, Unterwalder N, Buttgerit T, Krusche M, Meisel C, Burmester GR, Hiepe F, Biesen R, Kallinich T, Stenzel W, Schneider U, Rose T. SIGLEC1 enables straightforward assessment of

type I interferon activity in idiopathic inflammatory myopathies. *RMD Open*. Februar 2022;8(1):e001934.

57. Döcke WD, Höflich C, Davis KA, Röttgers K, Meisel C, Kiefer P, Weber SU, Hedwig-Geissing M, Kreuzfelder E, Tschentscher P, Nebe T, Engel A, Monneret G, Spittler A, Schmolke K, Reinke P, Volk HD, Kunz D. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem*. Dezember 2005;51(12):2341–7.
58. Rider LG, Werth VP, Huber AM, Alexanderson H, Rao AP, Ruperto N, Herbelin L, Barohn R, Isenberg D, Miller FW. 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*. November 2011;63(S11):S118–57.
59. Huber AM, Feldman BM, Rennebohm RM, Hicks JE, Lindsley CB, Perez MD, Zemel LS, Wallace CA, Ballinger SH, Passo MH, Reed AM, Summers RM, White PH, Katona IM, Miller FW, Lachenbruch PA, Rider LG, Juvenile Dermatomyositis Disease Activity Collaborative Study Group. Validation and clinical significance of the Childhood Myositis Assessment Scale for assessment of muscle function in the juvenile idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Rheum*. Mai 2004;50(5):1595–603.
60. Rider LG, Giannini EH, Harris-Love M, Joe G, Isenberg D, Pilkington C, Lachenbruch PA, Miller FW, International Myositis Assessment and Clinical Studies Group. Defining Clinical Improvement in Adult and Juvenile Myositis. *J Rheumatol*. März 2003;30(3):603–17.
61. Allenbach Y, Mammen AL, Benveniste O, Stenzel W, Allenbach Y, Amato A, Aussey A, Benveniste O, Bleecker JD, Groot I de, Visser M de, Goebel H, Hervier B, Fischer N, Hilton-Jones D, Lamb J, Lundberg I, Mammen A, Mozaffar T, Nishino I, Pestronk A, Schara U, Stenzel W. 224th ENMC International Workshop:: Clinico-seropathological classification of immune-mediated necrotizing myopathies Zandvoort, The Netherlands, 14–16 October 2016. *Neuromuscul Disord*. 1. Januar 2018;28(1):87–99.
62. Rigoleto M, Hou C, Baba Amer Y, Aouizerate J, Periou B, Gherardi RK, Lafuste P, Authier FJ. Distinct interferon signatures stratify inflammatory and dysimmune myopathies. *RMD Open*. Februar 2019;5(1):e000811.
63. Reed AM, Crowson CS, Hein M, de Padilla CL, Olazagasti JM, Aggarwal R, Ascherman DP, Levesque MC, Oddis CV, the RIM Study Group. Biologic predictors of clinical improvement in rituximab-treated refractory myositis. *BMC Musculoskelet Disord*. 17. September 2015;16(1):257.
64. Orak B, Ngoumou G, Ebstein F, Zieba B, Goetzke CC, Knierim E, Kaindl AM, Panzer A, Theophil M, Berns M, Krüger E, Meisel C, Unterwalder N, Kallinich T. SIGLEC1 (CD169) as a potential diagnostic screening marker for monogenic

interferonopathies. *Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol*. 25. Oktober 2020;

65. Savarese E, Chae O wha, Trowitzsch S, Weber G, Kastner B, Akira S, Wagner H, Schmid RM, Bauer S, Krug A. U1 small nuclear ribonucleoprotein immune complexes induce type I interferon in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Blood*. 15. April 2006;107(8):3229–34.
66. Ekholm L, Vosslamber S, Tjärnlund A, Jong TD de, Betteridge Z, McHugh N, Plestilova L, Klein M, Padyukov L, Voskuyl AE, Bultink IEM, Pegtel DM, Mavragani CP, Crow MK, Vencovsky J, Lundberg IE, Verweij CL. Autoantibody Specificities and Type I Interferon Pathway Activation in Idiopathic Inflammatory Myopathies. *Scand J Immunol*. 2016;84(2):100–9.
67. Roos A, Preusse C, Hathazi D, Goebel HH, Stenzel W. Proteomic Profiling Unravels a Key Role of Specific Macrophage Subtypes in Sporadic Inclusion Body Myositis. *Front Immunol*. 9. Mai 2019;10:1040.
68. Allenbach Y, Leroux G, Suárez-Calvet X, Preusse C, Gallardo E, Hervier B, Rigolet A, Hie M, Pehl D, Limal N, Hufnagl P, Zerbe N, Meyer A, Aouizerate J, Uzunhan Y, Maisonobe T, Goebel HH, Benveniste O, Stenzel W, Hot A, Grados A, Schleinitz N, Gallet L, Streichenberger N, Petiot P, Hachulla E, Launay D, Devilliers H, Hamidou M, Cornec D, Bienvenu B, Langlois V, Levesque H, Delluc A, Drouot L, Charuel JL, Jouen F, Romero N, Dubourg O, Leonard-Louis S, Behin A, Laforet P, Stojkovic T, Eymard B, Costedoat-Chalumeau N, Campana-Salort E, Tournadre A, Musset L, Bader-Meunier B, Kone-Paut I, Sibilia J, Servais L, Fain O, Larroche C, Diot E, Terrier B, De Paz R, Dossier A, Menard D, Morati C, Roux M, Ferrer X, Martinet J, Besnard S, Bellance R, Cacoub P, Saadoun D, Arnaud L, Grosbois B, Herson S, Boyer O. Dermatomyositis With or Without Anti-Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Antibodies. *Am J Pathol*. März 2016;186(3):691–700.
69. Sponkanaporn S, Deakin CT, Schutz PW, Marshall LR, Yasin SA, Johnson CM, Sag E, Tansley SL, McHugh NJ, Wedderburn LR, Jacques TS. Expression of myxovirus-resistance protein A: a possible marker of muscle disease activity and autoantibody specificities in juvenile dermatomyositis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. Juni 2019;45(4):410–20.
70. Melki I, Devilliers H, Gitiaux C, Bondet V, Duffy D, Charuel JL, Miyara M, Bokov P, Kheniche A, Kwon T, Authier FJ, Allenbach Y, Belot A, Bodemer C, Bourrat E, Dumaine C, Fabien N, Faye A, Frémond ML, Hadchouel A, Kitabayashi N, Lepelley A, Martin-Niclos MJ, Mudumba S, Musset L, Quartier P, Rice GI, Seabra L, Uettwiller F, Uggenti C, Viel S, Rodero MP, Crow YJ, Bader-Meunier B. Anti-MDA5 juvenile idiopathic inflammatory myopathy: a specific subgroup defined by differentially enhanced interferon- α signalling. *Rheumatology*. 1. August 2020;59(8):1927–37.
71. Zhang SH, Zhao Y, Xie QB, Jiang Y, Wu YK, Yan B. Aberrant activation of the type I interferon system may contribute to the pathogenesis of anti-melanoma differentiation-associated gene 5 dermatomyositis. *Br J Dermatol*. Mai 2019;180(5):1090–8.

