

Aus der Poliklinik und Funktionsbereich für Rheumatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

K. Direktor: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schneider

Diagnostische Wertigkeit eines
Multiplex Autoantikörper Assays
bei systemischem Lupus erythematodes

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Paloma Böhmer Romero

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:l

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Matthias Schneider

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Fritz Boege

Meinen Eltern und Roxana
in Dankbarkeit gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Vordenbäumen, S., Böhmer, P., Brinks, R., Fischer-Betz, R., Richter, J., Bleck, E., Rengers, P., Göhler, H., Zucht, H. D., Budde, P., Schulz-Knappe, P., Schneider, M., 2018, High diagnostic accuracy of histone H4-IgG autoantibodies in systemic lupus erythematosus, *Rheumatology (Oxford)*, Volume 57, Issue 3, Seiten 533-537

Deutsche Zusammenfassung

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine sehr heterogen verlaufende systemische Autoimmunerkrankung aus dem Formenkreis der Kollagenosen. Der variable Verlauf und die unterschiedlichen Symptome des SLE erschweren die Diagnosestellung. Das macht die Suche nach einem spezifischen und zugleich sensitiven diagnostischen Mittel so bedeutend. Die Autoantikörper-Bestimmung gegen Zellkernantigene ist ein wichtiger Bestandteil in der Diagnostik des SLE.

Ziel dieser Arbeit war es zu beurteilen, ob ein Multiplex Assay (MA) mit erweitertem Antigenspektrum bei der Differenzierung des SLE einen zusätzlichen Nutzen bietet. Es wurde ein MA aus 31 Antigenen mit einem Magpix-basierten Verfahren untersucht und mit einem Standard Assay (SA) verglichen, der üblicherweise zum Screening verwendet wird. Der SA enthielt SSA (60kDa), SSA (52kDa), SSB, U1-RNP und Sm als Antigene, die mittels Immunoblot analysiert wurden. Seren von 153 SLE-Patienten (85 % weiblich, Alter $41 \pm 13,5$ Jahre) und 81 gesunden Kontrollen (76,8 % weiblich, $43,3 \pm 12,4$ Jahre) wurden untersucht.

Der Vergleich von in beiden Assays enthaltenen Antikörpern zeigte eine gute Übereinstimmung und einen guten diagnostischen Wert in der ROC-Analyse (AUC 84,8-93,2) bei nur drei positiven gesunden Kontrollen im MA (3,7 %). Von den nur im MA zusätzlich enthaltenen Antikörpern waren bei SLE-Patienten sieben Antikörper signifikant erhöht (RPLP2, b2GP, HIST2H2AC, HIST1H4A, PRTN3, SRP, CENPB). Davon war HIST1H4A-IgG der Marker mit der besten Trennschärfe für die Diagnose des SLE (AUC 0,97, Sensitivität 95 % bei einer Spezifität von 90 %). Während der SA die Vorhersage der Krankheitsaktivität durch die Berücksichtigung von b2GP-Antikörpern nur leicht verbesserte, zeigte sich eine deutliche Verbesserung durch die Berücksichtigung von HIST1H4A-Antikörpern. Der qualitative Nachweis von HIST1H4A-IgG ist wie Schaden (SDI), CRP, C3c und anti-dsDNA Antikörper unabhängig assoziiert zu der durch den SLAM erfassten Krankheitsaktivität. Dabei waren hohe Spiegel an HIST1H4A-IgG assoziiert mit einer niedrigen Krankheitsaktivität.

Der in dieser Forschungsarbeit untersuchte MA kann einen potentiellen zusätzlichen Nutzen bieten bei der Diagnose und bei der Einschätzung der Krankheitsaktivität des SLE.

Englische Zusammenfassung

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a very heterogeneous systemic autoimmune disease from the group of collagen diseases. The variable course and the different symptoms of SLE complicate the diagnosis. This is what makes the search for a specific yet sensitive diagnostic tool so important. The determination of autoantibodies against nuclear antigens is an important part of the diagnosis of SLE.

The aim of this work was to assess whether a multiplex assay (MA) with an extended antigen spectrum offers additional benefit in the differentiation of SLE. A MA of 31 antigens was analyzed using a Magpix-based method and compared to a standard assay (SA) commonly used for screening. The SA contained SSA (60kDa), SSA (52kDa), SSB, U1-RNP and Sm as antigens analyzed by immunoblot. Sera from 153 SLE patients (85 % female, age 41 ± 13.5 years) and 81 healthy controls (76.8 % female, age 43.3 ± 12.4 years) were examined.

Comparison of antibodies contained in both assays showed good agreement and diagnostic value in ROC analysis (AUC 84.8-93.2) with only three positive healthy controls in MA (3.7 %). Of the antibodies only additionally contained in the MA, seven antibodies were significantly increased in SLE patients (RPLP2, b2GP, HIST2H2AC, HIST1H4A, PRTN3, SRP, CENPB). Of these, HIST1H4A-IgG was the marker with the best selectivity for the diagnosis of SLE (AUC 0.97, sensitivity 95 % with a specificity of 90 %). While the SA only slightly improved the prediction of disease activity when b2GP antibodies were taken into account, a significant improvement was shown by including HIST1H4A. Like damage (SDI), CRP, C3c and anti-dsDNA antibodies, the qualitative detection of HIST1H4A-IgG is independently associated with the disease activity measured by the SLAM. High levels of HIST1H4A IgG were associated with low disease activity.

The MA studied in this research may offer potential added value in the diagnosis and assessment of disease activity in SLE.

Abkürzungsverzeichnis:

ABIM	American Board of Internal Medicine
ACLE	Akut kutaner Lupus erythematoses
ACR	American College of Rheumatology
ALBIA	Adressable Laser Beads Immunoassays
ANA	Antinukleäre Antikörper
APS	Antiphospholipidsyndrom
AUC	Area under the curve
CAPS	Carotid Atherosclerosis Progression Study
CarP	Carbamyliertes Peptid
CCD	Charge-coupled-Device
CCLE	Chronisch kutaner Lupus erythematoses
CCP	cyklisch-citrulliniertes Peptid
CT	Computertomographie
DGRh	Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie
DILE	drug-induced lupus erythematosus = Medikamenten induzierter Lupus erythematoses
DNA	deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	double-stranded DNA = doppelsträngige DNA
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENA	Extrahierbare nukleäre Antikörper
EULAR	European League Against Rheumatism
ICC	Intraklassenkorrelation
ID	Idiotyp
IFT	Immunfluoreszenztest
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
INF	Interferon
LIA	Line Immunoassay
MA	Multiplex Assay
MAK	Membran-Angriffs-Komplex
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität

MMF	Mycophenolat-Mofetil
MRT	Magnetresonanztomographie
MTX	Methotrexat
NA	Nicht Anwendbar
NET	Neutrophil extracellular Traps = neutrophile extrazelluläre Netze
NLE	Neonataler Lupus erythematoses
NPV	Negativer prädiktiver Wert
PPV	Positiver prädiktiver Wert
PRTN3	Proteinase 3
RPLP2	ribosomal protein lateral stalk subunit P2
RIA	Radioimmunoassay
RNA	ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
ROC	Receiver Operating Characteristics
RPM	revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
SA	Standard Assay
SCLE	Subakut kutaner Lupus erythematoses
SD	Standard deviation = Standardabweichung
SDI	SLICC/ACR Damage Index = SLICC/ACR Schädigungsindex
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
SLICC	Systemic Lupus International Collaborating Clinics
Sm	Smith
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
ssDNA	single-stranded DNA = einsträngige DNA
SRP	signal recognition particle
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Systemischer Lupus erythematoses	1
1.1.1	Einordnung der Erkrankung.....	1
1.1.2	Epidemiologie	1
1.1.3	Ätiologie und Pathogenese.....	2
1.1.4	Klinik.....	4
1.1.5	Diagnose.....	4
1.1.6	Therapie.....	7
1.2	Rheumatologische Diagnostik	8
1.2.1	Allgemein	8
1.2.2	Multiplex Assays	14
1.3	Ziele der Arbeit	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Patienten und Kontrollen	18
2.2	Materialien	20
2.2.1	Lösungen und Geräte.....	20
2.2.2	Multiplex Antikörper Assay	21
2.3	Luminex® xMAP®	22
2.4	Statistische Methoden	26
3	Ergebnisse	28
3.1	Vergleich des Multiplex Assay mit einem Standard Assay	28
3.2	Diagnostische Leistung von individuellen Antikörpern	29
3.3	Einschätzung der Krankheitsaktivität	32
3.4	Diagnostische Leistung und Vergleich von Autoantikörper-Kombinationen einschließlich Histon-Antikörpern	33
4	Diskussion	35
4.1	Allgemein	35
4.2	Vergleich des Multiplex Assay mit einem Standard Assay	37
4.3	Einschätzung der Krankheitsaktivität	38
4.4	Diagnostische Leistung von individuellen Antikörpern	41
4.5	Schwächen der Studie	42
5	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	43
6	Literaturverzeichnis	45
	Danksagung	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Relative Wichtung der EULAR/ACR-Klassifikationskriterien des systemischen Lupus erythematoses.	6
Tabelle 2. Eigenschaften der Patienten (203).....	19
Tabelle 3. Lösungen und Geräte.	20
Tabelle 4. Antigene des Multiplex Assays.....	21
Tabelle 5. Retest-Reliabilität des Multiplex ENA Assays.....	28
Tabelle 6. Diagnostische Leistung des ENA Multiplex Assays.....	29
Tabelle 7. Nachweis von Autoantikörpern bei SLE und Kontrollen durch Multiplex Assay.....	30
Tabelle 8. Diagnostische Leistung von ausgewählten individuellen Antikörpern aus dem Multiplex Assay für die Diagnose ‚SLE‘ vs. ‚Gesund‘.....	31
Tabelle 9. Kontingenztabelle für die Häufigkeit von dsDNA-Antikörpern im Vergleich zu HIST1H4A-IgG bei SLE-Patienten.	32

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Beispielhafte Darstellung einer 96er half area-Platte mit 3-fach Bestimmungen.	23
Abbildung 2. Darstellung der Beads und der unterschiedlichen Kombinationen aus einem roten und einem infraroten Farbstoff.	23
Abbildung 3. Überblick über das Verfahren des Luminex xMAP Immunassay.	24

1 Einleitung

1.1 Systemischer Lupus erythematodes

1.1.1 Einordnung der Erkrankung

Der systemische Lupus erythematodes (SLE) ist eine systemische Autoimmunerkrankung mit variablem schubförmigem Verlauf, die zu den Kollagenosen gezählt wird. Ein Befall nahezu aller Organsysteme, z. B. von Haut, Gelenken, Nieren, serösen Häuten und des Nervensystems ist möglich (1). Insbesondere die Beteiligung von inneren Organen ist entscheidend für die Prognose und beeinflusst somit auch die Therapie (2).

1.1.2 Epidemiologie

Die Angaben zur Prävalenz des SLE variieren in der Literatur und Studien zur Epidemiologie sind oft Gegenstand der Forschung.

Im Jahr 2002 lag laut einem Datensatz der gesetzlichen Krankenversicherung in Deutschland die Prävalenz von diagnostiziertem SLE in Deutschland bei 37/100.000 mit einem Geschlechterverhältnis von Frauen zu Männern von 4:1 (3). In anderen Ländern reicht die Prävalenz von 10/100.000 bis 159/100.000 (4–11). Dabei ist die Prävalenz bei Afrikanern, Afroamerikanern, Lateinamerikanern, Asiaten und Personen aus der Karibik am höchsten und Afrikaner, Lateinamerikaner und Asiaten haben ein höheres Risiko eine schwerwiegendere Form des SLE zu entwickeln (9).

Die Mortalität des SLE hat sich seit den 1950er Jahren deutlich verbessert, vor allem durch frühere Diagnosestellung und bessere Therapiemöglichkeiten (12). Die 4-Jahres-Überlebensrate lag 1955 noch bei 51 % (13). Im Vergleich dazu liegt die 5-Jahres-Überlebensrate seit den 1990er Jahren bei ungefähr 90 % und die 10-Jahres-Überlebensrate bei ungefähr 80 % (14–19). Bernatsky et al. zeigten in einer internationalen Studie an 9.547 SLE-Patienten, dass die standardisierte Mortalitätsrate besonders hoch ist bei weiblichem Geschlecht, jüngerem Alter und einer Krankheitsdauer von unter einem Jahr (20).

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Es sind unterschiedliche genetische, hormonelle, umweltbedingte als auch das Immunsystem betreffende Faktoren bekannt, die an der Entstehung des SLE beteiligt sind (21–24).

Für eine genetische Veranlagung des SLE sprechen unter anderem die Konkordanzraten bei monozygoten Zwillingen mit 24 % im Vergleich zu 2 % bei dizygoten Zwillingen (25). Ursächlich kann ein kombinierter Effekt von mehreren Genen oder seltener auch der Verlust eines einzelnen Gens sein (wie z. B. der Komplement-Komponenten C1q oder C4) (26–32).

Zu den Hauptmerkmalen des SLE gehören die Autoantikörperproduktion, die Aktivierung des Komplementsystems und die Ablagerung von Immunkomplexen im Gewebe (33). Für die Produktion der typischen Autoantikörper werden vor allem fehlregulierte T-Helferzell- und B-Zell-Interaktionen verantwortlich gemacht (34–36). Dabei kommt es durch den Verlust der Immuntoleranz gegen körpereigene Antigene zu hyperaktiven B-Zellen, die Autoantikörper produzieren. Diese Autoantikörper sind vor allem gegen DNA (Desoxyribonukleinsäure) und RNA (Ribonukleinsäure)-assoziierte Epitope gerichtet und werden antinukleäre Antikörper (ANA) genannt (37). Allgemein werden unter ANA „alle Antikörper zusammengefasst, die mit nicht gewebespezifischen Zellkernantigenen reagieren“ und zu ihnen gehören z. B. Antikörper gegen einsträngige (single strand=ss) und doppelsträngige (double strand=ds) DNA, Histone und Nukleosome (38).

Warum die Autoantikörper bei SLE vor allem gegen Zellkernbestandteile gerichtet sind, ist noch nicht endgültig verstanden. Während des Reifungsprozesses werden diese Zellkernbestandteile weniger wahrscheinlich dem Immunsystem ausgesetzt und durchlaufen nicht dieselben Mechanismen der Selbstpräsentation wie zytosolische und sekretorische Proteine. Daher könnten diese Zellkernbestandteile bei der Präsentation wahrscheinlicher als Nicht-Selbst erkannt werden (37). Es gibt jedoch auch Antikörper gegen zytoplasmatische Antigene wie das ribosomale P-Protein, gegen Komplementfaktoren, Zelloberflächenmoleküle oder Phospholipide (39).

Sobald Antikörper im Gewebe oder im Blutstrom sind, können sie Immunkomplexe durch Vernetzung mit ihren Antigenen bilden. Diese Immunkomplexe lagern sich in Geweben wie der Haut, der Niere und dem zentralen Nervensystem (ZNS) ab und

führen so zu Entzündungen, indem sie das Komplementsystem aktivieren (40). Antikörper gegen Phospholipide führen eher zu einer Thrombophilie (41).

Viele ANA-positive Menschen bleiben gesund, was andeutet, dass zusätzliche Immundysregulationen an der SLE-Pathogenese beteiligt sein müssen. Um herauszufinden, ob noch andere Signalwege bei SLE-Patienten fehlreguliert sind, untersuchten Lu et al. in ihrer Studie die Proben von 84 Individuen, denen vor der SLE Diagnosestellung (durchschnittlicher Zeitraum bis zur Diagnose: 5,98 Jahre) Seren abgenommen worden sind und verglichen sie mit gesunden Kontrollen. Es wurden SLE-assoziierte Antikörper und lösliche Mediatoren untersucht. Dabei fand man heraus, dass viele lösliche Mediatoren, einschließlich Interleukin (IL)-5, IL-6 und Interferon- γ (IFN- γ), in Krankheitsfällen signifikant erhöht waren, z. T. mehr als 3,5 Jahre vor der Klassifikation, als auch vor oder gleichzeitig mit Autoantikörper-Positivität. Zusätzlich stiegen noch andere Mediatoren in den Fällen an, die sich der SLE Diagnosestellung annäherten, aber nicht in den Kontrollen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Immundysregulationen einschließlich mehrerer unterschiedlicher Signalwege zur SLE-Pathogenese beitragen. Insbesondere können bestimmte immunologische Profile prognostisch sein für die Entwicklung eines klinischen SLE und vielleicht sogar nützlich sein, um neue therapeutische Ziele zu entdecken (42).

Neben dem erworbenen Immunsystem mit Antikörper-Bildung spielt auch das angeborene Immunsystem eine wichtige Rolle in der Entstehung des SLE. 2004 entdeckten Brinkmann et al. einen neuen antimikrobiellen Abwehrmechanismus der neutrophilen Granulozyten. Bei dieser Art des Zelltodes bilden diese neutrophile extrazelluläre Netze (NET = neutrophil extracellular traps) um Erreger sozusagen einzufangen (43). Wenn NETs jedoch nicht rechtzeitig entfernt werden, schädigen sie das Gewebe und können ein Ursprung von neuen Autoantigenen sein (44). Zwei Studien aus den Jahren 2010 und 2012 zeigten außerdem, dass ein gestörter NET Abbau mit erhöhten anti-dsDNA Antikörper Titern assoziiert ist (45,46). Dies könnte also ein zusätzliches Ziel bei der Autoantikörper-Bildung sein.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil in der Ätiopathogenese des SLE scheint die Apoptose zu sein und zwar in Kombination mit einem Defizit an Elimination von apoptotischen Zellen bzw. Zellmaterial. Diese Beseitigung von Zellen oder Chromatin,

die bei der Apoptose entstehen, nimmt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Gewebe-Homöostase und bei dem Schutz des Gewebes vor entzündlichen und immunogenen Inhalten ein. Nach oxidativem Stress durch UV-Licht, Traumata und möglicherweise Virus-Infektionen gehen vermehrt Zellen in Apoptose und durch mangelnde Entfernung der apoptotischen Zellen kann es zu einer erhöhten Menge an potentiellen Autoantigenen kommen und somit die Bildung von Autoantikörpern begünstigt werden (47–50).

