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

DISSERTATION

„Analyse der diagnostischen Wertigkeit krankheitsspezifischer Antikörper bei Patienten mit systemischer Sklerose“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Hanke
aus Strausberg

Gutachter: 1. PD Dr. med. G. Riemekasten

2. Prof. Dr. med. M. Worms

3. Prof. Dr. med. C. Sunderkötter

Datum der Promotion: 31.08.2009

Gewidmet

meinen Eltern,

Christine und Peter Hanke,

&

meinem Freund, Tobias Weinert.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis ____ *IV*

Abkürzungsverzeichnis ____ *VII*

1. Einleitung ____ *1*

1.1 Motivation ____ **1**

1.2 Immunsystem, Autoimmunität und Autoantikörper ____ **2**

1.3 Untersuchte Antikörper ____ **4**

1.3.1 Anti-Topoisomerase I-Antikörper ____ 4

1.3.2 Anti-Centromer-Antikörper (ACA) ____ 4

1.3.3 Anti-Pm/Scl-Antikörper ____ 5

1.3.4 Anti-Ku-Antikörper ____ 5

1.3.5 Anti-Th/To-Antikörper ____ 6

1.4 Rheumatische Erkrankungen ____ **7**

1.4.1 Der Rheumatische Formenkreis ____ 7

1.4.2 Die Systemische Sklerose ____ 8

1.5 Zielstellung ____ **17**

2. Material und Methoden ____ *18*

2.1 Patientenkohorte ____ **18**

2.1.1 Assessment der Kohorte ____ 18

2.1.2 Verlaufskontrolle ____ 19

2.1.3 Klinische Parameter ____ 19

2.1.4 Kontrollgruppen ____ 20

2.1.5 Ethikvotum ____ 20

2.2 Grundlagen der Kohortencharakterisierung ____ **21**

2.2.1 Gruppierung der Patienten nach DNSS ____ 21

2.2.2 Beurteilung der dermalen Manifestationen ____ 21

2.2.3 Beurteilung der kardialen Manifestationen ____ 22

2.2.4 Beurteilung der pulmonalen Manifestationen ____ 22

2.2.5 Beurteilung der renalen Manifestationen ____ 22

2.2.6 Beurteilung der Krankheitsaktivität ____ 23

2.3 Grundlagen des Antikörpernachweises ____ **24**

2.3.1 Testmethoden und Durchführung 24
2.3.2 Line-Immunoblot-Assay (LIA) 24
2.3.3 Enzym-Linked-Immunoadsorbent-Assay (ELISA) 26
2.3.4 Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT) 26

2.4 Grundlagen der statistischen Analyse 29

2.4.1 Werkzeuge 29
2.4.2 Definitionen und Methodik 29
2.4.3 Testverfahren 30

2.5 Grundlagen der Literaturrecherche 33

2.5.1 Quellen 33
2.5.2 Methodik 33

3. Ergebnisse 34

3.1 Analyse der Kohorte 34

3.1.1 Analyse der SSc-Gruppen 34
3.1.2 Familienbeteiligung, Alters- und Geschlechtsverteilung 35
3.1.3 Analyse der Krankheitsverläufe 36

3.2 Analyse der Antikörperprävalenz 40

3.2.1 Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT) 40
3.2.2 Line Immunoblot Assay (LIA) 41
3.2.3 Enzym-Linked-Immunoabsorbent-Assay (ELISA) 43
3.2.4 Vergleich ELISA und LIA 44
3.2.5 Vergleich IFT und LIA 45
3.2.5 Zusammenfassung 46

3.3 Analyse der Antikörperassoziation mit klinischen Merkmalen 47

3.3.1 Anti-Topoisomerase I-Antikörper 47
3.3.2 Anti-Pm/Scl-Antikörper 53
3.3.3 Anti-CENP-A- und Anti-CENP-B-Antikörper 60
3.3.4 Weitere Antikörper 66
3.3.5 Antikörper-negative Patienten 69

3.4 Analyse von Antikörperprofilen 71

4. Diskussion 73

4.1 Literaturvergleich der Kohorte 73

4.2 Vergleich der Antikörper-Prävalenzen 77

4.2.1 Anti-Topoisomerase I-Antikörper 79

4.2.2 Anti-Pm/Scl-Antikörper 80
4.2.3 Anti-Cenp-A- und Anti-Cenp-B-Antikörper 82
4.2.4 Weitere Antikörper 83
4.2.6 Antikörper-negative Patienten 84

4.3 Methodenvergleich 86

4.4 Was bringt der neue Assay dem Kliniker? 88

4.5 Fazit und Ausblick 89

5. Zusammenfassung 90

Literaturverzeichnis 93

Eidesstattliche Erklärung IX

Danksagung X

Lebenslauf XI

Publikationsliste XII

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACA	Anti-Centromer-Antikörper
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACR	American College of Rheumatology
AK	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
ANoA	Antinukleoläre Antikörper
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BE	Blutentnahme
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CENP A-G	Zentromerprotein A-G
CK	Creatinkinase
CMV	Cytomegalievirus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNSS	Deutsches Netzwerk für Systemische Sklerose
dSSc/dcSSc	Diffuse Verlaufsform der systemischen Sklerose
ED	Erstdiagnose
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EKG	Elektrokardiogramm
EUSTAR	European Scleroderma Trial and Research group database
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HLA	Human leukocyte antigens
IgG (-M, -A)	Immunglobulin G (-M, -A)
IL-1	Interleukin-1
LIA	Line-Immunoblot Assay
lSSc/lcSSc	Limitierte Verlaufsform der systemischen Sklerose
LuFu	Lungenfunktion
MRP/RNAse P	Mitochondrialer RNA prozessierender Ribonuklease/Ribonuklease P-Komplex
MRSS	Modified Rodnan Skin Score
NO	Stickstoffmonoxid

PAH	Pulmonale arterielle Hypertonie
PDGF	Platelet-derived growth factor
RA	Rheumatoide Arthritis
SD	Standardabweichung
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SS	Sjögren-Syndrom
SSc	Systemische Sklerose
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Units
UCTD	Undifferentiated connective tissue diseases

1. EINLEITUNG

1.1 MOTIVATION

Die systemische Sklerose (SSc) ist eine sehr seltene chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, deren Krankheitsausprägung von mild und wenig lebensqualitätsbeeinträchtigend bis hin zu sehr ernsten, lebensbedrohlichen Verläufen reichen kann. Die Pathogenese ist bis heute noch nicht vollständig bekannt. Es können jedoch bei mehr als 95% aller Patienten mit systemischer Sklerose Autoantikörper gegen körpereigene Strukturen im Blut nachgewiesen werden [1]. Inwieweit dieses Phänomen mit der Pathogenese der Erkrankung verknüpft ist, wird kontrovers diskutiert. Es zeigt sich aber, dass einige Antikörper mit bestimmten Phänotypen der systemischen Sklerose beziehungsweise mit bestimmten klinischen Manifestationen assoziiert sind. Die Bestimmung der Autoantikörper aus dem Blut kann daher helfen, Patienten mit erhöhtem Risiko für das Auftreten von bestimmten Krankheitsausprägungen und –verläufen zu identifizieren [2].

In dieser Arbeit soll die diagnostische Wertigkeit bestimmter Antikörper und deren Assoziationen zu klinischen Merkmalen in der SSc-Kohorte der Charite, Berlin, untersucht werden. Einbezogen in diese Analysen werden die Antikörper gegen die DNA-Topoisomerase I, die Zentromer-Proteine A und B, das Ku-Protein sowie Antikörper gegen Pm/Scl-75 und -100, hpop1 und rpp38. Die Bestimmung der Antikörper erfolgt dafür mit verschiedenen Nachweismethoden. Dabei sollen unter anderem auch die Ergebnisse eines neu entwickelten Line-Immunoblot-Assays im klinischen Zusammenhang betrachtet werden.

1.2 Immunsystem, Autoimmunität und Autoantikörper

Um die Entstehung und Bedeutung von chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen und die Bedeutung der Autoantikörperdiagnostik zu verstehen, ist ein Grundverständnis des menschlichen Immunsystems hilfreich.

Das Immunsystem der höheren Lebewesen wird in die humoral vermittelte Immunität und die zellulär vermittelte Immunität eingeteilt. Die zelluläre Immunität wird durch die T-Lymphozyten und Phagozyten realisiert. Die humorale Immunität wird durch das Komplementsystem und Antikörper (Immunglobuline) vermittelt, welche von Plasmazellen, die aus B-Lymphozyten entstehen, sezerniert werden. Antikörper sind heterodimere Proteine, welche aus zwei schweren und zwei leichten Ketten bestehen. Jede Kette lässt sich in eine konstante und eine variable Region einteilen. Dabei hat der konstante Teil Effektorfunktion, während der durch Genarrangements, somatische Mutationen und andere Mechanismen variable Teil der Kette die Spezifität zur Bindung verschiedener Oberflächenstrukturen, den sogenannten Antigenen, vermittelt. Das bedeutet, dass ein Antikörper eine bestimmte Oberflächenstruktur erkennen und diese binden kann (Antigen-Antikörperkonzept).

Eine wichtige Funktion des Immunsystems ist die Erkennung von „körpereigen“ und „körperfremd“. Ist diese Unterscheidungsfunktion gestört, so können die auf „Autoaggression“ des Immunsystems zurückzuführenden Autoimmunerkrankungen entstehen, bei denen es zu einer pathologischen Reaktion des Immunsystems gegen körpereigenes Gewebe kommt. Zur Entstehung solcher Erkrankungen tragen verschiedene Faktoren bei, wie zum Beispiel das Vorhandensein einer genetischen Disposition, einschließlich des Vorkommens bestimmter HLA-Allele (human leukocyte antigens), welche maßgeblich an der Erkennung von Selbst- und Fremdproteinen beteiligt sind. Gleichzeitig haben bestimmte Umweltfaktoren wie Infektionen, hormonelle Veränderungen oder Stress einen Einfluss [3, 4]. Dabei kann das Vorhandensein von bestimmten Bakterien, deren Oberflächenstrukturen ähnlich derer des menschlichen Organismus sind, dazu führen, dass Antikörper gebildet werden, die nicht nur das Bakterienantigen erkennen, sondern auch kreuzreaktiv an körpereigenes Gewebe binden. Ein Beispiel für diesen Mechanismus ist die Karditis nach Streptokokkeninfektion (Rheumatisches Fieber). Dabei weisen das Kapselprotein M der Streptokokken und das Sarkolemm der Herzmuskelzellen eine ähnliche Oberflächenflächenstruktur auf, so dass die Kapselantigene der Streptokokken kreuzreagierende Antikörper gegen das Herzgewebe induzieren können, welche das Herzgewebe angreifen und eine Autoimmunreaktion hervorrufen [5]. Antikörper, welche gegen körpereigenes Gewebe gerichtet sind, werden auch als Autoantikörper bezeichnet. Als Antigene konnten

Proteine, Glykoproteine, Nukleinsäuren, Phospholipide und Glykosphingolipide identifiziert werden. Autoantikörper können durch spezifischen Antigenkontakt induziert werden (= pathologische Autoantikörper) oder aber ohne derartige Induktion im natürlichen Repertoire vorliegen (= natürliche Autoantikörper). Während natürliche Autoantikörper eher eine physiologische Rolle z.B. bei der Immunregulation und dem Abbau von abgestorbenen Zellen spielen, können pathologische Autoantikörper pathogenetisch wirksam sein, z.B. durch Blockierung von Rezeptoren, und damit die sogenannten Autoimmunerkrankungen hervorrufen [6]. Nicht bei allen der pathologisch vorkommenden Autoantikörper konnte eine pathogenetische Funktion bislang identifiziert werden, doch kommt einer Vielzahl der Antikörper eine klinische Bedeutung durch ihr spezifisches Vorkommen bei bestimmten Erkrankungen zu. Viele der bislang bekannten Autoantikörper können bei der Diagnostik von Autoimmunerkrankungen hilfreich sein.

Autoantikörper können nach ihren jeweiligen antigenen, zellulären Zielstrukturen unterteilt werden. Gegen Zellkernbestandteile gerichtete Antikörper werden als antinukleäre Antikörper (ANA) bezeichnet. Zu ihnen gehören zum Beispiel Antikörper gegen Doppelstrang-DNA (dsDNA-AK), Antikörper gegen Proteine der Zentromerregion (Anti-CENP-A und -B-AK), Antikörper gegen verschiedene Enzyme des Zellkerns (z.B. Anti-Topoisomerase I-AK) oder aber auch gegen den Nukleolus (Kernkörperchen), zu welchem der Exosomenkomplex gehört und die entsprechenden dagegen gerichteten Anti-Pm/Scl-AK.

1.3 Untersuchte Antikörper

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, die diagnostische Wertigkeit von 8 verschiedenen Autoantikörpern für die systemische Sklerose zu evaluieren. Im folgenden Abschnitt werden die in dieser Arbeit untersuchten Antikörper sowie bereits veröffentlichte Kenntnisse zum Thema vorgestellt.

1.3.1 Anti-Topoisomerase I-Antikörper

Anti-Topoisomerase I-Antikörper (Anti-topo I-AK; Synonym – Scl70-Antikörper) haben bei Patienten mit systemischer Sklerose eine Prävalenz von 9-30%. Sie sind mit weniger als 10% bei der limitierten Form und mit bis zu 70% bei der diffusen Form nachzuweisen. Die Spezifität für die systemische Sklerose wird mit bis zu 99% angegeben [2]. Erstmals wurde dieser Antikörper 1979 als präzipitierender Antikörper gegen eine Komponente des Kalbsthymus bei Patienten mit systemischer Sklerose entdeckt [7]. Als Zielantigen wurde die 70 kD Untereinheit der DNA-Topoisomerase I identifiziert, welche den Bruch und die Wiedervereinigung von Einzelstrang-DNA katalysiert. Die dabei entstehende Relaxation der DNA ist unter anderem Grundvoraussetzung für DNA-Replikation, -Transkription und -Reparatur [8-11].

In der Literatur werden Assoziationen der Anti-Topoisomerase I-Antikörper mit diffuser Sklerosierung, Lungen- und Herzbeteiligung [12] angegeben. Hu et al. stellten Assoziationen zur Hautbeteiligung und dem Hautfibrosierungsgrad sowie der Krankheitsaktivität fest [13]. Darüberhinaus scheint das Vorhandensein von Anti-Topoisomerase I-Antikörpern auf eine schwere Verlaufsform und erhöhte Mortalität hinzuweisen [2, 14-16].

1.3.2 Anti-Centromer-Antikörper (ACA)

Anti-Centromer-Antikörper wurden erstmals 1980 von Moroi et al. beschrieben [17]. Die Zentromerregion der Zelle bezeichnet dabei den Bereich der primären Einschnürung der Metaphase-Chromosomen vor der Teilung. Mittlerweile wurden Antikörper gegen die einzelnen Komponenten der Zentromerregion beschrieben. Als Zielantigene wurden die Zentromerproteine CENP-A (17kD), CENP-B (80kD), CENP-C (140kD), CENP-D (50kD), CENP-E (312kD), CENP-F (400kD) und CENP-G (95kD) identifiziert [18-20]. Im klinischen Alltag wird den Antikörpern gegen das Zentromerprotein B (Anti-CENP-B-AK) die größte Bedeutung für die systemische Sklerose zugeschrieben. Die Häufigkeit des Anti-CENP-B-Antikörper wird in der

Literatur mit 20-30% der SSc-Patienten angegeben, wobei sie überwiegend bei Patienten mit Merkmalen der limitierten systemischen Sklerose vorkommen [2, 21, 22]. Das Vorhandensein von ACA ist in den Untersuchungen von Weiner et al. mit einer günstigeren Prognose und verringerten Krankheitsaktivität assoziiert, weiterhin haben die Patienten in dieser Studie auch eine signifikant verringerte Beteiligung des Bewegungsapparates [12]. Die Assoziation des Vorkommens von ACA mit dem gehäuften Auftreten der pulmonalen arteriellen Hypertonie wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. Während in den Betrachtungen von Walker et al. von einer positiven Assoziation ausgegangen wird, finden Steen et al. keinen Zusammenhang [2, 23].

1.3.3 Anti-Pm/Scl-Antikörper

Anti-Pm/Scl-Antikörper sind Antikörper gegen Untereinheiten des Exosomenkomplexes des Kernkörperchens (antinukleoläre Antikörper – AnoA). Erstmals wurden sie 1984 von Reichlin et al. bei Patienten mit Polymyositis und systemischer Sklerose beschrieben [24]. Bislang können Autoantikörper gegen die 75 kD und die 100 kD Untereinheiten des Exosomenkomplexes nachgewiesen werden. Die meisten kommerziellen Testsysteme benutzen als Antigen allerdings das rekombinante Pm/Scl-100 [25], auch wenn neueste Studien eine wichtige diagnostische Rolle der Anti-Pm/Scl-75-Antikörper vermuten lassen, besonders wenn die Hauptisoform Pm/Scl-75c als Antigen benutzt wird [26]. Die verschiedenen Proteine des Exosomenkomplexes fungieren als Exoribonukleasen und sind unter anderem für die Prozession der ribosomalen RNA und den Abbau der Messenger-RNA verantwortlich. Das Vorhandensein von Anti-Pm/Scl-Antikörpern ist charakteristisch bei Patienten mit Polymyositis (Pm), Dermatomyositis, systemischer Sklerose und ihren Überlappungen. Mahler bzw. Raijmakers et al. fanden Anti-Pm/Scl-Antikörper bei etwa 24% bzw. 28% der Patienten mit Polymyositis/Systemische Sklerose-Overlap-Syndrom [25, 26]. Bei Patienten mit systemischer Sklerose ohne polymyositische Komponente wird die Prävalenz hingegen mit 3% angegeben [2].

1.3.4 Anti-Ku-Antikörper

Anti-Ku-Antikörper gegen das Ku-Protein wurden erstmals 1981 bei Patienten mit kombinierter Polymyositis und systemische Sklerose gefunden [27]. Als Antigen wurde ein nukleäres aus einer 70 kD und einer 80 kD Untereinheit bestehendes Heterodimer einer DNA-Proteinkinase identifiziert, welche sich selektiv an Doppelstrang-DNA bindet und unter anderem eine Rolle bei

der DNA-Reparatur, Regulierung der DNA-Transkription und Gen-Rekombination spielt [27, 28].

Die allgemeine Häufigkeit von Anti-Ku-Antikörpern wird mit 1-14% angegeben, wobei die Prävalenz in der asiatischen Bevölkerung höher als in der kaukasischen erscheint [2, 29]. Rozman et al. fanden in verschiedenen europäischen Kohorten eine Prävalenz von 0-7% bei Patienten mit systemischer Sklerose. Sie fanden darüber hinaus eine Assoziation mit der limitierten systemischen Sklerose und gehäufter muskuloskelettaler Beteiligung, vor allem einer myositischen Komponente [30].

1.3.5 Anti-Th/To-Antikörper

Anti-Th/To-Antikörper sind Antikörper gegen die RNase MRP- und RNase P-Komplexe. Beide Enzymkomplexe fungieren als spezifische Endonukleasen, bei der Prozessierung der mitochondrialen RNA (RNase MRP) beziehungsweise der Transfer-RNA (RNase P). Beide RNase-Komplexe haben eine ähnliche Sekundärstruktur. Darüberhinaus wurden folgende gemeinsame Untereinheiten beschrieben: hpop1, hpop5, hpop14, Rpp14, Rpp20, Rpp21, Rpp25, Rpp29/hpop4, Rpp30, Rpp38 und Rpp40 [31]. Gegen diese Komponenten der RNase-Komplexe wurden in humanen Seren vorkommende Autoantikörper beschrieben. In dieser Forschungsarbeit wurden die Antikörper Anti-hpop1 und Anti-rpp38 in die Untersuchung mit einbezogen. Die Häufigkeitsangaben der Antikörper schwanken in der Literatur bei Patienten mit SSc oder SSc-assoziierten Erkrankungen zwischen 2 und 5% [2, 32]. Angaben über die Bedeutung dieser Antikörper bezüglich vorkommender Assoziationen mit klinischen Manifestationen konnten in der Literatur keine gefunden werden.

Antikörper	Häufigkeit	Klinische Assoziationen	Literatur
Anti-Topoisomerase I-AK	9-30%	Diffuse SSc, Lungenbeteiligung, schwerere Verlaufsform und erhöhte Mortalität	[2, 8, 10, 11, 14-16]
Anti-Centromer-AK	20-30%	Limitierte SSc, leichtere Verläufe	[2, 21-23]
Anti-Pm/Scl-AK	3%	Polymyositis/SSc-Overlap-Syndrom	[1, 2, 25, 26]
Anti-Ku-AK	1-14%	Polymyositis/SSc-Overlap-Syndrom, erhöhte muskuloskelettale Beteiligung	[2, 30], [29]
Anti-hpop1- und Anti-Rpp38-Ak	2-5%	Nicht bekannt	[2, 32]

Tabelle 1: Klinische Assoziationen bestimmter Autoantikörper

1.4 Rheumatische Erkrankungen

Wie die oben beschriebenen Assoziationen zeigen, kann die Bestimmung von Autoantikörpern eine wesentliche Rolle für die Diagnostik und Verlaufsbeurteilung von bestimmten Erkrankungen spielen. Dies trifft in besonderem Maße für die rheumatischen Erkrankungen zu, zu denen auch, die in dieser Arbeit betrachtete systemische Sklerose zählt. Der folgende Abschnitt zeigt die Kennzeichen und Besonderheiten dieser Erkrankungsgruppe auf.

1.4.1 Der Rheumatische Formenkreis

Unter dem Oberbegriff „rheumatische Erkrankungen“ versteht man eine Gruppe von Autoimmunerkrankungen mit sehr unterschiedlichem klinischen Erscheinungsbild. Sie werden auch zum sog. „Rheumatischen Formenkreis“ zusammengefasst. Zum rheumatischen Formenkreis zählen über 400 Erkrankungen des Binde- und Stützgewebes, bei denen die Gelenke, Knochen, Sehnen, Bänder, Muskeln und das Bindegewebe betroffen sein können. All diese pathogenetisch und ätiologisch unterschiedlichen Krankheitsbilder haben die chronische Entzündung von Geweben und Strukturen des Körpers als wesentliche Gemeinsamkeit. Häufig sind sie durch chronische Schmerzen und Funktionsstörungen des Bewegungsapparates gekennzeichnet.

Zur Untergruppe der chronisch-entzündlichen rheumatischen Erkrankungen gehören die Kollagenosen, bei denen es hauptsächlich zu Veränderungen des Bindegewebes und der Gefäße kommt. Im Vordergrund stehen häufig eine Beteiligung der Haut oder Schleimhäute. Sie können aber auch durch einen Multiorganbefall in Erscheinung treten. Zu dieser Gruppe von Erkrankungen gehören unter anderem der systemische Lupus erythrematodes (SLE), das Sjögren-Syndrom (SS) und die systemische Sklerose (SSc).

Etwa 25% aller Deutschen leiden in irgendeiner Form an rheumatischen Beschwerden. Mit einer Prävalenz von 2-3% der Bevölkerung in Deutschland gehören die rheumatischen Erkrankungen somit zu den wichtigsten chronischen Erkrankungen [33]. Gemeinsam ist diesen Erkrankungen, dass sie häufig schubförmig mit Phasen von subjektiver und objektiver Remission oder aber chronisch-progredient verlaufen [34] und selten vollständig ausheilen. Die Patientenversorgung geht deshalb mit einem hohen diagnostischen und therapeutischen Aufwand einher.

1.4.2 Die Systemische Sklerose

Die systemische Sklerose (SSc) ist eine systemische Autoimmunerkrankung des kollagenen Bindegewebes mit Verhärtung (Sklerosierung) von Haut, Gefäßen und inneren Organen. Häufig wird als Synonym der Begriff *Sklerodermie* verwendet (Griechisch skleros [„Hart“] und derma [„Haut“]), der als beschreibender Begriff eine Beschränkung der Erkrankung auf eine alleinige Hautbeteiligung suggeriert. In dieser Arbeit wird daher ausschließlich der Begriff *Systemische Sklerose* verwandt.

Die systemische Sklerose ist eine sehr seltene Erkrankung, die weltweit und in allen ethnischen Gruppierungen auftritt. Der Häufigkeitsgipfel der Erkrankung liegt zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr. Die Prävalenz der Erkrankung schwankt in der Literatur zwischen 4-242 Erkrankungen pro 1.000.000 Einwohner, die Inzidenz wird mit 0,6-18,7 pro 1.000.000 Einwohner angegeben [35-38]. Diese Zahlen variieren regional. Die systemische Sklerose ist eher selten in Japan und Nordeuropa und etwas häufiger in Australien und Nordamerika, dort besonders häufig bei den in Oklahoma lebenden Choctaw-Indianern (469-660 pro 100.000 Einwohner) [39]. In allen Regionen sind Frauen deutlich häufiger betroffen als Männer. Durchschnittlich entspricht diese Gynäkotropie einem Verhältnis von etwa 7:1 [40, 41].

1.4.2.1 Klassifikationskriterien des ACR

1980 stellte eine Expertenkommission der American Rheumatology Association (jetzt American College of Rheumatology; ACR) im Rahmen einer großen 29 Zentren-umfassenden Studie in den USA, Kanada und Mexiko mit 797 SSc-Patienten folgende allgemeine Klassifikationskriterien (Tabelle 2) auf, die allerdings nicht der Diagnostik sondern der Vergleichbarkeit und Standardisierung von SSc-Patienten in klinischen Studien dienen sollten.

Hauptkriterium	• Sklerodermie proximal der Metacarpophalangealgelenke
Nebenkriterien	• Sklerodaktylie • Digitale Ulzerationen / Substanzverluste an den Fingern („Rattenbissnekrosen“) • Bibasiläre Lungenfibrose

Tabelle 2: ACR-Klassifikationskriterien der SSc (1980) [42]

Danach gilt die Diagnose „Systemische Sklerose“ als gesichert, wenn mindestens ein Hauptkriterium oder zwei und mehr Nebenkriterien erfüllt sind. In dieser Studie konnte damit die systemische Sklerose mit einer Sensitivität von 97% und einer Spezifität von 98% detektiert werden [42]. Nachteile dieser Klassifikation sind die geringe diagnostische Sensitivität für

Patienten in einem Frühstadium der Erkrankung und für Patienten mit einer limitierten Krankheitsform (lSSc).

1.4.2.2 Klassifikation nach LeRoy und Metzger

Aufgrund der Heterogenität der Ausprägung klinischer Manifestationen erfolgt die Einteilung der systemischen Sklerose in verschiedene Untergruppen. Die in der Klinik gebräuchlichste Klassifikation erstellten LeRoy und Medsger 1988 (weiterentwickelt 2001). Diese Klassifikation teilt die systemische Sklerose nach definierten Diagnosekriterien in drei Untergruppen ein (Tabelle 3). Die Unterteilung erfolgt dabei in eine limitierte Form (lSSc), in eine limitiert cutane Form (lcSSc) und in eine diffus cutane Form (dcSSc) [43, 44].

Untergruppe	Klassifikationskriterien
lSSc	• Raynaud-Phänomen (objektiv gesichert) • SSc-typische Nagel-Kapillariskopie oder SSc-typische Autoantikörper Oder • Raynaud-Phänomen (subjektiv) • SSc-typische Nagel-Kapillariskopie und SSc-typische Autoantikörper
lcSSc	Kriterien für lSSc + Hautveränderungen der distalen Extremitäten
dcSSc	Kriterien für lSSc + Hautveränderungen der proximalen Extremitäten

Tabelle 3: Klassifikation nach LeRoy und Medsger (2001)[43]

Früher häufig gebräuchlich war der Begriff des CREST-Syndroms, welches folgende Symptome zusammenfasst: Calcinosis cutis, Raynaud-Phänomen, Ösophagus-Motilitätsstörungen, Sklerodaktylie, Teleangiektasien. Die nach LeRoy und Medsger definierte Form der limitierten systemischen Sklerose umfasst diese Symptome, wobei diese nicht immer alle simultan vorhanden sein müssen, und hat damit den Begriff weitest gehend abgelöst.

1.4.2.3 Klassifikationsempfehlung nach DNSS

Die Einteilung des Deutschen Netzwerkes für Systemische Sklerose (DNSS) basiert zusätzlich zu den Klassifikationskriterien von LeRoy und Medsger auf einer weiteren Differenzierung in eine undifferenzierte Form der Erkrankung (UCTD), in die systemische Sklerose sine Skleroderma und in Sklerodermie-Overlap-Syndrome. Die von LeRoy und Medsger vorgeschlagenen Unterteilung in eine limitierte SSc und in eine limitiert cutane SSc wird nach den Empfehlungen des DNSS in einer Gruppe unter dem Namen der limitierten SSc zusammengefasst. Die nachfolgende Tabelle 4 gibt einen Überblick über die verschiedenen Untergruppen und die dazugehörigen Klassifikationskriterien.

Untergruppe	Klassifikationskriterien
Limitierte SSc	• Distale Sklerose der Haut bis max. Ellenbogen oder Knie • Sklerose der Gesichtshaut möglich • Raynaud-Phänomen (RP) häufig seit mehreren Jahren • meist ACA positiv
Diffuse SSc	• Sklerose der Haut proximal der Akren (Stamm, Rumpf, Gesicht) • RP meist weniger als ein Jahr bestehend • häufig Anti-topo I-AK positiv
SSc sine Skleroderma	• Raynaud-Phänomen • Beteiligung innerer Organe (Lunge) • SSc-typische Autoantikörper • keine oder nur geringe Hautbeteiligung
Overlap-Syndrome	• SSc (entsprechend der ACR-Kriterien) • weitere nicht organspezifische Autoimmunerkrankung oder Hauptsymptome einer solchen Erkrankung
UCTD	• Raynaud-Phänomen • mindestens ein mit SSc-assoziiertes Symptom und/oder SSc-typische Autoantikörper • ACR-Kriterien nicht vollständig erfüllt

Tabelle 4: Klassifikationsempfehlungen des DNSS

1.4.2.3 Pathogenese

Die Pathogenese der systemischen Sklerose ist nach wie vor nur unzureichend bekannt. Drei Komponenten haben auf die Entstehung einen maßgebenden Einfluss. Dies sind eine Bindegewebsentzündung und -fibrose, Gefäßveränderungen sowie eine überschießende Aktivierung des Immunsystems [45, 46]. Ob die dabei auftretenden Antikörper eine pathogenetische Rolle spielen ist noch unklar [2, 40, 47].

Erste pathologische Veränderungen, die schon vor der manifesten Sklerose der Haut stattfinden, sind Schäden an den Endothelzellen, die Zerstörung der Mikrostruktur der Gefäßwand und die darauffolgende Infiltration mit inflammatorischen Immunzellen [48].

Histologisch zeigt sich zu Beginn eine fibrinoide Nekrose der kleinen Hautgefäße, die sich später durch Myozytenproliferation zu einer obstruktiven Gefäßfibrosierung entwickelt. Weiterhin kommt es zu einer Rarefizierung der Kapillaren und einer Intimaproliferation der Arteriolen. Die genaue Pathogenese der Gefäßveränderungen ist noch unklar. Initial soll eine Endothelschädigung mit Verarmung von vasodilatativen Mediatoren, vor allem

Stickstoffmonoxid (NO), sowie ein Thrombozytenverbrauch mit vermehrter Freisetzung von Thrombozytenwachstumsfaktor (PDGRF) vorliegen [49]. Diese Endothelschädigung führt zur Gewebehypoxie und damit Apoptose von Endothelzellen sowie zu einem Verlust der Barrierefunktion des Endothels mit konsekutiver Ödembildung und zur Präsentation von subendothelialer Matrix. Dies löst eine Verschiebung der Balance zwischen vasokonstriktiven und vasodilatativen Faktoren zugunsten der vasokonstriktiven aus. Zudem setzt die Endothelaktivierung einen Koagulationsstimulus und führt zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems und gestörten Fibrinolyse [50]. Die wichtigsten an der Pathogenese beteiligten Immunzellen sind aktivierte T-Lymphozyten, welche durch die vermehrte Produktion von Botenstoffen, sogenannten Zytokinen, die Gewebefibrose und Gefäßschäden beeinflussen [51]. Gonzalez-Amaro et al. konnten *in vitro* zeigen, dass die durch mononukleäre Immunzellen gebildeten Zytokine von SSc-Patienten die Fibroblastenaktivierung und -proliferation sowie die Protein- und Kollagensynthese fördern [52]. Insbesondere durch von Makrophagen und T-Lymphozyten gebildete proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, tumor-necrosis-factor-beta (TNFbeta) und platlet-derived-growth-factor (PDGRF) werden die Fibroblasten– und Endothelzellfunktionen moduliert [53]. Aktivierte T-Lymphozyten stimulieren darüber hinaus B-Lymphozyten zur Antikörperproduktion, welche sich unter anderem gegen die präsentierte subendotheliale Matrix und die Zellbestandteile der apoptotischen Zellen richten.

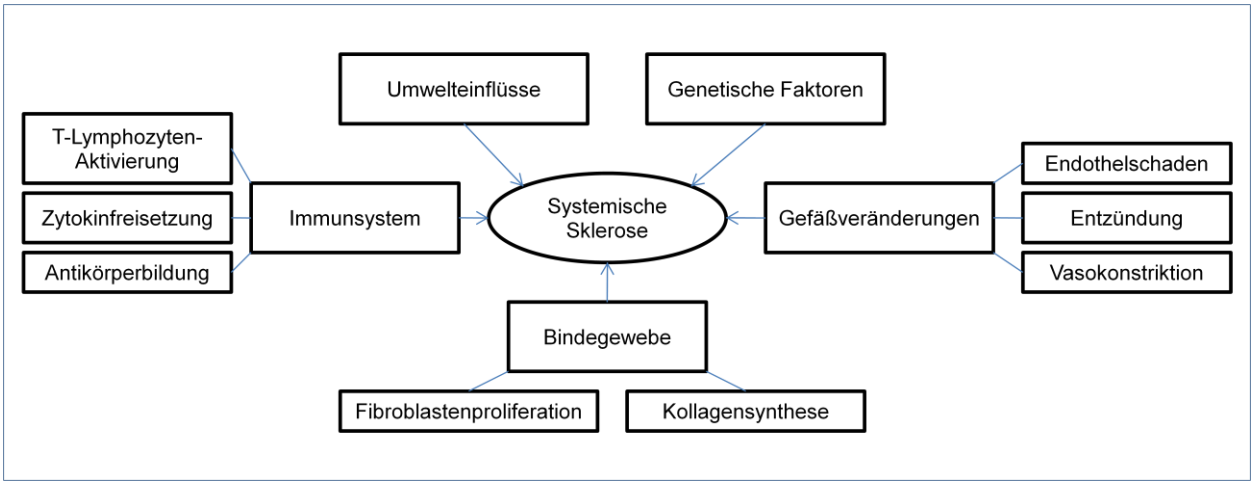


Abbildung 1: Pathoätiogenese der systemischen Sklerose

Bei der Entstehung der systemischen Sklerose spielen Umweltfaktoren, Hormone und Genetik eine wichtige Rolle [3]. So traten der systemischen Sklerose ähnliche Veränderungen bei Personen auf, die bestimmten Umwelteinflüssen ausgesetzt sind. Es erkrankten zum Beispiel gehäuft Arbeiter in Kohlegruben und Goldminen, die verstärkt im Boden vorkommenden

Silikaten ausgesetzt waren. Auch fand man Assoziationen zwischen dem Auftreten der systemischen Sklerose und der Exposition mit aromatisierten Kohlenwasserstoffen. 1981 erkrankten in Spanien fast 20.000 Menschen an einer systemischen Sklerose nach dem Verzehr von Anilin-verunreinigtem Rapsöl.

Die Infektion mit verschiedenen Viren, zum Beispiel Cytomegalieviren (CMV) und Retroviren, wird ebenfalls als Einflussfaktor diskutiert. Durch seine Fähigkeit Endothelzellen zu infizieren wird dem CMV eine Rolle bei der initialen Gefäßschädigung zu geschrieben. Durch die Infektion mit CMV erfolgt eine Immunantwort, die potentiell eine autoimmune Komponente enthält. Antikörper gegen CMV sind in der Lage die Apoptose von Endothelzellen hervorzurufen, da sie mit dem Integrin-NAG-2 Proteinkomplex auf der Endothelzelloberfläche reagieren, was zur Apoptose führen kann [54].