72. Hoshino K, Muro Y, Sugiura K, Tomita Y, Nakashima R, Mimori T. Anti-MDA5 and anti-TIF1- γ antibodies have clinical significance for patients with dermatomyositis. *Rheumatology*. September 2010;49(9):1726–33.
73. 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. *Ann Rheum Dis*. August 2017;76(8):1476–80.
74. Xiong Y song, Zhou Y heng, Rong G hua, Wu W lin, Liang Y, Yang Z xing, Geng H lian, Zhong R qian. Siglec-1 on monocytes is a potential risk marker for monitoring disease severity in coronary artery disease. *Clin Biochem*. Juli 2009;42(10–11):1057–63.
75. Pino M, Erkizia I, Benet S, Erikson E, Fernández-Figueras MT, Guerrero D, Dalmau J, Ouchi D, Rausell A, Ciuffi A, Keppler OT, Telenti A, Kräusslich HG, Martinez-Picado J, Izquierdo-Useros N. HIV-1 immune activation induces Siglec-1 expression and enhances viral trans-infection in blood and tissue myeloid cells. *Retrovirology*. Dezember 2015;12(1):37.
76. Bedin AS, Makinson A, Picot MC, Mennechet F, Malergue F, Pisoni A, Nyiramigisha E, Montagnier L, Bollore K, Debieesse S, Morquin D, Veyrenche N, Renault C, Foulongne V, Bret C, Bourdin A, Le Moing V, Van de Perre P, Tuillon E. Monocyte CD169 Expression as a Biomarker in the Early Diagnosis of Coronavirus Disease 2019. *J Infect Dis*. 24. Februar 2021;223(4):562–7.
77. Rodríguez-Carrio J, Burska A, Conaghan PG, Dik WA, Biesen R, Eloranta ML, Cavalli G, Visser M, Boumpas DT, Bertias G, Wahren-Herlenius M, Rehwinkel J, Frémond ML, Crow MK, Rönnblom L, Versnel MA, Vital EM. 2022 EULAR points to consider for the measurement, reporting and application of IFN-I pathway activation assays in clinical research and practice. *Ann Rheum Dis*. Juni 2023;82(6):754–62.
78. Nombel A, Foray AP, Garnier L, Lombard C, Hachulla E, Bader-Meunier B, Georgin-Lavialle S, Melki I, Walzer T, Belot A, Viel S. Assessment of type I interferon response in routine practice in France in 2022. *RMD Open*. Juni 2023;9(2):e003211.
79. Mathian A, Mouries-Martin S, Dorgham K, Yssel H, Amoura Z. Reply. *Arthritis Rheumatol*. 2020;72(1):197–197.
80. Rodero MP, Decalf J, Bondet V, Hunt D, Rice GI, Werneke S, McGlasson SL, Alyanakian MA, Bader-Meunier B, Barnerias C, Bellon N, Belot A, Bodemer C, Briggs TA, Desguerre I, Frémond ML, Hully M, van den Maagdenberg AMJM, Melki I, Meyts I, Musset L, Pelzer N, Quartier P, Terwindt GM, Wardlaw J, Wiseman S, Rieux-Laucat F, Rose Y, Neven B, Hertel C, Hayday A, Albert ML, Rozenberg F, Crow YJ, Duffy D. Detection of interferon alpha protein reveals differential levels and cellular sources in disease. *J Exp Med*. 1. Mai 2017;214(5):1547–55.
81. Mathian A, Mouries-Martin S, Dorgham K, Devilliers H, Yssel H, Garrido Castillo L, Cohen-Aubart F, Haroche J, Hié M, Pineton de Chambrun M, Miyara M, Pha M, Rozenberg F, Gorochoff G, Amoura Z. Ultrasensitive serum interferon- α

quantification during SLE remission identifies patients at risk for relapse. *Ann Rheum Dis.* Dezember 2019;78(12):1669–76.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Manuel Graf, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Die durchflusszytometrische Messung von SIGLEC1: ein Typ-I-Interferon-Biomarker bei idiopathischen inflammatorischen Myopathien“ (“The flow cytometric assessment of SIGLEC1: a type-I-interferon biomarker in idiopathic inflammatory myopathies“) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

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

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

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

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Manuel Graf hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1: Graf M, von Stuckrad SL, Uruha A, Klotsche J, Zorn-Pauly L, Unterwalder N, Buttgerit T, Krusche M, Meisel C, Burmester GR, Hiepe F, Biesen R, Kallinich T, Stenzel W, Schneider U, Rose T. SIGLEC1 enables straightforward assessment of type I interferon activity in idiopathic inflammatory myopathies . RMD Open. Februar 2022;8(1):e001934.