Zusammenfassend ist die Ätiopathogenese des SLE komplex, wahrscheinlich durchaus mit interindividuellen Unterschieden und bis zum heutigen Tag noch unvollständig verstanden.

1.1.4 Klinik

Die Klinik des SLE ist äußerst variabel und kann sowohl auf die Haut beschränkt sein als auch innere Organe betreffen. Die meisten SLE-Patienten haben unspezifische Symptome wie Abgeschlagenheit oder Myalgien und eine B-Symptomatik (Fieber, Gewichtsverlust, Nachtschweiß). Typisch für den SLE sind Hautbeteiligungen, zum Beispiel in Form eines Schmetterlingserythems, Arthralgien, eine Beteiligung der serösen Häute in Form einer Pleuritis oder Perikarditis, außerdem Entzündungen der Nieren, des zentralen Nervensystems (ZNS) und des hämatologischen Systems. Die Lupusnephritis und der neuropsychiatrische Lupus gehören zu den schwerwiegendsten Verlaufsformen im Rahmen einer Organbeteiligung und können zu einer deutlich eingeschränkten Lebenserwartung führen (51).

1.1.5 Diagnose

Die frühzeitige richtige Diagnosestellung nimmt beim SLE eine entscheidende Rolle ein, da dadurch die frühestmögliche Therapie, der Krankheitsverlauf und somit die Prognose maßgeblich verbessert werden können (52). Erschwerend kommt hinzu, dass der SLE eine Erkrankung ist, die einen variablen rezidivierenden und remittierenden Verlauf nehmen und die potentiell jedes Organ betreffen kann. Es kann zum Beispiel zum einen Verläufe geben, die nur mit Allgemeinbeschwerden oder Gelenkbeschwerden beginnen, und zum anderen auch schwerwiegendere Verläufe mit

Organbeteiligungen von Beginn an. Das macht die Suche nach einem verlässlichen diagnostischen Mittel umso wichtiger (53).

Bei der Diagnosesicherung, zumeist durch einen Spezialisten, spielen Antikörper eine wichtige Rolle. Durch eine schnelle Zuordnung über Antikörper und eine darauffolgend gezielte Therapie können nämlich Remissionsraten und die Prognose verbessert werden (54). Zudem können Antikörper die früheste Manifestation eines SLE sein und als erster diagnostischer Hinweis dienen, weil sie schon Jahre vor einer Diagnosestellung nachweisbar sein können (55–58). In Zukunft werden weitere Biomarker in der Diagnostik immer mehr an Bedeutung gewinnen, „um den SLE von anderen Krankheiten zu unterscheiden und um die Krankheitsaktivität zu überwachen“ (59).

Eine Klassifikation für den SLE ist das erste Mal im Jahr 1971 von dem American College of Rheumatology (ACR) entwickelt worden. Seitdem folgten Überarbeitungen, unter anderem in den Jahren 1982 und 1997.

Im Jahr 2012 wurden die SLICC Kriterien von den Systemic Lupus International Collaborating Clinics vorgestellt, die auf neuen Erkenntnissen über Autoantikörper und der Wichtigkeit von erniedrigten Komplementfaktoren basieren (59). Im Vergleich zu der ACR-Klassifikation zeigten die SLICC Kriterien bei einer Validierungsstichprobe bei 690 SLE-Patienten weniger Fehldiagnosen (62 im Gegensatz zu 74) und eine höhere Sensitivität (97 % versus 83 %), aber eine niedrigere Spezifität (84 % versus 96 %) (60).

2019 wurden neue Klassifikationskriterien für die Diagnostik des SLE vorgestellt, die von der European League Against Rheumatism (EULAR) und dem American College of Rheumatology (ACR) erarbeitet wurden (siehe Tabelle 1). Hierbei gilt der mindestens einmalige Nachweis von ANA als Einschlusskriterium. Zudem gibt es sieben klinische und drei immunologische Gebiete, denen Kriterien zugeteilt sind, die je mit einer Punktzahl von 2 – 6 gewertet werden. Um die Kriterien für einen SLE zu erfüllen, muss eine Mindestpunktzahl von 10 erreicht werden.

Tabelle 1. Relative Wichtung der EULAR/ACR-Klassifikationskriterien des systemischen Lupus erythematoses.

Gebiet	Kriterium	Wichtung
Klinisch		
Konstitutionell	Fieber	2
Hämatologisch	Leukopenie	3
	Thrombozytopenie	4
	Autoimmunhämolyse	4
Neuropsychiatrisch	Delir	2
	Psychose	3
	Krampfanfall	6
Mukokutan	Alopezie	2
	Orale Ulzerationen	2
	SCLE/DLE	4
	ACLE	6
Serosa	Erguss	5
	Akute Perikarditis	6
Muskuloskeletal	Gelenkbeteiligung	6
Renal	Proteinurie	4
	Klasse II/V	8
	Klasse III/IV	10
Immunologisch		
Antiphospholipid-AK	Antiphospholipid	2
Komplement	C3 oder C4 vermindert	3
	C3 und C4 vermindert	4
SLE-spezifische AK	Anti-Sm	6
	Anti-dsDNA	6

Die vereinfachte relative Wichtung der EULAR/ACR-Klassifikationskriterien (European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology), die aus dem Phase III Konsensmeeting aus dem Jahr 2019 abgeleitet wurden. Für die Klassifikation eines SLE muss durch Addition der relativen Wichtung der Kriterien eine Mindestpunktzahl von 10 erreicht werden. ACLE = Akut kutaner Lupus erythematoses. AK = Antikörper. DLE = Diskoider Lupus erythematoses. SCLE = Subakut kutaner Lupus erythematoses. SLE = Systemischer Lupus erythematoses.

Zudem hat die European League Against Rheumatism (EULAR) Empfehlungen für die Überwachung von Patienten mit SLE in der klinischen Praxis entwickelt. Ziel dieser Empfehlungen ist es mittels eines validierten Aktivitätsinstruments eine standardisierte Einschätzung der Krankheitsaktivität, der Organbeteiligung und der Komorbiditäten, wie kardiovaskuläres Risiko, Osteoporose und Infektionsrisiko, zu bieten (61).

Die Krankheitsaktivität kann beschrieben werden als die „reversible Manifestation des zugrundeliegenden inflammatorischen Prozesses“ und „reflektiert die Art und den Schweregrad der Organbeteiligung“ (62). Die Beurteilung der Krankheitsaktivität nimmt eine wichtige Rolle ein, da durch sie unter anderem ein Krankheitsschub definiert werden kann. Obwohl es keine allgemein gültige Definition des Krankheitsschubes gibt, sind sich viele Experten einig, dass ein Schub als ein messbarer Anstieg der Krankheitsaktivität definiert werden kann, der in einer Änderung der Therapie resultiert (63).

Für die Beurteilung der Krankheitsaktivität gibt es unterschiedliche Scores, wie den „British Isles Lupus Assessment Group“ (BILAG), den „European Consensus Lupus Activity Measure“ (ECLAM), den „Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index“ (SLEDAI) oder den „Systemic Lupus Activity Measure“ (SLAM) (61).

Zudem konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass erhöhte Spiegel an anti-dsDNA und verminderte Spiegel an C3 ein Risiko für einen Anstieg der Krankheitsaktivität darstellen (64–71).

1.1.6 Therapie

Durch den variablen klinischen Verlauf und die Beteiligung unterschiedlicher Organe ist die Therapie des SLE sehr komplex und muss bei jedem Patienten individuell an das Krankheitsbild angepasst werden. Ein wichtiger Bestandteil der Therapie ist unter anderem die Schulung der Patienten, damit sie UV-Licht und Rauchen meiden. Zudem sollten Patienten über kardiovaskuläre Risikofaktoren und die Behandlung von anderen Risikofaktoren, wie zum Beispiel der Osteoporose aufgeklärt werden (72–75).

Allgemein kann man die Therapie des SLE in zwei Gruppen unterteilen, und zwar danach, ob keine, eine leichte und/oder eine mittelschwere Organbeteiligung vorliegt oder ob es sich um eine aktive Organbeteiligung handelt.

Alle Patienten sollten bei fehlenden Kontraindikationen eine Therapie mit einem Antimalariamittel (Hydroxychloroquin oder Chloroquin) erhalten, da hierfür zahlreiche präventive Effekte bekannt sind (76,77). Darüber hinaus richtet sich die Therapie nach der Aktivität und Organbeteiligung und umfasst den BLYS-Antikörper Belimumab, Azathioprin, Cyclophosphamid, Glukokortikosteroide und andere nicht zugelassene immunsuppressive Substanzen wie MTX, MMF oder Rituximab (61,78,79). Neue Therapiemöglichkeiten sind nach wie vor Gegenstand der Forschung (72,80–83).

Um die Langzeitprognose des SLE weiter zu verbessern, sollten auch Strategien angewandt werden, die dazu beitragen Langzeit-Komplikationen zu reduzieren, einschließlich der Prophylaxe gegen Infektionen, der Kontrolle von Risikofaktoren für Arteriosklerose und der Tumor-Früherkennung (84).

1.2 Rheumatologische Diagnostik

1.2.1 Allgemein

SLE ist die Autoimmunerkrankung mit der größten Anzahl an nachweisbaren Autoantikörpern (85). Die ersten Antikörper gegen DNA wurden im Jahr 1957 und die ersten Antikörper gegen Antigene außer DNA im Jahr 1966 beschrieben (86–88). In einem Review aus dem Jahr 2015 beschrieben Yaniv et al. insgesamt 180 bekannte Autoantikörper (89). Dabei gehören die häufigsten Antikörper des SLE zu den Antinukleären Antikörper (ANA), und die Mehrheit der Patienten (> 95 %) haben irgendwann zu einem Zeitpunkt ihres Krankheitsverlaufes einen positiven ANA-Titer (51).

Entscheidend für ein gutes diagnostisches Verfahren ist vor allem, dass der Test eine gute Sensitivität hat (erkennt alle mit der Krankheit), eine gute Spezifität (erkennt nur diejenigen mit der Krankheit), einen hohen positiven prädiktiven Wert (PPV), d.h. Rate an richtig positiv getesteten Patienten von allen Positiven, und einen hohen negativen prädiktiven Wert (NPV), d.h. Rate an richtig negativ getesteten Patienten von allen Negativen.

Weiterhin wäre es wünschenswert neben der Diagnostik mittels eines geeigneten Testverfahrens Aufschlüsse über die Krankheitsaktivität zu gewinnen (90).

Grundsätzlich sollte ein Test reproduzierbar sein und in unterschiedlichen Laboren durchgeführt zu vergleichbaren Ergebnis kommen.

Für den Nachweis von ANAs wird üblicherweise der Immunfluoreszenztest (IFT) angewandt, gelegentlich werden ANA auch mittels leichter automatisierbarer Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) oder Line Immunoassay (LIA) einer Mischung spezifischer Antigene bestimmt. Antigenespezifitäten (ENA) werden anschließend anhand von Immunoblots (z.B. Line Immunoassays), Immundiffusion, Line Immunoassays, Hämagglutination, Komplementfixierung, Festphasen-Immunoassays (ELISA oder Western Blot) oder Radioimmunoassays (RIA) berichtet, wobei Immunoblots und ELISA die am häufigsten verwendeten Verfahren darstellen.

Der IFT erfolgt mittels Indirekter Immunfluoreszenz (IIF). Die IIF erfolgt an der Larynx-Karzinomzelllinie HEP-2 bzw. für den dsDNA-Nachweis mittels des Flagellaten *Crithidia luciliae*. Die Methode wurde das erste Mal im Jahr 1950 von Coons und Kaplan beschrieben. (91–93). Die Hep-2-Zelllinie ist abgeleitet von einem epithelialen Zelltumor und bietet ein standardisiertes Substrat für den Nachweis von ANA und hat die Nagetier-Schnitte größtenteils ersetzt.

Einige Autoantikörper haben im klinischen Alltag eine Bedeutung über die Diagnosestellung hinaus und sind mit erhöhter Krankheitsaktivität (insb. dsDNA-Antikörperkonzentrationen) oder mit bestimmten Organmanifestationen assoziiert (z. B. C1q-Antikörper mit der Lupusnephritis oder Ribosomales-P-Antikörper mit Neuropsychiatrischem Lupus) (55). Im Folgenden werden die wichtigsten in der Diagnostik des SLE zum Einsatz kommenden Autoantikörper näher beschrieben:

Der Nachweis von ANA ist sehr charakteristisch für Patienten mit SLE und nur wenige Patienten mit SLE zeigen keine ANA (d. h. hohe Sensitivität). Andererseits sind ANA mit zunehmendem Alter in steigender Konzentration nachweisbar, sind gehäuft bei anderen Erkrankungen wie z. B. Lebererkrankungen, Infektionserkrankungen und Schilddrüsenerkrankungen sowie gelegentlich in meist geringen Konzentrationen auch bei Gesunden zu finden (d. h. geringe Spezifität für die Diagnose eines SLE). Da ein negatives Testergebnis die Diagnose eines SLE aufgrund der hohen Sensitivität sehr

unwahrscheinlich macht, werden ANA als Eingangskriterium in der neuen ACR/EULAR-Klassifikation genutzt (90,94–97).

Die zusätzliche Bestimmung von antigen-spezifischen ANA wie unter anderem SSA-, SSB-, U1-RNP- und Sm-Antikörpern, die in den meisten Standard-Assays bestimmt werden (auch als extrahierbare nukleäre Antigene (**ENA**) bezeichnet) erlaubt eine weitere Differenzierung der ANA. Bestimmte ENA zeigen eine sehr hohe Spezifität für die Diagnose eines SLE, sind in ihrer Frequenz aber sehr gering. Umgekehrt sprechen manche Antigen-spezifitäten von ANA sogar eher gegen die Diagnose eines SLE, z.B. DFS-70-Antikörper (51,91,98). Theoretisch wäre daher die laborchemische Diagnose eines SLE mit hoher Spezifität und ausreichender Sensitivität durch eine Kombination von sehr spezifischen ENA eine Erleichterung in der Diagnostik.

Anti-dsDNA sind assoziiert mit der Krankheitsaktivität des SLE und einer renalen Beteiligung (85,99–102). Nur in wenigen Studien zeigte sich kein Zusammenhang von anti-dsDNA mit der Krankheitsaktivität, wobei hierbei mitunter verschiedene Labormethoden (ELISA, RIA) zum Einsatz kamen (103–105), die das Ergebnis beeinflussen.

Anti-dsDNA erkennen unterschiedliche DNA-Strukturen und können auch an andere Antigene als DNA binden, wie zum Beispiel an Annexin II, Laminin, Kollagen III, Kollagen IV oder Komplementrezeptor Typ 1 (C1q) (106).

Neben anti-dsDNA gibt es auch noch andere Antikörper für die Überwachung und die Vorhersage einer renalen Beteiligung, wie anti-Chromatin/Nukleosom-Antikörper und anti-C1q-Antikörper (33,107–110).

Bei durchschnittlich 51% der SLE-Patienten sind **Histon-Antikörper** nachweisbar (111–114,100,115–117).

Histone bilden zusammen mit der DNA und anderen Proteinen das eukaryotische Chromatin. Die Einheit aus Histonen und DNA bezeichnet man als Nukleosom (118,119). Dabei bilden die Histone ein Oktamer, das aus je zwei H2A, H2B, H3 und H4 besteht, um das sich die DNA windet. H1-Proteine binden an die Linker-DNA zwischen den Nukleosomen (118,120).

Die Gene der Histone sind in Clustern organisiert, was zu multiplen Kopien jedes Gens und unterschiedlichen Histon-Proteinen führt, deren funktionelle Besonderheiten noch

nicht vollständig erforscht sind (118,119). Antikörper gegen Nukleosome und gegen Ablagerungen von entstehenden Immunkomplexen sind beteiligt an der Pathogenese des SLE (120). Daher ist das Testen von Nukleosom-Antikörpern eine vielversprechende Möglichkeit bei der Verbesserung des diagnostischen Potenzials von Labortests für SLE. Allerdings wurde betont, dass Nukleosome eine große Vielfalt an individuellen Komponenten enthalten, wie unterschiedliche Histone oder doppelsträngige DNA, und dass Versuche unternommen werden sollten, das Ziel von potentiellen diagnostischen Antikörpern genau zu definieren (121).

Anti-Ro/SSA und **Anti-La/SSB** Antikörper gehören zu den häufigsten gemessenen ENAs und treten bei SLE mit einer Prävalenz zwischen 20 und 30 % auf (122). Außerdem sind sie mit dem Sjögren Syndrom, dem subakut kutanen Lupus erythematodes (SCLE) und dem neonatalen Lupus erythematodes (NLE) assoziiert; anti-RO/SSA sind im Durchschnitt 3,4 Jahre vor der Diagnose eines SLE nachweisbar (56,123–126).

Anti-Ro sind assoziiert mit kutaner Vaskulitis, Photosensibilität und Sicca-Syndrom, aber mit einer niedrigeren Prävalenz für Thrombozytopenie (122). Anti-La sind assoziiert mit einem Schmetterlingserythem, Photosensibilität, Arthritis, Serositis und Thrombose (122,127,128).

Zudem haben schwangere Frauen, bei denen anti-Ro nachweisbar sind, ein höheres Risiko ein Kind mit einem angeborenen Herzblock zu gebären (129–133).

Bei anti-Ro/SSA kann man zwischen zwei Antigenen unterscheiden, die sich durch ihre Molekularmasse unterscheiden, dem SSA/Ro60 und dem SSA/Ro52 (134). Beide bestehen aus unterschiedlichen Proteinen, die von unterschiedlicher DNA kodiert werden und unterscheiden sich biochemisch und immunologisch (134,135). Ro60, auch TROVE2 genannt, und Anti-La sind RNA-bindende Proteine und Ro52, auch TRIM52 genannt, ist eine Ubiquitin-E3-Ligase (135–138).

Anti-Sm sind mit einer Spezifität von 98 % spezifischer als anti-dsDNA-Antikörper, aber mit einer Sensitivität von 24 % nicht so sensitiv für den SLE. Sie treten vorwiegend bei Patienten mit oralen Ulzerationen und Myositis auf und seltener bei Patienten mit Sicca-Syndrom (55,122,139–141).