Die These einer zugrundeliegenden genetischen Prädisposition wird durch Familienuntersuchungen bestärkt. In Familienanalysen konnte eine Häufung der systemischen Sklerose in betroffenen Familien sowie eine Koexistenz von systemischer Sklerose und anderen Autoimmunerkrankungen gezeigt werden [55, 56]. Schon lange sind Assoziationen zwischen dem Vorkommen bestimmter HLA-Allele und der systemischen Sklerose bekannt [57]. Dabei konnte gezeigt werden, dass bestimmte Allele auch mit dem Vorkommen bestimmter Autoantikörper vergesellschaftet sind. So wurde bei Patienten mit Anti-Centromer-Antikörpern häufig das Vorkommen von HLA-DRB1 und bei Patienten mit Anti-Topoisomerase I-Antikörpern zusätzlich von HLA-DRQ1 berichtet [4].

1.4.2.4 Klinik

Die systemische Sklerose ist eine sehr heterogene Erkrankung, bei der neben einer Beteiligung der Haut nahezu alle Organkompartimente betroffen sein können (siehe Abbildung 3).

Die Hautbeteiligung ist bei der systemischen Sklerose meist das diagnostisch führende Symptom, dabei sind vor allem die Hände und Füße, seltener der Stamm betroffen. Das Frühstadium der Sklerosierung ist durch eine ödematöse Schwellung der Hände („puffy hands“) gekennzeichnet, die sich später zu einer Induration und Verdickung der Haut entwickeln kann (siehe Abbildung 2A). Durch eine zunehmende Fibrosierung der Hautsepten wird die Haut unverschieblich gegenüber den darunterliegenden Geweben und es können sich zunehmend Flexionskontrakturen der Finger („Madonnenfinger“) entwickeln. Die Haut ist sehr trocken, nimmt dabei aber ein wachsartiges Aussehen an. Subkutane Kalkablagerungen, die sogenannte Calcinosis cutis, treten gehäuft an Händen und Unterarmen auf. Weiterhin können trophische Störungen der Hautanhangsgebilde, wie Oncholysen und spröde Haare hinzukommen.

Im Gesicht zeigt sich die zunehmende Sklerosierung des Bindegewebes durch eine verkleinerte Mundöffnung (Mikrostomie) mit radiärer Fältelung („Tabaksbeutelmund“), eine Verkürzung und Fibrosierung des Zungenbändchens, sowie eine eingeschränkte maskenhafte Mimik bis hin zur Amimie (Abbildung 2C).

Nahezu 100% der Patienten mit systemischer Sklerose erkranken an einem Raynaud-Phänomen, einer vasospastischen Durchblutungsstörung, die bei der systemischen Sklerose zusätzlich durch die strukturellen Alterationen der kleinen Gefäße begünstigt wird. Kälte oder Stress können als auslösende Faktoren mitwirken. Durch arterielle Gefäßspasmen kommt es zu einem schmerzhaften Weißwerden der Finger, mit anschließender hypoxämischer livider Verfärbung und konsekutiver reaktiver Hyperämie (Tricolore-Phänomen). Dieses Phänomen tritt häufig schon Jahre vor Beginn der eigentlichen Hautbeteiligung auf. [58]

Abbildung 2: Darstellung typischer klinischer Aspekte bei Patienten mit SSc; A – „puffy hands“ (ödematöse Schwellung der Finger mit beginnender Sklerosierung); B – „Rattenbissnekrose“ an Dig. 2 (digitale Ulzeration); C – Mikrostomie und „Tabaksbeutelmund“[59]

Vasospastische Durchblutungsstörungen können möglicherweise auch an den inneren Organen wie Niere, Herz und Magen-Darmtrakt, als Raynaud-Phänomen der inneren Organe, auftreten.

Ischämische Nekrosen besonders an den Akren der Extremitäten, sogenannte „Rattenbissnekrosen“ (vergleiche Abbildung 2B), treten als Folge der Mitbeteiligung von Gefäßen im Rahmen der fibrotischen Gefäßveränderungen und von Mikroembolien auf. Diese schlecht heilenden Wunden können zu regelrechten Substanzverlusten an den Fingerkuppen und Zehen führen.

Eine Mitbeteiligung des Bewegungsapparates führt zu Arthralgien und Arthritis mit Tendosynovitis sowie zu Myalgien und Myopathien mit Muskelschwäche bis zur Muskelatrophie.

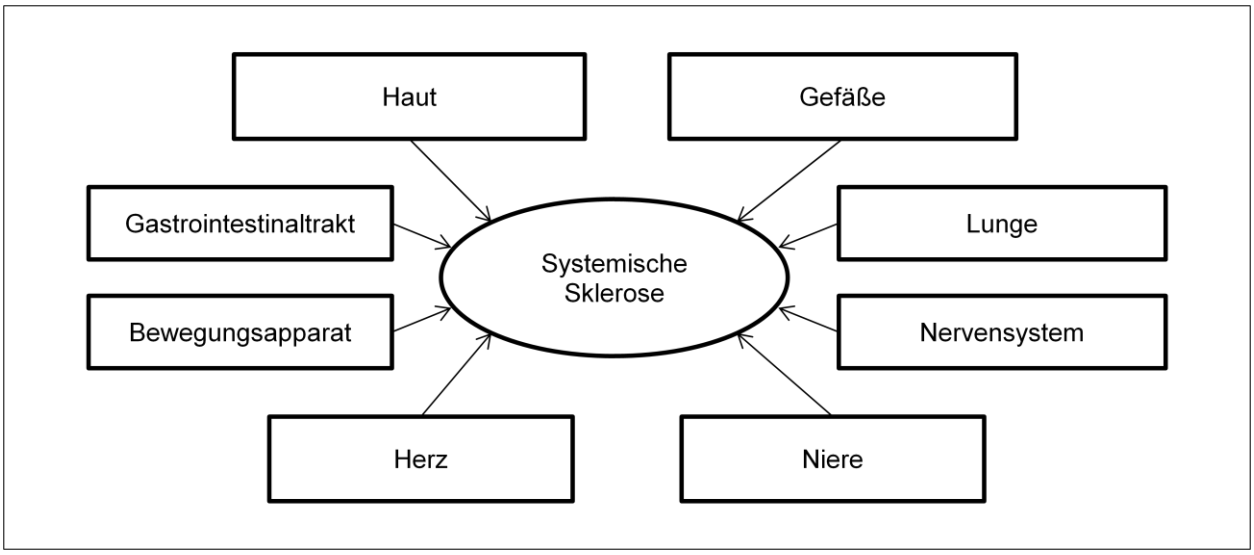


Abbildung 3: Beteiligung der verschiedenen Organkompartimente bei der SSc

Die Beteiligung des Gastrointestinaltraktes kann in allen Darmabschnitten auftreten, dabei führen die sklerosierenden Veränderungen vor allem zu einer eingeschränkten Motilität. Ist der Ösophagus betroffen, so äußert sich dies klinisch am ehesten durch Schluckbeschwerden (Dysphagie) und sekundärer Refluxösophagitis. Die Beteiligung des Magens äußert sich vor allem durch eine eingeschränkte Magenentleerung (Gastroparese). Klinisch geben die Patienten Völlegefühl, Übelkeit und Erbrechen an. Motilitätsstörungen des Dünndarms und des Kolons zeigen sich vor allem durch Diarrhö oder Obstipation. Im Allgemeinen stellen sich Patienten mit Beteiligung des Gastrointestinaltraktes häufig mit Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust und abdominalen Schmerzen vor.

Patienten mit systemischer Sklerose leiden auch vermehrt am sogenannten Sicca-Syndrom, bei dem es durch eine Verringerung der Sekretbildung seröser und muköser Drüsen zu trockenen Schleimhäuten im Mund und in den Augen sowie zu Verdauungsstörungen auf Grund der Verringerung von Verdauungssäften kommt.

Die Beteiligung der Lunge ist die häufigste Todesursache bei Patienten mit systemischer Sklerose [60] . Bei der Lungenbeteiligung wird zwischen der Lungenfibrose und der pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH) unterschieden. Unter der Lungenfibrose versteht man die Fibrosierung des interstitiellen Bindegewebes mit nachfolgender Reduktion der Lungencompliance. In Lungenfunktionstests äußert sich das in einer restriktiven Ventilationsstörung mit Verminderung der Vitalkapazität und dem totalen Lungenvolumen. Besonders typisch für die systemische Sklerose ist die bibasale Lungenfibrose.

Die PAH wird einerseits verursacht durch ein Ungleichgewicht zwischen vasodilatatorischen und vasokonstriktiven Mediatoren zu Gunsten der vasokonstriktiven, besonders des Endothelin-

1, sowie durch Endothelzellproliferation und Hypertrophie der glatten Gefäßmuskulatur. Anderseits kann sie Folge einer interstitiellen Bindegewebsfibrose im Rahmen einer Lungenfibrose sein. Man spricht von einer PAH, wenn der intraluminale Druck im Rechtsherzkatheter in Ruhe einen Wert von 25mmHg und in der Herzechokardiographie von 30mmHg überschreitet. Patienten mit einer Lungenbeteiligung beklagen vor allem Dyspnoe und verminderte Leistungsfähigkeit.

Die Beteiligung des Herzens kann sich durch eine diastolische Dysfunktion, Reduktion der Auswurfleistung, Erregungsbildungs- und Erregungsleitungsstörungen, Kardiomyopathien oder Perikardergüssen, die nicht durch andere Ursachen erklärt werden können, zeigen.

Sowohl unspezifische Veränderungen wie erhöhtes Serum-Kreatinin (über 1,0mg/dl), Proteinurie und renale arterielle Hypertonie als auch die SSc-spezifische renale Krise werden im Sinne einer Nierenbeteiligung gewertet. Renale Krisen sind charakterisiert durch das Auftreten von renalen Mikroangiopathien zum Teil vergesellschaftet mit einer hämolytischen oder renalen Anämie, die zu progressivem Nierenversagen und maligner Hypertension führen [61, 62].

Eine Beteiligung des Nervensystems ist selten, kann sich aber durch das Vorkommen eines Karpaltunnelsyndroms, einer Trigeminusneuralgie oder einer Polyneuropathie äußern.

1.4.2.5 Therapie

Für die systemische Sklerose stehen aktuell keine kausalen Therapieoptionen zur Verfügung, da die Ursachen der Erkrankung noch nicht vollständig bekannt sind. Eingesetzt werden antiinflammatorische und immunsupprimierende Medikamente wie steroidale Glukokortikoide, Methotrexat, Cyclophosphamid, Azathioprin und Ciclosporin A. Häufig erfolgt die Einstellung der Patienten auf eine Kombinationstherapie von Glukokortikoiden und einem weiteren immunmodulierenden Medikament. Eine erfolgreiche Verlangsamung der Progression der Fibrosierung konnte allerdings nur selten nachgewiesen werden [61, 63].

Die symptomatische Therapie steht bei der Behandlung der Patienten daher im Vordergrund. Zur Verbesserung der Durchblutungs- und trophischen Störungen werden vasoaktive Substanzen, wie Kalziumantagonisten, Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitoren (ACE-Inhibitoren) und Rheologika, zum Beispiel Pentoxifyllin eingesetzt. Auch der Einsatz der Infrarot-A-Hyperthermie zur Förderung der Durchblutung wird diskutiert.

Die Einführung von ACE-Inhibitoren zur Therapie von vaskulären Komplikationen, vor allem bei renalen Krisen führte zu einer signifikanten Reduktion der Mortalität [63]. Kalzium-Kanalblocker sowie ACE-Inhibitoren werden auch bei myokardialer Komponente eingesetzt.

Prostazykline und Endothelin-1-Antagonisten können zu einer Verringerung bzw. zu einem Progressionsverlangsamung der pulmonalen Hypertension führen [61]. Der Einsatz von Cyclophosphamid als Immunsuppresivum allein oder in Kombination mit Kortikosteroiden bei Patienten mit Lungenfibrose und Alveolitis wird kontrovers diskutiert, da durchgeführte Studien zu keinem einheitlichen Ergebnis kamen [64]. Zusätzlich zur medikamentösen Therapie werden zum Erhalt oder zur Besserung von Beweglichkeit begleitende physikalische Therapiemaßnahmen, Wärmeanwendungen und Bewegungsübungen eingesetzt.

Zusammenfassend kann sicher gesagt werden, dass bei der Variationsbreite und Symptomvielfalt der systemischen Sklerose ein breitgefächertes und individuelles Therapieregime angestrebt werden sollte. Wobei nicht alle Patienten Immunsuppressiva benötigen, aber sehr viele von einer vasoaktiven Therapie profitieren.

1.5 ZIELSTELLUNG

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, das Vorkommen bestimmter Autoantikörper bei Patienten mit systemischer Sklerose und deren Assoziationen zu klinischen Merkmalen zu untersuchen, um Häufigkeiten und Risikogruppen auf zu decken.

Folgende Fragestellungen sollen durch die Analysen in der Forschungsarbeit eine Beantwortung finden.

1. Prävalenzermittlung von Antikörpern gegen SSc-assoziierte Autoantigene und die Analyse von möglichen Assoziationen zu klinischen Manifestationen
2. Bewertung des diagnostischen Wertes von Anti-Topoisomerase I-Antikörpern und der Vergleich von Enzym-linked-Immunoadsorbent-Assay (ELISA) und Line-Immunoblot-Assay (LIA) zur Antikörperbestimmung
3. Bewertung des diagnostischen Wertes verschiedener Anti-Pm/Scl-Antikörper bei der systemischen Sklerose
4. Bewertung des diagnostischen Wertes von Anti-CENP-B- und Anti-CENP-A-Antikörpern
5. Bewertung des Nutzens eines Einsatzes eines neu entwickelten Line-Immunoblot-Assays (LIA) zur breitgefächerten Analyse verschiedener Autoantikörper bei der systemischen Sklerose

Die Analyse der Assoziationen der bestimmten Antikörper mit dem klinischen Bild der Patienten setzt eine gut charakterisierte Kohorte voraus, deren Daten standardisiert und einheitlich zusammengetragen wurden. Zu diesem Zweck nutzt die vorliegendene Forschungsarbeit als Grundlage das monozentrische Patientenkollektiv der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie sowie der Spezialambulanz für systemische Sklerose der Charite, Berlin, deren Assessment auf anerkannte einheitliche Empfehlungen und Kriterien beruht, welche im Abschnitt „Material und Methoden“ dargestellt werden. Um die Wertigkeit der gefunden Ergebnisse diskutieren zu können, wird im ersten Schritt daher eine Analyse der Kohorteneigenschaften vorgenommen und die Kohorte charakterisiert.

Neben der Prävalenz der einzelnen Antikörper soll das konkordante Vorkommen dieser untersucht werden. Darüberhinaus werden die Ergebnisse der Prävalenz der verschiedenen Nachweismethoden miteinander verglichen. Die anschließende Analyse der Assoziationen der Antikörper mit klinischen Merkmalen beruht auf den Ergebnissen des Line-Immunoblot-Assays und erfolgt in Einzeldarstellung jedes Antikörpers. Abschließend soll untersucht werden, ob bei den Patienten mit systemischer Sklerose der Nachweis keiner Antikörper sowie mehrerer Antikörper im Serum eine besondere diagnostische Wertigkeit besitzt.

2. MATERIAL UND METHODEN

Im folgenden Abschnitt werden die verwendeten Materialien, Methoden und grundlegenden Definitionen für das Erreichen der Zielstellung der Arbeit vorgestellt. Als Grundlage dienen die ausgewählte Patientenkohorte und unterschiedliche statistische Testverfahren. Darüberhinaus werden die für die Antikörperbestimmung genutzten Testverfahren erläutert.

2.1 PATIENTENKOHORTE

Im Folgenden wird, die der Arbeit zugrundeliegende Patientenkohorte der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und klinische Immunologie der Charite, Berlin, sowie deren Erfassung beschrieben.

2.1.1 ASSESSMENT DER KOHORTE

Im Zeitraum von Januar 2004 bis Mai 2007 wurden die klinischen und serologischen Daten von 295 Patienten der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und klinische Immunologie der Charite, Berlin, im Rahmen dieser Studie analysiert. In die Untersuchungen wurden Patienten eingeschlossen, die die Kriterien des American College of Rheumatology [42] für die systemische Sklerose erfüllen.

Von den anfänglich 295 untersuchten Patienten wurden im Laufe der Datenrecherche 15 aus den weiteren Analysen ausgeschlossen. Bei sieben Patienten, die ursprünglich als SSc-Patienten eingeordnet waren, stellte sich während der Verlaufskontrolle heraus, dass sie eher anderen rheumatischen Erkrankungen zugeordnet werden mussten. Bei sechs Patienten konnte auf Grund von Wegzug oder Umzug keine ausreichende Verlaufsbeobachtung durchgeführt werden. Zwei Patienten waren in der Datenbank doppelt erfasst, so dass nur die Daten vom jeweiligen Erstkontakt weiter verwendet wurden. Um mögliche Veränderungen im Antikörperstatus im Verlauf der Erkrankung auszuschließen, wurden in die Auswertung nur Patienten eingeschlossen, bei denen der Zeitraum von klinischem Assessment und Blutentnahme zur Antikörperbestimmung maximal ein Jahr betrug.

Für die folgenden Analysen wird daher eine Kohorte von 280 Patienten herangezogen.

2.1.2 Verlaufskontrolle

Der Beobachtungszeitraum der Patienten betrug im Durchschnitt 24,6 Monate (Maximale Dauer: 52 Monate, minimale Dauer: 18 Monate). Neben Alter und Geschlecht wurden das Erstmanifestationsalter, die Krankheitsdauer, die Familienanamnese für rheumatische Erkrankungen und 26 klinische Parameter erfasst.

Dafür wurden folgende Untersuchungen (vergleiche Tabelle 5) durchgeführt. Von 65 zufällig ausgewählten Patienten erfolgte eine zweite Blutentnahme zur Antikörperbestimmung im Verlauf des Beobachtungszeitraumes, dabei wurden die ersten Patienten aus der Liste, unabhängig von Alter, Geschlecht und Krankheitsform gewählt.

Erstuntersuchung und Verlaufskontrolle (alle 12 Monate)
• Anamnese und Patientenerfassung mittels DNSS-Patientenerfassungsbogen (Aktualisierung alle 12 Monate)
• Serumabnahme für Zentrallabor Aachen (1x 10ml für Verlaufsparameter Fibrose, 1x 5ml EDTA-Blut); Urin-Kontrolle (10ml Spontanurin) • Labor: Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), Blutbild, Kreatininkinase, GFR
• Befundbogen „Diagnostik peripherer Gefäße“
• mRSS*
• Untersuchung auf Teleangiektasien, Calcinosen und Sehnenreiben
• Urinstix-Untersuchung, Gesamtproteingehalt, Kreatinin-Clearence
• Lungenfunktion mit Diffusionskapazität (Bodyplethysmographie)
• Echokardiographie, Rechtsherzkatheteruntersuchung bei PAP > 35mmHg
• Röntgen -Thorax, ggf. HR-CT
• EKG
• Ggf. bei besonderer Indikation Spezialuntersuchungen wie BAL, Langzeit-Blutdruckmessung, Ösophagogastroduodenoskopie, Nierensonographie, Ösophagusmanometrie

Tabelle 5: Auszug aus den Kriterien des DNSS zur Erstuntersuchung und Verlaufskontrolle von Patienten mit SSc; * mRSS = modified Rodnan Skin Score

2.1.3 Klinische Parameter

Bei den Patienten der Kohorte wurden verschiedene klinische Parameter untersucht und in einer Datenbank erfasst. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die erfassten Daten (Tabelle 6). Mit Ausnahme der metrisch skalierten Daten wurden alle Werte entweder als pathologisch oder normal erfasst.

Datenerfassungsbereich	Erfasste Daten
• Allgemeine Patientendaten	➢ Alter, Geschlecht, Datum der Erstdiagnose, Vorstellungsdatum, Familienbeteiligung, Unterform der SSc
• Hautbeteiligung	➢ MRSS, Digitale Ulzerationen
• Gefäßbeteiligung	➢ Raynaud Phänomen
• Lungenbeteiligung	➢ Dyspnoe, ➢ Lungenfunktionswerte: Restriktion (FVC), PAH, Diffusionskapazität (DLCO-SB)
• Herzbeteiligung	➢ EKG-Veränderungen, Diastolische Dysfunktion, Palpitationen
• Beteiligung des Gastrointestinaltraktes	➢ Dysphagie, Gastroösophagealer Reflux, Diarrhö, Obstipation, Völlegefühl, Meteorismus
• Nierenbeteiligung	➢ Proteinurie, Renale Krisen, Kreatinin-Clearance
• Beteiligung des Bewegungsapparates	➢ Muskelschwäche und -atrophie, Gelenkkontrakturen, Synovisitis, CK-Erhöhung
• Beteiligung des Nervensystems	➢ Polyneuropathie, Trigeminusneuralgie
• Entzündungsparameter	➢ BSG
• Sicca-Symptomatik	
• Aktivitätsscore	

Tabelle 6: Kategorien der Datenerfassung

2.1.4 Kontrollgruppen

Zusätzlich zu den Serumproben der Patienten mit systemischer Sklerose wurden 259 Kontrollproben analysiert, welche sich wie folgt zusammensetzen: Patienten mit Sjögren-Syndrom (SS; n=49), mit systemischen Lupus erythrematodes (SLE; n=72), mit rheumatoider Arthritis (RA; n=88) und 50 gesunde Blutspender. Die Diagnosestellung der Kontrollpatienten erfolgte nach etablierten standardisierten international anerkannten Klassifikationskriterien [65-67]. Die Analyse der Kontrollseren erfolgte verblindet und in gleicher Weise wie die der Verumproben.

2.1.5 Ethikvotum

Zur Durchführung der wissenschaftlichen Analysen wurde ein positives Votum der Ethikkommission erteilt. Alle Patienten wurden schriftlich und mündlich über die Teilnahme an

einer wissenschaftlichen Studie informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur anonymisierten Erfassung und Auswertung ihrer klinischen und serologischen Daten.
Antragsnummer des Ethikvotums: EA1/013/705

2.2 Grundlagen der Kohortencharakterisierung

Im folgenden Abschnitt werden die methodischen Festlegungen und Definitionen für die Auswertung der erhobenen Patientendaten dargestellt.

2.2.1 Gruppierung der Patienten nach DNSS

Die Einteilung der Patienten in verschiedene Unterformen der systemischen Sklerose erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nach den Empfehlungen des DNSS in eine limitierte Form (lSSc), in eine diffuse Form (dSSc), in die systemische Sklerose sine Skleroderma (SScSS), in Overlap-Syndrome und in die undifferenzierten Bindegewebserkrankungen (UCTD; vergleiche Tabelle 4) [68]. Dabei erfolgte die Zuordnung zur Gruppe der diffusen und limitierten systemischen Sklerose nach der maximalen Ausdehnung der Hautsklerosierung während des Krankheitsverlaufes [44]. Als Overlap-Syndrom, einschließlich der mixed connective tissue diseases (MCTD), wurden Patienten klassifiziert, die klinische Merkmale der systemischen Sklerose und darüberhinaus auch anderer rheumatischer Erkrankungen aufwiesen [69]. Die systemische Sklerose sine Skleroderma wurde definiert wie es von Rodnan 1962 beschrieben wurde [70] und schließt Patienten ein, die SSc-typische Veränderungen, aber keine oder nur eine geringe Hautbeteiligung aufweisen. Als 5. Untergruppe wurden die undifferenzierten Bindegewebserkrankungen (UCTD) unterteilt. In diese Gruppe wurden Patienten eingeordnet, welche ein Raynaud-Phänomen und darüberhinaus typische Merkmale der systemischen Sklerose, wie eine arterielle pulmonale Hypertonie oder „puffy hands“ aufwiesen, ohne die Kriterien des ACR vollständig zu erfüllen [71, 72].

2.2.2 Beurteilung der dermalen Manifestationen

Die Beurteilung der sklerotischen Hautveränderungen erfolgte mit Hilfe des modifizierten Rodnan Skin Score (mRSS) [73, 74]. Dabei wird durch Palpation 17 verschiedener Körperareale das Ausmaß der Fibrosierung bestimmt. Je nach Ausdehnung und Grad der Fibrosierung ergibt

sich dabei ein Punktwert zwischen 0 und 51. Je höher der Fibrosierungsgrad, desto höher der Punktwert im mRSS.
Digitale Ulzerationen wurden definiert als Substanzverlust der Epidermis und Dermis in einer Größe von mindestens 2 mm Durchmesser an den distalen Phalangen der Finger.

2.2.3 Beurteilung der kardialen Manifestationen

Als eine positive Herzbeteiligung wurde das Vorhandensein von mindestens zwei der folgenden Symptome, sofern sie nicht durch andere Erkrankungen außer der systemischen Sklerose verursacht wurden, gewertet: eine in der Echokardiographie gesicherte diastolische Dysfunktion, Erregungsleitungsstörungen, eine Kardiomyopathie, eine verminderte Ejektionsfraktion, Klappenfunktionsstörungen, z.B. Trikuspidalinsuffizienz oder ein Perikarderguss.

2.2.4 Beurteilung der pulmonalen Manifestationen

Eine PAH wurde angenommen, wenn entweder in der Rechtsherzkatheteruntersuchung ein mittlerer Pulmonalarteriendruck (PAP) von mehr als 25 mmHg in Ruhe und mehr als 30 mmHg bei Belastung oder in der Echokardiographie ein systolischer pulmonal-arterieller Druck größer 40 mmHg gemessen wurde.
Das Vorhandensein einer Lungenfibrose wurde entweder in der Röntgenaufnahme des Thorax oder in der thorakalen High-Resolution-Computertomographie (HR-CT), entsprechend den ACR-Kriterien als bibasale Lungenfibrose, nachgewiesen.
Zur Bewertung der Lungenfunktion wurden die forcierte Vitalkapazität (FVC) und die Diffusionskapazität für CO (DLCO-SB) in der Single-Breath-Methode herangezogen.

2.2.5 Beurteilung der renalen Manifestationen

Als vorhandene Nierenbeteiligung wurden entweder das Auftreten einer eingeschränkten Nierenfunktion, einer renalen Hypertonie, einer Proteinurie oder eine aktuelle bzw. in der Vorgeschichte bekannte renale Krise angesehen, die nicht auf eine andere Erkrankung zurückzuführen sind. Dabei ist die renale Krise als akutes Auftreten eines arteriellen Hypertonus mit akutem Nierenversagen ohne andere ursächliche Erkrankung definiert.

2.2.6 Beurteilung der Krankheitsaktivität

Die Krankheitsaktivität wurde mit Hilfe des EUSTAR-Aktivitätsindices ermittelt [75, 76]. Dieser setzt sich aus folgenden Punkten in unterschiedlicher Wichtung zusammen. Einbezogen werden das Ausmaß der Hautveränderungen (mRSS und Sklerödem), der digitalen Ulzerationen, der entzündlichen Gelenkveränderungen sowie der pathologischen Lungenfunktionswerte. Eine besondere Wichtung erhalten die Fragen nach einer Verschlechterung der Haut-, Gefäß-, Herz- und Lungensymptomatik im Zeitraum des letzten Monats vor der Befragung. Darüberhinaus wird die Höhe von Entzündungswerten (BSG) im Blut mit einbezogen.

2.3 Grundlagen des Antikörpernachweises

Für die vorliegende Studie wurden verschiedene Autoantikörper in den Seren der Patienten der Kohorte bestimmt.

2.3.1 Testmethoden und Durchführung

Für die Analyse wurden SSc-spezifische Antikörper (ACA und Anti-topo-I-AK) sowie Antikörper, die bei anderen rheumatischen Erkrankungen und Manifestationen beschrieben worden sind (Anti-Pm/Scl-AK, Anti-Ku-AK, Anti-hpop1-AK, Anti-rpp38-AK), ausgewählt. Nach Abnahme der Blutproben erfolgte die Aufbewahrung der Seren bei -20°C. Die Antikörperbestimmung wurde mit Hilfe von kommerziell erhältlichen CE-zertifizierten Testsystemen der Firma EUROIMMUN AG, Lübeck, durch diese durchgeführt.

Erstens erfolgte die Bestimmung der gewählten Antikörper mit dem Line-Immunoblot-Assay (LIA, EUROLINE). Die dafür genutzten rekombinant in E.coli oder Baculovirus hergestellten Antigene sind DNA-Topoisomerase I, CENP-A, CENP-B, Pm/Scl-75c, Pm/Scl-100, Ku, hpop1, rpp38. Zweitens erfolgte die Bestimmung von Anti-CENP-B- und Anti-Topoisomerase I-Antikörpern mit Hilfe eines Enzym-linked-immunosorbent-Assay (ELISA), der ebenfalls von EUROIMMUN AG, Lübeck, entwickelt wurde und kommerziell erhältlich ist. Drittens wurde als unspezifische Antikörper-Screeningmethode ein indirekter Immunfluoreszenztest mit allen Seren durchgeführt.

Auf Grund der technischen Voraussetzungen und Kapazitäten konnten nicht alle Antikörper mit allen Analysemethoden nachgewiesen werden.

Alle Antikörperbestimmungen wurden verblindet durch erfahrenes wissenschaftliches Personal durchgeführt, ohne Kenntnis der jeweilig zugrundeliegenden Erkrankung und klinischen Manifestation.

2.3.2 Line-Immunoblot-Assay (LIA)

Der Line-Immunoblot-Assay ist eine semi-quantitative Nachweismethode humaner Antikörper der Immunglobulinklassen IgG, IgA und IgM im Serum oder Plasma. Nach einer Affinitätsaufreinigung erfolgt die Auftragung der rekombinant hergestellten Antigene in

spezifischen Verdünnungen auf Nitrozellulosemembranen. Diese beschichteten Membranen werden anschließend auf einem festen Trägermaterial fixiert.

Zur Detektion von Antikörpern im Serum eines Patienten, werden die Teststreifen im ersten Analyseschritt mit den Patientenproben inkubiert. Bei positiven Proben binden sich die darin enthaltenen Autoantikörper an die jeweiligen spezifischen, an die Membran gebundenen Antigene. Zur Darstellung dieser gebundenen Antikörper wird im zweiten Analyseschritt der Teststreifen mit einem Enzym-markierten Anti-Human-IgG (Enzymkonjugat) inkubiert, welches durch eine anschließende enzymkatalysierte Farbreaktion sichtbar gemacht wird. Die Signalintensität (Graustufen) wird anschließend mittels Flachbettscanner ermittelt und standardisiert mit einem Computerprogramm (EUROLineScan) ausgewertet.

Als Antikörper positiv wurden nach Vorgaben des Herstellers Signalstärken größer gleich 6 Units gewertet.

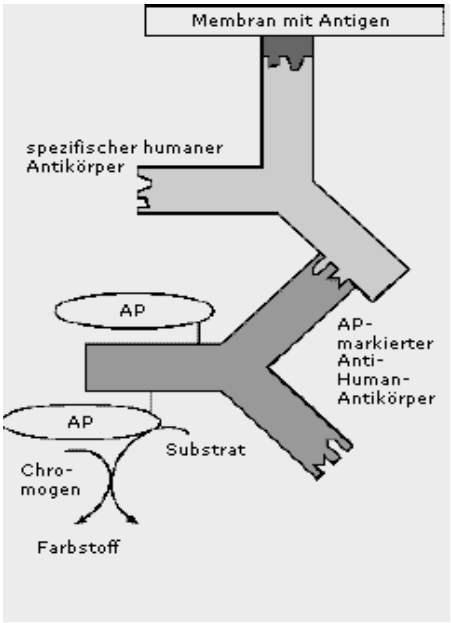


Abbildung 4: Prinzip des LIA. An einem mit Antigenen-beschichteten Membranstreifen binden sich spezifische humane Antikörper. Im zweiten Schritt werden diese Antikörper von einem mit Alkalischer-Phosphatase-markierten Anti-Human-IgG-Antikörper gebunden. Die Ermittlung der Antikörpertiter erfolgt durch densidometrische Messung des durch das Enzym umgesetzten Substrates. EUROIMMUN AG

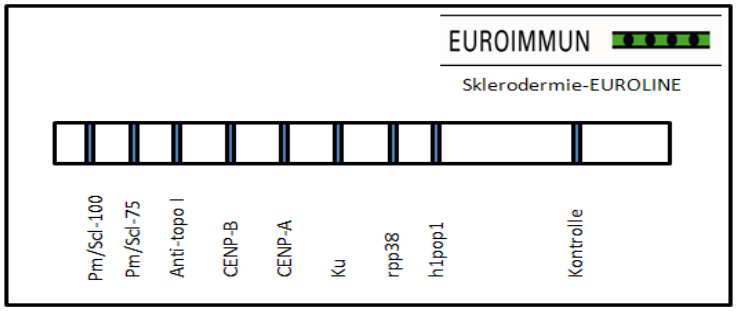


Abbildung 5: Beispiel für einen mit verschiedenen Antigenen beschichteten Line-Immunoblot-Assay, EUROIMMUN AG

2.3.3 ENZYM-LINKED-IMMUNOADSORBENT-ASSAY (ELISA)

Der ELISA dient der quantitativen Bestimmung humaner Antikörper.

Im ersten Schritt werden in Mikrotiterplatten, in denen sich an die Festphase gebundene Antigenen befinden, Patientenproben hineingegeben. Bei positiven Proben binden sich die darin enthaltenen Autoantikörper an die jeweiligen spezifischen, an die Festphase-gebundenen Antigene. Nach einem Waschgang wird zur Darstellung der gebundenen Antikörper im zweiten Analyseschritt mit einem Peroxidase-markierten Anti-Human-IgG (Enzymkonjugat) inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang, bei dem nichtgebundene Antikörper entfernt werden, kann das an den Zweitantikörper gebundene Enzym die Umsetzung eines zugegebenen geeigneten Substrates katalysieren. Die dabei entstehende Farbreaktion bzw. dessen Produkt kann anschließend photometrisch gemessen werden. Als Antikörper positiv wurden Titer größer gleich 20 U/l gewertet.

Für diese Forschungsarbeit stand ein ELISA-Testkit der Firma EUROIMMUN AG, Lübeck, zur Messung von Anti-Topoisomerase I- und Anti-CENP-B-Antikörpern zur Verfügung.

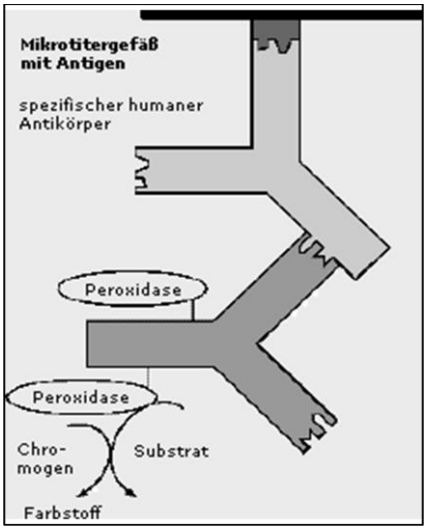


Abbildung 6: Prinzip des ELISA. An eine mit Antigenen beschichtete Mikrotiterplatte binden sich spezifische humane Antikörper aus dem Patientenserum. Im zweiten Schritt werden diese Antikörper von Peroxidase-markierten Anti-Human-IgG-Antikörpern gebunden. Die Ermittlung der Antikörpertiter erfolgt durch photometrische Messung des durch das Enzym umgesetzten Substrates. EUROIMMUN AG

2.3.4 INDIREKTER IMMUNFLUORESZENZTEST (IFT)

Bei dieser Nachweismethode werden als Antigen-Substrate auf Objektträger aufgebrachte Zellen und Gewebeschnitte, verwendet, welche mit Patientenproben inkubiert werden. Um die in der Patientenprobe potentiell enthaltenen Autoantikörper nachzuweisen, werden Fluorescein-

markierte Anti-Human-Immunglobuline im zweiten Schritt zugegeben, welche die gebundenen Patientenantikörper markieren können. Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann diese Markierung sichtbar gemacht und ein Antikörpermuster bestimmt werden.