Beitrag im Einzelnen:

- Erstautorenschaft
- Entwicklung des Forschungsthemas, der Fragestellung und der Methodik, gemeinsam mit Thomas Rose
- Literaturrecherche zum aktuellen Forschungsstand
- Suche nach Patient*innen mit IIM und für die Kontrollgruppe 1 in analogen und digitalen Akten, mit Unterstützung der Koautor*innen
- Zusammentragen der Patient*innendaten in Excel-Tabellen
- Interpretation und Diskussion der Daten, gemeinsam mit den Koautor*innen
- Durchführung und Präsentation der deskriptiven Statistik (siehe *Table 1*)
- Statistische Auswertungen (ausgenommen der Längsschnittanalyse) mit GraphPad Prism, supervidiert von Thomas Rose und Jens Klotsche
- Erstellung aller Tabellen, Graphen und Abbildungen, supervidiert von Thomas Rose (ausgenommen: *eFigure S6*, *eFigure S8*, Fotografien der Muskelbiopsien)
- Erstellen des Manuskripts der Publikation, gemeinsam mit Thomas Rose
- Einarbeitung der Anmerkungen und Vorschläge der Koautor*innen in das Manuskript, in Rücksprache mit Thomas Rose
- Einreichen der Publikation bei RMD Open und Durchführung der Überarbeitungen im Laufe des Review-Prozesses, in Rücksprache mit Thomas Rose

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2020** Selected Editions: SCIE, SSCI
 Selected Categories: **"RHEUMATOLOGY"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 34 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Nature Reviews Rheumatology	12,069	20.543	0.018620
2	ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES	58,006	19.103	0.064430
3	Arthritis & Rheumatology	16,730	10.995	0.042830
4	Lancet Rheumatology	1,395	8.136	0.000990
5	RHEUMATOLOGY	26,132	7.580	0.028910
6	OSTEOARTHRITIS AND CARTILAGE	21,754	6.576	0.019930
7	SEMINARS IN ARTHRITIS AND RHEUMATISM	8,783	5.532	0.012160
8	Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease	1,291	5.346	0.001720
9	ARTHRITIS RESEARCH & THERAPY	21,255	5.156	0.023000
10	RMD Open	2,761	5.117	0.008830
11	CURRENT OPINION IN RHEUMATOLOGY	5,866	5.006	0.006450
12	JOINT BONE SPINE	4,797	4.929	0.004810
13	ARTHRITIS CARE & RESEARCH	20,470	4.794	0.018690
14	JOURNAL OF RHEUMATOLOGY	25,867	4.666	0.016970
15	Current Rheumatology Reports	3,878	4.592	0.005270
16	CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY	11,511	4.473	0.011510
17	Lupus Science & Medicine	921	4.235	0.002470
18	BEST PRACTICE & RESEARCH IN CLINICAL RHEUMATOLOGY	4,898	4.098	0.004870
19	SCANDINAVIAN JOURNAL OF RHEUMATOLOGY	3,968	3.641	0.003150

Selected JCR Year: 2020; Selected Categories: "RHEUMATOLOGY"

1

Quelle: Seite 1 von 2 des Journal Citation Report 2020, Editions SCIE, SSCI, abgerufen am 13.12.2022 um 11:13 Uhr.

ORIGINAL RESEARCH

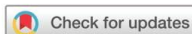
SIGLEC1 enables straightforward assessment of type I interferon activity in idiopathic inflammatory myopathies

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-TIF1γ, 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/creatin kinase, respectively, in juvenile dermatomyositis and (2) PGA score and SIGLEC1/creatin 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 (36.1 mg/day)	9 (6.3 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.

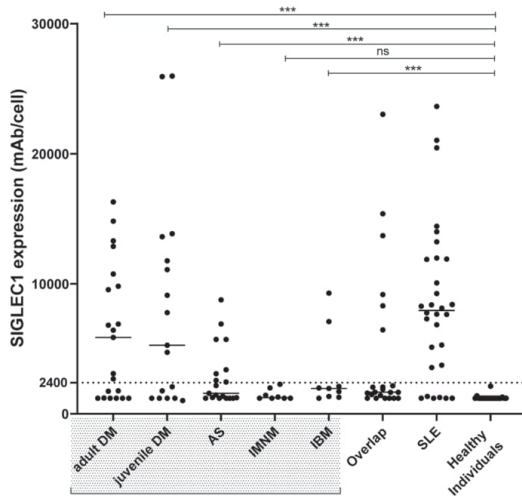


Figure 1 SIGLEC1 expression on monocytes of all patients at first visit. Horizontal bars show median values. Mann-Whitney U test was used to compare patients with the following idiopathic inflammatory myopathies (IIM)—adult (n=21) and juvenile (n=17) dermatomyositis (DM), antisynthetase syndrome (AS, 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:

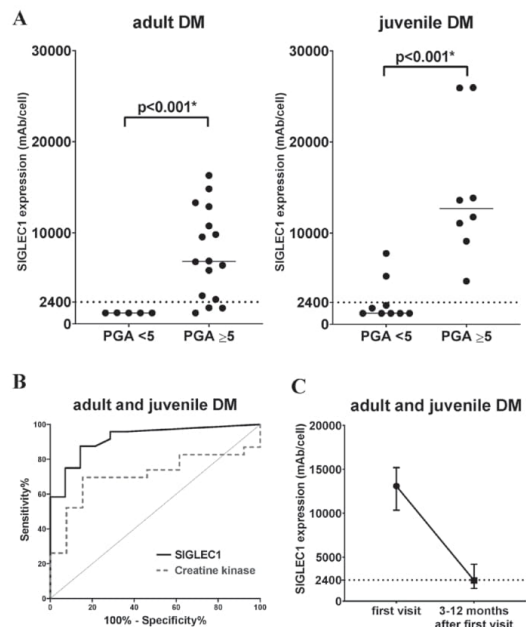


Figure 2 SIGLEC1 expression in DM patients (A) adult and juvenile DM subgroups (n=21/n=17) are separated by PGA score: PGA <5 (no to moderate disease activity) and PGA ≥5 (moderate to severe disease activity). Horizontal bars show median values; asterisks (*) represent significant results (p<0.05). The 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

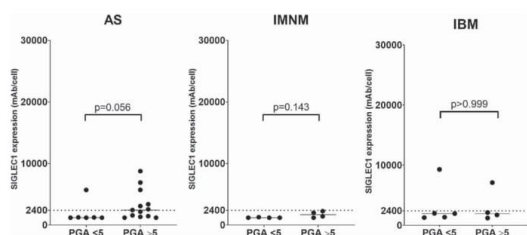


Figure 3 SIGLEC1 expression versus disease activity in AS, IMNM and IBM subgroups, separated by PGA score: PGA <5 (no to moderate disease activity) and PGA ≥5 (moderate to severe disease activity). Horizontal bars show median values. The Mann-Whitney U test was used to compare groups. AS, antisynthetase syndrome; IBM, inclusion body myositis; IMNM, immune-mediated necrotising myopathy; PGA, Physician Global Assessment; SIGLEC1, sialic acid binding I-g-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, 45}—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.

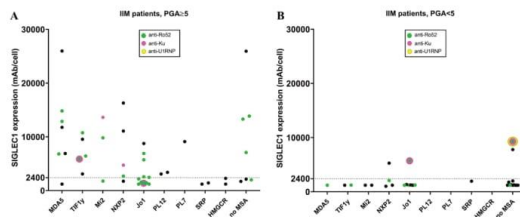


Figure 4 SIGLEC1 expression and autoantibody status. SIGLEC1 expression of all IIM patients (n=74) at first visit. Each group represents patients with a positivity for the respective myositis-specific autoantibody (MSA) and (A) PGA ≥ 5 (moderate to severe disease activity) and (B) PGA < 5 (no to moderate disease activity); if present, additional myositis associated antibodies (MAA) are marked by different colours and no MAA is resembled by black. IIM, idiopathic inflammatory myopathies; PGA, Physician Global Assessment; SIGLEC1, sialic acid binding Ig-like lectin 1.

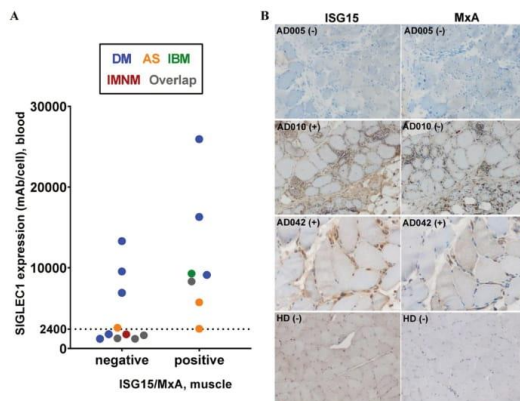


Figure 5 Immunohistochemical staining of type I interferon-inducible proteins (ISG15/MxA) in muscle tissue (A) comparison of SIGLEC1 expression in blood with negative or positive ISG15 and/or MxA status in immunohistochemical muscle biopsy staining (n=17). Colours represent patients with the specified subgroups of IIM and overlap (see legend box). (B) ISG15 and MxA status of three patients and one healthy donor (HD) are shown. Patient AD005 (adult DM, SIGLEC1 in blood 13301 mAb/cell) had negative (-) stains. Patient AD010 (adult IBM, SIGLEC1 in blood 9281 mAb/cell) stained clearly positive (+) for MxA on capillaries and macrophages; regarding the ISG15 status, some macrophages were positive, but myofibers were not. Patient AD042 (adult DM, SIGLEC1 in blood 16295 mAb/cell) was ISG15-positive (more densely stained on sarcolemma than on sarcoplasm) and MxA-positive. AS, antisynthetase syndrome; DM, dermatomyositis; IBM, inclusion body myositis; IMNM, immune-mediated necrotising myopathy; IIM, idiopathic inflammatory myopathies; SIGLEC1, sialic acid binding Ig-like lectin 1.

We did not find evidence of an upregulation of SIGLEC1 expression in immune-mediated necrotising myopathy, which is in line with other current studies analysing type I interferon-regulated transcripts (in muscle).⁴⁰

Few studies have explored differences in interferon signatures in blood according to myositis-specific autoantibody status.⁴⁷ We found the highest SIGLEC1 expression in anti-MDA5⁺ dermatomyositis patients, but could not detect a specific association of SIGLEC1 to certain myositis-specific autoantibodies in dermatomyositis otherwise. Our findings underline, that the autoantibody status alone is not predictive for the detection of a type I interferon activation. Thus, the assessment of myositis-specific autoantibodies in conjunction with the assessment of type I interferon activity might be useful for patient stratification.