Anti-Sm richten sich gegen 7 Proteine (B/B', D1, D2, D3, E, F, G), die den gemeinsamen Kern von U1-, U2-, U4- und U5-Partikeln des snRNP (small nuclear

ribonucleoprotein) bilden (139). snRNP bestehen aus snRNA (small nuclear RNA) und unterschiedlichen Proteinen und sind Teil des Spliceosoms (139).

Anti-U1 RNP (Ribonukleoprotein) Antikörper sind assoziiert mit dem SLE und Mischkollagenosen. Diese sind durch das Vorhandensein von Merkmalen unterschiedlicher rheumatischer Krankheitsbilder wie dem SLE, der Systemischen Sklerose, der Polymyositis und der rheumatoiden Arthritis gekennzeichnet (142,143). Das Vorhandensein von anti-U1 RNP in Liquor ist zudem assoziiert mit neuropsychiatrischen Manifestationen (144). Die Prävalenz der anti-U1 RNP lag in einem Euro-Lupus-Projekt aus dem Jahr 2006 bei 13 % und Patienten mit diesen Antikörpern hatten eine höhere Inzidenz für ein Raynaud-Phänomen, Myositis und Lymphadenopathie (122). Die Anti-RNP Antikörper richten sich gegen die Proteine A, C und 70K, die mit U1-RNA assoziiert sind und U1-snRNP bilden (143,144,139).

Das **Komplementsystem** spielt eine wichtige Rolle in der Ätiopathogenese des SLE und auch die Spiegel der Komplementkomponenten und der Antikörper gegen diese scheinen eine Aussage über die Krankheitsaktivität zu erlauben (145). Das Komplementsystem ist ein Teil der unspezifischen Immunabwehr und ist zum einen an der Elimination von Immunkomplexen und apoptotischen Zellen als auch an Entzündungsprozessen im Rahmen von Autoimmunerkrankungen beteiligt (146). Man unterscheidet unterschiedliche Aktivierungswege, die jedoch alle in der Aktivierung einer C3-Konvertase münden und eine gemeinsame Endstrecke mit der Bildung eines Membran-Angriffs-Komplex (MAK) haben (147). Dabei ist C3 gemessen an der Konzentration das am häufigsten vorkommende Komplement-Protein mit normalen Plasma-Spiegeln von 90-180 mg/dl und C4 das zweithäufigste, mit normalen Konzentrationen von ungefähr 12-50mg/dl (148).

Swaak et al. untersuchten die Seren von 78 SLE Patienten und verglichen die anti-dsDNA-Spiegel und die Krankheitsaktivität mit den Spiegeln der Komplementfaktoren C1q und C3. Bei allen Patienten mit einem niedrigen C1q- und einem niedrigen C3-Spiegel und einer deutlichen Abnahme von anti-dsDNA nahm die renale Funktion ab oder ein schon vorherrschender Nierenschaden wurde schwerwiegender. Der Abfall der anti-dsDNA Antikörper kommt dabei wahrscheinlich durch eine Komplexbildung mit DNA zustande (69). In einer weiteren Studie untersuchten Swaak et al. bei 143 SLE Patienten den Zusammenhang zwischen Klinik, anti-dsDNA und dem Gehalt an

Komplementkomponenten. Diese Ergebnisse gaben Anhalt dafür, dass man durch Beachten der Komplement- und anti-dsDNA-Spiegel nicht nur Exazerbationen hervorsagen kann, sondern auch Hinweise auf das Krankheitsmuster erlangen kann (149). Diese Ergebnisse wurden so aber nicht validiert.

Andere Studien von Garin et al. und Buyon et al. belegten ebenfalls den Zusammenhang zwischen dem C3-Spiegel und der Krankheitsaktivität, und Weinstein et al. zeigten, dass anti-dsDNA- und C3-Spiegel zusammen einen guten Vorhersagewert für die Diagnose eines SLE haben (70,71,150).

Des Weiteren gibt es Antikörper, die gegen Komponenten des Komplementsystems gerichtet sind, wie zum Beispiel den Anti-C1q-Antikörper, der die erste Komponente des klassischen Komplementsystems als Ziel hat, und der der beste Prädiktor in der Beurteilung der Organbeteiligung vor allem in Bezug auf Lupusnephritis ist (151–153).

Das **Antiphospholipidsyndrom (APS)** ist durch rezidivierende Aborte und Thrombosen gekennzeichnet (41). Zu den laborchemischen Klassifikationskriterien des APS gehört zudem der Nachweis von Lupus Antikoagulans, Anticardiolipin-Antikörpern oder anti-beta(2)-Glykoprotein-Antikörper (154–157). Die Häufigkeiten bei SLE-Patienten variieren in unterschiedlichen Studien: 10-30 % der SLE-Patienten haben das Lupus Antikoagulans, 35-45 % anti-beta2GP1 und bis zu 17 % - 86 % haben einen positiven Test für Anticardiolipin-Antikörper (158–161).

Dabei sind vor allem IgG Antiphospholipid-Antikörper klinisch relevant, da Antikörper vom IgM-Typ auch unspezifisch bei Gesunden, nach Infektionen oder nach Untergang von Gewebe erhöht sein können (157,162–166).

Das Antiphospholipidsyndrom wurde zum ersten Mal im Rahmen eines SLE beschrieben und im Anschluss auch als eigenständiges primäres Antiphospholipidsyndrom. Aber auch Patienten mit einem primären Antiphospholipidsyndrom weisen häufig ANA oder anti-dsDNA auf, was die enge Beziehung des Antiphospholipidsyndroms zum SLE widerspiegelt (154). Zudem können Antiphospholipid-Antikörper einen frühen Schaden bei SLE vorhersagen und SLE-Patienten mit Antiphospholipid-Antikörpern sind anfälliger dafür eine pulmonale Hypertension zu entwickeln (167,168). Diese pulmonale Hypertension entwickelt sich möglicherweise auf dem Boden von Mikrothromben (168).

Weitere Manifestationen können die Herzklappen betreffen, zum Beispiel als Libman-Sachs-Endokarditis oder Mitralklappenverdickungen oder sich als neurologische,

nephrologische, dermatologische und muskuloskeletale Manifestationen äußern, wie zum Beispiel Migräne, Epilepsien, thrombotische Mikroangiopathie der Niere, Livedo reticularis oder racemosa oder avaskuläre Knochennekrosen (169,169,162).

1.2.2 Multiplex Assays

Bei der IIF werden Zellen als Antigen-Substrat genutzt, um Autoantikörper zu detektieren. Dafür wird das Patientenserum auf den Zellen inkubiert und nach einer Waschung ergeben hinzugegebene fluoreszierende anti-IgG Antikörper ein Fluoreszenzmuster, das man wiederum bestimmten Autoantigenen zuordnen kann. Die Auswertung erfolgt mit einem Fluoreszenzmikroskop. Veränderungen der Inkubationszeiten, der Verdünnungen oder der Puffersysteme können zu Abweichungen bei der Auswertung führen. Die Mikroskopie mittels Fluoreszenzmikroskop und die Musterbewertung sollte zudem von erfahrenen Mitarbeiter/innen erfolgen (170).

Das Ergebnis der ANA-IIF enthält immer die folgenden drei Dinge: Das Fluoreszenzmuster, das verwendete Substrat und den Titer eines positiven Ergebnisses (171,172). Zur Auswertung der Fluoreszenzmuster wurde von einer internationalen Expertengruppe eine Nomenklaturempfehlung mit 30 verschiedenen Mustern definiert (173).

Neben der klassischen IIF gibt es in den letzten Jahren auch immer mehr neue IIF-Verfahren, die automatisiert sind und den Anspruch haben einen besseren Vergleich zwischen verschiedenen Laboren zu bieten. Diese haben eine Übereinstimmung mit der indirekten Immunfluoreszenz von 80 % - 99 % (174–178).

ELISA ist ein Festphasen-Immunassay, bei dem der Nachweis von Antikörpern durch einen Detektionsantikörper erfolgt, an den ein Enzym gekoppelt ist. Festphase bedeutet, dass Antigene oder Antikörper in einem ersten Schritt an eine feste Phase, wie zum Beispiel eine Platte gekoppelt werden. In einem nächsten Schritt wird die Platte mit der Probe inkubiert, sodass darin enthaltene Antigene oder Antikörper erkannt und gebunden werden und dann wird der Detektionsantikörper, der an ein Enzym gekoppelt ist, hinzugefügt. Als letzter Schritt wird ein passendes Substrat hinzugefügt, mit welchem das Enzym reagiert. Diese Reaktion kann als eine Farbreaktion oder Emission von Fluoreszenz oder Lumineszenz ausgewertet werden. In der Regel werden für

ELISA Mischungen von natürlichen und rekombinanten gereinigten Antigenen verwendet (179,180).

Einige Studien haben sich mit dem Vergleich der IIF und ELISA oder anderen Verfahren beschäftigt und sowohl Vor- als auch Nachteile für die unterschiedlichen Verfahren aufgezeigt (94,175,181–186).

Die Nachteile der IIF sind die Subjektivität der Interpretation der Ergebnisse, Intra- und Inter-Variabilität zwischen unterschiedlichen Laboren, die mangelnde Standardisierung und Automatisierung und die Unterschiede in Sensitivität und Spezifität beim Verwenden unterschiedlicher Substrate. (175). Dagegen ist ELISA sensitiver, aber weniger spezifisch als die IIF, kann automatisiert werden und ist kostengünstiger (175,187).

Eine Möglichkeit mehrere ENAs in einem Durchgang zu bestimmen ist das Anwenden von Multiplex Assays, wie zum Beispiel der xMAP Technologie von Luminex. Diese Technik basiert auf Polystyrol-Beads, die unterschiedlich gefärbt und mit Antigenen gekoppelt sind. Sie werden auch ALBIA (adressable laser bead immunoassay) genannt; es sind mehrere kommerzielle ALBIA Kits bekannt (188). Es ist aber auch möglich individuelle Assays zu erstellen, indem die gewünschten Antigene entsprechend des Protokolls mit Beads gekoppelt werden. Der Vergleich von einigen ALBIA mit Verfahren wie Immundiffusion oder ELISA zeigte meist eine gute Übereinstimmung, aber manchmal auch Unstimmigkeiten bei der Bestimmung einzelner Autoantikörper (189–205). Ein Vergleich dieser Studien ist jedoch schwer, da sie teilweise sehr heterogen sind in Bezug auf das Studiendesign, die selektiven Populationen und die Herkunft der Antigene.

Eine Studie von Hanly et al. verglich drei verschiedene Multiplex Assays miteinander und zeigte eine akzeptable Übereinstimmung der Assays, aber Unterschiede in der Sensitivität bei der Bestimmung von einigen Autoantikörpern (206).

Copple et al. verglichen drei verschiedene Multiplex Assays miteinander. Dabei wurden 169 Seren von gesunden Kontrollen und 104 Seren von Personen mit SLE und Mischkollagenosen untersucht auf das Vorhandensein von Sm, RNP, SSA, SSB, Scl-70 und dsDNA oder Chromatin. Dabei zeigte sich, dass die Assays nur bei dem Nachweis von SSA übereinstimmten. Verantwortlich für diese Unterschiede zwischen den verschiedenen Assays kann unter anderem das Anwenden oder Fehlen von

Waschschritten sein oder die Anwendung von rekombinanten oder natürlichen Antigenen (196).

Die Vorteile der Multiplex Assays sind, dass in einem Durchgang gleichzeitig viele Autoantikörper bestimmt werden können, die Verfahren kostengünstiger sind, im Vergleich nur wenig Serum (5 µl) benötigt wird und dass durch die Automatisierung mithilfe der xMAP Technologie ein Vergleich zwischen unterschiedlichen Laboren ermöglicht wird.

Festphasen-Immunoassays wie ELISA und Multiplex Bead Assays haben jedoch auch Nachteile. So wurde von hohen Falsch-Negativ Raten berichtet, da Patienten eventuell Autoantikörper haben, die durch IIF nachweisbar sind, aber nicht durch Festphasen-Substrate, die nur eine limitierte Anzahl an Antigenen verwenden. Wegen dieses Problems hat sich eine Arbeitsgruppe des ACR (American College of Rheumatology) mit dem Vergleich von IIF mit Verfahren wie ELISA und Multiplex Assays befasst. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass die IIF der Gold Standard für den Nachweis von ANA bleiben sollte. Bei der Verwendung von ELISA oder auf Beads basierenden Multiplex-Verfahren sollten auf Nachfrage Daten darüber zur Verfügung gestellt werden, dass der verwendete Assay die gleiche oder eine bessere Sensitivität und Spezifität hat als die IIF (186).

Um einen besseren Vergleich der Ergebnisse der Autoantikörper-Bestimmungen zu ermöglichen sollten die Immunoassays und andere diagnostischen Verfahren auf einheitlichen Referenzproben mit definierten Spezifitäten basieren. Das könnte die Entwicklung und Bewertung von spezifischen Krankheits-Screening Assays beinhalten (207).

1.3 Ziele der Arbeit

Die Arbeit will folgende Fragestellungen beantworten:

- Hat der von uns verwendete Multiplex Autoantikörper Assay eine ausreichende Retest-Reliabilität?
- Hat der von uns verwendete Multiplex Autoantikörper Assay mit erweitertem Antigenspektrum eine bessere diagnostische Aussagekraft als ein Autoantikörper-Screening mittels herkömmlichem Standard-Assay (SA)?
- Tragen insbesondere die im Multiplex Autoantikörper Assay enthaltenen Histon-Antikörper zu einer verbesserten diagnostischen Differenzierung bei?
- Sind Autoantikörper-Konzentrationen aus dem Multiplex Autoantikörper Assay mit Markern der Krankheitsaktivität von SLE-Patienten assoziiert?

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und Kontrollen

Es wurden die Seren von 153 Lupus Patienten aus der Arteriosklerose-Studie vermessen. Diesen Seren wurden 81 geschlechts- und altersgematchte Kontrollpersonen aus dem Projekt Rheumatruck zugeordnet. Beide Projekte sind durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt worden (Studennummer 2546 und 4336).

In die Arteriosklerose-Studie wurden in den Jahren 1999 und 2000 200 konsekutive Patienten mit SLE eingeschlossen, die an der Poliklinik für Rheumatologie des Universitätsklinikums Düsseldorf in Behandlung waren. Dabei erfüllten alle Patienten die überarbeiteten ACR-Kriterien von 1997 (208) und gaben ihr schriftliches Einverständnis für die Untersuchungen (209). Die Studie basierte auf einem Protokoll der „Carotid Atherosclerosis Progression Study“ (CAPS) (210), zu dem unterschiedliche Untersuchungen und ein standardisiertes Interview gehörten. Die Untersuchungen umfassten standardisierte Laboruntersuchungen, eine klinische Untersuchung und eine standardisierte Messung der Krankheitsaktivität mittels Systemic Lupus Activity Measure (SLAM) Index und SLICC/ACR (Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology) Schädigungsindex (SLICC-Damage Index = SLICC-DI) (60,209,211–213). Die mittlere Krankheitsdauer betrug 9,4 (7,3) Jahre und die Patienten wurden mit verschiedenen Medikamenten behandelt (zum Beispiel 61,6 % Glukokortikosteroide (mittlere Dosis 7,5mg), 48,7 % Antimalariamittel). Einzelheiten sind in Tabelle 2 aufgeführt (209).

Tabelle 2. Eigenschaften der Patienten (209).

Weiblich, %	85
Alter, Durchschnitt (SD), Jahre	41,0 (13,5)
Dauer SLE, Durchschnitt (SD), Jahre	9,4 (7,3)
SLAM, Durchschnitt (SD)	8,0 (5,1)
SLICC-DI, Durchschnitt (SD)	1,39 (1,77)
Sm, %	7,5
U1RNP, %	11,6
SSA, %	35,4
SSB, %	10,2
C3c, Durchschnitt (SD), mg/dl	84,1 (26,2)
C4, Durchschnitt (SD), mg/dl	15,1 (10,1)
IgG, Durchschnitt (SD), mg/dl	1313,4 (499,5)
DNA Antikörper RIA, Durchschnitt (SD), UI/ml	64,5 (163,6)
Glukokortikosteroide, %	61,6
Cyclophosphamid, %	9,4
Azathioprin, %	22,7
Ciclosporin, %	4
Antimalariamittel, %	48,7
Mycophenolatmofetil, %	7,9

SD: standard deviation = Standardabweichung; SLAM: Systemic Lupus Activity Measure; SLICC: SLICC-Damage Index; RIA: Radioimmunoassay

Der Rheumatruck im Jahr 2013 war eine Zusammenarbeit des Kooperativen Rheumazentrums Rhein-Ruhr e.V. und der RWE Power AG als Vorsorgeuntersuchung für rheumatische Krankheiten. Die Mitarbeiter der RWE Power AG konnten freiwillig an diesem Angebot teilnehmen, das innerhalb von 6 Wochen an 28 unterschiedlichen Standorten zur Verfügung stand und gaben ihr schriftliches Einverständnis für die Teilnahme. Um gesunde Personen als Kontrollgruppe für die aktuelle Studie zu rekrutieren wurde nur den Personen Seren abgenommen, bei denen eine rheumatische Erkrankung ausgeschlossen werden konnte (209). Dafür wurden die Personen an unterschiedlichen Stationen im Truck untersucht. Zu den Untersuchungen gehörten Kapillarmikroskopie, Ultraschall der Fingergelenke, ein CCP-Schnelltest (für AK gegen zyklisch-citrulliniertes Peptid) und zwei Fragebögen für rheumatische Erkrankungen

(RheumaCheck und RheumaRückenCheck). Die Untersuchungen wurden von 11 Humanmedizin-Studenten der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. An jedem Standort war zudem ein Rheumatologe anwesend, der die Personen über die verschiedenen Formen von Rheuma und deren Therapiemöglichkeiten aufklären konnte.

2.2 Materialien

2.2.1 Lösungen und Geräte

Tabelle 3. Lösungen und Geräte.

