

Aus der Klinik für Dermatologie der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. D. Zillikens

**Prävalenz und genetische Assoziation
antinukleärer Autoantikörper in gesunden
Blutspendern**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

– Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von

Jasper Niclas Prüßmann

aus Lübeck

Lübeck 2015

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Ralf J. Ludwig

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Peter Lamprecht

Tag der mündlichen Prüfung: 12.6.2015

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 12.6.2015

Promotionskommission der Sektion Medizin

Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
AMA-M2	Antimitochondriale Antikörper-M2
ANA	antinukleäre Autoantikörper
ANA _{SLE}	SLE-assoziierte ANA-Muster
APC	Antigen präsentierende Zellen
APL	Anti-Phospholipid Antikörper
BAFF	B-cell activating factor
CD	cluster of differentiation
CDR	complementarity determining region
CENP	centromeric nucleoprotein
CI	Konfidenzintervall
CRP	C-reaktives Protein
DFS	dense fine speckled (= LEDGF)
DHS	Dallas Heart Study group
DNA (DNS)	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure, dt.)
dsDNA	double stranded (Doppelstrang, dt.) DNA
Dsg	Desmoglein
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ENA	extrahierbares nukleäres Antigen
EZR	Extrazellulärraum
Fa.	Firma
FcγR	Fc gamma Rezeptor
FDR	false discovery rate
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
GWAS	genomweite Assoziationsstudie
HEp	Human epidermoid cancer cells
IFT	Immunfluoreszenztechnik
Ig	Immunglobulin
IIF	indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie
IL	Interleukin
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
MAF	minor allele frequency
MCTD	mixed connective tissue disease (Mischkollagenose, dt.)
MDA-LDL	malondialdehyd low density lipoprotein
n	Menge
N	Gesamtmenge
NA	unbekannt (not available)

NAA	Natürliche Autoantikörper
NETs	neutrophil extracellular traps
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NOR	nucleolus-organizing region
nRNP	nukleäres Ribonukleoprotein
Nukl.	Nukleosom
OLIG3	Oligodendrozytentranskriptionsfaktor 3
OR	Odds ratio
OxLDL	oxidiertes low density lipoprotein
p	Merkmalswahrscheinlichkeit
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCNA	proliferating-cell-nuclear-antigen
pH	pH-Wert
PL-12	alanyl-tRNA synthetase
PM-Scl	Polymyositis-Sclerodermie
q	Gegenwahrscheinlichkeit
rib. P protein	ribosomales P-Protein
RNA	ribonucleic acid
RNP	Ribonukleoprotein
RP11	subunit POLR3K of human RNA-polymerase III
Scl-70	scleroderma-70 Antigen (Topoisomerase I)
SCLE	Subakuter kutaner Lupus erythematoses
SE _p	Standardfehler
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SLICC	systemic lupus international collaborating clinics
Sm	Smith Antigen
SNP	single nucleotide polymorphism
snRNP	small nuclear ribonucleic proteins
SS-A	Sjögren Syndrom Antigen A (= Ro)
SS-B	Sjögren Syndrom Antigen B (= La)
TGF-β	transforming growth factor beta
T _H Zellen	T-Helfer Zellen
TLR	toll like receptor (Toll-ähnlicher Rezeptor)
TNF	tumor necrosis factor
TNFAIP3	tumor necrosis factor alpha-induced protein 3
T _{reg}	regulative T-Zelle
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die selbst-Immunität im Fokus	1
1.2	Autoantikörper	4
1.2.1	Vielfalt der Antikörperspezifitäten	4
1.2.2	Zentrale Toleranz	5
1.2.3	Periphere Toleranz	7
1.2.4	Extrinsische Toleranz	7
1.2.5	Bildung von Autoantikörpern	8
1.2.6	Natürliche Autoantikörper	9
1.3	Systemischer Lupus Erythematoses – SLE	10
1.3.1	Epidemiologie	11
1.3.2	Pathogenese	11
1.3.3	Klinik	12
1.4	Entwicklung der Fragestellungen	14
1.4.1	Fragestellungen	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Ethik	16
2.2	Kontroll- und Fallgruppencharakterisierung	16
2.3	Proben der Blutspender	16
2.4	Screening für Antinukleäre Antikörper (ANA)	17
2.4.1	Auswahl der ANA-Fluoreszenzmuster	19
2.5	Validierung und Spezifizierung der Antinukleären Antikörper	19
2.5.1	Validierung	19
2.5.2	Spezifizierung	20
2.6	Genotypisierung	21
2.6.1	DNA Aufbereitung	21
2.6.2	Konzentrationsmessung	22

2.6.3	Aufkonzentrierung	22
2.6.4	Präparation für die Genotypisierung	22
2.7	Studienübersicht.....	23
2.8	Auswertung und Statistik	24
2.8.1	Auswertung der genomweiten Assoziationsstudie	24
2.8.2	Statistik.....	25
3	Ergebnisse	27
3.1	ANA Prävalenz in gesunden Blutspendern	27
3.2	Antigenspezifität der ANA	28
3.3	Assoziation von ANA mit genetischen Merkmalen	31
3.3.1	Geschlechterverteilung	32
3.3.2	SNP Analyse	32
3.4	ANA Risikogene in SLE Patienten	35
4	Diskussion	36
4.1	Prävalenz antinukleärer Autoantikörper in Gesunden	36
4.2	Zielantigene antinukleärer Antikörper.....	37
4.2.1	Immunogenität nukleärer Antigene	39
4.3	Pathophysiologie der Autoantikörper	40
4.3.1	Entstehung der Autoantikörper	40
4.3.2	Pathogenität der Autoantikörper	43
4.3.3	Betrachtungen der Autoantikörpergenese von Gesunden und Patienten	44
4.3.4	Natürliche Autoantikörper	48
4.4	Herausforderung der klinischen Autoantikörperdiagnostik	49
4.4.1	Prädiktiver Wert antinukleärer Autoantikörper.....	50
4.4.2	Pathognomonische Fluoreszenzmuster für Gesunde.....	51
4.4.3	Zeitlicher Verlauf der ANA-Titer	52
4.5	Autoantikörper in der Pathogenese des Systemischen Lupus Erythematoses...53	
4.6	Genetik.....	55
4.6.1	Frauen sind häufiger ANA positiv.....	55
4.6.2	Single Nucleotide Polymorphism imm_6_138173816 (rs58905141)	55

4.6.3	TNFAIP3.....	56
4.7	Grenzen des Experimentaldesigns	57
4.7.1	Anonymität der Probanden	57
4.7.2	Validität der indirekten Immunfluoreszenz	58
4.7.3	Avidität der detektierten antinukleären Autoantikörper	59
4.7.4	Validität der Line Immunoblots.....	59
4.7.5	Einfluss des Studiendesigns auf die Genetik ANA _{SLE} -positiver Individuen ..	60
4.8	Mögliche Folgeexperimente.....	62
5	Zusammenfassung	64
6	Literatur.....	65
7	Anhang	73
7.1	Ethikvotum.....	73
7.2	SLICC Klassifikationssystem	73
7.3	Antigene der line blot immunoassays	74
7.4	Kombinationen spezifischer SLE-Antigene	75
7.5	Tafel zur Bestimmung von Immunfluoreszenzmustern auf HEp-Zellen	76
	Danksagung	77
	Lebenslauf.....	78
	Veröffentlichungen	79
	Kongressbeiträge	80

1 Einleitung

In den letzten Jahrzehnten fielen in Ländern mit hohem Lebensstandard die Inzidenzen von Infektionskrankheiten, während Autoimmunerkrankungen immer häufiger wurden [13]. Gleichzeitig ließen sich weitere Zielstrukturen der Autoimmunerkrankungen identifizieren und für die Routinediagnostik zugänglich machen. Das führt mit zunehmender Sicherheit sowohl zur richtigen Erkennung als auch zur Therapie der Erkrankungen. Trotz großer Fortschritte leiden viele Menschen an den Folgen der Erkrankungen und den oft unspezifischen immunsuppressiven Therapien [53]. Hierbei nehmen die Organschäden zu, je länger die Autoimmunerkrankung nicht adäquat behandelt wird. Daher kommt dem Zeitpunkt der Diagnose mittels verlässlicher Parameter eine entscheidende Rolle zu.

1.1 Die selbst-Immunität im Fokus

Autoimmunerkrankungen werden gemeinhin als Folge des Kontrollverlusts über das adaptive Immunsystem verstanden. Hierbei werden autoreaktive Lymphozyten aktiviert. Unter diesen sind B-Lymphozyten zur Bildung von Autoantikörpern fähig, die technisch sehr einfach im Blut nachweisbar sind und bei Autoimmunerkrankungen fast immer gefunden werden. Autoantikörper sind deshalb integraler Bestandteil der Diagnostik vieler Autoimmunerkrankungen. In retrospektiven Studien konnte nachgewiesen werden, dass sich Autoimmunerkrankungen teilweise Jahre vor den ersten klinischen Symptomen durch das Auftreten der Autoantikörper ankündigen können und in diesem Zeitraum verschiedene spezifische Autoantikörper akkumulieren (s. Abbildung 1) [6, 15, 35, 37, 57, 71, 77]. Es liegt nahe, Autoantikörper nicht nur zur Diagnostik, sondern auch zur Vorhersage manifester Erkrankungen zu nutzen. Identifizierte Personen könnten dann von einer frühen, vielleicht sogar prophylaktischen milderen Therapie profitieren. Ein Nachteil der retrospektiven Analysen von Patienten ist, dass gesunde Träger von Autoantikörpern nicht untersucht werden können. Da sich Autoantikörper in Abhängigkeit der genutzten Methode und Bewertungskriterien auch bei zahlreichen gesunden Menschen finden (s. Tabelle 1), sind diese Untersuchungen jedoch dringend notwendig. Zur prospektiven Unterscheidung von Gesunden und zukünftig Erkrankenden sind somit sichere Kriterien zu identifizieren und Standards zu entwickeln.

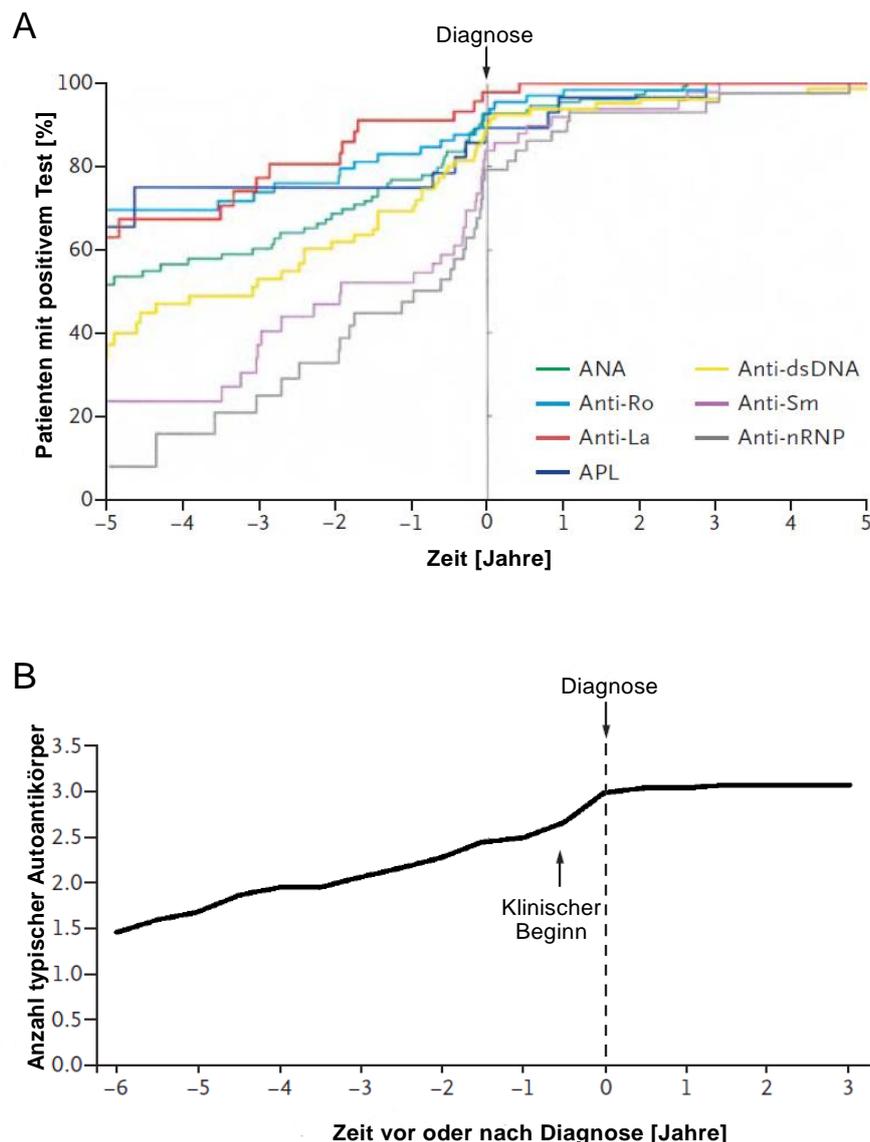


Abbildung 1: Nachweis SLE-typischer Autoantikörper vor und nach SLE-Diagnose, adaptiert nach Arbuckle et al. [6]. **A:** Anteil der Patienten mit positivem Autoantikörperbefund bezogen auf den Zeitpunkt relativ zur SLE-Diagnose. **B:** Akkumulation SLE spezifischer Autoantikörper. Abkürzungen: ANA = Antinukleäre Autoantikörper; Anti-Ro = Anti-SS-A Autoantikörper; Anti-La = Anti-SS-B Autoantikörper; APL = Anti-Phospholipid Antikörper; Anti-dsDNA = Anti-Doppelstrang Desoxyribonukleinsäure Autoantikörper; Anti-Sm = Anti-Smith Antigen Autoantikörper; Anti-nRNP = Anti-Ribonukleoprotein Autoantikörper

Eine naheliegende und einfache Möglichkeit bietet die quantitative Analyse der gefundenen Autoantikörper. Bei vielen Autoimmunerkrankungen wurden Zusammenhänge zwischen Krankheitsaktivität und der Konzentration der Autoantikörper im Serum festgestellt. Diese bestehen in der Regel jedoch nur innerhalb eines Individuums und auch nicht für absolute Antikörperlevel [31, 46, 47, 52, 82]. Ebenso schwierig ist die Analyse Erkrankter aus der Retrospektive, da die Messintervalle durch die überwiegend geringe Zahl der aufbewahrten Blutproben den Titerverlauf nur grob abbilden. Möglicherweise gab es auch darum zahlreiche Individuen mit fallenden Titern,

obwohl die Autoantikörpertiter vor dem Ausbruch eines systemischen Lupus erythematoses (SLE) durchschnittlich signifikant anstiegen [5]. Engmaschig konnte die Dynamik der Autoantikörperlevel bisher nur während der Therapie von Patienten beobachtet werden. Die prospektive Langzeitbeobachtung Gesunder zeigte in groben Messintervallen überwiegend stabile Autoantikörperlevel und nur in Ausnahmefällen Krankheitsausbrüche [67, 111, 113]. Somit erbrachte die retrospektive Beobachtung steigender Antikörperspiegel vor Ausbruch der Erkrankung neue Hinweise zur Pathogenese einer Autoimmunerkrankung, die jedoch bisher nicht zur sicheren Prädiktion einer Autoimmunerkrankung genutzt werden kann. Für die meisten Autoimmunerkrankungen gilt, dass Autoantikörper als Surrogatparameter die Krankheitsaktivität im Verlauf und individuell widerspiegeln können [58]. Der Ist-Zustand einer Erkrankung wird jedoch nicht verlässlich durch Autoantikörperspiegel abgebildet und auch eine allgemeingültige Schwelle, ab der die Erkrankung manifest wird, existiert nicht.

Ein qualitatives und vielversprechendes Kriterium zur Identifikation eines besonderen Risikos könnte das Glykosylierungsmuster der Autoantikörper darstellen. Erst in den letzten Jahren wurde festgestellt, dass verschiedene Glykosylierungsmuster stärkere pro- oder antiinflammatorische Wirkungen entfalten [26]. Falls ein Zusammenhang zwischen Glykosylierungsmuster und Ausmaß der Autoantikörperpathogenität bestätigt wird, könnte die Brücke zwischen Nachweis, Titer und Krankheitsaktivität geschlagen werden. Die interindividuell teilweise stark differierenden Antikörperlevel bei ähnlicher Krankheitsschwere ließen sich so möglicherweise erklären. Induziert ein Stimulus die Synthese pro-inflammatorischer Autoantikörper, wäre analog zur adaptiven Immunantwort auf eine Infektion rasch mit einer Manifestation der Autoimmunerkrankung zu rechnen. Aber auch mit dieser zukunftsweisenden Erkenntnis wäre das Verständnis von Dynamik und Ursache, mit denen die Glykosylierungsmuster in eine proinflammatorische Richtung modifiziert werden, für die Prognose essentiell. Die Untersuchung der Glykosylierung ist jedoch methodisch aufwendig. Gegenwärtig ist darum keine Routineuntersuchung verfügbar, die für die Analyse der zeitlichen Dynamik nutzbar wäre und auch die Mechanismen, die die Glykosylierungsmuster kontrollieren, sind unbekannt.

Selbstverständlich sind weitere Ansätze denkbar, die eine Vorhersage einer Autoimmunerkrankung in Zukunft gestatten. Dazu könnten Anzahl und Art spezifischer Autoantikörper gehören, aber auch von Autoantikörpern unabhängige Faktoren, die spezifisch für Autoimmunpatienten sind. Neben familienanamnestischen Kriterien und Risikoverhalten könnte hier die Identifizierung von genetischen Eigenschaften dienlich sein.

1.2 Autoantikörper

Bei der Erforschung der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen spielen Autoantikörper eine wichtige Rolle als „Rezeptor“ des adaptiven Immunsystems im Rahmen des Kampfes gegen den eigenen Körper. Burnet beschrieb 1959 [20], dass alle vom Organismus benötigten Antikörper in der Embryonalphase vorgebildet und später durch das Zusammentreffen mit passenden Antigenen selektioniert würden. Antikörper ohne passendes Antigen würden entsprechend nicht synthetisiert werden. Er postulierte weiterhin, dass diese Selektion auf zellulärer Basis stattfände. In der Tat steht hinter jedem Antikörper ein B-Zell Klon, der die Antikörper zunächst auf die Zellmembran gebunden exprimiert, die dann B-Zellrezeptoren genannt werden. Alle von der jeweiligen B-Zelle gebildeten Antikörper haben dieselbe Spezifität. Zur Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz würden jene autoreaktiven Zell-Klone beseitigt, welche Antikörper gegen körpereigene Antigene bilden könnten, sogenannte *Autoantikörper*. Autoimmunität spiegelt demnach wider, wenn selbstreaktive, „verbotene“ Klone nicht eliminiert, sondern aktiviert würden [61]. Die Theorie der Antikörperselektion wird fortwährend um die neuen Erkenntnisse der B-Zell- und Antikörper-Reifung verfeinert und auch dem folgenlosen Auftreten von „verbotenen“ Klonen bei gesunden Menschen durch verschiedene regulative Mechanismen des Immunsystems Rechnung getragen. Mackay zählte bereits 1992 unter anderem regulative T-Zellen, Anergie der autoreaktiven B- und T-Zellen, die fehlende Erreichbarkeit des Antigens für die autoreaktiven Zellen oder den sterilen Kontakt mit dem Antigen ohne 2. Stimulus auf [61]. Unter dieser Vorstellung trügen autoreaktive Zellen keine vom Organismus benötigte Funktion, sondern ihre Aktivität würde durch fehlende Stimuli unterdrückt bleiben.

Im folgenden soll ein Überblick gegeben werden, wie das menschliche Antikörper-Repertoire aufgebaut wird und wie das Immunsystem gegen Autoaggression vorgeht. Die Abschnitte 1.2.1-1.2.4 sind inhaltlich modifiziert dem Lehrbuch Janeway's immunobiology entnommen.

1.2.1 Vielfalt der Antikörperspezifitäten

Die Differenzierung der B-Zellen zu aktiven Komponenten der Immunabwehr beginnt im Knochenmark und beinhaltet als maßgeblichen Prozess die Bildung eines Rezeptors für Antigene. Es existiert eine unermessliche Zahl an Krankheitserregern, denen der einzelne Mensch nie allen begegnen wird. Diese Erreger haben eine im Vergleich zum Menschen sehr geringe Generationszeit mit häufigen Veränderungen ihrer Strukturen. Aus diesen Gründen muss der Mensch, neben dem statischen Rezeptor-Repertoire wie dem der angeborenen Immunabwehr gegen sehr häufige Antigene, auch ein flexibles Rezeptor-Repertoire zur Erkennung unbekannter Antigene vorhalten. Realisiert wird die Vielfalt der

B-Zell-Rezeptoren, in löslicher Form Antikörper genannt, mit einem Arsenal von Allelen, die zufällig miteinander kombiniert werden. Diese sind in drei Gen-Regionen unterteilt, die Variable, Diversity und Joining (V, D, J) genannt werden. B-Zell-Rezeptoren und Antikörper (folgend nur noch Antikörper genannt) bestehen aus vier Proteinen, wovon je zwei identische „schwere“ und zwei identische „leichte“ Ketten vorliegen, die konstante (C-) und variable (V-) Regionen beinhalten. Die konstanten Regionen bestimmen die Effektorfunktionen und ob es sich um membranständige B-Zell-Rezeptoren oder nach Aktivierung der B-Zelle um sezernierte Antikörper der Klassen IgA, IgD, IgE, IgG oder IgM handelt. Die variablen Regionen mit der hypervariablen Region (Syn. complementarity determining region, CDR) beinhalten den Abschnitt, der das Epitop des Antigens erkennt, bindet und somit die Spezifität des Antikörpers determiniert. Die Antigen-bindende Stelle wird gemeinsam von schwerer und leichter Kette gebildet. Für die variablen Regionen der schweren Kette werden insgesamt drei Allele der V-, D-, J-Genregionen und für die leichte Kette nur zwei Allele der V- und J-Genregionen rekombiniert. Dieser Prozess wird V(D)J-Rekombination genannt und würde theoretisch $1,9E10^6$ Antikörperspezifitäten ermöglichen. Ist er für leichte und schwere Kette vollzogen, präsentieren die unreifen B-Zellen B-Zell-Rezeptoren in Form von IgM auf ihrer Zelloberfläche [66].

1.2.2 Zentrale Toleranz

Qualitätskontrollen im Knochenmark eliminieren B-Zell-Klone, die nach vollzogener Rekombination offensichtlich defekte oder autoreaktive Antikörper bilden. Die Genrekombination mit Bildung unzähliger Antigenspezifitäten hat den Vorteil, pathogene Substanzen zuverlässig zu erkennen und birgt aus gleichem Grund den Nachteil, dass körpereigenen Strukturen als Ziel entstehen. Diverse Mechanismen minimieren dieses Risiko, ohne die primäre Aufgabe des Immunsystems, das Erkennen von Pathogenen, nennenswert beeinträchtigen zu dürfen. Der erste Kontrollpunkt erfolgt mit dem Prä-B-Zell-Rezeptor, der aus rekombinierter schwerer Kette und einer Surrogat-Leichtkette besteht. Nur bei funktionierender schwerer Kette erhält die Prä-B-Zelle ein Signal vom Prä-B-Zell-Rezeptor und setzt ihre Differenzierung zunächst mit Zellteilungen fort. Die entstehenden Tochterzellen führen jeweils die Rekombinationen für die leichte Kette mit unterschiedlichen Resultaten durch. Entsteht eine funktionstüchtige leichte Kette, formt sich paarweise mit der schweren Kette ein IgM Molekül, welches auf der Zelloberfläche als B-Zellrezeptor auf der „unreifen“ B-Zelle präsentiert wird. Nun ist es den unreifen B-Zellen möglich, Antigene zu erkennen. Erkennen sie Antigene im Knochenmark, handelt es sich in der Regel um Autoantigene. Das Immunsystem nutzt vier Varianten, mit einem autoreaktiven Zellklon umzugehen (s. Abbildung 2). Die Erkennung vor allem oberflächengebundener Antigene führt zur Quervernetzung von IgM, leitet die Aktivierung

der unreifen B-Zelle im Knochenmark ein, die nun das Apoptose-Programm startet. Einigen Zellen ist es auch möglich, durch neue Genrekombinationen der leichten Ketten ihre Rezeptorspezifität zu ändern („receptor editing“). Falls die Autoreaktivität auch nach der Rekombination erhalten bleibt, wird dann Apoptose eingeleitet. Als dritte Variante kann das Autoantigen die B-Zellrezeptoren schwächer quervernetzen, wie zum Beispiel bei löslichen Antigenen, und die Zelle wird nicht vollständig aktiviert. Die autoreaktive Zelle kann in die Peripherie migrieren. Jedoch sind durch den Autoantigenkontakt einige Änderungen erfolgt, die zur Unterbrechung der Rezeptor-Signaltransduktion und einer verminderten IgM Synthese führen. Im Unterschied zu nicht autoreaktiven Zellen wird sie somit kaum mehr IgM auf ihrer Oberfläche exprimieren, sondern vor allem IgD. Diese Mechanismen führen dazu, dass sie sogar mithilfe autoreaktiver T-Zellen kaum mehr durch ihr Antigen aktivierbar ist. Die Zelle ist *anerg*. Im Wettbewerb mit den anderen B-Zellen beim Zugang zu sekundären Lymphorganen unterliegen sie und gehen zugrunde.

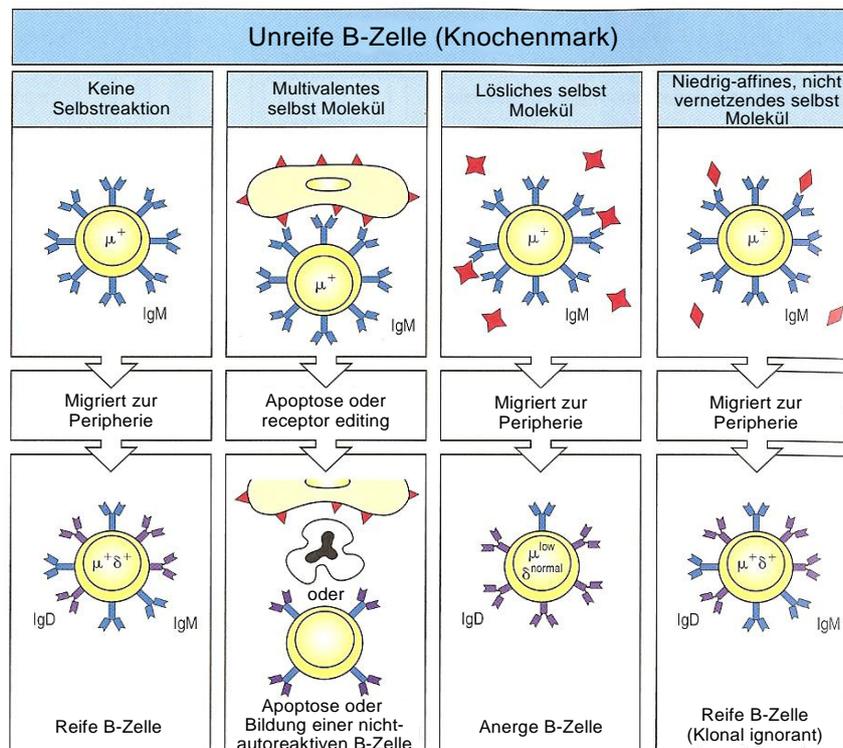


Abbildung 2: Zentrale Toleranz – Kontakt zu selbst Molekülen im Knochenmark kann zum Tod oder zur Inaktivierung unreifer B-Zellen führen. Adaptiert von Janeway's immunobiology [66].

Der vierte Weg wird von autoreaktiven Zellen eingeschlagen, deren Autoantigen zu keinerlei Signal in der Zelle führt. Dies geschieht bei zu niedriger Bindungsstärke, mangelnder Konzentration oder Zugänglichkeit des Autoantigens im Knochenmark oder der Milz. Sie werden nicht negativ selektiert und migrieren in die Peripherie. Sie bieten somit die gleichen Voraussetzungen wie nicht-autoreaktive B-Zellen. Das bedeutet, dass sie bei Antigenkontakt und suffizienter Kostimulation eine Immunreaktion auslösen

könnten. Zusammengefasst bilden die genannten Kontrollmechanismen der B-Zell-Reifung im Knochenmark die zentrale Toleranz. Ein hereditärer oder erworbener Defekt der zentralen Toleranz wurde noch nicht beschrieben und scheint daher mit dem Leben nicht vereinbar zu sein [66, 66].

1.2.3 Periphere Toleranz

Das Milieu und die Dynamik der Antigenerkennung beeinflusst, ob das Antigen als selbst oder nicht selbst wahrgenommen wird. Während eine unreife B-Zelle im Knochenmark Apoptose einleitet und zugrunde geht, sobald sie durch ein Antigen stimuliert wird, würde eine reife B-Zelle in der Peripherie durch das gleiche Signal aktiviert werden. Da trotz der zentralen Toleranzmechanismen kontinuierlich autoreaktive B-Zellen in die Peripherie gelangen, gibt es auch dort Toleranzmechanismen, die eine Immunreaktion durch autoreaktive Zellen gegen körpereigenes Gewebe verhindern sollen. Diese beruhen auf folgenden Eigenschaften der selbst-Antigene, die unabhängig von der Molekülstruktur des Epitops funktionieren: Während Autoantigene eher kontinuierlich in hoher Konzentration im ganzen Körper vorkommen, erfolgt der Kontakt mit einem fremd-Antigen lokalisiert und mit plötzlich stark steigenden Konzentrationen. Eine weitere wichtige Rolle spielt die Kostimulation durch das angeborene Immunsystem. Fehlt sie oder generell ein inflammatorisches Milieu, würde ein Antigen-Kontakt zu einer Inaktivierung der Zelle oder Bildung regulatorischer Lymphozyten führen. Neben B-Zellen werden auch T-Zellen durch Antigene selektiert. Für sie gelten ähnliche Bedingungen. Jedoch sind sie in der Lage, in regulatorische T-Zellen zu differenzieren, welche ihrerseits vor Autoimmunreaktionen schützen und somit die Selbst-Toleranz aufrechterhalten (siehe 1.2.4). In der Zusammenschau können auch Pathogene mit struktureller Ähnlichkeit zu Selbstantigenen durch ihre Dynamik im Auftreten als solche erkannt und eliminiert werden. Sehr wahrscheinlich wird diese Leistung durch das System und nicht durch die einzelne Zelle erbracht. Die Aufrechterhaltung der Toleranz reifer Lymphozyten wird auch periphere Toleranz genannt [66].

Bestimmte Autoantigene sind in Organen mit Immunprivileg lokalisiert und schützen sich durch besondere Toleranzmechanismen vor dem Immunsystem [66].

1.2.4 Extrinsische Toleranz

Regulative T-Zellen (T_{reg}) umfassen zwei wichtige Populationen, die natürlichen und die adaptiven regulativen T-Zellen. Diese gehören zu den CD4-positiven T-Zellen mit Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3, welcher die Expression von Interleukin 2 (IL-2) verhindert. IL-2 ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für T-Zellen. Bei Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass fehlende FoxP3-exprimierende Zellen zur Aggravation zum

Beispiel von SLE führten, während die Transfusion regulativer T-Zellen die Erkrankung unterdrückte. Natürliche T_{reg} entstehen im Thymus aus autoreaktiven T-Zellen, die der negativen Selektion entgehen. In der Peripherie werden sie durch Autoantigene aktiviert und blockieren die Aktivierung diverser autoreaktiver T-Zellen im gleichen Gewebe. Diese adaptiven T_{reg} entstehen in peripheren Lymphorganen durch einen Antigenkontakt ohne pro-inflammatorische Kostimulation. Stattdessen erhalten sie von der unreifen antigenpräsentierenden Zelle TGF- β . Über diesen Mechanismus erwirbt das Immunsystem die sogenannte extrinsische Toleranz für das betreffende Antigen. Autoimmunerkrankungen scheinen diversen Studien zufolge mit vielfältigen Funktionsstörungen regulativer T-Zellen begleitet zu sein [66].