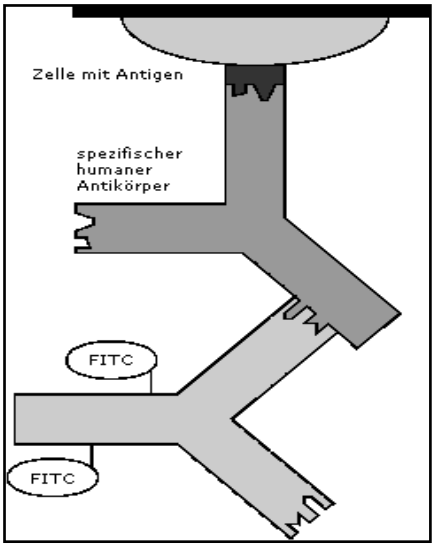


Abbildung 7: Prinzip des IFT. Auf einen Objektträger aufgebrachte Zellen dienen als Antigen-Substrate, an welche sich spezifische humane Antikörper binden. Im zweiten Schritt werden diese Antikörper von Fluorescein-markierten Anti-Human-Antikörpern gebunden. Die Ermittlung des Antikörperprofils erfolgt durch Betrachtung des Fluoreszenz-Musters unter dem Fluoreszenzmikroskop. EUROIMMUN AG

Beim indirekten Immunfluoreszenztest als Antikörper-Screening-Methode ist es möglich, ein weites Spektrum an Autoantikörpern zu erfassen. Typische Muster in der Immunfluoreszenz können dabei dem Vorhandensein bestimmter Antikörper in der untersuchten Probe zugeordnet werden. Die auftretenden Muster können allerdings nicht spezifisch einem Antikörper zugeordnet werden und diesen somit auch nicht spezifisch identifizieren, da in den als Antigenquelle verwendeten Zellen und Gewebeschnitten kein einzelnes Antigen isoliert dargestellt werden kann.

Durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Antigenquellen (HEp-2-Zellen/Primatenleberzellen) sind aber eine wechselseitige Absicherung und eine weitere Charakterisierung des Antikörpermusters möglich.

Im Folgenden sind einige Beispiele für IFT-Muster abgebildet (Abbildung 8). Dabei zeigt die linke Seite jeweils das Muster in den HEp-2-Zellen (humane Larynx-Karzinom-Zelllinie [77]), während die rechte Seite das Fluoreszenzmuster des Primatenlebergewebeschnittes zeigt. Typische Muster sind z.B. die spezifische Anfärbung der Zentromerregion der Zelle bei vorhandenen Autoantikörpern gegen Zentromerproteine (Abbildung 8b). Wird eine stark homogene, glatt begrenzte Fluoreszenz der Nukleoli (Kernkörperchen), häufig begleitet von einer schwachen Anfärbung des Zytoplasmas, beobachtet, ist dies typisch für das Vorhandensein

von Anti-Pm/Scl-Antikörpern (Abbildung 8a). Für das Vorhandensein von Anti-Topoisomerase I-Antikörpern spricht eine feingranuläre bis homogene nukleoplasmatische Fluoreszenz (Abbildung 8c). All die beschriebenen Muster sind sehr typisch, aber keineswegs spezifisch für die einzelnen genannten Antikörper [78].

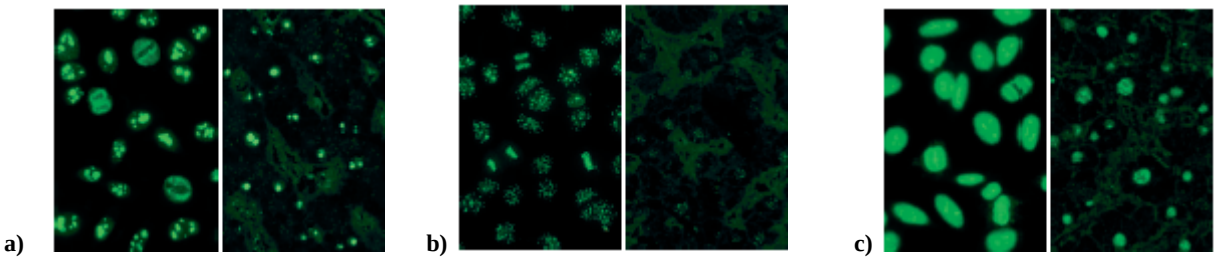


Abbildung 8: Antikörper-Muster im IFT. a) nukleolär homogenes Muster, z.B. bei Anti-Pm/Scl-AK; b) Zentromer-Muster, z.B. bei Anti-Centromer-AK; c) homogenes Muster der Anti-topo I-AK, EUROIMMUN AG

Für die Bestimmung der Anti-Topoisomerase I-Antikörper wurde über die normale Fluoreszenzmusteranalyse hinaus ein Zusatzsubstrat (EUROPLUS®) mit spezifischem Antigen zur Bestätigung bzw. Sicherung des jeweiligen Fluoreszenzmusters auf den HEp-2-Zellen bewertet. Die Auswertung der Antikörpermuster erfolgte am Fluoreszenzmikroskop durch erfahrenes und speziell geschultes Personal. Ein Titer von 1:160 und größer wurde als positiv gewertet.

2.4 Grundlagen der statistischen Analyse

Das Ergebnis eines jeden Beobachtungsprozesses soll durch die Durchführung von statistischen Testverfahren abgesichert und mit anderen Untersuchungen vergleichbar gemacht werden. Darüberhinaus soll die Anwendung gezielter statistischer Verfahren der Sicherung der Verallgemeinerungsfähigkeit dienen. Im folgenden Abschnitt werden die für diese Arbeit verwendeten statistischen Definitionen und Testverfahren beschrieben.

2.4.1 Werkzeuge

Die statistischen Auswertungen wurden unter Zuhilfenahme der Programme EXCEL (Microsoft) Version 2007 und SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Version 15.0 2006 erstellt.

2.4.2 Definitionen und Methodik

Der folgende Abschnitt erläutert die für die statistische Auswertung verwendeten Definitionen. Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Querschnittsuntersuchung der Krankheitsausprägungen und serologischen Parameter einer definierten Kohorte zu einem bestimmten Zeitpunkt. Bei lediglich einem Teil der Kohorte wurde an zwei bestimmten Zeitpunkten die Messung der serologischen Parameter durchgeführt, um stichprobenartig Veränderungen dieser Parameter beobachten zu können. Das Design der Studie hat dabei einen retrospektiven Charakter.

Im Mittelpunkt der statistischen Auswertung stehen die Sensitivität und Spezifität der verschiedenen Antikörper, welche sich aus folgender zugrundeliegender Vierfeldertafel berechnen lassen:

	Krankheit vorhanden	Krankheit nicht vorhanden
Test positiv	Richtig positiv (rp)	Falsch positiv (fp)
Test negativ	Falsch negativ (fn)	Richtig negativ (rn)

Tabelle 7: Vierfeldertafel zur Berechnung der Sensitivität und Spezifität

Dabei gibt die Sensitivität den Anteil der Erkrankten, bei denen der Test positiv ist, an der Gesamtzahl der Erkrankten wieder. Sie ist damit ein Maß für die Sicherheit, die Kranken richtig zu erkennen, was im Folgenden als diagnostische Sensitivität bezeichnet wird.

Die Sensitivität lässt sich wie folgt berechnen: Sensitivität = rp/ (rp+fn)

Die diagnostische Spezifität ist der Anteil der Gesunden, bei denen der Test negativ ist, an allen Gesunden und gibt damit die Sicherheit an, Nicht-Erkrankte auszuschließen.

Die Spezifität wird wie folgt berechnet: Spezifität = rn/ (fp + rn)

Für beide statistischen Parameter ergeben sich aus der Berechnung eigentlich Zahlen zwischen 0 und 1, sie werden häufig aber in Prozent angegeben, so auch in dieser Arbeit [79].

Als Maßzahl für die Häufigkeit wird die Prävalenz verwendet. Diese gibt die Häufigkeit eines bestimmten Merkmals (Erkrankung) in einer bestimmten Population zu einem definierten Zeitpunkt an. Unter der Inzidenz wird die Anzahl der Neuerkrankungen in einer bestimmten Population während einer definierten Periode verstanden.
Als Lageparameter der Grundgesamtheit wird in der vorliegenden Arbeit weitestgehend der Median mit den 75%- und 25%-Quantilen bzw. dem Interquartilenbereich (IQR) angegeben, da von einer Nichtnormalverteilung der Gesamtdaten ausgegangen werden kann.
.

2.4.3 TESTVERFAHREN

Um Zusammenhänge zwischen verschiedenen Variablen zu analysieren, wurden bei kategorialen, nominalen oder ordinalskalierten (Kategorien < 5) unabhängigen Daten in erster Linie Kreuztabellen und Chi-Quadrat-Tests verwendet. Dabei untersucht dieses Testverfahren, ob aus den Stichprobenbeobachtungen geschlossen werden kann, dass zwischen zwei Variablen in der Grundgesamtheit ein Zusammenhang besteht, oder ob die Variablen unabhängig voneinander sind, indem beobachtete Häufigkeiten mit erwarteten Häufigkeiten verglichen werden. Es werden zur Berechnung der Chi-Quadratwerte für jedes Feld der Vierfeldertafel (Kreuztabelle) die quadrierten Abweichungen der erwarteten von den tatsächlichen Häufigkeiten durch die erwarteten Häufigkeiten dividiert. Die Summe dieser Quotienten über alle Felder der Tabelle bildet den Chi-Quadratwert. Ein Zusammenhang wird angenommen und damit die Nullhypothese „die Variablen sind nicht von einander abhängig“ verworfen, wenn der Test eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0{,}05$ ergibt [80]. In dieser Arbeit wird bei Vierfeldertafeln zur Ermittlung der Irrtumswahrscheinlichkeit, die 2-seitige Signifikanz des exakten Fisher-Tests angegeben.
Für den Vergleich metrischer, nicht normalverteilter Testvariablen zwischen zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Dieser nichtparametrische Test vergleicht die Größe

der durchschnittlichen Rangsummen der Testvariablen in den verschiedenen Gruppen und trifft eine Entscheidung, ob diese der gleichen Grundgesamtheit entstammen. Der Test ist signifikant, wenn sich eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0{,}05$ ergibt [80]. Aufgrund des Pilotcharakters der Studie und dem Ziel des Data-Mining, wird auf die Adjustierung des Signifikanzniveaus für multiples Testen verzichtet.

Da es sich bei der vorliegenden Arbeit um eine retrospektive Querschnittsstudie handelt, wurde zur Einschätzung von Risiken das Odds-Ratio (OR) herangezogen. Das Odds-Ratio, auch Kreuzproduktverhältnis, spiegelt die Erhöhung der Chance wider an einer bestimmten Krankheit zu erkranken bzw. ein bestimmtes Merkmal zu entwickeln, wenn eine bestimmte Exposition eines Risikofaktors gegeben ist. Als Grundlage zur Berechnung dieses symmetrischen Maßes, welches im Gegensatz zum Relativen Risiko (RR) auch bei retrospektiven Querschnittsuntersuchungen angewendet werden darf, dient ebenfalls die Vierfeldertafel. In dieser Arbeit wird als Risikofaktor das Vorhandensein von bestimmten Antikörpern im Serum der Patienten angenommen.

	Merkmal vorhanden	Merkmal nicht vorhanden
Risikofaktor vorhanden	a	b
Risikofaktor nicht vorhanden	c	d

Tabelle 8: Vierfeldertafel zur Berechnung der Odds-Ratio

Das Odds-Ratio wird wie folgt berechnet: $OR = a*d/b*c$

Ist der berechnete Wert größer eins, so kann angenommen werden, dass die Exposition des Risikofaktors die Chance erhöht zu erkranken. Ist der Parameter kleiner eins, so könnte man von einer protektiven Wirkung ausgehen. Ist der ermittelte Wert gleich eins, so hat er keinen Einfluss auf das Risiko. Da dieses Maß bei kleinen Fallzahlen starken Verzerrungen unterliegen kann, wurde die Berechnung nur für Antikörper bei einer Mindestfallzahl von $n \geq 20$ durchgeführt.
Zur Überprüfung von Zusammenhängen zwischen zwei oder mehreren Variablen (Antikörper, klinische Merkmale) wurden die Verfahren der Korrelation und der Regression verwendet.
Die Korrelation beschreibt dabei die Stärke eines (meist ungerichteten) Zusammenhanges zweier Merkmale. Anwendung in dieser Arbeit findet dabei die Korrelation nach Spearman, der als Grundlage zur Berechnung die Bildung von Rangzahlen dient. Folgende Voraussetzungen sind für dieses statistische Verfahren notwendig und in der vorliegenden Arbeit erfüllt. Ein linearer Zusammenhang der Merkmale ist nicht notwendig, ausreichend ist die Vermutung eines

montonen Zusammenhangs. Die untersuchten Variablen müssen mindestens ordinalskaliert sein, eine Normalverteilung der Daten ist nicht notwendig. Als Maßzahl ergibt sich der Korrelationskoeffizient nach Spearman (rho), welcher Werte zwischen -1 und 1 annimmt. Dabei gilt, je näher der Korrelationskoeffizient betragsmäßig dem Wert 1 liegt, desto stärker ist der Zusammenhang. Positive Werte zeigen dabei einen gleich gerichteten, negative Werte einen entgegengesetzt gerichteten Zusammenhang an. Ist rho gleich 0, so besteht kein Zusammenhang der untersuchten Variablen. Dieses Verfahren erlaubt keine Schlüsse auf eine Kausalität.

Um bei der Analyse des Einflusses von Antikörperprofilen die stärksten unabhängigen Prädiktoren zu identifizieren, wurde die Methode der multivariaten logistischen Regression mit schrittweisem Einschluss gewählt. Dabei werden die Prädiktoren in der Reihenfolge des stärksten Zusammenhanges nacheinander aufgenommen, bis keine signifikante Modellverbesserung mehr durch die Aufnahme weiterer Prädiktoren erreicht wird. Die Regression beschreibt dabei die Art eines meist gerichteten Zusammenhangs und ermöglicht die Unterscheidung einer abhängigen Variablen von einer oder mehreren unabhängigen Variablen. Ziel ist festzustellen, wie sich die Änderungen der unabhängigen Variablen auf die abhängige auswirken. Aufgrund der zum Teil geringen Prävalenzen der Antikörper und des retrospektiven Designs der Studie wurden die klinischen Manifestationen untersucht, die einen großen Einfluss auf die Mortalität und Lebensqualität haben. Eingeschlossen wurden die Lungenfibrose, die PAH, das Vorkommen von renalen Krisen, die Herzbeteiligung sowie ein mRSS größer 15. Als Maßzahl zur Beurteilung der Güte der Regressionsschätzung dient das Bestimmtheitsmaß r^2. Es stellt das Verhältnis von erklärter Streuung zur Gesamtstreuung der abhängigen Variable dar. Ein Schluss auf Kausalität ist dabei nicht zulässig.

2.5 Grundlagen der Literaturrecherche

Zur Erschließung bereits bekannter wissenschaftlicher Grundlagen des bearbeiteten Themengebietes sowie zur Einordnung der gefundenen Ergebnisse wurde eine Literaturrecherche durchgeführt.

2.5.1 Quellen

Die Literaturrecherche zur Bedeutung verschiedener Autoantikörper bei der systemischen Sklerose und anderen Autoimmunerkrankungen wurde im Wesentlichen mit der Onlinedatenbank „Pubmed“ des NCBI/NIH („National Center of Biotechnology Information“ des „National Institutes of Health“, Bethesda, Maryland, USA) mit folgender Internetadresse www.ncbi.nlm.nih.gov durchgeführt. Darüberhinaus konnte auf diverse Fachbücher sowie das Wissen aus verschiedenen Lehr- und Weiterbildungsveranstaltungen zurückgegriffen werden.

2.5.2 Methodik

Für die Recherche in der Online-Datenbank wurden initial folgende Suchbegriffe (auch in Kombination) verwendet: systemic sclerosis, scleroderma, pathogenesis, antibodies, autoantibodies, prevalence, clinical association, scl-70, anti-topo I, anti-topoisomerase I, Cenp-B, Cenp-A, anti-centromere, ACA, Pm/Scl, Pm/Scl-75, Pm/Scl-100, Ku, hpop1, rpp38. Über die direkten Ergebnisse dieser Literatursuche hinaus, wurden angezeigte weiterführende Links (related articles) sowie in den Literaturverzeichnissen angegebene relevante Artikel mit in die Betrachtungen einbezogen.

3. ERGEBNISSE

Dieses Kapitel der Arbeit zeigt die Ergebnisse der durchgeführten statistischen Analysen auf. Dabei werden zuerst die Ergebnisse der durchgeführten grundlegenden Kohortenanalyse dargestellt. Anschließend wird auf die Häufigkeitsverteilung der untersuchten Antikörper in der Kohorte, den Kontrollgruppen und den SSc-Unterformen eingegangen sowie die Ergebnisse der unterschiedlichen Nachweismethoden verglichen. Zum Schluss folgen die Ergebnisse der Analyse des Zusammenhangs der klinischen Manifestationen mit einzelnen Antikörpern und mit den betrachteten Antikörperkombinationen.

3.1 ANALYSE DER KOHORTE

Der folgende Abschnitt zeigt die Ergebnisse der Analyse der untersuchten Kohorte. Es wurden 280 Patienten mit systemischer Sklerose der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie der Charite, Berlin, in die Analyse einbezogen. Nach den Empfehlungen des DNSS erfolgte die Bestimmung und Auswertung verschiedener klinischer Parameter und Subtypen der systemischen Sklerose. Dieser Abschnitt dient der Erfassung der Vergleichbarkeit der untersuchten Patientengruppe mit anderen Kohorten.

3.1.1 ANALYSE DER SSC-GRUPPEN

Die Betrachtung der Verteilung der Patienten der Kohorte in die verschiedenen unter Abschnitt 2.2.1 definierten SSc-Gruppen ergab die größte Häufigkeit für die limitierte systemische Sklerose.

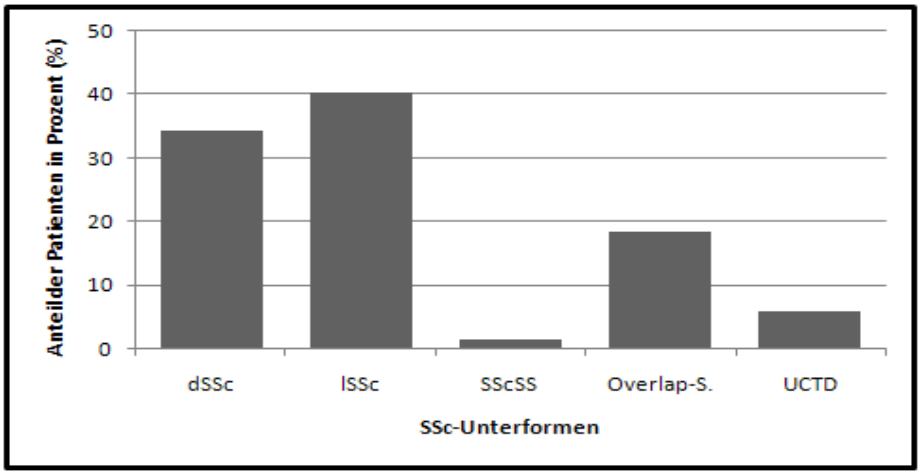


Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung der SSc-Subformen in der untersuchten Kohorte; dSSc = diffuse Form der SSc, lSSc = limitierte Form der SSc; SScSS = systemische Sklerose sine Skleroderma; Overlap-S. = Overlap-Syndrom; UCTD = undifferentiated connective tissue diseases

40,4 % (n=113) der Patienten wurden aufgrund des klinischen Erscheinungsbildes der limitierten Form zugeordnet. Dem gegenüber erfüllten 34,3% (n=96) der Patienten die Kriterien einer diffusen Form der systemischen Sklerose. 18,2% (n= 51) der Patienten zeigten ein Overlap-Syndrom zwischen der systemischen Sklerose und einer weiteren rheumatischen Erkrankung. 5,7% (n=16) der Patienten wurden den undifferenzierten Bindegewebserkrankungen (UCTD) und 1,4% (n=4) der systemischen Sklerose sine Skleroderma an Hand der Klinik zugeordnet (siehe Abbildung 9).

3.1.2 Familienbeteiligung, Alters- und Geschlechtsverteilung

In der untersuchten Kohorte wurden die Alters- und Geschlechtsverteilung sowie die Häufigkeit der Familienbeteiligung zum einen für die Gesamtkohorte, aber auch in den verschiedenen Formen der systemischen Sklerose untersucht. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Ergebnisse dieser Analyse.

Das Durchschnittsalter aller Patienten in der Gesamtkohorte lag zum Zeitpunkt dieser Studie bei 56 Jahren (SD 13,2 Jahren). Die Altersspanne reichte dabei von 16 bis maximal 84 Jahren.

Das durchschnittliche Alter bei der Erstmanifestation der systemischen Sklerose lag in der untersuchten Kohorte bei 49,7 Jahren (SD 14,4 Jahre). Niedriger war es mit 45,8 Jahren in der Gruppe der Patienten mit Overlap-Syndrom und mit 47,3 Jahren bei den Patienten mit dSSc. Das Erstmanifestationsalter war hingegen erhöht in der Gruppe der Patienten mit lSSc (53,5 Jahre).

Es zeigt sich eine Geschlechtsverteilung in der untersuchten Kohorte von 86,8% weiblichen und 13,2% männlichen Patienten, dies entspricht einem Verhältnis von 7:1. Etwas höher ist der

Anteil der Frauen bei der lSSc von 92,9% und bei den Patienten der UCTD von 100%. Bei den Patienten mit SSc sine Skleroderma zeigt sich ein Verhältnis von Männern zu Frauen von 1:1.

	N	Alter (J.)	Manifestations-alter (J.)	Familien-beteiligung (%)	Frauen (%)	Männer (%)
Alle	280	56,0 ± 13,2	49,7 ± 14,4	23,6	86,8	13,2
dSSc	96	53,2 ± 14,5	47,3 ± 16,1	20,8	82,3	17,7
lSSc	113	60,2 ± 11,3	53,5 ± 12,6	24,8	92,9	7,1
SScSS	4	54,0 ± 12,7	51,0 ± 11,5	0	50,0	50,0
Overlap-S.	51	52,0 ± 13,2	45,8 ± 13,3	25,5	80,4	19,6
UCTD	16	56,6 ± 10,7	51,5 ± 13,5	31,3	100	0
Familienbeteiligung	66	54,1 ± 13,6	48,6 ± 14,0	100	87,9	12,1
Frauen	243	56,6 ± 13,2	49,8 ± 14,7	23,9	100	0
Männer	37	52,0 ± 13,2	49,0 ± 11,8	21,6	0	100

Tabelle 9: Häufigkeitsverteilung von Alter, Manifestationsalter, Familienbeteiligung und Geschlecht in der untersuchten Kohorte; Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung bzw. Prozent

Betrachtet man die Männer im Vergleich zu den Frauen, so stellt man fest, dass die Männer zum Zeitpunkt der Erfassung durchschnittlich vier Jahre jünger waren als die Frauen, das Manifestationsalter aber mit 49 bzw. 49,8 Jahren in etwa gleich ist.

In der Gesamtkohorte haben 23,6% der Patienten eine positive Familienanamnese für rheumatische Erkrankungen. Die Familienbeteiligung ist niedriger bei den Patienten mit dSSc (20,8%) und bei Patienten mit SSc sine Skleroderma (0%). Deutlich häufiger zeigte sich eine positive Familienanamnese bei den Patienten mit UCTD. Dort gaben 31,3% der Patienten dieser Gruppe an, mindestens einen nahen Verwandten mit einer rheumatischen Erkrankung zu haben. Patienten mit positiver Familienanamnese erkrankten mit durchschnittlich 48,6 ± 14 Jahren etwas, aber nicht signifikant früher im Vergleich zu den Patienten mit negativer Familienanamnese.

3.1.3 Analyse der Krankheitsverläufe

Im Mittelpunkt dieses Abschnitts stehen zum einen die Dauer und Aktivität der Erkrankung bei den untersuchten Patienten zum Zeitpunkt der durchgeführten Antikörperanalysen und zum anderen die Häufigkeiten der zu betrachtenden klinischen Merkmale.

3.1.3.1 Krankheitsdauer und - aktivität

Die Krankheitsdauer in der untersuchten Kohorte wurde in zwei verschiedene Kategorien unterteilt. Zum einen wurde die Dauer der Erkrankung seit dem erstmaligen Auftreten des Raynaud-Phänomens analysiert. Diese betrug in der Kohorte im Median 8 Jahre (IQR 16-4). Die Spanne reichte dabei von unter einem Jahr bis hin zu 43 Jahren. Zum zweiten wurde die Dauer der Erkrankung seit dem erstmaligen Auftreten eines vom Raynaud-Phänomen verschiedenen Symptoms analysiert. Diese Krankheitsdauer betrug in der untersuchten Kohorte durchschnittlich 5 Jahre (IQR 9-3). Die Unterscheidung der unterschiedlichen Zeitspannen ist für die verschiedenen SSc-Formen von Bedeutung. Die Ergebnisse zeigen, dass lSSc – Patienten und Patienten mit einer SSc sine Skleroderma im Durchschnitt eine viel längere Zeitspanne zwischen dem Auftreten eines Raynaud-Phänomens und eines weiteren organbezogenen Symptoms als Patienten mit einer dSSc aufweisen (siehe Tabelle 10).

	n	Erkrankungsdauer seit RP (J.)	Erkrankungsdauer seit 1. nicht-RP-Syndrom (J.)
Alle	280	8 (16-4)	5 (9-3)
dSSc	113	5 (12-3)	4 (7-3)
lSSc	96	10 (20-5)	7 (10-3)
SScSS	4	12 (28-3)	3 (4-3)
Overlap-S.	51	7 (14-4)	6 (12-3)
UCTD	16	8 (15-5)	5 (7-3)

Tabelle 10: Darstellung der Erkrankungsdauer in der untersuchten Kohorte in Median mit den 75%- und 25%-Quartilen ( ) in Jahren; RP = Raynaud-Phänomen

Die Mehrzahl der Patienten wurde zu einem Zeitpunkt erfasst, an dem die Erkrankung noch nicht sehr lange durch klinische Merkmale ersichtlich war. 57,4% aller Patienten hatten zu Beginn der Beobachtungen eine Krankheitsdauer von weniger als fünf Jahren. Nur etwa 10% aller Patienten in dieser Kohorte hatten zum Zeitpunkt der Analyse einen Krankheitsverlauf von über 15 Jahren. Für die Gesamtkohorte wurde ein medianer Krankheits-Aktivitäts-Score von 1,5 ermittelt. Bedeutsam höher lag dieser in der Gruppe der dSSc (2,5) und geringer mit 1,0 bei den Patienten mit lSSc und UCTD (1,5; $p < 0,0005$).

3.1.3.2 Häufigkeitsverteilung klinischer Merkmale

Im folgenden Abschnitt werden die Häufigkeiten der einzelnen untersuchten klinischen Parameter in der Gesamtkohorte und den SSc-Subformen dargestellt. Tabelle 11 gibt eine Übersicht über diese Ergebnisse und stellt sie in Anzahl (N) und Prozentzahlen (%) sowohl für

die Gesamtkohorte als auch die SSc-Subformen dar. Die metrischen Daten werden als Median mit dem Interquartilsrange von 75% - 25% dargestellt.

Klinisches Merkmal	Alle Patienten N = 280		dSSc N = 96		lSSc N = 113		Overlap-S. N = 51		SScSS N = 4		UCTD N = 16	
	N	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**
Hautbeteiligung	248	**88,9**	94	**98,9**	105	**92,9**	39	**76,5**	3	**75,0**	7	**43,8**
Raynaud-Phänomen	272	**97,1**	95	**99,0**	110	**97,3**	50	**98,0**	4	**100**	13	**81,3**
Vaskuläre Beteiligung	119	**42,5**	56	**58,3**	38	**33,6**	20	**39,2**	3	**75,0**	2	**12,5**
Akrale digitale Ulcera	112	**40,0**	52	**54,2**	38	**33,6**	18	**35,3**	2	**50,0**	2	**12,5**
Lungenfibrose	98	**35,0**	57	**59,4**	16	**14,2**	20	**39,2**	3	**75,0**	2	**12,5**
PAH	60	**21,4**	22	**22,9**	22	**19,5**	13	**25,5**	2	**50,0**	1	**6,3**
Restriktiver Defekt	99	**36,3**	52	**55,3**	24	**21,8**	21	**41,2**	1	**25,0**	1	**7,1**
Herzbeteiligung	117	**40,7**	47	**49,0**	35	**31,0**	25	**49,0**	3	**75,0**	4	**25,0**
Erregungsleitungsstörungen	69	**24,6**	28	**29,2**	22	**19,5**	15	**29,4**	1	**25,0**	3	**18,8**
Diastolische Dysfunktion	109	**38,9**	39	**40,6**	46	**40,7**	16	**31,4**	2	**50,0**	6	**37,5**
Nierenbeteiligung	56	**20,0**	17	**17,7**	22	**19,5**	14	**27,5**	1	**25,0**	2	**12,5**
Renale Krise	16	**5,7**	10	**10,4**	3	**2,7**	1	**1,9**	1	**25,0**	1	**6,3**
Ösophagusbeteiligung	219	**77,1**	77	**80,2**	88	**77,9**	39	**76,5**	3	**75,0**	9	**56,3**
Beteiligung von Magen/Dünndarm	113	**40,4**	42	**43,8**	45	**39,8**	19	**37,3**	3	**75,0**	4	**25,0**
Kolonbeteiligung	41	**14,6**	13	**13,5**	20	**17,7**	6	**11,8**	1	**25,0**	1	**6,3**
Beteiligung d. Bewegungsapparates	255	**91,1**	91	**94,8**	102	**90,3**	49	**96,1**	3	**75,0**	10	**62,5**
Gelenkkontrakturen	172	**61,4**	78	**81,3**	62	**54,9**	27	**52,9**	2	**50,0**	3	**18,8**
Synovisitis	76	**27,1**	30	**31,3**	23	**20,4**	18	**35,3**	2	**50,0**	3	**18,8**
Muskelschwäche	152	**54,5**	58	**61,1**	54	**47,8**	34	**66,7**	2	**50,0**	4	**25,0**
Muskelatrophie	130	**46,4**	52	**54,2**	46	**40,7**	27	**52,9**	2	**50,0**	3	**18,8**
CK-Erhöhung	37	**13,2**	14	**14,6**	6	**5,3**	14	**27,5**	0	**0**	3	**18,8**
Beteiligung d. Nervensystems	45	**16,1**	14	**14,6**	20	**17,7**	10	**19,6**	0	**0**	1	**6,3**
Sicca-Symptomatik	193	**68,9**	64	**66,7**	74	**65,5**	38	**74,5**	4	**100**	13	**81,3**
	M	**IQR**	**M**	**IQR**	**M**	**IQR**	**M**	**IQR**	**M**	**IQR**	**M**	**IQR**
MRSS	5,0	10-2	11,0	17,5-6	4,0	7-3	3,0	7,5-0	1,0	2,5-0	0,0	2-0
DLCO	72,4	85-6	65,3	80-53	78,9	89-69	71,2	83-55	51,1	58-50	80,0	88-67
FVC	91,6	103-77	82,1	98-68	97,4	107-85	86,5	101-75	95,6	103-80	95,2	101-85
Aktivitätsscore	1,5	3-1	2,5	4-2	1,0	0,5-2	2,0	1-3	3,0	2-3,5	1,5	0,5-2

Tabelle 11: Vorkommen klinischer Merkmale in Anzahl und Prozent bzw. in Median (M) und 75%-25%-Interquartilsrange (IQR) für die Gesamtkohorte und einzelnen SSc-Subformen

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Vergleich zur Gesamtkohorte die Gruppe der dSSc Patienten durch ein aktiveres Krankheitsgeschehen mit einem gehäuften Auftreten von Haut- und Gefäßbeteiligung, Lungenfibrose und restriktiven Lungenfunktionsstörungen sowie häufigerer

Herzbeteiligung und Beteiligung des Bewegungsapparates charakterisiert werden kann. Das erstmalige Auftreten des Raynaud-Phänomens hat durchschnittlich einen geringen Abstand zum Auftreten der ersten organischen Manifestation.

Die Patienten mit lSSc haben in der untersuchten Kohorte längere Krankheitsverläufe und im Vergleich zu den übrigen Patienten seltener vaskuläre, pulmonale und muskuloskelettale Manifestationen. Auch die Krankheitsaktivität ist deutlich geringer.
Patienten mit Overlap-Syndromen stellten sich durch eine häufigere Beteiligung der Lunge, der Niere und des Bewegungssystems dar.
Patienten mit UCTD haben deutlich weniger Haut- und Gefäßbeteiligung sowie deutlich geringere Lungen-, Nieren-, Herz- und muskuloskelettale Beteiligung als die Patienten der anderen Untergruppen.
Kennzeichnend für Patienten mit systemischer Sklerose sine Skleroderma sind ein hohes Vorkommen von vaskulärer, pulmonaler und kardialer Beteiligung. Alle Patienten dieser Gruppe haben zusätzlich ein Sicca-Syndrom. Mit 1,0 ist der mediane mRSS in der untersuchten Kohorte von 0 verschieden, was aber mit der Definition der SSc sine Skleroderma vereinbar ist und ein geringes Maß an Hautsklerosierung anzeigt.
Aufgrund der geringen Anzahl von Patienten mit systemischer Sklerose sine Skleroderma und undifferenzierten Bindegewebserkrankungen sind die angegebenen Prozentzahlen in diesen Gruppen allerdings nur eingeschränkt verwertbar.

3.2 Analyse der Antikörperprävalenz

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Analyse der Antikörperhäufigkeiten, ermittelt mit den in Kapitel 2 dargestellten Methoden, in der untersuchten Kohorte präsentiert. Aufgrund der technischen Voraussetzungen konnten in dieser retrospektiven Studie nicht alle in die Betrachtung einbezogenen Antikörper mit allen Nachweismethoden dargestellt werden.

3.2.1 Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT)

In der untersuchten Kohorte konnten verschiedene Fluoreszenzmuster im indirekten Immunfluoreszenz-Test nachgewiesen werden (siehe Tabelle 12).

Fluoreszenzmuster	**Anzahl**
Zentromere	104
Feingranulär-nukleolär	35
Homogen-nukleoläres	64
Feingranuläres-zytoplasmatisches	40
Nukleolär	8
Homogen	18
Homogen-feingranulär	1
Granulär-zytoplasmatisch	2
Ku	2
Negativ	6

Tabelle 12: Häufigkeitsverteilung der nachgewiesenen Fluoreszenzmuster im IFT

Von den 280 untersuchten Seren zeigten insgesamt 104 Patientenseren eine Anfärbung der Zentromerregion der HEp-2 Zellen. 64 dieser Seren zeigten dabei ausschließlich dieses Muster, 36 Seren zeigten zusätzlich eine Anfärbung anderer Zellstrukturen, wie punktförmige Fluoreszenz der Zellkerne mit und ohne Anfärbung der Chromosomenregionen oder verschiedene Fluoreszenzmuster des Zytoplasmas.

Ein homogenes oder feingranuläres Muster des Zytoplasmas, welches als typisch für das Vorhandensein von Anti-Topoisomerase I-Antikörpern beschrieben wird, konnten bei 59 Patientenseren nachgewiesen werden. Eine positive Reaktion auf das Anti-Topoisomerase I-Antikörper-Zusatzsubstrat zeigten 48 Seren.

6 Patientenseren zeigten sich negativ in der Immunfluoreszenz.

3.2.2 LINE IMMUNOBLOT ASSAY (LIA)

In der untersuchten Kohorte konnten bei 215 Patienten Antikörper mit Hilfe des LIA nachgewiesen werden. In Tabelle 13 sind die ermittelten Prävalenzen im Überblick dargestellt. 65 Patientenseren (23,2%) stellten sich als Antikörper-negativ dar.