Produktname	Bezugsquelle
Goat-anti-human-PE(Phycoerythrin)- Detection Antikörper	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
PBS (Phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BSA (Albumin from bovine serum)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
LCB (Low Cross Buffer)	Candor Bioscience GmbH, Wangen
Bead Puffer	CBS + LCB 1:2
Wasch Puffer	PBS + 0,1 % Tween
Sheath Fluid	Luminex Corporation, Austin, TX, USA
Drive Fluid	Luminex Corporation, Austin, TX, USA
MAGPIX® Calibration Kit	Luminex Corporation, Austin, TX, USA
MAGPIX® Verification Kit	Luminex Corporation, Austin, TX, USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NaClO	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
96 well half area Platte	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster
Mikroplattenschüttler	Corning Incorporated, Action, MA, USA
Protein LoBind Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Tubes (15ml + 50 ml)	Greiner
Vortex-Mixer	Janke & Kunkel, Staufen im Breisgau
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg

Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
Vacutainer® SST™ II Advance Röhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Vacutainer® Safety-Lok™ Blutentnahmeset	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Vacutainer® Einmalhalter	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zentrifuge Varifuge-3.0R	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
Zentrifuge EBA 20 Typ 2002	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen

2.2.2 Multiplex Antikörper Assay

Für den Multiplex Antikörper Assay wurden insgesamt 31 Antigene ausgewählt, für die Zusammenhänge mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen bekannt sind. Diese 31 rekombinanten Antigene wurden in *E. coli* produziert und gereinigt (209). Alle 31 Antigene (in Tabelle 4 ausgeführt) wurden kovalent an magnetische Mikrosphären (Beads) gekoppelt wie in vorhergegangenen Studien beschrieben und entsprechend der Herstelleranleitung (Luminex Corp, Austin, TX, USA) (209,214,215).

Der diagnostische Antikörper zum Nachweis der gebundenen Antikörper war ein mit Phycoerythrin gekoppelter Goat-Anti-Human-IgG, der spezifisch für das Fc-Fragment von Antikörpern ist (209).

Tabelle 4. Antigene des Multiplex Assays.

Antigen	Abkürzung
TROVE2	SSA (60kDa)
TRIM21	SSA (52kDa)
SSB	SSB
SNRNP70	U1-RNP
SNRPB	Sm
XRCC5	Ku
AQP4	AQP4
RPLP2	RPLP2
FBL	FBL

APOH	b2GP
GARS	EJ
CHD3	Mi2
POLR3B	RNAP
CHD4	Mi2b
CENPC	CENPC1
HIST2H2AC	HIST2H2AC
POP1	MRP
HIST2H2AA3	HIST2H2AA3
FTH1	FTH1
HARS	Jo1
MPHOSPH10	MPP10
CENPB	CENPB
EXOSC10	PmScl
PRTN3	PRTN3
TARS	PL7
HIST1H4A	HIST1H4A
SRP54	SRP
XRCC6	Ku2
YARS	Ha
TOP1	Scl70
CCP	Anti-CCP

Die Antigene des Multiplex Assays entsprechend ihrer Gen ID und mit Abkürzungen. ID = Idiotyp

2.3 Luminex® xMAP®

Die Messungen des Multiplex Assays erfolgten mit dem Gerät MAGPIX® und der xMAP®-Technologie der Firma Luminex® (209). Mit Hilfe von magnetischen Mikrosphären, sogenannten Beads, ist es möglich in einem Durchlauf bis zu 50 verschiedene Parameter (pro Well auf einer 96er Half Area-Platte) zu bestimmen. Es erfolgten Dreifach Bestimmungen jedes Patienten und zusätzlich wurden auf jeder Platte eine Negativkontrolle, sechs gesunde Probanden, drei Positivkontrollen und ein gepooltes Serum gemessen wie beispielhaft in Abbildung 1 dargestellt. Somit konnten pro Platte 21 Seren gemessen werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank	blank	blank	Kon trolle5	Kon trolle5	Kon trolle5	Probe 6	Probe 6	Probe 6	Probe 14	Probe 14	Probe 14
B	M316	M316	M316	Kon trolle6	Kon trolle6	Kon trolle6	Probe 7	Probe 7	Probe 7	Probe 15	Probe 15	Probe 15
C	Ref Jo1	Ref Jo1	Ref Jo1	Ge poolt	Ge poolt	Ge poolt	Probe 8	Probe 8	Probe 8	Probe 16	Probe 16	Probe 16
D	Ref Sci70	Ref Sci70	Ref Sci70	Probe 1	Probe 1	Probe 1	Probe 9	Probe 9	Probe 9	Probe 17	Probe 17	Probe 17
E	Kon trolle1	Kon trolle1	Kon trolle1	Probe 2	Probe 2	Probe 2	Probe 10	Probe 10	Probe 10	Probe 18	Probe 18	Probe 18
F	Kon trolle2	Kon trolle2	Kon trolle2	Probe 3	Probe 3	Probe 3	Probe 11	Probe 11	Probe 11	Probe 19	Probe 19	Probe 19
G	Kon trolle3	Kon trolle3	Kon trolle3	Probe 4	Probe 4	Probe 4	Probe 12	Probe 12	Probe 12	Probe 20	Probe 20	Probe 20
H	Kon trolle4	Kon trolle4	Kon trolle4	Probe 5	Probe 5	Probe 5	Probe 13	Probe 13	Probe 13	Probe 21	Probe 21	Probe 21

Abbildung 1. Beispielhafte Darstellung einer 96er half area-Platte mit 3-fach Bestimmungen.

Wie in Abbildung 2 dargestellt unterscheiden sich die Beads in ihrem Farbton im Bereich des roten und infraroten Spektralbereichs und dadurch ergeben sich unterschiedliche Bead-Gruppen mit einem einzigartigen Farbstoffgemisch, das eine genaue Zuordnung jedes einzelnen Beads erlaubt.

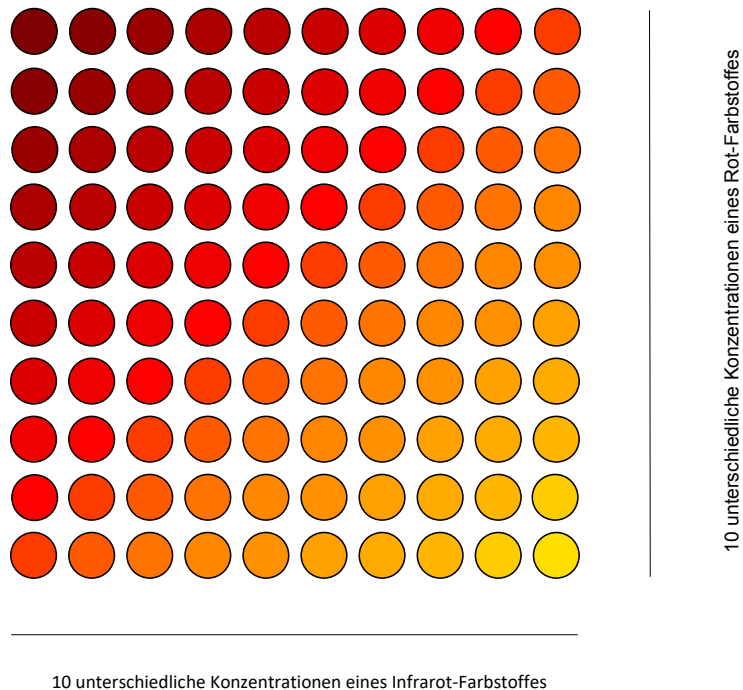


Abbildung 2. Darstellung der Beads und der unterschiedlichen Kombinationen aus einem roten und einem infraroten Farbstoff.

Mit Hilfe eines Bestimmungslasers (roter LED, 635nm) lassen sich die unterschiedlichen Konzentrationen der Farbstoffe unterscheiden. Der Nachweis der an die Beads gebundenen Antikörper erfolgt mit einem mit Phycoerythrin (PE)-markierten anti-human-IgG-Sekundärantikörper. Durch den Farbstoff Phycoerythrin ist eine Quantifizierung der gebundenen Antikörper mit einem Reporterlaser (grüner LED, 532nm) möglich (216). Dieses Verfahren ist zur Verdeutlichung in Abbildung 3 dargestellt.

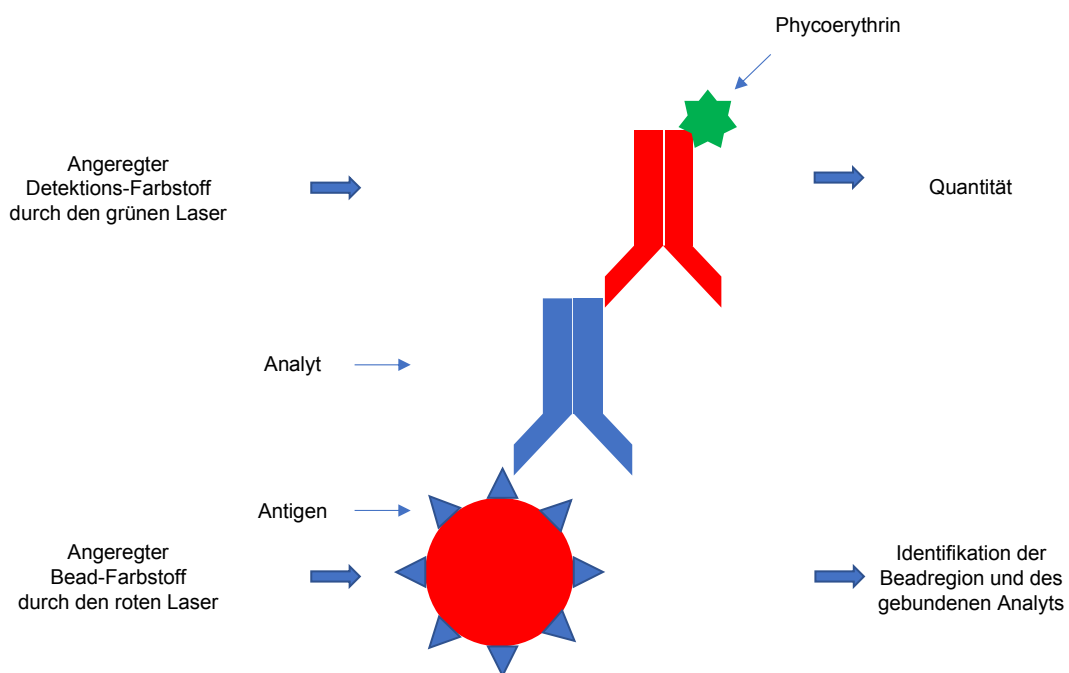


Abbildung 3. Überblick über das Verfahren des Luminex xMAP Immunassay.

Zu Beginn eines jeden Testdurchlaufs wurden die Seren gevortext und anschließend für zwei Minuten bei 2200 rpm (rpm = revolutions per minute/Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert um grobe Partikel zu sedimentieren. Für die 1:100-Serumverdünnung wurden 495 µl Bead-Puffer mit 5 µl Serum gemischt und der Ansatz gevortext.

Im Assay sollten jeweils 1000 Beads jeder Region in jedem Well vermessen werden. Dafür wurde aus Beads und Bead-Puffer ein Beadmix angesetzt. Um eine gleichmäßige Verteilung der Beads zu gewährleisten wurden die Beads gevortext und fünf Minuten in

ein Ultraschallbad gegeben. Für den Beadmix wurden die Beads mit dem Bead-Puffer in einem Verhältnis von 2:3 gemischt und der Ansatz anschließend noch einmal gevortext und fünf Minuten ins Ultraschallbad gegeben.

Mit einer Magnetplatte konnten die magnetischen Beads an dem Boden der Wells fixiert werden. Dafür wurde die 96er Half Area-Platte auf die Magnetplatte gestellt und je 50 µl Beadmix pro Well pipettiert. Dabei wurde der Beadmix immer nach zwei Spalten gevortext, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Beads zu gewährleisten. Danach wurde die 96er Half Area-Platte zwei Minuten auf der Magnetplatte stehen gelassen, damit sich die Beads setzen konnten und dann der Überstand abgeschüttet.

Dann folgte die Inkubation der Beads mit den Seren. Dafür wurden je 50 µl der kurz davor gevortexten Serum-Verdünnung pro Well pipettiert. Daraufhin wurde die Platte lichtgeschützt für 22 Stunden bei 4°C auf einem Schüttler (900 rpm) inkubiert.

Nach Ablauf der 22 Stunden wurde der Bead-Serum-Ansatz dreimal gewaschen. Dafür wurde die 96er Half Area-Platte wieder auf die Magnetplatte gestellt und der Überstand nach zwei Minuten abgeschüttet. Das Waschen erfolgte mit je 100µl Wasch-Puffer/Well, einer Minute auf dem Schüttler (900 rpm), zwei Minuten ruhen lassen auf der Magnetplatte und dann wieder Abschütten. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.

Nach dem letzten Waschdurchgang wurde nach dem Abschütten des Überstandes 50µl der Sekundär-Antikörper-Verdünnung/Well hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde wieder lichtgeschützt für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert.

Nach der Inkubation wurde der Ansatz wieder dreimal gewaschen.

Nach dem letzten Waschdurchgang wurden dann 100µl SheathFluid/Well hinzugefügt.

Die 96er Half Area-Platte konnte nun ins MAGPIX®-System gelegt werden.

Das MAGPIX®-System besteht aus einem mechanischen, einem elektronischen, einem optischen und einem Fluidik-System.

Die 96er Half Area-Platte wurde in das mechanische System eingelegt und mit Hilfe einer Probensonde konnten die Proben in das Fluidik-System aufgenommen werden und gelangten hierdurch zum optischen System.

Hier wurden die Beads von einem Magneten festgehalten und von einer roten und einer grünen LED beleuchtet. Die rote LED dient dabei der Bead-Klassifizierung und die grüne LED der Quantifizierung der gebundenen Antikörper. Von jeder Beleuchtung wurde in dem optischen System ein Bild mit einem CCD-basierten Aufnahmegerät (Charge-coupled-Device) gemacht und danach wurde der Magnet zurückgezogen, damit die Beads nicht mehr festgehalten wurden und die nächste Probe konnte analysiert werden.

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der xPonent-Software, die die rot und grün beleuchteten Bilder analysierte und die Ergebnisse in Form von mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI) des Farbstoffs Phycoerythrin und von Anzahl an positiven Antikörpern mitteilte. (Vgl. 217)

2.4 Statistische Methoden

Die Eingabe der Daten erfolgte mit dem Programm Microsoft® Excel (Version 15.32, Microsoft, USA) und die statistische Auswertung mit dem Programm R (Version 3.2.2, www.r-project.org) (209). Dabei wurde ein p-Wert < 0,05 als signifikant angesehen. Es wurden Intraklassenkorrelationen (ICCs) berechnet zum Vergleich der Routine ENA des SAs mit den ENA innerhalb des MAs zur Bestimmung der Retest Reliabilität (209). Um die diagnostische Güte des MAs zu bestimmen und Sensitivität und Spezifität des MAs mit dem Standard Assay (SA) zu vergleichen, wurde eine Receiver Operating Characteristics (ROC)-Analyse durchgeführt und die Area Under the Curve (AUC) bestimmt. Zudem wurde eine ROC Analyse durchgeführt, um die individuelle diagnostische Leistung eines jeden Parameters für die Unterscheidung SLE vs. Gesund zu bestimmen (209). Um positive Seren in der Kontrollpopulation zu bestimmen, wurden optimale Schwellenwerte durch den Youden-Index der ROC bestimmt. Die anderen Parameter wurden als positiv angesehen, wenn die MFI höher war als +2 Standardabweichungen der Kontrollgruppe. Die Rate an positiven Ergebnissen wurde zwischen den Gruppen mithilfe des χ^2 -Test verglichen, einschließlich einer Korrektur nach Bonferroni für Mehrfachtestungen. Um Verbindungen zwischen den Antikörper-

Messungen zu den Routine-Parametern aus Klinik und Labor einzuschätzen, wurde ein stufenweise multivariates Regressionsmodell mit Rückwärtselimination angewandt.

Sofern angebracht wurden die Modelle mit ANOVA verglichen. Die relative Auswirkung von jedem Parameter mit 95 % Konfidenzintervall für die Vorhersage des SLAM wurde nach dem Bootstrapping der Probe beurteilt.

In einem nächsten Schritt wurden die Proben zufällig in eine Trainingsgruppe (75 %) und in eine Validierungsgruppe (25 %) aufgeteilt (209). Binäre logistische Regressionsanalysen wurden durchgeführt für die Routine-Autoantikörper im Vergleich zu den Modellen, die Histon-Antikörper enthielten (Vergleichsmodelle) (209).

Vergleiche der Routine-Antikörpern mit den Vergleichsmodellen in der Trainingsgruppe erfolgten mit Likelihood-Ratio-Test (209). Die Genauigkeit der Zuordnung zu ‚Gesund‘ und ‚SLE‘ wurde bei den Validierungsproben für alle Modelle beurteilt (209). Außerdem wurden Generalisierte Lineare Modelle angewendet einschließlich aller Multiplex-Parameter und klinischer Routine-Informationen, um zu beurteilen ob die Vorhersage der Krankheitsaktivität durch den SLAM verbessert werden kann (209). Klinische Informationen und Ergebnisse von Referenzstandards (z. B. SLE Klassifikation) waren nicht zugänglich für die Leser des MAs und Ergebnisse von letzterem waren nicht zugänglich für Untersucher der Referenzstandards (209). Es gab keine fehlenden Daten in den Referenzstandards oder Index Tests in der aktuellen Kohorte (209).

Die Grafiken in dieser Arbeit wurden mit GraphPad Prism erstellt (Version 7.0c, GraphPad Software, Inc., USA).

3 Ergebnisse

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Unterstützung des Co-Betreuers Professor Dr. med. Stefan Vordenbäumen.

3.1 Vergleich des Multiplex Assay mit einem Standard Assay

Zunächst sollte die Retest-Reliabilität des Multiplex Assays (MA) untersucht werden. Dafür wurden ICC (Intraklassenkorrelationen) für diejenigen Parameter berechnet, die im Standard Assay (SA) enthalten waren (d.h. SSA (52kDa), SSA (60kDa), SSB, U1-RNP, Sm). Diese fünf Proben wurden 12-mal auf verschiedenen Platten gemessen. Wie in Tabelle 5 dargestellt lag der durchschnittliche ICC bei 0,85, von 0,73 bis 0,99 reichend. Damit ist eine gute Übereinstimmung zwischen den zwölf Messungen vorhanden (209).