The current study has strengths and limitations. A strength is that we could demonstrate that SIGLEC1, as an implemented routine biomarker, was able to validate findings from other studies investigating type I interferon signature with the advantage of being easily assessable by flow cytometry. A limitation is that muscle strength scores equivalent to the CMAS were not available for adult patients. Second, the PGA was performed retrospectively in most cases, which has to be considered when interpreting the data. Since the missing scores were determined by two experienced rheumatologists with access to all clinical data for each visit but blinded to SIGLEC1 expression, we hope that we could reduce a potential bias. Third, although we could show that a clinical meaningful response to therapy was associated with a decrease in SIGLEC1 expression, the clinical benefit of measuring type I interferon biomarkers still needs to be proven by subsequent prospective studies. Another limitation of the study was the low number of patients in the subanalysis of autoantibodies. This problem can only be solved by multicentre collaborations.

In conclusion, analysis of SIGLEC1 expression by flow cytometry enables the individual assessment of type I interferon activity in idiopathic inflammatory myopathies. Present and published data on SIGLEC1 expression in patients with interferon-associated rheumatic and musculoskeletal diseases, interferonopathies and viral infections confirm that SIGLEC1 is an easy-to-use type I interferon biomarker and demonstrate its potential for patient stratification, disease activity monitoring and assessment of treatment response in routine clinical practice.

Author affiliations

¹Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Germany

²Department of Pediatric Pneumology, Immunology and Critical Care Medicine and SPZ (Center for Chronically Sick Children), Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Germany

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 @kruschemartin

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>

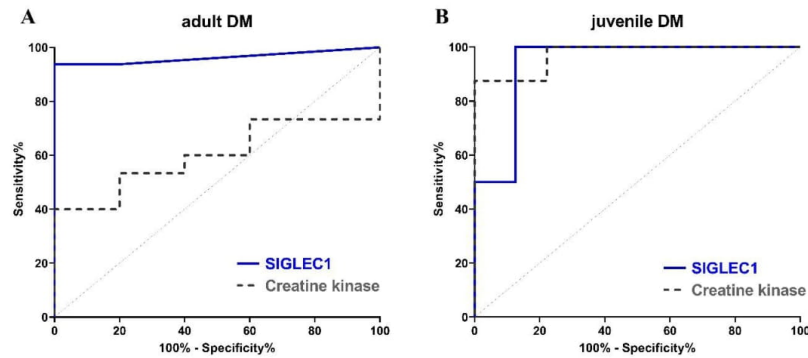
Thomas Rose <http://orcid.org/0000-0003-3628-1775>

REFERENCES

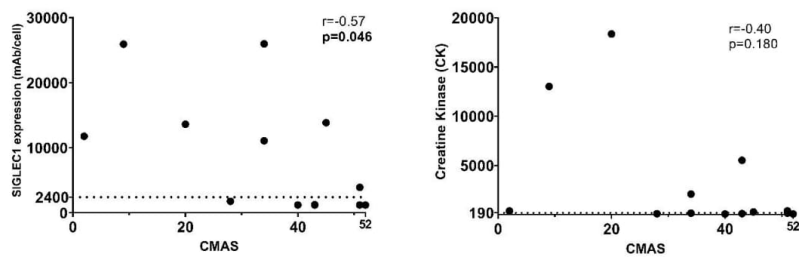
- Lundberg IE, Tjärnlund A, Bottai M, et al. 2017 European League against Rheumatism/American College of rheumatology classification criteria for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies and their major subgroups. *Ann Rheum Dis* 2017;76:1955–64.
- Allenbach Y, Benveniste O, Goebel H-H, 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, Chazaud 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, Slattey 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 Proteomics* 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, Szelenksi 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, Höflich 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.

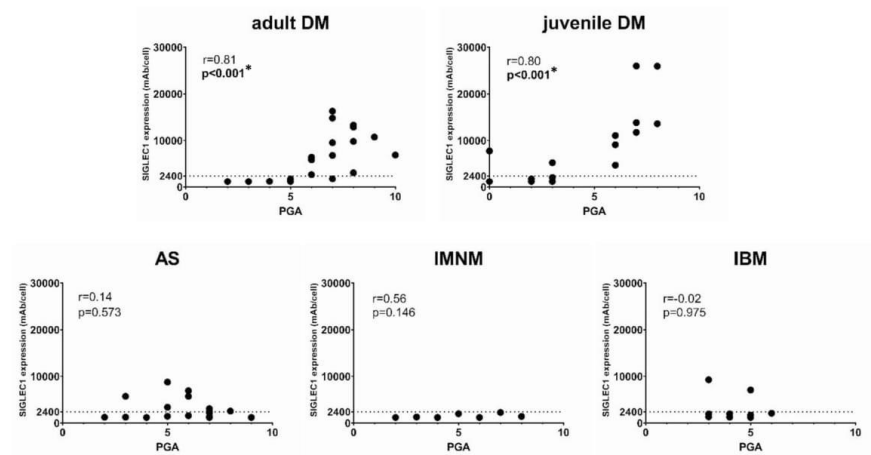
Supplemental material



eFigure S1 Receiver operating characteristic curves for SIGLEC1 and creatine kinase in dermatomyositis (DM) patients. The curves show the ability of each biomarker to distinguish between patients with $\text{PGA} \geq 5$ (moderate to severe disease activity) and $\text{PGA} < 5$ (no to moderate disease activity), in (A) adult DM patients ($n=21$); SIGLEC1: $\text{AUC}=0.96$, $p=0.002$; creatine kinase: $\text{AUC}=0.60$, $p=0.513$ and (B) juvenile DM patients ($n=17$); SIGLEC1: $\text{AUC}=0.97$, $p=0.001$; creatine kinase: $\text{AUC}=0.94$, $p=0.003$



eFigure S2 Correlation between biomarkers and muscle strength scores (CMAS) in juvenile dermatomyositis patients at assessment visit 1 (VC1) (A) SIGLEC1 versus CMAS ($n=13$) and (B) creatine kinase versus CMAS ($n=13$); Asterisks (*) represent significant results ($p < 0.05$). Spearman's rank test was used for both analyses; VC1, first visit with assessment of SIGLEC1 and CMAS