	Anti-topo I	Anti-CENP-B	Anti-CENP-A	Anti-Rpp38	Anti-Ku	Anti-hpop1	Anti-Pm/Scl-75	Anti-Pm/Scl-100
Anzahl	280	280	280	280	280	280	280	280
Negativ	213	177	177	276	278	269	251	260
neg. in %	76,1	63,2	63,2	98,6	99,3	96,1	89,6	92,9
Positiv	67	103	103	4	2	11	29	20
Pos in %	23,9	36,8	36,8	1,4	0,7	3,9	10,4	7,1

Tabelle 13: Prävalenz der untersuchten Autoantikörper im LIA

Mit 103 positiven Patienten (36,8%) haben die Anti-CENP-A- und Anti-CENP-B-Antikörper die größte Prävalenz. Am zweithäufigsten wurden mit 23,9% (n=67) Antikörper gegen die DNA-Topoisomerase I nachgewiesen. 35 Patienten (12,5%) wiesen Anti-Pm/Scl-Antikörper im Serum auf, dabei wurden bei 10,4% der Patienten (n=29) Anti-Pm/Scl-75-Antikörper und bei 7,1% (n=20) Anti-Pm/Scl-100-Antikörper nachgewiesen.

Antikörper gegen die Th/To-Antigene Rpp38 und hpop1 wurden bei vier (1,4%) beziehungsweise 11 (3,9%) Patienten nachgewiesen.

Anti-Ku-Antikörper zeigten in der untersuchten Kohorte eine Häufigkeit von 0,7% (n=2).

Bei der Analyse der Patientenseren im LIA zeigte sich ein Nebeneinander verschiedener Antikörper. Tabelle 14 stellt die Konkordanz der verschiedenen Autoantikörper graphisch dar und bietet die Möglichkeit die Anzahl der Patienten (rechte Spalte) mit den jeweils als positiv markierten Antikörpern abzulesen.

Mit Ausnahme von drei Patienten ist bei Anti-CENP-B-Antikörper-positiven Patienten auch immer der Antikörper gegen das CENP-A-Protein im Serum zu finden. Sieben Patienten waren zusätzlich noch für einen der anderen untersuchten Antikörper positiv.

Von den 67 Anti-Topoisomerase I-Antikörper-positiven Patienten wiesen 50 ausschließlich diesen Antikörper auf. Zwei Patienten sind simultan positiv für Anti-Topoisomerase I- sowie Anti-CENP-B- und Anti-CENP-A-Antikörper. Der häufigste zweite simultan vorkommende Antikörper neben den Anti-Topoisomerase I-Antikörpern ist in der untersuchten Kohorte der Anti-Pm/Scl-75-Antikörper, welcher bei 13 Patienten zusätzlich gefunden wurde.

	Anti-topo I	Anti-CENP-B	Anti-CENP-A	Anti-hpop1	Anti-Rpp38	Anti-Ku	Anti-Pm/Scl-75	Anti-Pm/Scl-100	**Anzahl der Patienten**
1 Antikörper positiv	+	-	-	-	-	-	-	-	50
	-	+	-	-	-	-	-	-	3
	-	-	+	-	-	-	-	-	3
	-	-	-	+	-	-	-	-	4
	-	-	-	-	+	-	-	-	0
	-	-	-	-	-	+	-	-	2
	-	-	-	-	-	-	+	-	2
	-	-	-	-	-	-	-	+	5
2 Antikörper positiv	+	+	-	-	-	-	-	-	0
	+	-	+	-	-	-	-	-	0
	+	-	-	+	-	-	-	-	2
	+	-	-	-	-	-	+	-	10
	-	+	+	-	-	-	-	-	96
	-	-	-	+	+	-	-	-	1
	-	-	-	+	-	-	-	-	1
	-	-	-	-	-	-	+	-	1
	-	-	-	-	-	-	-	+	1
	-	-	-	-	-	-	+	+	11
3 Antikörper positiv	+	+	+	-	-	-	-	-	2
	+	-	-	-	-	-	+	+	1
	+	-	-	+	-	-	+	-	1
	+	-	-	-	+	-	+	-	1
	-	+	+	+	-	-	-	-	2
	-	+	+	-	-	-	-	-	2
	-	+	+	-	-	-	+	-	2
	-	+	+	-	-	-	-	+	1
	-	-	-	+	+	-	-	+	1
	-	-	-	-	+	-	+	+	1
AK neg.	-	-	-	-	-	-	-	-	65

Tabelle 14: Konkordanz der untersuchten Autoantikörper gemessen im LIA

Von den 29 beziehungsweise 20 Patienten mit Anti-Pm/Scl-75- bzw. Anti-Pm/Scl-100-Antikörpern zeigten 13 Patienten ein konkordantes Auftreten dieser. Ausschließlich positiv für Anti-Pm/Scl-75-Antikörper war lediglich ein Patient, während dies bei den Anti-Pm/Scl-100-Antikörpern für vier Patienten zutraf.

Die zwei anti-Ku-Antikörper-positiven Patienten waren nur für diesen positiv, andere Antikörper konnten bei diesen beiden Patienten nicht detektiert werden.
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Mehrzahl der Patienten (94,6%) nur einen oder maximal zwei der untersuchten Autoantikörper im Serum aufwiesen. Bei 14 von 280 Patienten (5%) wurden mehr als 2 Autoantikörper im LIA detektiert.

Betrachtet man die Häufigkeiten des Vorkommens der Antikörper in den untersuchten Kontrollgruppen (n=259), welche aus Patienten mit anderen rheumatischen Erkrankungen und gesunden Blutspendern zusammengesetzt sind, so ergeben sich die in Tabelle 15 dargestellten Ergebnisse für die jeweilige diagnostische Sensitivität und diagnostische Spezifität der Antikörper für die systemische Sklerose.

Antikörper	Diagnostische Sensitivität (%)	Diagnostische Spezifität (%)
Anti-Topoisomerase I	23,9	96,1
Anti-CENP-B	36,8	98,1
Anti-CENP-A	36,8	97,3
Anti-Pm/Scl-75	10,4	98,5
Anti-Pm/Scl-100	7,1	98,5
Anti-Rpp38	1,4	95,0
Anti-hpop1	3,9	92,3
Anti-Ku	0,7	98,1

Tabelle 15: Diagnostische Sensitivität und Spezifität der Autoantikörper für die SSc in der untersuchten Kohorte

Eine relativ hohe diagnostische Sensitivität und Spezifität zeigen dabei Anti-Topoisomerase I-, Anti-CENP-A- und –B-Antikörper. Alle übrigen untersuchten Antikörper müssen als wenig sensitiv eingeschätzt werden, wobei Anti-Rpp38- und Anti-hpop1-Antikörper dabei auch noch eine geringe Spezifität für die systemische Sklerose aufweisen.

3.2.3 Enzym-Linked-Immunoabsorbent-Assay (ELISA)

Im ELISA wurden bei 65 Patienten Anti-Topoisomerase I-Antikörper (23,2%) und bei 105 Patienten Anti-CENP-B-Antikörper (37,5%) nachgewiesen.
Von 65 zufällig ausgewählten Patienten wurde nach durchschnittlich 14 Monaten ein zweites Mal Blut analysiert und der Antikörperstatus der Anti-Topoisomerase I- und Anti-CENP-B-Antikörpern bestimmt. Von den 24, bei der ersten Messung für Anti-Topoisomerase I-Antikörper positiven Patienten, waren 23 auch bei der zweiten Messung positiv (95,8%). Von den 41 als negativ getesteten Seren zeigten sich 40 auch bei der zweiten Messung negativ (97,6%) für Anti-

Topoisomerase I-Antikörper. Darüberhinaus zeigte der Vergleich der Antikörpertiter bei 20 der 23 bei der ersten Messung positiven Patienten auch ähnlich hohe Antikörper-Titer in der zweiten Messung.

Der Anti-CENP-B-Antikörper-Status änderte sich bei den untersuchten Patienten unserer Kohorte nicht.

Bei der ersten Messung waren 20 Patienten Anti-CENP-B-Antikörper positiv (30,8%) und 45 Patienten negativ. Nach 14 Monaten hat sich bei keinem der untersuchten Patienten der Antikörperstatus geändert. Die 20 Anti-CENP-B-Antikörper-positiven Patienten zeigten dabei auch ähnlich hohe Titer bei beiden Messungen.

3.2.4 Vergleich ELISA und LIA

Vergleicht man die Ergebnisse des LIA und des ELISA, fällt eine Übereinstimmung der Ergebnisse in 97% bei der Messung der Anti-Topoisomerase I-Antikörper auf. Im ELISA konnten 65 Patienten mit Anti-Topoisomerase I-Antikörpern detektiert werden, im LIA konnten zwei zusätzliche Patienten nachgewiesen werden, wobei diese Seren als grenzwertig positiv zu betrachten sind (17 und 22 Units).

Eine signifikante Korrelation zwischen den gemessenen Anti-Topoisomerase I-Antikörpersignalstärken im LIA und den gemessenen Antikörpertitern im ELISA konnte beobachtet werden (rho 0,752, p<0,0005; Tabelle 16).

			Anti-topo I-AK-Titer (LIA)
Spearman-Rho	Anti-topo I-AK-Titer (ELISA)	Korrelationskoeffizient	,752
		Sig. (2-seitig)	,000
		N	280

Tabelle 16: Korrelationstabelle Anti-topo I-Antikörpersignalstärke (LIA) und Anti-topo I-Antikörpertiter (ELISA)

Zur weiteren Antikörperbestimmung im ELISA stand noch das CENP-B-Antigen zur Verfügung. Doppelt positiv sowohl bei der Anti-CENP-B-Antikörper Bestimmung im LIA als auch im ELISA waren 101 Patienten. Der ELISA zeigte vier zusätzliche Patienten mit positiven Anti-CENP-B-Antikörpertitern (41U/l, 65U/l, 99U/l, 324U/l). Die Antikörpermessung im LIA ergab 2 positive Patienten zusätzlich, die im ELISA als negativ gewertet wurden. Von diesen 2 Patienten ist einer schwach positiv (8U) und der zweite stärker positiv (152 U) für Anti-CENP-B-Antikörper. Zusammenfassend ergibt sich daraus eine Übereinstimmung der Anti-CENP-B-Antikörperpositivität von 96,1% der Fälle in den genannten Antikörperbestimmungsmethoden.

Die Höhe der gemessenen Antikörpertiter bzw. –signalstärken zeigen eine signifikante Korrelation (rho 0,849; p < 0,0005; Tabelle 17).

			Anti-CENP-B-AK (LIA)
Spearman-Rho	Anti-CENP-B-AK-Titer (ELISA)	Korrelationskoeffizient	,849
		Sig. (2-seitig)	,000
		N	280

Tabelle 17: Korrelationstabelle Anti-CENP-B-Antikörpersignalstärke (LIA) und des Anti-CENP-B-Antikörpertiters (ELISA)

3.2.5 Vergleich IFT und LIA

Beim Vergleich der im LIA positiv für bestimmte Antikörper getesteten Seren fällt eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen des IFT auf. Tabelle 18 zeigt den Vergleich der Anzahl der Anti-CENP-B-/A-Antikörper-positiv- und negativgetesteten Seren im LIA mit der Anzahl der Seren mit und ohne Zentromermuster im IFT. Die Sensitivität bzw. Spezifität der Ergebnisse für die alleinige Bestimmung der Anti-CENP-B-Antikörper beträgt 96,15% bzw. 98,30%. Bei der Simultanbestimmung von Anti-CENP-B- und –A-Antikörpern erhöht sich die Sensitivität auf 99,04%. Dies bedeutet, dass von 104 Seren mit Zentromermuster im IFT in der untersuchten Kohorte 103 Seren im LIA für Anti-Centromer-Antikörper positiv getestet wurden. Von den 176 Seren, die im IFT eine vom Zentromermuster verschieden Fluoreszenz aufwiesen, stellten sich 98,3% auch im LIA Anti-Centromer-Antikörper-negativ dar.

N = 280		IFT Zentromer	
		pos	neg
Anti-CENP-B-AK	Pos	100	3
	Neg	4	173
Anti-CENP-A-AK	Pos	101	2
	Neg	3	174
Anti-CENP-B- + CENP-A-AK	Pos	103	3
	Neg	1	173

Tabelle 18: Vergleich der Antikörperbestimmung im IFT und LIA

Tabelle 19 stellt die Häufigkeiten der Fluoreszenzmuster bei den Anti-Topoisomerase I-Antikörper-positiven Seren dar. Auch hier zeigt sich eine große Übereinstimmung der Messergebnisse im LIA mit den für Anti-Topoisomerase-I-Antikörper typischen Fluoreszenzmustern. Die Mehrzahl der Anti-Topoisomerase I-Antikörper-positiven Seren im LIA (88,1%) zeigten dabei ein homogenes und nukleoläres Muster.

Anti-topo I-Antikörper positive Seren (N = 67)	
Homogen und nukleolär	59
Feingranulär und nukleolär	3
Homogen – zytoplasmatisch	3
Feingranulär – zytoplasmatisch	1
Nukleolär	1

Tabelle 19: Häufigkeiten der Fluoreszenzmuster bei den Anti-topo 1-AK-positiven Seren (LIA)

3.2.5 ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die in dieser Forschungsarbeit betrachteten Antikörper in stark unterschiedlicher Häufigkeit in der untersuchten Kohorte vorkommen (Tabelle 13). Die Mehrzahl der untersuchten Patienten (94,6%) wiesen im Serum lediglich einen oder maximal zwei Autoantikörper auf. Die Messergebnisse von ELISA und LIA stimmten für den Nachweis von Anti-Topoisomerase I-Antikörpern in beiden Methoden zu 97% und für Anti-CENP-B-Antikörper in 96,1% überein. Die Übereinstimmung der als typisch für die oben angegebenen Antikörper gewerteten Fluoreszenzmuster, mit der Häufigkeit der im LIA als ebenfalls positiv-getesteten Seren für diese Antikörper, fiel sehr hoch aus. Der für diese Forschungsarbeit verwendete LIA zeigt sich bei der Analyse der untersuchten Kohorte somit vergleichbar sensitiv und spezifisch wie die Antikörpernachweismethoden ELISA und IFT.

3.3 Analyse der Antikörperassoziation mit klinischen Merkmalen

In den folgenden Abschnitten erfolgt die Betrachtung der einzelnen in die Untersuchung einbezogenen Antikörper hinsichtlich ihrer diagnostischen Wertigkeit für die systemische Sklerose sowie ihres Potenzials zur Risikoabschätzung. Es werden dabei vor allem die Assoziationen zu bestimmten klinischen Merkmalen näher betrachtet. Dieser Analyse liegen die Ergebnisse der Antikörperbestimmung im LIA zugrunde. Nur in wenigen Teilaspekten, die gesondert genannt werden, erfolgt ein Bezug auf die ELISA-Testergebnisse.

3.3.1 Anti-Topoisomerase I-Antikörper

Anti-Topoisomerase I-Antikörper wurden bei 67 Patienten nachgewiesen und haben somit in der untersuchten Kohorte eine Prävalenz von 23,9%. In den untersuchten Kontrollseren fanden sie sich bei einem von 49 Patienten mit Sjögren-Syndrom, bei drei von 72 Patienten mit SLE und bei sechs von 88 Patienten mit RA sowie bei keinem der gesunden Blutspender. Zusammenfassend ergibt sich daraus eine diagnostische Spezifität von 96,1% für die systemische Sklerose.

3.3.1.1 Betrachtung nach SSc-Gruppen

Zur Gruppe der dSSc gehören 58 der als Anti-Topoisomerase I-Antikörper positiv gewerteten Seren. Dies entspricht einem Anteil von 60,4% aller Patienten mit dSSc. An einer lSSc sind sieben Patienten (6,2%) der Anti-Topoisomerase I-Antikörper-positiven Patienten erkrankt. Jeweils ein Anti-Topoisomerase I-Antikörper-positiver Patient leidet an einem Overlap-Syndrom zwischen der systemischen Sklerose und der Polymyositis bzw. an einer systemischen Sklerose sine Skleroderma (vergleiche Abbildung 10). Bei den untersuchten Patienten mit UCTD konnte dieser Antikörper nicht nachgewiesen werden. Die größte Rolle scheint dieser Antikörper auf Grund der Häufigkeitsverteilung bei den Patienten mit dSSc zu spielen. In Bezug auf die gemessenen Werte im LIA ergibt sich eine diagnostische Sensitivität für die dSSc von 60,4% und eine diagnostische Spezifität von 95,1% bezüglich der Gesamtkohorte. Die ermittelte Odds-Ratio von 29,68 zeigt eine sehr deutliche Risikoerhöhung an einer dSSc zu erkranken, wenn der Nachweis von Anti-Topoisomerase I-Antikörpern im Serum positiv ist.

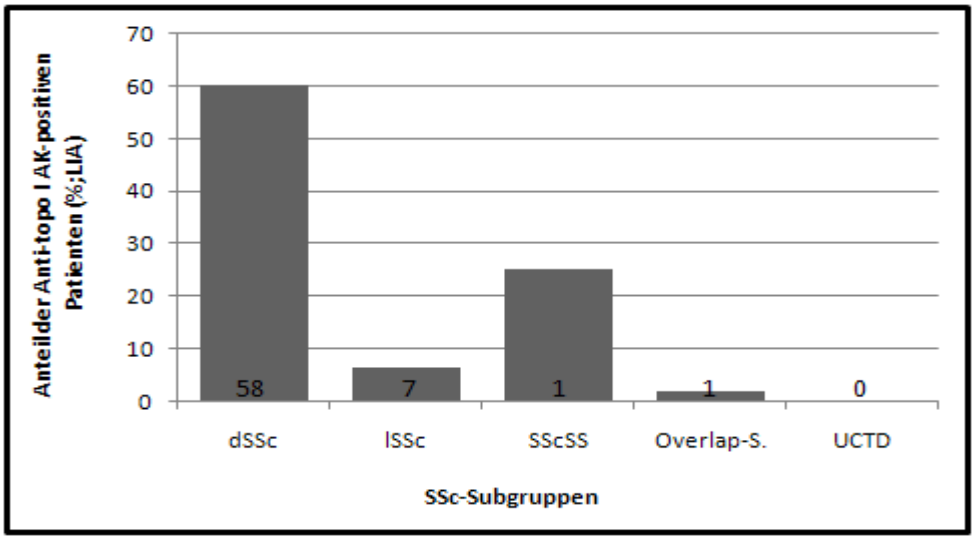


Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung der Anti-topo I-Antikörper-positiven Patienten (%) in den SSc-Subgruppen, Nummern in den Säulen entsprechen den Absolutzahlen

Darüberhinaus zeigt sich bei der Betrachtung der Antikörpertiter, dass die Patienten der untersuchten Kohorte mit einer dSSc im Median einen höheren Anti-Topoisomerase I-Antikörpertiter aufweisen als Patienten mit lSSc (siehe Abbildung 11). Dieser Unterschied stellte sich sowohl im LIA als auch im ELISA signifikant dar ($p < 0{,}0005$). Die mediane Signalintensität der dSSc Patienten lag, gemessen im LIA, bei 160 U (IQR 120) und bei lSSc Patienten bei 135 U (IQR 120).

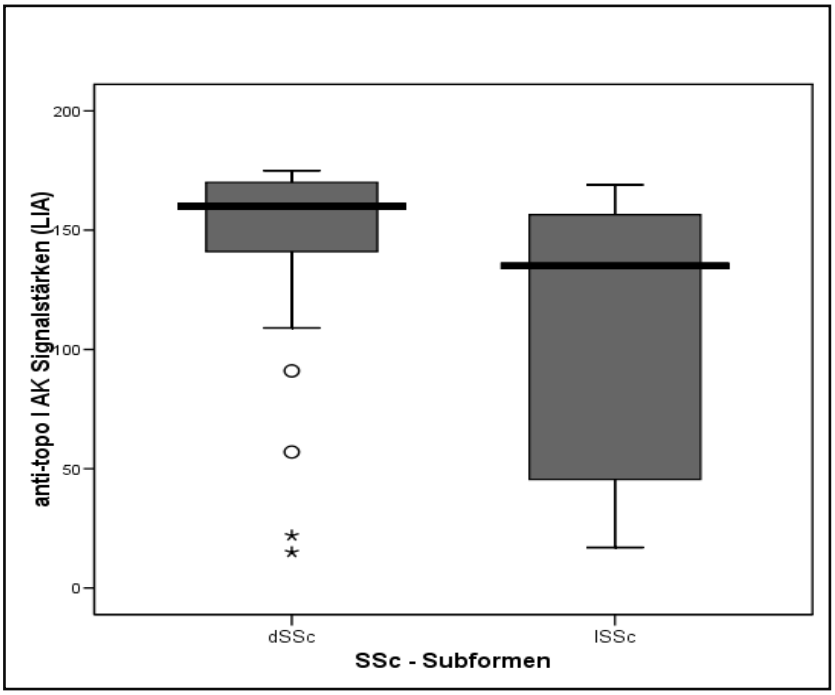


Abbildung 11: Anti-topo-I AK-Titervergleich der Anti-topo I-Antikörper-positiven Patienten mit dSSc und lSSc (LIA)

3.3.1.2 Klinische Assoziationen

Anti-Topoisomerase I-Antikörper zeigen in der untersuchten Kohorte signifikante Assoziationen mit einer vermehrten Gefäßbeteiligung und deren vergesellschafteten Komplikationen.

Bei den Patienten mit Anti-Topoisomerase I-Antikörpern haben 68,7% eine Beteiligung des Gefäßsystems, in der Antikörper-negativen Gruppe sind es nur 34,3% der Patienten ($p < 0,0005$). 57% der Patienten mit Anti-Topoisomerase I-Antikörpern haben oder hatten in der Vergangenheit digitale Ulzerationen. In der Antikörper-negativen Gruppe zeigten diese Komplikation nur 32,2% der Patienten ($p = 0,002$).

In der untersuchten Kohorte zeigten die Anti-Topoisomerase I-Antikörper-positiven Patienten auch vermehrt eine fibrotische Komponente. So haben 68,6% dieser Patienten eine Lungenfibrose, verglichen mit einer Häufigkeit der Lungenfibrose von 23,3% in der Anti-Topoisomerase I-Antikörper-negativen Gruppe ($p < 0,0005$). Bei einer ermittelten Odds-Ratio von 6,78 ergibt sich eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit an einer Lungenfibrose zu erkranken, wenn Anti-Topoisomerase I-Antikörper im Serum vorhanden sind. In der Lungenfunktionsprüfung hatten die Anti-Topoisomerae I-Antikörper-positiven Patienten im Vergleich zu den Antikörper-negativen Patienten zudem signifikant (p-Wert $< 0,0005$) schlechtere Werte für die FVC (80,7% vs. 91,8%) und DLCO-SB (63,2% vs. 72,7%). Von den Patienten mit Normalwerten für die FVC von > 85% haben nur 15,6% Anti-Topoisomerase I-Antikörper. In der Gruppe mit FVC-Werten von 50-69% haben hingegen 55% der Patienten Anti-Topoisomerase I-Antikörper. Die Assoziation zwischen den Gruppen der gemessenen FVC und dem Vorhandensein von Anti-Topoisomerase I-Antikörper zeigte sich signifikant ($p < 0,001$; Abbildung 12). Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch für die DLCO-SB. 15,5% der Patienten mit einer DLCO-SB > 85% waren Anti-Topoisomerase I-Antikörper positiv. Die Häufigkeit der Anti-Topoisomerase I-Antikörper-positiven Patienten stieg auf 43,8% in der Gruppe der Patienten mit einer DLCO-SB < 35%. Auch hier sind die Gruppen der DLCO-SB-Werte signifikant mit der Häufigkeit des Vorkommens von Anti-Topoisomerase I-Antikörpern verbunden ($p = 0,006$, Abbildung 12).

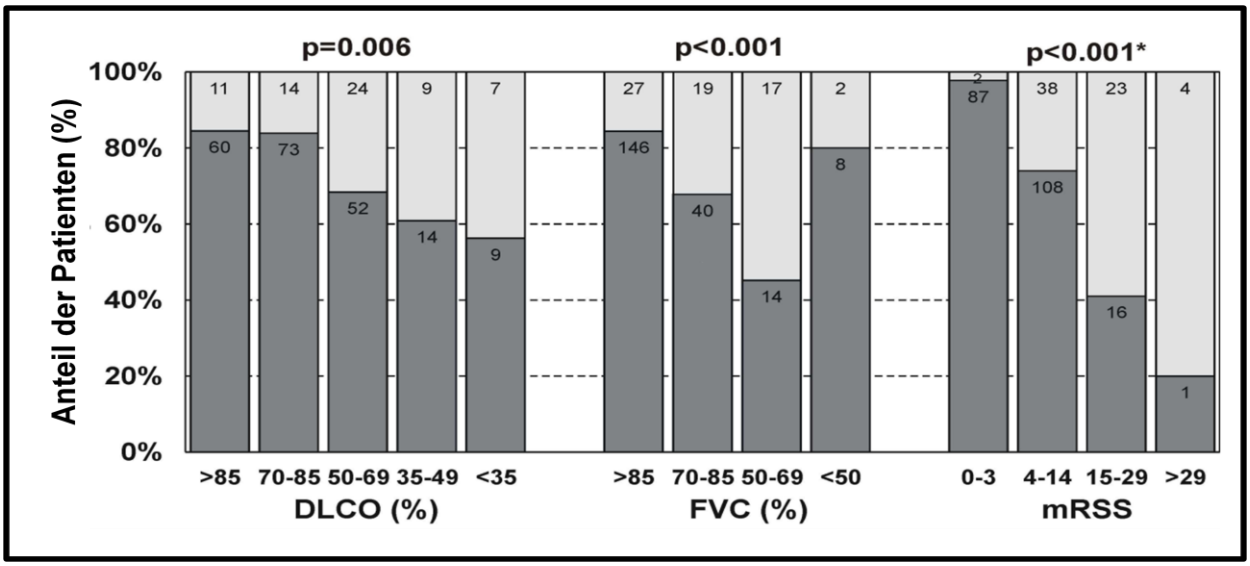


Abbildung 12: Vergleich der prozentualen Verteilung der Patienten in unterschiedlichen Gruppen von DLCO-SB (%), FVC (%) und mRSS, Dunkelgrau = Anti-topo I-AK-negative Patienten, Hellgrau = Anti-topo I-AK- positive Patienten; Nummern in den Balken geben die Absolutzahlen an, * ermittelt im Chi-Quadrat-Test

Darüber hinaus konnte eine schwache negative Korrelation der Signalstärken (LIA) mit den gemessenen FVC (rho = -0,215, p < 0,0005; Tabelle 20) und DLCO-SB-Werten (rho = -0,0219, p < 0,0005; Tabelle 21) festgestellt werden. Dabei galt je höher Signalstärken für die Anti-Topoisomerase I-Antikörper im LIA, desto geringer waren die gemessenen Werte für FVC und DLCO-SB.

			Anti-topo I-AK
Spearman-Rho	FVC (%)	Korrelationskoeffizient	-,215
		Sig. (2-seitig)	,000
		N	271

Tabelle 20: Korrelationstabelle der Anti-topo I-AK-Signalstärke und FVC (%)

			Anti-topo I-AK
Spearman-Rho	DLCO-SB (%)	Korrelationskoeffizient	-,219
		Sig. (2-seitig)	,000
		N	271

Tabelle 21: Korrelationstabelle der Anti-topo I-AK-Signalstärke und DLCO-SB (%)

Patienten mit Anti-Topoisomerase I-Antikörpern haben auch durchschnittlich höhere Werte im mRSS, der ein Maß für die Hautfibrosierung und –sklerosierung darstellt.

So hatten die Anti-Topoisomerase I-Antikörper-positiven Patienten im Median einen mRSS von 10,5 (IQR 13,0) gegenüber den Anti-Topoisomerase I-Antikörper-negativen mit einem medianen mRSS von 4,0 (IQR 5,0; p < 0,0005). Auch hier galt, je höher der mRSS, desto größer ist die

Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Anti-Topoisomerase I-Antikörper im Serum (p < 0,001, Abbildung 12). Nur 2,2% der Patienten mit einem mRSS zwischen 0-3 zeigten sich Anti-Topoisomerase I-Antikörper-positiv im Gegensatz zu 61,4% der Patienten mit einem mRSS >14. Desweiteren konnte eine schwache Korrelation zwischen der Anti-Topoisomerase I-Antikörpersignalstärke und dem mRSS beobachtet werden. Dabei gilt, je höher die Antikörpersignalstärke, desto höher der mRSS in der untersuchten Kohorte (rho 0,413, p < 0,0005; Tabelle 22).

			Anti-topo I-AK
Spearman-Rho	mRSS	Korrelationskoeffizient	,413
		Sig. (2-seitig)	,000
		N	279

Tabelle 22: Korrelationstabelle der Anti-Topoisomerase I-AK-Signalstärke und mRSS

Bei Betrachtung der Patienten mit dSSc ergeben sich ähnliche Ergebnisse. Auch in dieser Untergruppe haben die Anti-Topoisomerase I-Antikörper-positiven Patienten einen höheren Hautfibrosierungsgrad im Vergleich zu den Antikörper-negativen Patienten (p = 0,007).

Darüberhinaus zeigten sich noch weitere Assoziationen zwischen dem Vorkommen von Anti-Topoisomerase I-Antikörpern und klinischen Merkmalen. So traten bei den Antikörper-positiven Patienten häufiger Gelenkkontrakturen (p < 0,0005), Sehnenreiben (p = 0,004) und EKG-Veränderungen (p = 0,02) gegenüber den Antikörper-negativen Patienten auf.

Es konnten keine Assoziationen zwischen dem Vorhandensein von Anti-Topoisomerase I-Antikörpern und der Häufigkeit der PAH, der Nierenbeteiligung, inklusive der renalen Krise, der Herzbeteiligung (außer EKG-Veränderungen), der Nervensystembeteiligung, der Beteiligung des Gastrointestinal-Traktes und der Sicca-Symptomatik gefunden werden.

3.3.1.3 Mortalität und Krankheitsaktivität

Patienten der untersuchten Kohorten mit Anti-Topoisomerase I-Antikörpern zeigten eine höhere Krankheitsaktivität und Mortalität.

Der Krankheitsaktivitätsscore stand bei 266 der 280 eingeschlossenen Patienten zur Verfügung. In der Gruppe der Anti-Topoisomerase I-Antikörper-positiven Patienten lag der mediane Aktivitätsscore bei 2,5 (IQR 2,0), während er bei den Antikörper-negativen Patienten im Median bei 1,5 (IQR 2,0) lag (p < 0,0005). Es zeigt sich eine schwache Korrelation zwischen dem Anti-Topoisomerase I-Antikörpertiter und dem Aktivitätsscore. Dabei gilt je höher die gemessene Signalstärke, desto höher die Krankheitsaktivität (rho = 0,234, p <0,0005; Tabelle 23). Minimal

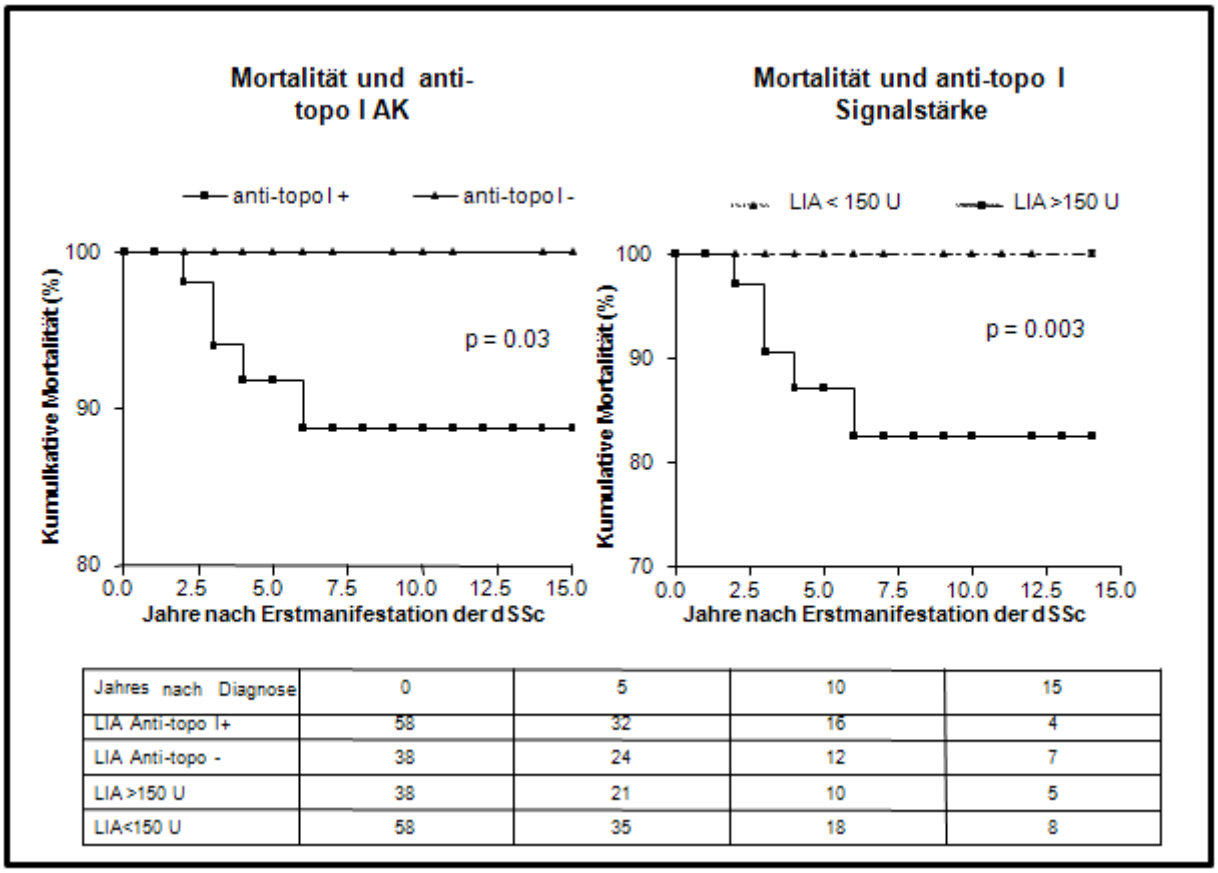
deutlicher zeigte sich diese Korrelation in der Gruppe der Patienten mit dSSc (rho 0,294, p = 0,01, N = 89; Daten nicht gezeigt).

			Anti-topo I-AK
Spearman-Rho	Aktivitätsscore (EUSTAR)	Korrelationskoeffizient	,234
		Sig. (2-seitig)	,000
		N	266

Tabelle 23: Korrelationstabelle der Anti-topo I-AK-Signalstärke und Aktivitätsscore (nach EUSTAR)

16 Patienten der untersuchten Kohorte starben während des Beobachtungszeitraumes, durchschnittlich sieben Jahre nach Diagnosestellung. 14 dieser Patienten starben dabei an SSc-assoziierten Komplikationen, zwei starben an Tumorerkrankungen. Aus der Gruppe der Patienten mit dSSc starben acht Patienten, von diesen Patienten waren fünf positiv für Anti-Topoisomerase I-Antikörper.

Das Vorhandensein von Anti-Topoisomerase I-Antikörper ging in der untersuchten Kohorte mit einer höheren Mortalität einher, insbesondere bei Patienten mit Antikörpertitern über 150U (p = 0,003; Abbildung 13).



Jahres nach Diagnose	0	5	10	15
LIA Anti-topo I+	58	32	16	4
LIA Anti-topo -	38	24	12	7
LIA >150 U	38	21	10	5
LIA<150 U	58	35	18	8

Abbildung 13: Kumulative Mortalität vom Zeitpunkt der Diagnose in Zusammenhang mit dem Anti-topo I-Antikörperstatus in der Kohorte der dSSc-Patienten (n=96). Signalstärken > 150U sind mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (p-Wert=0,003).

3.3.1.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Vorkommen von Anti-Topoisomerase I-Antikörpern besonders mit einer diffusen systemischen Sklerose sowie mit einer erhöhten Häufigkeit der fibrotischen und vaskulären Krankheitskomponenten, der Krankheitsaktivität und Mortalität assoziiert ist. Darüberhinaus konnten Korrelationen zwischen der Höhe des Antikörpertiters und der Schwere der Lungenfunktionsstörung, des Ausmaßes der Hautfibrosierung und dem Aktivitätsgrad der Erkrankung nachgewiesen werden. Eine Assoziation mit einem gehäuften Vorkommen einer PAH bei Antikörper-positiven Patienten konnte nicht gezeigt werden.