1.2.5 Bildung von Autoantikörpern

Die Entstehung von Autoimmunität beruht nach heutigem Wissen vor allem auf dem Ausfall der peripheren Toleranzmechanismen. Man beobachtete transiente Autoimmunreaktionen, wie beispielsweise während eines Herzinfarktes gegen die ausgeschwemmten Herzantigene. Nach dem Ausklingen des akuten Geschehens kehren die physiologischen Verhältnisse wieder zurück. Auch monomere Autoantigene können B-Zellen unter normalen Bedingungen nicht aktivieren, weil sie die B-Zell-Rezeptoren, wie im letzten Fall der zentralen Toleranzmechanismen beschrieben, nicht quervernetzen und somit keine Signaltransduktion induzieren können. Diese autoreaktiven B-Zellen werden also nicht negativ selektiert und stellen einen Teil des peripheren B-Zell-Pools dar. Gelangen diese Autoantigene durch ein Ereignis in eine polymere Form, würden sie die entsprechende B-Zelle aktivieren können. Immunologische Reaktionen können beispielsweise Immunkomplexe aus IgG und Antigenen hervorrufen. Die so als polymer gebundenen IgG können nun B-Zellen mit IgG spezifischen B-Zell-Rezeptoren aktivieren. Die B-Zellen produzieren daraufhin Anti-IgG-Antikörper, den bekannten Rheumafaktor. Wie in einer Immunreaktion gegen körperfremde Pathogene können die gebildeten Antikörper in ihrer Antigenpezifität reifen und ihre Antikörperklasse von IgM zum Beispiel zu IgG ausdifferenzieren. So lassen sich neben dem Rheumafaktor vom IgM-Typ in Patienten zum Teil auch Rheumafaktoren vom IgG-Typ finden. Sind die Immunkomplexe abgebaut, führt der fehlende Antigen-Stimulus zu einem Sistieren der Anti-IgG Antikörperproduktion. Nach allgemeiner Auffassung liegt darum der Synthese von Autoantikörpern des IgG-Typs eine signifikante pathogene Immunreaktion zugrunde, während die Synthese von Autoantikörpern des IgM-Typs auch als unspezifische Reaktion während einer anderen Immunantwort entstehen kann [66].

Eine Autoimmunreaktion kann sich manifestieren und somit zur Erkrankung werden, wenn sie Gewebsschädigungen hervorruft. Sowohl das entzündliche Milieu, als auch die

Ausschwemmung von Autoantigenen wird so aufrechterhalten. Eine hierfür typische Erkrankung wäre der systemische Lupus erythematoses, bei dem nukleäre Antigene eine wichtige Rolle spielen. Sie werden im Rahmen der Apoptose oder Gewebnekrosen freigesetzt. Man vermutet, dass als wichtiger pathogenetischer Faktor des SLE der Abraum insbesondere des apoptotischen Materials vermindert ist und sich dieses verstärkt ansammelt. Einige Bestandteile davon können durch die Toll-like-Rezeptoren (TLR) des angeborenen Immunsystems erkannt werden. Dazu zählt unmethylierte DNA, die im Rahmen der Apoptose entsteht und durch TLR-9 erkannt wird. Aber auch RNA-Bestandteile aktivieren TLR7- oder 8-Signalwege. Gelangt eine reife B-Zelle mit einem spezifischen B-Zell-Rezeptor für TLR-Liganden in Kontakt mit jenem, könnte im Zusammenspiel der TLR- und B-Zell-Rezeptor-Signalwege die B-Zelle aktiviert werden und zur Synthese von Autoantikörpern stimuliert werden [66].

Auch die Co-Stimulation durch das adaptive Immunsystem, wie den T-Zellen, setzt wichtige Reize für oder gegen eine Autoimmunreaktion. Autoreaktive T-Zellen lösen in Abhängigkeit ihres Subtyps und somit ihrer ausgeschütteten Zytokine verschiedene Immunreaktionen aus. Bei Mäusen mit Prädisposition für Typ 1 Diabetes führen T_H1 Zellen mit Spezifität für Beta-Zellen des Pankreas beispielsweise zum Ausbruch der Erkrankung, während T_H2 Zellen der gleichen Spezifität davor schützen. Ob Selbsttoleranz oder Autoimmunität durch autoreaktive T-Zellen gefördert wird, hängt somit entscheidend von ihrem Subtyp ab [66].

1.2.6 Natürliche Autoantikörper

Da das alleinige Auftreten von Autoantikörpern ohne erkennbare Schäden noch als physiologisches Geschehen betrachtet werden muss, kann erst mit dem Ausbruch der Autoimmunerkrankung von einem Toleranzverlust gesprochen werden.

Der lebhaften Diskussion um die Pathogenität der Autoantikörper per se und der notwendigen, aber komplexen Regulierung der Selbsttoleranz in gesunden Menschen setzt Stratis Avrameas darum ein im Kern simples Konzept gegenüber. Jedes Wesen besitze die für die Ontogenese essentielle Fähigkeit, sich selbst zu erkennen, bezeichnet als „*gnothi seauton*“ [9]. Daher sei es selbstverständlich, dass jedes Lebewesen Autoantikörper bilde. Diese werden als *natürliche* Autoantikörper bezeichnet, weil ihre Genese nicht durch Immunisierung oder exogene Stimuli, sondern durch Faktoren, die vermutlich genetischer Natur seien, initiiert würde.

Dass natürliche Autoantikörper (NAA) von Organismen ohne Immunisierung produziert werden, wurde mit Experimenten an keim- und antigenfrei aufwachsenden Neugeborenen- und Nackt-Mäusen gezeigt. In den NAA synthetisierenden B-Zellen sind

außerdem keine oder wenige somatische Mutationen in den kodierenden Genen (z.B. V-Gene) nachweisbar, wie es sonst für Antikörper typisch ist; somit entsprechen die genetischen Informationen dieser B-Zellen denen der Keimbahnzellen. Charakteristisch ist außerdem, dass ubiquitär vorkommende Moleküle passende Ziel-Antigene darstellen. Dazu gehören Enzyme, Strukturproteine oder DNA. In vielen Fällen sind NAA polyreaktiv, jedoch kommen auch monoreaktive NAA vor. Während IgM die häufigste Immunglobulinklasse der NAA darstellt, können IgA und IgG NAA ebenso regelmäßig in gesunden Individuen detektiert werden [9]. Bei Untersuchungen der ABO-Blutgruppen-Antikörper wurde festgestellt, dass sowohl natürliche als auch induzierte Antikörper ähnlich stark an Erythrozyten binden. Aber auch natürliche Antikörper mit exogenen Zielantigenen werden synthetisiert. Ein Beispiel hierfür wären natürliche anti-bakterielle Antikörper, die im Vergleich zu immunologisch induzierten sehr spezifischen Antikörpern sowohl mit hoher als auch niedriger Spezifität und Avidität auftreten [12].

Natürlichen Autoantikörpern werden diverse physiologische Funktionen zugeschrieben. So gibt es Anti-Idiotypen Antikörper, welche spezifisch für die Antigen-Bindungsstellen anderer Antikörper sind, den Idiotypen, und mit diesen Netzwerke bilden. Diese Idiotypennetzwerke können anti- und proinflammatorische Funktionen aufweisen. Weitere physiologische Funktionen sind das Abräumen von Zellschrott, Metaboliten, Exogenen Pathogenen (Viren, Bakterien etc.) zur Unterstützung der angeborenen Abwehr [11].

Zusammenfassend lässt sich sagen: Obgleich Autoantikörper seit über 100 Jahren bekannt sind, geben sie noch immer viele Rätsel auf. Insbesondere, wenn über ihre Existenz oder sogar Funktion in gesunden Menschen nachgedacht wird. Eine stark beforschte Autoimmunerkrankung, der systemische Lupus erythematoses, ist durch Bildung von Immunkomplexen gekennzeichnet, die beträchtliche Schäden an Organen hervorrufen können. Die beteiligten Autoantikörper richten sich meistens gegen Antigene der Zellkerne, die ubiquitär im Körper verteilt sind. Diese antinukleären Autoantikörper kommen sehr häufig auch bei Gesunden vor, ohne erfassbare Schäden zu verursachen. Somit stellt der SLE eine besonders interessante Erkrankung dar, die als zentralen Mechanismus den Toleranzverlust gegen sich selbst inne hat, der zur Autoaggression führen kann [9].

1.3 Systemischer Lupus Erythematoses – SLE

Der Systemische Lupus Erythematoses (SLE) ist eine klinisch heterogene Verlaufsform des Lupus Erythematoses und wird zu den Kollagenosen gerechnet. Der historische Ausdruck Kollagenose trägt zum einen dem Ort des pathologischen Geschehens Rechnung, der das Bindegewebe aller Organe und der Gefäße treffen kann. Zum anderen

zählen Kollagenosen zu den Autoimmunerkrankungen, die dem rheumatischen Formenkreis zugeordnet werden. Als Besonderheit richtet sich das autoimmunologische Geschehen gegen nukleäre Strukturen, welche fast jede Zelle des Körpers in sich trägt.

1.3.1 Epidemiologie

Die Prävalenz von SLE in der deutschen Bevölkerung ist unbekannt, da epidemiologische Daten hierzulande derzeit fehlen. Die Lebenszeitprävalenz in der dänischen Bevölkerung wird auf Basis von Gesundheitsregistern auf 32 von 100.000 (0,032 %) Individuen geschätzt. Dafür wurden alle Individuen gezählt, welche in einem Zeitraum von 1977 bis 2001 eine SLE-Diagnose haben oder hatten. Vor 1977 gestellte Diagnosen wurden nicht erfasst, sodass die Lebenszeitprävalenz wahrscheinlich unterschätzt wurde [32]. In einer Übersichtsstudie reicht die berichtete Prävalenz von SLE in Europa pro Jahr und 100.000 Individuen von 25 in Finnland bis 91 in Spanien. Es wurden dort für Frankreich und Südschweden Punkt-Prävalenzen von etwa 40 pro 100.000 Individuen pro Jahr ermittelt [28]. Aufgrund der ähnlichen Bevölkerungsstruktur ist eine dementsprechende Größenordnung auch für Deutschland zu erwarten. Weltweit tritt SLE besonders häufig bei Frauen auf, welche in Europa etwa im Verhältnis von 10:1 häufiger betroffen sind als Männer [23]. Aus Daten eines Zensus in Birmingham von 1991 lag die SLE-Prävalenz pro Jahr und 100.000 Einwohnern besonders hoch bei karibischen Afroamerikanern (207/100.000), Chinesen (93/100.000) und Asiaten (49/100.000) im Vergleich zu Kaukasiern (20/100.000) [50].

1.3.2 Pathogenese

Die Ursache von SLE ist bis heute ungeklärt. Man geht von einer multifaktoriellen Genese der Erkrankung aus, die neben einer genetischen Prädisposition triggernde Umweltfaktoren wie Sonnenlicht, Medikamente, sowie Infektionen insbesondere durch Epstein-Barr Virus einschließt. Man geht ferner davon aus, dass Störungen im Abbau apoptotischer Zellen und Fehlfunktionen von B- und T-Zellen zur Bildung und Persistenz von Autoantikörpern führen, welche sich in Endorganen als Immunkomplexe ablagern und dort Schäden hervorrufen oder direkt funktionell-relevante Antigene binden und beeinflussen [63]. Beim SLE spielen die Autoantikörper somit eine entscheidende Rolle in der Schädigung des Organismus, welche in Tabelle 1 veranschaulicht werden.

Tabelle 1 SLE-typische Autoantikörper*

Antikörperspezifität	IIF Muster (HEp-2 Zellen)	Häufigkeit unter SLE Patienten [%]	Häufigkeit unter Gesunden [%]	Klinischer Aspekt
ANA			1,4-27,12 [§]	
dsDNA	Homogenes Nukleoplasma	70 (Spezifität 95 %)	Keine Studien	Krankheitsaktivität, Nierenschädigung
Sm	Grobgranuläres Nukleoplasma	20 (Spezifität 99 %)	0,2 [36, 105]	Krankheitsaktivität, ZNS Symptome, hohe Spezifität, geringe Sensitivität
U1nRNP	Grobgranuläres Nukleoplasma	30-40	Keine Studien	Raynaud Phänomen, MCTD
SS-A/Ro	Feingran. Nukleoplasma Teils negative ANA	24-60	0,2 -0,4 [36, 105]	SCLE (70-90 %), Fotosensitivität, neonataler LE (>90 %), C2, C4 Defizienz (90 %)
SS-B/La	Feingran. Nukleoplasma	9-35	Keine Studien	Neonataler LE (75 %)
Histone	Homogenes Nukleoplasma	50-70	Keine Studien	Medikamenten induzierter LE (>95 %)
Ribosomale RNP	Feingranuläres oder homogenes Zytoplasma, homogene Nukleoli	10-20	Keine Studien	Zerebritis mit Psychose (56-90 %)
Ku	Homogenes Nukleoplasma und Nukleoli	1-19	Keine Studien	

* adaptiert nach „Autoantibodies in the Diagnosis of systemic rheumatic diseases“ von CA von Mühlen und EM Tan [106]; [§] 27,12 % **ELISA**-Wert über Diagnostischer Schwelle [109], 25,0 % **ELISA**-Wert über Diagnostischer Schwelle [59], 10,1 % **IIF** (1:160) [86], 5 % **IIF** (1:160) [33, 98], 4,74 % **IIF** (IgG, 1:80) [105], 3,4 % **IIF** (>1:160), 1,4 % **IIF** (\geq 1:320) [36]. Abkürzungen: IIF = Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie; HEp = Human epidermoid cancer cells; ANA = Antinukleäre Autoantikörper; dsDNA = Doppelstrang Desoxyribonukleinsäure; Sm = Smith Antigen; RNP = Ribonukleoprotein; ZNS = Zentrales Nervensystem; MCTD = Mixed connective tissue disease; Feingran. = feingranulär; SCLE = Subacute cutaneous lupus erythematosus.

1.3.3 Klinik

Klinisch äußert sich SLE sehr heterogen, sodass die Beschwerden bei Erstvorstellung der SLE Patienten teilweise sehr differieren. Die 1982 revidierten American College of Rheumatology (ACR) Kriterien zur Klassifikation von SLE, die 1997 zuletzt aktualisiert wurden, unterstützen bei der Diagnose der Erkrankung [49, 97]. Die Diagnose SLE lässt sich stellen, wenn vier von elf Kriterien durch den Patienten erfüllt werden. Inzwischen wurden die ACR Kriterien weiterentwickelt und die Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) Klassifikationskriterien veröffentlicht [73] (siehe Anhang, Abschnitt 7.2). Diese sollten eine erhöhte Sensitivität bei ähnlicher Spezifität bieten, wobei eine aktuelle Veröffentlichung keinen signifikanten Unterschied feststellen konnte [4]. Damit eine hohe Sensibilität und Spezifität der Diagnose gewährleistet bleibt, wurden Allgemeinsymptome in beiden Systemen nicht inkludiert. Diese beeinträchtigen die Lebensqualität teilweise stark und treten häufig auf. Sie umfassen unter anderem Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust und Fieber [63]. Je nachdem, welches Organsystem von der Erkrankung betroffen ist, äußern sich die resultierenden Fehlfunktionen in den entsprechenden Symptomen. In einem Review von 2006 beschrieben Manson und

Rahman folgende typische Symptomkomplexe: Sehr typisch seien Veränderungen an Haut und Schleimhäuten, darunter das Schmetterlingserythem im Gesicht, Diskoide Papeln, Fotosensitivität und orale Ulzerationen. Die Manifestation am Bewegungsapparat führe häufig zur SLE Diagnose durch den Rheumatologen. In der Regel lägen nicht-erosive Polyarthritiden vor, wie die Jaccoud Arthropathie. Seltener seien rheumatoide Arthritiden. Serositiden äußerten sich als Brustschmerzen bei Pleuritis, Perikarditis führe seltener zu subjektiven Beschwerden. Bei etwa 30 % der Patienten befallte der SLE auch die Niere und führe zur Lupus-Nephritis. Zu Beginn seien die Schäden noch symptomlos, entwickelten sich aber ohne Behandlung zur lebensbedrohlichsten Komplikation eines SLE. Wäre, wie in circa 20 % der Fälle, das zentrale Nervensystem betroffen, sei die Diagnosefindung bei ansonsten milder Symptomatik besonders schwierig. Es bestünde eine breite Varianz der Symptome von Kopfschmerzen und Anfallsleiden bis zu psychiatrischen Erkrankungen wie Depressionen und Psychosen. Im peripheren Nervensystem kämen Neuropathien vor. Insgesamt werden 19 neuropsychiatrische Syndrome beschrieben. Manifestationen im Gefäßsystem äußern sich zum Beispiel im Raynaud Phänomen, welches in seiner dreiphasigen Form bei 16 % der Patienten zu finden sei. Außer diesem werden Assoziationen mit Livedo reticularis, einer Erscheinungsform der Immunkomplexvaskulitis vermutet und bei bis zu zehn Prozent der Patienten entstünden venöse und arterielle Thrombosen. Weiterhin kämen diverse gastrointestinale Beschwerden vor [63].

Typische Befunde im Blut seien Variationen von Anämien, antinukleäre Autoantikörper und Autoantikörper gegen DNA, Smith-Antigen und Phospholipide, welche durch die Klassifikationskriterien des ACR berücksichtigt werden. Anti-dsDNA Antikörper nahmen hierbei eine besondere Rolle an, da ihre Titer mit der Krankheitsaktivität korrelierten (wegen Immunkomplexen aus AAK und EZR-DNA insbesondere mit der Nierenbeteiligung) und bei einem Schub der Erkrankung anti-dsDNA Titer stiegen sowie die Blutsenkungsgeschwindigkeit zunähmen. Für das C-reaktive Protein (CRP) sei dieser Zusammenhang nicht ausgeprägt [63].

1.4 Entwicklung der Fragestellungen

Noch immer ist die Rolle von Autoantikörpern, die sich im Organismus eines gesunden Menschen gegen hoch konservierte humane Antigene richten, nicht geklärt. In der retrospektiven Analyse von SLE-Patienten fanden sich SLE-typische Autoantikörper Jahre vor Manifestation der Krankheit [6]. Ein Antikörperscreening zur Vorhersage der Erkrankung kann jedoch nicht durchgeführt werden, weil antinukleäre Antikörper zu den häufigsten Antikörpern gehören, die in Gesunden gefunden werden (1,4 – 27,1 % Prävalenz) [33, 36, 59, 86, 98, 105, 109]. Auch spezifische Autoantikörper wie anti-Sm oder anti-SS-A konnten in Gesunden gefunden werden [105]. Nach ihrer Beobachtung stellten Arbuckle et al. das Modell auf, dass die Entstehung einer Autoimmunerkrankung zwei wichtige Schritte umfasse: Im ersten Schritt würden Autoantikörper gebildet, ohne klinische Symptome zu verursachen und erst nach einem zweiten Schritt käme es zum klinischen Ausbruch der Erkrankung. Diese Schritte werden vermutlich durch genetische- und Umweltfaktoren beeinflusst. „A“-Faktoren könnten die Autoantikörpersynthese beeinflussen, während „B“-Faktoren die Manifestation der Erkrankung vorantrieben (s. Abbildung 3). Studien zur Identifikation von Risikogenen für Krankheiten werden mit Patienten und gesunden Personen durchgeführt. Deswegen werden sowohl „A“- und „B“-Gene identifiziert, die aber nicht voneinander unterscheidbar sind. Der genetische Vergleich von Autoantikörper-negativen mit Autoantikörper-positiven Gesunden könnte erstmals Gene identifizieren, die nur die Autoantikörpersynthese beeinflussen („A“-Gene). Diese müssten sich als Teil des Pathogeneseprozesses unter den Risikogenen für Autoimmunerkrankungen wiederfinden. Der unbekanntem Ursache, die zur Synthese von antinukleären Autoantikörpern führt, käme man einen Schritt näher.

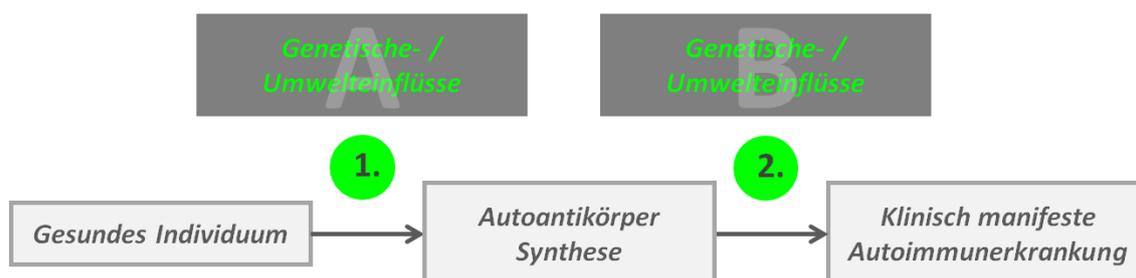


Abbildung 3: Modell der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, adaptiert nach Arbuckle et al. [6]

1.4.1 Fragestellungen

Aus den eben aufgeführten Betrachtungen ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Wie hoch ist der Anteil in der *gesunden* Bevölkerung, der SLE-typische antinukleäre IgG-Autoantikörper bildet?
- Lassen sich spezifische Zielantigene dieser antinukleären Antikörper nachweisen?
- Ist die Existenz antinukleärer IgG-Autoantikörper mit genetischen Merkmalen assoziiert?
- Teilen gesunde ANA-positive Individuen Risikogene mit SLE-Patienten?

2 Material und Methoden

2.1 Ethik

Die Studie wurde entsprechend den Prinzipien der Deklaration von Helsinki durchgeführt und durch die lokale Ethikkommission genehmigt (siehe Anhang, Abschnitt 7.1). Proben wurden gesammelt und genutzt, deren Spender ihre schriftliche Einwilligung nach schriftlicher und mündlicher Information über die Verwendung ihres Blutes abgaben. Entsprechend der Vorgabe des Ethik-Votums wurden alle Proben direkt nach der Blutentnahme komplett anonymisiert und mit einer Identifikationsnummer versehen.

2.2 Kontroll- und Fallgruppencharakterisierung

Auswahlkriterium für Proben der Fallgruppe war der Nachweis von Mustern in der indirekten Immunfluoreszenz, die mit SLE assoziiert waren. Für die Kontrollgruppe galt, dass untersuchte Blutproben mit den genutzten Tests keinen Hinweis auf Autoantikörper gaben.

2.3 Proben der Blutspender

Für diese Forschungsarbeit wurden gemeinsam mit Wiebke Jung von August 2010 bis März 2011 von insgesamt 10.155 Blutspendern Proben gesammelt. Aufgrund der in Deutschland geltenden Voraussetzungen für die Zulassung zur Blutspende gehören Blutspender zur gesündesten erreichbaren Bevölkerungsgruppe. Deren Gesundheit wird ärztlich durch die Anamnese zur persönlichen Gesundheit, eine körperliche Untersuchung und die folgende Labordiagnostik festgestellt [19]. Den Zugang zu den Proben der regulären Blutspender ermöglichten Prof. Siegfried Görg und Dr. David Juhl vom Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein und Prof. Reinhard Henschler vom Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, sowie vom Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes Baden-Württemberg/Hessen des Klinikums der Goethe-Universität Frankfurt a.M. für die jeweiligen Blutspendezentralen. Etwa 3.500 Proben stammten aus Frankfurt a.M., die übrigen aus Lübeck und Kiel. Damit trotz sofortiger Anonymisierung keine doppelten Proben desselben Spenders im Untersuchungskollektiv enthalten sein konnten, grenzten wir das Sammelintervall für jede Blutspendezentrale auf acht Wochen ein, dem kürzesten Spendeintervall derselben Person. In diesen acht Wochen schlossen wir alle verfügbaren Blutproben in die Sammlung ein. Darüber hinaus bezogen wir nur Blutproben von erstmaligen Spendern.

Die Blutproben wurden in EDTA-Monovetten (*Fa. Sarstedt AG und Co, Nümbrecht*) bei vier Grad Celsius von den Blutspendezentralen in unser Labor transportiert. Von jeder Probe wurden zwei Vollblut- und vier Plasma- Aliquots mit je circa 500 µl Inhalt erstellt. Hierfür verwendeten wir 1,5 ml Safeseal Reagiergefäße (*Fa. Sarstedt AG und Co, Nümbrecht*). Jede Blutprobe erhielt eine Identifikationsnummer, mit welcher die sechs Reagiergefäße beschriftet wurden. Für die Vollblutproben wurde die Blutprobe auf einem Vortex Genie 2-Schüttler (*Scientific Industries Inc., Bohemia, New York*; im folgenden Vortex-Schüttler) durchmischt und jeweils circa 500 µl in zwei Reagiergefäße pro Spender pipettiert. Zur Separation des Plasmas erfolgte die Zentrifugierung der Monovetten für sieben Minuten mit 2.500 x g (Zentrifuge *Heraeus Sepatech, Megafuge 1.0 R*) bei Raumtemperatur und der Transfer von jeweils circa 500 µl des überstehenden Plasmas in vier Reagiergefäße. Die Vollblutproben wurden getrennt bei -80°C eingefroren, die Seren gepaart getrennt bei -20°C.

2.4 Screening für Antinukleäre Antikörper (ANA)

Alle folgenden Experimente wurden von dem Doktoranden persönlich durchgeführt. Die Untersuchung auf den Gehalt von Antinukleären Antikörpern umfasste insgesamt 6454 Proben, die sich je zur Hälfte aus Frankfurter und Schleswig-Holsteiner Proben zusammensetzten. Für den Nachweis der ANA wurde der indirekte Immunfluoreszenztest EUROPLUS® ANA-Mosaik 20A (*Euroimmun AG, Lübeck*) verwendet. Der Test basierte auf Objektträgern, welche zehn Felder für Proben aufwiesen. Jedes Feld war mit vier Biochips versehen. Der erste Biochip enthielt HEp-20-10-Zellen. Diese Zellreihe ermöglichte durch ihre hohe Mitoserate eine einfachere Differenzierung „Mitose-abhängiger“ Antikörper. Der zweite Biochip war mit den Extractable Nuclear Antigens (ENA) ribosomales P-Protein und Jo-1 zum monospezifischen Nachweis jener Antikörper versehen. Auf dem dritten Biochip befand sich Leber (Affe) und auf Biochip vier die ENAs SS-A und SS-B zum monospezifischen Nachweis dieser Antikörper. Mit Ausnahme der folgenden Materialien waren alle im verwendeten Immunfluoreszenztest enthalten: Reagenzträger „TITERPLANE“ (*Euroimmun AG, Lübeck*) und Ampuwa Spüllösung (*Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg*).

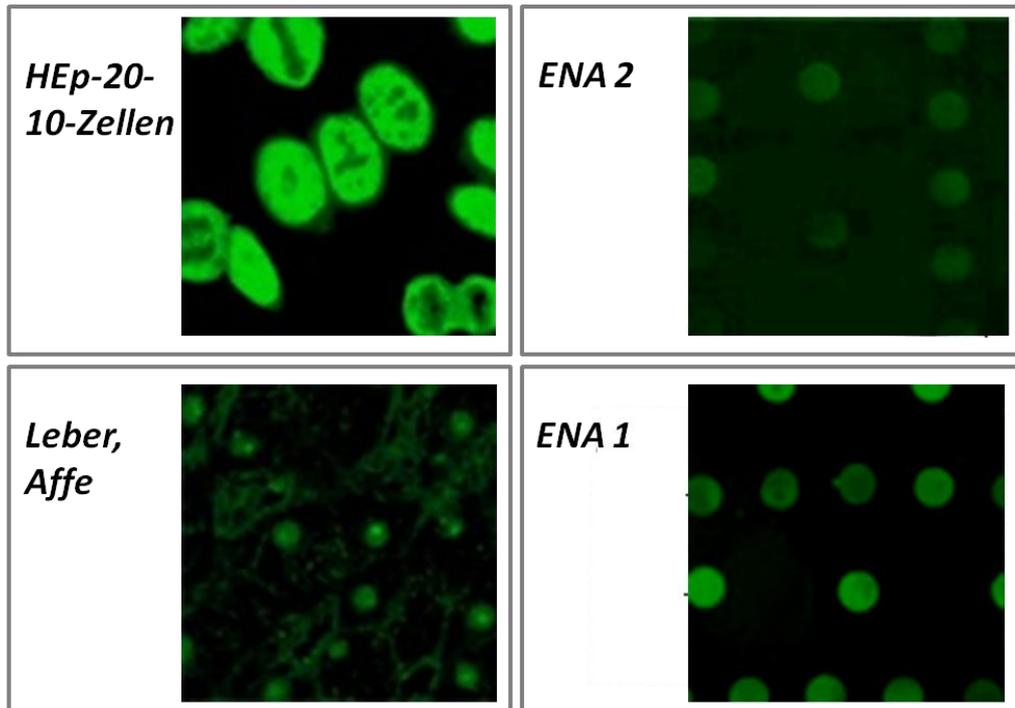


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Biochip ANA-Mosaik 20A der Euroimmun AG, mit positiven Fluoreszenzen (Bilder aus eigenen Aufnahmen). Abkürzungen: HEp = Human epidermoid cancer cells; ENA = extrahierbares nukleäres Antigen

Das ANA-Mosaik wurde entsprechend den Anweisungen des Testprotokolls für qualitative Auswertung verwendet. Die Erstellung eines PBS-Tween Puffers erfolgte mit 1 Liter Ampuwa Spüllösung, einer Packung PBS Salz für pH 7,2 und 2 ml Tween 20. Der Puffer diente zur Verdünnung der Plasmaproben auf 1:100 sowie zum Spülen. Je Ansatz wurden mithilfe des Reagenzträgers pro Feld 30 µl der Blutspenderproben und je 30 µl einer Positiv und einer Negativ Kontrolle pipettiert. Die Kontrollproben waren Bestandteil des EUROPLUS® ANA-Mosaiks. Die Inkubation dauerte 30 Minuten bei Raumtemperatur. Bei positiven Proben banden Antikörper an die Antigene der Biochips. Daraufhin wurden die Objektträger im Schwall mit dem Puffer abgespült und fünf Minuten in einer Küvette im Puffer stehend auf einem Rotationsschüttler geschüttelt (1. Waschschrift). Zum Nachweis gebundener IgG Antikörper wurde Fluorescein-markiertes Anti-human-IgG (Ziege) verwendet. In dieser zweiten Inkubation wurden pro Feld 25µl des markierten Anti-Human-IgG (Ziege) Antiserums verwendet. Sie erfolgte in Dunkelheit für 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend wurde im 2. Waschschrift erneut gespült. Zur mikroskopischen Analyse wurden die Objektträger mit Eindeckmedium und Deckgläschen abschließend eingedeckt.

Für die Auswertung der Fluoreszenzmuster wurde das EUROStar II Plus Fluoreszenzmikroskop (Euroimmun AG, Lübeck) verwendet. Die HEp-20-10 Zellen wurden mit 40x Objektiv, die ENA und die Leber mit 20x Objektiv analysiert. Für die

Interpretation der Fluoreszenzmuster vermittelte Prof. Winfried Stöcker von der Euroimmun AG im Vorfeld eine Schulung durch seine Mitarbeiterin Frau Sonja Overbeck. Weiterhin wurde eine Tafel über Fluoreszenzmuster der HEp-Zellen von der Euroimmun AG zur Verfügung gestellt (siehe Anhang, Abschnitt 7.5). Auf Basis dieser Kenntnisse wurden die Fluoreszenzmuster aller gefärbten Proben beschrieben.

2.4.1 Auswahl der ANA-Fluoreszenzmuster

Antinukleäre Antikörper haben ein beliebiges Antigen im Zellkern und rufen verschiedene Fluoreszenzmuster in der indirekten Immunfluoreszenz hervor. Für die weitere Verwendung wurden nur Proben ausgewählt, die bei 1:100 Verdünnung ein mit der Krankheit SLE assoziiertes Fluoreszenzmuster zeigten. Dazu zählen Nukleär homogen, nukleär grobgranulär mit negativen Nukleoli, nukleär (fein-)granulär und „few nuclear dots“ sowie das zytoplasmatische Muster Golgi-Apparat [106, 107]. Alle Fluoreszenzmuster der ausgewählten Proben wurden am Mikroskop Olympus BX 40 (*Olympus Deutschland GmbH, Hamburg*) des Autoimmunlabors der Lübecker Hautklinik des UKSH fotografisch dokumentiert. Dazu wurden die Kamera ProgRes C10^{plus} (*Jenoptik AG, Jena*) mit der Software ProgRes Capture Pro 2.1 (*Jenoptik AG, Jena*) genutzt.