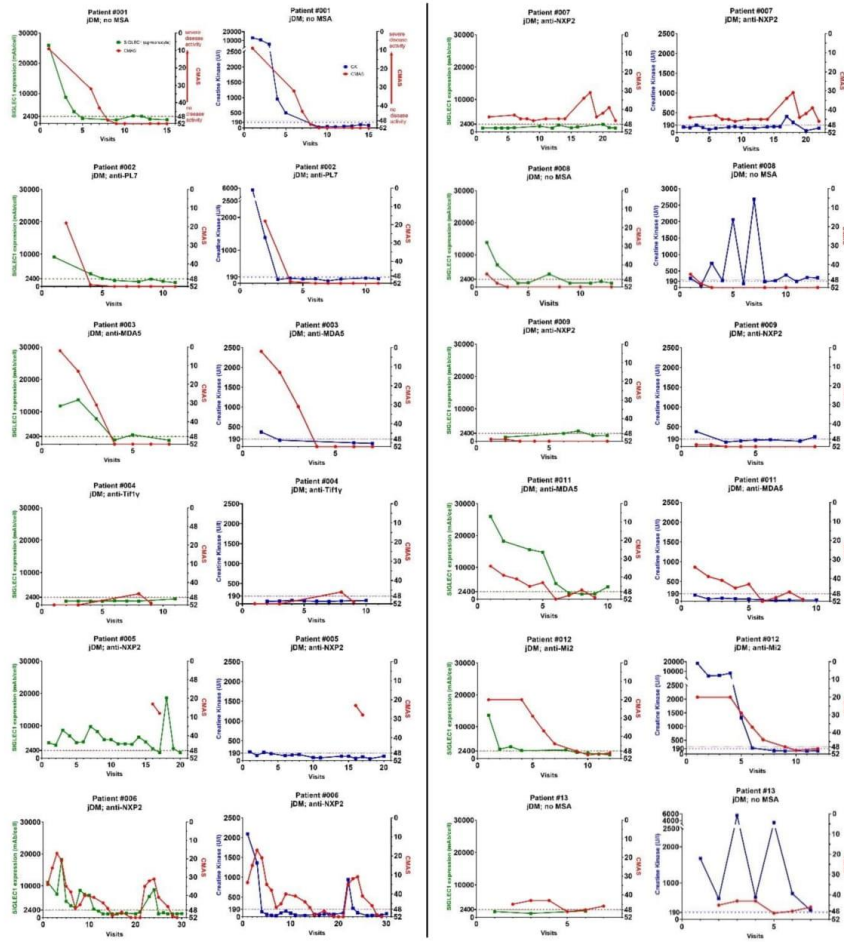


eFigure S3 Correlation between SIGLEC1 expression on monocytes and Physician Global Assessment (PGA) at first visit for the various IIM subgroups. Asterisks (*) represent significant results ($p<0.05$). Spearman's rank test was used for all analyses.

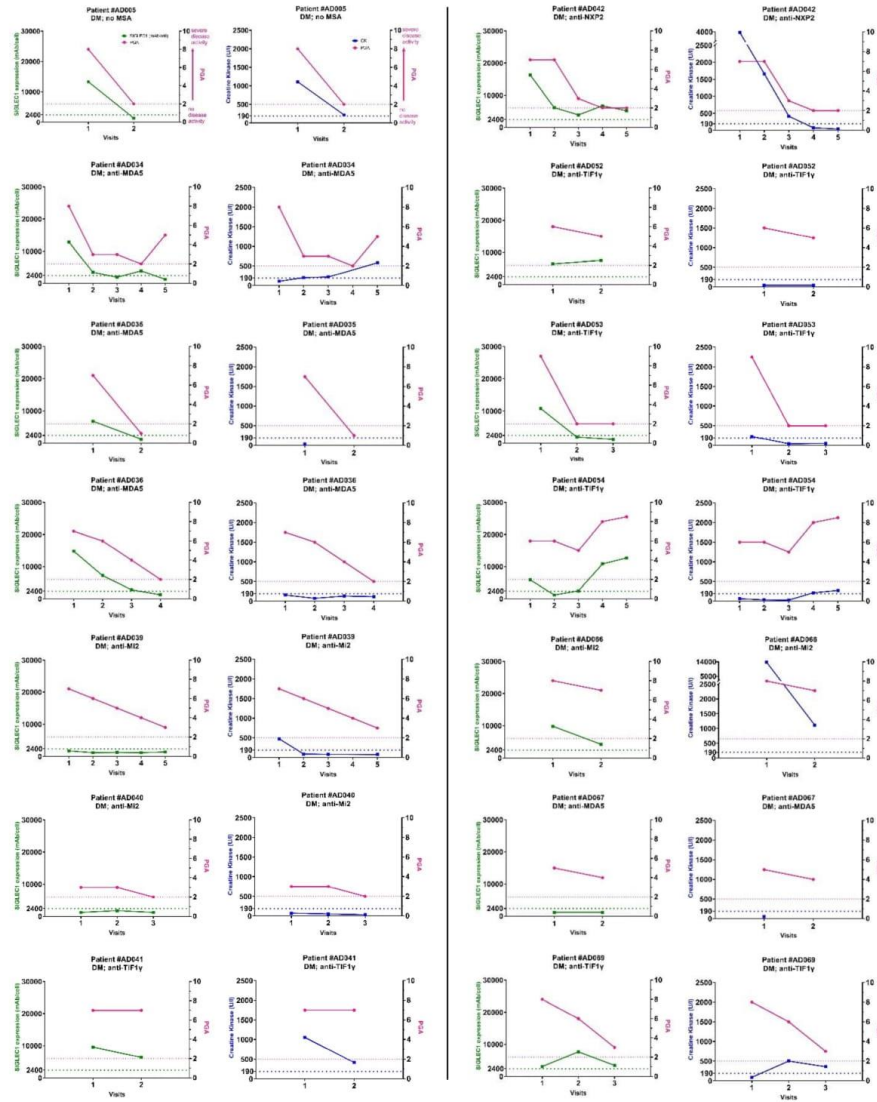
Patient ID	Clinical diagnosis	Myositis-specific antibodies (MSA)	Myositis-associated antibodies (MAA)	SIGLEC1, mAb/cell (blood)	MxA status (muscle)	ISG15 status (muscle)
AD029	AS	Jo1	Ro52	5721	0	1
AD031	AS	Jo1	Ro52	2568	0	0
AD030	AS	Jo1	Ro52, PM-Scl100	2449	0	1
AD039	DM (adult)	Mi2	Ro52	1769	0	0
AD042	DM (adult)	NXP2	-	16295	1	1
AD005	DM (adult)	-	Ro52	13301	0	0
AD041	DM (adult)	TIF1 γ	-	9545	0	0