3.3.2 ANTI-PM/SCL-ANTIKÖRPER

In der untersuchten Kohorte wurden mit Hilfe des LIA 35 Patienten (12,5%) mit Anti-Pm/Scl-Antikörpern identifiziert. 29 Patienten (10,4%) davon wiesen Anti-Pm/Scl-75-Antikörper auf. Antikörper gegen das Pm/Scl-100-Antigen wurden bei 20 Patienten (7,1%) der untersuchten Kohorte nachgewiesen. In der betrachteten Kontrollkohorte, bestehend aus Patienten mit anderen rheumatischen Erkrankungen, wie RA, SLE und SS sowie gesunden Probanden, wurden Anti-Pm/Scl-100- bzw. Anti-Pm/Scl-75-Antikörper jeweils nur bei vier Patienten nachgewiesen.

Anti-Pm/Scl-100-Antikörper wurden bei jeweils einem Patienten mit Sjögren Syndrom (2%) und bei drei von 72 Patienten mit SLE (4,2%) nachgewiesen. Anti-Pm/Scl-75-Antikörper fanden sich bei einem Patienten mit SLE (1,4%) und bei drei von 88 Patienten mit RA (3,4%), wobei es bei keinem der Kontrollseren zu einem Auftreten beider Anti-Pm/Scl-Antikörper simultan kam. Darüberhinaus wies keiner der gesunden Blutspender Anti-Pm/Scl-Antikörper im Serum auf.

Zusammenfassend ergab die Analyse der 280 Patientenseren und der 259 Kontrollseren eine Spezifität von 98,5% für jeden der beiden untersuchten Anti-Pm/Scl-Antikörper. Anti-Pm/Scl-75-Antikörper haben in der untersuchten Kohorte eine niedrige diagnostische Sensitivität für die systemische Sklerose von 10,4%. Anti-Pm/Scl-100-Antikörper weisen eine diagnostische Sensitivität von 7,1% auf.

3.3.2.1 Betrachtung nach SSc-Gruppen

Am häufigsten wiesen Patienten mit dSSc bzw. Overlap-Syndromen Anti-Pm/Scl-Antikörper auf (19,8% bzw. 17,6%). Bei den Patienten mit lSSc wurden Anti-Pm/Scl-Antikörper bei 3,5% der Patienten im Serum detektiert (Abbildung 14).

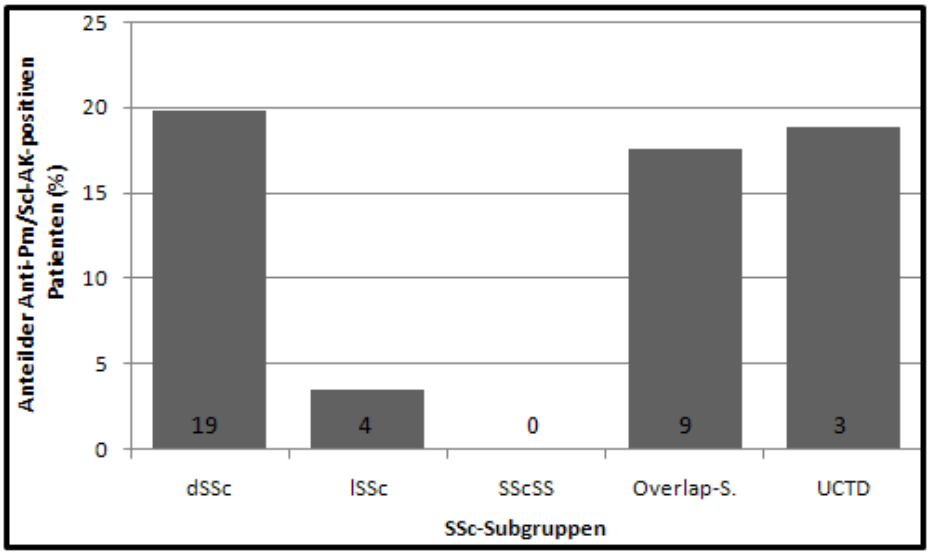


Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung der Anti-Pm/Scl-AK-positiven Patienten (%) in den SSc-Subgruppen; Nummern in den Säulen entsprechen den Absolutzahlen

3.3.2.2 Konkordanz der Antikörper nach SSc-Subgruppen

Eine ausführliche Analyse der Konkordanz der verschiedenen untersuchten Autoantikörper ist bereits zu Beginn des Kapitels aufgeführt. An dieser Stelle soll noch einmal kurz auf die Konkordanz speziell der Anti-Pm/Scl-Antikörper in Bezug auf die zugrundeliegenden SSc-Subgruppen eingegangen werden, da dies interessante Unterschiede zwischen den verschiedenen Anti-Pm/Scl-Antikörpern, aber auch zwischen den SSc-Subgruppen zeigt.

Beim Betrachten der einzelnen SSc-Subgruppen zeigten sich folgende Ergebnisse (vergleiche Abbildung 15). Von den 19 Anti-Pm/Scl-Antikörper positiven Patienten mit einer dSSc wiesen 18 Anti-Pm/Scl-75-Antikörper (94,7%) auf, 13 dieser Patientenseren enthielten zusätzlich noch Anti-Topoisomerase I-Antikörper.

Bei den Patienten mit lSSc wiesen drei der vier Anti-Pm/Scl-Antikörper-positiven Patienten Anti-Pm/Scl-100-Antikörper im Serum auf. Der Patient mit Anti-Pm/Scl-75-Antikörpern zeigte zusätzlich auch eine positive Reaktion für Anti-CENP-B-Antikörper. Bei Betrachtung der Ergebnisse der Odds-Ratio fällt auf, dass die Chance in der untersuchten Kohorte ein Overlap-Syndrom zu haben, deutlich höher ist, wenn Anti-Pm/Scl-100-Antikörper anstelle der Anti-Pm/Scl-75-Antikörper nachgewiesen worden sind (OR 4,25 bzw. 1,19). Für die dSSc gilt Umgekehrtes. Das Risiko dieses Phänotypes ist erhöht, wenn Anti-Pm/Scl-75-Antikörper im Serum nachzuweisen sind (OR 3,63).

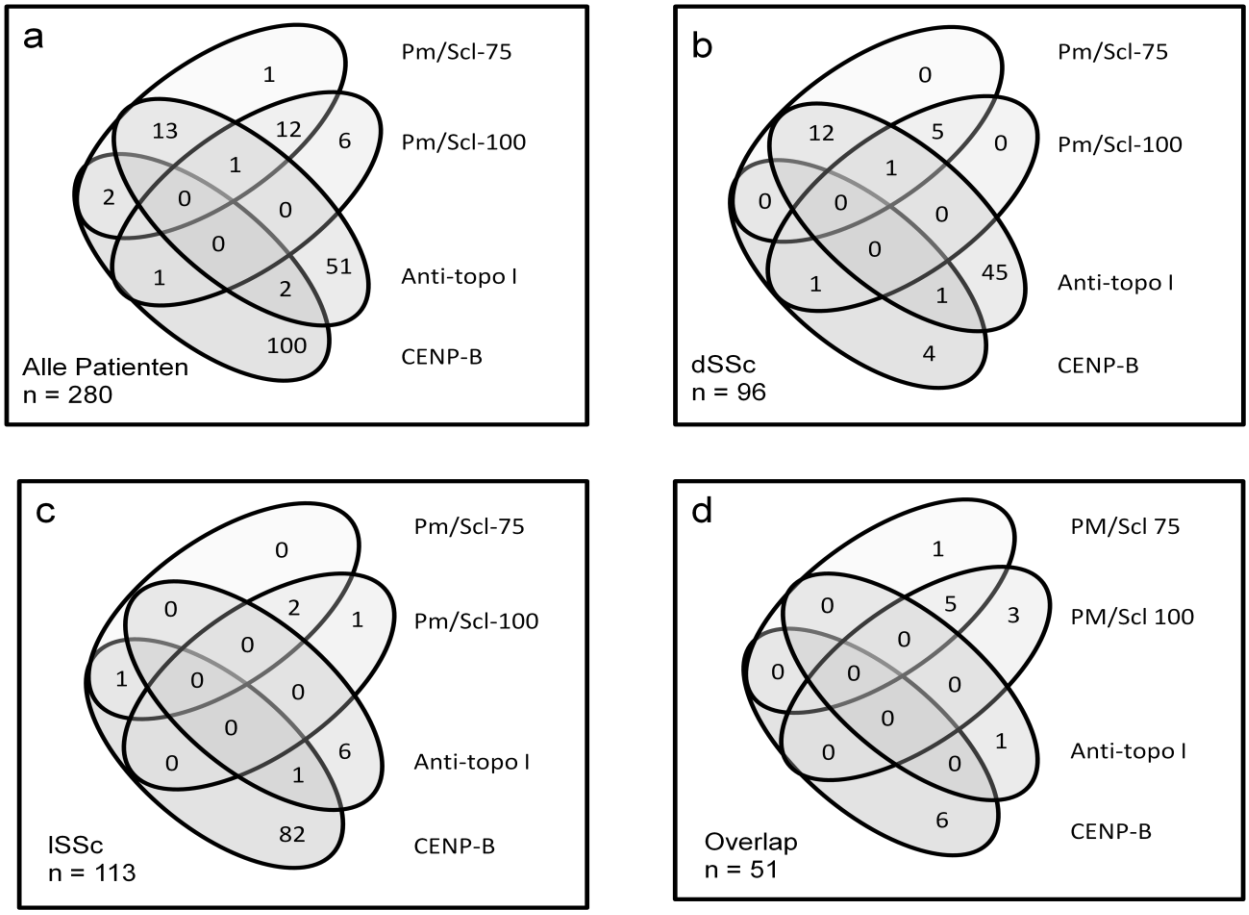


Abbildung 15: Konkordanz der Anti-Pm/Scl-75/-100-, Anti-topo I- und Anti-CENP-B-Antikörper, a – alle Patienten, b – dSSc Patienten, c – lSSc Patienten, d – Patienten mit Overlap-Syndrom

3.3.2.3 Antikörpertiter nach SSc-Gruppen

Die in der untersuchten Kohorte gemessenen Signalstärken scheinen in ihrer Höhe ebenfalls mit der zugrundeliegenden SSc-Form des Patienten assoziiert zu sein. Patienten mit einem Overlap-Syndrom zeigen dabei die größten Signalintensitäten für Anti-Pm/Scl-75-Antikörper. Dabei lag die mediane Signalintensität bei 92,7 U und war damit signifikant höher im Vergleich zu den Signalstärken, wie sie bei Patienten mit dSSc ($p = 0{,}03$) oder RA ($p = 0{,}02$) gemessen werden konnten (Abbildung 16a). Signalstärken über 70 Units wurden fast ausschließlich bei Patienten mit Overlap-Syndromen gefunden. Lediglich ein Patient mit dSSc zeigte eine Signalstärke von 142 U. Im Median lag die gemessene Signalintensität für Patienten mit dSSc bei 27,6 U und für Patienten mit lSSc bei 37 U. Einschränkend muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die Fallzahlen für diese Analyse jedoch sehr gering und die Streuung recht groß ist.

Bei der Betrachtung der Signalstärken für Anti-Pm/Scl-100-Antikörper konnten keine bedeutsamen Unterschiede zwischen den einzelnen SSc-Formen ermittelt werden, es zeigte sich lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen den gemessenen Signalstärken bei den Patienten mit Overlap-Syndrom und den Patienten mit SLE ($p = 0{,}02$; Abbildung 16b).

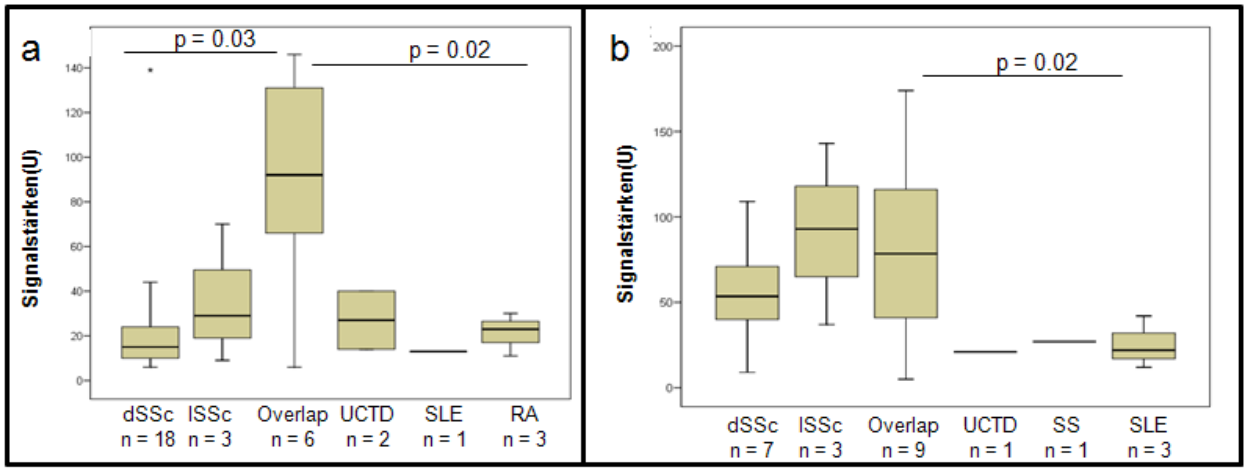


Abbildung 16: Vergleich der Anti-Pm/Scl-75- (a) und Anti-Pm/Scl-100- (b) Antikörpersignalstärken in verschiedenen SSc-Subformen und Kontrollgruppen, signifikante Unterschiede zwischen zwei Formen als p-Werte (Mann-Whitney-Test) dargestellt

3.3.2.4 Klinische Assoziationen

Bei der Analyse der Anti-Pm/Scl-Antikörper (unabhängig vom Subtyp) bezüglich ihrer Assoziationen mit klinischen Merkmalen ergaben sich für die Antikörper-positiven Patienten eine häufigere Beteiligung des muskuloskelettalen Systems sowie der Lunge.

Anti-Pm/Scl-Antikörper-positive Patienten wiesen in der untersuchten Kohorte signifikant häufiger eine Lungenfibrose (p = 0,004) und damit verbunden einen restriktiven Defekt in der Lungenfunktionsprüfung auf (p = 0,003).

Seltener hingegen litten die Patienten der untersuchten Kohorte, welche Anti-Pm/Scl-Antikörper im Serum aufwiesen, an einer PAH (8,6% gegenüber 23,3%; p = 0,049).

Es zeigt sich darüberhinaus auch eine Assoziation mit digitalen Ulzerationen, welche bei den Anti-Pm/Scl-Antikörper-positiven Patienten signifikant häufiger zu beobachten waren (p = 0,005).

Patienten mit Anti-Pm/Scl-Antikörpern haben eine deutlich höhere Prävalenz einer CK-Erhöhung im Serum, welche als Marker einer myositischen Komponente gewertet werden kann (p = 0,002). So wiesen 31,4% der Antikörper-positiven Patienten diese Blutwerterhöhung auf, wohingegen dies nur 9,7% der Antikörper-negativen Patienten zutraf.

Es zeigten sich keine Assoziationen zwischen dem Vorkommen von Anti-Pm/Scl-Antikörpern und dem vermehrten oder verminderten Auftreten einer Herz-, Nieren-, gastrointestinalen und Nervensystembeteiligung sowie dem Sicca-Syndrom.

Eine signifikante Assoziation zwischen gehäufter Mortalität und dem Vorkommen von Anti-Pm/Scl-Antikörpern konnte nicht gefunden werden. Allerdings starben während des gesamten Beobachtungszeitraumes 4 der 29 Anti-Pm/Scl-75-Antikörper-positiven Patienten (13,8%) an

SSc-assoziierten Komplikationen (Ausnahme: eine Patientin verstarb an einem Mamma-Karzinom). In der Gesamtkohorte starben mit 6,1% aller Patienten deutlich weniger.
Um die diagnostische Wertigkeit der unterschiedlichen Antikörper gegen Pm/Scl-Antigene zu beurteilen, werden im folgenden Abschnitt die Assoziationen mit klinischen Merkmalen jeweils für die zwei Antikörper gegen die verschiedenen Pm/Scl-Antigene (Pm/Scl-75 und Pm/Scl-100) einzeln betrachtet.

Anti-Pm/Scl-75-Antikörper
Das Vorhandensein von Anti-Pm/Scl-75-Antikörpern identifiziert einen speziellen Subtyp von Patienten.
Patienten, welche Anti-Pm/Scl-75-Antikörper im Serum aufwiesen, zeigten eine deutlich höhere Prävalenz einer vaskulären Beteiligung (p = 0,003). Diese konnte bei 69,0% der Anti-Pm/Scl-75-Antikörper-positiven Patienten und bei 39,4% der Anti-Pm/Scl-75-Antikörper-negativen Patienten festgestellt werden. Signifikant häufiger wiesen die Anti-Pm/Scl-75-Antikörper-positiven Patienten darüberhinaus auch digitale Ulzerationen aktuell oder in der Vergangenheit (p = 0,005) auf.
Bei Betrachtung der medianen Werte des mRSS zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Anti-Pm/Scl-75-Antikörper-positiven und -negativen Patienten. So wies die Antikörper-positive Gruppe einen medianen mRSS-Wert von 9,00 (IQR 12) gegenüber 5,0 (IQR 8) der Antikörper-negativen Gruppe auf (p = 0,017). Dieser Zusammenhang lässt sich auch als schwache, gleichgerichtete Korrelation der gemessenen Anti-Pm/Scl-75-Antikörpersignalstärken und der mRSS-Werte darstellen (rho 0,226; p < 0,0005; Tabelle 24).

			Anti-Pm/Scl-75-AK
Spearman-Rho	mRSS	Korrelationskoeffizient	,226
		Sig. (2-seitig)	,000
		N	279

Tabelle 24: Korrelationstabelle der Anti-Pm/Scl-75-Ak-Signalstärke und mRSS

Patienten mit Anti-Pm/Scl-75-Antikörpern haben häufiger eine Lungenbeteiligung. Eine Lungenfibrose konnte bei 55,2% aller Anti-Pm/Scl-75-Antikörper-positiven Patienten gefunden werden, während sie bei den Antikörper-negativen Patienten nur bei 32,7% beobachtet wurde (p = 0,023). Die Antikörper-positiven Patienten litten dementsprechend auch signifikant häufiger an einer restriktiven Lungenfunktionseinschränkungen (62,1% gegenüber 32,2%; p = 0,001). Die Korrelation zwischen den gemessenen Antikörpersignalstärken und den FVC- bzw. den DLCO-

SB-Werten ist dabei als sehr schwach negativ zu betrachten (vergleiche Tabelle 25 und Tabelle 26).

			Anti-Pm/Scl-75-AK
Spearman-Rho	FVC (%)	Korrelationskoeffizient	-,210
		Sig. (2-seitig)	,001
		N	271

Tabelle 25: Korrelationstabelle der Anti-Pm/Scl-75-AK-Signalstärke und der FVC (%)

			Anti-Pm/Scl-75-AK
Spearman-Rho	DLCO-SB (%)	Korrelationskoeffizient	-,141
		Sig. (2-seitig)	,020
		N	271

Tabelle 26: Korrelationstabelle der Anti-Pm/Scl-75-AK-Signalstärke und der DLCO-SB (%)

Signifikante Unterschiede zwischen den Anti-Pm/Scl-75-Antikörper-positiven und -negativen Patienten wurden auch bei der Beteiligung des Bewegungsapparates gefunden. Antikörper-positive Patienten wiesen signifikant häufiger Gelenkkontrakturen und Muskelatrophien auf (p = 0,044 bzw. 0,032). Auch eine CK-Erhöhung im Serum als Marker einer myositischen Komponente wurde bei 34,5% der Anti-Pm/Scl-75-Antikörper-positiven und nur bei 10,8% der Anti-Pm/Scl-75-Antikörper-negativen Patienten (p = 0,002) gemessen.

Die Krankheitsaktivität ist bei den Anti-Pm/Scl-75-Antikörper-positiven Patienten erhöht. Sie wiesen in unserer Kohorte im Median einen Score von 2,0 (IQR 2,0) gegenüber von 1,5 (IQR 2,0) bei den Antikörper-negativen Patienten auf (p = 0,037). Dies lässt sich auch in einer schwachen Korrelation zwischen den gemessenen Signalstärken und dem Aktivitätsscore zeigen (rho 0,205; p = 0,001; Tabelle 27).

			Anti-Pm/Scl-75-AK
Spearman-Rho	Aktivitätsscore (EUSTAR)	Korrelationskoeffizient	,205
		Sig. (2-seitig)	,001
		N	266

Tabelle 27: Korrelationstabelle der Anti-Pm/Scl-75-AK-Signalstärke und dem Aktivitätsscore (nach EUSTAR)

Darüberhinaus lag der Krankheitsbeginn bei den Anti-Pm/Scl-75-Antikörper-positiven Patienten im Schnitt bei 44,2 Jahren (SD 17,6 Jahre), was einem Beginn von durchschnittlich sechs Jahren vor den Anti-Pm/Scl-75-Antikörper-negativen Patienten mit 50,4 Jahren (SD 13,8 Jahre; p = 0,057) entspricht.

Anti-Pm/Scl-100-Antikörper

Das Vorhandensein von Anti-Pm/Scl-100-Antikörpern in den Seren der untersuchten Kohorte zeigte weniger Assoziationen mit den betrachteten klinischen Merkmalen. Ähnlich den Patienten mit Anti-Pm/Scl-75-Antikörpern zeigten die Patienten mit Anti-Pm/Scl-100-Antikörpern ebenfalls häufiger eine Erhöhung der CK im Serum (35%) als die Anti-Pm/Scl-100-Antikörper-negativen Patienten (11,5%; p = 0,009). Es konnte nur eine Tendenz zwischen dem Vorhandensein von Anti-Pm/Scl-100-Antikörpern und der erhöhten Häufigkeit einer Lungenfibrose bei den Patienten gefunden werden (p = 0,086).

Etwas geringer war die Häufigkeit von gastrointestinalen Beschwerden der Patienten mit Anti-Pm/Scl-100-Antikörpern. Nur 55% der Antikörper-positiven Patienten berichteten von regelmäßigen Diarrhoen, im Vergleich zu 78,5% der Anti-Pm/Scl-100-Antikörper-negativen Patienten (p = 0,026). 15% gaben an regelmäßig an Emesis zu leiden, wohingegen es bei den Antikörper-negativen Patienten 38,5% waren (p = 0,036). 20% der Anti-Pm/Scl-100-Antikörper-positiven Patienten litten regelmäßig an Obstipation. In der Antikörper-negativen Gruppe gaben 44,2% der Patienten an, daran zu leiden (p = 0,037).

Beim Vergleich des Alters bei Erkrankungsbeginn zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Anti-Pm/Scl-100-Antikörper-positiven und -negativen Gruppe (48,3 Jahre vs. 49,8 Jahre). Auch ergab sich keine bedeutsame Korrelation zwischen den gemessenen Signalstärken und dem Krankheitsaktivitätsscore (Tabelle 28).

			Anti-Pm/Scl-100-AK
Spearman-Rho	Aktivitätsscore (EUSTAR)	Korrelationskoeffizient	-,013
		Sig. (2-seitig)	,838
		N	266

Tabelle 28: Korrelationstabelle der anti-Pm/Scl-100 AK-Signalstärke und dem Aktivitätsscore

Es konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen den gemessenen Anti-Pm/Scl-100-Antikörpersignalintensitäten und dem Grad der Hautfibrosierung bzw. den Lungenfunktionsparametern gefunden werden (vergleiche Tabelle 29, Tabelle 30 und Tabelle 31).

			Anti-Pm/Scl-100-AK
Spearman-Rho	mRSS	Korrelationskoeffizient	,024
		Sig. (2-seitig)	,689
		N	279

Tabelle 29: Korrelationstabelle der Anti-Pm/Scl-100-AK-Signalstärke und mRSS

			Anti-Pm/Scl-100-AK
Spearman-Rho	DLCO-SB (%)	Korrelationskoeffizient	,024
		Sig. (2-seitig)	,690
		N	271

Tabelle 30: Korrelationstabelle der Anti-Pm/Scl-100-AK-Signalstärke und der DLCO-SB (%)

			Anti-Pm/Scl-100-AK
Spearman-Rho	FVC (%)	Korrelationskoeffizient	-,095
		Sig. (2-seitig)	,117
		N	271

Tabelle 31: Korrelationstabelle der Anti-Pm/Scl-100-AK-Signalstärke und der FVC (%)

3.3.2.5 Zusammenfassung

Die Häufigkeit des Vorkommens der verschiedenen Anti-Pm/Scl-Antikörper ist in den einzelnen SSc-Subformen deutlich unterschiedlich. Patienten mit einer dSSc zeigen fast ausschließlich eine Reaktion gegen das Pm/Scl-75 Antigen, während Patienten mit Overlap-Syndromen beide Autoantikörper im Serum aufweisen können. Patienten mit lSSc haben eine geringe Prävalenz von Anti-Pm/Scl-Antikörpern im Serum und weisen dann aber überwiegend Anti-Pm/Scl-100-Antikörper auf.

Die Häufigkeit und Bedeutsamkeit der Assoziationen zu klinischen Merkmalen sind stark unterschiedlich bei den beiden untersuchten Anti-Pm/Scl-Antikörpern ausgeprägt. Anti-Pm/Scl-75-Antikörper weisen in der untersuchten Kohorte deutlich stärkere Assoziationen und Korrelationen zur Klinik der systemischen Sklerose auf als Anti-Pm/Scl-100-Antikörper.

3.3.3 Anti-CENP-A- und Anti-CENP-B-Antikörper

Anti-CENP-A- und -B-Antikörper haben in der untersuchten Kohorte jeweils eine Prävalenz von 36,8% (n=103) und sind damit die am häufigsten nachgewiesenen Antikörper. Bei den untersuchten Kontrollseren konnten Anti-CENP-B-Antikörper bei einem Patienten mit Sjögren Syndrom (2%), bei einem Patienten mit systemischen Lupus erythrematodes (1,4%) und bei drei Patienten mit Rheumatoider Arthritis (3,4%), aber bei keinem der gesunden Blutspender nachgewiesen werden. Daraus ergibt sich eine diagnostische Spezifität der Anti-CENP-B-Antikörper für die systemische Sklerose in der untersuchten Kohorte von 98,1% bei einer diagnostischen Sensitivität von 36,8%. Anti-CENP-A-Antikörper-positive Seren fanden sich ebenfalls in den Kontrollgruppen. Dabei wies der gleiche Patient mit Sjögren Syndrom (2%) neben den Anti-CENP-B-Antikörpern auch Anti-CENP-A-Antikörper auf. Bei den Patienten mit

SLE fanden sich fünf Patienten mit Anti-CENP-A-Antikörpern (6,9%), wobei auch hier ein doppelt positiver Patient zu finden ist. In der Gruppe der Patienten mit rheumatoider Arthritis wurden Anti-CENP-A-Antikörper bei einem von 88 Patienten (1,1%) nachgewiesen. Daraus ergibt sich eine diagnostische Spezifität der Anti-CENP-A-Antikörper für die systemische Sklerose in der untersuchten Kohorte von 97,3% bei einer diagnostischen Sensitivität von 36,8%.

3.3.3.1 Konkordanz der Antikörper untereinander

Es wurden mit Hilfe des LIA 106 Patienten mit Anti-CENP-B- oder Anti-CENP-A-Antikörpern identifiziert. Von diesen Patienten konnten bei 100 sowohl Anti-CENP-B- als auch Anti-CENP-A-Antikörper im Serum nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Übereinstimmung von 94,3% (Abbildung 17). Jeweils drei Patienten wiesen nur einen der beiden Antikörper auf.

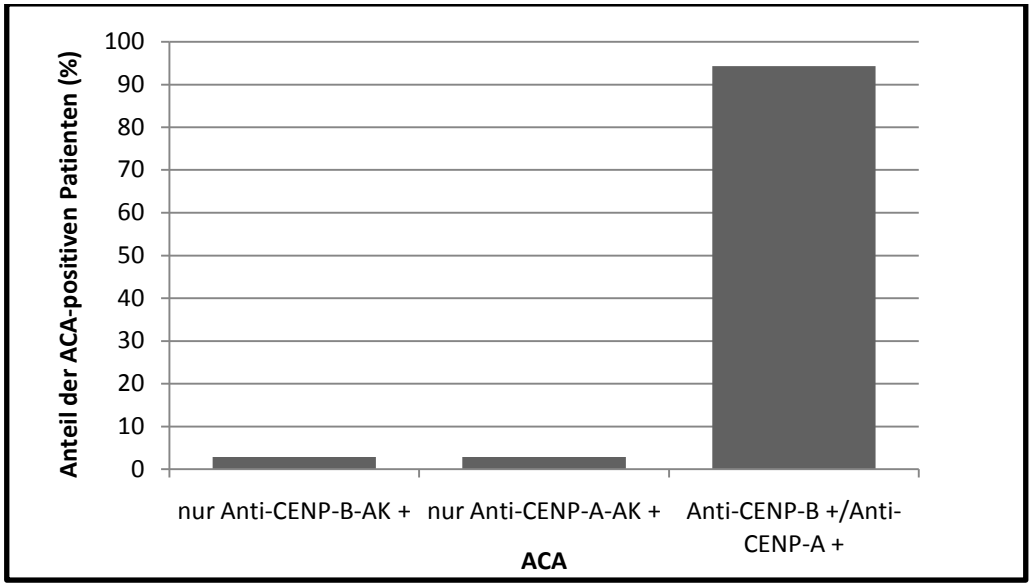


Abbildung 17: Häufigkeiten und Konkordanz der Anti-Centromer-Antikörper (ACA) in der Gesamtkohorte in %

3.3.3.2 Betrachtung nach SSc-Gruppen

Anti-Centromer-Antikörper charakterisieren Patienten mit lSSc. 84 der 103 Anti-CENP-B-Antikörper-positiven Patienten haben eine lSSc, dies entspricht 74,3% aller lSSc-Patienten. Bei den Anti-CENP-A-Antikörper-positiven Patienten sind es 82 Patienten mit lSSc (72,6%). Von den 96 Patienten mit dSSc haben sechs Patienten (6,3%) Anti-CENP-B-Antikörper und sieben (7,3%) Anti-CENP-A-Antikörper. Die gleichen Häufigkeiten ergeben sich für die Patienten mit Overlap-Syndromen. Bei den Patienten mit SSc sine Skleroderma hat jeweils einer bzw. haben zwei Patienten Anti-CENP-B- bzw. Anti-CENP-A-Antikörper. Sechs Patienten mit UCTD haben Anti-CENP-B-Antikörper. Fünf Patienten mit UCTD haben Anti-CENP-A-Antikörper (Abbildung 18).

Sind Anti-CENP-B- bzw. Anti-CENP-A-Antikörper im Serum vorhanden ist die Chance eine lSSc zu entwickeln 22,5- bzw. 18,4- fach erhöht. Die Odds-Ratio bei Betrachtung der dSSc beträgt hingegen nur 0,06 (bzw. 0,07) und deutet somit auf eine protektive Wirkung hin.

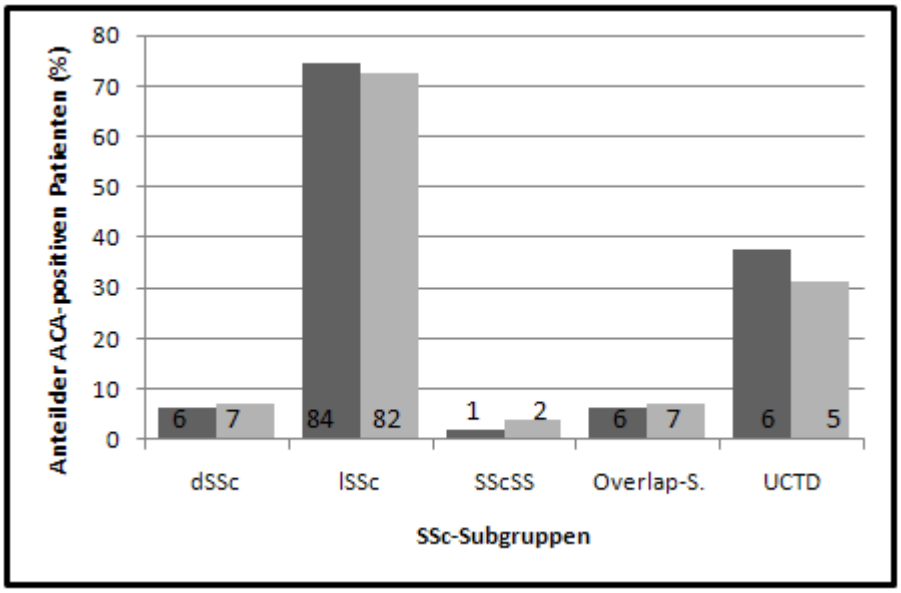


Abbildung 18: Häufigkeitsverteilung der Anti-CENP-B-Antikörper (dunkelgrau) und der Anti-CENP-A-Antikörper (hellgrau) in den verschiedenen SSc-Subgruppen; Nummern in den Säulen entsprechen den Absolutzahlen

3.3.3.3 Antikörpertiter nach SSc-Gruppen

Betrachtet man die Signalstärken der untersuchten Anti-Centromer-Antikörper, so lassen sich keine bedeutsamen Unterschiede zwischen den einzelnen SSc-Subformen feststellen, insbesondere auch nicht für die lSSc. Die gemessenen Intensitäten der Anti-CENP-B-Antikörper lagen im Median höher (156 U; IQR 21) als die der Anti-CENP-A-Antikörper (115 U; IQR 33), dies könnte aber die Ursache im verwendeten Testsystem haben.

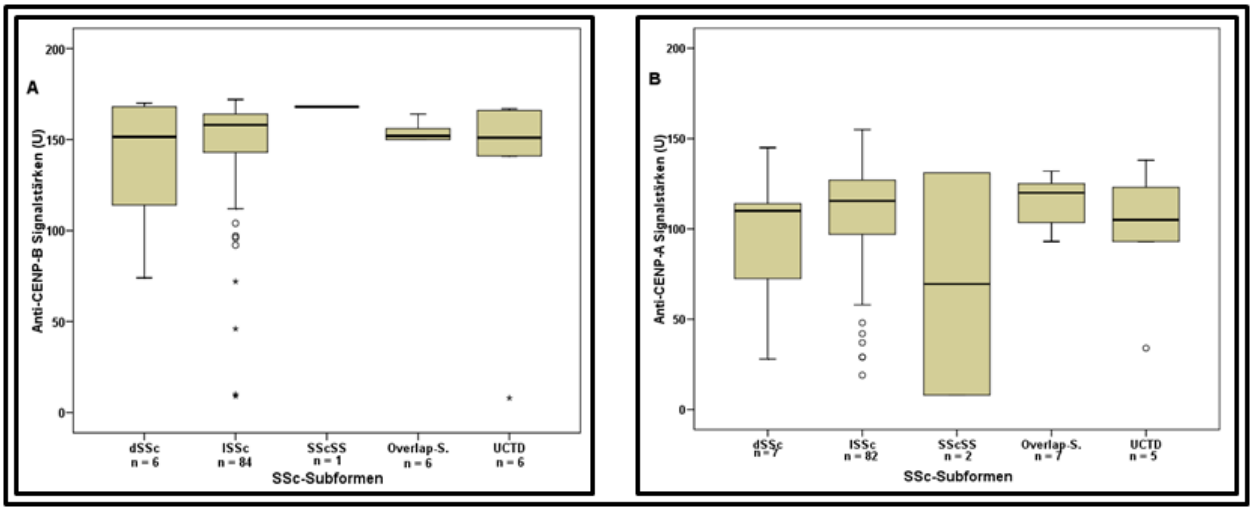


Abbildung 19: Vergleich der Anti-CENP-B- (A) und der Anti-CENP-A- (B) AK-Signalstärken (LIA) in den verschiedenen SSc-Subformen

3.3.3.4 Klinische Assoziationen der Anti-CENP-B-Antikörper

Im folgenden Abschnitt werden die Assoziationen der klinischen Merkmale und des Vorkommens von Anti-CENP-B-Antikörpern dargestellt.