2.5 Validierung und Spezifizierung der Antinukleären Antikörper

Da das Screening nur in einer Verdünnungsstufe durchgeführt wurde, kann es zur Missinterpretation ähnlicher Muster kommen. Außerdem sollte für die genetischen Untersuchungen eine möglichst objektive Charakterisierung der ANA-Muster erfolgen. Darum wurden Proben mit sehr wahrscheinlich SLE-spezifischer Fluoreszenz, solche mit ähnlicher Fluoreszenz und zehn Proben ohne Fluoreszenz als negative Kontrollen für die objektivierte und quantifizierte Validierung ausgewählt. Weiterhin wurden all diese Proben auf die Antikörperspezifität hin untersucht.

2.5.1 Validierung

Für die objektivierte und quantifizierte Validierung wurden die Proben mit drei Verdünnungsstufen (1:10, 1:100, 1:1000) erneut mittels indirektem Immunfluoreszenztest untersucht. Das weitere Procedere entsprach dem bereits im EUROPLUS ANA-Mosaik 20A zum Screening verwendeten Protokoll (s. 2.4). Die verwendeten Objektträger enthielten in jedem Feld sechs Biochips (HEp-2-Zellen, HEp-20-10-Zellen, Leber (Affe), Niere (Ratte) und ENA (SS-A, SS-B, Sm, nRNP/Sm, Jo-1, Scl-70)). Die Fluoreszenzmuster auf den gefärbten Objektträgern wurden zur Objektivierung und Qualitätskontrolle durch Manja Kowalke, Mitarbeiterin des „Klinisch-immunologischen Referenzlabors Prof. Winfried Stöcker“, mikroskopisch ausgewertet und beschrieben. Die

Beschreibungen der Muster aus dem vorangegangenen Screening waren ihr nicht bekannt. Die Intensitäten der Fluoreszenzmuster wurden den Referenzlaborstandards entsprechend eingeordnet in negativ, positiv, stark oder sehr stark positiv und daraus Verdünnungsstufen von 1:10, 1:100, 1:320, 1:1.000, 1:3.200 und 1:10.000 abgeleitet. Die Stufe 1:320 entspricht einer stark positiven Fluoreszenz bei 1:100 und negativen Fluoreszenz bei 1:1000 Verdünnung. Die Stufen 1:3.200 und 1:10.000 entsprechen einer starken beziehungsweise sehr starken Fluoreszenz bei 1:1000 Verdünnung.

2.5.2 Spezifizierung

Die Zielantigene der ANAs wurden mit den drei Line Blot Immunoassays ANA Profil 5, Myositis-Profil 3 und Systemsklerose-Profil EUROLINES untersucht (*alle Euroimmun AG, Lübeck*). Die Line Blots enthielten 34 verschiedene Antigene, darunter die SLE spezifischen Antigene SS-A (Ro), SS-B (La), Doppelstrang-DNA (dsDNA), U1-nukleäres Ribonukleoprotein (U1-nRNP), Smith-Antigen (Sm), Nukleosomen, Histone, proliferating-cell-nuclear-antigen (PCNA), Ku-Protein und Ribosomales P-Protein (rib. P protein). Die weiteren enthaltenen Antigene finden sich im Anhang, Abschnitt 7.3. Das verwendete Protokoll entspricht dem der kommerziell erhältlichen Euroimmun Line Blot Immunoassays. Vorbereitend wurden der Waschpuffer im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser und das Enzymkonjugat im Verhältnis 1:10 mit dem gebrauchsfertigen Probenpuffer verdünnt. Die Proben und positive Kontrolle wurden im Verhältnis 1:101 mit Probenpuffer verdünnt. Die Teststreifen wurden zur Vorbereitung einzeln in Inkubationsrinnen für fünf Minuten mit 1,5 ml Probenpuffer bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler inkubiert. Der Puffer wurde danach verworfen und die Streifen mit 1,5 ml der verdünnten Proben und einer positiv Kontrolle für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler inkubiert. Bei diesem Vorgang banden bei positiven Proben Antikörper aus dem Plasma an die Antigene der Teststreifen. Zum Waschen wurden dann die verdünnten Proben verworfen und die Teststreifen drei Mal für 5 Minuten mit 1,5 ml Waschpuffer auf dem Wippschüttler behandelt (1. Waschschrift). Zur Markierung gebundener IgG aus den Proben folgte die Behandlung mit Anti-Human-IgG Enzym Konjugat (Alkalische Phosphatase). Je Teststreifen wurden 1,5 ml des Konjugats hinzugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler inkubiert. Es folgte nach dem Verwerfen des Konjugats der 2. Waschschrift (s.o.). Nun wurde jeweils 1,5 ml Substratlösung zu den Teststreifen gegeben und für 10 Minuten auf dem Wippschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. An humane IgG gebundene Enzymkonjugate färbten in ihrer Reaktion die darunterliegende Antigen-Bande. Die Enzymreaktion wurde daraufhin mit Verwerfen des Substrats und drei Mal einminütigem Spülen der Teststreifen mit destilliertem Wasser auf dem Wippschüttler gestoppt. Nach

dem Aufbringen der Teststreifen auf ein Auswertungsprotokoll und Trocknung derselben wurden die Protokolle mit einem Flachbett Scanner eingescannt. Die Software EUROLineScan (*Euroimmun AG, Lübeck*) wertete die Signalintensität der gefärbten Banden aus und kategorisierte sie in negativ, grenzwertig, positiv und stark positiv. Alle Teststreifenbanden wurden zusätzlich visuell auf Färbeartefakte hin untersucht und Fehlinterpretationen der Software gegebenenfalls manuell korrigiert.

2.6 Genotypisierung

Für die GWAS wurden Proben ausgewählt, die SLE typische Fluoreszenzmuster mit Intensitäten von 1:320 oder höher zeigten, beziehungsweise ein SLE typisches Fluoreszenzmuster mit einem Titer von 1:100 und mindestens einem SLE spezifischen Antikörper aufwiesen (s.o.). Diese werden im folgenden ANA_{SLE}-Positive genannt. Proben mit SLE typischen ANA Mustern mit einem Titer von 1:100 ohne Auftreten SLE spezifischer Antikörper wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Dieser Schritt begründet sich vornehmlich durch die Erwartung, dass die falsch positive Beurteilung von eigentlich unspezifischen Fluoreszenzen bei Intensitäten von 1:100 wahrscheinlicher ist als bei Proben mit Intensitäten ab 1:320. Die Amplifikation der Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphism, SNP) benötigt als Ausgangsmaterial 20 µl DNA-Proben mit einer Konzentration von circa 50 ng/µl.

2.6.1 DNA Aufbereitung

Die DNA Extraktion aus Vollblut wurde mit dem kommerziell erhältlichen QIAamp DNA Blood Mini Kit (*Qiagen, Hilden*) durchgeführt. Dies geschah dem beigelegten Protokoll für DNA Extraktion aus Blut oder Körperflüssigkeiten mittels Zentrifuge für 400 µl Vollblut folgend. Nicht im Kit enthalten waren autoklavierte 1,5 µl Reagiergefäße, weitere 2 ml Sammelröhrchen (*Fa. Sarstedt AG und Co, Nümbrecht*), 96 % Ethanol und destilliertes Wasser (*jeweils Apotheke UKSH, Lübeck*) zur Elution der DNA. Im ersten Schritt wurden 40 µl QIAGEN Protease und 400 µl Vollblut in die Zentrifugenröhrchen pipettiert. Mit Hinzufügen von 400 µl des AL Puffers und anschließendem Stoßmischen auf dem Vortex-Schüttler für 15 Sekunden waren die Proben zur Proteindegradation präpariert. Die Degradation fand während Inkubation bei 56°C für zehn Minuten auf einem Heizblock statt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Proteasenaktivität stoppte durch Hinzufügen von 400 µl Ethanol (96%) und Stoßmischen für 15 Sekunden auf dem Vortex-Schüttler. Die Proben wurden daraufhin komplett in QIAamp Mini Zentrifugen Säulen übertragen, welche in 2 ml Sammelröhrchen standen. Die Röhrchen mit den Säulen wurden mit 6.100 x g in der Zentrifuge (Heraeus Sepatech, Biofuge Pico) für eine Minute zentrifugiert. Das abzentrifugierte Filtrat wurde mit dem Sammelröhrchen entsorgt,

die Säulen in neue Sammelröhrchen gestellt. Es folgte der erste Waschschrift mit 200 µl AW1 Puffer und zentrifugieren bei 6.100 x g für eine Minute. Im zweiten Waschschrift wurden 500 µl AW2 Puffer hinzugegeben und bei 16.000 x g für drei Minuten zentrifugiert. Das Waschfiltrat wurde mit den Sammelröhrchen entsorgt und die Säulen in neuen Sammelröhrchen erneut bei 16.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Für die Elution wurden die Säulen in beschriftete autoklavierte 1,5 µl Reagiergefäße gestellt und mit 102 µl destilliertem Wasser versehen. Nach einer Inkubation von einer Minute wurden die Säulen bei 6.100 x g zentrifugiert und anschließend entsorgt. Die Reagiergefäße enthielten nun das DNA-Eluat.

2.6.2 Konzentrationsmessung

Die DNA-Konzentration der Eluate wurde mit dem NanoDrop 2000 (ThermoScientific, Wilmington, Delaware, USA) ermittelt. Die Messung erfolgte mit 2 µl des Eluates.

2.6.3 Aufkonzentrierung

Proben, deren DNA-Konzentration unter 40 ng/µl lagen, wurden mit dem Kit „DNA Clean and Concentrator™-5 D4004“ (Zymo Research Europe GmbH, Freiburg) höher konzentriert. Nicht im Kit enthalten waren destilliertes Wasser (Apotheke UKSH, Lübeck) und autoklavierte 1,5 ml Reagiergefäße. Das Kit wurde entsprechend des beigelegten Standardprotokolls genutzt. Die nach der Konzentrationsmessung noch 100 µl umfassenden DNA-Proben wurden mit 200 µl *DNA Binding Buffer* versetzt und vorsichtig auf dem Vortex-Schüttler gemischt. Das gesamte Gemisch wurde dann in Sammelröhrchen stehenden Zymo-Spin™ Säulen übertragen und für 30 Sekunden bei 11.500 x g zentrifugiert. Das Filtrat wurde entsorgt, 200 µl Waschpuffer in die Säulen gegeben und diese bei 11.500 x g für 30 Sekunden zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde einmal wiederholt. Zum Schluss wurden die Säulen in autoklavierte 1,5 ml Reagiergefäße gestellt und mit 40 µl destilliertem Wasser eluiert. Hierfür fand eine Zentrifugation für 30 Sekunden bei 11.500 x g statt.

Die konzentrierten Proben wurden erneut mit dem NanoDrop (s.o.) untersucht. Die Konzentrationsmessung der DNA erfolgte mit zwei Mikroliter der DNA-Proben.

2.6.4 Präparation für die Genotypisierung

Die Genotypisierung wurde im Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel/UKSH durchgeführt. Insgesamt wurden 304 ANA-negative Kontrollen und 119 ANA_{SLE}-Positive in einem ersten Batch und 68 ANA_{SLE}-Positive in einem zweiten Batch genotypisiert. Die Replikation erfolgte mit dem „Immunchip Illumina array“ für 196.509 SNPs. Die DNA-Proben wurden hierfür auf Well-Plates (96 Multiply

PCR-Platte, Fa. Sarstedt AG und Co, Nümbrecht) aufgebracht. Die Zielkonzentration von 50 ng/μl der einzelnen DNA-Proben wurde durch Vorlegen der entsprechenden Volumina destillierten Wassers in die Wannern der PCR-Platte erreicht. Die benötigte Verdünnung für 20 μl Gesamtvolumen wurde dafür auf ein ganzzahliges Volumenverhältnis von DNA-Probe zu Wasser in μl gerundet. Proben mit Konzentrationen von 39,37-54,9 ng/μl wurden unverdünnt verwendet. 16 ANA_{SLE}-Positive und 11 Kontrollen hatten DNA-Konzentrationen zwischen 40 und 45 ng/μl.

2.7 Studienübersicht

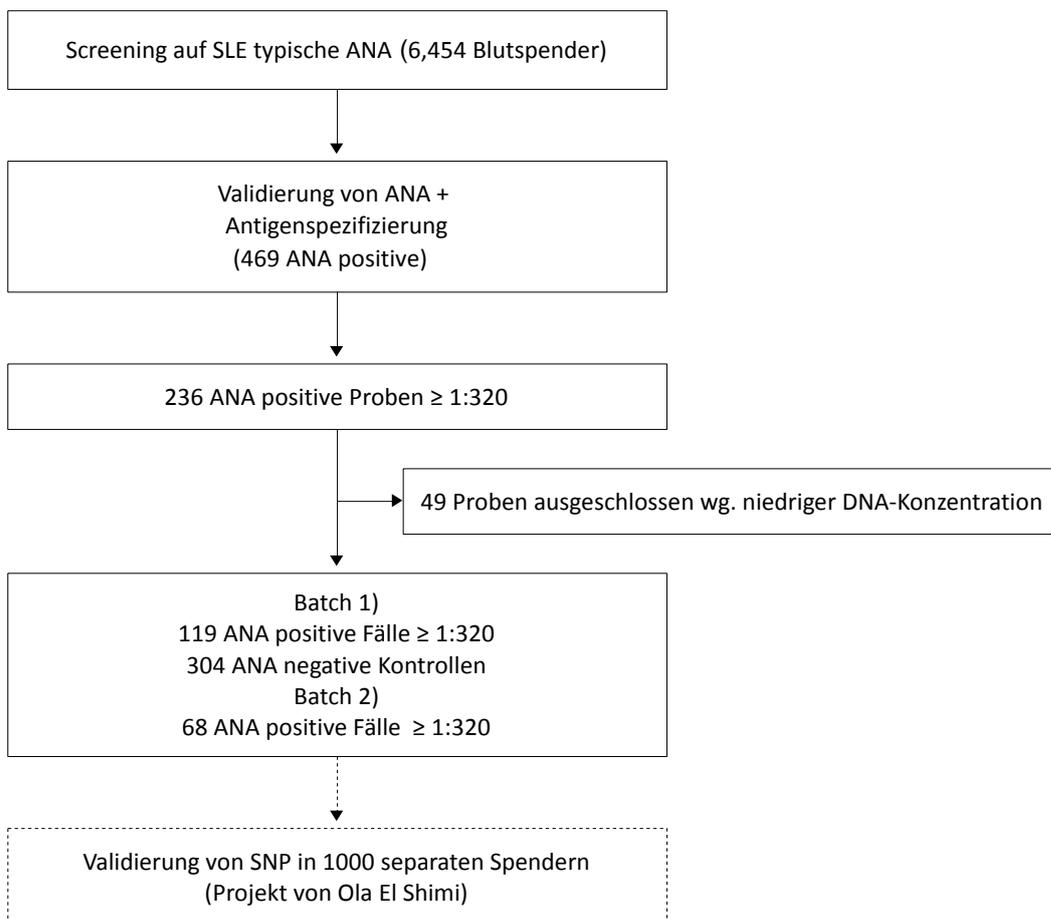


Abbildung 5: Darstellung des Studiendesigns

2.8 Auswertung und Statistik

2.8.1 Auswertung der genomweiten Assoziationsstudie

Die Daten der Genotypisierung wurden mit der Software PLINK (Version: v1.07, Autor: Shaun Purcell, <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/> [74]) ausgewertet. Sie enthielten für jede untersuchte Probe die Replikationsdaten der im Array enthaltenen SNPs in Form von Allel-Signalintensitäten. Die notwendige Programmierung der PLINK Software wurde durch Dr. Steffen Möller durchgeführt.

Die Analyse der SNP erfolgte für zwei Signifikanzschwellen von $1E^{-3}$ und $1E^{-5}$. Den üblichen Standards zur Qualitätskontrolle in GWAS entsprechend galten folgende Filterkriterien: Individuen mit über 10% fehlenden Genotypendaten „[mind]“, sowie SNPs mit einer Minor Allel Frequency „[maf]“ von unter 5% wurden ausgeschlossen. Für das Signifikanzniveau von $1E^{-5}$ galt außerdem eine Replikationsrate von unter 90% „[geno]“ als Ausschlusskriterium für SNPs.

Für beide Signifikanzniveaus wurde mit der False Discovery Rate und der Summe der ausgewerteten SNPs zusätzlich die Anzahl falsch positiver SNPs berechnet.

Fehler bei der Replikation der SNP-Allele können zu falscher Einordnung in A- und B-Allele führen, die die PLINK Software nicht überprüfen kann. In dieser Arbeit wurde zu jedem SNP das vorliegende Allel identifiziert, indem die replizierte Menge der DNA-Kopien jedes Allels gemessen wurde. Aus diesen Signalen, welche kontinuierliche Daten generieren, wurden durch die Software Genome Studio Schwellenwerte und daraus diskrete Daten mit Zuordnung der Proben zu homozygoten oder heterozygoten Allelen erstellt. Dies ist beispielhaft in Abbildung 10 an der farblichen Unterlegung zu sehen. Die Menge der DNA-Kopien eines Allels kann durch einen technischen Fehler bei der Replikation eines SNPs reduziert werden. Ist dies bei heterozygoten Individuen der Fall, führt das verringerte Signal des betroffenen Allels dazu, dass dieses von der Software nicht korrekt erkannt wird. Das Individuum wird entweder als unbekannt (NA) klassifiziert und von weiteren Analysen ausgeschlossen oder fälschlicherweise als homozygot für das andere Allel klassifiziert und in die weiteren Analysen eingeschlossen. Die Replikationsgüte der mit der Software identifizierten SNPs für Signifikanzniveaus von über $1E^{-3}$ und $1E^{-5}$ wurde deswegen zusätzlich mit dem Programm GenomeStudio Data Analysis Software (Version: 2011.1, *Illumina, San Diego, Kalifornien, USA*) überprüft. Hierzu diente für jeden SNP die Darstellung der Signalintensität für das A- und B-Allel aller replizierten Proben in einem Streudiagramm. SNPs ohne eindeutige A- und B-Allelverteilung wurden wegen mangelnder Replikationsgüte manuell von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Um zu ermitteln, wie viele der SNPs mit guter Replikationsgüte falsch positiv sind, wurde mit der Summe der durch PLINK identifizierten positiven SNPs und der Anzahl der erwarteten falsch Positiven der prozentuale Anteil falsch positiver SNPs berechnet. Anschließend wurde mit diesem Prozentsatz kalkuliert, wie viele der SNPs mit eindeutiger Allelverteilung wahrscheinlich falsch positiv sind.

Die Genloci der resultierenden SNPs wurden in der Onlinedatenbank Ensembl Genome Browser auf dem Stand der NCBI Sammlung 36 [34] für kodierende Bereiche untersucht. Lag ein SNP nicht innerhalb eines bekannten Gens, wurden Gene in unmittelbarer Nachbarschaft für die weitere Auswertung herangezogen.

Insbesondere bei kleinen Fallzahlen haben technische Unregelmäßigkeiten einen großen Einfluss auf die Statistik. In dessen Folge werden SNPs identifiziert, die nicht mit den ausgewählten Phänotypen (s. 2.2) assoziiert sind, sondern auf Unterschieden der Verarbeitung beruhen. Zur Klärung dieser Fragestellung erfolgte für die identifizierten SNPs die graphische Darstellung der Allele aller Proben.

Zusätzlich wurde mit dem Programm GenomeStudio das Geschlecht der genotypisierten ANA Positiven und Kontrollen ermittelt und mit dem Fisher exact test (s.u.) die Verteilung analysiert.

2.8.2 Statistik

Die angegebenen Punktprävalenzen beziehen sich auf die untersuchte Population. Alle nachstehenden Berechnungen erfolgten unter der Annahme normalverteilter Daten. Zur Berechnung des Standardfehlers SE_p wurden gefundene Merkmalswahrscheinlichkeit p , Gegenwahrscheinlichkeit q und Probenzahl n herangezogen:

$$SE_p = \sqrt{\frac{p \times q}{n}} = \sqrt{\frac{p \times (1 - p)}{n}}$$

Die obere und untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls errechnete sich mit folgenden Formeln:

$$\text{obere Grenze} = p + 1,96 \times SE_p$$

$$\text{untere Grenze} = p - 1,96 \times SE_p$$

Die Formeln für Standardfehler und Konfidenzintervall wurden dem Kursskript des Blockpraktikums „Evidenzbasierte und soziale Medizin entnommen [51].

Die Unabhängigkeit zweier Merkmale von Stichproben wurden mit dem exakten Test nach Fisher in Gnu R (Version 2.14, <http://www.r-project.org>) statistisch geprüft.

Der Nachweis SLE-spezifischer Antikörper im Line Blot wurde weiterhin mit Gnu R (Version 2.15, <http://www.r-project.org>) und dem Package "epitools" (version 0.5-6) untersucht. Dabei wurde der positive Nachweis spezifischer Antikörper in Abhängigkeit des Fluoreszenztiters mittels Logistischer Regression analysiert und darüber ein Wilson Konfidenzintervall berechnet. Die Logistische Regression und die folgende Berechnung des Wilson Konfidenzintervalls wurde durch Dr. Andreas Recke aus der Klinik für Dermatologie, UKSH, Campus Lübeck unterstützt.

3 Ergebnisse

3.1 ANA Prävalenz in gesunden Blutspendern

Insgesamt wurden 6.454 Blutproben gesunder Blutspender auf antinukleäre Antikörper untersucht. Dabei zeigten 17,72 Prozent (95% CI: 16,8 - 18,7%) eine beliebige Fluoreszenz der HEp-Zellen. Nach dem Screening mit einer 1:100 Verdünnung wurden 469 ANA_{SLE}-positiv gescreente Proben validiert. In der Verdünnungsreihe von 1:10, 1:100 und 1:1000 lag die Prävalenz von ANAs mit SLE-typischen Fluoreszenzmustern zwischen 5,62 (1:100; 95% CI: 5,1 - 6,2%) und 0,02 Prozent (1:10000; 95% CI: 0,0 - 0,1%) (Tabelle 2). Das Gros der Proben zeigte eine granuläre Fluoreszenz der Zellkerne (n = 303). In 16 Proben traten Kombinationen der Fluoreszenzmuster auf. Alle negativen Kontrollen (n = 10) wurden erneut als negativ beschrieben. Außerdem wurden 24 Proben mit dem Muster „Nuclear dense fine speckled“ (s. 4.4.2) identifiziert, welche zum Ausschluss einer Überlagerung der Muster Nukleär homogen und Nukleär granulär in die Validierung aufgenommen wurden.

Tabelle 2: Prävalenz SLE-typischer Antinukleärer Antikörper in gesunden Blutspendern

Titer	Anzahl	Prozent [%]	95% CI
Negativ [#]	5.311	82,28	81,4 – 83,2
≥1:100 [§]	1.144	17,72	16,8 – 18,7
ANA Titer*			
≥1:100	363	5,62	5,1 – 6,2
≥1:320	236	3,66	3,2 – 4,1
≥1:1000	99	1,53	1,3 – 1,9
≥1:3200	11	0,17	0,1 – 0,3
≥1:10000	1	0,02	0,0 – 0,1
Insgesamt analysiert	6.454	100,00	–

[#] negative Proben zeigten keine Fluoreszenz eines nukleären oder zytoplasmatischen Musters. [§] beliebige Fluoreszenzmuster der HEp-20-10 Zellen. * Muster: Nukleär homogen (n=53), nukleär granulär (n=303), few nuclear dots (n=10), zytoplasmatischer Golgi-Apparat (n=10), zytoplasmatische ribosomale P-Proteine (n=0). 16 Proben zeigten Kombinationen dieser Fluoreszenzmuster

Insgesamt zeigten 24 Proben eine antigenspezifische Fluoreszenz für das ENA SS-A (Ro-60) und dies immer in Kombination mit einem nukleär granulären ANA-Muster. Mit 112 Proben zeigte das ENA SS-B (La) die häufigste antigenspezifische Immunfluoreszenz. Die spezifische SS-B Fluoreszenz war aber nur in 50 Prozent der Fälle mit einer

granulären Fluoreszenz assoziiert. Bei acht Prozent der ENA SS-B spezifischen Fluoreszenz trat keine Reaktion der HEp-Zellen ein und bei circa sieben Prozent reagierten diese nur schwach. Weitere ENA zeigten seltener Antikörper-Reaktionen. Umgekehrt waren granuläre Fluoreszenzmuster am häufigsten in Kombination mit spezifischen ENA-Fluoreszenzen assoziiert (> 30 %, s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Prävalenz von Antikörpern gegen extrahierbare nukleäre Antigene in validierten Proben

ENA [°]	Validiert N = 492 [n]	SLE-typische HEp-Fluoreszenz					Andere HEp- Fluoreszenz N = 113 [n] (%)
		Nukleär homogen N = 53 [n] (%) ⁺	Nukleär granulär [§] N = 303 [n] (%) ⁺	few nuclear dots N = 10 [n] (%) ⁺	Golgi- apparat N = 10 [n] (%) ⁺	ANA hell [§] N = 19 [n] (%) ⁺	
SS-A (Ro-60)	24		24*				
SS-B (La)	112	4	56	1		9	42 [#]
Scl-70	14		8			3	3
Jo-1	13	3	6		1		3
nRNP-Sm	16	1	11				4
Sm	3 [*]		3 [*]				
ENA positiv	166 (33,7)	7 (13,2)	103 (34,0)	1	1	11 (57,9)	49 (43,4)
ENA negativ	326 (66,3)	46 (86,8)	200 (66,0)	9	9	8 (42,1)	64 (56,6)

[°] ENA = Extrahierbares nukleäres Antigen. ⁺ in Klammern prozentualer Anteil am jeweiligen Fluoreszenzmuster. * eine Probe grenzwertig nukleär granulär, aber deutlich nukleolär gefärbt. [#] 9 Proben zeigten nur ENA SS-B Reaktivität, davon 2 grenzwertig. [§] umfasst fein- und grobgranuläre nukleäre Fluoreszenz, ohne nuclear dense fine speckled. [§] schwache nukleäre Fluoreszenz, n.n.b., ^{*} trat in Kombination mit nRNP-Sm (n = 2) und SS-B (n = 1) auf.

3.2 Antigen-spezifität der ANA

Im Line Blot Immunoassay wurden unter 469 ANA_{SLE}-positiv gescreenten Proben in 174 Proben (37,10 %) antigenspezifische Antikörper detektiert. Bei 77 dieser Proben handelte es sich um mindestens einen SLE-assoziierten Antikörper und 14 dieser Proben zeigten sogar mehr als einen SLE-assoziierten Antikörper (siehe Anhang, Abschnitt 7.4). Je stärker die Intensität der Immunfluoreszenz, desto häufiger war ein Antikörper gegen getestete Antigene zu finden. Dies ist für die häufigsten ANA-Muster „homogen“, „granulär“ und „nukleolär“ in Abbildung 6 abgebildet.

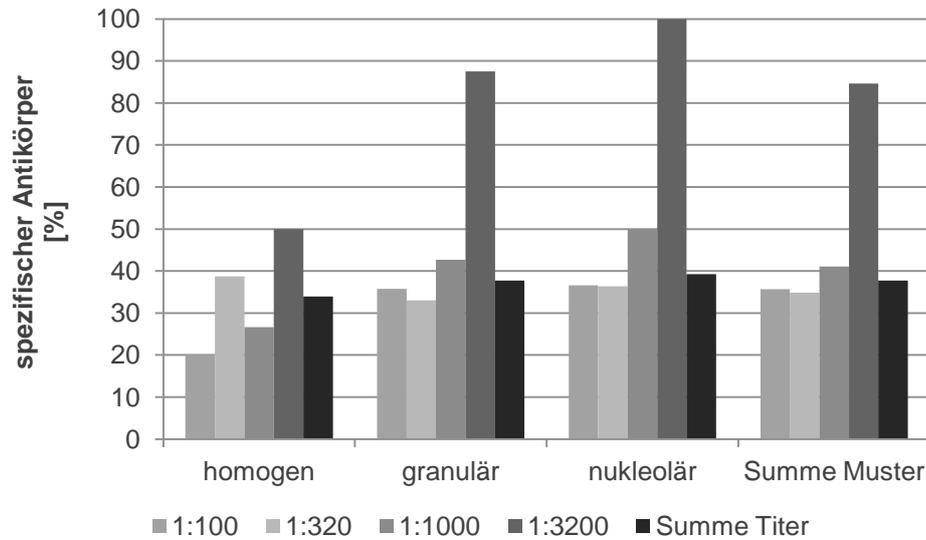


Abbildung 6: Prävalenz spezifischer Autoantikörper bezogen auf ANA Muster und Titer

Die Wahrscheinlichkeit, bei ANA_{SLE} Mustern einen SLE-assoziierten Antikörper zu detektieren, stieg dabei signifikant mit dem Titer in der Immunfluoreszenz ($p=0,0241$, s. Abbildung 7).

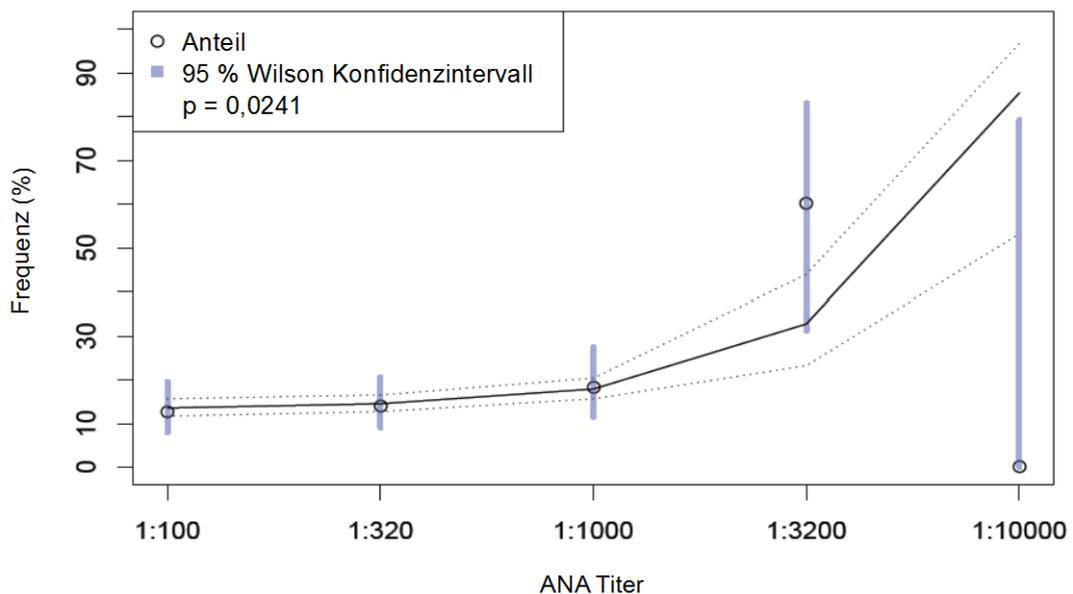


Abbildung 7: Logistische Regression der Prävalenz spezifischer Autoantikörper abhängig vom ANA-Titer

Die identifizierten spezifischen Antikörper der einzelnen Immunfluoreszenzmuster sind in Tabelle 4 aufgeführt. Proben mit nukleär homogenen und nukleär granulären Mustern zeigten ähnlich häufig SLE-spezifische Antikörper (15,1 % und 15,8 %). Andere SLE-typische Muster zeigten nur in zehn Prozent der Fälle SLE-spezifische Antikörper, während bei Mustern ohne bekannte Assoziation mit SLE wiederum häufiger SLE-

typische spezifische Antikörper nachweisbar waren (15,7 %). Am häufigsten reagierte der Euroline Test positiv auf Antikörper gegen SS-A (Ro-60, n=17), das sind 4,68 Prozent aller ANA_{SLE}-Positiven. Werden auch schwach positive Reaktionen berücksichtigt, so waren SS-B (La) spezifische Antikörper am häufigsten zu finden (n=24). Schwach positive SS-B Proben zeigten in der ENA SS-B Fluoreszenz Titer-Äquivalente von 1:320 (n=4), 1:1000 (n=7), 1:3200 (n=2) oder waren negativ (n=1). Besonders häufig reagierte Ro-52 in den Eurolines (9,6 % positiv, 12,4 % inklusive grenzwertiger Befunde). Da Ro-52 als rekombinantes Antigen im Testsystem vorlag und als häufiger Fund bei diversen Erkrankungen vorkommt, wurde es als unspezifischer Antikörper von weiteren Analysen ausgeschlossen (s. auch 4.2)

Tabelle 4: Prävalenz SLE-typischer Autoantikörper für ausgewählte ANA-Muster*

IF Muster	N	≥1 SLE typ. AAK	SS-A	SS-B	dsDNA	nRNP	Sm	Nukl.	Histon	PCNA	Ku	rib. P Prot.
N. homogen	53	8 (15,1%)	-	1	-	-	-	3	5	-	0	-
N. granulär	303	48 (15,8%)	18	10	1	3	3	-	5	9	9	1
SLE typ.§	20	2 (10,0 %)	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-
Kein SLE typ.§	127	20 (15,7 %)	2	12	1	1	1	-	-	1	2	-

*mindestens grenzwertiger Nachweis (gilt nicht für Ku), hellgrau hinterlegt sind die typischen spezifischen antinukleären Antikörper der entsprechenden Fluoreszenzmuster [27]. § HEp-Muster „few nuclear dots“, „Golgi-Apparat“. \$ HEp-Muster „nukleolär“, „Kernmembran“, „nuclear dense fine speckled“, „zytoplasmatisch“ (diverse) und Kombinationen davon; Abkürzungen: AAK = Autoantikörper, SLE = Systemischer Lupus Erythematodes, rib. P. Prot. = Ribosomales P-Protein, Nukl. = Nukleosom

Von allen Proben mit positiver ENA SS-B Fluoreszenz (n=112) war nur ein Fünftel auch im Euroline mindestens grenzwertig SS-B positiv (n=22). Für SS-A ergibt sich eine höhere Übereinstimmung von 67 Prozent (75 Prozent inklusive grenzwertig positiver) der ENA SS-A positiven, die auch im Euroline positiv waren. Umgekehrt waren von 17 SS-A positiven Proben im Lineblot 16 ebenso positiv für die ENA SS-A Fluoreszenz (18 von 20 bei grenzwertigem Lineblot Ergebnis). Die fehlende Probe zeigte stattdessen eine ENA SS-B Fluoreszenz. 9 von 10 Proben (mit grenzwertigen Lineblot Ergebnissen 22 von 24) zeigten bei SS-B positivem Lineblot ebenso eine ENA SS-B Fluoreszenz. Die jeweils negativen Proben zeigten stattdessen eine ENA SS-A Fluoreszenz. Die Übereinstimmung der Ergebnisse beider Testsysteme war für beide analysierten spezifischen Antikörper signifikant ($p=1,5E^{-13}$ [SS-B], $p=5,3E^{-26}$ [SS-A]). Die Übereinstimmungen der ENA Fluoreszenzen und Euroline Ergebnisse lagen für Sm bei 25 % (1 von 4) und für nRNP/Sm bei 100 % (4 von 4). Arbuckle et al. gruppierten einige SLE-spezifische Antikörper in „früh“ und „spät“ im Krankheitsverlauf auftretende Antikörper ein. Früh treten SS-A und SS-B auf, spät hingegen U1-nRNP und Sm. Für die nicht gruppierten SLE-

typischen Autoantikörper konnte kein signifikanter Unterschied zu den gruppierten Autoantikörpern festgestellt werden [6]. „Frühe“ Antikörper (SS-A, SS-B) fanden sich signifikant häufiger in den hier untersuchten Proben als „späte“ Antikörper (U1-nRNP, Sm; $p < 0,001$, Abbildung 8).