Tabelle 5. Retest-Reliabilität des Multiplex ENA Assays.

	ICC (95 % KI)
Probe 1	0,84 (0,62-0,98)
Probe 2	0,79 (0,53-0,97)
Probe 3	0,73 (0,45-0,96)
Probe 4	0,90 (0,74-0,99)
Probe 5	0,99 (0,96-1,00)
Durchschnitt	0,85

Intraklassenkorrelation (ICC) mit entsprechenden Konfidenzintervallen (KI) von 12 wiederholten Messungen von fünf Antikörpern (SSA (60kDa), SSA (52kDa), SSB, U1-RNP und Sm) in dem Multiplex Assay.

Um die Diagnostikleistung des MAs zu bestimmen, wurden die Messungen der Routineparameter SSA (60kDa), SSA (52kDa), SSB, U1-RNP, Sm im MA und SA durch ROC Analyse verglichen mit Berechnung der Sensitivität und Spezifität wie in Tabelle 6 beschrieben. Die Area under the curve (AUC) reichte von 0,85 (für U1-RNP) bis 0,9 (für SSA). Beim Anwenden von optimalen thresholds für den Test waren nur 3 (3,7 %) Proben in der Kontrollgruppe positiv (2 SSA60kDa, 1 SSB) (209).

Da keine Routine Tests vorhanden waren, mit denen die anderen Parameter des MAs verglichen werden konnten, wurden Mittelwerte der Kontrolle +2 Standardabweichungen als Grenzwert für das Fluoreszenzsignal verwendet.

Tabelle 6. Diagnostische Leistung des ENA Multiplex Assays.

	AUC (95 % KI)	Sensitivität bei 90 % Spezifität (95 % KI)	Threshold (Sens./Spez.)
SSA60	0,90 (0,85-0,96)	0,83 (0,71-0,94)	1243,5 (0,96/0,81)
SSA52	0,88 (0,82-0,95)	0,77 (0,52-0,88)	11631,8 (0,92/0,78)
SSB	0,93 (0,86-1,00)	0,80 (0,53-1,00)	4983,2 (0,99/0,73)
U1RNP	0,85 (0,72-0,98)	0,76 (0,53-0,94)	4632,2 (0,95/0,76)
Sm	0,87 (0,72-1,00)	0,36 (0,72-1,00)	4514,1 (0,82/0,91)

Area under the curve (AUC) und 95 %-iges Konfidenzintervall (95 % KI) entsprechend der Receiver Operating Characteristics (ROC) Analyse mit Bestimmung von Sensitivität (Sens.) und Spezifität (Spez.). Optimaler threshold mit entsprechender Sensitivität und Spezifität nach Youden.

3.2 Diagnostische Leistung von individuellen Antikörpern

Anschließend wurde die Rate an positiven Signalen zwischen SLE-Patienten und gesunden Kontrollen verglichen wie in Tabelle 7 dargestellt. Nach der Bonferroni-Korrektur zum Ausgleich einer Alphafehler-Kumulation waren insgesamt sieben Antikörper signifikant erhöht bei SLE, einschließlich Antikörper gegen typischerweise SLE-assoziierte Antigene (RPLP2, b2GP, Histone) als auch Antigene, die charakteristisch sind für andere entzündliche rheumatische Erkrankungen (PRTN3, SRP).

Tabelle 7. Nachweis von Autoantikörpern bei SLE und Kontrollen durch Multiplex Assay.

	Kontrollen (n / %)	SLE (n / %)	p-Wert (X ² -Test)
Ku	4 / 4,9	25 / 16,3	0,0209
AQPA	5 / 6,2	1 / 0,7	0,0352
RPLP2	2 / 2,5	78 / 51,0	<0,0001
FBL	5 / 6,2	11 / 7,1	0,9833
b2GP	4 / 4,9	34 / 22,2	0,0013
EJ	2 / 2,5	6 / 3,9	0,8387
Mi2	6 / 7,4	11 / 7,2	1,0000
RNAP	6 / 7,4	12 / 7,8	1,0000
Mi2b	5 / 6,2	6 / 3,9	0,6531
CENPC1	2 / 2,5	10 / 6,5	0,3029
HIST2H2AC	6 / 7,4	53 / 34,6	<0,0001
MRP	5 / 6,2	29 / 19,0	0,0015
HIST2H2AA3	7 / 8,6	40 / 26,1	0,0026
FTH1	5 / 6,2	27 / 17,6	0,0257
Jo1	2 / 2,5	5 / 3,3	1,0000
MPP10	4 / 4,9	16 / 10,5	0,2337
CENPB	5 / 6,2	56 / 36,6	<0,0001
PmScl	5 / 6,2	7 / 4,6	0,8293
PRTN3	2 / 2,5	75 / 49,0	<0,0001
PL7	6 / 7,4	15 / 9,8	0,7115
HIST1H4A	5 / 6,2	138 / 90,2	<0,0001
SRP	5 / 6,2	46 / 30,1	<0,0001
Ku2	15 / 18,5	60 / 39,2	0,0021
Ha	3 / 3,7	12 / 7,8	0,3424
Scl70	6 / 7,4	11 / 7,2	1,0000
CCP	4 / 4,9	11 / 7,2	0,6977

Nachweis von Autoantikörpern durch das Luminex-basierte Multiplex Assay bei Systemischem Lupus erythematoses (SLE) Patienten (n=153) gegen gesunde Kontrollen (n=81). Die Häufigkeit des Antikörper-Nachweises wurde zwischen den Gruppen verglichen durch den X²-Test. Signifikante Ergebnisse nach der Bonferroni-Korrektur sind fettgedruckt.

Als nächstes wurde eine ROC Analyse durchgeführt, um die Sensitivität bei einer fixierten Spezifität von 90 % zu ermitteln. Dieses Vorgehen wurde gewählt, da eine Spezifität von mindestens 90 % als klinisch bedeutsam eingeschätzt wurde und damit andererseits die Sensitivitäten der einzelnen Parameter untereinander einfacher vergleichbar sind. Wie in Tabelle 8 ausgeführt, reichte die AUC von 0,72 bis 0,97. Die HIST1H4A Antikörper zeigten mit einer Sensitivität von 0,95 den besten Wert unter den Parametern (209).

Tabelle 8. Diagnostische Leistung von ausgewählten individuellen Antikörpern aus dem Multiplex Assay für die Diagnose ‚SLE‘ vs. ‚Gesund‘.

Antikörper	AUC (95 % KI)	Sens. bei 90 % Spez. (95 % KI)
SSA60	0,72 (0,66 – 0,79)	0,41 (0,33 – 0,50)
SSA52	0,87 (0,82 – 0,91)	0,63 (0,50 – 0,75)
SSB	0,90 (0,86 – 0,95)	0,76 (0,62 – 0,92)
U1RNP	0,85 (0,80 – 0,90)	0,67 (0,54 – 0,80)
Sm	0,90 (0,86 – 0,94)	0,65 (0,52 – 0,80)
RPLP2	0,90 (0,86 – 0,94)	0,75 (0,56 – 0,86)
HIST2H2AA3	0,75 (0,68 – 0,81)	0,33 (0,20 – 0,58)
HIST2H2AC	0,81 (0,75 – 0,87)	0,50 (0,28 – 0,65)
HIST1H4A	0,97 (0,96 – 0,99)	0,95 (0,88 – 0,98)

Area under the curve (AUC) und 95 %-iges Konfidenzintervall (95 % KI) gemäß der Receiver Operating Characteristics (ROC)-Analyse mit Bestimmung von Sensitivität (Sens.) und Spezifität (Spez.) für die Diagnose von systemischem Lupus erythematoses vs. gesunde Kontrollen.

Es waren keine dsDNA-Antikörper Messungen für die Kontrollen vorhanden. Nichtsdestotrotz sollte sichergestellt werden, dass HIST1H4A-IgG-Spiegel nicht nur die dsDNA-Antikörper-Spiegel widerspiegeln. Als Erstes wurde eine Spearman-Korrelation bewertet, die eine schwache Assoziation mit einem Koeffizienten von 0,23 ($p=0,0094$) zeigte. Als Nächstes wurden dsDNA-Antikörper-Spiegel aufgeteilt (positiv (z.B. > 7 IU/ml) oder negativ) und mit HIST1H4A-IgG Positivität bei optimalem threshold verglichen (entsprechend Youden mit einer Sensitivität von 95,4 % und einer Spezifität von 92,6 %). Während dsDNA-Antikörper in 47 Fällen falsch negativ waren, haben HIST1H4A-IgG nur vier Fälle nicht erkannt. Der Chi-Quadrat-Test als eine Messung der Assoziation zwischen den beiden Markern war wie in Tabelle 9 dargestellt nicht signifikant ($p = 0,62$) (209).

Tabelle 9. Kontingenztabelle für die Häufigkeit von dsDNA-Antikörpern im Vergleich zu HIST1H4A-IgG bei SLE-Patienten.

		HIST1H4a-IgG	
		Negativ	Positiv
dsDNA	Negativ	1	46
	Positiv	3	78

Chi-Quadrat-Test p = 0,62.

3.3 Einschätzung der Krankheitsaktivität

In einem nächsten Schritt sollte exploriert werden, ob Antikörperkonzentrationen des Multiplex Assays auch eine Assoziation zur Krankheitsaktivität zeigen. Daher wurden in dieser Querschnittsuntersuchung Routine-Laborparameter (C3c, C4, dsDNA-AK, CRP) sowie klinische Parameter (SLICC, Krankheitsdauer, Alter, Geschlecht) zusammen mit den Autoantikörperkonzentrationen aus dem Multiplex Assay mittels schrittweiser linearer Regression hinsichtlich ihrer Assoziation zur Krankheitsaktivität (gemessen am SLAM) untersucht. Signifikante Prädiktoren in der Reihenfolge ihrer relativen Auswirkungen bestehen in CRP, Schadensindex (SLICC), C3c, dsDNA und HIST1H4A-IgG. Hohe Spiegel von HIST1H4A-IgG waren assoziiert mit einer niedrigen Krankheitsaktivität (209).

Tabelle 10. Schrittweise Regression mit Rückwärtselimination der Krankheitsaktivität (SLAM) einschließlich Antikörper und Klinik- und Labor-Parameter.

Einfluss	Schätzung	Standardfehler	p-Wert
RPLP2	8,52e-5	4,46e-5	0,06
HIST1H4A	-8,59e-4	3,67e-4	0,02
Krankheitsdauer	-7,24e-2	4,32e-2	0,10
SLICC-DI	4,92e-1	1,79e-1	0,01
CRP	1,31	3,49e-1	0,0002
C3c	-3,04e-2	1,21e-2	0,01
dsDNA	4,71e-3	2,18e-3	0,03

Schrittweise lineares Regressionsmodell mit Rückwärtselimination für die Vorhersager der Krankheitsaktivität (SLAM). Antikörper gegen RPLP2 (Ribosomales P), Histon H4 (HIST1H4A), Krankheitsdauer des SLE, Schädigungsindex (SLICC-DI), C-reaktives Protein (CRP), Komplement C3c Spiegel (C3c) und dsDNA-Antikörper mittels Radioimmunassay gemessen. Signifikante Prädiktoren ($p < 0,05$) sind fettgedruckt.

3.4 Diagnostische Leistung und Vergleich von Autoantikörper-Kombinationen einschließlich Histon-Antikörpern

Die bisher dargestellten Ergebnisse legten nahe, dass die Ergänzung von Histon-Antikörpern zu dem Standard Assay das diagnostische Potenzial erhöhen könnte. Um dieses Ergebnis zu untersuchen wurde der Datensatz zufällig aufgeteilt in einen Trainingsdatensatz (75 % der Fälle) und einen Validierungsdatensatz (25 % der Fälle). Dann wurden binäre logistische Regressionsmodelle berechnet für die Diagnose ‚SLE‘ im Gegensatz zu ‚Gesund‘ für den Standard Assay und mit je einem Histon-Antikörper eingeschlossen. Die Anpassungsgüte der unterschiedlichen Modelle zu den tatsächlichen Daten wurde in dem Trainingsdatensatz verglichen. Die Genauigkeit, die Krankheitsaktivität bei allen Modellen korrekt vorherzusagen, wurde innerhalb des Validierungsdatensatzes beurteilt. Wie in Tabelle 11 zu sehen, ergab das Hinzufügen von HIST2H2AC oder HIST2H2AA3 Antikörpern ein geringfügig besseres Ergebnis. Das Hinzufügen von HIST1H4A Antikörpern hingegen verbesserte das Ergebnis und die Genauigkeit bei der Vorhersage der Krankheitsaktivität deutlich auf einem hohen signifikanten Niveau. Tabelle 12 zeigt die Details des binären logistischen Regressionsmodells mit HIST1H4A Antikörpern (209).

Tabelle 11. Vergleich der binären logistischen Regressionsmodelle für die Vorhersage SLE vs. Gesund.

Modell	Antikörper	Residuen- Devianz	p-Wert	Genauigkeit (Training) (%)	Genauigkeit (Validierung) (%)
Standard	SSA (60kDa), SSA (52kDa), SSB, U1-RNP, Sm, RPLP2	97,1	NA	89,1	86,4
Modell 1	Standard + HIST2H2AA3	87,5	0,02	90,3	86,4
Modell 2	Standard + HIST2H2AC	87,4	0,02	89,1	86,4
Modell 3	Standard + HIST1H4A	45,9	4,3 x 10 ⁻¹¹	95,4	89,8

Binäre logistische Regressionsmodelle für die Vorhersage ‚SLE‘ vs. ‚Gesund‘. Ein Standard Modell mit den aufgeführten Antikörpern wurde verglichen mit Modellen mit zusätzlichen Histon-Antikörpern (Modelle 1-3). Mittels Residuen-Devianz wurde das Standard Modell mit jedem Modell mittels Likelihood-Ratio-Tests verglichen (p-Wert). Genauigkeit: Genauigkeit der Zuweisung zu SLE oder Gesund im Trainings- und Validierungsdatensatz. NA= nicht anwendbar.

Tabelle 12. Details des binären logistischen Regressionsmodells mit HIST1H4A für die Vorhersage ‚SLE‘ vs. ‚Gesund‘.

Einfluss	Schätzung	Standardfehler	p-Wert
SSB	6,06e-5	2,76e-4	0,83
SSA52	-9,35e-5	1,50e-4	0,53
Sm	4,10e-4	3,85e-4	0,29
U1RNP	6,76e-5	2,32e-4	0,77
SSA60	4,11e-4	7,00e-4	0,56
RPLP2	3,64e-4	9,93e-4	0,71
HIST1H4A	1,32e-2	3,16e-3	<0,0001

Binäres logistisches Regressionsmodell für die Berechnung der Diagnose ‚SLE‘ vs. ‚Gesund‘. Signifikante Prädiktoren (p<0,05) sind fettgedruckt.

4 Diskussion

4.1 Allgemein

Die Bildung von Autoantikörpern ist ein Markenzeichen des SLE und deren Nachweis ein etablierter Bestandteil in der Diagnostik und Verlaufskontrolle.

Krankheitsspezifische Autoantikörper sind nur in einer niedrigen Frequenz vorhanden. Deshalb erfordert eine verlässliche Diagnostik, die auf Autoantikörper-Analysen basiert, die Untersuchung mehrerer Autoantigene. Durch technische Verbesserungen ist die Untersuchung einer großen Anzahl von Autoantikörpern in einem einzigen Test möglich und es gibt bereits einige Beispiele unterschiedlicher Assays, die in Bezug auf SLE untersucht worden sind (191,192,197,199,201,203,206,218–226).

Multiplex Assays basieren auf der Anwendung von sogenannten Beads. Bei diesen handelt es sich um 5,6 Mikrometer große Polystyrolpartikel, an die zu testende Antigene / Proteine gebunden werden können. Bei Multiplex Assays des Herstellers Luminex kann man zwischen unterschiedlichen Systemen wie dem Luminex® 100/200™, dem FLEXMAP 3D® und dem in dieser Arbeit verwendeten MAGPIX® wählen.

Zudem gibt es andere Instrumente, die auf der Luminex-Technologie basieren, wie das Bio-Plex 200, 2200 und 3D (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), das AtheNA Multi-Lyte® Instrument (ZEUS Scientific Inc, Branchburg, NJ, USA) oder das FIDIS™ System (Theradiag, Croissy Beaubourg, FRA) und unterschiedliche kommerzielle Assays für die Untersuchung von Autoantikörpern. In vorangegangenen Studien wurden diese verschiedenen Systeme bei unterschiedlichen Krankheiten untersucht und mit ELISAs oder IIF verglichen. Es gab Untersuchungen mit dem Luminex® 100/200™ (192,195,199,204,225), dem Bio-Plex System (190,194,197,205,206,220,222,226–230), dem AtheNA Multi-Lyte Test System (191,195,198,199,231) oder dem FIDIS™ System (203,232).

Trotz der zahlreichen Studien zu unterschiedlichen Multiplex Assays ist ein Vergleich dieser Studien sehr schwierig, da es keine Standardisierung der Verfahren gibt (233).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob ein Multiplex Assay mit erweitertem Antigenspektrum Vorteile in der Differenzierung eines SLE von Gesunden gegenüber einem Screening mit einem konventionellen ENA-Test bringt und ob im Multiplex Assay erfasste Antikörper zur Krankheitsaktivität bei SLE-Patienten assoziiert sind. Es wird gezeigt, dass insbesondere durch die Hinzunahme bestimmter Histon-Antikörper eine Verbesserung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität erzeugt werden konnte, und dass HIST1H4A-Antikörper Assoziationen zur Krankheitsaktivität zeigen.