Patienten mit Anti-Centromer-Antikörpern sind durch ein geringes Ausmaß der Fibrosierung gekennzeichnet.

Eine Lungenfibrose konnte bei 13,6% der Anti-CENP-B-Antikörper-positiven Patienten nachgewiesen werden, im Vergleich zu 47,5% der Anti-CENP-B-Antikörper-negativen Patienten ($p < 0,0005$). Bei einer berechneten Odds-Ratio von 0,17 könnte sogar von einem protektiven Faktor ausgegangen werden. Allerdings ist dieses Risikomaß kein beweisendes Kausalitätsmaß. Auch die Ergebnisse der durchgeführten Lungenfunktionstests (FVC, DLCO-SB) zeigen eine deutlich geringere Beeinträchtigung der Patienten mit Anti-CENP-B-Antikörpern im Serum ($p < 0,0005$). Patienten mit Anti-CENP-B-Antikörpern haben im Median eine DLCO-SB von 79,0% (IQR 22,0) und eine mediane FVC 99,1% (IQR 22,0). In der Anti-CENP-B-Antikörper-negativen Gruppe lagen die medianen Messergebnisse für die DLCO-SB bei 69,4% (IQR 28,0) und für die FVC bei 85,6% (IQR 26,0). Darüber hinaus zeigten sich keine Korrelationen zwischen den Anti-CENP-B-Antikörpersignalstärken und den gemessenen Lungenfunktionswerten (vergleiche Tabelle 32 und Tabelle 33).

			Anti-CENP-B-AK
Spearman-Rho	FVC (%)	Korrelationskoeffizient	-,042
		Sig. (2-seitig)	,681
		N	99

Tabelle 32: Korrelationstabelle der Anti-CENP-B-AK-Signalstärken und der FVC (%)

			Anti-CENP-B-AK
Spearman-Rho	DLCO-SB (%)	Korrelationskoeffizient	-,160
		Sig. (2-seitig)	,109
		N	101

Tabelle 33: Korrelationstabelle der Anti-CENP-B-AK-Signalstärken und der DLCO-SB (%)

Ein geringes Ausmaß an Fibrosierung und Sklerosierung spiegelt sich auch beim Vergleich der mRSS-Werte zwischen den Anti-CENP-B-Antikörper-positiven und -negativen Patienten wider ($p < 0,0005$). Bei den Anti-CENP-B-Antikörper-positiven Patienten lag der mRSS-Wert im Median bei 4,0 (IQR 4,0), wohingegen er bei den Anti-CENP-B-Antikörper-negativen Patienten mit 7,0 (IQR 11,0) fast doppelt so hoch lag. Es konnte eine schwache Korrelation zwischen der gemessenen Anti-CENP-B-Antikörpersignalstärke und der Höhe des mRSS nachgewiesen

werden. Es gilt dabei, je höher die gemessenen Signalstärke des Antikörpers, desto höher der Grad der Fibrosierung (rho 0,235; p = 0,017; Tabelle 34).

			Anti-CENP-B-AK
Spearman-Rho	mRSS	Korrelationskoeffizient	,235
		Sig. (2-seitig)	,017
		N	103

Tabelle 34: Korrelationstabelle der Anti-CENP-B-AK-Signalstärke und mRSS

Das Ausmaß der vaskulären Beteiligung ist in der Anti-CENP-B-Antikörper-positiven Patientengruppe ebenfalls deutlich geringer. Während bei den Anti-CENP-B-Antikörper-negativen Patienten 49,7% eine vaskuläre Beteiligung und 44,6% digitale Ulzerationen aufweisen, sind es bei den Anti-CENP-B-Antikörper-positiven Patienten lediglich 30,1% bzw. 32% (p = 0,002 bzw. p = 0,043).

Es zeigte sich eine seltenere Herzbeteiligung bei den Anti-CENP-B-Antikörper-positiven Patienten der untersuchten Kohorte. Bei 29,1% der Anti-CENP-B-Antikörper-positiven Patienten konnte diese nachgewiesen werden, während dies in der Antikörper-negativen Gruppe für 47,5% der Patienten zutraf (p = 0,004).

Keine signifikanten Unterschiede konnten dabei für die Häufigkeit von Erregungsleitungsstörungen oder diastolischer Dysfunktion festgestellt werden.

Auch eine Beteiligung des Bewegungsapparates ist seltener in der Anti-CENP-B-Antikörper-positiven Patientengruppe zu finden. 53,4 % dieser Patienten litten an Gelenkkontrakturen und bei 6,8% konnte eine CK-Erhöhung im Serum gemessen werden. Von den Anti-CENP-B-Antikörper-negativen Patienten hatten 66,1% Gelenkkontrakturen (p = 0,042) und 16,9% eine CK-Erhöhung (p = 0,017).

Der Krankheitsbeginn bei den Anti-CENP-B-Antikörper-positiven Patienten lag im Schnitt bei 55,5 Jahren (SD 13,8 Jahre), was einem Beginn von durchschnittlich fünf Jahren später als bei den Anti-CENP-B-Antikörper-negativen Patienten mit 48,0 Jahren (SD 14,4 Jahre; p = 0,004) entspricht. Während des Beobachtungszeitraumes verstarben 5 Patienten, der Anti-CENP-B-Antikörper-positiven Patienten (4,9%).

Es konnten keine Assoziationen zwischen dem Vorkommen von Anti-CENP-B-Antikörpern und der Häufigkeit einer Beteiligung des Gastrointestinaltrakts, der Nieren und des Nervensystems sowie des Sicca-Syndroms gefunden werden.

3.3.3.5 Krankheitsaktivität

Der Vergleich der Höhe des Krankheitsaktivitätsscores der Anti-CENP-B-Antikörper-positiven Patienten zu den negativen Patienten zeigt einen deutlichen Unterschied. Die Antikörper-positiven Patienten wiesen im Median eine geringere Krankheitsaktivität mit 1,0 (IQR 1,5) im Vergleich zu den Antikörper-negativen Patienten mit 2,0 (IQR 2,0; p < 0,0005) auf. Eine Korrelation zwischen den Anti-CENP-B-Antikörpersignalstärken und den Werten des Aktivitätsscores konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 35).

			Anti-CENP-B-AK
Spearman-Rho	Aktivitätsscore (EUSTAR)	Korrelationskoeffizient	,152
		Sig. (2-seitig)	,133
		N	99

Tabelle 35: Korrelationstabelle der Anti-CENP-B-AK-Signalstärke und des Aktivitätsscores (nach EUSTAR)

3.3.3.6 Klinische Assoziationen der Anti-CENP-A-Antikörper

Aufgrund der hohen Konkordanz (94,3%) der Anti-CENP-A- und –B-Antikörper ergeben sich bei der Analyse der Assoziation mit klinischen Merkmalen nur marginale Unterschiede zwischen beiden Antikörpern (vergleiche Tabelle 35). Aus diesem Grund wird auf die ausführliche Darstellung der Ergebnisse an dieser Stelle verzichtet.

Klinische Manifestationen	Anti-CENP-B-AK positiv n = 103	Anti-CENP-A-AK positiv n = 103	ACA neg. n = 177	p-Wert
Lungenfibrose	13,6%	15,5%	47,5%	< 0,0005*
PAH	24,3%	25,2%	19,8%	0,231
mRSS #	4,0 (4,0)	4,0 (4,0)	7,0 (12,0)	< 0,0005*
Gefäßbeteiligung	30,1%	30,1%	49,7%	0,002*
Digitale Ulzerationen	32,0%	32,0%	44,6%	0,043*
GI-Beteiligung	77,7%	75,7%	76,8%	1,000
Bewegungssystem	87,4%	87,4%	93,2%	0,127
Herzbeteiligung	29,1%	30,1%	46,9%	0,007*
Nieren	17,5%	17,5%	21,5%	0,443
Nervensystem	12,6%	11,7%	18,1%	0,244
Sicca-Syndrom	68,9%	69,9%	68,9%	1,000

Tabelle 36: Vergleich der Häufigkeiten klinischer Manifestationen zwischen Anti-CENP-A-AK-positiven, Anti-CENP-B-AK-positiven und Anti-Centromer-AK-negativen (ACA neg.) Patienten; p-Werte im Chi-Quadrat-Test ermittelt beziehen sich auf die Unterschiede zwischen den ACA + und ACA - Patienten; * = signifikant; # Median (IQR)

3.3.3.7 Zusammenfassung

Autoantikörper gegen die Zentromerproteine A und B haben in der untersuchten Kohorte die höchste Prävalenz (36,8%), wobei sie am häufigsten bei den Patienten mit einer lSSc nachzuweisen sind. Anti-CENP-A- und Anti-CENP-B-Antikörper unterscheiden sich in der untersuchten Kohorte nicht in ihrer Häufigkeit. In 94,3% der Fälle kamen beide Antikörper konkordant bei den Patienten vor.

Patienten mit Anti-Centromer-Antikörper sind durch eine leichtere Krankheitsausprägung und durch ein deutlich geringeres Maß an Fibrosierung gekennzeichnet.

3.3.4 Weitere Antikörper

Aufgrund der geringen Fallzahlen waren signifikante Unterschiede in den statistischen Analysen der übrigen untersuchten Antikörper nicht nachzuweisen, so dass ausschließlich Fallvorstellungen der Antikörper-positiven Patienten präsentiert werden können. Im folgenden Abschnitt werden diese Kasuistiken dargestellt.

3.3.4.1 Anti-Ku-Antikörper

Zwei von 280 Patienten (0,7%) sind in der untersuchten Kohorte positiv für Anti-Ku-Antikörper. Beide Patienten sind dabei ausschließlich und eindeutig positiv mit gemessenen Signalstärken von 80 U bzw. 165 U. Andere Antikörper konnten jeweils nicht nachgewiesen werden.

Die zwei Anti-Ku-Antikörper-positiven Patienten sind beide weiblichen Geschlechts und an einem Overlap-Syndrom zwischen der systemischen Sklerose und einer Polymyositis erkrankt (vergleiche Tabelle 37). Zum Zeitpunkt der Untersuchung sind beide Patienten im mittleren Alter (63 Jahre bzw. 51 Jahre). Bei beiden ist keine positive Familienanamnese bekannt.

Die Krankheitsausprägung ist durch eine ausgeprägte Beteiligung des Bewegungsapparates mit Muskelatrophie, Gelenkkontrakturen und CK-Erhöhungen im Serum gekennzeichnet. Darüberhinaus leiden beide Patienten an einer Dysmotilität des Ösophagus und an einer Sicca-Symptomatik.

Der Fibrosierungs- und Sklerosierungsgrad kann als eher gering betrachtet werden (mRSS 2 bzw. mRSS 11). Keine der Patientinnen hat eine vaskuläre Beteiligung oder digitale Ulzerationen. Auch eine Beteiligung der Lunge oder des Nervensystems konnte nicht festgestellt werden.

Unterschiede zwischen beiden Patienten gab es lediglich in der Beteiligung des Dünn- und Dickdarmes sowie bei der Nierenbeteiligung.

Patienten-ID	SSc-Form	Geschlecht	Manifestations-alter (J.)	mRSS	Lungen-fibrose	PAH	Bewegungs-system	GIT	Sicca	Gefäße	Nerven-system	Nieren
SKL030	SSc/Pm	W	50	2	-	-	+	+	+	-	-	-
SKL091	SSc/Pm	W	64	11	-	-	+	+	+	-	-	+

Tabelle 37: Eigenschaften der Anti-Ku-Antikörper-positiven Patienten; + = vorhanden; - = nicht vorhanden; W = weiblich; M = männlich; GIT - Gastrointestinaltrakt

3.3.4.2 Anti-Rpp38-Antikörper

In der untersuchten Kohorte konnten vier Patienten mit Anti-Rpp38-Antikörpern identifiziert werden (1,4%). Keiner der Anti-Rpp38-Antikörper-positiven Patienten wies ausschließlich diesen Antikörper im Serum auf. Im LIA wurde immer mindestens ein weiterer Antikörper im Serum als positiv gemessen (siehe Tabelle 14). 50% dieser Patienten haben einen eher niedrigen Antikörperspiegel mit 7 bzw. 9 U, 50% sind stärker positiv mit 51 bzw. 55 U.

Alle vier Patienten sind weiblichen Geschlechts, die Altersspanne zum Zeitpunkt der Analyse reicht dabei von 43 Jahren bis 70 Jahren. Drei Patienten sind an einer diffusen systemischen Sklerose, eine Patientin ist an einer UCTD erkrankt.

Eine Hautbeteiligung kann bei allen Patienten beobachtet werden, allerdings ist der gemessene mRSS als eher gering (im Median 7) zu betrachten. Bei allen Patienten ist eine Beteiligung des Bewegungssystems vorhanden (vergleiche Tabelle 38). Diese ist dabei bei allen vier Anti-Rpp38-Antikörper-positiven Patienten unterschiedlich stark ausgeprägt. Ein Patient hat eine äußerst vielgestaltige Beteiligung des muskuloskelettalen Systems mit Gelenkkontrakturen, Muskelschwäche, Muskelatrophien und CK-Erhöhung. Ein weiterer Patient leidet nur an einer Muskelbeteiligung, die zwei Übrigen leiden vorrangig an Gelenkkontrakturen.

Bei 75% der Anti-Rpp38-Antikörper-positiven Patienten sind Motilitätsstörungen des Ösophagus bekannt. Drei der vier Patienten leiden an einer Sicca-Symptomatik, davon haben aber nur zwei Patienten auch eine Ösophagusbeteiligung.

Akrale Ulzerationen konnten bei 50% der Anti-Rpp38-Antikörper-positiven Patienten beobachtet werden.

Eine pulmonale Komponente ist bei diesen vier Patienten eher selten. Zwei haben in der Lungenfunktionsuntersuchung einen respiratorischen Defekt. Lediglich ein Patient hat eine Lungenfibrose.

Auch die Beteiligung des Nervensystems ist in der untersuchten Kohorte eher nicht charakteristisch für die Anti-Rpp38-Antikörper-positiven Patienten. Einer der vier Patienten hat eine Trigeminusneuralgie.

Bei keinem der Anti-Rpp38-Antikörper-positiven Patienten konnte eine Herz-, Kolon-, oder Nierenbeteiligung beobachtet werden.

Zusammenfassend stellt sich die Gruppe der Anti-Rpp38-Antikörper-positiven Patienten als eher heterogen dar. Sie ist gekennzeichnet durch eine eher geringe Ausprägung der Hautfibrosierung und eine unterschiedlich stark ausgeprägte, aber in allen Fällen vorhandene Beteiligung des Bewegungsapparates. Die Patienten der untersuchten Kohorte mit diesem Antikörper leiden selten oder gar nicht an pulmonaler, kardialer und nephrologischer Beteiligung.

Patienten-ID	SSc-Form	Geschlecht	Manifestations-alter (J.)	mRSS	Lungen-fibrose	PAH	Bewegungs-system	GIT	Sicca	Gefäße	Nerven-system	Nieren
SKL159	UCTD	W	66	2	-	-	+	-	+	-	-	-
SKL185	dSSc	W	58	7	-	-	+	+	+	-	-	-
SKL232	dSSc	W	30	7	-	-	+	+	+	-	+	-
SKL244	dSSc	W	21	7	+	-	+	+	-	+	-	-

Tabelle 38: Eigenschaften der Anti-Rpp38-Antikörper-positiven Patienten; + = vorhanden; - = nicht vorhanden; W = weiblich; M = männlich; GIT - Gastrointestinaltrakt

3.3.4.3 Anti-hpop1-Antikörper

In der untersuchten Kohorte konnte bei 11 Patienten Antikörper gegen hpop1 nachgewiesen werden (3,9%). Zwei dieser Patienten sind dabei stark positiv (140 U, 98 U), die übrigen Patienten haben gemessene Signalstärken zwischen 6 und 23 Units im LIA für Anti-hpop1-Antikörper.

Das Verhältnis von weiblichen zu männlichen Patienten beträgt 10: 1.

Die Einteilung in die Subgruppen der systemischen Sklerose zeigt ein heterogenes Bild (vergleiche Tabelle 39). Vier Patienten haben eine dSSc, drei Patienten haben eine lSSc bzw. ein Overlap-Syndrom zwischen der systemischen Sklerose und einer anderen rheumatischen Erkrankung, ein Patient hat eine undifferenzierte Bindegewebserkrankung.

Bei der Analyse der Konkordanz der Anti-hpop1-Antikörper mit den anderen untersuchten Antikörpern erhält man ebenfalls ein heterogenes Ergebnis (vergleiche Tabelle 14). Drei Patienten sind lediglich für Anti-hpop1-Antikörper positiv und hatten keine weiteren Antikörper im Serum. Klinisch zeigen sich aber keine Unterschiede zu den Patienten mit mehr als einem Antikörper.

Es lässt sich keine spezielle klinische Ausprägung der systemischen Sklerose als Gemeinsamkeit der Anti-hpop1-Antikörper-positiven Patienten in der betrachteten Kohorte finden. Allen Patienten gemeinsam ist lediglich eine Beteiligung des Bewegungssystems, dies aber in sehr unterschiedlicher Intensität und Symptomvielfalt. Der Anti-hpop1-Antikörper scheint somit nicht zur Charakterisierung eines spezifischen Phänotypes geeignet zu sein.

Patienten-ID	SSc-Form	Geschlecht	Manifestations-alter (J.)	mRSS	Lungen-fibrose	PAH	Bewegungs-system	GIT	Sicca	Gefäße	Nerven-system	Nieren
SKL019	Overlap	W	43	5	+	+	+	+	+	-	-	+
SKL042	Overlap	W	51	2	+	-	+	+	+	-	+	-
SKL102	lSSc	W	68	4	-	-	+	+	+	-	-	-
SKL159	UCTD	W	66	2	-	-	+	-	+	-	-	-
SKL211	dSSc	W	k.A.	15	+	-	+	+	+	-	-	-
SKL232	dSSc	W	30	7	-	-	+	+	+	-	+	-
SKL273	lSSc	W	61	2	-	-	+	+	+	-	-	-
SKL284	dSSc	W	55	26	+	-	+	+	-	+	-	-
SKL302	Overlap	M	35	0	+	+	+	+	-	+	+	-
SKL348	lSSc	W	k.A.	8	-	+	+	+	+	+	+	-
SKL360	dSSc	W	61	48	+	-	+	+	+	+	+	-

Tabelle 39: Eigenschaften der Anti-hpop1-AK-positiven Patienten; + = vorhanden; - = nicht vorhanden; W = weiblich; M = männlich; k.A. = keine Angaben vorhanden; GIT-Gastrointestinaltrakt

3.3.5 Antikörper-negative Patienten

65 Patienten sind in der untersuchten Kohorte bei der Antikörperbestimmung im LIA für keinen der untersuchten Antikörper positiv.

15,4% (n=10) davon sind männlichen, 84,6% weiblichen Geschlechts, was ein Verhältnis von 1: 5,5 ergibt.

Der Erkrankungsbeginn der systemischen Sklerose lag bei den Patienten in dieser Gruppe bei durchschnittlich 53,5 Jahren (SD 13,7 Jahre) und somit geringfügig höher als bei den Antikörper-positiven Patienten mit durchschnittlich 50,0 Jahren (SD 14,6 Jahre). Die Erkrankungsdauer zum Zeitpunkt der Studie lag im Median bei 2 Jahren (IQR 6,0).

Die Patientengruppe ohne Nachweis von Antikörpern ist sehr heterogen bezüglich der beobachteten SSc-Subgruppen. Die größte Anzahl der Patienten (n=21) leiden an der diffusen Form. 18 Patienten haben eine limitierte Hautfibrosierung und –sklerosierung und wurden demnach als lSSc klassifiziert. Von 51 Patienten mit Overlap-Syndrom sind 17 Antikörper negativ (33,3%). Bei 50% der Patienten mit UCTD (n=8) konnte keiner der untersuchten Antikörper im Serum detektiert werden. Auch ein Patient mit systemischer Sklerose sine Skleroderma ist Antikörper-negativ.

Vergleicht man die Häufigkeiten der klinischen Merkmale in den Gruppen Antikörper-negativ und Antikörper-positiv, so konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden. In der untersuchten Kohorte entsprachen sich somit beide Gruppen weitestgehend in der klinischen Charakterisierung (Tabelle 40).

	Antikörper-negative Patienten n = 65	Antikörper-positive Patienten n = 215
Hautbeteiligung	83,1 %	90,7 %
mRSS #	4,5 (9,0)	5,0 (9,0)
Lungenfibrose	29,2 %	36,7 %
PAH	13,8 %	23,7 %
Beteiligung des Bewegungsapparates	92,3 %	90,7 %
Herzbeteiligung	44,6 %	39,5 %
Nierenbeteiligung	24,6 %	18,6 %
Ösophagusbeteiligung	83,1 %	75,3 %
Nervensystembeteiligung	20 %	14,9 %

Tabelle 40: Vergleich der Häufigkeiten klinischer Manifestationen bei Patienten mit und ohne Autoantikörper in Prozent, # Median und Interquartilsbereich

Das Merkmal der Antikörper-Negativität scheint, zu mindest nach den Ergebnissen der vorliegenden Analyse, nicht dazu geeignet eine weitere Patientensubklassifizierung zu ermöglichen.

3.4 Analyse von Antikörperprofilen

Um den Einfluss des gleichzeitigen Vorkommens mehrerer Antikörper bei einem Patienten (Antikörperprofil) auf die Wahrscheinlichkeit des Auftretens bestimmter klinischer Merkmale zu untersuchen, wurde das Modell der multivariaten logistischen Regression gewählt. Der Einschluss der Antikörper in das Modell erfolgte schrittweise und geordnet nach ihrer Aussagekraft. Nicht aufgeführte Antikörper wurden aufgrund des nicht nachweisbaren Einflusses auf die abhängige Variable nicht in die Gleichung eingeschlossen.

Merkmal	Schrittweiser Einschluss	Regressions-koeffizient B	Ex(B)	Sign.	Cox & Snell r^2
Lungen-fibrose	Konstante	-0,619	0,538	< 0,0005	
	Anti-topo I-AK	1,914	6,782	< 0,0005	
	Konstante	-1,130	0,323	< 0,0005	0,141
	Anti-CENP-B-AK	-1,258	0,284	< 0,0005	
	Anti-topo I-AK	1,462	4,313	< 0,0005	
	Konstante	-0,635	0,530	0,001	0,185
	Anti-CENP-B-AK	-1,106	0,331	0,002	
	Anti-topo I-AK	1,617	5,036	< 0,0005	
	Anti-Pm/Scl-100-AK	0,998	2,712	0,047	
	Konstante	-0,807	0,446	< 0,0005	0,196

Tabelle 41: Modell der logistischen Regression zur Aufklärung von Autoantikörpern als Risikofaktoren für die Lungenfibrose

Die Odds für das Auftreten einer Lungenfibrose sind am größten, wenn Anti-Topoisomerase I-Antikörper im Serum des Patienten zu finden sind. Die Chance ist um das 6,8-fache erhöht. Aus den Gewichten des Anti-CENP-B-Antikörpers im Modell ergibt sich ein Hinweis darauf, dass das Auftreten dieses Antikörpers die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Lungenfibrose eher verringert. Ist als dritter Antikörper Anti-Pm/Scl-100-Antikörper im Serum nachzuweisen, steigt statistisch die Wahrscheinlichkeit für eine Lungenfibrose erneut an (vergleiche Tabelle 41). Der Einfluss von mehreren Antikörpern auf die Ausprägung einer Lungenfibrose ist aber

insgesamt geringer als der Einfluss jedes einzelnen. Der schrittweise Anstieg des r^2 von Cox und Snell von 0,141 auf 0,196 bei der Einbeziehung weiterer Variablen, zeigt dass dieses Modell eine Varianzaufklärung von 19,6% bietet. Damit ist Varianzaufklärung nicht sehr hoch, was auf Grund der Vielfalt der Einflußfaktoren auf die Entstehen einer systemischen Sklerose auch nicht zu erwarten war, es ergeben sich aber daraus gute Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen.
Für die anderen in diesem Modell untersuchten klinischen Manifestationen zeigten sich keine signifikanten Einflüsse mehrerer Antikörper, so dass sich jeweils nur der Einfluss von einem Hauptantikörper ermitteln ließ (Tabelle 42).

Merkmal	Schrittweiser Einschluss	Regressions-koeffizient B	Ex(B)	Sign.	Cox & Snell r^2
PAH	Konstante	-1,299	0,273	< 0,0005	
	Anti-Pm/Scl-75-AK	-1,400	0,246	0,061	
	Konstante	-1,202	0,301	< 0,0005	0,018
Herz-Beteiligung	Konstante	-0,376	0,687	0,002	
	Anti-CENP-B-AK	-0,787	0,455	0,003	
	Konstante	-0,102	0,903	0,499	0,033
Renale Krisen	Konstante	-2,800	0,061	< 0,0005	
	Anti-CENP-B-AK	-1,473	0,229	0,055	
	Konstante	-2,449		< 0,0005	0,018
mRSS > 15	Konstante	-1,878	0,153	< 0,0005	
	Anti-topo I-AK	2,174	8,791	< 0,0005	
	Konstante	-2,733	0,650	< 0,0005	0,115

Tabelle 42: Modell der log. Regression zur Aufklärung der Bedeutung des Vorkommens von verschiedenen Antikörpern als Risikofaktoren für die PAH, die Herzbeteiligung, renale Krisen und einem mRSS>15

4. DISKUSSION

Die vorliegende retrospektive statistische Forschungsarbeit hatte zum Ziel, erstens eine Kohorte von Patienten mit systemischer Sklerose der Charite Berlin zu charakterisieren, zweitens die Prävalenzen der untersuchten Antikörper zu ermitteln, sowie drittens deren Assoziationen zu klinischen Merkmalen zu evaluieren. Darüberhinaus sollte der Nutzen eines multianalytischen Testsystems zur Autoaantikörperbestimmung bei Patienten mit systemischer Sklerose bewertet werden.

4.1 LITERATURVERGLEICH DER KOHORTE

Die untersuchte Kohorte umfasst 280 Patienten der Klinik für Rheumatologie und klinischen Immunologie sowie der Ambulanzsprechstunde für systemische Sklerose der Charite, Berlin. Die systemische Sklerose ist eine seltene Erkrankung, deren Prävalenz zwischen 4-242 Erkrankungen pro 1.000.000 Einwohner und deren Inzidenz zwischen 0,6-18,7 Neuerkrankungen pro Jahr pro 1.000.000 Einwohner schwankt [35-38], so dass die Anzahl der untersuchten Patienten durchaus als hoch zu betrachten ist. Diese hohe Fallzahl war Grundvoraussetzung für die korrekte Durchführung verschiedener statistischer Analysen.

Die systemische Sklerose ist eine sehr heterogene Erkrankung. Die Einteilung der Unterformen erfolgte in Anlehnung an die Empfehlungen des DNSS, welche diagnostische Kriterien mit dem Ziel, die Erfassung und Erforschung der systemischen Sklerose in Deutschland auf eine standardisierte Basis zu stellen, herausgaben. Die Einteilung der Patienten erfolgte dabei ausschließlich nach der maximalen Hautbeteiligung basierend auf der Klassifikation von LeRoy et.al. [43] und vor Beginn dieser Studie, unabhängig vom Antikörperprofil. In der Literatur lassen sich Häufigkeitsangaben von 32,7% [68], 33,8% [36] bis 36,9% [16] für die dSSc sowie Angaben von 45,5% [68], 57,5% [16] bis 65,1% [36] für die lSSc finden. Die in der vorliegenden Studie gefunden Prävalenzen für die dSSc liegen dabei gut im Durchschnitt anderer Studien (34,3%). Die gefundene Häufigkeit der lSSc liegt etwas unter den in der Literatur gefundenen Angaben (40,4%). Dies kann unter anderem daran liegen, dass in der vorliegenden Studie die Einteilung der Patienten in mehr als zwei Subtypen erfolgte. Patienten, die die Kriterien von LeRoy et al. [43] für die dSSc und lSSc nicht vollständig erfüllten, wurden in drei weitere Kategorien eingeteilt. Von den 280 untersuchten Patienten wurden 18,2% zur Kategorie Overlap-Syndrom, 1,4% zur Kategorie SSc sine Skleroderma und 5,7% zu UCTD gezählt.

Einen Einfluss auf die Prävalenz der einzelnen Subformen kann auch die ethnische Herkunft haben. So zeigten Mayes und Meyer et al., dass Afroamerikaner eine höhere Prävalenz der dSSc und eine niedrigere der lSSc haben [35, 36, 81]. Auch Steen, Giordano und Kuwana et al. konnten Unterschiede zwischen den einzelnen ethnischen Gruppen aufzeigen [38, 82, 83]. Mit Ausnahme von sechs Patienten handelt es sich bei den Patienten in der untersuchten Kohorte ausschließlich um Patienten kaukasischer Ethnizität. Bei der Analyse der klinischen Assoziationen ohne die sechs nicht-kaukasischen Patienten veränderten sich die Ergebnisse nicht signifikant, so dass alle Ergebnisse für die Gesamtkohorte dargestellt sind. Aufgrund des erhöhten Einflusses der ethnischen Herkunft auf die Krankheitsausprägung und –häufigkeiten wird ein Vergleich der gefundenen Ergebnisse bevorzugt mit Kohorten aus dem europäischen Raum bzw. mit Patienten kaukasischer Herkunft vorgenommen.

Das Geschlechterverhältnis in der untersuchten Kohorte von Frauen zu Männern mit 7:1 entspricht den Angaben in der Literatur [16, 40, 41]. Interessanterweise zeigt sich bei den Patienten mit systemischer Sklerose sine Skleroderma ein Verhältnis von 1:1 bei allerdings sehr geringer Patientenanzahl.

Die mediane Erkrankungsdauer zum Zeitpunkt der Analyse betrug vom Auftreten des Raynaud-Phänomens 8 Jahre (IQR 16 - 4) und vom Auftreten des ersten nicht-Raynaud-Phänomens 5 Jahre (IQR 9 - 3). Die Differenz dieser beiden unterschiedlichen Zeitpunkte ist für die Patienten mit lSSc wesentlich größer (10 bzw. 7 Jahre) als für Patienten mit dSSc (5 bzw. 4 Jahre). Womit ein wesentliches Unterscheidungskriterium dieser beiden Unterformen unabhängig vom Ausmaß der Hautbeteiligung erfüllt ist [84]. 57,4% der Patienten wurden in einem Krankheitsstadium von weniger als fünf Jahren erfasst, so dass von einem relativ frühen Krankheitsstadium auszugehen ist. Im Allgemeinen wird der Erkrankungsbeginn am häufigsten zwischen dem 30.-50. Lebensjahr beschrieben [35, 36, 38, 68]. Statistisch lagen Patienten der untersuchten Kohorte innerhalb dieser Spanne. Es zeigte sich dabei kaum ein Unterschied zwischen Frauen und Männern, deren durchschnittlicher Krankheitsbeginn bei 49,8 Jahren und 49 Jahren lag.

Patienten mit einer positiven Familienanamnese für rheumatische Erkrankungen erkrankten früher als Patienten ohne familiäre Vorbelastung.

Die 10-Jahres-Überlebensrate wurde in der Studie von Scussel-Lonzetti et al. in einer großen Franko-Kanadischen Kohorte für die lSSc mit 89% und für die dSSc mit 62,4% ermittelt [85]. Unabhängig von der zugrundeliegenden Subform der systemischen Sklerose ermittelten Bryan et al. in einer britischen Kohorte eine 10-Jahres-Überlebendsrate von 75% [86]. Darüberhinaus zeigten sie auch, dass das Risiko, an den Folgen der systemischen Sklerose zu sterben, für Frauen höher ist als für Männer [86].

Der Vergleich der Häufigkeitsverteilung der klinischen Symptome zu Ergebnissen anderer Studien ist schwierig aufgrund unterschiedlicher Definitionen der Diagnosen und Schweregrade. Dieses Problem soll zukünftig durch die Gründung von Netzwerken, wie DNSS und EUSTAR, mit gemeinsamen Standards verringert werden. Unter Berücksichtigung der Diagnose- und Einteilungsempfehlungen konnte in der untersuchten Kohorte eine Hautbeteiligung bei 88,9%, eine Gefäßbeteiligung bei 42,5%, digitale Ulzerationen bei 40%, eine Lungenfibrose bei 35,0% und eine pulmonal arterielle Hypertonie bei 21,4% der Patienten gefunden werden. 20% der Patienten hatten eine Nierenbeteiligung, etwa 5,7% sogar renale Krisen. An einer kardialen Manifestation litten 40,7% der Patienten. 91,1% der Patienten hatten eine Beteiligung des Bewegungsapparates, davon zeigten 61,4% Gelenkkontrakturen, 46,4% Muskelatrophien und 13,2% eine myositische Komponente. Hunzelmann et al. veröffentlichten 2008 die Ergebnisse der Kohortenstudie des DNSS, welches 27 deutsche Zentren für die Behandlung der systemischen Sklerose umfasst, zu denen auch das Berliner Zentrum der Charite gehört. 189 der 280 in dieser Forschungsarbeit untersuchten Patienten sind in der von Hunzelmann et al. veröffentlichten Studie ebenfalls eingeschlossen. Nichts desto trotz unterscheiden sich die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse der Merkmalshäufigkeiten in einigen Punkten von den Ergebnissen der 1483 Patienten umfassenden gesamtdeutschen Studie. In der Referenzkohorte des DNSS zeigten sich wesentlich seltener eine Beteiligung des muskuloskelettalen Systems (47,5% vs. 91,1%), der Nieren (10,5% vs. 20%), des Herzens (14,6% vs. 40,7%) sowie des Nervensystems (6,4% vs. 16,1%). Deutlich seltener waren auch digitale Ulzerationen (24,4% vs. 40%) und die PAH (15,8% vs. 21,4%). In der Prävalenz der Hautbeteiligung, des Raynaud-Phänomens, der Lungenfibrose und der Werte des durchschnittlichen mRSS (5,0 vs. 7,65) sind die beobachteten Ergebnisse sehr ähnlich [68]. Der Vergleich der Ergebnisse von Ferri et al., die eine Analyse der SSc-Kohorte in Italien vornahmen, gestaltete sich aufgrund der unterschiedlichen Definition und Wichtung von Merkmalen schwierig. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in der Häufigkeit der digitalen Ulzerationen von 48%, der kardialen Beteiligung von 30% und der Nierenbeteiligung von 7%. Die Häufigkeit der Lungenfibrose wurde nicht untersucht. Alternativ wurde die Häufigkeit einer Lungenbeteiligung ohne nähere Bezeichnung mit 60% angegeben. Unterschiede ergaben sich auch bei der Betrachtung der Beteiligung des Bewegungsapparates, da bei Ferri et al. nur die Häufigkeit von Arthritiden mit 19% angegeben wurde [87]. Der Vergleich mit der Arbeit von Walker et al., die 2007 die Ergebnisse des EUSTAR Netzwerkes von 3656 europäischen Patienten mit systemischer Sklerose von 102 Zentren aus 30 Ländern veröffentlichten, zeigt im Hinblick auf die Häufigkeitsverteilung der Merkmale bei den Patienten mit dSSc und lSSc der

vorliegenden Arbeit ähnliche Ergebnisse [16]. Für die Patienten mit dSSc ergaben sich Häufigkeiten von 42,7% für digitale Ulzerationen, 53,4% für das Vorhandensein einer Lungenfibrose und 22,3% für die PAH. Der durchschnittliche mRSS betrug 19,0. In unserer untersuchten Kohorte konnten digitale Ulzerationen bei 54,2%, eine manifeste Lungenfibrose bei 59,4% und die PAH bei 22,9% der Patienten mit dSSc nachgewiesen werden. Der mediane mRSS betrug 11,0. Vergleicht man die Häufigkeitsangaben bestimmter klinischer Manifestationen in der Gruppe der Patienten, welche als lSSc eingestuft wurden, so fallen ebenfalls ähnliche Ergebnisse auf. Digitale Ulzerationen wurden in der EUSTAR-Kohorte bei 32,9% in der vorliegenden Arbeit bei 33,6% der Patienten gefunden. Walker et al. gaben die Häufigkeit einer Lungenfibrose von 34,7% und einer PAH von 20,5% der Patienten mit lSSc an. In der Berliner Kohorte wiesen 14,2% der lSSc Patienten eine Lungenfibrose und 19,5% eine PAH auf. Der durchschnittliche mRSS betrug bei Walker et al. 8,1 und der mediane mRSS in der zugrundeliegenden Kohorte lag bei 4,0.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Prävalenzen der untersuchten klinischen Manifestationen im Vergleich mit denen anderer Studien ähnlich hoch sind und diese Kohorte zumindest für europäische Kohorten als repräsentativ gewertet werden kann.