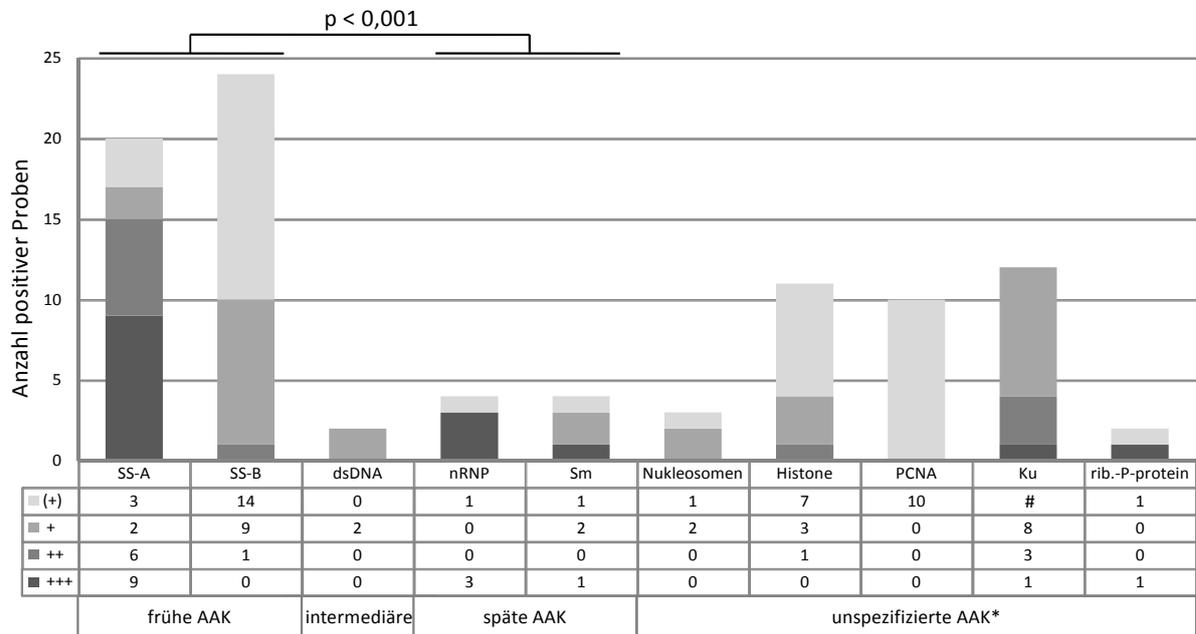


Abbildung 8: „Frühe“ SLE-assoziierte Autoantikörper finden sich bei Gesunden am häufigsten. *nicht durch Arbuckle et al. klassifiziert; # grenzwertige Befunde lt. Hersteller unspezifisch. Abkürzung: AAK = Autoantikörper; Abkürzungen Antigene siehe Abkürzungsverzeichnis

Sehr häufig ($n=556$, 8,6%) wurde im ANA-Screening der 6.454 untersuchten Blutspender das Muster „nuclear dense fine speckled“ (DFS-70/anti-LEDGF) nachgewiesen [30]. Mit einer Stichprobe von 24 dieser Proben, die eine sehr intensive Fluoreszenz aufwiesen, wurde ebenfalls eine Validierung und Spezifizierung der Antikörper durchgeführt. Hinzu kamen 14 Proben, die in der Validierung mit diesem Muster korrigierend klassifiziert wurden. Im Euroline konnte in zwölf dieser Proben ein spezifischer Antikörper identifiziert werden (1 Th/To mit NOR90, 1 RP11, 1 PL-12, 3 PM-Scl 75, 3 PM-Scl 100, 1 AMA-M2, 1 Ku, 1 Histon mit SS-B).

3.3 Assoziation von ANA mit genetischen Merkmalen

Insgesamt wurden 491 Proben genotypisiert. Aufgrund technischer Schwierigkeiten wurden die Genotypisierungsdaten der 68 Proben des zweiten Batches nicht in die Auswertung einbezogen. Diese äußerten sich bei der Implementierung der Daten des zweiten Batches in die Daten des ersten Batches in Form von zahlreichen höchstsignifikanten SNPs.

3.3.1 Geschlechterverteilung

Die 423 genotypisierten Proben der ANA_{SLE}-Positiven und Negativen konnten Geschlechtern zugeordnet werden und umfassten 165 weibliche und 258 männliche Individuen. Bei weiblichen Individuen betrug die Verteilung von Fall zu Kontrolle 67 zu 98, während männliche Individuen eine Verteilung von 52 zu 206 aufwiesen. Männer stellten unter den zufällig ausgewählten Kontrollen 67,8 Prozent aller Proben. Demgegenüber stellten Frauen jedoch 56,3 Prozent der ANA_{SLE}-Positiven. Frauen waren im Vergleich zu Männern mit höherer Wahrscheinlichkeit ANA_{SLE} positiv ($p = 3,2E^{-06}$; OR 2,7, 95 %, CI 1,7-4,3) und der weibliche Anteil unter ANA_{SLE}-Positiven war signifikant höher als unter den Kontrollen ($p = 0,004$).

3.3.2 SNP Analyse

In beiden Analysen wurde kein Individuum wegen zu geringer Genotypendaten ausgeschlossen. Für $1E^{-3}$ wurden 117.444 SNPs und für $1E^{-5}$ 115.806 SNPs analysiert und 79.065, beziehungsweise 80.703 SNPs von der Analyse ausgeschlossen. Die false discovery rate (FDR) der gewählten Signifikanzschwellen liegt somit bei 117,4 ($1E^{-3}$) und 1,15 ($1E^{-5}$) falsch positiven Genloci.

Für die Signifikanzschwelle von $1E^{-3}$ (MAF (0.5), Mind (0.1)) wurden 291 SNPs durch PLINK identifiziert. Die FDR mit 117,4 falsch Positiven lässt rund 40 % falsch positive SNPs unter den gefundenen 291 SNPs erwarten. Für 64 der 291 gefundenen SNP stellte sich eine eindeutige A- und B-Allelverteilung dar. Entsprechend 40 % falsch positiver SNPs sind rund 25,8 falsch Positive unter den 64 SNPs. Die MAF der gefundenen SNPs unterschritt in Kontrollproben nicht elf Prozent. Ausnahme hiervon bildeten fünf SNPs mit 8,5 % in der Region 6:31379490-31415295 und zwei SNPs mit 9,2 % in der Region 6:31492557-31496088. Nur in diesen Genregionen lag die MAF bei Fallproben mit 17,4 % und 19,7 % über der der Kontrollproben. Nach der Zusammenfassung von SNPs aus gleichen Genregionen ergeben sich 41 Genloci, die in dieser Untersuchung theoretisch mit SLE typischen ANA-Immunfluoreszenzmustern assoziiert sind. Aufgrund der hohen Rate falsch positiver Ergebnisse wurde von einer weiteren Auswertung abgesehen.

Bei einer Signifikanzschwelle von $1E^{-5}$ (MAF (0.5), Mind (0.1), geno (0.1)) wurden 68 SNPs durch PLINK identifiziert. Die FDR dieser Signifikanzschwelle liegt bei 1,15 falsch Positiven unter 115.806 analysierten SNPs und bedeutet bei 68 identifizierten SNPs eine Wahrscheinlichkeit von 1,69 Prozent, einen SNP fälschlicherweise mit dem ANA-Muster zu assoziieren. Für sieben der 68 identifizierten SNPs fanden sich eindeutige A- und B-Allelverteilungen sowie benachbarte Genloci. Unter Berücksichtigung der Wahrscheinlichkeit von 1,69 Prozent, einen SNP falsch positiv zu bewerten, sind unter

diesen sieben Genloci 0,12 falsch positive zu erwarten. Die MAF lag in der Kontrollgruppe bei diesen SNPs bei mindestens 14,8 Prozent und immer unter der MAF der Fallgruppe. Diese Genloci sind somit statistisch signifikant mit SLE-typischen ANA-Mustern assoziiert. In Nachbarschaft dieser SNPs befinden sich 12 bekannte Gene (Tabelle 5).

Tabelle 5: Mit ANA_{SLE}-Positiven statistisch assoziierte Single nucleotide Polymorphisms (SNP)

Chr.	SNP	BP	p-Wert OR	FDR Schwelle [§]	Gen*	Entfernung SNP-Gen [bp] [#]	Kommentar
2	imm_2_99933331	99933331	8.40E-07 3.528	4,32E-7	AFF3	0	Batch-Effekt, hoher p-Wert
2	imm_2_191595829	191595829	2.31E-06 2.928	4,32E-7	STAT1	-8648	Batch-Effekt, hoher p-Wert
					STAT4	+6718	
6	1kg_6_30265577	30265577	5.02E-08 2.664	4,32E-7	TRIM26	0	Keine Heterozygoten
6	rs2499690	34149396	1.29E-07 3.421	4,32E-7	GRM4	0	Batch-Effekt
6	imm_6_138173816 (rs58905141)	138173816	1.21E-07 2.699	4,32E-7	OLIG3	-316736	OR 1.69 (1.4-2.04) [§]
					TNFAIP3	+56458	
6	6-167351454-AT- DELETION	167351454	4.75E-07 3.279	4,32E-7	FGFR1OP	0	Batch-Effekt, hoher p-Wert
					CCR6	0	
					RNASET2	-60785	
8	ccc-8-126597904-A-G	126597904	1.73E-06 3.341	4,32E-7	TRIB1	-78080	Batch-Effekt, hoher p-Wert
					NSMCE2	-149361	

[§]Schwelle des p-Wertes nach Benjamini und Liu [14]. *Abkürzungen siehe Datenbanken (z. B. PubMed®). [#]positive Werte liegen auf der DNA upstream, negative Werte downstream vom betrachteten SNP. [§]OR für SLE bei Europäern mit Minor-Allel [1]. Abkürzungen: Chr. = Chromosom, SNP = Single Nucleotide Polymorphism, BP = Basenpaar, OR = Odds Ratio, FDR = False Discovery Rate, [bp] = Basenpaare

Für die sieben identifizierten SNPs zeigte die graphische Darstellung der Allele aller Proben, dass sechs SNPs auffällige Allelverteilungen haben (s. Abbildung 9). Bei fünf dieser SNPs war die Probenfolge 1-48 einer Mikrotiterplatte heterozygot, davon waren 19 Kontrollen und 29 Fälle betroffen. Bei dem SNP „1kg_6_30265577“ fehlten heterozygote Proben gänzlich.

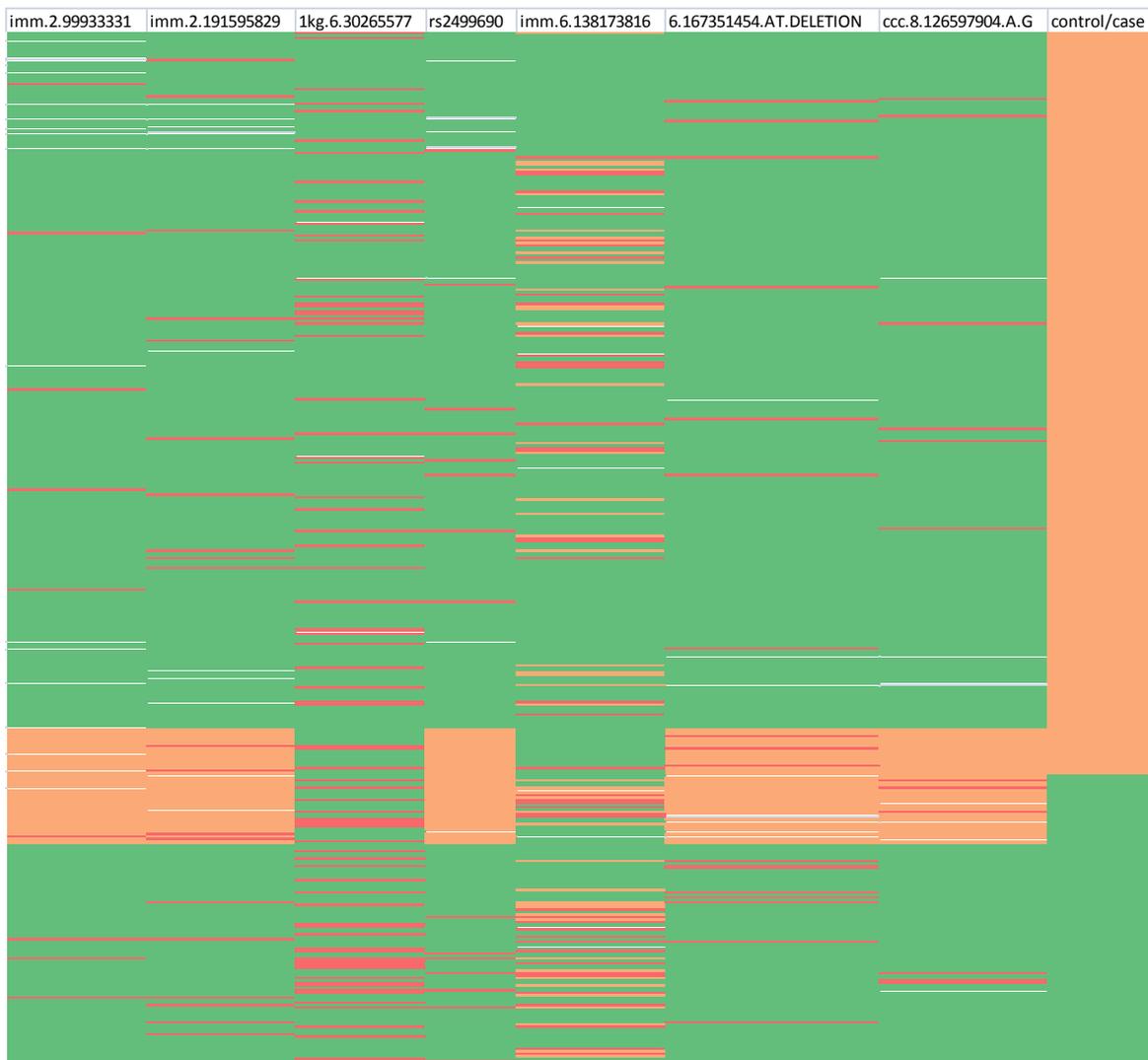


Abbildung 9: Die Homozygoten der identifizierten SNP zeigen teilweise eine unnatürliche Verteilung. (grün = homozygot für Major-Allel oder case, rot = homozygot für Minor-Allel, orange = heterozygot oder control; jede Linie stellt ein Individuum dar)

Der SNP „imm_6_138173816“ (rs58905141 [7]), der in der Nähe des Gens TNFAIP3 liegt, zeigte nach Berechnung der Homo- und Heterozygoten mit der Minor-Allel-Frequenz nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz eine Diskrepanz zwischen gefundenen und erwarteten Häufigkeiten. Die Signalintensitäten der replizierten Allele sind für diesen SNP in Abbildung 10 dargestellt.

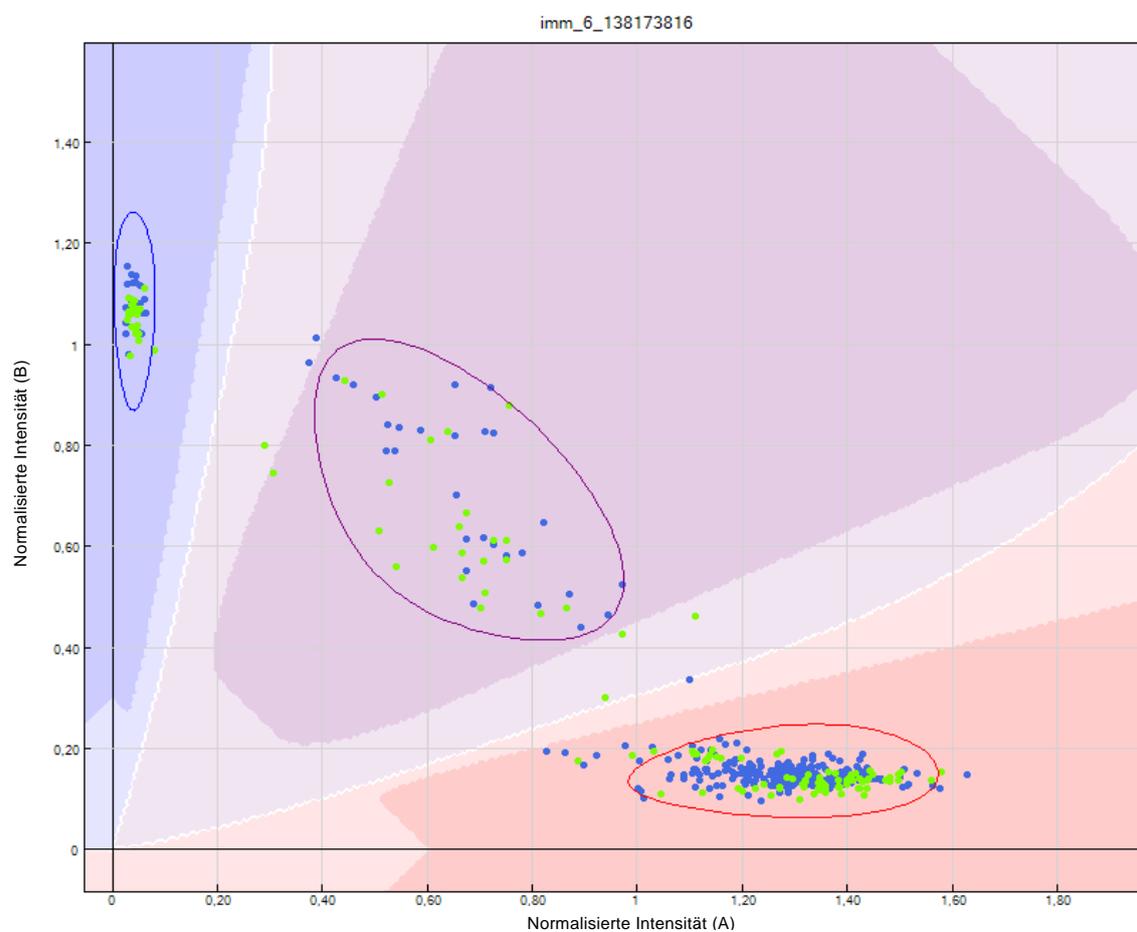


Abbildung 10: Signifikanter SNP *imm_6_138173816* mit Intensitäten der einzelnen replizierten Allel-Varianten. Jeder Punkt stellt ein untersuchtes Individuum dar (grün = Fall, blau = Kontrolle). Farblich unterlegt sind die Bereiche für homo- und heterozygote Allelkombinationen (blau und rosa = homozygot, violett = heterozygot). Messpunkte in den helleren Bereichen werden nicht zugeordnet.

3.4 ANA Risikogene in SLE Patienten

Sowohl der SNP „*imm_6_138173816*“ (rs58905141) als auch die benachbarten Gene *OLIG3* und *TNFAIP3* sind bekannte Risikogene für SLE [1].

4 Diskussion

Trotz intensiver und vielversprechender Forschung ist es noch nicht gelungen, die Manifestation des SLE vorherzusagen. So zeigten retrospektive Studien mit SLE-Patienten, dass sowohl diagnostisch relevante Autoantikörper als auch einzelne klinische Kriterien der ACR bereits Jahre vor der endgültigen Diagnose der Erkrankung vorlagen. Sogar dem Befall einzelner Organe wie der Niere oder der Gelenke geht in den meisten Fällen die Bildung von anti-DNS Autoantikörper beziehungsweise Rheumafaktoren voraus [6, 47]. Im Gegenzug wurde festgestellt, dass sich bei sehr viel mehr gesunden Menschen Autoantikörper finden lassen, als es ein effizientes Screening für Autoimmunerkrankungen erlauben würde (s. Tabelle 1). Weiterhin gibt es diverse Studien zu genetischen Risikofaktoren für Autoimmunerkrankungen wie dem SLE. Diese erfolgten bisher mit Patienten. In dieser Arbeit wurde nun erstmalig eine Untersuchung durchgeführt, die eine genetische Assoziation mit der Prävalenz von Autoantikörpern des IgG-Typs in Abwesenheit einer klinisch manifesten Autoimmunerkrankung untersuchte. Hierfür wurde eine Kohorte mit gesunden Individuen gebildet, die klinisch symptomfrei IgG-Autoantikörper produzieren. Die Autoantikörper sollten durch ein SLE-assoziiertes ANA-Muster charakterisiert sein. Unter 6.454 untersuchten Individuen hatten 3,66 Prozent ein so definiertes ANA Muster mit hoher Intensität (IIF Titer $\geq 1:320$). Aus dieser Gruppe wurden 119 Individuen in einer genomweiten Assoziationsstudie mit Individuen ohne Autoantikörpernachweis verglichen. Dabei konnte ein Genlocus identifiziert werden (False Discovery Rate 0,0169), der eine Assoziation mit den untersuchten SLE-typischen Autoantikörpern zeigte ($p = 1.21E^{-07}$, OR 2.699). Das dort kodierte Gen TNFAIP3 ist ein bekanntes Risikogen für die Entwicklung eines SLE.

4.1 Prävalenz antinukleärer Autoantikörper in Gesunden

ANA sind hoch prävalent in der hier untersuchten Kohorte. Es ist nicht ungewöhnlich, antinukleäre Antikörper vom IgG-Typ in gesunden Menschen zu detektieren. Je nachdem, welche Populationen und Parameter Prävalenzstudien heranzogen, wurden bisher teilweise weit auseinandergehende Prävalenzen antinukleärer IgG-Autoantikörper in Gesunden berichtet (s. Tabelle 1). Fernandez et al. fanden mit indirekter Immunfluoreszenztechnik in 7 von 500 Blutspendern ANA-Titer mit mindestens 1:320 Verdünnung (1.4%, $CI_{95\%}$: 0.3 to 2.4) [36]. Studien, welche auf Basis eines ELISA Tests für ANAs durchgeführt wurden, lieferten in der Regel wesentlich höhere Prävalenzen von bis zu 27,12 % [109]. Besser mit der in dieser Arbeit gefundenen ANA-Prävalenz (vgl. Tabelle 2) stimmt jene aus der Arbeit von Tan et al. überein. Sie untersuchten 125 gesunde Blutspender mit der indirekten Immunfluoreszenztechnik und HEp-2-Zellen auf

ANA und fanden in der Verdünnungsstufe 1:320 in 3,3 Prozent der Blutspender ein ANA-Muster [98].

Das Konfidenzintervall der in Tabelle 2 aufgeführten Prävalenz für den Titer von 1:320 schließt diesen Wert mit ein. Da nukleoläre Fluoreszenzmuster (Anm.: nicht *nukleäre*) in dieser Arbeit von der ANA-Validierung ausgeschlossen wurden (s. 2.4.1), wird die tatsächliche Prävalenz der gesamten ANAs in dieser Kohorte noch höher liegen. Im Screening fanden sich etwa zwei Prozent mit nukleolärem Muster, deren helle Fluoreszenz am ehesten einem minimalen Titer von 1:320 entspricht, sodass die Prävalenz aller ANAs (1:320) etwa 5,6 % beträgt. Da keine objektive Validierung dieser Fluoreszenzmuster durch eine unabhängige Person erfolgte, soll der Effekt einer Lernkurve im Verlauf von 6454 untersuchten Proben grob dargestellt werden: Bei Teilung der Gesamtkohorte in eine früh und eine spät untersuchte Kohorte lagen die Häufigkeiten für helle nukleoläre Fluoreszenzmuster bei 1,9 (95 Prozent KI 1,5 – 2,3) und 2,1 Prozent (95 Prozent KI 1,2 – 3,0). Möglicherweise wurden also in der späten Kohorte geringfügig mehr nukleoläre Muster erkannt (zur Güte der indirekten Immunfluoreszenztechnik s. a. Abschnitt 4.7.2). Die Gesamtprävalenz der ANAs liegt in dieser Kohorte für einen Titer von 1:320 bei circa 5,6 Prozent (95 Prozent KI 4,2 – 7,0).

4.2 Zielantigene antinukleärer Antikörper

Wenige bekannte Zielantigene des Nukleus zeigen bei einem beachtlichen Teil der antinukleären Antikörper eine Reaktivität. Mit der indirekten Immunfluoreszenz konnte zusätzlich zur HEp-Fluoreszenz in einem Drittel der Fälle eine spezifische Reaktivität der ENA nachgewiesen werden (s. Tabelle 3). Und auch die Line Immunoblots identifizierten bei ähnlich vielen ANA-positiven Ziel-Antigene von IgGs. Im Vergleich zu den nur wenig mehr als 30 bekannten und auf den Blots genutzten nukleären Zielantigenen [38, 102, 106], bieten die HEp2-Zellen wahrscheinlich das gesamte Spektrum menschlicher nukleärer Antigene in ihrer natürlichen Umgebung. Somit war zu erwarten, dass ein Teil der ANA positiven keine ENA-Reaktivität zeigte. Ob polyspezifische oder niedrig avide antinukleäre Antikörper in der Immunfluoreszenz Muster hervorrufen, aber durch den genutzten Line Immunoblot wegen fehlender Antigene oder mangelnder Sensitivität nicht nachgewiesen werden konnten, ist möglich. Im Vergleich zum Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) wird beiden Techniken übereinstimmend keine Empfindlichkeit für niedrig-avide Antikörper bescheinigt [33]. Da die Blots nur die begrenzte Zahl von Antigenen enthielten, sind 37,1 Prozent identifizierbare Zielantigene von allen ANA_{SLE} positiv gescreenten Blutproben (1:100 Verdünnung) ein überraschend hoher Wert. Auf 6454 Blutspender bezogen sind dies 2,7 Prozent Prävalenz. Dies

übertrifft die Ergebnisse von Wandstrat et al., welche in 1,7 Prozent der sogenannten Dallas Heart Study (DHS) Population (n = 3470) Autoantikörper gegen nukleäre Antigene (Chromosomen, RNP, Sm, SS-A) fanden. Es wurde jedoch explizit darauf hingewiesen, dass Autoimmunerkrankungen in dieser Population nicht ausgeschlossen wurden [109]. Da in der hier vorliegenden Arbeit die Zielantigene nur von Proben mit SLE-typischen nukleären Fluoreszenzmustern bestimmt wurden, könnte die ENA-Prävalenz größer sein. So fehlen Informationen über nicht untersuchte Proben, die beispielsweise Fluoreszenzmuster der Nukleoli zeigten. In der Literatur gelang bei gesunden Blutspendern mit Western Blot oder der Ouchterlony-Doppelimmundiffusion bei vergleichbaren Zielantigenrepertoire nur in 0,4 – 0,6 Prozent der Zielantigennachweis [36, 105]. Bei ANAs mit einem Titer von 1:3200 (n=10) ließen sich in der vorgelegten Arbeit mit dem begrenzten Antigen-Repertoire der Line Immunoblots erstaunlicherweise sogar in über 50 Prozent der Fälle (n=6) Ziel-Antigene identifizieren. In vier dieser Proben fanden sich sogar zwei SLE-typische Antikörper (anti SS-A + anti-SS-B, anti-SS-A + anti-Ku, nRNP/Sm + Sm, Nukleosomen + Histone). Ob zwischen nRNP/Sm und Sm beziehungsweise Nukleosomen und Histonen kreuzreaktive Autoantikörper detektiert wurden, ist in diesen Fällen nicht auszuschließen. Insgesamt steigt mit der Höhe des Titers die Wahrscheinlichkeit, einen spezifischen Antikörper zu finden (s. Abbildung 7). Dieses Ergebnis deckt sich mit anderen Studien, in der für ANA Muster und Titer die prozentual ENA positiven angegeben wurden [27, 55]. Interessanterweise stellten Damoiseaux et al. fest, dass homogene Muster in weniger als der Hälfte der Fälle ENA positiv waren wie bei granulären Mustern. In der hier vorliegenden Arbeit konnten Unterschiede dieser Größenordnung nicht festgestellt werden, wenngleich das homogene Muster auch hier seltener mit einem spezifischen Antigennachweis assoziiert war (s. Abbildung 6). Dass es gelang, in mehr als einem Drittel aller ANAs mindestens einen spezifischen Autoantikörper nachzuweisen, war, bezogen auf die bisherige Literatur und das vergleichsweise begrenzten Antigenrepertoire der Lineblots, überraschend.

Aus den Mustern und Intensitäten der Indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie lassen sich die zu erwartenden Zielantigene nicht vorhersagen. Für die identifizierten Muster ließen sich sowohl in der Immunfluoreszenz als auch in den Lineblots jeweils diverse Antigene feststellen und auch im umgekehrten Falle fanden sich für die Antigene verschiedene Muster (s. Tabelle 3 und Tabelle 4). Dies deckt sich mit den Ergebnissen veröffentlichter Daten. So sind anti-sDNA Autoantikörper laut Servais et al. nicht immer mit homogenen Mustern assoziiert [87]. Sie fanden für dsDNA positive je 37 Prozent homogene und granuläre nukleäre und in 16 Prozent nukleoläre Fluoreszenzmuster. Somit scheinen nachgewiesene Antikörper gegen spezifische nukleäre Antigene nicht kausal für die Art des Fluoreszenzmusters zu sein.