Die Auswahl an Antigenen, die im Multiplex Assay verwendet wurden, basierte auf einer Auswahl an häufig bei verschiedenen rheumatischen Erkrankungen detektierbaren Antikörpern. Eine empirische Optimierung dieser Auswahl erfolgte nicht, so dass eine optimierte Auswahl an Antigenen oder eine Hinzunahme von noch unbekanntem Antigenen die diagnostische Wertigkeit eines Multiplex Assays vermutlich noch weiter steigern kann. Der Vorteil einer variablen Auswahl an Antigenen mit z. B. nicht typischerweise mit dem SLE-assoziierten Antikörpern hat jedoch den Vorteil eines klinisch breiteren Einsatzes unabhängig von der Verdachtsdiagnose (z. B. SLE vs. rheumatoide Arthritis oder anderen entzündlich-rheumatischen Erkrankungen). Damit wäre ein solcher Assay potentiell auch leichter von Nicht-Experten einsetzbar.

Insgesamt waren von den 31 in unserem Multiplex Assay enthaltenen Autoantikörpern sieben Antikörper (RPLP2, b2GP, HIST2H2AC, CENPB, PRTN3, HIST1H4A, SRP) signifikant bei SLE erhöht. Hiervon war eine Assoziation mit der Diagnose SLE bereits für RPLP2, b2GP oder Histon-Antikörper bekannt. Wir fanden allerdings auch signifikant erhöhte Antikörper gegen Proteinase 3 (PRTN3) oder gegen SRP (signal recognition particle). Antikörper gegen PRTN3 wurden bei 49,0 % der SLE-Patienten nachgewiesen (Tabelle 7). PRTN3 sind typischerweise assoziiert mit Vaskulitiden, am häufigsten mit Granulomatose mit Polyangiitis (234,235), und gehören zu den antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (ANCA). Zuvor wurde von Detektionsraten von ANCA bei SLE bis zu 37 % berichtet (236), während die PRTN3-Spezifität dieser ANCA eigentlich selten zu sein scheint (237). Manolova et al. entdeckten in ihrer Studie hingegen Antikörper gegen PRTN3 bei 12,7 % von 55 SLE-Patienten (238). Die Häufigkeiten in anderen Studien lagen bei 0-1,7 % (239–242). Zu beachten ist hierbei, dass der PRTN3-Grenzwert in unserem MA nicht im Vergleich zu einem Gold-Standard wie Immunblot oder ELISA bestimmt wurde.

ANCA konnten bei SLE bisher keine klinische Bedeutung zugeordnet werden (243) und das gleichzeitige Auftreten eines SLE und einer ANCA-assoziierten Vaskulitis ist sehr selten (244). Ein Zusammenhang wurde in unserer Studie nicht untersucht. Autoantikörper gegen SRP treten häufig bei Dermatomyositis und Polymyositis und insbesondere bei einer schweren nekrotisierenden Myopathie auf (245). Anti-SRP sind zudem vor allem mit einer Herz- und Lungenbeteiligung assoziiert (246–248). Bisher wurde nur eine Assoziation von SRP-Antikörpern mit pädiatrischer Lupusnephritis berichtet (249). Das Durchschnittsalter unserer Patienten lag bei 41,0 Jahren (s. Tabelle 2) und es gab keine pädiatrischen Patienten, sodass dieser Zusammenhang in unserer Studie nicht belegt werden konnte. Ebenfalls enthalten im Multiplex Assay war ein citrulliniertes Peptid zum Nachweis von spezifischen Antikörpern für die rheumatoide Arthritis, der gelegentlich bei Patienten mit Overlap-Syndromen aus SLE und RA auffällig und dann auch in SLE-Kohorten gelegentlich erhöht ist (250–252). In der aktuellen Untersuchung waren diese Autoantikörper bei SLE nicht erhöht, was möglicherweise auf das Fehlen von Patienten mit entsprechenden Overlap-Syndromen in der aktuellen Kohorte zurückzuführen ist.

4.2 Vergleich des Multiplex Assay mit einem Standard Assay

Die Konkordanz zwischen dem von uns untersuchten MA und den Routineverfahren lag zwischen 73 % und 99 %; daraus ergab sich eine durchschnittliche Retest-Reliabilität von 85 % (209).

In einigen Studien, die die Multiplex Verfahren mit den bisherigen Testsystemen, die in der Routine Anwendung finden, verglichen, zeigte sich ebenfalls eine gute Konkordanz der unterschiedlichen Verfahren:

Shovman et al. untersuchten unter anderem die Seren von 113 SLE-Patienten auf das Vorhandensein von unterschiedlichen ANAs mit dem Athena MultiLyte ANA System und verglichen diese Ergebnisse mit Messungen mittels ELISA. Dabei lag die Konkordanz bei der Untersuchung von Patienten mit Autoimmunerkrankungen bei 92 – 97,7 % und die Sensitivität des Multiplex Assays bei 80,5 % verglichen mit einer Sensitivität von 82,3 % bei dem Nachweis mit ELISA (195).

Rouquette et al. verglichen ANA-Messungen mittels des FIDIS Immunassay auf dem Luminex® 100 System mit etablierten Methoden wie Immunfluoreszenz. Dabei lag die Konkordanz bei 99,1-100 % (225).

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Studien hatte die Studie von Bonilla et al. hatte eine Konkordanz von 95,6 % bei negativen Ergebnissen und bei positiven Ergebnissen eine Konkordanz von nur 41,9 %. (253).

Die in unserer Studie festgestellte Konkordanz war somit im Einklang mit den Vergleichen aus anderen Studien.

4.3 Einschätzung der Krankheitsaktivität

In einem nächsten Schritt wurde analysiert, ob es Assoziationen zwischen der Krankheitsaktivität und den Parametern des Multiplex Assays gibt. Einschränkend muss angemerkt werden, dass diese Studie eine Querschnittsstudie ist, daher keine longitudinalen Messungen möglich waren und so die vorliegende Analyse zu diesem Thema nur eine Abschätzung erlaubt.

Um zu explorieren, ob die Antikörperkonzentrationen des Multiplex Assay eine Assoziation zu der Krankheitsaktivität zeigen, wurden die Routine-Laborparameter (C3c, C4, dsDNA-AK, CRP) sowie klinischen Parameter (SLICC, Krankheitsdauer, Alter, Geschlecht) zusammen mit den Autoantikörperkonzentrationen aus dem Multiplex Assay mittels schrittweiser linearer Regression hinsichtlich ihrer Assoziation zur Krankheitsaktivität (gemessen am SLAM) untersucht.

Signifikante Prädiktoren der Krankheitsaktivität (SLAM) bestehen in CRP, Schadensindex (SLICC), C3c, dsDNA und HIST1H4A-IgG (s. Tabelle 10). Dabei waren niedrige HIST1H4A-IgG-Konzentrationen mit einer höheren Krankheitsaktivität assoziiert.

Die in unserer Studie mit der Krankheitsaktivität assoziierten anti-dsDNA Konzentrationen (gemessen mittels Radioimmunassay) sind bekanntermaßen Prädiktoren einer Nierenschädigung im Rahmen des SLE , wobei dies v. a. für die Messung von dsDNA mittels RIA gezeigt wurde (102,254). Zudem konnte

nachgewiesen werden, dass ein Anstieg der anti-dsDNA Spiegel einer Exazerbation des SLE vorausgehen kann, gefolgt von einem Abfall der Spiegel (64,69,255).

Abgesehen von dem Nachweis von dsDNA-Antikörpern waren nur HIST1H4A-IgG mit der Krankheitsaktivität assoziiert. In anderen Studien konnten bisher keine anti-ENA gefunden werden, die signifikant mit der Krankheitsaktivität korrelieren (256,257). Jedoch untersuchten Gussin et al. die Seren von 128 SLE-Patienten und verglichen die Spiegel von anti-Scl-70 Antikörpern mit der durch den SLAM erfassten Krankheitsaktivität und konnten bei 25 % der Patienten, bei denen anti-Scl-70 nachweisbar war, eine Korrelation mit der Krankheitsaktivität nachweisen (258).

Das C-reaktive Protein (CRP) hatte im Rahmen der multivariaten schrittweisen Regressionsanalyse in unserer Studie den größten Einfluss auf die Schätzung der Krankheitsaktivität (SLAM). CRP ist in der Regel im Rahmen eines SLE nicht erhöht. Obwohl der SLE vor allem durch die Bildung von Autoantikörpern und Immunkomplexen gekennzeichnet ist, sind die meisten Organmanifestationen entzündlich (259). Erhöhte CRP-Werte können also auch für aktive Infektionen, oder alternativ für eine Serositis oder eine Lupusarthritis, sprechen und können zum Beispiel im Rahmen einer Pleuritis oder Perikarditis einen Einfluss auf die durch den SLAM erfasste Krankheitsaktivität haben (55,260–265,259,266).

Hohe Spiegel von HIST1H4A-IgG waren in der vorliegenden Arbeit assoziiert mit einer niedrigen Krankheitsaktivität. Histon-Antikörper sind in dem Zusammenhang mit einem SLE schon mehrfach untersucht worden und in einigen Studien konnte ebenfalls ein Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität nachgewiesen werden (111,112,267–269).

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Studien gab es aber auch einige Studien, die keinen Zusammenhang von Histon-Antikörpern und Krankheitsaktivität zeigen konnten (270–275).

Erhöhte Histon-Antikörper können auch im Rahmen eines Medikamenten induzierten Lupus erythematoses (drug induced lupus erythematosus, DILE) nachgewiesen werden (276). Typisch für den DILE ist ein Rückgang nach Absetzen des Medikaments und ein damit einhergehender Abfall des Titers der Histon-Antikörper (276). Neben Hautmanifestationen können auch eine Arthritis oder Serositis auftreten (276).

Histone sind potentielle Aktivatoren des Immunsystems via Bindung an die Toll-Like-Rezeptoren 2 und 4 (277). Dieser entzündungsfördernde Zustand konnte durch Histon-Antikörper in experimentellen Entzündungsmodellen gehemmt werden (278). HIST1H4A-IgG sind dann vielleicht eine Antwort des Immunsystems auf die Aktivierung beim SLE, die gegen die aktive Krankheit schützen soll durch Unterdrückung der proentzündlichen Aktivität des Histons H4.

Der Schadensindex SLICC-DI dient zur standardisierten Erfassung von Einschränkungen der Organfunktionen im Rahmen eines SLE und erfasst Schäden seit dem Beginn der Erkrankung (213). Erhöhte Scores des SLICC-DI sind unter anderem assoziiert mit einer erniedrigten Lebensqualität und einer erhöhten Mortalität (279–283). Dabei nimmt der Schaden mit der Zeit zu und die Krankheitsaktivität oder eine immunsuppressive Therapie sind assoziiert mit einem künftigen Schaden (282). In unserer Studie waren wie zu erwarten die Krankheitsaktivität und der Schadensindex assoziiert.

Die Komplementfaktoren C3 und C4 sind bekannte Marker für die Krankheitsaktivität eines SLE und in unserer Studie war niedriges C3c ein Prädiktor für eine höhere Krankheitsaktivität (284,285). C3c ist ein stabiles Fragment des Komplementfaktors C3 und dient als Marker für den Umsatz an C3. In Zukunft werden Komplementfaktoren eventuell auch therapeutisch an Bedeutung gewinnen. C3- und C5-Blocker befinden sich aktuell in Entwicklung für unterschiedliche Indikationen (286,287).

In unserer Studie gab es keine unabhängige Verbindung von anti-Sm Antikörpern zu der durch den SLAM repräsentierten Krankheitsaktivität ebenso wie in anderen Studien, die auch keine prädiktive Korrelation von anti-Sm Antikörpern und Krankheitsaktivität gefunden haben (257,288). Es gibt jedoch einige Berichte, die anti-Sm Antikörper mit der durch den SLEDAI gemessenen Krankheitsaktivität in Verbindung bringen (197,219). Bei der Bewertung von anti-Sm Antikörpern muss jedoch auch ihre erhöhte Prävalenz bei Afrikanern und Asiaten im Vergleich zu Kaukasiern bedacht werden (289).

4.4 Diagnostische Leistung von individuellen Antikörpern

Grundsätzlich ist der Nachweis eines Antikörpers oder ANA-Titers nicht allein ausreichend für die Diagnose eines SLE, sondern hiermit zu vereinbarende klinische Symptome oder Zeichen sollten ebenfalls vorhanden sein. Dies wird zum Beispiel auch in den EULAR/ACR-Klassifikationskriterien für den SLE berücksichtigt (Tabelle 1). Dennoch leisten Antikörper einen wichtigen Baustein bei der Diagnose, aber prinzipiell sollte nur bei einem konkreten klinischen Verdacht auf eine Kollagenose eine Untersuchung auf ANA erfolgen.

Nach der Bonferroni-Korrektur zum Ausgleich einer Alphafehler-Kumulation waren insgesamt sieben Antikörper signifikant erhöht bei SLE, einschließlich Antikörper gegen typischerweise SLE-assoziierte Antigene (RPLP2, b2GP, Histone) als auch Antigene, die charakteristisch sind für andere entzündliche rheumatische Erkrankungen (PRTN3, SRP, CENPB).

Unter den untersuchten Parametern des Multiplex Assays zeigten Histon-Antikörper, insbesondere HIST1H4A, eine besonders hohe diagnostische Sensitivität und Spezifität, die auch dem Vergleich mit den Parametern des Standard Assays standhielt. Im Vergleich der binären logistischen Regressionsmodelle für die Vorhersage ‚SLE‘ oder ‚Gesund‘ verbesserten HIST1H4A Antikörper zudem das Ergebnis und die Genauigkeit bei der Vorhersage der Krankheitsaktivität signifikant im Vergleich zu HIST2H2AC oder HIST2H2AA3 Antikörpern.

Im Gegensatz zu anderen Histon-Antikörpern, vor allem zu H2A und H2B, wurde bisher von Histon H4-Antikörpern angenommen, dass sie einen schlechteren diagnostischen Nutzen haben (112,267,290,291). Einige der Studien zu H4-Antikörpern verwendeten jedoch unterschiedliche Technologien oder nicht-rekombinantes H4 mit zusätzlichen anderen Histonen (112) oder nicht-humanen Proteinen (290,209). Beispielsweise untersuchten Gioud et al. die Seren von 131 Patienten mittels ELISA auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen komplette Histone und gegen die Histon-Fraktionen H1, H2a-H4, H2b und H3. Dabei waren bei 52,4 % der SLE-Patienten Histon-Antikörper nachweisbar und nur bei einem Patienten mit Systemischer Sklerose. Dabei ist besonders beachtenswert, dass die Antikörper bei 87 % der Patienten mit

einem aktiven SLE nachweisbar waren und nur bei 18 % der Patienten mit einem inaktiven SLE (112).

4.5 Schwächen der Studie

Schwächen unserer Studie liegen in der heterogenen Patientenbehandlung, dem Fehlen von einer Krankheitskontrollgruppe und von Gold-Standard-Tests, um einige der verwendeten Antikörper zu bestimmen, abgesehen von den Cutoffs, die im Vergleich zu gesunden Kontrollen definiert worden sind (209). Zudem ist diese Studie eine Querschnittsstudie und daher waren keine longitudinalen Messungen möglich und es ist keine Aussage möglich zu dem Beginn der Erkrankung.

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Autoantikörper sind ein zentrales Element für die Diagnostik des Systemischen Lupus erythematoses. Die verfügbaren Autoantikörper sind häufig wenig spezifisch (ANA) oder wenig sensitiv (ENA) und werden daher mit der Klinik kombiniert für eine Diagnosesicherung.

Das Ziel dieser Arbeit war es zu beurteilen, ob für einen erweiterten sog. Kollagenosen-assoziierten Multiplex Assay (MA) im Vergleich zu einem für den SLE typischen Standard Assay (SA) ein zusätzlicher diagnostischer Nutzen vorliegt und ob Parameter des erweiterten Assays die Krankheitsaktivität widerspiegeln.

In diesem aktuellen prototypischen MA kombinierten wir SLE-assoziierte Antigene mit Antigenen, die mit anderen entzündlich-rheumatischen Erkrankungen assoziiert sind und in dem verwendeten Assay-System für diese auch schon geprüft waren. Die Untersuchung erfolgte mit einem Magpix-basierten Verfahren auf einer Luminex Plattform an 153 SLE-Patienten und 81 gesunden Kontrollen.

Der Multiplex Assay zeigte im Vergleich zu dem Standard Assay eine gute Retest-Reliabilität und Diagnostikleistung (209).

Von den 31 in dem MA enthaltenen Antikörpern waren für sieben Antikörper erhöhte Spiegel bei SLE-Patienten nachweisbar. Darunter sowohl SLE-typische Antikörper (RPLP2, b2GP, HIST2H2AC, HIST1H4A) als auch Antikörper, die charakteristisch sind für andere Autoimmunerkrankungen (PRTN3, SRP54, CENPB).

Es konnte zudem gezeigt werden, dass HIST1H4A-IgG Antikörper hoch spezifisch und sensitiv für die Diagnose eines SLE gegenüber gesunden Kontrollen waren mit einer überlegenen diagnostischen Leistung im Gegensatz zu konventionellen Markern. HIST1H4A-IgG Antikörper sollten daher weiter untersucht werden in der Diagnosestellung des SLE (209).

In der multivariaten Datenanalyse ergab sich unter Einbeziehung klinischer Parameter ein Zusammenhang der durch den SLAM erfassten Krankheitsaktivität mit eingetretenem Schaden (SLICC), CRP, C3c-Abfall und DNS-Antikörpern ($R^2=0,19$). Für die Fluoreszenzintensität und die Anzahl an positiven Antikörpern konnte ein Zusammenhang zu IgG-Serumspiegeln und ein inverser Zusammenhang zu C4 (jeweils

p= 0,0019 und p=0,0014) festgestellt werden. Unter Einbeziehung der b2GP-Serumlevel aus dem Multiplex Assay verbesserte sich die Vorhersage des SLAM geringfügig, aber signifikant ($R^2=0,23$, p=0,0009).

SRP-Antikörper wurden bei SLE Patienten mit einer hohen Frequenz nachgewiesen im Vergleich zu Kontrollen und verdienen weitere Aufmerksamkeit als ein potentieller diagnostischer Autoantikörper.