Der mögliche Einfluss von verschiedenen Therapiemaßnahmen wurde bei der Analyse der Kohorte nicht betrachtet, so dass dies eine Limitierung der Aussagekraft der gefundenen Ergebnisse bedeuten könnte. In weiterführenden Studien könnte dieser Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

4.2 Vergleich der Antikörper-Prävalenzen

Autoantikörper wurden seit dem Zeitpunkt ihrer Entdeckung in den 1960-iger Jahren mit der systemischen Sklerose assoziiert.

Bislang gibt es aber kaum Hinweise, dass die bei der systemischen Sklerose nachzuweisenden Autoantikörper eine pathogenetische Rolle spielen [1]. In der gängigen Literatur wird daher die Frage diskutiert, ob Autoantikörper somit lediglich eine Art Phänomen sind, welches bei den Patienten mit systemischer Sklerose zu beobachten ist. Sicher scheint, dass einige Antikörper mit bestimmten Phänotypen der Erkrankung assoziiert sind, wie auch die in dieser Studie präsentierten Ergebnisse zeigen.

Auch wenn bestimmte Autoantikörper schon vor mehr als 50 Jahren das erste Mal beschrieben wurden, sind doch noch immer Fragen bezüglich der klinischen Bedeutung offen bzw. werden kontrovers diskutiert. Die in der Literatur vorkommenden unterschiedlichen Angaben bezüglich der Assoziation bestimmter Autoantikörper mit klinischen Merkmalen haben verschiedene Ursachen. Zum einen hängen statistische Ergebnisse stark von der zugrundeliegenden Fallzahl ab. Diese schwanken in den publizierten Studien zu diesem Thema von sehr gering, zum Beispiel 30 Patienten in der Arbeit von Sato et al. [15], bis über 3000 untersuchte Patienten bei Veröffentlichungen der Ergebnisse großer Multizenterstudien [16]. Diese hohe Anzahl von Patienten ist allerdings bei der geringen Prävalenz der Erkrankung in einer monozentrischen Kohorte nur schwer zu erreichen, so dass die untersuchte Anzahl von Patienten in der vorliegenden Arbeit durchaus als hoch zu werten ist. Der Vorteil monozentrischer Studien könnte darin gesehen werden, dass die einheitliche Umsetzung von Untersuchungsstandards und Krankheitsdefinitionen eher möglich ist, da die Anzahl der einbezogenen Untersucher in der Regel sehr gering ist.

Unterschiedliche Ergebnisse bezüglich klinischer Assoziationen finden ihre Ursache auch in der unterschiedlichen Herkunft der Patienten. Wie oben bereits erwähnt schwankt die Ausprägung der systemischen Sklerose stark in den verschiedenen Ländern. Dies trifft auch für die Prävalenz der untersuchten Antikörper zu. So zeigten Mayes et al., dass Anti-Centromer-Antikörper in der dunkelhäutigen Bevölkerung deutlich seltener sind als in der hellhäutigen. Anti-Topoisomerase I-Antikörper haben hingegen eine höhere Prävalenz bei afroamerikanischen Patienten [36]. Zu ähnlichen Schlüssen kam auch Steen bei der Auswertung der Pittsburgh Scleroderma Database [1].

Trotz der ausreichenden Patientenanzahl für die Charakterisierung der Kohorte ergab sich eine Einschränkung für die statistische Auswertung der Assoziationen der verschiedenen Antikörper.

Mit Ausnahme der SSc-spezifischen Antikörper Anti-Topoisomerase I- und Anti-CENP-B-Antikörper sowie der Anti-Pm/Scl-Antikörper zeigte sich eine sehr geringe Prävalenz der übrigen Antikörper. Eine Signifikanz in den statistischen Untersuchungen zu erzielen war aufgrund der sich ergebenen Fallzahlen somit nicht immer möglich, so dass eine Reduktion auf Fallvorstellungen erforderlich war.

Grundlage der Studie ist die laborchemische Bestimmung verschiedener Autoantikörper in unterschiedlichen Testsystemen (LIA, ELISA, IFT) sowie die parallel dazu durchgeführte klinische Evaluation der Patienten und der Krankheitsmanifestationen. Bei 23,2% (n=65) der Patienten wurde nach durchschnittlich 14 Monaten eine Verlaufskontrolle der zwei wichtigsten SSc-spezifischen Antikörper [2] (Anti-topo I-, Anti-CENP-B-Antikörper) durchgeführt, um stichprobenartig Veränderungen im Antikörperstatus aufzudecken.

Die Antikörper, welche im Serum bei einem Patienten zu finden sind, wechseln normalerweise nicht in einen anderen Antikörper. Hildebrandt et al. konnten zeigen, dass Anti-Topoisomerase I-Antikörper-Titer über einen Beobachtungszeitraum von 16 Jahren stabil blieben [88].

Kuwana et al. konnten nur bei einer geringen Patientenanzahl einen Verlust der Anti-Topoisomerase I-Antikörper im Verlauf der Erkrankung detektieren [89]. Auch wurde in einigen Studien nachgewiesen, dass Autoantikörper schon vor Beginn der eigentlichen Krankheitsmanifestationen im Serum nachzuweisen und dann auch nach Beginn der ersten Symptome konstant sind. Tramposch et al. zeigten dies zumindest für die Anti-Centromer-Antikörper [90]. Über einen Beobachtungszeitraum von durchschnittlich 14 Monaten (maximal 36 Monate) konnten wir für Anti-Topoisomerase I- und Anti-CENP-B-Antikörper ähnliche Ergebnisse nachweisen. 95,8% der Anti-Topoisomerase I-Antikörper-positiven Patienten blieben über den Beobachtungszeitraum mit ähnlich hohen Antikörpertitern positiv. Der Patient mit wechselndem Antikörperstatus hatte sowohl bei der ersten als auch bei der zweiten Messung einen grenzwertig positiven bzw. negativen Anti-Topoisomerase I-Antikörpertiter. Ein Einfluss durch bestimmte Therapieoptionen, wie zum Beispiel eine Stammzelltransplantation lag nicht vor. Beim Vergleich der Anti-CENP-B-Antikörper-positiven Patienten zeigte sich keine Veränderung ihres Antikörperstatus. Diese Beobachtung wurde in einer zufällig ausgewählten Stichprobe der Gesamtkohorte gemacht.

Die vorliegende Studie zeigt diagnostische Wertigkeiten verschiedener Autoantikörper für das klinische Assessment von Patienten mit systemischer Sklerose auf. Auf Grund des Studiendesigns können keine Aussagen über Prädiktion und Prognosen getroffen werden.

Die in der Literatur angegebenen Prävalenzen für die untersuchten Antikörper schwanken stark. Ursachen dafür sind verschiedene Kohorten mit Patienten unterschiedlicher Ethnizität und

Herkunft [81, 83], die Verwendung verschiedener Antikörperanalysemethoden mit unterschiedlicher Testgenauigkeit (Immunodiffusion, ELISA, IFT, LIA), die Verwendung verschiedener Antigene und uneinheitlicher Cut-offs. Der Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen publizierten Studien ist daher schwierig.
Im folgenden Abschnitt erfolgt die Wertung der Ergebnisse der Analysen für die einzelnen Antikörper.

4.2.1 Anti-Topoisomerase I-Antikörper

Für Anti-Topoisomerase I-Antikörper wurde in der untersuchten Kohorte eine Prävalenz von 23,9% im LIA (23,2% im ELISA) ermittelt. Dieses Ergebnis liegt im Durchschnitt anderer Studien mit Patientenkohorten aus verschiedenen Ländern, deren Häufigkeitszahlen zwischen 9,4% und 70% lagen [14, 91].
Die Ergebnisse der Analyse der Anti-Topoisomerase I-Antikörper in der untersuchten Kohorte lassen den Schluss zu, dass dieser Antikörper als Marker der diffusen Verlaufsform zu werten ist. 60,4% der Patienten mit dSSc wiesen Anti-Topoisomerase I-Antikörper im Serum auf. Darüberhinaus zeigte das ermittelte Odds-Ratio, dass das Vorhandensein von Anti-Topoisomerase I-Antikörpern im Serum die Chance deutlich erhöht an einer diffusen systemischen Sklerose zu erkranken. Ähnliche Zahlen zeigten auch die Ergebnisse von Walker et al., die in der EUSTAR-Kohorte Anti-Topoisomerase I-Antikörper bei 60,8% der Patienten mit dSSc nachweisen konnten [16]. In der vorliegenden Studie ließen sich Anti-Topoisomerase I-Antikörper bei nur wenigen Patienten mit lSSc (6,2%) finden. Dies ist erheblich weniger als in anderen Studien (18% [23], 31,3% [16]). Gründe dafür könnten zum einen unterschiedliche Klassifikationskriterien bei der Subgruppeneinteilung und zum anderen Kohorten unterschiedlicher Ethnizität sein.
Wie auch von anderen Autoren gezeigt, identifizieren Anti-Topoisomerase I-Antikörper Patienten mit einer vermehrten Haut- und Lungenfibrosierung, digitalen Ulzerationen und Beteiligung des Bewegungsapparates [14, 23, 85]. Die gefundenen Korrelationen zwischen der Antikörpersignalstärke und dem mRSS sowie der Krankheitsaktivität bestätigen die Ergebnisse vorangegangener Arbeiten [2, 13, 15]. Darüberhinaus zeigte sich, dass höhere Anti-Topoisomerase I-Antikörper-Titer mit schlechteren Lungenfunktionsparameteren einhergehen. Eine Assoziation mit einer gehäuften PAH konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Interessanterweise waren hohe Signalstärken im LIA auch mit einer erhöhten Mortalität bei Patienten mit dSSc assoziiert. So dass der Nachweis von Anti-Topoisomerase I-Antikörpern,

Patienten mit einem erhöhte Risiko an einer aktiven, prognostisch ungünstigen, diffusen systemischen Sklerose zu erkranken, identifizieren kann.

4.2.2 ANTI-PM/SCL-ANTIKÖRPER

Anti-Pm/Scl-Antikörper sind als Marker für Polymyositis/SSc-Overlap-Syndrome bekannt [25, 92]. Die diagnostische Wertigkeit der beiden Antikörper gegen die Hauptantigene Pm/Scl-100 und Pm/Scl-75c für die systemische Sklerose, insbesondere der einzelnen Unterformen ist noch nicht gut untersucht, so dass sich nur sehr wenige Hinweise über die Bedeutung der beiden Antikörper in der Literatur finden lassen [92].

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, sind Anti-Pm/Scl-Antikörper, insbesondere Anti-Pm/Scl-75-Antikörper, häufiger bei Patienten mit systemischer Sklerose zu finden als bislang vermutet. Auch zeigte sich eine Abhängigkeit von der zugrundeliegenden Subform der systemischen Sklerose. Anti-Pm/Scl-75-Antikörper sind vor allem bei Patienten mit dSSc und Overlap-Syndrom zu finden. Anti-Pm/Scl-100-Antikörper wurden überwiegend bei Patienten mit einem Overlap-Syndrom nachgewiesen. Die Anti-Pm/Scl-Antikörper wiesen in der untersuchten Kohorte mit 98,5% eine hohe Spezifität für die systemische Sklerose auf. Einschränkend muss allerdings gesagt werden, dass bei den Kontrollgruppen keine Patienten mit Myositis oder Polymyositis eingeschlossen waren. Die Prävalenz der Anti-Pm/Scl-Antikörper wird bei diesen Patienten mit bis zu 23,8% angegeben [92, 93].

In vielen Studien wird nur das Vorkommen von Anti-Pm/Scl-Antikörpern im Allgemeinen und deren Assoziationen betrachtet, ohne die einzelnen Antikörper gegen die verschiedenen Pm/Scl-Antigene (75kD und 100kD-Untereinheiten) zu berücksichtigen. Die vorliegende Studie zeigt aber doch erhebliche Unterschiede bezüglich der Bedeutung der verschiedenen Anti-Pm/Scl-Antikörper und ihren Assoziationen zu Phänotypen auf. Insbesondere ließen sich hinsichtlich der diagnostischen Wertigkeit und Risikobeurteilung Hinweise für einen Vorteil der Einzelbestimmung beider Antikörper finden.

Zum einen ist die Prävalenz der Anti-Pm/Scl-75-Antikörper (10,4%) höher als die der Anti-Pm/Scl-100-Antikörper (7,1%). Zum anderen zeigen sie auch eine bessere Assoziation zu klinischen Manifestationen. Anti-Pm/Scl-75-Antikörper identifizieren einen speziellen Subtyp von Patienten mit systemischer Sklerose, welcher häufiger eine myositische Komponente, eine vermehrte Haut- und Lungenfibrose, eine vaskuläre Beteiligung mit digitalen Ulzerationen und Gelenkbeteiligung aufweist. Demgegenüber steht ein selteneres Vorhandensein einer pulmonalen arteriellen Hypertonie. Der Nachweis von Anti-Pm/Scl-100-Antikörpern im Serum erhöht zwar

die Chance an einem Overlap-Syndrom zwischen der systemischen Sklerose und der Polymyositis zu erkranken, Assoziationen zu einzelnen klinischen Manifestationen konnten kaum gefunden werden. Die Anti-Pm/Scl-100-Antikörper positiven Patienten wiesen allerdings seltener gastrointestinale Symptome auf.

Eine signifikant erhöhte Mortalität in Zusammenhang mit Anti-Pm/Scl-Antikörperpositivität konnte, bei eher geringer Fallzahl, nicht nachgewiesen werden. Es zeigten sich allerdings doch im Vergleich zur Gesamtkohorte eine prozentual erhöhte Sterblichkeit (13,8% vs. 6,1%). Diese ermittelte Mortalitätsrate, die signifikante Erhöhung der Krankheitsaktivität, besonders bei den Anti-Pm/Scl-75-Antikörper-positiven Patienten und das gehäufte Vorkommen von schwerwiegenden Krankheitsmanifestationen, wie einer Lungenfibrose, können die Ergebnisse früherer Studien, welche eher eine günstige Prognose für Anti-Pm/Scl-Antikörper-positive Patienten ermittelten, nicht bestätigen [94, 95]. Unterschiede hinsichtlich eines besseren oder schlechteren Therapieansprechens konnten ebenfalls nicht ermittelt werden.

Steen et al. zeigten bereits, dass Patienten mit Anti-Pm/Scl-Antikörpern bei Beginn der Erkrankung jünger sind [1]. Interessanterweise konnten wir diesen Zusammenhang in der untersuchten Kohorte nur bei Patienten mit Anti-Pm/Scl-75-Antikörpern bestätigen. Diese Patienten erkrankten im Schnitt sechs Jahre früher als die übrigen. Patienten mit Anti-Pm/Scl-100-Antikörpern erkrankten in etwa im selben Alter wie der Durchschnitt der Gesamtkohorte. Über dieses Ergebnis hinaus haben Anti-Pm/Scl-75-Antikörper-positive Patienten auch eine erhöhte Krankheitsaktivität. Die Bestimmung beider Anti-Pm/Scl-Antikörper scheint also durchaus einen Informationsgewinn zu bedeuten, da die Sensitivität für die systemische Sklerose erhöht und auch die Risikobeurteilung auf Grund unterschiedlicher Assoziationen zu klinischen Manifestationen verbessert wird.

Interessanterweise zeigten die meisten Patienten eine positive Reaktivität auf nur eines der beiden Hauptantigene. Nur 37,1% der Anti-Pm/Scl-Antikörper-positiven Patienten waren doppelt positiv für sowohl Anti-Pm/Scl-75- als auch für Anti-Pm/Scl-100-Antikörper. Die höhere Prävalenz der Anti-Pm/Scl-75-Antikörper und die höhere Rate an klinischen Assoziationen lassen vermuten, dass Pm/Scl-75 das Hauptantigen bei der systemischen Sklerose ist. Aufgrund dieser Ergebnisse sollten beide Antigene zum Antikörpernachweis benutzt werden, um einen Informationsverlust zu vermeiden, wenn nur, wie bisher üblich, Anti-Pm/Scl-100-Antikörper nachgewiesen werden.

Beim Vergleich der gemessenen Signalstärken im LIA in den unterschiedlichen SSc-Subformen ergaben sich statistisch signifikant höhere Signalstärken der Anti-Pm/Scl-75-Antikörper in der Gruppe der Patienten mit einem Overlap-Syndrom gegenüber den anderen SSc-Subformen und

den Kontrollgruppen. Für die Anti-Pm/Scl-100-Antikörper konnte kein bedeutsamer Unterschied bezüglich der Signalstärken zwischen den SSc-Subformen nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Fallzahl in dieser Analyse und die recht breite Streuung sind die Ergebnisse aber nur eingeschränkt aussagekräftig und werden daher eher als eine beobachtete Tendenz gewertet. Diese interessante Beobachtung müsste in einer größeren Kohorte mit höherer Fallzahl erneut analysiert und bestätigt werden.

4.2.3 Anti-CENP-A- und Anti-CENP-B-Antikörper

Anti-CENP-A- und Anti-CENP-B-Antikörper konnten jeweils bei 36,8% der untersuchten Patienten nachgewiesen werden, wobei diese zu 74,3% (bzw. 72,6% für Anti-CENP-A-Antikörper) an einer limitierten Form der systemischen Sklerose erkrankt sind. Diese gefundenen Prävalenzen entsprechen denen, die andere Autoren ermittelt haben. Die Häufigkeit der Anti-CENP-B-Antikörper wird dabei im Allgemeinen für die systemische Sklerose mit 20% bis 47,5% und für die lSSc mit 50% bis 70% angegeben [2, 16, 68]. Das Risiko einer lSSc ist deutlich (OR 22,5) erhöht bei positivem ACA-Nachweis im Serum.

Auffällig ist, dass die meisten publizierten Studien klinische Assoziationen entweder allgemein der Anti-Centromer- oder der Anti-CENP-B-Antikörper untersuchen. Es konnten keine Studien ermittelt werden, die die verschiedenen Anti-Centromer-Antikörper bezüglich ihrer Assoziationen zu klinischen Manifestationen in Patientenkohorten mit systemischer Sklerose vergleichen, so dass die Bedeutung von Anti-CENP-A-Antikörpern bis dato unklar scheint.

In der vorliegenden Studie wurden erstmals die Assoziationen von Anti-CENP-B- und Anti-CENP-A-Antikörpern getrennt untersucht. Festgestellt wurde, dass beide Antikörper in 94,3% der untersuchten Patientenseren, unabhängig von der zugrundeliegenden SSc-Subform, konkordant auftraten, obwohl die im LIA verwendeten Antigensequenzen keine Ähnlichkeit haben. Dementsprechend sind die Häufigkeitszahlen der klinischen Assoziationen nahezu identisch (vergleiche Tabelle 36).

Patienten mit Anti-CENP-B- und Anti-CENP-A-Antikörpern sind durch eine leichtere Krankheitsausprägung und durch ein deutlich geringeres Maß an Fibrosierung gekennzeichnet. Eine Lungenfibrose konnte nur bei 13,6% der ACA-positiven (vs. 47,5 % der ACA-negativen) Patienten nachgewiesen werden. Der Fibrosierungsgrad der Haut (mRSS) ist ebenfalls deutlich geringer bei den ACA-positiven Patienten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Mitri et al. konnte keine Assoziation mit vermehrter PAH bei den ACA-positiven Patienten gefunden werden [96].

Auf Grund der sehr ähnlichen Prävalenz sowie der hohen Konkordanz der beiden Anti-Centromer-Antikörper, bringt die zusätzliche Analyse von Anti-CENP-A-Antikörpern keinen entscheidenden Vorteil oder Wissenszuwachs gegenüber der alleinigen Bestimmung von Anti-CENP-B-Antikörpern. Die Sensitivität bezüglich der im IFT als Zentromermuster positiv gewerteten Seren erhöhte sich allerdings bei Bestimmung beider Antikörper im Vergleich zur Einzelbestimmung von Anti-CENP-B-Antikörpern.

4.2.4 Weitere Antikörper

In einer 2007 veröffentlichten europäischen Studie wurde die Prävalenz von Anti-Ku-Antikörpern mit 0 bis 7,02% bei Patienten mit einer systemischen Sklerose angegeben [30]. Die in der untersuchten Kohorte ermittelte Prävalenz von 0,7% liegt damit eher im unteren Bereich. In anderen, vor allem asiatischen Studien wird eine deutlich höhere Prävalenz von bis zu 55% insbesondere bei Patienten mit SSc/Polymyositis-Overlap-Syndrom angegeben, so dass von einem deutlichen Einfluss der Ethnizität auszugehen ist [97]. Die Anti-Ku-Antikörper-positiven Patienten wiesen ausschließlich diesen Antikörper im Serum auf, in vergleichbaren Studien war dies ebenfalls für die Mehrheit der untersuchten Patienten zu treffend [30, 98]. Nur wenige Patienten wiesen zusätzliche Antikörper auf. In der untersuchten Kohorte konnten diese Antikörper nur bei Patienten mit einem Polymyositis-Overlap-Syndrom nachgewiesen werden [99]. Die Patienten sind vor allem durch eine ausgeprägte Beteiligung des muskuloskelettalen Systems gekennzeichnet. Darüberhinaus zeigten die Patienten alle ein Sicca-Syndrom und eine Beteiligung des Gastrointestinaltrakts, besonders des Ösophagus. Eine pulmonale oder vaskuläre Beteiligung mit digitalen Ulzerationen wies keiner der untersuchten Patienten auf. Da die Prävalenz in der untersuchten SSc-Kohorte sehr gering ist, konnten keine statistisch signifikanten Tests durchgeführt werden, so dass die gefunden Ergebnisse nur beschreibend sind. In der Arbeit von Rozman et al. weisen die Anti-Ku-Antikörper-positiven Patienten ein signifikant erhöhtes Risiko für eine Beteiligung des Bewegungsapparates auf. Darüberhinaus wurde auch ein signifikant geringerer Anteil an digitalen Ulzerationen beobachtet. Die Beteiligung des Ösophagus, der Lunge und das Sicca-Syndrom sind in ihrer Häufigkeit nicht bedeutsam häufiger oder seltener im Vergleich zu den Anti-Ku-Antikörper- negativen Patienten der Kohorte [30]. Cavazzana et al. fanden in ihrer Studie ein gehäuftes Vorkommen einer Lungenbeteiligung, in denen übrigen Aussagen stimmen die gefundenen Ergebnisse bezüglich klinischer Assoziationen mit denen der vorliegenden Studie weitestgehend überein [98]. Die Anti-Ku-Antikörper scheinen eher eine untergeordnete Rolle bei der systemischen Sklerose zu

spielen. Allerdings sollte aufgrund der Tatsache, dass Patienten mit Anti-Ku-Antikörpern überwiegend keine weiteren Antikörper im Serum aufweisen, gerade bei Patienten, die ANA-positiv, aber Anti-CENP-B- und Anti-Topoisomerase I-Antikörper-negativ sind, an die Bestimmung von Anti-Ku-Antikörper gedacht werden. Besonders vor dem Hintergrund, dass diese Patienten ein erhöhtes Risiko haben, muskuloskelettale Manifestationen zu entwickeln.

Anti-hpop1- und Anti-rpp38-Antikörper als Bestandteile der Th/To-Antikörper sind in ihrer Häufigkeit bei der systemischen Sklerose eher selten (3,9% bzw. 1,4%). Kuwana et al. zeigten in einer 2002 veröffentlichten Studie Prävalenzen dieser beiden Antikörper allerdings nur in Th/To-positiven Seren (4,6% der SSc-Patienten) auf [32]. Dabei wurden Anti-hpop1-Antikörper in 93% und Anti-rpp38-Antikörper bei 43% der Th/To-Antikörper-positiven Seren gefunden. Assoziationen zu klinischen Manifestationen konnten in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der niedrigen Prävalenzen konnten in der vorliegenden Studie keine statistischen Analysen, welche signifikante Unterschiede zwischen Antikörper-positiven und -negativen Patienten aufzeigen, durchgeführt werden. Allerdings zeigt der Vergleich der einzelnen Anti-hpop1- bzw. Anti-Rpp38-Antikörper-positiven Patienten ein eher heterogenes Bild der Phänotypen.

4.2.6 Antikörper-negative Patienten

In der untersuchten Kohorte wurden 23,2% der Patienten als Antikörper-negativ identifiziert. In anderen Studien finden sich deutlich höhere Zahlenangaben. Steen et al. identifizierten 53%, Gonzalez et al. sogar 54% der Patienten als Antikörper-negativ [23, 100]. Diese deutlichen Unterschiede können auf verschiedene Gründe zurückgeführt werden. Zum einen unterscheiden sich die Studien in den Antikörperanalysemethoden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte der Antikörper-Nachweis mit einem LIA, Gonzalez et al. nutzten den IFT sowie den ELISA, Steen et al. den IFT. Aber auch in der Definition der Antikörpernegativität gibt es Unterschiede. In der vorliegenden Studie werden Patienten als Antikörper-negativ betrachtet, wenn sie keinen der 8 untersuchten Antikörper im Serum aufweisen. Bei anderen Arbeiten wird von Antikörpernegativität gesprochen, wenn bei den Patienten weder Anti-Centromer-Antikörper noch Anti-Topoisomerase I-Antikörper detektiert werden können, andere Antikörper wurden dann nicht mit einbezogen bzw. spielte ein positiver ANA-Nachweis in der IFT keine Rolle [23, 101]. Auffällig in der Analyse der Erkrankungsdauer zum Zeitpunkt der Blutentnahme zur

Antikörperbestimmung, ist die sehr kurze mediane Krankheitsdauer von 2 Jahren der Antikörper-negativen Patienten. Möglicherweise sind potentielle Antikörper in diesem frühen Krankheitsstadium bei manchen Patienten noch nicht nachweisbar. Weitere Gründe könnten Fehler bei der Antikörperbestimmung und somit falsch-negative Ergebnisse sein. Auch ist es möglich, dass noch nicht alle Antikörper überhaupt nachweisbar sind, die möglicherweise im Serum enthalten sind.
Vergleicht man die AK-negativen Patienten der untersuchten Kohorte in ihren Eigenschaften mit den Patienten, welche im LIA Antikörper aufweisen, so fällt auf, dass sich beide Gruppen kaum in ihrem Krankheitsbild voneinander unterscheiden (siehe oben). 32,2% der Patienten sind dabei der dSSc, 27,7% der lSSc zugeordnet. Von einem schweren Krankheitsverlauf, kann im Gegensatz zur Studie von Gonzalez et al. in der untersuchten Kohorte nicht ausgegangen werden [100].

Zusammenfassend muss festgehalten werden, dass bestimmte Antikörper gehäuft in einer SSc-Subform vorkommen. Diese sind somit auch mit den klinischen Merkmalen, welche die SSc-Subform charakterisieren, assoziiert. Beim Vergleich der Anti-CENP-B-Antikörper-positiven Patienten mit den Anti-CENP-B-Antikörper- negativen Patienten in der Gruppe der lSSc ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in diesen Gruppen (Daten nicht dargestellt). So dass zu gelten scheint, dass die Antikörper wohl eher mit der SSc-Subform, als mit den einzelnen klinischen Merkmalen assoziiert sind. Zu einem ähnlichen Schluss sind auch Steen et al. bei der Analyse der Pittsburgh Scleroderma Datenbank gekommen [1]. Da die Einteilung der Patienten in die unterschiedlichen SSc-Subformen zum größten Teil nach klinischen Gesichtspunkten erfolgt, scheinen die Antikörper für die Gruppenzugehörigkeit eher eine untergeordnete Rolle zu spielen, da sich die Patienten einer Gruppe in ihrer Krankheitsausprägung unabhängig von Antikörperstatus ähneln [1].

4.3 METHODENVERGLEICH

Die Bestimmung von Autoantikörpern in den verschiedenen publizierten Studien erfolgt durch die unterschiedlichsten Analysemethoden. Häufig wird dafür der indirekte Immunfluoreszenz-Test, der Western Blot, der ELISA und zunehmend auch der LIA verwendet. Obwohl nicht alle Patienten mit systemischer Sklerose Antikörper im Serum aufweisen, wird in den aktuellen Leitlinien des American College of Rheumatology empfohlen bei Patienten mit Verdacht auf eine systemische Sklerose einen indirekten Immunfluoreszenztest auf ANA durchzuführen. Anschließend daran kann bei ANA-positiven Seren der Einzelnachweis bestimmter Antikörper mit ELISA, Western-Blot oder LIA erfolgen [102]. Für die vorliegende Studie haben wir uns entschieden, die Antikörperbestimmung mit kommerziell erhältlichen und zertifizierten ELISA und IFT sowie durch einen neu entwickelten LIA durchführen zu lassen. Alle Messungen wurden verblindet durch geschultes und langjährig erfahrenes Fachpersonal, das heißt ohne Kenntnis über den hinter einer Serumprobe sich verbergenden Patienten und ohne Kenntnis der Diagnosen und Krankheitsmanifestationen, durchgeführt.

Die Bestimmung von Assoziationen zwischen klinischen Merkmalen und Antikörpern im Serum basiert ausschließlich auf den Ergebnissen des LIA, da der ELISA nur für 25% der ausgewählten Antikörper zur Verfügung stand.

Die vorliegende Studie hatte nicht primär das Ziel einen Methodenvergleich der Antikörperbestimmung durchzuführen. Angesichts der Tatsache, dass verschiedene Verfahren zur Antikörperbestimmung zur Anwendung kommen konnten, auch wenn nicht jeder Antikörper in allen Methoden dargestellt werden konnte, bot es sich an, die Resultate mit einander zu vergleichen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf den Vergleich der Ergebnisse von ELISA und LIA für Anti-Topoisomerase I- und Anti-CENP-B-Antikörper gelegt, da beide Methoden antikörperspezifisch und quantitativ sind.

Maclachlan et al. zeigten in einer 2002 publizierten Studie, dass LIA und ELISA bei der Bestimmung von Anti-CENP-B- und Anti-Topoisomerase I-Antikörper in Sensitivität und Spezifität eine gute Übereinstimmung zeigen. Sie analysierten 92 Patientenseren mit bekanntem Antikörperprofil und bekanntem klinischen Phänotyp unterschiedlicher rheumatischer Erkrankungen, dabei zeigte sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse des LIA und des ELISA für die Anti-Topoisomerase I-Antikörper in 91,3% und für Anti-CENP-B-Antikörper in 97,8% der untersuchten Fälle [103].

In unseren Analysen zeigte sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse der verwendeten LIA und ELISA für Anti-Topoisomerase I-Antikörper in 97% (67 vs. 65 positive Patienten) und der Anti-

CENP-B-Antikörper in 96,1% (103 vs. 105 positive Patienten, nicht alle konkordant). Die Mehrzahl der Patienten, die unterschiedliche Antikörperstatus in beiden Testsystemen aufwiesen, zeigten grenzwertig positive bzw. negative Antikörpertiter. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, das der Einsatz des benutzten LIA eine adäquate Alternative zum ELISA bieten kann.

Der Vergleich der Ergebnisse des LIA mit den Ergebnissen des IFT zeigte ebenfalls eine gute Übereinstimmung, der für Anti-Centromer-Antikörper und Anti-Topoisomerase I-Antikörper typischen Fluoreszenzmuster und mit den LIA-Messergebnissen.

Der indirekte Immunfluoreszenz-Test ist der Goldstandard für das Screening von ANA [104], obwohl er aufgrund des unspezifischen Nachweisprinzips zu einer falschen Aussage führen kann und immer im klinischen Zusammenhang betrachtet werden sollte [102, 105]. Die Standardisierung dieses Assays ist schwierig, da die Ergebnisse vom verwendetet Substrat und den Eigenschaften des zweiten Antikörpers abhängig sind. Darüberhinaus ergeben sich Unterschiede aufgrund der verwendeten technischen Apparate (Mikroskope) und der subjektiven Interpretation der Ergebnisse [106]. Bei Einzelbetrachtung der Anti-CENP-B-Antikörper-positiven Seren im LIA zeigte sich eine Übereinstimmung von 96,2% zu den Zentromermuster-positiven Seren im IFT. Bei Doppelbestimmung der beiden in dieser Arbeit betrachteten Antikörper gegen Zentromerprotein A und B erhöhte sich diese Sensitivität sogar auf 99,04%. Auch die als Anti-Topoisomerase I-Antikörper positiv gewerteten Seren zeigten im IFT durchweg typische Fluoreszenzmuster. Nifli et al. konnten bei, allerdings anderem Studiendesign, eine Übereinstimmung von 71% für ANA nachweisen [106].

4.4 Was bringt der neue Assay dem Kliniker?

Lange Zeit galt die Ansicht, dass bestimmte Antikörper spezifisch für eine bestimmte Autoimmunerkrankung sind. Mit der Etablierung neuer Antikörpernachweismethoden zeigt sich, dass dies eher selten der Fall ist und Antikörperprofile als diagnostische Kriterien zunehmend eine Bedeutung erlangen [29, 107].

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass verschiedene Antikörper mit denselben klinischen Merkmalen und Phänotypen der systemischen Sklerose assoziiert sind. Zum Beispiel sind sowohl Anti-Topoisomerase I-Antikörper als auch Anti-PM/Scl-75-Antikörper mit dem Auftreten einer Lungenfibrose assoziiert. Das Vorkommen beider Antikörper im Serum eines Patienten erhöht sogar das Risiko einer restriktiven Lungenfunktionsstörung. Anders als erwartet zeigten sich bei der multivariaten logistischen Regressionsanalyse aber nur für das Vorkommen der Lungenfibrose Hinweise auf eine Erhöhung der Odds-Ratio durch den Einschluss mehrerer Antikörper, so dass Antikörperkombinationen bei der systemischen Sklerose zumindest in der untersuchten Kohorte nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen.

Allgemeine Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der Analyse von Antikörperkombinationen in der untersuchten Kohorte können sicher nicht gezogen werden, da nur eine kleine Auswahl von bekannten Antikörpern in die Betrachtungen einbezogen wurde. Aus diesem Grund sollten die gefundenen Hinweise auf eine Risikoerhöhung bzw. –senkung durch das Vorhandensein bestimmter Antikörper oder Antikörperkombinationen beim Auftreten verschiedener klinischer Manifestationen im Modell der logistischen Regression in einer größeren Kohorte evaluiert werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Einsatz eines Line-Immunoblot-Assays als Nachweismethode die Darstellung mehrerer Antikörper simultan ermöglicht. Auch wenn für die systemische Sklerose Anti-Topoisomerase I- und Anti-CENP-B-Antikörper nach wie vor die größte Prävalenz und diagnostische Bedeutung haben, lassen die Ergebnisse der untersuchten Kohorte durchaus den Schluss zu, dass der Test auf seltenere Antikörper einen Informationsgewinn bedeuten kann. Dies trifft im Besonderen bei Patienten zu, die entweder ANA-positiv sind aber Anti-Topoisomerase I- und Anti-CENP-B-Antikörper-negativ oder aber bei Patienten, die über Anti-Topoisomerase I- und Anti-CENP-B-Antikörper hinaus noch weitere Antikörper im Blut aufweisen.