AD067	DM (adult)	MDA5	PM-Sc1100	1200	0	0
AD065	DM (adult)	MDA5	-	6901	0	0
PAE002	DM (juvenile)	PL7	-	9114	0	1
PAE001	DM (juvenile)	-	-	25931	1	1
AD010	IBM	-	Ro52, U1RNP	Ku, 9281	1	0
AD004	Overlap	-	Ku	8305	0	1
AD072	IMNM	HMGCR	-	1752	0	0
AD008	Overlap	-	Ro52, Ku, PM-Sc175, PM-Sc1100	1645	0	0
AD047	Overlap	SRP	-	1260	0	0
AD064	Overlap	-	Ku	1200	0	0

eTable S1 Subgroup analysis of SIGLEC1 expression (in blood) versus MxA and ISG15 status (in immunohistochemical muscle biopsy stains) (n=17). MxA/ISG15 status: 0 = negative, 1 = positive



eFigure S4 Longitudinal graphs of SIGLEC1 vs. CMAS and creatine kinase vs. CMAS for all juvenile DM patients with at least two visits; PGA, Physician Global Assessment; CMAS, Childhood Myositis Assessment Scale



eFigure S5 Longitudinal graphs of SIGLEC1 vs. PGA and creatine kinase vs. PGA for all adult DM patients with at least two visits; PGA, Physician Global Assessment; CMAS, Childhood Myositis Assessment Scale

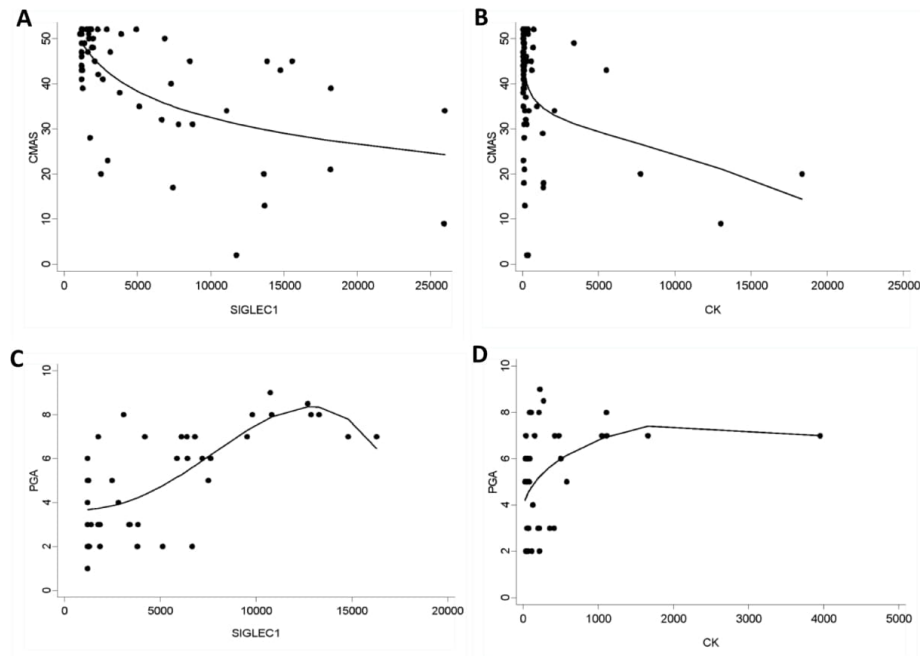
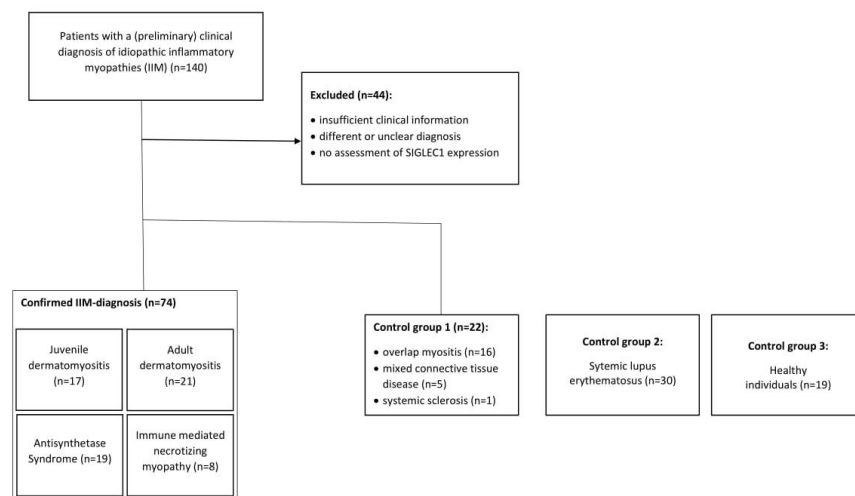