Folgende Resultate der vorliegenden Arbeit sind hervorzuheben:

1. HISTH4A-Antikörper haben eine hohe diagnostische Wertigkeit bei der Abgrenzung eines SLE von gesunden Personen und sollten weiter validiert werden.
2. Durch einen Multiplex Ansatz können potentielle neue diagnostische Marker wie HIST1H4A-IgG Antikörper vergleichend zu etablierten Markern evaluiert werden und somit die Auswahl geeigneter Kandidaten zur Weiterentwicklung mit diagnostischem Mehrwert erleichtern.

6 Literaturverzeichnis

1. Genth E, Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie, Herausgeber. Qualitätssicherung in der Rheumatologie. 2. Aufl. Darmstadt: Steinkopff; 2007. 583 S.
2. Dunky A, Graninger W, Herold M, Smolen J, Wanivenhaus A. Praktische Rheumatologie. 5., aktualisierte und erw. Aufl. Wien: Springer; 2012. 916 S.
3. Brinks R, Fischer-Betz R, Sander O, Richter JG, Chehab G, Schneider M. Age-specific prevalence of diagnosed systemic lupus erythematosus in Germany 2002 and projection to 2030. *Lupus*. November 2014;23(13):1407–11.
4. Arnaud L, Fagot J-P, Mathian A, Paita M, Fagot-Campagna A, Amoura Z. Prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in France: a 2010 nationwide population-based study. *Autoimmun Rev*. November 2014;13(11):1082–9.
5. Lim SS, Bayakly AR, Helmick CG, Gordon C, Easley KA, Drenkard C. The incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus, 2002-2004: The Georgia Lupus Registry. *Arthritis Rheumatol* Hoboken NJ. Februar 2014;66(2):357–68.
6. Somers EC, Marder W, Cagnoli P, Lewis EE, DeGuire P, Gordon C, u. a. Population-based incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: the Michigan Lupus Epidemiology and Surveillance program. *Arthritis Rheumatol* Hoboken NJ. Februar 2014;66(2):369–78.
7. Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus*. 2006;15(5):308–18.
8. Pamuk ON, Balci MA, Donmez S, Tsokos GC. The incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus in Thrace, 2003-2014: A 12-year epidemiological study. *Lupus*. Januar 2016;25(1):102–9.
9. Lewis MJ, Jawad AS. The effect of ethnicity and genetic ancestry on the epidemiology, clinical features and outcome of systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Oxf Engl*. 01 2017;56(suppl_1):i67–77.
10. Nived O, Sturfelt G, Wollheim F. Systemic lupus erythematosus in an adult population in southern Sweden: incidence, prevalence and validity of ARA revised classification criteria. *Br J Rheumatol*. Mai 1985;24(2):147–54.
11. Jonsson H, Nived O, Sturfelt G. Outcome in systemic lupus erythematosus: a prospective study of patients from a defined population. *Medicine (Baltimore)*. Mai 1989;68(3):141–50.
12. Uramoto KM, Michet Jr. CJ, Thumboo J, Sunku J, O’Fallon WM, Gabriel SE. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950–1992. *Arthritis Rheum*. 1. Januar 1999;42(1):46–50.
13. Merrell M, Shulman LE. Determination of prognosis in chronic disease, illustrated by systemic lupus erythematosus. *J Chronic Dis*. 1. Januar 1955;1(1):12–32.
14. Mak A, Cheung MW-L, Chiew HJ, Liu Y, Ho RC. Global trend of survival and damage of systemic lupus erythematosus: meta-analysis and meta-regression of observational studies from the 1950s to 2000s. *Semin Arthritis Rheum*. Juni 2012;41(6):830–9.
15. Trager J, Ward MM. Mortality and causes of death in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. September 2001;13(5):345–51.
16. Abu-Shakra M, Urowitz MB, Gladman DD, Gough J. Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center. I. Causes of death. *J Rheumatol*. Juli 1995;22(7):1259–64.

17. Urowitz MB, Gladman DD. Evolving spectrum of mortality and morbidity in SLE. *Lupus*. 1. Mai 1999;8(4):253–5.
18. Massardo L, Martínez ME, Jacobelli S, Villarroel L, Rosenberg H, Rivero S. Survival of Chilean patients with systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*. August 1994;24(1):1–11.
19. Pistiner M, Wallace DJ, Nessim S, Metzger AL, Klinenberg JR. Lupus erythematosus in the 1980s: a survey of 570 patients. *Semin Arthritis Rheum*. August 1991;21(1):55–64.
20. Bernatsky S, Boivin J-F, Joseph L, Manzi S, Ginzler E, Gladman DD, u. a. Mortality in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1. August 2006;54(8):2550–7.
21. Cervera R, Khamashta MA, Hughes GRV. The Euro-lupus project: epidemiology of systemic lupus erythematosus in Europe. *Lupus*. September 2009;18(10):869–74.
22. Ghodke-Puranik Y, Niewold TB. Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *J Autoimmun*. November 2015;64:125–36.
23. Crispín JC, Hedrich CM, Tsokos GC. Gene-function studies in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. August 2013;9(8):476–84.
24. Ramos PS, Kelly JA, Gray-McGuire C, Bruner GR, Leiran AN, Meyer CM, u. a. Familial aggregation and linkage analysis of autoantibody traits in pedigrees multiplex for systemic lupus erythematosus. *Genes Immun*. Juli 2006;7(5):417–32.
25. Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, u. a. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. März 1992;35(3):311–8.
26. Lahita RG, Tsokos G, Buyon JP, Koike T. *Systemic Lupus Erythematosus*. Academic Press; 2010. 1155 S.
27. Tsokos GC. Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med*. 1. Dezember 2011;365(22):2110–21.
28. Stone NM, Williams A, Wilkinson JD, Bird G. Systemic lupus erythematosus with C1q deficiency. *Br J Dermatol*. März 2000;142(3):521–4.
29. Dragon-Durey MA, Quartier P, Frémeaux-Bacchi V, Blouin J, de Barace C, Prieur AM, u. a. Molecular basis of a selective C1s deficiency associated with early onset multiple autoimmune diseases. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15. Juni 2001;166(12):7612–6.
30. Rupert KL, Moulds JM, Yang Y, Arnett FC, Warren RW, Reveille JD, u. a. The molecular basis of complete complement C4A and C4B deficiencies in a systemic lupus erythematosus patient with homozygous C4A and C4B mutant genes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1. August 2002;169(3):1570–8.
31. Moser KL, Kelly JA, Lessard CJ, Harley JB. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun*. Juli 2009;10(5):373–9.
32. Bao L, Cunningham PN, Quigg RJ. Complement in Lupus Nephritis: New Perspectives. *Kidney Dis Basel Switz*. September 2015;1(2):91–9.
33. Liu C-C, Ahearn JM. The search for lupus biomarkers. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. August 2009;23(4):507–23.
34. Zhao L, Ye Y, Zhang X. B cells biology in systemic lupus erythematosus—from bench to bedside. *Sci China Life Sci*. November 2015;58(11):1111–25.
35. Iwata S, Tanaka Y. B-cell subsets, signaling and their roles in secretion of autoantibodies. *Lupus*. Juli 2016;25(8):850–6.
36. Tan P, Pang G, Wilson JD. Immunoglobulin production in vitro by peripheral blood lymphocytes in systemic lupus erythematosus: helper T cell defect and B cell

- hyperreactivity. *Clin Exp Immunol*. Juni 1981;44(3):548–54.
37. Rasmussen TK. Follicular T helper cells and IL-21 in rheumatic diseases. *Dan Med J*. Oktober 2016;63(10).
 38. Hartung K, Seelig H-P. Labordiagnostik der systemischen Autoimmunerkrankungen. *Z Für Rheumatol*. 1. Dezember 2006;65(8):709–24.
 39. Alexander T, Radbruch A, Hiepe F. [Pathogenesis of systemic lupus erythematosus]. *Z Rheumatol*. April 2015;74(3):183–90.
 40. Toong C, Adelstein S, Phan TG. Clearing the complexity: immune complexes and their treatment in lupus nephritis. *Int J Nephrol Renov Dis*. 11. Januar 2011;4:17–28.
 41. Bertolaccini ML, Khamashta MA, Hughes GR. Diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2005;1(1):40–6.
 42. Lu R, Munroe ME, Guthridge JM, Bean KM, Fife DA, Chen H, u. a. Dysregulation of innate and adaptive serum mediators precedes systemic lupus erythematosus classification and improves prognostic accuracy of autoantibodies. *J Autoimmun*. November 2016;74:182–93.
 43. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, u. a. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 5. März 2004;303(5663):1532–5.
 44. Yu Y, Su K. Neutrophil Extracellular Traps and Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Cell Immunol*. April 2013;4.
 45. Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, u. a. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25. Mai 2010;107(21):9813–8.
 46. Leffler J, Martin M, Gullstrand B, Tydén H, Lood C, Truedsson L, u. a. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1. April 2012;188(7):3522–31.
 47. Delfani P, Sturfelt G, Gullstrand B, Carlsson A, Kassandra M, Borrebaeck C a. K, u. a. Deciphering systemic lupus erythematosus-associated serum biomarkers reflecting apoptosis and disease activity. *Lupus*. April 2017;26(4):373–87.
 48. Majai G, Kiss E, Tarr T, Zahuczky G, Hartman Z, Szegedi G, u. a. Decreased apopto-phagocytic gene expression in the macrophages of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. Februar 2014;23(2):133–45.
 49. Rodenburg R j. t., Raats J m. h., Pruijn G j. m., van Venrooij W j. Cell death: a trigger of autoimmunity? *BioEssays*. 1. Juli 2000;22(7):627–36.
 50. Perl A. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. November 2013;9(11):674–86.
 51. Shaikh MF, Jordan N, D’Cruz DP. Systemic lupus erythematosus. *Clin Med Lond Engl*. Februar 2017;17(1):78–83.
 52. Gaubitz M, Schotte H. [Early diagnosis in patients with systemic lupus erythematosus (SLE)]. *Z Rheumatol*. November 2005;64(8):547–52.
 53. Herbst R, Liu Z, Jallal B, Yao Y. Biomarkers for systemic lupus erythematosus. *Int J Rheum Dis*. Oktober 2012;15(5):433–44.
 54. Doria A, Zen M, Canova M, Bettio S, Bassi N, Nalotto L, u. a. SLE diagnosis and treatment: when early is early. *Autoimmun Rev*. November 2010;10(1):55–60.
 55. Mohan C, Assassi S. Biomarkers in rheumatic diseases: how can they facilitate diagnosis and assessment of disease activity? *BMJ*. 26. November 2015;351:h5079.
 56. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, u. a. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus

- erythematosus. *N Engl J Med*. 16. Oktober 2003;349(16):1526–33.
57. Eriksson C, Kokkonen H, Johansson M, Hallmans G, Wadell G, Rantapää-Dahlqvist S. Autoantibodies predate the onset of systemic lupus erythematosus in northern Sweden. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(1):R30.
 58. McClain MT, Arbuckle MR, Heinlen LD, Dennis GJ, Roebuck J, Rubertone MV, u. a. The prevalence, onset, and clinical significance of antiphospholipid antibodies prior to diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. April 2004;50(4):1226–32.
 59. Yu C, Gershwin ME, Chang C. Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: a critical review. *J Autoimmun*. März 2014;48–49:10–3.
 60. Petri M, Orbai A-M, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, u. a. Derivation and Validation of Systemic Lupus International Collaborating Clinics Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum*. August 2012;64(8):2677–86.
 61. Bertsias G, Ioannidis JPA, Boletis J, Bombardieri S, Cervera R, Dostal C, u. a. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics. *Ann Rheum Dis*. Februar 2008;67(2):195–205.
 62. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH, Austin A, u. a. Derivation of the sledai. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum*. 1992;35(6):630–40.
 63. Fanouriakis A, Kostopoulou M, Alunno A, Aringer M, Bajema I, Boletis JN, u. a. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2019;78(6):736–45.
 64. ter Borg EJ, Horst G, Hummel EJ, Limburg PC, Kallenberg CG. Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. A long-term, prospective study. *Arthritis Rheum*. Mai 1990;33(5):634–43.
 65. Bijl M, Dijkstra HM, Oost WW, Bootsma H, Derksen RHWM, Aten J, u. a. IgG subclass distribution of autoantibodies differs between renal and extra-renal relapses in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Oxf Engl*. Januar 2002;41(1):62–7.
 66. Bootsma H, Spronk P, Derksen R, de Boer G, Wolters-Dicke H, Hermans J, u. a. Prevention of relapses in systemic lupus erythematosus. *Lancet Lond Engl*. 24. Juni 1995;345(8965):1595–9.
 67. Ho A, Magder LS, Barr SG, Petri M. Decreases in anti-double-stranded DNA levels are associated with concurrent flares in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. Oktober 2001;44(10):2342–9.
 68. Gladman DD, Hirani N, Ibañez D, Urowitz MB. Clinically active serologically quiescent systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1. September 2003;30(9):1960–2.
 69. Swaak AJ, Aarden LA, Staius van Eps LW, Feltkamp TE. Anti-dsDNA and complement profiles as prognostic guides in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. März 1979;22(3):226–35.
 70. Weinstein A, Bordwell B, Stone B, Tibbetts C, Rothfield NF. Antibodies to native DNA and serum complement (C3) levels. Application to diagnosis and classification of systemic lupus erythematosus. *Am J Med*. Februar 1983;74(2):206–16.
 71. Garin EH, Donnelly WH, Shulman ST, Fernandez R, Finton C, Williams RL, u. a. The significance of serial measurements of serum complement C3 and C4 components and DNA binding capacity in patients with lupus nephritis. *Clin Nephrol*.

- Oktober 1979;12(4):148–55.
72. Francis L, Perl A. Pharmacotherapy of systemic lupus erythematosus. *Expert Opin Pharmacother.* Juni 2009;10(9):1481–94.
73. Goldblatt F, Isenberg DA. New therapies for systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* Mai 2005;140(2):205–12.
74. Simard JF, Costenbader KH, Liang MH, Karlson EW, Mittleman MA. Exposure to maternal smoking and incident SLE in a prospective cohort study. *Lupus.* April 2009;18(5):431–5.
75. Manzi S. Lupus update: perspective and clinical pearls. *Cleve Clin J Med.* Februar 2009;76(2):137–42.
76. Ruiz-Irastorza G, Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Khamashta MA. Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Ann Rheum Dis.* Januar 2010;69(1):20–8.
77. Shinjo SK, Bonfá E, Wojdyla D, Borba EF, Ramirez LA, Scherbarth HR, u. a. Antimalarial treatment may have a time-dependent effect on lupus survival: data from a multinational Latin American inception cohort. *Arthritis Rheum.* März 2010;62(3):855–62.
78. Bertsias GK, Tektonidou M, Amoura Z, Aringer M, Bajema I, Berden JHM, u. a. Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association–European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of adult and paediatric lupus nephritis. *Ann Rheum Dis.* 1. Juli 2012;annrheumdis-2012-201940.
79. Bertsias GK, Ioannidis JPA, Aringer M, Bollen E, Bombardieri S, Bruce IN, u. a. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus with neuropsychiatric manifestations: report of a task force of the EULAR standing committee for clinical affairs. *Ann Rheum Dis.* 1. Dezember 2010;69(12):2074–82.
80. Birner P, Heider S, Petzelbauer P, Wolf P, Kornauth C, Kuroll M, u. a. Interleukin-6 receptor alpha blockade improves skin lesions in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Exp Dermatol.* April 2016;25(4):305–10.
81. Gallagher S, Yusuf I, McCaughy TM, Turman S, Sun H, Kolbeck R, u. a. MEDI-551 Treatment Effectively Depletes B Cells and Reduces Serum Titers of Autoantibodies in Mice Transgenic for Sle1 and Human CD19. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* April 2016;68(4):965–76.
82. Wei S, Sun Y, Sha H. Therapeutic targeting of BET protein BRD4 delays murine lupus. *Int Immunopharmacol.* Dezember 2015;29(2):314–9.
83. Suurmond J, Zou YR, Kim SJ, Diamond B. Therapeutics to block autoantibody initiation and propagation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med.* 25. März 2015;7(280):280ps5.
84. Doria A, Briani C. Lupus: improving long-term prognosis. *Lupus.* März 2008;17(3):166–70.
85. Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: More than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum.* Oktober 2004;34(2):501–37.
86. Hargraves MM, Richmond H, Morton R. Presentation of two bone marrow elements; the tart cell and the L.E. cell. *Proc Staff Meet Mayo Clin.* 21. Januar 1948;23(2):25–8.
87. Ceppellini R, Polli E, Celada F. A DNA-Reacting Factor in Serum of a Patient with Lupus Erythematosus Diffusus. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1. Dezember 1957;96(3):572–4.
88. Tan EM, Kunkel HG. Pillars Article: Characteristics of a Soluble Nuclear

- Antigen Precipitating with Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 1966. 96: 464–471. *J Immunol.* 1. Februar 2006;176(3):1297–304.
89. Yaniv G, Twig G, Shor DB-A, Furer A, Sherer Y, Mozes O, u. a. A volcanic explosion of autoantibodies in systemic lupus erythematosus: a diversity of 180 different antibodies found in SLE patients. *Autoimmun Rev.* Januar 2015;14(1):75–9.
90. Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol.* 1. Juni 2000;53(6):424–32.
91. Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH, American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum.* August 2002;47(4):434–44.
92. Tozzoli R, Antico A, Porcelli B, Bassetti D. Automation in indirect immunofluorescence testing: a new step in the evolution of the autoimmunology laboratory. *Autoimmun Highlights.* 1. August 2012;3(2):59–65.
93. Coons AH, Kaplan MH. LOCALIZATION OF ANTIGEN IN TISSUE CELLS. *J Exp Med.* 1. Januar 1950;91(1):1–13.
94. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, u. a. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol.* Februar 2002;117(2):316–24.
95. Bizzaro N, Wiik A. Appropriateness in anti-nuclear antibody testing: from clinical request to strategic laboratory practice. *Clin Exp Rheumatol.* Juni 2004;22(3):349–55.
96. Abeles AM, Abeles M. The clinical utility of a positive antinuclear antibody test result. *Am J Med.* April 2013;126(4):342–8.
97. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, u. a. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 2019;71(9):1400–12.
98. Thong B, Olsen NJ. Systemic lupus erythematosus diagnosis and management. *Rheumatol Oxf Engl.* 24. Dezember 2016;
99. Förger F, Matthias T, Oppermann M, Becker H, Helmke K. Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotypes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis. *Lupus.* 2004;13(1):36–44.
100. Cortés-Hernández J, Ordi-Ros J, Labrador M, Buján S, Balada E, Segarra A, u. a. Antihistone and anti-double-stranded deoxyribonucleic acid antibodies are associated with renal disease in systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 1. Februar 2004;116(3):165–73.
101. Alba P, Bento L, Cuadrado MJ, Karim Y, Tungekar MF, Abbs I, u. a. Anti-dsDNA, anti-Sm antibodies, and the lupus anticoagulant: significant factors associated with lupus nephritis. *Ann Rheum Dis.* Juni 2003;62(6):556–60.
102. Linnik MD, Hu JZ, Heilbrunn KR, Strand V, Hurley FL, Joh T, u. a. Relationship between anti-double-stranded DNA antibodies and exacerbation of renal disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1. April 2005;52(4):1129–37.
103. Esdaile JM, Abrahamowicz M, Joseph L, MacKenzie T, Li Y, Danoff D. Laboratory tests as predictors of disease exacerbations in systemic lupus erythematosus. Why some tests fail. *Arthritis Rheum.* 1. März 1996;39(3):370–8.
104. Petri M, Genovese M, Engle E, Hochberg M. Definition, incidence, and clinical description of flare in systemic lupus erythematosus. A prospective cohort study. *Arthritis Rheum.* 1. August 1991;34(8):937–44.