4.5 Fazit und Ausblick

Die Bestimmung von Autoantikörpern bei Patienten mit dem Verdacht auf eine systemische Sklerose ist aus dem klinischen Alltag nicht mehr wegzudenken. Auch wenn die klinische Untersuchung in Abhängigkeit von der Erfahrung des Untersuchenden nach wie vor die größte Bedeutung für die Diagnose der Erkrankung hat, kann der Nachweis von bestimmten Autoantikörpern auf ein erhöhtes oder auch verringertes Risiko an einer bestimmten Manifestation der systemischen Sklerose zu erkranken hinweisen. Die Risikostratifizierung sollte dabei individuell in Zusammenschau aller klinischen und serologischen Parameter erfolgen. Die diagnostische Wertigkeit scheint, auf Grund der relativ hohen Sensitivität und Spezifität, am größten für Anti-Topoisomerase I- und Anti-CENP-B- bzw. –A-Antikörper zu sein. Darüberhinaus zeigte die Analyse der untersuchten Kohorte, dass die zusätzliche Bestimmung von Anti-Pm/Scl-75- und -100-Antikörpern durch die Detektion bestimmter Risikopatienten ebenfalls einen diagnostischen Wert besitzt. Unter der Annahme, dass Antikörper schon vor dem Auftreten erster sichtbarer Erscheinungen im Blut vorhanden sein können, gewinnt ihre Rolle weiter an Bedeutung, da es möglich ist, Risikopatienten frühzeitig und regelmäßig auf bestimmte Organveränderungen hin zu untersuchen, möglicherweise prophylaktisch tätig zu werden oder rechtzeitig mit einer Therapie zu beginnen.

Auf Grund der Tatsache, dass es Patienten gibt, die im ANA-Screening positiv getestet werden, es aber weiterhin bei einigen nicht gelingt, spezifische Antikörper nachzuweisen, kann die Annahme getroffen werden, dass bei weitem noch nicht alle Antikörper, die auftreten können bekannt sind bzw. nachgewiesen werden können. Zukünftig wird es sicher weiter Gegenstand der Forschung sein müssen, neue Techniken bzw. Antigene zu entwickeln, um weitere Antikörper nachzuweisen und deren Bedeutung im Zusammenhang mit der Klinik der Patienten zu untersuchen.

Auch wenn die systemische Sklerose eine Erkrankung mit niedriger Prävalenz ist, sind die Patienten doch zum Teil sehr schwer beeinträchtigt und von erhöhter Mortalität bedroht. Die frühe und möglichst genaue Diagnostik sowie eine adäquate Therapie muss auch in Zukunft das Ziel des Umganges mit dem Patienten und der Forschung sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden retrospektiven Forschungsarbeit wurden die Prävalenz und der Zusammenhang ausgewählter Autoantikörper mit dem Vorkommen bestimmter klinischer Manifestationen bei Patienten mit systemischer Sklerose analysiert, um Häufigkeiten und Risikogruppen aufzudecken. Zu diesem Zweck wurden die Messergebnisse von drei unterschiedlichen Nachweismethoden (LIA, ELISA und IFT) für acht verschiedene krankheitsspezifische Antikörper ausgewertet und in ausgesuchten Punkten miteinander verglichen. Eingeschlossen wurden Anti-Topoisomerase I-, Anti-CENP-B,-, Anti-CENP-A-, Anti-Pm/Scl-75-, Anti-Pm/Scl-100-, Anti-Ku-, Anti-Rpp38- und Anti-hpop1-Antikörper. Ziel war neben der Prävalenzermittlung und der Bewertung der unterschiedlichen diagnostischen Wertigkeiten der Antikörper hinsichtlich vorkommender klinischer Manifestationen bei der systemischen Sklerose auch die Betrachtung des Nutzens eines Einsatzes der verschiedenen Nachweismethoden zur breitgefächerten Analyse verschiedener Autoantikörper.

Grundlage der Arbeit ist eine große monozentrische Kohorte von Patienten mit systemischer Sklerose der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und klinische Immunologie der Charite, Berlin, die als Bestandteil der statistischen Auswertung ausführlich analysiert und charakterisiert wurde. Das Ergebnis dieser Auswertung zeigt, dass es sich bei diesen Patienten um eine repräsentative Kohorte für die Erkrankung handelt. Für das Erreichen der Zielstellung wurden verschiedene statistische Testverfahren und Modelle genutzt.

Die betrachteten Antikörper wiesen eine sehr unterschiedliche Prävalenz in der untersuchten Kohorte. Am häufigsten wurden die Anti-Centromer-Antikörper-A und -B (36,8%) und Anti-Topoisomerase I-Antikörper (23,9%) nachgewiesen. Seltener, aber doch mit einer höheren Prävalenz als vermutet, fanden sich Anti-Pm/Scl-Antikörper (12,5%). Dabei zeigte sich, dass Anti-Pm/Scl-75-Antikörper häufiger bei Patienten mit systemischer Sklerose zu finden sind als Anti-Pm/Scl-100-Antikörper. Anti-Ku-, Anti-hpop1- und Anti-Rpp38-Antikörper gehören zu den sehr seltenen Antikörpern und wiesen nur eine sehr geringe diagnostische Sensitivität auf. Bei der Betrachtung der Konkordanz der Antikörper untereinander zeigte sich, dass 94,6% der Patienten lediglich einen oder maximal zwei Antikörper im Serum aufwiesen.

Bei der Analyse der Assoziationen mit dem Phänotyp der systemischen Sklerose kann festgehalten werden, dass das Vorkommen von Anti-Topoisomerase I-Antikörpern besonders mit einer diffusen systemischen Sklerose sowie mit einer erhöhten Häufigkeit der fibrotischen und vaskulären Krankheitskomponenten, der Krankheitsaktivität und Mortalität assoziiert ist.

Darüberhinaus konnten Korrelationen zwischen der Höhe des Antikörpertiters und der Schwere der Lungenfunktionsstörung, des Ausmaßes der Hautfibrosierung und dem Aktivitätsgrad der Erkrankung nachgewiesen werden.

Eine besondere Gewichtung lag in der vorliegenden Arbeit auf der Analyse der diagnostischen Wertigkeit der verschiedenen Anti-Pm/Scl-Antikörper, deren einzelne Bedeutung bislang nicht ausreichend geklärt ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der unterschiedlichen Anti-Pm/Scl-Antikörper und der zugrundeliegenden SSc-Subgruppe nahe. Patienten mit einer dSSc zeigen fast ausschließlich eine Autoantikörperreaktion gegen das Pm/Scl-75c-Antigen, während Patienten mit Overlap-Syndromen vorwiegend beide Autoantikörper im Serum aufweisen. Die Häufigkeit und Bedeutsamkeit der Assoziationen zu klinischen Merkmalen sind unterschiedlich bei den beiden untersuchten Anti-Pm/Scl-Antikörpern ausgeprägt. Anti-Pm/Scl-75-Antikörper sind mit einer vermehrten muskuloskelettalen Beteiligung, einer häufigeren Haut- und Lungenfibrose gekennzeichnet. Darüberhinaus sind sie vermehrt bei jüngeren Patienten mit einem aktiveren Krankheitsgeschehen zu finden. Ein günstigerer Krankheitsverlauf konnte nicht beobachtet werden, wohingegen es sich sogar zeigte, dass es eine erhöhte Mortalität bei den Anti-Pm/Scl-75-Antikörper-positiven Patienten gibt. Anti-Pm/Scl-100-Antikörper zeigen nur geringe Assoziationen zu klinischen Manifestationen. Die Betrachtungen zeigen, dass diese Patienten seltener an gastrointestinalen Komplikationen leiden.

Anti-CENP-A- und Anti-CENP-B-Antikörper unterschieden sich in der untersuchten Kohorte nicht in ihrer Häufigkeit. In 94,3% der Fälle kamen beide Antikörper konkordant bei den Patienten vor. Es zeigten sich nur marginale Unterschiede bei den gefundenen Assoziationen der beiden Antikörper im Hinblick auf die betrachteten klinischen Manifestationen, so dass eine Bestimmung beider Antikörper nicht sinnvoll ist. Patienten mit Anti-Centromer-Antikörpern sind durch eine leichtere Krankheitsausprägung und durch ein deutlich geringeres Maß an Fibrosierung gekennzeichnet.

Die übrigen Antikörper konnten in der untersuchten Kohorte sehr selten nachgewiesen werden. Anti-Ku-Antikörper zeigten jedoch einen Zusammenhang mit dem Vorkommen bei Patienten mit einem Overlap-Syndrom zwischen der systemischen Sklerose und der Polymyositis und darüberhinaus mit einer ausgeprägten muskulären Beteiligung bei einer geringen fibrotischen und sklerotischen Komponente. Patienten mit Anti-hpop1- und Anti-Rpp38-Antikörpern lassen sich anhand ihrer präsentierten Klinik nicht zu einer einheitlichen Gruppe zusammenfassen, sodass diese beiden Antikörper in der untersuchten Kohorte keinen speziellen Subtyp charakterisieren.

Die Gruppe der Patienten, bei denen keine Antikörper im Serum nachzuweisen waren, unterscheidet sich nicht signifikant in ihren Eigenschaften von den Antikörper-positiven Patienten. Sie spiegeln daher ein heterogenes Bild der Gesamtkohorte wider.

Der Antikörpernachweis mit dem benutzten Line-Immunoblot-Assay bietet die Möglichkeit mehrere Antikörper parallel zu bestimmen. Der Vergleich der Ergebnisse mit dem IFT sowie dem ELISA zeigt eine große Übereinstimmung für den Nachweis von Anti-Topoisomerase I- (97%) und Anti-CENP-B-Antikörpern (96,1%). Einen besonderen Vorteil bietet die Methode dahingehend, dass es möglich ist, auch die selteneren Antikörper parallel bestimmen zu können, die wie Anti-Ku- und Anti-Pm/Scl-Antikörper besondere Risikopatienten identifizieren.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass diese statistische Arbeit einige bekannte Ergebnisse bestätigen konnte, darüberhinaus aber auch neue Aspekte im Hinblick auf seltenere Antikörper liefert. Für die Zukunft wäre es wünschenswert, bestimmte Ergebnisse in größeren Studien zu überprüfen und zu bestätigen, in denen dann auch Aspekte wie die durchgeführte immunsuppressive Therapie berücksichtigt werden können. Die Möglichkeit neue Antikörper durch die Entwicklung verbesserter Techniken und neuer Antigene nachzuweisen und auf ihre klinische Bedeutung bei Patienten mit der seltenen systemischen Sklerose zu untersuchen, wird zukünftig die Diagnosestellung und die individuelle Risikoverlaufsbeurteilung dieser Patienten erleichtern, um möglichst frühzeitig adäquate Therapieoptionen einleiten zu können.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Steen, V. D., *Autoantibodies in systemic sclerosis.* Semin Arthritis Rheum, **2005**. 35(1): p. 35-42.
2. Walker, J. G. and Fritzler, M. J., *Update on autoantibodies in systemic sclerosis.* Curr Opin Rheumatol, **2007**. 19(6): p. 580-91.
3. Rodenburg, R. J., Raats, J. M., Pruijn, G. J., et al., *Cell death: a trigger of autoimmunity?* Bioessays, **2000**. 22(7): p. 627-36.
4. Reveille, J. D., *The genetic basis of autoantibody production.* Autoimmun Rev, **2006**. 5(6): p. 389-98.
5. Hilario, M. O. and Terreri, M. T., *Rheumatic fever and post-streptococcal arthritis.* Best Pract Res Clin Rheumatol, **2002**. 16(3): p. 481-94.
6. Conrad K, Schößler W, Hiepe F, *Autoantikörper bei systemischen Autoimmunerkrankungen - Ein diagnostischer Leitfaden.* 3 ed. **2007**: Immmundiagnostische Bibliothek der Gesellschaft zur Förderung der Immundiagnostik e.V. 251.
7. Douvas, A. S., Achten, M. and Tan, E. M., *Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma.* J Biol Chem, **1979**. 254(20): p. 10514-22.
8. Maul, G. G., French, B. T., Van Venrooij, W. J., et al., *Topoisomerase I identified by scleroderma 70 antisera: enrichment of topoisomerase I at the centromere in mouse mitotic cells before anaphase.* Proc Natl Acad Sci U S A, **1986**. 83(14): p. 5145-9.
9. Guldner, H. H., Szostecki, C., Vosberg, H. P., et al., *Scl 70 autoantibodies from scleroderma patients recognize a 95 kDa protein identified as DNA topoisomerase I.* Chromosoma, **1986**. 94(2): p. 132-8.
10. Shero, J. H., Bordwell, B., Rothfield, N. F., et al., *High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients.* Science, **1986**. 231(4739): p. 737-40.
11. Shero, J. H., Bordwell, B., Rothfield, N. F., et al., *Antibodies to topoisomerase I in sera from patients with scleroderma.* J Rheumatol Suppl, **1987**. 14 Suppl 13: p. 138-40.
12. Weiner, E. S., Earnshaw, W. C., Senecal, J. L., et al., *Clinical associations of anticentromere antibodies and antibodies to topoisomerase I. A study of 355 patients.* Arthritis Rheum, **1988**. 31(3): p. 378-85.
13. Hu, P. Q., Fertig, N., Medsger, T. A., Jr., et al., *Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis.* Arthritis Rheum, **2003**. 48(5): p. 1363-73.
14. Diot, E., Giraudeau, B., Diot, P., et al., *Is anti-topoisomerase I a serum marker of pulmonary involvement in systemic sclerosis?* Chest, **1999**. 116(3): p. 715-20.
15. Sato, S., Hamaguchi, Y., Hasegawa, M., et al., *Clinical significance of anti-topoisomerase I antibody levels determined by ELISA in systemic sclerosis.* Rheumatology (Oxford), **2001**. 40(10): p. 1135-40.
16. Walker, U. A., Tyndall, A., Czirjak, L., et al., *Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database.* Ann Rheum Dis, **2007**. 66(6): p. 754-63.
17. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M. J., et al., *Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera.* Proc Natl Acad Sci U S A, **1980**. 77(3): p. 1627-31.

18. Rattner, J. B., Rees, J., Arnett, F. C., et al., *The centromere kinesin-like protein, CENP-E. An autoantigen in systemic sclerosis.* Arthritis Rheum, **1996**. 39(8): p. 1355-61.
19. Rattner, J. B., Rao, A., Fritzler, M. J., et al., *CENP-F is a .ca 400 kDa kinetochore protein that exhibits a cell-cycle dependent localization.* Cell Motil Cytoskeleton, **1993**. 26(3): p. 214-26.
20. He, D., Zeng, C., Woods, K., et al., *CENP-G: a new centromeric protein that is associated with the alpha-1 satellite DNA subfamily.* Chromosoma, **1998**. 107(3): p. 189-97.
21. Miyawaki, S., Asanuma, H., Nishiyama, S., et al., *Clinical and serological heterogeneity in patients with anticentromere antibodies.* J Rheumatol, **2005**. 32(8): p. 1488-94.
22. Akbarali, Y., Matousek-Ronck, J., Hunt, L., et al., *Fine specificity mapping of autoantigens targeted by anti-centromere autoantibodies.* J Autoimmun, **2006**. 27(4): p. 272-80.
23. Steen, V. D., Powell, D. L. and Medsger, T. A., Jr., *Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis.* Arthritis Rheum, **1988**. 31(2): p. 196-203.
24. Reichlin, M., Maddison, P. J., Targoff, I., et al., *Antibodies to a nuclear/nucleolar antigen in patients with polymyositis overlap syndromes.* J Clin Immunol, **1984**. 4(1): p. 40-4.
25. Mahler, M. and Raijmakers, R., *Novel aspects of autoantibodies to the PM/Scl complex: clinical, genetic and diagnostic insights.* Autoimmun Rev, **2007**. 6(7): p. 432-7.
26. Raijmakers, R., Renz, M., Wiemann, C., et al., *PM-Scl-75 is the main autoantigen in patients with the polymyositis/scleroderma overlap syndrome.* Arthritis Rheum, **2004**. 50(2): p. 565-9.
27. Robinson, A., *The Ku autoantigen: cast in a new light.* Cmaj, **1996**. 154(12): p. 1871-3.
28. Mimori, T., *Clinical significance of anti-Ku autoantibodies--a serologic marker of overlap syndrome?* Intern Med, **2002**. 41(12): p. 1096-8.
29. Von Muhlen, C. A. and Tan, E. M., *Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases.* Semin Arthritis Rheum, **1995**. 24(5): p. 323-58.
30. Rozman, B., Euenik, S., Sodin-Semrl, S., et al., *Prevalence and clinical associations of anti-KU antibodies in patients with systemic sclerosis: a European EUSTAR - initiated multicentre case-control study.* Ann Rheum Dis, **2007**.
31. Van Eenennaam, H., Vogelzangs, J. H., Lugtenberg, D., et al., *Identity of the RNase MRP- and RNase P-associated Th/To autoantigen.* Arthritis Rheum, **2002**. 46(12): p. 3266-72.
32. Kuwana, M., Kimura, K., Hirakata, M., et al., *Differences in autoantibody response to Th/To between systemic sclerosis and other autoimmune diseases.* Ann Rheum Dis, **2002**. 61(9): p. 842-6.
33. Sieper, J., Burkhardt, H. and Gross, W. L., *[Immunopathogenetic hypotheses in inflammatory rheumatic diseases]*. Internist (Berl), **2001**. 42(2): p. 198-210.
34. Zink, A., Mau, W. and Schneider, M., *[Epidemiological and public health aspects of inflammatory rheumatic systemic diseases]*. Internist (Berl), **2001**. 42(2): p. 211-6, 219-22.
35. Mayes, M. D., *Scleroderma epidemiology.* Rheum Dis Clin North Am, **2003**. 29(2): p. 239-54.
36. Mayes, M. D., Lacey, J. V., Jr., Beebe-Dimmer, J., et al., *Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population.* Arthritis Rheum, **2003**. 48(8): p. 2246-55.
37. Medsger, T. A., Jr. and Masi, A. T., *Epidemiology of systemic sclerosis (scleroderma).* Ann Intern Med, **1971**. 74(5): p. 714-21.

38. Steen, V. D., Oddis, C. V., Conte, C. G., et al., *Incidence of systemic sclerosis in Allegheny County, Pennsylvania. A twenty-year study of hospital-diagnosed cases, 1963-1982.* Arthritis Rheum, **1997**. 40(3): p. 441-5.
39. Arnett, F. C., Howard, R. F., Tan, F., et al., *Increased prevalence of systemic sclerosis in a Native American tribe in Oklahoma. Association with an Amerindian HLA haplotype.* Arthritis Rheum, **1996**. 39(8): p. 1362-70.
40. Stephanie Gu, Y., Kong, J., Cheema, G. S., et al., *The Immunobiology of Systemic Sclerosis.* Semin Arthritis Rheum, **2008**.
41. Zhou, X., Tan, F. K., Wang, N., et al., *Genome-wide association study for regions of systemic sclerosis susceptibility in a Choctaw Indian population with high disease prevalence.* Arthritis Rheum, **2003**. 48(9): p. 2585-92.
42. Masi at, Rodnan Gp, Medsger Ta Jr, *Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee.* Arthritis Rheum, **1980**. 23(5): p. 581-90.
43. Leroy, E. C. and Medsger, T. A., Jr., *Criteria for the classification of early systemic sclerosis.* J Rheumatol, **2001**. 28(7): p. 1573-6.
44. Leroy, E. C., Black, C., Fleischmajer, R., et al., *Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis.* J Rheumatol, **1988**. 15(2): p. 202-5.
45. Needleman, B. W., *Immunologic aspects of scleroderma.* Curr Opin Rheumatol, **1992**. 4(6): p. 862-8.
46. Kowal-Bielecka, O., *Targeting vascular disease in systemic sclerosis.* Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, **2006**. 6(4): p. 401-7.
47. Cepeda, E. J. and Reveille, J. D., *Autoantibodies in systemic sclerosis and fibrosing syndromes: clinical indications and relevance.* Curr Opin Rheumatol, **2004**. 16(6): p. 723-32.
48. Prescott, R. J., Freemont, A. J., Jones, C. J., et al., *Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma.* J Pathol, **1992**. 166(3): p. 255-63.
49. Riede Un, Schaefer He, *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Vol. 4. Auflage. **2001**, Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag.
50. Cerinic, M. M., Valentini, G., Sorano, G. G., et al., *Blood coagulation, fibrinolysis, and markers of endothelial dysfunction in systemic sclerosis.* Semin Arthritis Rheum, **2003**. 32(5): p. 285-95.
51. Scaletti, C., Vultaggio, A., Maggi, E., et al., *Microchimerism and systemic sclerosis.* Int Arch Allergy Immunol, **2001**. 125(3): p. 196-202.
52. Gonzalez-Amaro, R., Alarcon-Segovia, D., Alcocer-Varela, J., et al., *Mononuclear cell-fibroblast interactions in scleroderma.* Clin Immunol Immunopathol, **1988**. 46(3): p. 412-20.
53. Needleman, B. W., Wigley, F. M. and Stair, R. W., *Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma.* Arthritis Rheum, **1992**. 35(1): p. 67-72.
54. Lunardi, C., Bason, C., Navone, R., et al., *Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells.* Nat Med, **2000**. 6(10): p. 1183-6.
55. Arnett, F. C., Cho, M., Chatterjee, S., et al., *Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts.* Arthritis Rheum, **2001**. 44(6): p. 1359-62.
56. Englert, H., Small-Mcmahon, J., Chambers, P., et al., *Familial risk estimation in systemic sclerosis.* Aust N Z J Med, **1999**. 29(1): p. 36-41.

57. Tan, F. K. and Arnett, F. C., *Genetic factors in the etiology of systemic sclerosis and Raynaud phenomenon.* Curr Opin Rheumatol, **2000**. 12(6): p. 511-9.
58. Sunderkotter, C. and Riemekasten, G., *Pathophysiology and clinical consequences of Raynaud's phenomenon related to systemic sclerosis.* Rheumatology (Oxford), **2006**. 45 Suppl 3: p. iii33-5.
59. Manger, B, *Checkliste Rheumatologie*. Vol. 3. **2005**, Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag.
60. Mcnearney, T. A., Reveille, J. D., Fischbach, M., et al., *Pulmonary involvement in systemic sclerosis: associations with genetic, serologic, sociodemographic, and behavioral factors.* Arthritis Rheum, **2007**. 57(2): p. 318-26.
61. Allanore, Y. and Kahan, A., *Treatment of systemic sclerosis.* Joint Bone Spine, **2006**. 73(4): p. 363-8.
62. Steen, V. D. and Medsger, T. A., Jr., *Long-term outcomes of scleroderma renal crisis.* Ann Intern Med, **2000**. 133(8): p. 600-3.
63. Steen, V. D., *Treatment of systemic sclerosis.* Am J Clin Dermatol, **2001**. 2(5): p. 315-25.
64. Berezne, A., Valeyre, D., Ranque, B., et al., *Interstitial lung disease associated with systemic sclerosis: what is the evidence for efficacy of cyclophosphamide?* Ann N Y Acad Sci, **2007**. 1110: p. 271-84.
65. Vitali, C., Bombardieri, S., Moutsopoulos, H. M., et al., *Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community.* Arthritis Rheum, **1993**. 36(3): p. 340-7.
66. Tan, E. M., Cohen, A. S., Fries, J. F., et al., *The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, **1982**. 25(11): p. 1271-7.
67. Arnett, F. C., Edworthy, S. M., Bloch, D. A., et al., *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum, **1988**. 31(3): p. 315-24.
68. Hunzelmann, N., Genth, E., Krieg, T., et al., *The registry of the German Network for Systemic Scleroderma: frequency of disease subsets and patterns of organ involvement.* Rheumatology (Oxford), **2008**. 47(8): p. 1185-92.
69. Bennett, R. M., *Scleroderma overlap syndromes.* Rheum Dis Clin North Am, **1990**. 16(1): p. 185-98.
70. Rodnan, G. P. and Fennell, R. H., Jr., *Progressive systemic sclerosis sine scleroderma.* Jama, **1962**. 180: p. 665-70.
71. Mosca, M., Neri, R. and Bombardieri, S., *Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD): a review of the literature and a proposal for preliminary classification criteria.* Clin Exp Rheumatol, **1999**. 17(5): p. 615-20.
72. Mosca, M., Tani, C., Neri, C., et al., *Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD).* Autoimmun Rev, **2006**. 6(1): p. 1-4.
73. Furst, D. E., Clements, P. J., Steen, V. D., et al., *The modified Rodnan skin score is an accurate reflection of skin biopsy thickness in systemic sclerosis.* J Rheumatol, **1998**. 25(1): p. 84-8.
74. Rodnan, G. P., Myerowitz, R. L. and Justh, G. O., *Morphologic changes in the digital arteries of patients with progressive systemic sclerosis (scleroderma) and Raynaud phenomenon.* Medicine (Baltimore), **1980**. 59(6): p. 393-408.
75. Della Rossa, A., Valentini, G., Bombardieri, S., et al., *European multicentre study to define disease activity criteria for systemic sclerosis. I. Clinical and epidemiological features of 290 patients from 19 centres.* Ann Rheum Dis, **2001**. 60(6): p. 585-91.
76. Valentini, G., Della Rossa, A., Bombardieri, S., et al., *European multicentre study to define disease activity criteria for systemic sclerosis. II. Identification of disease activity*

variables and development of preliminary activity indexes. Ann Rheum Dis, **2001**. 60(6): p. 592-8.

77. Toolan, H. W., *Transplantable human neoplasms maintained in cortisone-treated laboratory animals: H.S. No. 1; H.Ep. No. 1; H.Ep. No. 2; H.Ep. No. 3; and H.Emb.Rh. No. 1.* Cancer Res, **1954**. 14(9): p. 660-6.
78. Conrad K, Schößler W, Hiepe F, *Autoantikörper bei systemischen Autoimmunerkrankungen - Ein diagnostischer Leitfaden.* 3 ed. **2007**: Immmundiagnostische Bibliothek der Gesellschaft zur Förderung der Immundiagnostik e.V. 251.
79. Greiling H, Gressner Am, *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie.* 3 ed. Ärztliche Verwendung von klinisch-chemischen Befunden., ed. Stamm D Büttner J. **1995**, Stuttgart: Schattauer Verlag.
80. Brosius, Felix, *SPSS 14*. Vol. 1. **2006**, Hamburg: mitp, REDLINE GMBH.
81. Meyer, O., *Prognostic markers for systemic sclerosis.* Joint Bone Spine, **2006**. 73(5): p. 490-4.
82. Giordano, M., Valentini, G., Migliaresi, S., et al., *Different antibody patterns and different prognoses in patients with scleroderma with various extent of skin sclerosis.* J Rheumatol, **1986**. 13(5): p. 911-6.
83. Kuwana, M., Kaburaki, J., Arnett, F. C., et al., *Influence of ethnic background on clinical and serologic features in patients with systemic sclerosis and anti-DNA topoisomerase I antibody.* Arthritis Rheum, **1999**. 42(3): p. 465-74.
84. Kasper Dl, Fauci as, Longo Dl Et Al., *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16th Edition ed. Sysemic Sclerosis (Scleroderma) and Related Disorders **2005**: McGraw-Hill.
85. Scussel-Lonzetti, L., Joyal, F., Raynauld, J. P., et al., *Predicting mortality in systemic sclerosis: analysis of a cohort of 309 French Canadian patients with emphasis on features at diagnosis as predictive factors for survival.* Medicine (Baltimore), **2002**. 81(2): p. 154-67.
86. Bryan, C., Howard, Y., Brennan, P., et al., *Survival following the onset of scleroderma: results from a retrospective inception cohort study of the UK patient population.* Br J Rheumatol, **1996**. 35(11): p. 1122-6.
87. Ferri, C., Valentini, G., Cozzi, F., et al., *Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients.* Medicine (Baltimore), **2002**. 81(2): p. 139-53.
88. Hildebrandt, S., Jackh, G., Weber, S., et al., *A long-term longitudinal isotypic study of anti-topoisomerase I autoantibodies.* Rheumatol Int, **1993**. 12(6): p. 231-4.
89. Kuwana, M., Kaburaki, J., Mimori, T., et al., *Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis.* Arthritis Rheum, **2000**. 43(5): p. 1074-84.
90. Tramposch, H. D., Smith, C. D., Senecal, J. L., et al., *A long-term longitudinal study of anticentromere antibodies.* Arthritis Rheum, **1984**. 27(2): p. 121-4.
91. Koenig, M., Dieude, M. and Senecal, J. L., *Predictive value of antinuclear autoantibodies: the lessons of the systemic sclerosis autoantibodies.* Autoimmun Rev, **2008**. 7(8): p. 588-93.
92. Selva-O'callaghan, A., Labrador-Horrillo, M., Solans-Laque, R., et al., *Myositis-specific and myositis-associated antibodies in a series of eighty-eight Mediterranean patients with idiopathic inflammatory myopathy.* Arthritis Rheum, **2006**. 55(5): p. 791-8.
93. Hausmanowa-Petrusewicz, I., Kowalska-Oledzka, E., Miller, F. W., et al., *Clinical, serologic, and immunogenetic features in Polish patients with idiopathic inflammatory myopathies.* Arthritis Rheum, **1997**. 40(7): p. 1257-66.

94. Vandergheynst, F., Ocmant, A., Sordet, C., et al., *Anti-pm/scl antibodies in connective tissue disease: Clinical and biological assessment of 14 patients.* Clin Exp Rheumatol, **2006**. 24(2): p. 129-33.
95. Marguerie, C., Bunn, C. C., Copier, J., et al., *The clinical and immunogenetic features of patients with autoantibodies to the nucleolar antigen PM-Scl.* Medicine (Baltimore), **1992**. 71(6): p. 327-36.
96. Mitri, G. M., Lucas, M., Fertig, N., et al., *A comparison between anti-Th/To- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis patients with limited cutaneous involvement.* Arthritis Rheum, **2003**. 48(1): p. 203-9.
97. Mimori, T., Akizuki, M., Yamagata, H., et al., *Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap.* J Clin Invest, **1981**. 68(3): p. 611-20.
98. Cavazzana, I., Ceribelli, A., Quinzanini, M., et al., *Prevalence and clinical associations of anti-Ku antibodies in systemic autoimmune diseases.* Lupus, **2008**. 17(8): p. 727-32.
99. Hirakata, M., Mimori, T., Akizuki, M., et al., *Autoantibodies to small nuclear and cytoplasmic ribonucleoproteins in Japanese patients with inflammatory muscle disease.* Arthritis Rheum, **1992**. 35(4): p. 449-56.
100. Gonzalez, R., Storr, M., Bloching, H., et al., *Autoantibody profile in progressive systemic sclerosis as markers for esophageal involvement.* J Clin Gastroenterol, **2001**. 32(2): p. 123-7.
101. Garcia De La Pena-Lefebvre, P., Chanseaud, Y., Tamby, M. C., et al., *IgG reactivity with a 100-kDa tissue and endothelial cell antigen identified as topoisomerase 1 distinguishes between limited and diffuse systemic sclerosis patients.* Clin Immunol, **2004**. 111(3): p. 241-51.
102. Kavanaugh, A., Tomar, R., Reveille, J., et al., *Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists.* Arch Pathol Lab Med, **2000**. 124(1): p. 71-81.
103. Maclachlan, D., Vogt, P., Wu, X., et al., *[Comparison between line immunoassay (LIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of antibodies to extractable nuclear antigenes (ENA) with reference to other laboratory results and clinical features]*. Z Rheumatol, **2002**. 61(5): p. 534-44.
104. Jaskowski, T. D., Schroder, C., Martins, T. B., et al., *Screening for antinuclear antibodies by enzyme immunoassay.* Am J Clin Pathol, **1996**. 105(4): p. 468-73.
105. Kavanaugh, A., *The role of the laboratory in the evaluation of rheumatic diseases.* Clin Cornerstone, **1999**. 2(2): p. 11-25.
106. Nifli, A. P., Notas, G., Mamoulaki, M., et al., *Comparison of a multiplex, bead-based fluorescent assay and immunofluorescence methods for the detection of ANA and ANCA autoantibodies in human serum.* J Immunol Methods, **2006**. 311(1-2): p. 189-97.
107. Van Eenennaam, H., Vogelzangs, J. H., Bisschops, L., et al., *Autoantibodies against small nucleolar ribonucleoprotein complexes and their clinical associations.* Clin Exp Immunol, **2002**. 130(3): p. 532-40.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit (einschließlich Abbildungen), die anderen Ursprungs sind in jedem Einzelfall mit Angabe des Urhebers als solche kenntlich gemacht habe.

Des weiteren versichere ich, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlich ist sowie dass ich mich noch nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen solchen bereits besitze.

Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung der Charité Universitätsmedizin Berlin vom 22. März 2005 ist mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation wurde von Frau PD. Dr. med. G. Riemekasten aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie am Campus Mitte der Charite, Berlin, betreut.

Berlin, den 01. Februar 2009 Katharina Hanke

DANKSAGUNG

In erster Linie möchte ich Ihnen, Frau PD. Dr. Riemekasten, für die Unterstützung bei der Wahl und der Umsetzung des Themas dieser Promotionsarbeit danken. Die mir von Ihnen eröffneten Möglichkeiten zur Teilnahme an wissenschaftlichen Kongressen, Posterpräsentationen und Publikationen haben nicht nur diese Arbeit, sondern darüberhinaus auch meine persönliche wissenschaftliche Entwicklung in besonderem Maße gefördert. Auch den anderen Mitarbeitern des Zentrums für Sklerodermie der Charite – CCM, Berlin, insbesondere Claudia Brückner und Mike Becker, möchte ich für ihre wertvolle Unterstützung danken.

Vielen Dank an die Mitarbeiter der EUROIMMUN AG, insbesondere an Dr. W. Stöcker, Dr. Wolfgang Schlumberger, Dr. Wolfgang Meyer und Antonia Janssen, für ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung und viele interessante Diskussionen zu aktuellen Fragestellungen der Antikörperdiagnostik.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Karl Egerer, dem Leiter des rheumatologisch-immunologischen Labors der Charite, Berlin und seinen MitarbeiterInnen für die Zurverfügungstellung und ihr Engagement bei der Aufarbeitung der Serumproben bedanken.

Ein besonderer Dank gilt den Personen, Dörte Huscher und Tom Frenzel, die mir bei statistischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite standen.

Von Herzen kommt der Dank an meine Eltern, Dr. Christine und Dr. Peter Hanke, und meinen Freund Tobias Weinert, die mich zu dem machen was ich bin und mir überhaupt erst die Möglichkeit gegeben haben, dieses Vorhaben in die Tat umzusetzen.

LEBENSLAUF

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

PUBLIKATIONSLISTE

Artikel:

1. Hanke K, Dähnrich C, Brückner CS, Huscher D, Becker M, Janssen A, Meyer W, Egerer K, Hiepe F, Burmester GR, Schlumberger W, and Riemekasten G. *Diagnostic value of anti-topoisomerase I antibodies in a large monocentric cohort*. Arthritis Research & Therapy, 2009, 11:R28.
2. Hanke K, Brückner CS, Dähnrich C, Komorowski L, Meyer W, Janssen A, Backhaus M, Becker M, Kill A, Egerer K, Burmester GR, Hiepe F, Schlumberger W, Riemekasten G. *Antibodies against PM/Scl-75 and PM/Scl-100 are independent markers for different subsets of SSc patients.* Arthritis Research & Therapy, 2009, 11:R22
3. Hanke K, Riemekasten G. *Anti-CENP-A and anti-CENP-B antibodies show high concordance and similar clinical associations in patients with systemic sclerosis despite completely different underlying protein sequences.* In preparation.

Poster:

Hanke K, Dähnrich C, Brückner CS, Huscher D, Becker M, Janssen A, Meyer W, Egerer K[1], Hiepe F, Burmester GR, Schlumberger W, and Riemekasten G. *Diagnostic value of anti-topoisomerase I antibodies in a large monocentric cohort – a comparison of ELISA and Line Immunoblot Assay.* 36. DGRH Kongress, Berlin, Germany, 24.-27.09.2008

K. Hanke, A. Janssen, W. Meyer, T. Scheper, L. Komorowski, C. Brueckner, K. Egerer, F. Hiepe, G. Riemekasten. *Distribution of autoantibodies against PM/Scl75 and PM/Scl100 in patients with systemic sclerosis.* 10th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity, Guadalajara, Jalisco, Mexico, 06.-09-03.2008

K. Hanke, S. Uibel, C. Brückner, C. Dähnrich, K. Egerer, F. Hiepe, W. Schlumberger, G. Riemekasten. *Antibodies against CENP-B antigen identify a subset of systemic sclerosis patients with Sicca syndrome and missing lung fibrosis – analysis of the Charité SSc cohort*. 8th Dresden Symposium on Autoantibodies, Dresden, Germany, 12.-15.09.2007