Figure S6 Visualization of the results of longitudinal data analysis (see Table 2) of A) SIGLEC1 vs. CMAS for juvenile DM patients (absolute values); B) Creatine kinase (CK) vs. CMAS for juvenile DM patients (absolute values); C) SIGLEC1 vs. PGA for adult DM patients (absolute values); D) Creatine kinase (CK) vs. PGA for adult DM patients (absolute values)

eText S1: Laboratory measurement of SIGLEC1

SIGLEC1 expression was determined by flow cytometry using a highly standardized quantitative assay. Briefly, 25µl of EDTA-anticoagulated whole blood was incubated with 10 µl of mouse-anti-human antibody cocktail containing phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD169 monoclonal antibody (mAb) (labeled at a fluorochrome/protein ratio of 1:1), allophycocyanin (APC)-labeled anti-CD14 mAb and KromeOrange-labeled anti-CD45 mAb for 15 min at room temperature (RT) in the dark (all antibodies from Beckman Coulter, Krefeld, Germany). Red blood cells were then lysed by adding 500µl of Versa-Lysis solution (Beckman Coulter) to each reaction tube. After incubation for 30 min at RT in the dark,

samples were centrifuged for 5 min at 200 x g at RT. Samples were then washed once with 1000 μ l PBS containing 2% fetal calf serum (FCS) and centrifuged again for 5 min at 200 x g at RT. Stained samples were acquired on a 10-color flow cytometer (Navios, Beckman Coulter) and analyzed using the Navios software. During each analytical run, QuantiBRITE™ PE tubes (BD Biosciences) were acquired 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 for PE molecules (as specified by the manufacturer) for each QuantiBRITE™ bead population were used to perform linear least square regression analysis to determine the best calibration value, which then was used to convert the FL2 MFI values of monocytes in the analytical sample to the amount of PE-labeled CD169 mAb bound per monocyte (mAb/cell).



eFigure S7 Flow diagram of study participants

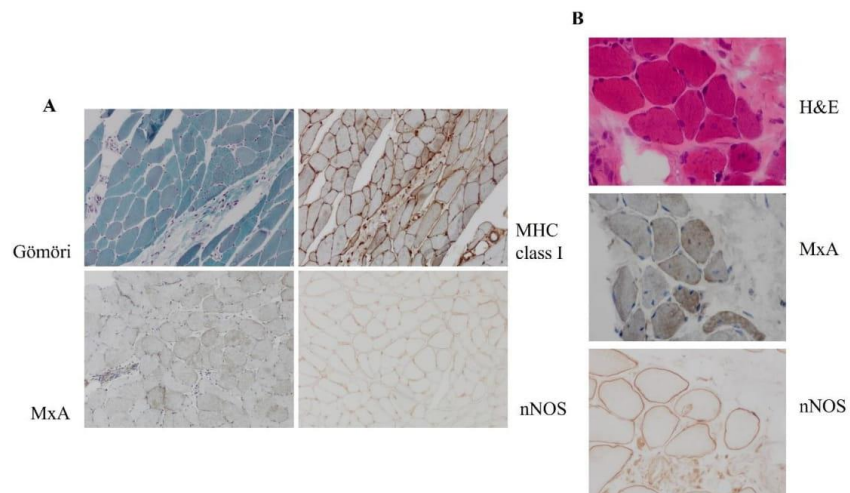


Figure S8 A-B Negative control stainings with an irrelevant antibody for MxA: As a negative control we used the species specific antibody (rabbit polyclonal) nNOS (neuronal nitric oxide synthase) at the same dilution (1:100). This is an antibody that we use in every muscle biopsy work-up to demonstrate integrity of the sarcolemma or lack of staining in e.g. denervation processes. The macrophages, endothelial cells and the sarcoplasm are not stained by nNOS. nNOS can similarly be used as a negative control with the species specific antibody (rabbit polyclonal) for ISG15 at a dilution 1:50.

Lebenslauf

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

Komplette Publikationsliste

Original article:

Graf M, von Stuckrad SL, Uruha A, Klotsche J, Zorn-Pauly L, Unterwalder N, Buttgerit T, Krusche M, Meisel C, Burmester GR, Hiepe F, Biesen R, Kallinich T, Stenzel W, Schneider U, Rose T. SIGLEC1 enables straightforward assessment of type I interferon activity in idiopathic inflammatory myopathies. RMD Open. Februar 2022;8(1):e001934.

Scientific Abstract/Poster:

Graf M, Von Stuckrad ASL, Uruha A, Klotsche J, Zorn-Pauly L, Unterwalder N, Buttgerit T, Krusche M, Meisel C, Burmester GR, Hiepe F, Biesen R, Kallinich T, Stenzel W, Schneider U, Rose T. POS0183 SIGLEC1 AS A TYPE I INTERFERON BIOMARKER IN IDIOPATHIC INFLAMMATORY MYOPATHIES. Ann Rheum Dis. 1. Juni 2021;80(Suppl 1):305.

Danksagung

Die Danksagung wird in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.