4.2.1 Immunogenität nukleärer Antigene

Es gelang in dieser Arbeit der Nachweis, dass bei Gesunden mit antinukleären Autoantikörpern bei steigender Intensität der Immunfluoreszenz typische nukleäre Zielantigene häufiger identifiziert werden können. Die Nachweisbarkeit korrelierte dabei positiv mit dem Immunfluoreszenz-Titer ($p = 0,0241$, s. Abbildung 7). Dies deckt sich mit dem Befund, dass auch bei Personen mit Verdacht oder der Diagnose von SLE häufiger anti-dsDNA-Antikörper nachgewiesen werden, je höher die ANA-Titer lagen [3]. Bei Gesunden fanden sich mithilfe der Line immunoblots die gleichen Autoantikörper wie bei Patienten. Interessanterweise traten jene signifikant am häufigsten auf, die früh in der Vorgeschichte von SLE-Patienten auftreten [6] (s. 0). Dies sind anti-SS-A- und anti-SS-B-Antikörper. Auch wenn die Zielantigene der ANAs primär bei Erkrankten mit hohen ANA-Titern identifiziert wurden und darum der Diagnostik Erkrankter dienen, sollte man darum nicht von einer grundsätzlichen Pathogenität spezifischer Autoantikörper ausgehen. Trotzdem sind gerade diese Antigene äußerst immunogen und ermöglichen bereits mit der kleinen Antigenauswahl der Lineblots typische Ziele von hochtitrigen ANAs auch in Gesunden zu identifizieren.

Tatsächlich wurde eine Theorie aufgestellt, nach der Proteine mit besonders hohem Anteil ungeordneter Aminosäureketten ein hohes immunogenes Potential haben, insbesondere für B-Zellen. Ungeordnet bedeutet in diesem Sinne, dass Proteine in betreffenden Bereichen sich nicht ohne weiteres falten und darum keine definierten höherwertigen Strukturen annehmen. In einer Studie von Carl. et al. zeigten nukleäre Antigene hohe Anteile ungeordneter Proteinstrukturen. Im Vergleich mit anderen Studien entsprachen diese ungeordneten Proteinabschnitte den Bereichen, die in der Regel den Epitopen von Antinukleären Autoantikörpern entsprachen. Für die Pathogenese einer Autoimmunerkrankung könnte weiterhin von Bedeutung sein, dass die ungeordneten Proteinstrukturen schlechte Antigene für T-Zellrezeptoren darstellten [21].

Ein weiterer Faktor, der eine hohe Immunogenität zur Bildung von Autoantikörpern verursacht, ist die Isoaspartylierung von Proteinen. Aspartat-Reste eines Proteins bilden mit ihren β -Carboxylgruppen, unter Abspaltung von Wasser, mit der α -Aminogruppe spontan cyclische Imide. Diese Ringe werden durch Hydrolyse wieder geöffnet, wobei das Stickstoffatom der α -Aminogruppe mit dem α -Carboxyl-Rest (Aspartyl-Peptid), oder mit dem β -Carboxyl-Rest verbunden bleiben kann (Isoaspartyl-Peptid). Es wurden unter anderem isoaspartylierte snRNPs (z. B. snRNP D, zu Sm-Antigenen gehörend) gefunden, welche im Gegensatz zu den normal konfigurierten aspartylierten snRNP eine hohe Immunogenität aufwiesen. Isoaspartylierte Proteine kumulieren erst mit steigendem Alter, sodass sie möglicherweise von vorn herein keine Toleranzentwicklung der Lymphozyten

induzieren können und hierin ein Teil der Ursache für die hohe Immunogenität liegt. Weiterhin haben Anti-isoaspartyl-Peptid-Antikörper eine relevante Kreuzreaktivität zu den normalen aspartyl-Peptiden. Eine konsekutive Immunreaktionen gegen letztere könnte die Folge sein [107].

Aktive Autoimmunerkrankungen gehen häufig mit Autoantikörpern gegen intrazelluläre und nukleäre Antigene einher. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass intrazelluläre Autoantigene einem anderen Toleranzmechanismus unterliegen als extrazelluläre (s. 1.2.2). Extrazelluläre Antigene, die ständig „sichtbar“ sind, führen dazu, dass autoreaktive Zellen gegen sie gemäß der Clonal-Selection-Theorie ständig eliminiert oder unterdrückt werden. Demnach erlauben die intrazellulären Antigene durch ihr „Versteck“ die Entstehung autoreaktiver Klone, ohne zunächst eine Autoimmunerkrankung hervorzurufen. Die Rolle natürlicher Autoantikörper zum Maskieren und Opsonisieren intrazellulärer Antigene im extrazellulären Bereich zur Toleranzerhaltung ist ebenso zu bedenken (s. 4.3.4). Verbleiben die intrazellulären Antigene im extrazellulären Raum, könnten gegen nukleäre Antigene schnell Autoantikörper entstehen (s. 4.3.1 und 4.3.3).

4.3 Pathophysiologie der Autoantikörper

Autoantikörper unterscheiden sich von anderen Antikörpern des Immunsystems darin, dass ihre Ziele keine infektiösen Erreger sind, sondern körpereigene Strukturen. Darum lassen sich Autoantigene nicht durch das Immunsystem entfernen. Während allgemein anerkannt ist, dass autoreaktive B-Zellen in jedem Menschen physiologisch existieren, gilt dies für Autoantikörper insbesondere der Klasse IgG nicht. Die zentralen und peripheren Toleranzmechanismen sollten sie verhindern (s. 1.2.2 und 0). Jedoch sind bis zu 10 bis 20 Prozent der reifen B-Zellen autoreaktiv [42]. Diese sollten in der Lage sein, im Blut nachweisbare Autoantikörper zu synthetisieren.

4.3.1 Entstehung der Autoantikörper

Giltiy et al. untersuchten näher, wie sich B-Zellen differenzieren und so zur Produktion von Autoantikörpern angeregt werden können. Selektionsmechanismen unreifer B-Zellen im Knochenmark und die periphere Selektion naiver B-Zellen in sekundären Lymphorganen wurden betrachtet. Die Anteile autoreaktiver B-Zellen in jedem Menschen sinken von circa 75 Prozent unreifer B-Zellen im Knochenmark bis auf fünf Prozent bei naiven folliculären B-Zellen in sekundären Lymphorganen. Interessanterweise sind wieder bis zu 25 Prozent der Gedächtnis-B-Zellen, die sich aus naiven B-Zellen entwickeln, autoreaktiv [42]. Bei Autoimmunpatienten sind die Anteile höher. Den in Gesunden zahlreichen und scheinbar inaktiven und darum harmlosen autoreaktiven B-Zellen steht

die wichtige Rolle der B-Zellen in Autoimmunerkrankungen gegenüber, die durch die erfolgreiche Therapie einer B-Zell-Depletion deutlich wird. Giltiy et al. interessierten sich vor allem für die Entstehung von Autoantikörpern der Klasse G. Diese werden bei den meisten Autoimmunerkrankungen als Teil der Pathogenese betrachtet und kennzeichnen sich durch stattgehabte somatische Mutationen, die zur Erkennung definierter Autoantigene führen.

Um sich in antikörperproduzierende Gedächtnis-B-Zellen oder langlebige Plasmazellen zu differenzieren, werden B-Zellen nach traditionellem Verständnis im Keimzentrum eines Lymphfollikels in Anwesenheit entsprechender Antigene aktiviert. Hierbei spielt die Co-Stimulation durch Antigenpräsentierende Zellen (APC) und T-Helferzellen eine entscheidende Rolle. Auch diese müssen die betreffenden Antigene auf ihre Weise erkennen und durch sie aktiviert werden. Follikuläre dendritische Zellen nutzen zum Beispiel Toll-like Rezeptoren, welche sogenannte Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMPs) erkennen, zu denen man Autoantigene nicht rechnet. Mit der Differenzierung der naiven B-Zellen zu Antikörper produzierenden Zellen wird die Antigenspezifität durch die somatische Hypermutation der Gensequenzen für die Antigen-erkennenden Abschnitte des Antikörpers erhöht. Abhängig von weiteren stimulierenden Faktoren erfolgt ein Klassenwechsel der Antikörper, zum Beispiel von IgM zu IgG. B-Zellen ohne antigenspezifische oder mit autoreaktiven B-Zellrezeptoren, auch infolge der somatischen Hypermutation, würden nicht stimuliert werden und Apoptose einleiten. Letzteres stellt einen wichtigen Selektionsmechanismus zur Vermeidung von nutzlosen oder autoaggressiven B-Zellpopulationen dar [42].

Doch auch autoreaktiven B-Zellen gelingt es, in langlebige Zellen auszudifferenzieren, wie in Patienten mit Autoimmunerkrankungen festzustellen ist. Dazu bedarf es der Co-Stimulation, die durch den B-Zell aktivierenden Faktor BAFF erfolgt. Günstig scheint für autoreaktive B-Zellen im Wettbewerb mit anderen B-Zellen um BAFF eine B-Zell Lymphopenie oder eine Entzündung mit erhöhter BAFF Synthese zu sein [43]. Auch die Beteiligung autoreaktiver T-Zellen, die ihrerseits Selektionsmechanismen ausgesetzt sind (s. Kapitel 1.2.4 und 1.2.4), bietet wichtige Stimuli. Überraschenderweise kann das angeborene Immunsystem ohne die Beteiligung autoreaktiver T-Helferzellen autoreaktive naive B-Zellen aktivieren. Die gesteigerte Expression von TLR7 und 9 führt bereits zur verstärkten Bildung autoreaktiver B-Zellen. Und aktivierte TLR9- und B-Zell-Rezeptorsignalwege stimulieren normale B-Zellen gemeinsam intrinsisch, ohne Beteiligung dendritischer Zellen, und regen sie zum Klassenwechsel und zur somatischen Hypermutation ihrer B-Zellrezeptoren an. Wahrscheinlich können TLR-Signalwege dabei ebenso durch körpereigene Antigene induziert werden und autoreaktive B-Zellen

aktivieren. Ein Defekt der TLR-Signalwege führt übrigens zu gesteigerten Mengen autoreaktiver B-Zellen in der Peripherie, verhindert jedoch auch die Ausdifferenzierung und somit die Produktion von Autoantikörpern. Weiterhin sind auch Neutrophile Granulozyten fähig, in die perifollikuläre Zone der Milz einzuwandern und dort T-Zell unabhängig die B-Zellen in gleicher Weise zu aktivieren. Dabei vermutet man, dass die sogenannten NETs (Neutrophil Extracellular Traps) eine wichtige Rolle spielen [42]. Da diese hauptsächlich aus DNA und weiteren nukleären Antigenen bestehen, könnten sie entsprechend der Theorie von C. Janeway Jr. als (körpereigene) Liganden der TLR-Signalwege fungieren, wobei normalerweise die zentrale B-Zell-Rezeptorselektion unterstützt würde [54]. Möglicherweise werden auf diese Weise peripher auch Autoantikörper induziert. Eine Population bestimmter B-Zellen, die in der roten Pulpa der Milz vorkommen, kann ebenfalls lediglich durch Antigenkontakt aktiviert werden und zu antikörperproduzierenden Zellen differenzieren. Sie stellen eine weitere Quelle von Autoantikörpern dar [42].

Wie bereits in 1.2.2 beschrieben, gelangen autoreaktive B-Zellen aus dem Knochenmark in die Peripherie. Dies geschieht insbesondere dann, wenn niedrig averse B-Zell Rezeptoren die B-Zelle bei Autoantigenkontakt nicht aktivieren konnte. Normalerweise werden diese B-Zellen auch in der Peripherie nicht aktiviert. Hierzu tragen bestimmte Enzyme bei, die durch aktivierte B-Zell-Rezeptoren rekrutiert werden und dort die Aktivierungsschwelle der B-Zellen anheben. Diese sind die Tyrosin-Phosphatase SHP1 und die Lipid Phosphatase SHIP. Bei Defekt eines dieser Enzyme wurde beobachtet, dass spontan Autoantikörper produziert werden. Ebenso spielt die Genregulation autoreaktiver B-Zellen eine besondere Rolle. Autoreaktive B-Zell Rezeptoren können die Synthese von CD-5 Zelloberflächen Proteinen induzieren, sodass diese wiederum SHP1 rekrutieren [43].

Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass die Erkennung körpereigener Strukturen durch das Milieu und die Interaktion diverser Immunzellen geleistet wird und nicht durch die Molekülstruktur der Autoantigene. Darum können nur jene autoreaktiven B-Zellen eliminiert werden, die sich durch ihre Aktivierung im Milieu des „pathogen-freien“ Knochenmarks bemerkbar machen. Die in der Peripherie ständig ankommenden autoreaktiven B-Zellen sind durchaus sogar ohne Beteiligung weiterer Zellen in der Lage, aktiviert zu werden. Während die Produktion von Autoantikörpern pathophysiologisch erklärbar ist, kann der Ausbruch einer Autoimmunerkrankung damit nicht begründet werden.

Die zeitlich stabilen ANA-Titer, die in Gesunden beobachtet wurden (s. 4.4.3), suggerieren, dass in Gesunden langlebige antikörperproduzierende Zellen existieren

könnten, die stetig stabile Antikörpermengen freisetzen. Da kaum Krankheitsausbrüche festgestellt wurden, scheinen immunogene Stimuli, die einen Pool aus kurzlebigen antikörperproduzierenden Zellen aufrechterhalten, unwahrscheinlich oder ebenso zeitlich konstant. Die Relevanz langlebiger, ohne immunogene Stimuli antikörperproduzierende Zellen konnte auch in Patienten mit SLE oder Rheumatoider Arthritis beobachtet werden. Trotz der Depletion CD20-positiver B-Zellen durch Rituximab wurden bei ihnen kontinuierlich Autoantikörper gebildet [42]. Diese Depletion kurzlebiger B-Zellen bei gesunden Trägern von Autoantikörpern durchzuführen, um langlebige Zellen nachzuweisen, ist wegen der relevanten Nebenwirkungen nicht vertretbar.

4.3.2 Pathogenität der Autoantikörper

Es bleibt fraglich, welche Faktoren die Pathogenität steuern und ob Autoantikörper überhaupt Ursache oder immer Folge von Autoimmunerkrankungen sind. Grundsätzlich stimulieren Autoantikörper im Rahmen einer Immunantwort das Komplementsystem und die zelluläre Immunität über Opsonisierung des Zielantigens, um das betreffende Antigen zu beseitigen. Dies steht im Einklang mit den Schäden, die bei Autoimmunerkrankungen auftreten.

Die Strategien des Zielgewebes sind vielfältig, um die Toleranz zu erhalten. Sie betreffen zum Beispiel die Regulierung der Dichte oder Form der präsentierten Antigene, Ausschüttung von Botenstoffen und weitere Einflussfaktoren. Insbesondere die Veränderung des gesamten Zielantigens, über das detektierte Epitop hinaus, oder das Verschwinden des Antigens von der Zelloberfläche wird durch bindende Autoantikörper induziert [96].

Auch lässt sich die Immunität beispielsweise über Induktion verschiedener Subtypen von Antikörperrezeptoren an den Effektorzellen beeinflussen. Der Fc-gamma Rezeptor IIb (Fc γ RIIb) entfaltet als einziger der bekannten Rezeptorsubtypen anti-inflammatorische Wirkung und trägt somit zur Toleranz des Immunsystems bei [72]. Einer speziellen Fc-Glykosylierung von IVIG-Präparaten schreibt man zu, regulative Fc-gamma Rezeptoren auf Zellen der angeborenen Abwehr herauf zu regulieren und auf diese Weise einen Teil ihrer anti-entzündlichen Wirkung zu entfalten. Fehlen regulative Fc-gamma Rezeptoren, so wirkt sich dies positiv auf die Bildung von Autoantikörpern und Autoimmunerkrankungen aus [18].

Neue Evidenz bescheinigt nun, dass die Pathogenität von Antikörpern mit einfachen Modulationen ihrer Molekülstruktur durch das Glykosylierungsmuster steuerbar sei. Entscheidend sei, welcher Zucker am konservierten Kern des Heteroglykans, der an der konstanten Region jeder schweren Kette hängt, verknüpft wäre. Pro-inflammatorische

Wirkung konnte für wenig glykosylierte Antikörper gezeigt werden, während Galaktose und Sialinsäure eine anti-inflammatorische Wirkung ausübten [26]. Die pathogenen und ebenso physiologischen Eigenschaften von Autoantikörpern wären auch auf intrinsische, wahrscheinlich veränderbare Determinanten zurückzuführen und es ließe sich somit erklären, dass von einem zunächst harmlosen Autoantikörper durch wenige Modifikationen auf Seite der B- und Plasmazellen eine autoreaktive Entzündung hervorgerufen werden könne. Für die hier untersuchten ANAs könnte die Identifikation ihrer Glykosylierung die Theorie eines „anti-inflammatorischen“ Musters bestärken.

Welche Faktoren könnten eine Änderung der Glykosylierung hervorrufen? Im Zusammenhang mit der Pathogenese des SLE wäre denkbar, dass die gestörte Clearance des Apoptotischen Materials Ursache ist. Die relative „Insuffizienz“ der Autoantikörper in der Opsonisierung des Detritus könnte im Zusammenhang mit stetigen immunogenen Signalen durch den Detritus selbst dazu führen, proinflammatorische Faktoren wie die Galaktosylierung zu aktivieren, die eine gesteigerte Aktivität des Immunsystems zur Folge haben und die Clearance intensiviert. Die Ursache, die diesen „Schalter“ umlegt, könnte eine Autoimmunerkrankung auslösen.

4.3.3 Betrachtungen der Autoantikörpergenese von Gesunden und Patienten

Existiert also eine gemeinsame Basis von Autoantikörpern gesunder und erkrankter Menschen? Die bei Patienten retrospektiv festgestellte Ausweitung der Antikörperspezifitäten und -Titer der ANAs vor Ausbruch der Erkrankung deuten auf die Intensivierung einer vorhandenen B-Zellaktivität hin. Ebenso zeigte sich in dieser Arbeit, dass Gesunde die spezifischen Autoantikörper bilden, die bei SLE-Patienten viele Jahre vor Ausbruch der Erkrankung gefunden werden. Im Gegensatz dazu fanden sich signifikant seltener Autoantikörper, die mit Organschäden (anti-dsDNA) oder dem unmittelbar bevorstehenden Krankheitsausbruch (U1-nRNP, Sm) assoziiert sind (s. Tabelle 1 und Abbildung 8). Da die Prävalenz der Autoantikörper bei Gesunden (Titer 1:100) circa 140-mal höher ist als die vom SLE (s. Kapitel 1.3.1 und Tabelle 2), ergibt sich für pathogene Autoantikörper der Gedanke, ob neben einer gleichartigen Genese mit physiologischen Autoantikörpern Gesunder auch die unabhängige Entstehung möglich ist. Verschiedene Varianten sollen in drei Hypothesen veranschaulicht werden (siehe auch Abbildung 11):

1. Pathogene Autoantikörper differenzieren sich aus bestehenden B-Zellen, die zunächst in geringen Mengen oder mit niedriger Avidität (physiologische?) IgG ANAs produzieren. Im Rahmen einer Entzündung oder eines Defekts der Immunregulation mit erhöhtem Aufkommen von Zelldetritus reifen die B-Zellen aus und steigern unter anderem ihre

Aktivität oder Avidität, wodurch ANA-Fluoreszenzmuster mit steigenden Titern hervorgerufen werden. Ändern die B-Zellen die IgG-Subklasse oder Glykosylierung der Autoantikörper, könnten pathogene Autoantikörper entstehen [40].

Für SLE-Patienten wurden steigende Antikörpertiter bereits nachgewiesen (s. Kapitel 4.4.3). Kontinuierlich steigende ANA-Titer bis zum Ausbruch der Erkrankung könnten Ausdruck einer Ausreifung der ANA-synthetisierenden B-Zellen sein.

2. Es existieren physiologische Autoantikörper, die im Rahmen einer Entzündung andere B-Zellen aktivieren und somit eine Immunreaktion gegen weitere Antigene oder Epitope des entzündeten Gewebes induzieren, ähnlich einem epitope spreading [92]. Neben der Erhöhung der Antikörpermenge als Ursache steigender ANA-Titer könnten die physiologischen Autoantikörper auch nukleäre Antigene geringerer Dichte erkennen als die pathologischen, sodass letztere intensivere Fluoreszenzmuster hervorrufen.

Bei der Autoimmunerkrankung Pemphigus vulgaris mit den Autoantigenen Desmoglein (Dsg) 3 und 1 kann ein ähnlicher Effekt auftreten. Während in den Schleimhäuten mehr Dsg 3 exprimiert wird, liegt in der Haut der Anteil von Dsg 1 höher. Die Krankheit betrifft in der Regel zuerst die Schleimhäute, was mit der Synthese von Anti-Dsg 3 Antikörpern zusammenhängt. Durch die lokale Entzündung wird das Immunsystem gegen das dort seltenere Dsg 1 sensibilisiert, woraufhin auch an der Haut Läsionen entstehen [91]. Dieser Prozess kann durch eine konsequente anti-entzündliche Therapie mit Reduktion der Autoantikörperlevel unter die Nachweisgrenze und damit einhergehendem Verschwinden der Läsionen verhindert werden [83]. Dies unterstreicht die Relevanz eines entzündlichen Milieus. Eine ähnliche Situation könnte für nukleäre Antigene entstehen. Die normalerweise harmlosen ANAs könnten bei der Verarbeitung der nukleären Bestandteile durch Antigen-präsentierende Zellen wirksam werden und die Aktivierung weiterer autoreaktiver B-Zellen und möglicherweise auch T-Zellen unterstützen. In diesem Prozess entstehen neue ANAs, die durch ihre Genese in einer Abwehrreaktion oder über Besonderheiten der Zielantigene im Gegensatz zu den ersten ANAs pathogene Eigenschaften haben und zum Beispiel SLE auslösen.

3. Die pathogenen Autoantikörper entstehen ohne vorangehende Stimulation durch physiologische Autoantikörper de novo. Ein ubiquitär verbreitetes, immunogenes Autoantigen könnte wie bei einer Infektion die Entstehung hochtitriger, vielleicht sogar pathogener ANAs ermöglichen. Ein spezifischer Trigger wie eine virale Entzündung wäre erforderlich, eine zeitlich weit vorausgehende Nachweisbarkeit von ANAs mit niedrigem Titer hingegen nicht.

Einen Erklärungsansatz hierfür bieten die natürlichen Autoantikörper. Bekannt ist, dass diverse natürliche IgM Autoantikörper gebildet werden, die beispielsweise die Clearance und Maskierung apoptotischen Materials effektiv unterstützen [9]. – Einen ähnlichen Ansatz verfolgt die anti-D Prophylaxe bei Gebärenden mit Rhesus-Inkompatibilität. – Führt ein Prozess zu einer Imbalance mit Überwiegen des apoptotischen Materials, das diverse Antigene des Zellkerns enthält, könnte das adaptive Immunsystem damit in Kontakt geraten und eine Immunantwort induziert werden [69]. In der Pathogenese des SLE spielen gesteigerte Mengen apoptotischen Materials und eine beeinträchtigte Phagozytenaktivität tatsächlich eine wichtige Rolle (s. 1.3.2 und 4.5). In Kombination mit Methylierungsstörungen, die bei SLE Patienten beobachtet wurden, könnten größere Mengen von unmethylierter CpG-DNS, dem TLR9 stimulierenden Liganden, vorliegen und autoreaktive B-Zellen aktivieren. Für TLR7 konnte sogar gezeigt werden, dass er Säuger-Einzelstrang RNS erkennt [42].

Ob IgG ANAs, die vor Ausbruch einer Autoimmunerkrankung detektiert werden, eigentlich als physiologische Reaktion auf eine gestörte Phagozytenfunktion und der größeren Menge apoptotischen Materials gebildet werden, das sie opsonisieren sollen, wäre eine interessante Hypothese. Ebenso könnte es sich um natürliche Autoantikörper mit der gleichen Aufgabe handeln. Die Genese des SLE läge in beiden Fällen eher nicht bei den Antikörpern, sondern in der fehlerhaften Clearance des apoptotischen Materials.

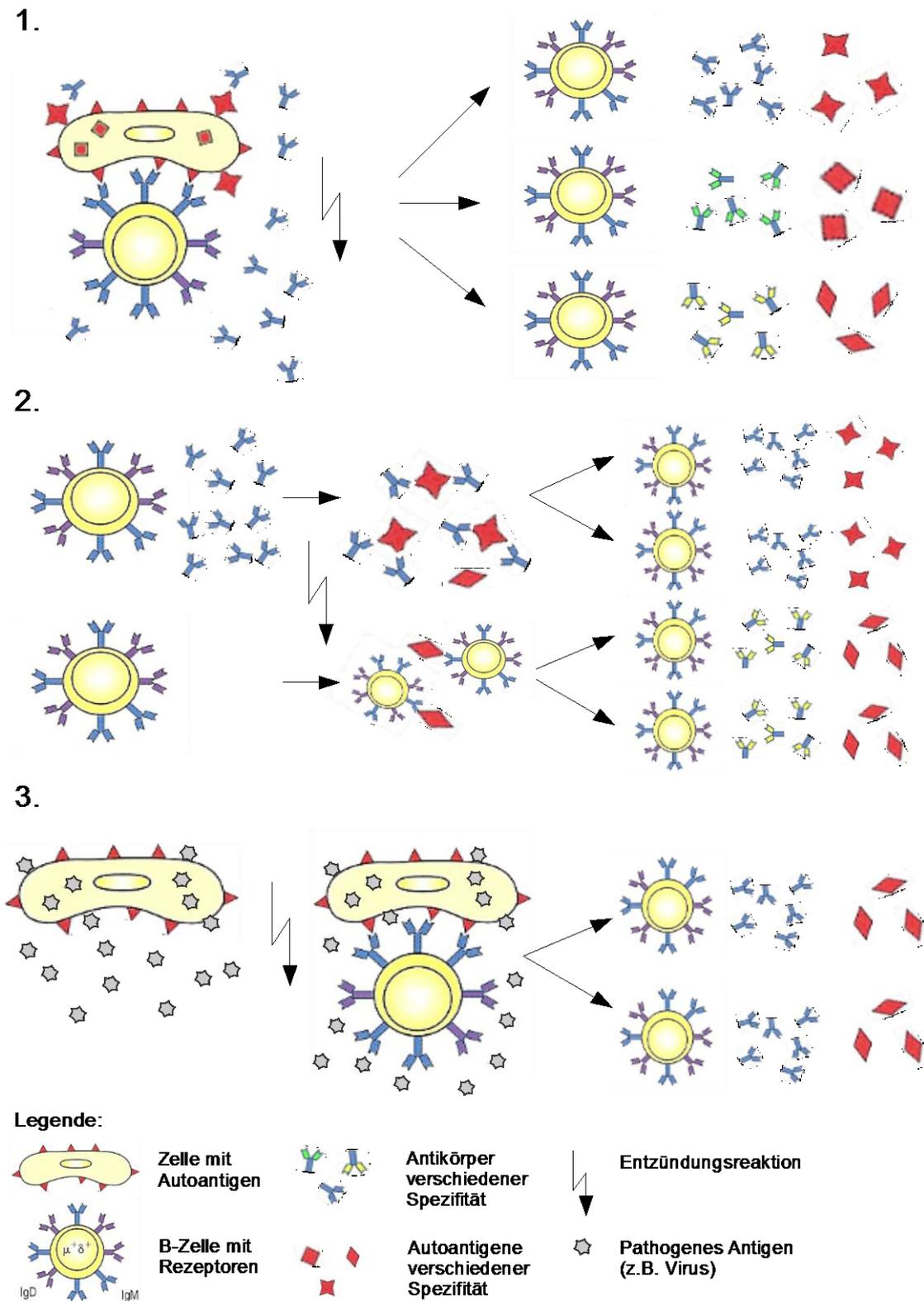


Abbildung 11: Hypothesenschema zur Entstehung von Autoantikörpern im Rahmen von Entzündungsreaktionen. 1. Aus einer bestehenden autoreaktiven B-Zellen differenzieren sich pathogene Autoantikörper. 2. Physiologische Autoantikörper aktivieren andere autoreaktive B-Zellen. 3. Pathogene Autoantikörper entstehen de novo während einer Infektion. Zell- und Molekülsymbole sind adaptiert von Janeway's immunobiology entnommen [66].

4.3.4 Natürliche Autoantikörper

ANAs und andere Autoantikörper könnten, wie bereits angedeutet, in gesunden Lebewesen physiologische Funktionen besitzen. Ob sie auch auf gleiche Weise entstehen wie bei Autoimmunpatienten gefundene Autoantikörper, ist nicht ausgeschlossen. Die Funktion von autoreaktiven B-Zellen physiologisch gebildeter Autoantikörper in der Homöostase des menschlichen Organismus spielt bei den Betrachtungen von Autoimmunerkrankungen bisher jedoch eine untergeordnete Rolle. Im Screening der 6454 Blutspender zeigten bei einer 1:100 Verdünnung bemerkenswerterweise fast 20 Prozent der Proben eine Immunfluoreszenz von IgG-Antikörpern auf HEp-20-10-Zellen. Den Einwand, es handele sich um unspezifische Antikörper, entkräften Erkenntnisse über variable Regionen der Ig-Ketten, die zeigten, dass im einzelnen Individuum nur wenige unreife, frühe naive und reife naive B-Zellen nach der negativen Selektion im Knochenmark polyreaktive Antikörper bildeten. Bei reifen naiven B-Zellen sind es circa 4,3 Prozent. Im Gegensatz dazu seien bis zu 20 Prozent der von reifen B-Zellen gebildeten Antikörper autoreaktiv im Test mit HEp-2-Zellen. Etwa ein Drittel reagieren mit nukleären Antigenen und zwei Drittel mit zytosolischen Antigenen[110] (s. a. 4.4.3). Sowohl im Querschnitt einer großen Population als auch im einzelnen Individuum ließen sich also Autoantikörper regelmäßig antreffen, welche mehrheitlich monospezifisch seien. Studien mit gesunden Probanden, die unter Verwendung von Microarrays mit bis zu 10.000 körpereigenen Antigenen auf IgG-Autoantikörper testen konnten und bei jedem untersuchten Individuum mindestens 300 verschiedene Reaktivitäten feststellten, suggerieren sogar eine vollständige Prävalenz von Autoantikörpern[68]. Diese Zahlen legen eine physiologische Funktion der Autoantikörper nahe, die beispielsweise im Abraum von Gewebe- und Zellschrott liegen könnte. Eine IIF-Untersuchung auf HEp-Zellen mit geringer Verdünnung, zum Beispiel 1:10, würde zutage führen, ob ANAs auch mit einer Methode der Routinediagnostik bei fast jedem Menschen zu finden wären. Es sollte beim Testen mit geringer Verdünnung auch eine Differenzierung in die bekannten Autoantikörperklassen erfolgen, um somit Rückschlüsse auf die Reifung der B-Zellen zu erlauben.

Ob die detektierten ANAs natürliche Autoantikörper oder induzierte Autoantikörper sind, ist nicht bekannt. Während natürliche Autoantikörper quasi als Ergebnis eines genetischen Programms synthetisiert würden, wären induzierte Autoantikörper die Folge einer klassischen Immunreaktion. Bestätigt wurde bereits, dass natürliche Antikörper auch als IgG Klasse existieren [10].

Zusammenfassend wäre anzunehmen, dass natürliche Autoantikörper bei Gesunden häufig auch als IgG und gelegentlich mit hohen Titern und spezifischen Zielantigenen

vorkämen. Induzierte Autoantikörper hingegen hätten Pathogenität und fänden sich bei jenen, die eine Autoimmunerkrankung entwickeln. Sie würden darum mit Fortschreiten der Autoimmunreaktionen häufig immer höhere Titer erreichen und hätten in der Regel spezifische Zielantigene, wie es mit den retrospektiven Studien der Autoimmunpatienten charakterisiert wurde (s.o.). Derzeit sind keine nutzbaren Merkmale für eine solche Unterscheidung der Antikörpermoleküle bekannt, zumal Autoantikörper bei Autoimmunerkrankungen, besonders im SLE, eine enge Beziehung zu natürlichen Autoantikörpern haben. So werden die Autoantikörper von Erkrankten zwar von ähnlichen Genen kodiert wie durch exogene Antigene induzierte Antikörper, diese Gene zeigten jedoch starke Homologien mit nicht mutierten V-Genen, wie sie für natürliche Autoantikörper typisch sind [9]. Vergleicht man hochspezifische und -avide natürliche anti-bakterielle Antikörper mit induzierten anti-bakteriellen Antikörpern, so unterscheiden sich die physikochemischen Eigenschaften beispielsweise nur marginal in der Hitzestabilität [12]. Bisher fehlen darum zur Unterscheidung natürlicher Autoantikörper von den nach einer Immunisierung gebildeten Autoantikörpern geeignete Methoden.

4.4 Herausforderung der klinischen Autoantikörperdiagnostik

Autoantikörper werden im klinischen Alltag wie in der etablierten Wissenschaft als zentrales Merkmal einer Autoimmunerkrankung verstanden und genutzt. Sie sind einfach nachweisbar und dienen darum nicht nur zur Differenzierung von klinisch aktiven Autoimmunerkrankungen, sondern werden bereits beim Verdacht als diagnostisches Instrument genutzt. In Folge werden zahlreiche Patienten, die an unspezifischen Symptomen leiden wie Abgeschlagenheit, einem Raynaud-Phänomen oder Gelenksbeschwerden, auf Autoantikörper getestet und bei positivem Befund den entsprechenden Fachärzten überwiesen. Dies sind in der Regel Rheumatologen, die alltäglich Patienten mit positivem Autoantikörpernachweis, aber ohne klinisch eindeutig aktive Autoimmunerkrankung sehen und differentialdiagnostisch beurteilen sollen. Wenn eine Autoimmunerkrankung durch das klinische Wissen nicht sicher ausgeschlossen werden kann, folgen aufwendige apparative Untersuchungen wie Röntgenaufnahmen oder Sonographien der Gelenke, Skelettszintigraphien oder Biopsien. Diese bringen teilweise ihr eigenes gesundheitliches Risiko mit sich, verursachen weitere Kosten und beunruhigen in die Patienten [39]. Ihr Nachteil ist weiterhin, dass mit ihnen in der Regel nur Veränderungen in bereits fortgeschrittenen Stadien einer Autoimmunerkrankung feststellbar sind. Die Verunsicherung über den Umgang mit positiven Antikörperbefunden wird weiterhin von wissenschaftlichen Artikeln gesteigert, welche für spezifische Autoantikörper und die assoziierten Erkrankungen positiv prädiktive Werte von teilweise 100 Prozent angeben [89]. Diese Werte rühren von der retrospektiven Analyse Erkrankter

her, in denen sich tatsächlich vor Ausbruch der Erkrankung immer Autoantikörper manifestierten. Diese Angaben sind für neue Patienten prospektiv nicht anwendbar und verwirrend [58]. Kritisch hinterfragt werden sollte infolgedessen immer dann, wenn Patienten sich am möglichen Übergang zu einer aktiven Autoimmunerkrankung befinden und bisher nur unspezifische Symptome äußern, aber von engmaschigen Kontrollen und frühzeitiger Therapie profitieren würden. Die Belastung für Menschen, bei denen fälschlich eine Autoimmunerkrankung diagnostiziert oder vermutet wird und die Gefahr, ihnen durch eine immunsuppressive Therapie erheblichen Schaden zuzufügen, muss im Gegenzug ausgeschlossen sein. Für diese schwierige Aufgabe muss die Serologie tiefergehend verstanden werden und letztendlich ein geeignetes und sicheres Auswahlinstrument gefunden werden.

4.4.1 Prädiktiver Wert antinukleärer Autoantikörper

Von der Prozentzahl ANA-positiver Blutproben (s. Tabelle 2) kann mit Bezug zur SLE-Diagnostik der positiv prädiktive Wert des Testsystems für die SLE-Diagnostik in der deutschen (blutspendenden) Bevölkerung abgeschätzt werden. Hat die Probe eines Deutschen eine SLE-typische Fluoreszenz auf HEp-2-Zellen mit einem Titer von mindestens 1:320 und die Vortestwahrscheinlichkeit der Gesamtbevölkerung, so beträgt der positiv prädiktive Wert dieses Testsystems zur SLE-Diagnostik für die deutsche Bevölkerung (ca. 80 Millionen Individuen) mit einer SLE-Lebenszeitprävalenz von circa 32 je 100.000 Einwohner [32] lediglich 1,0 Prozent. Hierbei wird angenommen, dass jeder SLE Patient positiv für SLE-typische ANA (s. 2.4.1) getestet wird. Da in der o. g. Studie den spezifischen Antikörpern ein hoher prädiktiver Wert beigemessen wurde, soll für diese ebenfalls beispielhaft gerechnet werden. Hochspezifisch für SLE ist der anti-dsDNA Autoantikörper. Für den dsDNA Nachweis im Euroline Immunoblot ergäbe sich mit o. g. epidemiologischen Zahlen rechnerisch ein positiv prädiktiver Wert von 50 Prozent, wenn jeder SLE Patient positiv für dsDNA-Antikörper getestet würde. Jedoch gilt zu bedenken, dass unter 6454 getesteten Blutspendern nur bei zweien ein dsDNA Nachweis gelang und nur ANA positive ohne nukleoläre Muster gezielt ausgewählt und untersucht wurden. In jüngerer Zeit konnte nachgewiesen werden, dass anti-dsDNA-Antikörper neben homogenen Mustern ebenso bei granulären und nukleolären Mustern gefunden werden [87]. Weiterhin muss bezüglich des gesundheitlichen Zustands auf die sorgfältige Arbeit der Blutspendezentralen und Blutspender selbst vertraut werden. Aber selbst die einzelnen rheumatischen klinischen Symptome (z.B. Raynaud-Phänomen: 3,6 % pro Jahr bei französischen Arbeitnehmern [79], Arthrose: über 40 % Lebenszeitrisiko [70], Chronische Fatigue (i. S. Müdigkeit): 4,3 % bei Eigenanamnese [76]) sind so häufig, dass sie wie der Autoantikörpernachweis bei Gesunden die Prävalenz der

Autoimmunerkrankungen weit übertreffen. Die Kombination klinischer Symptome mit dem Autoantikörpernachweis steigert selbstverständlich den positiv prädiktiven Wert. In einer Studie von Rantapää-Dahlqvist et al. wurde dies retrospektiv für rheumatoide Arthritis und anti-CCP Antikörper im Vergleich zu gesunden Kontrollen kalkuliert und der PPV von 16 auf 62 Prozent gesteigert [77]. Soto et al. analysierten Proben von Patienten, die von Kliniken gezielt für die ANA Diagnostik eingesendet wurden und stellten für ANA positive Individuen mit klinischen Symptomen positiv prädiktive Werte über 90 Prozent fest. Jedoch liegt die Sensitivität dann nur bei knapp über 50 Prozent. Können klinische Symptome oder ein positiver ANA-Test fehlen, steigt die Sensitivität auf fast 90 Prozent, der positiv prädiktive Wert jedoch sinkt auf immerhin 73 Prozent [94]. Als Voraussetzung für hohe positiv-prädiktive Werte des ANA Tests gilt, den Test auch tatsächlich nur in klinisch auffälligen Patienten anzuwenden. Ansonsten sinkt der PPV wieder auf das Niveau für die Normalbevölkerung und der Test liefert neben den entstehenden Ängsten des Patienten und den Kosten keinen Nutzen. Entsprechend müssen für jede Krankheit Kriterien zur Erhöhung der Prätest-Wahrscheinlichkeit ermittelt werden, um tatsächlich behandlungsbedürftige Patienten rechtzeitig zu identifizieren. Neben klinischen Kriterien könnten hier auch genetische Marker hinzugezogen werden (s. Genetik) [88]. Weiterhin ist es zusätzlich zum akademischen Interesse sowohl gesundheitlich als auch ökonomisch bedeutsam, die pathophysiologische Brücke von Autoantikörpern und Entstehung der Autoimmunerkrankungen zu schlagen und so ihr Auftreten im gesunden Menschen grundlegend zu verstehen und künftig prognostisch richtig deuten zu können.

4.4.2 Pathognomonische Fluoreszenzmuster für Gesunde

Für die Diagnostik systemischer rheumatischer Erkrankungen mit der indirekten Immunfluoreszenztechnik auf HEp-2-Zellen werden aus eben genannten Gründen die Leitlinien zur Qualitätssicherung laufend weiterentwickelt. Dazu zählen neben der Angabe der ANA-Positivität die Bestimmung des ANA-Titers und die standardisierte Beschreibung des gesehenen Musters. Für dieses ist etabliert, dass die Fluoreszenzmuster Assoziationen mit bestimmten Krankheiten zeigen [2]. Bei der Untersuchung gesunder Blutspender fiel in jüngerer Zeit ein ANA-Fluoreszenzmuster der HEp-2-Zellen auf, welches anscheinend mit hoher Spezifität bei Gesunden beziehungsweise Patienten ohne Autoimmunphänomene vorkommt [64]. Dieses „nuclear dense fine speckled“ genannte Muster, welches das Zielantigen DFS-70 hat, zeigt somit, dass die differentielle Beschreibung der Muster einen wichtigen diagnostischen Wert zum Ausschluss einer systemischen Autoimmunerkrankung haben kann. Tatsächlich fanden sich in dieser Arbeit bei 8,6 Prozent der Blutspender dieses Muster im Screening und somit hatten fast die Hälfte aller Blutspender mit Fluoreszenz der HEp-2-Zellen (17,72 Prozent) dieses Muster.

Die mit SLE assoziierten Muster (7,3 Prozent) waren in der Summe seltener als das „nuclear dense fine speckled“ Muster. Problematisch ist, dass ähnliche Muster (nukleär feingranulär, „quasi-homogen“) oder die Überlagerung verschiedener Muster, was in SLE-Patienten nicht untypisch ist, zu Fehlinterpretationen führen kann [27, 39]. Auch in dieser Arbeit wurden in der Validierung 14 Proben als „nuclear dense fine speckled“ beschrieben, von denen zunächst granuläre (n = 4) oder homogene (n = 6) und nur in drei Fällen wegen der Granulation, aber sehr hoher Intensität fraglich homogene Muster angenommen wurden. Dies lag an der Fluoreszenz der Zellkerne im Lebergewebe, die in den 24 bereits im Screening als „nuclear dense fine speckled“ identifizierten Proben fehlten. Weiterhin erreicht das Muster „nuclear dense fine speckled“ teilweise hohe Titer in Gesunden [64], wie auch in der hier vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnte (maximal 1:10.000). Da empfohlen wird, einen ANA in der Krankheitsdiagnostik als positiv zu bewerten, wenn er einen Titer über der 95er Perzentile der gesunden Bevölkerung erreicht [2], ergibt sich hieraus die wichtige Aufgabe, die Bedeutung dieses Musters zu klären. Der Vorschlag, in der ANA-Diagnostik anti-DFS-70 Antikörper nachzuweisen [62], erscheint diskutabel, da eine große Diskrepanz zwischen der Häufigkeit dieses ANA-Musters und dem spezifischen Antigennachweis beschrieben wurde [16]. Dass ANAs unter Ausschluss dieses Musters krankheitsspezifisch sind, kann bei positiv prädiktiven Werten um einen Prozent ebenso nicht angenommen werden (s. o.). Der Hinweis auf ein für Autoimmunerkrankungen untypisches Muster und dessen klinische Relevanz erscheint jedoch wichtig. Pathognomonisch für Gesundheit ist das Muster keinesfalls, da beispielsweise virale Infektionen nicht untersucht wurden, wie Mariz et al. feststellten [64]. Ein Einfluss subklinischer Viruserkrankungen oder Autoimmunphänomene auf ANAs ließe sich von Infekt-Assoziierten transienten ANAs ableiten, sofern diese nicht durch eine antibakterielle, -mykotische oder -virale Chemotherapie beziehungsweise symptomatische Arzneimitteltherapie bedingt sind. Bestätigt wird, dass der Autoantikörper sich wie die o.g. apparative Diagnostik entsprechend eines Surrogatmarkers per se nicht zur Prognose der Manifestation einer Autoimmunerkrankung eignet.

4.4.3 Zeitlicher Verlauf der ANA-Titer

In den aktuellen Empfehlungen wird die Kontrolle des ANA-Titers nicht zur Beobachtung des Krankheitsverlaufs empfohlen [2]. Wie bereits besprochen, zeigt der Titer durchaus Assoziationen mit dem Verlauf einer Autoimmunerkrankung. Arbuckle et al. arbeiteten zum Beispiel mit zwei vordiagnostischen Blutproben, die mehr als sechs Monate und weniger als sechs Monate vor Diagnose der Autoimmunkrankheit abgenommen wurden. Sie fanden dabei einen signifikanten Titeranstieg der anti-dsDNA Antikörper mit dem Beginn der Erkrankung [5]. Anders lautende Ergebnisse liefern prospektiv erhobene

Daten von Gesunden oder Patienten mit nicht ANA-assoziierten Erkrankungen. Unter 54 ANA-positiven Rosacea-Patienten und zwei ANA-positiven Kontrollprobanden veränderten sich mit Beobachtungszeitpunkten nach sechs Monaten sowie zwei Jahren die ANA-Titer um höchstens eine Stufe, was innerhalb der zu erwartenden Abweichung dieser Methode liegt (s. o.). Keiner der Beobachteten Probanden entwickelte eine Autoimmunerkrankung [113]. In dieser und weiteren prospektiven Studien mit gesunden Probanden [67, 111] wurde gezeigt, dass die Titer mehrheitlich zeitlich stabil sind und bei Gesunden äußerst selten Krankheitsausbrüche beobachtet wurden und die Beobachtung der Titer tatsächlich sinnlos erscheint.

4.5 Autoantikörper in der Pathogenese des Systemischen Lupus Erythematodes

Autoantikörper spielen eine wichtige Rolle beim SLE. Humane Seren mit Autoantikörpern von SLE-Patienten besitzen Pathogenität und können in Mäusen Glomerulonephritis und Arthritis auslösen. Somit erfüllen sie das erste Witebsky Kriterium für das Vorliegen einer Autoimmunerkrankung [80, 112]. In einer Studie von Rosetti et al. wurde dies in Mäusen, welche FcγRIIA und FcγRIIIB auf Neutrophilen exprimieren, gezeigt. Für die Arthritis war unabdingbar, dass das CD18 Integrin Mac-1 fehlte. Dieses scheint zur Clearance von Immunkomplexen und insbesondere bei der Regulation der Neutrophilen benötigt zu werden und schützt vor Organschäden [81]. Silverman et al. untersuchten Autoantikörperprofile von Zwillingen, die einzeln oder beide an SLE erkrankt waren. Interessanterweise stellten sie fest, dass bei fast allen Patienten erhöhte Konzentrationen von IgM zu finden waren, die sich gegen Antigene apoptotischer Zellen richteten. Im Speziellen waren dies die veränderten Phospholipide OxLDL und MDA-LDL sowie DNA-Antigene [90]. In Mausexperimenten zeigte sich, dass applizierte apoptotische Zellen durch eine immunogene Wirkung zur verstärkten Bildung solcher Antikörper führen. In SLE-Patienten vermutet man daher, dass die mangelnde Beseitigung und resultierend gesteigerten Mengen apoptotischer Zellen die oben genannten erhöhten IgM Konzentrationen auslösen [24]. Dass die gesteigerte Synthese der anti-OxLDL, -MDA-LDL Antikörper, sowie gegen DNA-Antigene gerichteter Antikörper eine physiologische Reaktion zum Beseitigen des Detritus darstellen und somit eine protektive Funktion haben, konnte beobachtet werden [45]. Wie es trotzdem zur Entzündung kommen kann, ergibt sich teilweise aus den folgenden Erkenntnissen: Bei der Untersuchung apoptotischer Zellen beobachteten Casciola-Rosen *et al.*, dass DNA- und RNA-Antigene gemeinsam auf Apoptosekörperchen auftauchen [22]. Zu RNA-Antigenen zählen unter anderem die Antigene Ro60 (SS-A) und La (SS-B), die man auf den apoptotischen Zellen fand [65]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass anti-Ro IgG die effektive

Phagozytose apoptotischer Herzzellen stören und über TNF-Sekretion von Makrophagen eine Entzündung hervorrufen können [25]. Ein weiterer Effekt sei, dass diese anti-Ro IgG die Bindung von IgM an DNA-Antigene auf der apoptotischen Zelloberfläche sterisch verhinderten und damit zusätzlich die zügige Phagozytose störten. Die apoptotischen Zellen akkumulierten trotz der gebildeten protektiven IgM und wirken ebenso inflammatorisch [90]. In der Konsequenz stellen die Anti-Ro60 und -La Autoantikörper einen möglichen Faktor der SLE-Manifestation dar. Übereinstimmend mit dieser Annahme lassen sich Anti-SS-A und SS-B Antikörper bereits Jahre vor dem Ausbruch des SLE in vielen Patienten nachweisen, wie von Arbuckle et al. beschrieben [6]. Warum es jedoch zur Bildung dieser Anti-SS-A und -SS-B IgG kommt, bleibt unklar. Auffällig ist, dass in der hier vorliegenden Arbeit SS-A und SS-B Autoantikörper (IgG) sehr häufig in gesunden Individuen gefunden werden konnten. Ob diese von B-Zellen abstammen, welche ursprünglich natürliche IgM bildeten oder durch pathogene Stimuli entstanden und darunter anschließend auch einen Klassenwechsel vollzogen, ist nicht beschrieben. Silverman et al. vermuteten aufgrund ihrer identifizierten Antikörper-Muster der SLE Patienten jedoch einen starken genetischen Einfluss auf die Auswahl der Zielantigene von Autoantikörpern [90]. Die gezeigten Eigenschaften von anti-SS-A- und -SS-B-IgG könnten auch andere Autoantikörper der IgG Fraktion vorweisen. Autoantikörper der IgM Fraktion sowie polyspezifische Autoantikörper vom IgG Subtyp werden anscheinend in jedem Menschen gebildet, nicht jedoch monospezifische Autoantikörper der Klasse IgG [10]. Es ist denkbar, dass im Rahmen eines Entzündungsprozesses, zum Beispiel einer Infektion, die polyspezifischen IgG ausreifen und monospezifisch mit bestimmten Autoantigenen reagieren. Je nach Zielantigen stören diese die physiologische Aufgabe der gebildeten (natürlichen) IgM Autoantikörper weniger oder mehr. Dies bleibt entweder folgenlos oder löst Autoimmunphänomene und sogar Erkrankungen aus, wie oben für anti-Ro60 IgG beschrieben.

Autoreaktive B-Zellen können nicht nur durch CD4⁺-T-Zellen mit aktivierten T-Zell-Rezeptoren in Keimzentren stimuliert werden, sondern auch über ihre membranständigen Autoantikörper (B-Zellrezeptoren), die die zelleigenen Toll-like Rezeptoren (TLR) mit eingeschleusten Autoantigenen in Kontakt bringen. Dies konnte zum Beispiel mit Säuger-Doppelstrang-DNS gezeigt werden, die über den B-Zellrezeptor in das TLR9 enthaltene Kompartiment eingeschleust wurde und so die B-Zelle aktivierte. Ähnliche Effekte konnten mit weiteren TLRs und Autoantigenen erzeugt werden, wobei man vermutet, dass eine verringerte Expression der TLRs in B-Zellen eine unbeabsichtigte Aktivierung derer verhindern soll [44]. Möglicherweise schlägt die Regulation der endogenen B-Zell-Aktivierung durch TLRs bei Autoimmunerkrankungen fehl und erklärt unter anderem den

Therapieerfolg, wenn beispielsweise durch Rituximab selektiv die B-Zellen unterdrückt werden.

4.6 Genetik

Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit stellt der genetische Vergleich *gesunder* Kohorten zur Untersuchung einer Erkrankung ein neues Konzept dar. Gerade weil erneut gezeigt werden konnte, dass Autoantikörper in Gesunden viel häufiger vorkommen als die Prävalenz der Krankheit vermuten ließe, sind genauere Untersuchungen dieser Gesunden notwendig.

4.6.1 Frauen sind häufiger ANA positiv

Die hier erhobenen Daten zeigten epidemiologische Parallelen von Autoimmunerkrankungen und Autoantikörperbildung. Anhand der genotypischen Daten konnte das Geschlecht aller genetisch untersuchten Proben ermittelt werden. Der Anteil männlicher Proben in der Kontrollgruppe war höher (67,8 %) und deutet auf eine höhere Anzahl blutspendender Männer hin. Bei ANA-Positiven war im Vergleich zu männlichen Spendern der Anteil der Frauen mit einer OR von 2,7 ($p = 3,2E^{-06}$) jedoch wesentlich höher. Dies entspricht dem in vielen Studien beobachteten höheren Anteil weiblicher Autoimmunpatienten [78] und stimmt ebenso mit einer Studie von Li et al. überein, die bei Gesunden mit positivem ANA-Befund einen wesentlich höheren Anteil weiblicher Individuen fanden [59]. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Synthese von IgG Autoantikörpern und Autoimmunerkrankungen tatsächlich pathophysiologische Elemente teilen. Da jedoch die Prävalenz der untersuchten ANAs (Titer 1:320) über 114 mal höher liegt als die des systemischen Lupus erythematoses, sind weitere Faktoren speziell für die Krankheitsentstehung zu erwarten. Im Sinne der Protoonkogene und Tumorsuppressorgene aus der Onkologie könnten dies „Proto-Autoimmun“- und „Autoimmunsuppressor-Gene“ sein, welche die Autoantikörper-Signalverarbeitung durch Leukozyten polygenetisch kontrollieren.

4.6.2 Single Nucleotide Polymorphism imm_6_138173816 (rs58905141)

Der SNP imm_6_138173816 befindet sich nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und kann trotz des signifikanten p-Werts nur unter Vorbehalt mit der ANA_{SLE}-Positivität assoziiert werden. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht basiert auf der definierten Verteilung aller Minor- und Majorallele unter Homo- und Heterozygoten in einer idealen Population. Da nur 119 Fallproben in die Studie einbezogen wurden, kann nicht von einer idealen Population ausgegangen werden, sodass eine Abweichung von der Allelverteilung als mögliches Ergebnis erwartet werden muss.

Für den in Abbildung 10 abgebildeten SNP wurden vier Fall- und drei Kontrollproben (siehe hellere Bereiche) als unbekannt klassifiziert. Es fällt auf, dass im Bereich der Homozygoten für Allel A (rosa unterlegt) die grünen Punkte in zwei Wolken getrennt vorliegen. Angenommen, dass die grüne Wolke mit höherer B-Intensität eigentlich heterozygote Individuen mit mangelhafter B-Allel-Replikation umfasst, wären die gefundenen Daten wesentlich näher an der Hardy-Weinberg-Verteilung. Klarheit würde die erneute Replikation dieses SNPs in der gleichen Kohorte bringen. Aufgrund der signifikant höheren MAF bei ANA_{SLE}-positiven und der bekannten Assoziation des SNP mit SLE soll die Rolle des benachbarten TNFAIP3 Gens für Autoimmunerkrankungen im nächsten Kapitel näher betrachtet werden.

4.6.3 TNFAIP3

TNFAIP3 (Tumornekrosefaktor alpha induziertes Protein 3) stellt gemeinsam mit dem benachbarten Gen OLIG3 (Oligodendrozytentranskriptionsfaktor 3) das am häufigsten identifizierte Risikogen von Autoimmunerkrankungen dar [75]. TNFAIP3 ist auch bekannt unter der Bezeichnung A20 und wird durch Tumornekrosefaktor und Interleukin 1 induziert. TNFAIP3 kodiert ein Zink-Finger Protein und inhibiert sowohl die Expression von NF-kappa B [48, 93, 100] als auch die TNF-induzierte Apoptose [56, 101, 104]. Somit stellt es einen zentralen negativ regulierenden Faktor der TNF-induzierten Stress- und Entzündungsreaktionen sowie des programmierten Zelltodes, als auch der NF-kappa B Aktivität dar [103].

Die Rolle von TNFAIP3 in B-Zellen und anderen Zellen ist hoch suggestiv für den Einfluss auf die Entwicklung einer Autoimmunerkrankung [1, 60]. NFkB liegt in Zellkernen von B-Zellen konstitutiv vor. Eine veränderte Regulation von TNFAIP3 könnte durch Inhibierung der NFkB Funktion eine reduzierte Apoptosebereitschaft der B-Zellen hervorrufen und somit die Rate autoaggressiver B-Zellen steigern.

Auf der anderen Seite könnte der direkte Einfluss auf die Apoptose und Entzündungsreaktion das Gleichgewicht stören, welches zwischen Menge des apoptotischen Materials und dessen Clearance besteht, wie es bei SLE Patienten beobachtet wird (s. Kapitel 4.5).

Bezogen auf das in der vorliegenden Arbeit verwendete Studiendesign ergibt sich der Hinweis, dass durch dieses Gen insbesondere die ANA Synthese beeinflusst wird. ANA könnten den Abraum des apoptotischen Materials durch Opsonisierung unterstützen. Dann wären ANA nicht primäre Ursache einer Autoimmunerkrankung, sondern Folge einer Dysbalance der Apoptose-Homöostase.

Letztendlich kann durch den identifizierten SNP in der Nähe des TNFAIP Gens keine Aussage getroffen werden, ob das Gen in seiner Funktion beeinflusst wird und ob es dann eine negative oder positive Regulation zur Folge hat. Aber die Vermutung liegt nahe, dass die Ausbildung von antinukleären Autoantikörpern und vom systemischen Lupus erythematoses gemeinsame Mechanismen teilen könnten.

4.7 Grenzen des Experimentaldesigns

4.7.1 Anonymität der Probanden

Die vorliegende Arbeit basiert auf der Annahme, dass die untersuchten, anonymen Blutspender gesund sind. Die dafür notwendige ärztliche Beurteilung ist durch die Paragraphen 12 und 18 des Transfusionsgesetzes geregelt. Als mögliche Auslöser für ANAs werden die Einnahme bestimmter Medikamente oder auch Infektionen angenommen. Für Medikamente gilt, dass mindestens fünf Halbwertszeiten seit der letzten Einnahme vergangen sein müssen, bei teratogenen Medikamenten sogar 28 Halbwertszeiten [95]. Bei Infektionen gelten erregersabhängige Karenzzeiten, die auch lebenslanglich sein können [19]. Medikamenten- oder infektions-induzierte ANAs sollten somit einen geringen Einfluss auf die gefundene Prävalenz haben. In einer großen Studie aus den Niederlanden wurde festgestellt, dass Blutspender im Vergleich zur Normalbevölkerung signifikant bessere Gesundheitskriterien erfüllen. Dazu zählen beispielsweise Gewicht, Rauchen, Alkoholkonsum und Dauer der körperlichen Aktivität pro Woche [8]. Trotzdem können Autoimmunerkrankungen aufgrund ihrer mitunter unspezifischen Symptomatik unerkannt und für einen Teil der ANA-Prävalenz unter „Gesunden“ verantwortlich sein [109]. Etwa fünf (exklusive Rheumatoide Arthritis und Autoimmunthyreoiditis [29]) bis 5.29% Prozent [32] der Gesamtbevölkerung westlicher Staaten sind von Autoimmunerkrankungen betroffen. Geht man davon aus, dass die Morbidität der Betroffenen sehr unterschiedlich ist, könnten einige mit schwach oder unspezifisch ausgeprägter Klinik durch die Gesundheitsuntersuchung vor der Blutspende unentdeckt bleiben und in der Kohorte der Blutspender enthalten sein. Außerdem gehören ANAs zur Diagnostik oder zu typischen Phänomenen verschiedenster Autoimmunerkrankungen. So lassen sich neben den typischen rheumatischen Erkrankungen auch bei etwa einem Drittel der Patienten mit Autoimmunthyreoiditis ANAs nachweisen [99]. Da die gefundenen ANA Häufigkeiten jedoch denen aus Studien mit nicht anonymen gesunden Probanden kleinerer Kohorten ähneln, dürfte der Bias zu vernachlässigen sein.

Auch das Alter der einzelnen Probanden ist nicht bekannt. Anhand der anonymen Statistik der Blutspendezentralen lag das Alter der Blutspende im Sammelzeitraum zwischen 18 und 70 Jahren (Mittelwert $39,9 \pm 14,3$ Jahre). Studien zeigten jedoch, dass ein Einfluss des Alters auf die Bildung von ANAs weder sicher angenommen noch ausgeschlossen werden kann [59, 85].

4.7.2 Validität der indirekten Immunfluoreszenz

Aufgrund der subjektiven Auswertung ist die Angabe der ANA-Titer mit indirekter Immunfluoreszenztechnik Fehlerquellen ausgesetzt. In der Literatur werden ANAs mit Titern ab 1:320 [36] oder 1:160 [17] als pathologisch betrachtet. Eine weitere Differentialdiagnostik wird derzeit für Titer ab 1:160 empfohlen [2]. Die korrekt angegebene Höhe des Antikörpertiters mittels indirekter Immunfluoreszenz liefert für diese Arbeit die Sicherheit, ANA_{SLE}-Proben für die GWAS ausgewählt zu haben, die mit einem Titer von 1:320 auch den Kriterien für eine Autoimmundiagnostik genügen würden. Tan et al. haben für eine ähnliche Fragestellung 120 Proben normaler Blutspender in drei Aliquots aufgeteilt. Jeweils zwei wurden von demselben Labor und ein drittes von einem weiteren Labor mittels IIF auf ANAs untersucht und die ermittelten ANA-Fluoreszenzintensitäten (Bewertungsskala 0-1-2-3-4) verglichen. Die Beurteilung der Intensitäten und Muster unterschied sich nur geringfügig und interinstitutionell am meisten. Der Variationskoeffizient der Messungen betrug innerhalb desselben Labors zwischen 16,5 und 12,2 Prozent und ist abhängig von der Verdünnung (Verdünnungsstufen 1:40, 1:80, 1:160, 1:320,). Die Abweichungen zwischen verschiedenen Laboren ist insgesamt etwa dreimal größer und bei 1:40 Verdünnung signifikant höher (50,7 %) als bei Verdünnung mit 1:320 (36,0 %). Die Abweichung bei 1:80 Verdünnung betrug 44,3 Prozent. Innerhalb eines Labors bestanden keine signifikanten Unterschiede der Abweichungen zwischen Titerstufen [98]. Die Daten aus Tabelle 2 wurden durch vier separate Verdünnungsansätze generiert. Dies erfolgte bei Verdünnung mit 1:100 im Screening und bei Verdünnungen mit 1:10, 1:100 und 1:1000 in der folgenden Validierung. In der Validierung wurden weiterhin in jeder Verdünnungsstufe derselben Probe vier Bewertungskategorien für die Intensitäten genutzt (siehe 2.5.1). Skaliert betrachtet könnten diese mit Werten von 0, 1, 2 und 3 versehen werden. Für das Muster „granuläres Nukleoplasma“ ergab sich bei einer Verdünnung von 1:100 eine mittlere Intensität von 1,1. Bei einem angenommenen Variationskoeffizienten von 44,3 Prozent wäre mit einem Standardfehler von 0,5 zu rechnen. Dies entspricht dem Sprung um eine halbe Intensitätsstufe, sodass in der Praxis maximal eine ganze Titerstufe Abweichung zu erwarten ist. Mit dem Grenztiter von 1:320 zur Auswahl für die GWAS könnten Proben mit einem wirklichen ANA Titer von 1:100 einbezogen worden sein. Doch

auch dieser Titer wird in der Praxis noch als nicht-normwertig angesehen. Für die Angabe der Prävalenzen (s. Tabelle 2) ist hingegen nur von geringen Abweichungen auszugehen, da sich zufällige Messabweichungen bei 6454 untersuchten Proben im Screening und 469 Proben in der Validierung ausgleichen, sodass den Konfidenzintervallen getraut werden kann.

4.7.3 Avidität der detektierten antinukleären Autoantikörper

Ein weiteres Einflusskriterium für den ermittelten Titer stellt die Avidität der festgestellten Antikörper dar. So würden bei gleicher Fluoreszenz niedrig avide Antikörper in höherer Konzentration vorliegen als hoch avide, da sie in einem größeren Verhältnis in Lösung bleiben und weniger mit dem Substrat verbinden. Zur Feststellung der Avidität wird vom Hersteller für die hier verwendete IFT (Euroimmun) zusätzlich zum normalen Versuchsaufbau eine Harnstoffbehandlung der mit Probenserum inkubierten Reagenzträger empfohlen. Niedrig-avide gebundene Antikörper lösen sich dann von den Antigenen und es resultiert eine schwächere Fluoreszenz im Vergleich zur normalen Färbung. Mit diesem Test könnte den ANAs neben dem Titer die Avidität als zusätzliche Information hinzugefügt werden. Welchen Wert eine hohe Avidität mit niedriger Konzentration im Vergleich zu einer niedrigen Avidität und hohen Konzentration hat, ist noch unbekannt. Zu vermuten wäre, dass letztere eher natürlichen Autoantikörpern entsprechen, während hoch avide Autoantikörper den Charakteristika entsprechend eher von autoreaktiven B-Zellen stammen, welche der Selektion entgingen.

4.7.4 Validität der Line Immunoblots

Ob die Line Immunoblots häufiger unspezifisch reagieren als beispielsweise die doppelte Immundiffusion ist umstritten. Bei nur zehn ANA-negativen Kontrollen, aber Beispielsweise allein 9,6 % Ro-52 positiven unter den ANA-Validierten, ist die Frage mit dieser Arbeit nicht zu beantworten. In einer italienischen Studie jedoch wurden unter 54 ANA-positiven Rosacea-Patienten mit Titern von mindestens 1:160 keine spezifischen Antigene mit dem genutzten Euroline Immunoblot nachgewiesen [113]. Jener enthielt die Antigene RNP, Sm, Ro-60, Ro-52, La, PM-Scl, Jo-1, dsDNA, Histone und ribosomales P-Protein. Eine Ausnahme bildet die Studie von Sebastian et al., in der 119 Proben auf HEp-Zellen (ANA Mosaik, Euroimmun) ANA positiv waren (Titer 1:100) und von denen 101 Proben ebenfalls eine spezifische Antigenreaktion im Lineblot (ANA Euroline, Euroimmun) zeigten [84]. Grundlage waren 5066 eingesendete Proben aus medizinischen Einrichtungen, von denen nach unveröffentlichten Kriterien nur 319 Proben mittels IFT und Lineblot weiter untersucht wurden. Die niedrige Prävalenz der ANAs und der hohe Anteil identifizierter Antigene muss somit auf die unbekanntenen Einschlusskriterien

zurückzuführen sein, am ehesten auf einen hohen ANA-Titer. In weiteren Studien zur Autoimmundiagnostik konnten dem Euroline Immunoblot im Vergleich mit anderen Testverfahren ähnlich hohe Spezifitäten und Sensitivitäten attestiert werden [40].

Bei Einschluss von Ro-52 in die Autoimmundiagnostik sinkt die Spezifität und der positiv prädiktive Wert kommerzieller Testsysteme. Ro-52, PM-Scl, PCNA und CENP B liegen auf den in dieser Arbeit verwendeten Euroline Immunoblots als rekombinante Antigene vor. In der Tat fanden sich sehr häufig Reaktivitäten der Lineblots für Ro-52 (n=45), jedoch nicht für PM-SCL (n=3), CENP B (n=1) oder PCNA (nur grenzwertig, n=9). Durch veränderte Glykosylierung der rekombinanten Proteine, Isolation der Antigene aus komplexeren Molekülen (z. B. U1-RNP, Sm, SS-A), der Verunreinigung mit bakteriellen Antigenen und anderen Gründen könnten unspezifische Reaktionen hervorgerufen werden [27]. Jedoch gilt zu bedenken, dass Ro-52 in diversen rheumatischen Autoimmunerkrankungen, Autoimmunhepatitis und auch Virushepatitis gefunden wurde [108] und darum auch in dieser Arbeit als unspezifisch bewertet werden muss.

4.7.5 Einfluss des Studiendesigns auf die Genetik ANA_{SLE}-positiver Individuen

Eine mögliche Verzerrung der Ergebnisse kann durch die unterschiedliche geographische Herkunft der Proben entstehen. In deren Folge würden genetische Polymorphismen erkannt, die spezifisch für Regionen, aber nicht für ANA sind. Doch eine Verteilung von positiven Proben und Kontrollen, die zusätzlich zur Selektion für das ANA Muster auch genau ihrer geographischen Herkunft entspräche, die die Aussagekraft der Genlocus-ANA_{SLE} Assoziationsanalyse schmälern würde, ist nicht anzunehmen. Andernfalls bestünde ein geographischer Zusammenhang, der ein Risiko für die ANA-Positivität darstellt und möglicherweise auf dem genetischen Hintergrund bestünde. Aufgrund der Anonymisierung der Proben könnte die hypothetische Feststellung, dass ANA_{SLE}-Positivität regional verteilt sei, jedoch nicht formuliert werden.

Genomweite Assoziationsstudien werden in der Regel mit sehr großen Kohorten durchgeführt, welche mehrere Tausend Individuen umfassen können. In dieser Studie wurden etwa 500 Proben verglichen, von denen ein Viertel positiv selektierte Individuen sind. Hieraus ergibt sich die Unsicherheit, wie stark die SNP-Varianten tatsächlich mit dem selektierten Phänotypen assoziiert sind. Der Einfluss technischer Verarbeitungsfehler einzelner Individuen auf die Richtung der Gesamtaussage ist hier wesentlich größer als üblich. Bei einzelnen SNPs scheint tatsächlich ein Replikations- oder Auswertungsfehler dazu geführt zu haben, dass einem Block von 48 Proben auf einer Mikrotiterplatte mit 96 Proben ein Minorallel zugeordnet wurde. Bei 19 von 304 betroffenen Kontrollen und 29 von 119 Fällen ergab sich für jene fünf SNPs eine

signifikante Minor-Allelverteilung. Obwohl sowohl Kontrollen als auch Fälle betroffen waren, wurde das Ergebnis zugunsten der Häufigkeit des Minorallels unter den Fällen verzerrt, was bei einer größeren untersuchten Gesamtpopulation wahrscheinlich nicht aufgetreten wäre. Da die betroffenen Proben eine Serie auf *einer* Mikrotiterplatte bildeten, fiel dieser Fehler in der graphischen Darstellung der Allele jeder Probe auf. Dem liegt wahrscheinlich eine Varianz zugrunde, die während der Verarbeitung dieser Proben auftrat. Trotz dieser Unsicherheit, der man durch graphische Darstellung der Allele in Reihenfolge der Probenverarbeitung für identifizierte SNP nachkommen kann, bietet die Untersuchung kleinerer Kohorten ein Potential zur Identifikation von Gen-Phänotyp-Assoziationen. So können seltene genetische Varianten in sehr großen Populationen verborgen bleiben, während sie unter den Bedingungen kleinerer Populationen eher auffallen [41]. Dieses Modell ist in Abbildung 12 dargestellt und illustriert, wie einzelne Varianten unter bestimmten Bedingungen wie zum Beispiel Umwelteinflüssen (grüne oder orangene Punkte) gefunden werden können, während bei gemischten Populationen diese (grüne und orangene Punkte, Pfeile) nicht identifizierbar sind und die gesamte Varianz geringer ist. Es ist also durchaus denkbar, mit kleinen Populationen Varianten zu entdecken, welche einen Einfluss auf die Ausprägung von Phänotypen, also zum Beispiel die verstärkte Synthese von antinukleären Autoantikörpern haben. Dieser Effekt ist insbesondere dann zu erwarten, wenn der Einfluss der Genvarianten auf den Phänotypen nur sehr gering ist. Das bedeutet jedoch auch, dass diese Genvarianten nur in Kombination mit weiteren Faktoren zum Beispiel zum Ausbruch einer Erkrankung führen können und im Umkehrschluss häufig bei gesunden Individuen gefunden werden können.

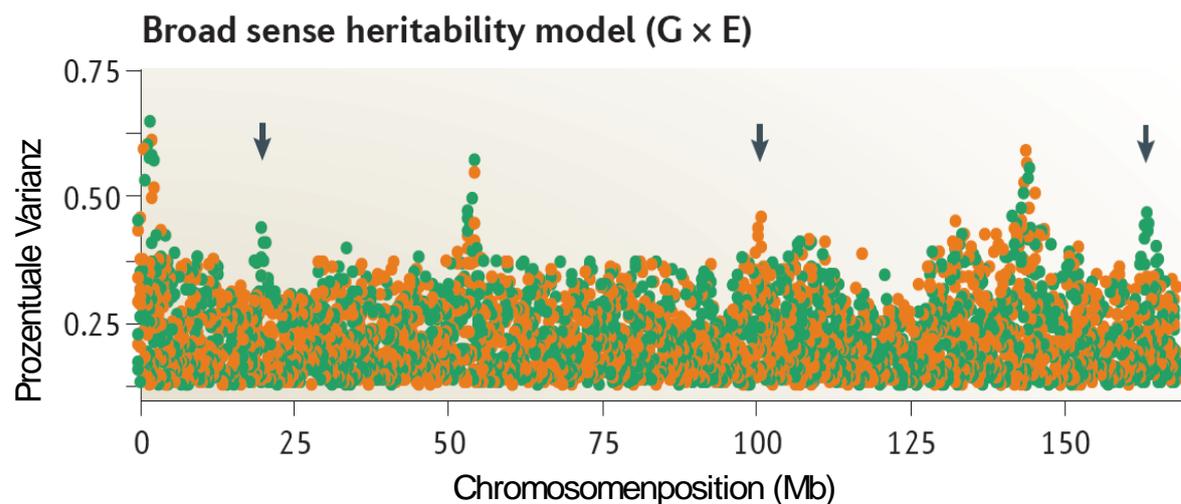


Abbildung 12: Seltene Varianten werden in gemischten Populationen maskiert. Adaptiert von Gibson, 2011 [41].

Weiterhin hat sich für die Auswertung einer GWAS inzwischen eine Signifikanzschwelle von $p \leq 10^{-8}$ etabliert, sodass bei einer Million Tests die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler der ersten Art fünf Prozent beträgt. Da in dieser Arbeit im SNP-Array nur knapp 200.000 SNPs enthalten und davon nur circa 115.000 korrekt repliziert wurden, ergab sich die Möglichkeit, die Schwelle zum Ausgleich für Multiple Testungen anzupassen. Nach der Methode von Benjamini und Liu wurde die Schwelle auf $p = 4,32E^{-7}$ festgesetzt.

Ein grundsätzliches Problem der genomweiten Assoziationsstudien stellt die Assoziation selbst dar, die nicht als Kausalität zwischen identifiziertem Genlocus und dem selektionierten Phänotypen missinterpretiert werden darf. Die genomweiten Assoziationsstudien bieten jedoch die Möglichkeit, auch unerwartete Genorte zu entdecken. Zum Verstehen der pathogenetischen Zusammenhänge zwischen jenen Genen und den Phänotypen können dann funktionelle Studien, beispielsweise mit Knockout-Mäusen oder -Zellen, durchgeführt werden.

4.8 Mögliche Folgeexperimente

Einige Fragen werden aufgeworfen, die sich durch folgende Experimente untersuchen ließen:

Zur Feststellung der Avidität wird vom Hersteller für die hier verwendeten IFT (Euroimmun AG) zusätzlich zum normalen Versuchsaufbau eine Harnstoffbehandlung der mit Probenserum inkubierten Reagenzträger empfohlen. Somit könnten die Titer korrekt auf eine hohe Antikörperkonzentration oder eine hohe Avidität zurückgeführt werden.

Eine IIF-Untersuchung auf HEp-Zellen mit geringer Verdünnung, zum Beispiel 1:10, würde zutage führen, ob ANAs auch mit einer Routinediagnostikmethode tatsächlich bei jedem Menschen zu finden wären. Es sollte beim Testen mit geringer Verdünnung auch eine Differenzierung in die bekannten Autoantikörperklassen erfolgen, um somit Rückschlüsse auf die Reifung der B-Zellen zu erlauben. (4.3.4)

Die Identifikation der ANA-IgG Glykosylierung in Gesunden könnte die Theorie bestärken, dass bestimmte Heteroglykane pro- und anti-inflammatorische Wirkungen entfalten.

In Mäusen mit humanisierten Immunzellen konnten mit Seren von SLE Patienten Glomerulonephritis und Arthritis ausgelöst werden [81]. Eine Wiederholung dieses Experiments mit den Seren von ANA positiven, aber gesunden Blutspendern könnte Aufschluss darüber geben, ob diese bereits pathogenetisches Potential aufweisen und somit auf das erste Witebsky Kriterium prüfen (siehe 4.5).

Die genetische Untersuchung könnte auch mit anderen häufigen Autoantikörpern durchgeführt werden, um eine Assoziation auch anderer Autoimmunerkrankungen mit den entsprechenden Autoantikörpern nachzuweisen und somit auf eine generelle genetische Assoziation von der Bildung der Autoantikörper und der sukzessive entstehenden Autoimmunerkrankung schließen zu können.

Weiterhin könnte eine genetische Assoziationsstudie einer wesentlich größeren gesunden Fallkohorte mit positivem Autoantikörperbefund weitere genetische, pathophysiologische Einflussfaktoren der Autoantikörperentstehung aufdecken und für funktionelle Experimente interessant machen.

Der gefundene SNP könnte validiert werden, indem dieser in einer neuen Kohorte genotypisiert und anschließend für ANAs gefärbt würde. Fände sich das Risikoallel auch hier häufiger bei ANA Positiven, würde dies die gefundene Assoziation unterstützen. Ein ähnlicher Ansatz wird derzeit von Ola El Shimi verfolgt.

5 Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten fielen in Ländern mit hohem Lebensstandard die Inzidenzen von Infektionskrankheiten, während Autoimmunerkrankungen immer häufiger wurden. Trotz großer Fortschritte leiden viele Menschen an den Folgen der Erkrankungen und den oft unspezifischen immunsuppressiven Therapien. Hierbei nehmen die Organschäden zu, je länger die Autoimmunerkrankung nicht adäquat behandelt wird. Daher kommt dem Zeitpunkt der Diagnose mittels verlässlicher Parameter eine entscheidende Rolle zu. In retrospektiven Studien wurde nachgewiesen, dass sich Autoimmunerkrankungen wie der systemische Lupus erythematodes (SLE) teilweise Jahre vor den ersten klinischen Symptomen durch das Auftreten der Autoantikörper ankündigen. Da in der normalen Bevölkerung die gleichen Autoantikörper sehr häufig vorkommen (1,4-27,1 % Prävalenz), können diese bisher nicht zur Vorhersage der Erkrankung genutzt werden. Um diese Problematik besser zu verstehen, sollen in dieser Arbeit beispielhaft für den SLE folgende Fragen geklärt werden: Wie hoch ist der Anteil der *gesunden* Bevölkerung, die SLE-typische Autoantikörper in sich tragen und die Selbsttoleranz noch aufrechterhalten? Ist die Existenz antinukleärer IgG-Autoantikörper mit eigenen genetischen Merkmalen assoziiert und liegen sogar Übereinstimmungen mit Risikogenen für SLE vor? Hierfür wurden mit der indirekten Immunfluoreszenztechnik (IFT) und Immunoblotting in 6454 gesunden Blutspendern antinukleäre IgG-Autoantikörper gesucht und mit positiven Individuen eine genomweite Assoziationsstudie durchgeführt. Bei 5,62 Prozent (Titer 1:100) wurden SLE-typische ANAs identifiziert und je höher die Fluoreszenzintensität war, desto signifikant häufiger ließen sich spezifische Autoantikörper nachweisen, am häufigsten gegen das Antigen SS-A (4,7 Prozent der ANA-Positiven) und nur einmal gegen Doppelstrang-DNA. In 3,66 Prozent fand sich ein SLE-typisches ANA Muster mit hoher Intensität (IFT Titer \geq 1:320), welches genetisch eine Assoziation mit dem Gen für das Tumornekrosefaktor alpha induzierende Protein 3 (TNFAIP3) zeigte. Somit sind ANAs vom IgG-Typ in Gesunden wesentlich häufiger als die SLE Prävalenz. Die spezifischen Zielantigene waren vor allem solche ohne Beziehung zu konkreten Organschäden und nur einmal die besonders SLE-spezifische Doppelstrang-DNA, wie es ebenso für SLE-Patienten vor Ausbruch der Erkrankung beschrieben wurde. Sowohl der identifizierte SNP, als auch das Gen TNFAIP3 sind bekannte Risikofaktoren für die Entwicklung eines SLE, sodass ANA-positive Gesunde und SLE-Patienten möglicherweise eine Störung der durch TNFAIP3 regulierten Prozesse der Apoptose und der Apoptoseclearance teilen.

6 Literatur

- 1 Adrianto, I.; Wen, F.; Templeton, A.; Wiley, G.; King, J. B.; Lessard, C. J. et al. (2011): Association of a functional variant downstream of TNFAIP3 with systemic lupus erythematosus. In: *Nat Genet* 43 (3), S. 253–258.
- 2 Agmon-Levin, N.; Damoiseaux, J.; Kallenberg, C.; Sack, U.; Witte, T.; Herold, M. et al. (2014): International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. In: *Ann. Rheum. Dis.* 73 (1), S. 17–23.
- 3 Almogren, A. (2010): Anti-double stranded antibody. Association with titers and fluorescence patterns of anti-nuclear antibody in systemic lupus erythematosus. In: *Saudi Med J* 31 (1), S. 32–36.
- 4 Amezcua-Guerra, L. M.; Higuera-Ortiz, V.; Arteaga-García, U.; Gallegos-Nava, S.; Hübbe-Tena, C. (2014): Performance of the 2012 SLICC and the 1997 ACR classification criteria for systemic lupus erythematosus in a real-life scenario. In: *Arthritis care & research.*
- 5 Arbuckle, M. R.; James, J. A.; Kohlhase, K. F.; Rubertone, M. V.; Dennis, G. J.; Harley, J. B. (2001): Development of Anti-dsDNA Autoantibodies Prior to Clinical Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus. In: *Scand J Immunol* 54 (1-2), S. 211–219.
- 6 Arbuckle, M. R.; McClain, M. T.; Rubertone, M. V.; Scofield, R. H.; Dennis, G. J.; James, J. A.; Harley, J. B. (2003): Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. In: *N Engl J Med* 349 (16), S. 1526–1533.
- 7 Archive Ensembl (Hg.): Variation: rs58905141. Online verfügbar unter http://may2009.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Summary?r=6:138173316-138174316;v=rs58905141;vdb=variation;vf=13971228.
- 8 Atsma, F.; Veldhuizen, I.; Vegt, F. de; Doggen, C.; Kort, W. de (2011): Cardiovascular and demographic characteristics in whole blood and plasma donors: results from the Donor InSight study. In: *Transfusion* 51 (2), S. 412–420.
- 9 Avrameas, S. (1991): Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. In: *Immunology Today* 12 (5), S. 154–159.
- 10 Avrameas, S.; Selmi, C. (2013): Natural autoantibodies in the physiology and pathophysiology of the immune system. In: *Journal of Autoimmunity* 41, S. 46–49.
- 11 Avrameas, S.; Ternynck, T. (1993): The natural autoantibodies system: Between hypotheses and facts. In: *Molecular Immunology* 30 (12), S. 1133–1142.
- 12 Avrameas, S.; Ternynck, T. (1995): Natural autoantibodies: The other side of the immune system. In: *Research in Immunology* 146 (4-5), S. 235–248.
- 13 Bach, J.-F. (2002): The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases. In: *N Engl J Med* 347 (12), S. 911–920.
- 14 Benjamini, Y.; Drai, D.; Elmer, G.; Kafkafi, N.; Golani, I. (2001): Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. In: *Behavioural Brain Research* 125 (1-2), S. 279–284.
- 15 Berglin, E.; Padyukov, L.; Sundin, U.; Hallmans, G.; Stenlund, H.; van Venrooij, Walther J et al. (2004): A combination of autoantibodies to cyclic citrullinated peptide (CCP) and HLA-DRB1 locus antigens is strongly associated with future onset of rheumatoid arthritis. In: *Arthritis Res. Ther.* 6 (4), S. R303-8.

- 16 Bizzaro, N.; Tonutti, E.; Visentini, D.; Alessio, M. G.; Platzgummer, S.; Morozzi, G. et al. (2007): Antibodies to the lens and cornea in anti-DFS70-positive subjects. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1107, S. 174–183.
- 17 Black, A. A.; McCauliffe, D. P.; Sontheimer, R. D. (1992): Prevalence of acne rosacea in a rheumatic skin disease subspecialty clinic. In: *Lupus* 1 (4), S. 229–237.
- 18 Böhm, S.; Schwab, I.; Lux, A.; Nimmerjahn, F. (2012): The role of sialic acid as a modulator of the anti-inflammatory activity of IgG. In: *Semin Immunopathol* 34 (3), S. 443–453.
- 19 Bundesärztekammer (2010): Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie), Zweite Richtlinienanpassung 2010.
- 20 Burnet, F. M. (1959): The clonal selection theory of acquired immunity. In: *Cambridge University Press, England and Vanderbilt University Press, Nashville, Tennessee.*
- 21 Carl, P. L.; Temple, Brenda R S; Cohen, P. L. (2005): Most nuclear systemic autoantigens are extremely disordered proteins: implications for the etiology of systemic autoimmunity. In: *Arthritis Res. Ther.* 7 (6), S. R1360-74.
- 22 Casciola-Rosen, L. A.; Anhalt, G.; Rosen, A. (1994): Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. In: *J. Exp. Med.* 179 (4), S. 1317–1330.
- 23 Cervera, R.; Khamashta, M. A.; Font, J.; Sebastiani, G. D.; Gil, A.; Lavilla, P. et al. (2003): Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. In: *Medicine (Baltimore)* 82 (5), S. 299–308.
- 24 Chang, M.-K.; Binder, C. J.; Miller, Y. I.; Subbanagounder, G.; Silverman, G. J.; Berliner, J. A.; Witztum, J. L. (2004): Apoptotic cells with oxidation-specific epitopes are immunogenic and proinflammatory. In: *J. Exp. Med.* 200 (11), S. 1359–1370.
- 25 Clancy, R. M.; Neufing, P. J.; Zheng, P.; O'Mahony, M.; Nimmerjahn, F.; Gordon, T. P.; Buyon, J. P. (2006): Impaired clearance of apoptotic cardiocytes is linked to anti-SSA/Ro and -SSB/La antibodies in the pathogenesis of congenital heart block. In: *J. Clin. Invest.* 116 (9), S. 2413–2422.
- 26 Collin, M.; Ehlers, M. (2013): The carbohydrate switch between pathogenic and immunosuppressive antigen-specific antibodies. In: *Exp. Dermatol.* 22 (8), S. 511–514.
- 27 Damoiseaux, J G M C; Tervaert, J W Cohen (2006): From ANA to ENA: how to proceed? In: *Autoimmun Rev* 5 (1), S. 10–17.
- 28 Danchenko, N.; Satia, J. A.; Anthony, M. S. (2006): Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. In: *Lupus* 15 (5), S. 308–318.
- 29 Davidson, A.; Diamond, B. (2001): Autoimmune diseases. In: *N. Engl. J. Med.* 345 (5), S. 340–350.
- 30 Dellavance, A.; Viana, Vilma S T; Leon, E. P.; Bonfa, Eloisa S D O; Andrade, Luís E C; Leser, P. G. (2005): The clinical spectrum of antinuclear antibodies associated with the nuclear dense fine speckled immunofluorescence pattern. In: *J. Rheumatol.* 32 (11), S. 2144–2149.
- 31 Döpp, R.; Schmidt, E.; Chimanovitch, I.; Leverkus, M.; Bröcker, E. B.; Zillikens, D. (2000): IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain

- of BP180 in Bullous pemphigoid: serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. In: *J. Am. Acad. Dermatol.* 42 (4), S. 577–583.
- 32 Eaton, W. W.; Rose, N. R.; Kalaydjian, A.; Pedersen, M. G.; Mortensen, P. B. (2007): Epidemiology of autoimmune diseases in Denmark. In: *Journal of Autoimmunity* 29 (1), S. 1–9.
- 33 Egner, W. (2000): The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. In: *Journal of Clinical Pathology* 53 (6), S. 424–432.
- 34 Ensembl Genome Browser. Online verfügbar unter <http://may2009.archive.ensembl.org/index.html>, zuletzt geprüft am 18.07.2013.
- 35 Eriksson, C.; Kokkonen, H.; Johansson, M.; Hallmans, G.; Wadell, G.; Rantapää-Dahlqvist, S. (2011): Autoantibodies predate the onset of systemic lupus erythematosus in northern Sweden. In: *Arthritis Res. Ther.* 13 (1), S. R30.
- 36 Fernandez, Solange Assuncion Villagra; Lobo, Alice Zoghbi Coelho; Oliveira, Zilda Najjar Prado de; Fukumori, Ligia Maria Ichimura; P rigo, Alexandre Marques; Rivitti, E. A. (2003): Prevalence of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. In: *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 58 (6), S. 315–319.
- 37 Franke, B.; Galloway, T. S.; Wilkin, T. J. (2005): Developments in the prediction of type 1 diabetes mellitus, with special reference to insulin autoantibodies. In: *Diabetes Metab. Res. Rev.* 21 (5), S. 395–415.
- 38 Frieri, M. (2013): Mechanisms of disease for the clinician: systemic lupus erythematosus. In: *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 110 (4), S. 228–232.
- 39 Fritzler, M. J. (2011): The antinuclear antibody test: last or lasting gasp? In: *Arthritis Rheum.* 63 (1), S. 19–22.
- 40 Ghirardello, A.; Rampudda, M.; Ekholm, L.; Bassi, N.; Tarricone, E.; Zampieri, S. et al. (2010): Diagnostic performance and validation of autoantibody testing in myositis by a commercial line blot assay. In: *Rheumatology (Oxford)* 49 (12), S. 2370–2374.
- 41 Gibson, G. (2011): Rare and common variants: twenty arguments. In: *Nat. Rev. Genet.* 13 (2), S. 135–145.
- 42 Giltiy, N. V.; Chappell, C. P.; Clark, E. A. (2012): B-cell selection and the development of autoantibodies. In: *Arthritis Res Ther* 14 (Suppl 4), S. S1.
- 43 Goodnow, C. C.; Sprent, J.; Fazekas de St Groth, Barbara; Vinuesa, C. G. (2005): Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. In: *Nature* 435 (7042), S. 590–597.
- 44 Green, N. M.; Marshak-Rothstein, A. (2011): Toll-like receptor driven B cell activation in the induction of systemic autoimmunity. In: *Seminars in Immunology* 23 (2), S. 106–112.
- 45 Grönwall, C.; Vas, J.; Silverman, G. J. (2012): Protective Roles of Natural IgM Antibodies. In: *Front. Immun.* 3.
- 46 Harman, K. E.; Seed, P. T.; Gratian, M. J.; Bhogal, B. S.; Challacombe, S. J.; Black, M. M. (2001): The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. In: *Br. J. Dermatol.* 144 (4), S. 775–780.
- 47 Heinlen, L. D.; McClain, M. T.; Merrill, J.; Akbarali, Y. W.; Edgerton, C. C.; Harley, J. B.; James, J. A. (2007): Clinical criteria for systemic lupus erythematosus precede diagnosis, and associated autoantibodies are present before clinical symptoms. In: *Arthritis Rheum* 56 (7), S. 2344–2351.
- 48 Heyninck, K.; Valck, D. de; Vanden Berghe, W.; van Criekinghe, W.; Contreras, R.; Fiers, W. et al. (1999): The zinc finger protein A20 inhibits TNF-induced NF-

- kappaB-dependent gene expression by interfering with an RIP- or TRAF2-mediated transactivation signal and directly binds to a novel NF-kappaB-inhibiting protein ABIN. In: *J. Cell Biol.* 145 (7), S. 1471–1482.
- 49 Hochberg, M. C. (1997): Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. In: *Arthritis Rheum.* 40 (9), S. 1725.
- 50 Hopkinson, N. D.; Doherty, M.; Powell, R. J. (1994): Clinical features and race-specific incidence/prevalence rates of systemic lupus erythematosus in a geographically complete cohort of patients. In: *Annals of the rheumatic diseases* 53 (10), S. 675–680.
- 51 Institut für Sozialmedizin und Institut für Klinische Epidemiologie, UKSH, Campus Lübeck (2012): Blockpraktikum "Evidenzbasierte Medizin". Kursunterlagen. Sommersemester 2012. Unter Mitarbeit von Eva Blozik, Alexander Katalinic, Sascha Köpke, Thomas Kötter, Dagmar Lühmann, Nadine Pohontsch, Susanne Richter, Maike Schnoor, Sabine Stumpf, Annika Waldmann.
- 52 Ishii, K.; Amagai, M.; Hall, R. P.; Hashimoto, T.; Takayanagi, A.; Gamou, S. et al. (1997): Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. In: *J. Immunol.* 159 (4), S. 2010–2017.
- 53 Jacobson, D. L.; Gange, S. J.; Rose, N. R.; Graham, N. M. (1997): Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. In: *Clin. Immunol. Immunopathol.* 84 (3), S. 223–243.
- 54 Janeway, C. A. (2001): How the immune system protects the host from infection. In: *Microbes Infect.* 3 (13), S. 1167–1171.
- 55 Kang, I.; Siperstein, R.; Quan, T.; Breitenstein, M. L. (2004): Utility of age, gender, ANA titer and pattern as predictors of anti-ENA and -dsDNA antibodies. In: *Clin. Rheumatol.* 23 (6), S. 509–515.
- 56 Lademann, U.; Kallunki, T.; Jäättelä, M. (2001): A20 zinc finger protein inhibits TNF-induced apoptosis and stress response early in the signaling cascades and independently of binding to TRAF2 or 14-3-3 proteins. In: *Cell Death Differ.* 8 (3), S. 265–272.
- 57 LaGasse, J. M.; Brantley, M. S.; Leech, N. J.; Rowe, R. E.; Monks, S.; Palmer, J. P. et al. (2002): Successful prospective prediction of type 1 diabetes in schoolchildren through multiple defined autoantibodies: an 8-year follow-up of the Washington State Diabetes Prediction Study. In: *Diabetes Care* 25 (3), S. 505–511.
- 58 Leslie, D.; Lipsky, P.; Notkins, A. L. (2001): Autoantibodies as predictors of disease. In: *J. Clin. Invest.* 108 (10), S. 1417–1422.
- 59 Li, Q.-Z.; Karp, D. R.; Quan, J.; Branch, V. K.; Zhou, J.; Lian, Y. et al. (2011): Risk factors for ANA positivity in healthy persons. In: *Arthritis Res. Ther.* 13 (2), S. R38.
- 60 Ma, A.; Malynn, B. A. (2012): A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. In: *Nat Rev Immunol* 12 (11), S. 774–785.
- 61 Mackay, I. R. (1992): Autoimmunity: Paradigms of Burnet and complexities of today. In: *Immunology and Cell Biology* (70), S. 159–171.
- 62 Mahler, M.; Fritzler, M. J. (2012): The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on HEp-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. In: *Clin. Dev. Immunol.* 2012, S. 494356.
- 63 Manson, J. J.; Rahman, A. (2006): Systemic lupus erythematosus. In: *Orphanet J Rare Dis* 1 (1), S. 6.

- 64 Mariz, H. A.; Sato, E. I.; Barbosa, S. H.; Rodrigues, S. H.; Dellavance, A.; Andrade, Luis E C (2011): Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. In: *Arthritis Rheum.* 63 (1), S. 191–200.
- 65 Miranda-Carús, M. E.; Askanase, A. D.; Clancy, R. M.; Di Donato, F.; Chou, T. M.; Libera, M. R. et al. (2000): Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La autoantibodies bind the surface of apoptotic fetal cardiocytes and promote secretion of TNF-alpha by macrophages. In: *J. Immunol.* 165 (9), S. 5345–5351.
- 66 Murphy, Kenneth; Janeway, Charles A.; Travers, Paul; Walport, Mark (2012): Janeway's immunobiology. 8th ed. Oxford: Taylor & Francis.
- 67 Myckatyn, S. O.; Russell, A. S. (2003): Outcome of positive antinuclear antibodies in individuals without connective tissue disease. In: *J. Rheumatol.* 30 (4), S. 736–739.
- 68 Nagele, E. P.; Han, M.; Acharya, N. K.; DeMarshall, C.; Kosciuk, M. C.; Nagele, R. G. (2013): Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease. In: *PLoS ONE* 8 (4), S. e60726.
- 69 Navratil, J. S.; Sabatine, J. M.; Ahearn, J. M. (2004): Apoptosis and immune responses to self. In: *Rheumatic Disease Clinics of North America* 30 (1), S. 193–212.
- 70 Neogi, T.; Zhang, Y. (2013): Epidemiology of Osteoarthritis. In: *Rheumatic Disease Clinics of North America* 39 (1), S. 1–19.
- 71 Nielen, Markus M J; van Schaardenburg, D.; Reesink, H. W.; van de Stadt, Rob J; van der Horst-Bruinsma, Irene E; de Koning, Margret H M T et al. (2004): Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. In: *Arthritis Rheum.* 50 (2), S. 380–386.
- 72 Nimmerjahn, F.; Ravetch, J. V. (2008): Fcγ receptors as regulators of immune responses. In: *Nat. Rev. Immunol.* 8 (1), S. 34–47.
- 73 Petri, M.; Orbai, A.-M.; Alarcón, G. S.; Gordon, C.; Merrill, J. T.; Fortin, P. R. et al. (2012): Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. In: *Arthritis and rheumatism* 64 (8), S. 2677–2686.
- 74 Purcell, S.; Neale, B.; Todd-Brown, K.; Thomas, L.; Ferreira, Manuel A R; Bender, D. et al. (2007): PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. In: *American journal of human genetics* 81 (3), S. 559–575.
- 75 Ramos, P. S.; Criswell, L. A.; Moser, K. L.; Comeau, M. E.; Williams, A. H.; Pajewski, N. M. et al. (2011): A Comprehensive Analysis of Shared Loci between Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and Sixteen Autoimmune Diseases Reveals Limited Genetic Overlap. In: *PLoS Genet* 7 (12), S. e1002406.
- 76 Ranjith, G. (2005): Epidemiology of chronic fatigue syndrome. In: *Occup Med (Lond)* 55 (1), S. 13–19.
- 77 Rantapää-Dahlqvist, S.; de Jong, Ben A W; Berglin, E.; Hallmans, G.; Wadell, G.; Stenlund, H. et al. (2003): Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. In: *Arthritis Rheum.* 48 (10), S. 2741–2749.

- 78 Renau, A.; Isenberg, D. (2012): Male versus female lupus: a comparison of ethnicity, clinical features, serology and outcome over a 30 year period. In: *Lupus* 21 (10), S. 1041–1048.
- 79 Roquelaure, Y.; Ha, C.; Le Manac'h, A. P.; Bodin, J.; Bodere, A.; Bosseau, C. et al. (2012): Risk factors for Raynaud's phenomenon in the workforce. In: *Arthritis Care Res* 64 (6), S. 898–904.
- 80 Rose, N. R.; Bona, C. (1993): Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). In: *Immunology Today* 14 (9), S. 426–430.
- 81 Rosetti, F.; Tsuboi, N.; Chen, K.; Nishi, H.; Hernandez, T.; Sethi, S. et al. (2012): Human lupus serum induces neutrophil-mediated organ damage in mice that is enabled by Mac-1 deficiency. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 189 (7), S. 3714–3723.
- 82 Schmidt, E.; Obe, K.; Bröcker, E. B.; Zillikens, D. (2000): Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. In: *Arch Dermatol* 136 (2), S. 174–178.
- 83 Schmidt, E.; Zillikens, D. (2011): The diagnosis and treatment of autoimmune blistering skin diseases. In: *Dtsch Arztebl Int* 108 (23), S. 399–405.
- 84 Sebastian, W.; Roy, A.; Kini, U.; Mullick, S. (2010): Correlation of antinuclear antibody immunofluorescence patterns with immune profile using line immunoassay in the Indian scenario. In: *Indian J Pathol Microbiol* 53 (3), S. 427–432.
- 85 Semchuk, K. M.; Rosenberg, A. M.; McDuffie, H. H.; Cessna, A. J.; Pahwa, P.; Irvine, D. G. (2007): Antinuclear antibodies and bromoxynil exposure in a rural sample. In: *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 70 (7), S. 638–657.
- 86 Semchuk, K. M.; Rosenberg, A. M.; McDuffie, H. H.; Cessna, A. J.; Pahwa, P.; Irvine, D. G. (2007): Antinuclear antibodies and bromoxynil exposure in a rural sample. In: *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 70 (7), S. 638–657.
- 87 Servais, G.; Karmali, R.; Guillaume, M. P.; Badot, V.; Duchateau, J.; Corazza, F. (2009): Anti DNA antibodies are not restricted to a specific pattern of fluorescence on HEp2 cells. In: *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 47 (5), S. 543–549.
- 88 Shepshelovich, D.; Shoenfeld, Y. (2006): Prediction and prevention of autoimmune diseases: additional aspects of the mosaic of autoimmunity. In: *Lupus* 15 (3), S. 183–190.
- 89 Shoenfeld, Y.; Blank, M.; Abu-Shakra, M.; Amital, H.; Barzilai, O.; Berkun, Y. et al. (2008): The mosaic of autoimmunity: prediction, autoantibodies, and therapy in autoimmune diseases--2008. In: *Isr. Med. Assoc. J.* 10 (1), S. 13–19.
- 90 Silverman, G. J.; Srikrishnan, R.; Germar, K.; Goodyear, C. S.; Andrews, K. A.; Ginzler, E. M.; Tsao, B. P. (2008): Genetic imprinting of autoantibody repertoires in systemic lupus erythematosus patients. In: *Clinical & Experimental Immunology* 153 (1), S. 102–116.
- 91 Sitaru, C.; Goebeler, M.; Zillikens, D. (2004): Bullose Autoimmundermatosen (I): Pathogenese und Diagnostik. In: *J Deut Dermatol Gesell* 2 (2), S. 123–139.
- 92 Sokolove, J.; Bromberg, R.; Deane, K. D.; Lahey, L. J.; Derber, L. A.; Chandra, P. E. et al. (2012): Autoantibody epitope spreading in the pre-clinical phase predicts progression to rheumatoid arthritis. In: *PLoS ONE* 7 (5), S. e35296.
- 93 Song, H. Y.; Rothe, M.; Goeddel, D. V. (1996): The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (13), S. 6721–6725.

- 94 Soto, M. E.; Hernández-Becerril, N.; Perez-Chiney, A. C.; Hernández-Rizo, A.; Telich-Tarriba, J. E.; Juárez-Orozco, L. E. et al. (2013): Predictive value of antinuclear antibodies in autoimmune diseases classified by clinical criteria: Analytical study in a specialized health institute, 1 year follow-up. In: *Results in Immunology*.
- 95 Stichtenoth, D. O.; Deicher, H. R.; Frölich, J. C. (2001): Blood donors on medication. Are deferral periods necessary? In: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 57 (6-7), S. 433–440.
- 96 Stowell, S. R.; Liepkalns, J. S.; Hendrickson, J. E.; Girard-Pierce, K. R.; Smith, N. H.; Arthur, C. M.; Zimring, J. C. (2013): Antigen modulation confers protection to red blood cells from antibody through Fcγ receptor ligation. In: *J. Immunol.* 191 (10), S. 5013–5025.
- 97 Tan, E. M.; Cohen, A. S.; Fries, J. F.; Masi, A. T.; McShane, D. J.; Rothfield, N. F. et al. (1982): The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. In: *Arthritis Rheum.* 25 (11), S. 1271–1277.
- 98 Tan, E. M.; Feltkamp, T. E. W.; Smolen, J. S.; Butcher, B.; Dawkins, R.; Fritzler, M. J. et al. (1997): Range of antinuclear antibodies in “healthy” individuals. In: *Arthritis & Rheumatism* 40 (9), S. 1601–1611.
- 99 Tektonidou, M. G.; Anapliotou, M.; Vlachoyiannopoulos, P.; Moutsopoulos, H. M. (2004): Presence of systemic autoimmune disorders in patients with autoimmune thyroid diseases. In: *Ann. Rheum. Dis.* 63 (9), S. 1159–1161.
- 100 Valck, D. de; Heyninck, K.; van Criekeing, W.; Vandenabeele, P.; Fiers, W.; Beyaert, R. (1997): A20 inhibits NF-kappaB activation independently of binding to 14-3-3 proteins. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238 (2), S. 590–594.
- 101 Valck, D. de; Jin, D. Y.; Heyninck, K.; Van de Craen, M; Contreras, R.; Fiers, W. et al. (1999): The zinc finger protein A20 interacts with a novel anti-apoptotic protein which is cleaved by specific caspases. In: *Oncogene* 18 (29), S. 4182–4190.
- 102 Venrooij, W. J. van; Maini, R. N. (1996): Manual of biological markers of disease. Dordrecht, Boston: Kluwer Academic Publishers.
- 103 Vereecke, L.; Beyaert, R.; van Loo, G. (2009): The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. In: *Trends Immunol.* 30 (8), S. 383–391.
- 104 Vincenz, C.; Dixit, V. M. (1996): 14-3-3 proteins associate with A20 in an isoform-specific manner and function both as chaperone and adapter molecules. In: *J. Biol. Chem.* 271 (33), S. 20029–20034.
- 105 Vlam, K. de; Keyser, F. de; Verbruggen, G.; Vandenbossche, M.; Vanneuville, B.; D'Haese, D.; Veys, E. M. (1993): Detection and identification of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. In: *Clin. Exp. Rheumatol.* 11 (4), S. 393–397.
- 106 von Mühlen, C A; Tan, E. M. (1995): Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. In: *Semin. Arthritis Rheum.* 24 (5), S. 323–358.
- 107 von Mühlen, C. A.; Chan, E.; Anglés-Cano, E.; Mamula, M. J.; Garcia-de, I.; Fritzler, M. J. (1998): Advances in autoantibodies in SLE. In: *Lupus* 7 (8), S. 507–514.
- 108 W. Meyer; T. Scheper; A. Janssen; M. Siegemund; B. Kuehn; S. Chen et al. (2008): Anti-Ro-52 antibodies are not disease specific: Prevalence in various rheumatic autoimmune diseases, primary biliary liver cirrhosis and autoimmune and infectious hepatitis. In: *Ann. Rheum. Dis.* 67 (2), S. 146.

- 109 Wandstrat, A. E.; Carr-Johnson, F.; Branch, V.; Gray, H.; Fairhurst, A.-M.; Reimold, A. et al. (2006): Autoantibody profiling to identify individuals at risk for systemic lupus erythematosus. In: *J. Autoimmun.* 27 (3), S. 153–160.
- 110 Wardemann, H.; Yurasov, S.; Schaefer, A.; Young, J. W.; Meffre, E.; Nussenzweig, M. C. (2003): Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. In: *Science* 301 (5638), S. 1374–1377.
- 111 Wijeyesinghe, U.; Russell, A. S. (2008): Outcome of high titer antinuclear antibody positivity in individuals without connective tissue disease: a 10-year follow-up. In: *Clin. Rheumatol.* 27 (11), S. 1399–1402.
- 112 Witebsky, E.; Rose, N. R.; Terplan, K.; Paine, J. R.; Egan, R. W. (1957): Chronic thyroiditis and autoimmunization. In: *Journal of the American Medical Association* 164 (13), S. 1439–1447.
- 113 Woźniacka, A.; Salamon, M.; McCauliffe, D.; Sysa-Jędrzejowska, A. (2013): Antinuclear antibodies in rosacea patients. In: *Postępy Dermatol Alergol* 30 (1), S. 1–5.

7 Anhang

7.1 Ethikvotum

Alle hier durchgeführten Untersuchungen der Blutproben gesunder Blutspender sind durch die zuständige Ethikkommission der Universität zu Lübeck bewilligt worden: Aktenzeichen 10-094, Genehmigungsschreiben vom 01.06.2010.

7.2 SLICC Klassifikationssystem*

* adaptiert von Petri et al. [73]

Kriterien sind kumulativ und müssen nicht zeitgleich auftreten.

Klinische Kriterien

1. Akut kutaner Lupus, einschließlich:

Schmetterlingserythem (nicht wenn diskoid)

Bullöser Lupus erythematodes

Toxisch epidermale nekrolyse Form von SLE

Makulopapulöses Lupus Exanthem

Photosensitives Lupus Exanthem

in Abwesenheit von Dermatomyositis

ODER subakut kutanem Lupus (nicht-indurierte psoriasiforme und/oder anuläre polyzyklische Läsionen, die Narbenlos abheilen, auch wenn teilweise mit postinflammatorischer Pigmentverschiebung oder Teleangiektasien)

2. Chronisch kutaner Lupus, einschließlich:

Klassische diskoidale Papeln

Lokal (oberhalb Hals)

Generalisiert (ober- und unterhalb Hals)

Hypertropher (verruköser) lupus

Lupus Pannikulitis (profundus)

Mucöser Lupus erythematodes

Lupus erythematosus tumidus

Chilblain Lupus erythematodes

Diskoider Lupus/Lichen ruber planus overlap

3. Orale Ulzera

Gaumen

Bukkal

Zunge

ODER nasale Ulzera

in Abwesenheit anderer Ursachen wie Vaskulitis, Morbus Behçet, Infektion (Herpes Virus), entzündlicher Darmerkrankung, reaktiver Arthritis und saurer Nahrung

4. nicht-vernarbende Alopezie (Diffus oder sichtbar brüchiges Haar)

in Abwesenheit anderer Ursachen wie Alopecia areata, Medikamente, Eisenmangel und androgenetischer Alopezie

5. Synovitis (2 oder mehr Gelenke betroffen), charakterisiert durch Schwellung oder Erguss

ODER Schmerzen in 2 oder mehr Gelenken und mindestens 30 Minuten Morgensteifigkeit

6. Serositis

Typische pleuritis länger als 1 Tag

ODER Pleuraerguss

ODER Pleurareiben

Typischer perikardialer Schmerz (im Liegen, verbessert im Sitzen) länger als 1 Tag

ODER Perikarderguss

ODER Perikardreiben

ODER Perikarditis anhand EKG

in Abwesenheit anderer Ursachen wie Infektion, Urämie und Dressler Perikarditis

7. Niere

Urin Protein-Kreatinin Ratio (oder 24-Stunden Urin Protein) 500 mg Protein/24 Stunden darstellend

ODER Erythrozytenzylinder

8. Neurologisch

Schlaganfälle

Psychose

Mononeuritis multiplex

in Abwesenheit anderer bekannter Ursachen wie primärer Vaskulitis

Myelitis

Periphere oder kranial Neuropathie

in Abwesenheit anderer bekannter Ursachen wie primärer Vaskulitis, Infektion und Diabetes mellitus

Akute Verwirrtheit

*in Abwesenheit anderer Ursachen einschließlich toxisch/metabolisch, Urämie, Medikamente***9. Hämolytische Anämie****10. Leukopenie (<4,000/µl mindestens einmalig)***in Abwesenheit anderer bekannter Ursachen wie Felty Syndrom, Medikamente und portale Hypertension*

ODER

Lymphopenie (<1,000/µl mindestens einmalig)

*in Abwesenheit anderer bekannter Ursachen wie Kortikosteroide, Medikamente und Infektion***11. Thrombozytopenie (<100,000/µl mindestens einmalig)***in Abwesenheit anderer bekannter Ursachen wie Medikamente, portale Hypertension und thrombotisch thrombozytopenische Purpura***Immunologische Kriterien**

1. ANA Level über Laborreferenzwert

2. Anti-dsDNA Antikörper Level über Laborreferenzwert (oder >2-fach über Laborreferenzwert im ELISA)

3. Anti-Sm: Nachweis von Antikörper gegen nukleärem Sm Antigen

4. Antiphospholipid Antikörper Positivität bestimmt durch eines der Folgenden:

Positives Testergebnis für Lupus Antikoagulanzen

Falsch-positives Testergebnis für RPR (rapid plasma reagin)

Mittel- oder hoch-titrige Antikardiolipin Antikörper Level (IgA, IgG, oder IgM)

Positives Testergebnis für anti-β₂-Glykoprotein I (IgA, IgG, oder IgM)

5. Komplementmangel

C3-Mangel

C4-Mangel

CH50-Mangel

6. Direkter Coombs Test *in Abwesenheit einer hämolytischen Anämie***7.3 Antigene der line blot immunoassays**

SS-A (Ro-60)

Ro-52

SS-B (La)

dsDNA (double-stranded DNA)

U1-nRNP (U1-nuclear ribonucleoprotein)

RNP 70 (70kDa ribonucleoprotein)

RNP-A (ribonucleoprotein A)

RNP-C (ribonucleoprotein C)

Sm (Smith-antigen)

nucleosomes

histones

PCNA (proliferating-cell-nuclear-antigen)

Ku-protein

rib. P protein (ribosomal p-protein)

Scl-70 (DNA-topoisomerase I)

CENP-A (centromeric nucleoprotein A)

CENP-B (centromeric nucleoprotein B)

RP11 (subunit POLR3K of human RNA-polymerase III)

RP155 (subunit POLR3A of human RNA-polymerase III)

Fibrillarin (U3-nRNP)

NOR90 (nucleoli organizing region)

Th/To (7-2-RNP/7-2-RNA-protein-complex)

PM/Scl (multiple antigens of nucleolar PM/Scl-macromolecular complex)

PM/Scl-75 (75kDa protein of nucleolar PM/Scl-macromolecular complex)

PM/Scl-100 (100kDa protein of nucleolar PM/Scl-macromolecular complex)

PDGFR (stimulating the platelet derived growth factor)

Jo-1 (histidyl-tRNA-synthetase)

PL-7 (threonyl-tRNA-synthetase)

PL-12 (alanyl-tRNA-synthetase)
 EJ (glycyl-tRNA-synthetase)
 OJ (isoleucyl-tRNA-synthetase)
 Mi-2 (component of nucleosome-remodeling complex)
 SRP (signal recognition particle)
 AMA-M2 (anti-mitochondrial antigen)

7.4 Kombinationen spezifischer SLE-Antigene

Antigen 1	Antigen 2	Fluoreszenz
Histone	Nukleosomen	Nukleär homogen (1:3200)
	SS-B	Nukleär granulär (1:1000)
	dsDNA	Nukleär granulär (1:100)
	PCNA	Nukleär granulär (1:100)
	SS-A	Nukleär granulär (1:320)
SS-A	PCNA	Nukleär granulär (1:100)
	3x SS-B	Nukleär granulär (1:1000)
	SS-B	Nukleär granulär (1:3200)
	Ku	Nukleär granulär (1:3200)
nRNP/Sm	Sm	Nukleär granulär (1:3200)
	Rib. P-Protein	Nukleär granulär (1:1000)
PCNA	Ku	Nukleär granulär (1:320)

7.5 Tafel zur Bestimmung von Immunfluoreszenzmustern auf HEp-2-Zellen

EUROIMMUN

Medizinische
Labordiagnostika
AG

Strategie zur Bestimmung von Autoantikörpern gegen Zellkerne (ANA) und Cytoplasma-Bestandteile

Suchtest (Indirekte Immunfluoreszenz): Humane Epithelzellen (HEp-2) und Primatenleber

Zellkerne homogen

Interphase: homogen Chromosomenbanden: positiv

Muster homogen

Zellkerne peripher

Kernmembran positiv

AAK gegen Lamine, gp210, p62
CFS, Kollagenosen
PBC, CAH

Nucleoplasm gepunktet

HEp-2: 6-20 Punkte
Leber: mehrere Punkte

AAK gegen Nuclear Dots
PBC
Rheumatische Erkrankg. 30-3%

HEp-2: 2-6 Punkte
Leber: positiv oder negativ

AAK gegen Few Nuclear Dots
SS, SLE, PBC

HEp-2: 46/92 Punkte
Leber: schwache Reaktion

AAK gegen Zentromere
PSS, lim. 80-95%

Nucleoli positiv

Nucleoli betont Nucleoplasm homogen

Muster Scl-70

Nucleoli homogen

AAK gegen PM-ScI und andere Antigene
PM, DM, PSS, diff.

Nucleoli feingranulär

AAK gegen Fibrillarin
PSS, diff.

Nucleoli grobgranulär

AAK gegen RNS-Polymerase I
PSS, diff.

Nucleoli granulär Mitosen einzelne Punkte

AAK gegen RNS-Polymerase I & NOR
PSS

Cytoplasma positiv

HEp-2: homogen Leber: positiv (helle Flecken)

Muster Ribosomen

ELISA Anti-Ribosomale-P-Proteine
AAK gegen Rib. P-Pr
SLE 5-20%

Nucleoplasm granulär

HEp-2: grobgranulär Leber: starke Fluoreszenz

Muster nRNP/Sm

HEp-2: feingranulär, Nucleoli oft betont. Leber: schwache Fl.

Muster SS-A/SS-B

HEp-2: granulär Leber: schollig, granulär

SLE AAK gegen Ku
SLE Überlappungssyndrome 30-55%

untersch. reaktiv Mitosen neg.

AAK gegen PCNA (Cyclin I)
SLE

untersch. reaktiv Mitosen pos.

AAK gegen Mitosen (Cyclin II)
diverse Malignome

Cytoplasma granulär

HEp-2: feingranulär Leber: schwach

Muster Jo-1

HEp-2: grobgranulär Leber: positiv

Muster AMA

HEp-2 und Leber: Cytoplasma granulär oder tropfenförmig

AAK gegen „Lysosomen“
Klinische Assoziation: ?

HEp-2: perinuclear Leber: positiv

AAK gegen Golgi-Apparat
SS, SLE, RA

HEp-2: Mitosestadien positiv

kond. Chromosomen positiv

AAK gegen Chrom-assoz. Ag
Klin. Assoz.: ?

Spindelapparat positiv

AAK gegen Spindelfasern (rheumatische Erkrankungen)

Trennzone positiv

AAK gegen Trennzone
Klin. Assoz.: ?

Zellpole positiv

AAK gegen Zentriolen
Klin. Assoz.: ?

Cytoplasma filamentös

HEp-2 und Leber: feine Fasern. Tröpfchen in den Mitosen

AAK gegen Vimentin
Klinische Assoziation: ?

HEp-2: Faserschlingen Leber: Fasern im Parenchym

AAK gegen Tropomyosin
Klinische Assoziation: ?

HEp-2: Bündel nadelförm. Fasern Leber: Gallenacanthosis

AAK gegen Actin
CAH 40-90%

Anti-dsDNS, -Histone, Nukleosomen

AAK gegen dsDNS
SLE 30-90%

AAK gegen Histone
Med. ind. LE 95%
SLE 30-70%

AAK gegen Nukleosomen
SLE 40-70%

ELISA Anti-nRNP/Sm / Anti-Sm
ELISA/EUROASSAY Anti-ENA ProfilPlus

AAK gegen U1-nRNP
MCTD 95-100%
SLE 15-40%

AAK gegen Sm
SLE 5-30%

ELISA Anti-SS-A / Anti-SS-B
ELISA/EUROASSAY Anti-ENA ProfilPlus

AAK gegen SS-A (Ro 60 kDa)
SS 40-95%
SLE 20-60%
neonat. LE 100%

AAK gegen SS-B
SS 40-95%
SLE 10-20%

Systemischer Lupus erythematoses (SLE)

Autoantikörper gegen	Prävalenz
Deposition von DNS (dsDNS)	30-90%
Nukleosomen	40-70%
Histone	10-60%
U1-nRNP	15-40%
Sm	15-40%
SS-A (Ro)	5-30%
SS-B (La)	20-60%
PCNA (Cyclin I)	10-20%
Zn	3%
Rheumafaktoren	5-10%
Ribosomale P-Proteine	5-20%
Cardiolipin, E2-Glykoprotein	30-40%
Ro-52	38%

Mischkollagenose (MCTD, Sharp-Syndrom)

Autoantikörper gegen	Prävalenz
U1-nRNP	95-100%
Ro-52	19%

Rheumatoide Arthritis

Autoantikörper gegen	Prävalenz
Histone	selten
Rheumafaktoren	68-80%
CCP (Phagozyt-Epitolip)	70-80%
Citrullinase Ig	32-61%
Ro-52	5%

Progressive Systemisklerose (diffuse Form)

Autoantikörper gegen	Prävalenz
Fibrillarin (U3-nRNP)	5-10%
PM Scl75, PM Scl100	20%
Scl 70	50%
RNS-Polymerase I	4%
72-nRNP (Tc)	selten
NOR (NOR 90)	selten
Zentromere	8%
Ro-52	28%

Polymyositis und Dermatomyositis

Autoantikörper gegen	Prävalenz
PM Scl	8%
Jo-1 (Helicoly-RNS-Synthetase)	25-35%
Me-2	5%
Ku	5-5%
PL-3 PL-12	3-4%
SRP	5%
Ro-52	31%

Primäres Sjögren-Syndrom

Autoantikörper gegen	Prävalenz
SS-A (Ro)	40-95%
SS-B (La)	40-95%
Leber-Niere-Mitosen (LKM-1)	30-40%
Speicheldrüsen-Ausführungsgänge	7%
Rheumafaktoren	60-80%
LC1	10-30%
Ro-52	81%

Neonataler Lupus erythematoses

Autoantikörper gegen	Prävalenz
SS-A	100%

Medikamenten-induzierter Lupus

Autoantikörper gegen	Prävalenz
Histone	95%

Autoimmun-Hepatitis (AIH)

Autoantikörper gegen	Prävalenz
AMA (Typ I/AMA1)	40-95%
ANA (Lamine, SS-A u. a.)	30-40%
Leber-Niere-Mitosen (LKM-1)	7%
Speicheldrüsen-Ausführungsgänge	60-80%
LC1	10-30%
Ro-52	81%

Primär-biliäre Leberzirrhose

Autoantikörper gegen	Prävalenz
M2 (Mitochondrien-POC)	95%
M3 (SFO-Antikörperkomplexe)	93%
BCOADC, POC, ODCD	30-40%
Speicheldrüsen-Ausführungsgänge	30%
Kernmembran: Lamine, gp210, p62	10-30%
Ro-52	27%

Autoantikörper gegen

Autoantikörper gegen	Prävalenz
AAK: Autoantikörper	95%
Anti-dsDNS	30-90%
Anti-Histone	30-70%
Anti-Nukleosomen	40-70%
Anti-U1-nRNP	15-40%
Anti-Sm	15-40%
Anti-SS-A	40-95%
Anti-SS-B	40-95%
Anti-PCNA	30-55%
Anti-PCNA (Cyclin I)	10-20%
Anti-Zn	3%
Anti-Rheumafaktoren	5-10%
Anti-Ribosomale P-Proteine	5-20%
Anti-Cardiolipin, E2-Glykoprotein	30-40%
Anti-Ro-52	38%

Autoantikörper gegen

Autoantikörper gegen	Prävalenz
Anti-AMA	40-95%
Anti-ANA	30-40%
Anti-Scl-70	25-35%
Anti-Jo-1	25-35%
Anti-PCNA	30-55%
Anti-Mitosen	80-90%
Anti-Vimentin	?
Anti-Tropomyosin	?
Anti-Actin	40-90%

EUROLINE Profile

Mycositis-ass. Ag

EUROLINE ANA-Profil 3

AAK gegen M-2, Ku, Jo-1, PM-Scl, SRP, PL-3, PL-12, EJ, OJ, Ro-52

u. a. CENP B, RNP Rib. P-Pr, PCNA, SS-A, Ro-52, Jo-1

EUROIMMUN AG · D-23560 Lübeck · Seekamp 31

HA_1900_1_DE_B04_10/2009

Telefon 0 45 1 / 58 55 - 0 · Telefax 58 55 - 591 · euroimmun@euroimmun.de

Abbildung 13: Tafel zur Bestimmung von Autoantikörpern gegen Zellkerne und Zytoplasma-Bestandteile.

Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Detlef Zillikens für die Bereitstellung der Forschungslabore und die persönliche Förderung und Beratung in der wissenschaftlichen Arbeit.

Ebenso gilt mein außerordentlicher Dank Herrn Prof. Ralf Ludwig für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Beratung und nicht zuletzt für die stets fröhliche Motivation. Weiterhin möchte ich ihm für den Vorschlag zur Förderung durch das Graduiertenkolleg 1727 danken. Dieses und seine Mitglieder ermöglichten mir als Medizinstudenten intensiv in die Welt der Forschung einzutreten und einen spannenden Austausch mit internationalen Kulturen zu erleben.

Herrn Prof. Winfried Stöcker danke ich für die Übernahme des Mentorats, für die Möglichkeit als Gast in seinen Laboren die Validierung und Spezifizierung der ANAs durchzuführen und in dieser Zeit im Mitarbeiterrestaurant köstlich gespeist haben zu dürfen.

Herrn Prof. Saleh Ibrahim danke ich ebenfalls für die Übernahme des Mentorats und die wissenschaftliche Beratung.

Für die Unterstützung und Beratung während der experimentellen Arbeiten danke ich Frau Dipl. biol. Susen Müller, Frau Rebecca Cames und Frau Miriam Freitag aus den dermatologischen Forschungslaboren der Uni Lübeck sowie Frau Kristin Rentzsch, Frau Manja Kowalke und Frau Sonja Oberbeck als verlässliche Ansprechpartner von der Euroimmun AG.

Herrn Dr. Steffen Möller danke ich für die kreative Beratung und Unterstützung im Umgang mit genetischen Datenbanken und Herrn Dr. Andreas Recke für die Beratung bei statistischen Fragestellungen und Auswertungen.

Meinen Eltern danke ich ganz herzlich für die beständige Unterstützung während meiner Arbeit an der Dissertation.

Meinen Schwiegereltern möchte ich für die stete Motivation danken.

Meiner Ehefrau Wiebke danke ich zutiefst, hier fehlen mir die Worte.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Jasper Niclas Prüßmann
geboren am 13. April 1988 in Lübeck
verheiratet mit Wiebke Prüßmann, geb. Jung

Schulabschluss: 2007 Abitur, Note 1,4

Studium:

10/2007 Beginn des Studiums Humanmedizin, Universität zu Lübeck

04/2009 – 07/2009 Wahlfach „Anatomie des Immunsystems“ bei Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

09/2009 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note sehr gut (1,0)

04/2011 – 03/2012 Promotionssemester

10/2012 – 02/2013 Wahlfach „Klinische Rheumatologie“ bei Prof. Dr. med. Peter Lamprecht

11/2014 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note sehr gut (1,5)

Praktisches Jahr:

08/2013 – 12/2014 Klinik für Dermatologie und Venerologie, UKSH, Campus Lübeck

12/2013 – 03/2014 Klinik für Innere Medizin, Sophien- und Hufeland Klinikum, Weimar

03/2014 – 07/2014 Klinik für Chirurgie, UKSH, Campus Lübeck

Promotion:

07/2010 Beginn der Promotion in der Klinik für Dermatologie, Universität zu Lübeck, AG Kutane Autoimmunität bei Prof. Dr. med. Ralf Ludwig

08/2010 – 12/2012 Durchführung der experimentellen Arbeiten

04/2011 – 03/2012 Stipendiat des Graduiertenkollegs 1727 „Modulation von Autoimmunität“ zur Vertiefung der Promotion

12/2014 Fertigstellung der Arbeit

Veröffentlichungen

1. **Prüßmann J***, Prüßmann W*, Recke A, Rentzsch K, Juhl D, Henschler R, Müller S, Lamprecht P, Schmidt E, Csernok E, Görg S, Stöcker W, Zillikens D, Ibrahim SM, Ludwig RJ. Co-occurrence of autoantibodies in healthy blood donors. *Exp Dermatol*. 2014. *equal contributors
2. Prüßmann W*, **Prüßmann J***, Koga H*, Recke A, Iwata H, Juhl D, Görg S, Henschler R, Hashimoto T, Schmidt E, Zillikens D, Ibrahim SM and Ludwig RJ. Prevalence of pemphigus and pemphigoid autoantibodies in the general population. Submitted in revised version. *equal contributors

Kongressbeiträge

1. **Prüßmann J***, Jung W*. Incidence and Clustering of Autoantibodies in Blood Donors. Oral Presentation. Symposium of the North German Immunologists, Borstel 2012. *equal contributors
2. **Prüßmann J***, Jung W*, Recke A, Rentzsch K, Juhl D, Henschler R, Müller S, Lamprecht P, Schmidt E, Csernok E, Görg S, Stöcker W, Zillikens D, Ibrahim SM and Ludwig RJ. Prevalence and co-occurrence of autoantibodies in healthy blood donors. Poster Presentation. International Pre IID Meeting on Autoimmune Bullous Diseases, Lübeck. 2013. *equal contributors
3. Jung W*, **Prüßmann J***, Recke A, Stöcker W, Juhl D, Henschler R, Görg S, Zillikens D, Ibrahim SM, Schmidt E and Ludwig RJ. Prevalence of pemphigus and pemphigoid autoantibodies in the general population. Poster Presentation. International Investigative Dermatology, Edinburgh. 2013. *equal contributors