105. Fu SM, Dai C, Zhao Z, Gaskin F. Anti-dsDNA Antibodies are one of the many autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *F1000Research*. 2015;4(F1000 Faculty Rev):939.
106. Wang X, Xia Y. Anti-double Stranded DNA Antibodies: Origin, Pathogenicity, and Targeted Therapies. *Front Immunol*. 17. Juli 2019;10:1667.
107. Simón JA, Cabiedes J, Ortiz E, Alcocer-Varela J, Sánchez-Guerrero J. Anti-nucleosome antibodies in patients with systemic lupus erythematosus of recent onset. Potential utility as a diagnostic tool and disease activity marker. *Rheumatology*. 1. Februar 2004;43(2):220–4.
108. Gutiérrez-Adriánzén OA, Koutouzov S, Mota RMS, Medeiros MM das C, Bach J-F, Campos H de H. Diagnostic value of anti-nucleosome antibodies in the assessment of disease activity of systemic lupus erythematosus: a prospective study comparing anti-nucleosome with anti-dsDNA antibodies. *J Rheumatol*. 1. August 2006;33(8):1538–44.
109. Potlukova E, Kralikova P. Complement Component C1q and Anti-C1q Antibodies in Theory and in Clinical Practice. *Scand J Immunol*. 1. Mai 2008;67(5):423–30.
110. Seelen MA, Trouw LA, Daha MR. Diagnostic and prognostic significance of anti-C1q antibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. November 2003;12(6):619–24.
111. Sun X-Y, Shi J, Han L, Su Y, Li Z-G. Anti-histones antibodies in systemic lupus erythematosus: prevalence and frequency in neuropsychiatric lupus. *J Clin Lab Anal*. 2008;22(4):271–7.
112. Gioud M, Kaci MA, Monier JC. Histone antibodies in systemic lupus erythematosus. A possible diagnostic tool. *Arthritis Rheum*. 1. April 1982;25(4):407–13.
113. Burlingame RW, Boey ML, Starkebaum G, Rubin RL. The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. Juli 1994;94(1):184–92.
114. González C, Garcia-Berrocal B, Herráez O, Navajo JA, González-Buitrago JM. Anti-nucleosome, anti-chromatin, anti-dsDNA and anti-histone antibody reactivity in systemic lupus erythematosus. *Clin Chem Lab Med*. März 2004;42(3):266–72.
115. Viard JP, Choquette D, Chabre H, Slama FB, Primo J, Letrait M, u. a. Anti-histone reactivity in systemic lupus erythematosus sera: a disease activity index linked to the presence of DNA:anti-DNA immune complexes. *Autoimmunity*. 1992;12(1):61–8.
116. Suzuki T, Burlingame RW, Casiano CA, Boey ML, Rubin RL. Antihistone antibodies in systemic lupus erythematosus: assay dependency and effects of ubiquitination and serum DNA. *J Rheumatol*. Juni 1994;21(6):1081–91.
117. Cohen MG, Webb J. Antihistone antibodies in rheumatoid arthritis and Felty's syndrome. *Arthritis Rheum*. 1. Oktober 1989;32(10):1319–24.
118. Brown DT. Histone variants: are they functionally heterogeneous? *Genome Biol*. 2001;2(7):reviews0006.1-reviews0006.6.
119. Millar CB. Organizing the genome with H2A histone variants. *Biochem J*. 1. Februar 2013;449(3):567–79.
120. Pisetsky DS. The Complex Role of DNA, Histones and HMGB1 in the Pathogenesis of SLE. *Autoimmunity*. Dezember 2014;47(8):487–93.
121. Rekvig OP, van der Vlag J, Seredkina N. Review: antinucleosome antibodies: a critical reflection on their specificities and diagnostic impact. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. Mai 2014;66(5):1061–9.
122. Cervera R. Systemic lupus erythematosus in Europe at the change of the

- millennium: Lessons from the “Euro-Lupus Project”. *Autoimmun Rev.* März 2006;5(3):180–6.
123. Yamamoto K. Pathogenesis of Sjögren’s syndrome. *Autoimmun Rev.* Januar 2003;2(1):13–8.
124. von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum.* April 1995;24(5):323–58.
125. Kobayashi R, Mii S, Nakano T, Harada H, Eto H. Neonatal lupus erythematosus in Japan: a review of the literature. *Autoimmun Rev.* Mai 2009;8(6):462–6.
126. Yoshimi R, Ueda A, Ozato K, Ishigatsubo Y. Clinical and Pathological Roles of Ro/SSA Autoantibody System. *J Immunol Res.* 6. Dezember 2012;2012:e606195.
127. Fukuda MV, Lo SC, de Almeida CS, Shinjo SK. Anti-Ro antibody and cutaneous vasculitis in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* März 2009;28(3):301–4.
128. Mond CB, Peterson MG, Rothfield NF. Correlation of anti-Ro antibody with photosensitivity rash in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum.* Februar 1989;32(2):202–4.
129. Buyon JP, Winchester R. Congenital complete heart block. A human model of passively acquired autoimmune injury. *Arthritis Rheum.* Mai 1990;33(5):609–14.
130. Tingström J, Hjelmstedt A, Welin Henriksson E, Ambrosi A, Sonesson S-E, Wahren-Herlenius M. Anti-Ro/SSA autoantibody-positive women’s experience of information given on the risk of congenital heart block. *Lupus.* April 2016;25(5):536–42.
131. Costedoat-Chalumeau N, Georgin-Lavialle S, Amoura Z, Piette JC. Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibody-mediated congenital heart block. *Lupus.* 2005;14(9):660–4.
132. Clancy RM, Neufing PJ, Zheng P, O’Mahony M, Nimmerjahn F, Gordon TP, u. a. Impaired clearance of apoptotic cardiocytes is linked to anti-SSA/Ro and -SSB/La antibodies in the pathogenesis of congenital heart block. *J Clin Invest.* September 2006;116(9):2413–22.
133. Lazzarini PE, Capecchi PL, Guideri F, Acampa M, Galeazzi M, Laghi Pasini F. Connective tissue diseases and cardiac rhythm disorders: an overview. *Autoimmun Rev.* Mai 2006;5(5):306–13.
134. Schulte-Pelkum J, Fritzler M, Mahler M. Latest update on the Ro/SS-A autoantibody system. *Autoimmun Rev.* Juni 2009;8(7):632–7.
135. Chan EK, Hamel JC, Buyon JP, Tan EM. Molecular definition and sequence motifs of the 52-kD component of human SS-A/Ro autoantigen. *J Clin Invest.* 1. Januar 1991;87(1):68–76.
136. Deutscher SL, Harley JB, Keene JD. Molecular analysis of the 60-kDa human Ro ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dezember 1988;85(24):9479–83.
137. Ben-Chetrit E, Gandy BJ, Tan EM, Sullivan KF. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the 60-kD component of the human SS-A/Ro ribonucleoprotein autoantigen. *J Clin Invest.* April 1989;83(4):1284–92.
138. Wada K, Kamitani T. Autoantigen Ro52 is an E3 ubiquitin ligase. *Biochem Biophys Res Commun.* 6. Januar 2006;339(1):415–21.
139. Migliorini P, Baldini C, Rocchi V, Bombardieri S. Anti-Sm and anti-RNP antibodies. *Autoimmunity.* Februar 2005;38(1):47–54.
140. Mahler M. Sm peptides in differentiation of autoimmune diseases. *Adv Clin Chem.* 2011;54:109–28.
141. Benito-Garcia E, Schur PH, Lahita R, The American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Guidelines for immunologic

- laboratory testing in the rheumatic diseases: Anti-Sm and anti-RNP antibody tests. *Arthritis Care Res.* 15. Dezember 2004;51(6):1030–44.
142. Ortega-Hernandez O-D, Shoenfeld Y. Mixed connective tissue disease: An overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* Februar 2012;26(1):61–72.
143. Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, Gould RG, Holman HR. Mixed connective tissue disease-an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am J Med.* 1. Februar 1972;52(2):148–59.
144. Sato T, Fujii T, Yokoyama T, Fujita Y, Imura Y, Yukawa N, u. a. Anti-U1 RNP antibodies in cerebrospinal fluid are associated with central neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum.* 1. Dezember 2010;62(12):3730–40.
145. Manderson AP, Botto M, Walport MJ. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:431–56.
146. Kallel-Sellami M, Laadhar L, Zerzeri Y, Makni S. Complement deficiency and systemic lupus erythematosus: consensus and dilemma. *Expert Rev Clin Immunol.* September 2008;4(5):629–37.
147. Macedo ACL, Isaac L. Systemic Lupus Erythematosus and Deficiencies of Early Components of the Complement Classical Pathway. *Front Immunol.* 2016;7:55.
148. Ramsey-Goldman R, Li J, Dervieux T, Alexander RV. Cell-bound complement activation products in SLE. *Lupus Sci Med* [Internet]. 21. August 2017 [zitiert 16. November 2018];4(1). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5704741/>
149. Swaak AJ, Groenwold J, Bronsveld W. Predictive value of complement profiles and anti-dsDNA in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* Mai 1986;45(5):359–66.
150. Buyon J, Furie R, Putterman C, Ramsey-Goldman R, Kalunian K, Barken D, u. a. Reduction in erythrocyte-bound complement activation products and titres of anti-C1q antibodies associate with clinical improvement in systemic lupus erythematosus. *Lupus Sci Med.* 2016;3(1):e000165.
151. Orbai A-M, Truedsson L, Sturfelt G, Nived O, Fang H, Alarcón GS, u. a. Anti-C1q antibodies in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* Januar 2015;24(1):42–9.
152. Bock M, Heijnen I, Trendelenburg M. Anti-C1q antibodies as a follow-up marker in SLE patients. *PloS One.* 2015;10(4):e0123572.
153. Stojan G, Petri M. Anti-C1q in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* Juli 2016;25(8):873–7.
154. Tincani A, Andreoli L, Chighizola C, Meroni PL, Tincani A, Andreoli L, u. a. The interplay between the antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 1. Januar 2009;42(4):257–9.
155. Garabet L, Gilboe I-M, Mowinckel M-C, Jacobsen AF, Mollnes TE, Sandset PM, u. a. Antiphospholipid Antibodies are Associated with Low Levels of Complement C3 and C4 in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Scand J Immunol.* August 2016;84(2):95–9.
156. Gigante A, Gasperini ML, Cianci R, Barbano B, Giannakakis K, Donato DD, u. a. Antiphospholipid Antibodies and Renal Involvement. *Am J Nephrol.* 2009;30(5):405–12.
157. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, u. a. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost JTH.* Februar 2006;4(2):295–

- 306.
158. Petri M. Update on anti-phospholipid antibodies in SLE: the Hopkins' Lupus Cohort. *Lupus*. April 2010;19(4):419–23.
159. Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmun*. September 2000;15(2):145–51.
160. Danowski A, Kickler TS, Petri M. Anti-beta2-glycoprotein I: prevalence, clinical correlations, and importance of persistent positivity in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. September 2006;33(9):1775–9.
161. Bruce IN, Clark-Soloninka CA, Spitzer KA, Gladman DD, Urowitz MB, Laskin CA. Prevalence of antibodies to beta2-glycoprotein I in systemic lupus erythematosus and their association with antiphospholipid antibody syndrome criteria: a single center study and literature review. *J Rheumatol*. Dezember 2000;27(12):2833–7.
162. Specker C, Fischer-Betz R, Dörner T. Antiphospholipidsyndrom. *Z Für Rheumatol*. 1. April 2020;79(3):255–66.
163. Lim W, Crowther MA, Eikelboom JW. Management of antiphospholipid antibody syndrome: a systematic review. *JAMA*. 1. März 2006;295(9):1050–7.
164. Bertolaccini ML, Roch B, Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GR. Multiple antiphospholipid tests do not increase the diagnostic yield in antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol*. November 1998;37(11):1229–32.
165. Ruffatti A, Ross TD, Ciprian M, Nuzzo M, Rampudda M, Bertero MT, u. a. Risk factors for a first thrombotic event in antiphospholipid antibody carriers. A multicentre, retrospective follow-up study. *Ann Rheum Dis*. 1. März 2009;68(3):397–9.
166. Chayoua W, Kelchtermans H, Gris J-C, Moore GW, Musiał J, Wahl D, u. a. The (non-)sense of detecting anti-cardiolipin and anti-β2glycoprotein I IgM antibodies in the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost JTH*. Januar 2020;18(1):169–79.
167. Ruiz-Irastorza G, Egurbide M-V, Martinez-Berriotxo A, Ugalde J, Aguirre C. Antiphospholipid antibodies predict early damage in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2004;13(12):900–5.
168. Ware D, Sharma V, Kalekar L, Kamble A, Mahajan A, Gokhale Y. Higher Incidence of Pulmonary Hypertension in Antiphospholipid Antibody Positive Lupus. *J Assoc Physicians India*. April 2015;63(4):17–20.
169. Uthman I, Noureldine MHA, Ruiz-Irastorza G, Khamashta M. Management of antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. 1. Februar 2019;78(2):155–61.
170. Sack U, Conrad K, Csernok E, Frank I, Hiepe F, Krieger T, u. a. Autoantikörpernachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz an HEp-2-Zellen/Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells. 2012;
171. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch Pathol Lab Med*. Januar 2000;124(1):71–81.
172. Kumar Y, Bhatia A, Minz RW. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagn Pathol*. 2. Januar 2009;4:1.
173. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PLC, u. a. Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns 2014–2015. *Front Immunol* [Internet]. 2015 [zitiert 14. November 2020];6. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00412/full>

174. Melegari A, Bonaguri C, Russo A, Luisita B, Trenti T, Lippi G. A comparative study on the reliability of an automated system for the evaluation of cell-based indirect immunofluorescence. *Autoimmun Rev.* August 2012;11(10):713–6.
175. Shovman O, Agmon-Levin N, Gilburd B, Martins T, Petzold A, Matthias T, u. a. A fully automated IIF system for the detection of antinuclear antibodies and antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Immunol Res.* Februar 2015;61(1–2):135–40.
176. Rigon A, Buzzulini F, Soda P, Onofri L, Arcarese L, Iannello G, u. a. Novel opportunities in automated classification of antinuclear antibodies on HEp-2 cells. *Autoimmun Rev.* August 2011;10(10):647–52.
177. Copple SS, Jaskowski TD, Giles R, Hill HR. Interpretation of ANA Indirect Immunofluorescence Test Outside the Darkroom Using NOVA View Compared to Manual Microscopy. *J Immunol Res.* 24. Februar 2014;2014:e149316.
178. Yoo IY, Oh JW, Cha HS, Koh EM, Kang ES. Performance of an Automated Fluorescence Antinuclear Antibody Image Analyzer. *Ann Lab Med.* Mai 2017;37(3):240–7.
179. Schmitt J, Papisch W. Recombinant autoantigens. *Autoimmun Rev.* Februar 2002;1(1–2):79–88.
180. Fenger M, Wiik A, Høier-Madsen M, Lykkegaard JJ, Rozenfeld T, Hansen MS, u. a. Detection of antinuclear antibodies by solid-phase immunoassays and immunofluorescence analysis. *Clin Chem.* November 2004;50(11):2141–7.
181. Tonuttia E, Bassetti D, Piazza A, Visentini D, Poletto M, Bassetto F, u. a. Diagnostic accuracy of ELISA methods as an alternative screening test to indirect immunofluorescence for the detection of antinuclear antibodies. Evaluation of five commercial kits. *Autoimmunity.* März 2004;37(2):171–6.
182. Ulvestad E, Kanestrøm A, Madland TM, Thomassen E, Haga HJ, Vollset SE. Evaluation of diagnostic tests for antinuclear antibodies in rheumatological practice. *Scand J Immunol.* September 2000;52(3):309–15.
183. Bentow C, Lakos G, Martis P, Wahl E, Garcia M, Viñas O, u. a. International multi-center evaluation of a novel chemiluminescence assay for the detection of anti-dsDNA antibodies. *Lupus.* Juli 2016;25(8):864–72.
184. Peterson LK, Wells D, Shaw L, Velez M-G, Harbeck R, Dragone LL. Novel method for quantitative ANA measurement using near-infrared imaging. *J Immunol Methods.* 30. September 2009;349(1–2):1–8.
185. El-Chennawi FA, Mosaad YM, Habib HM, El-Degheidi T. Comparative study of antinuclear antibody detection by indirect immunofluorescence and enzyme immunoassay in lupus patients. *Immunol Invest.* 2009;38(8):839–50.
186. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis.* August 2010;69(8):1420–2.
187. Cozzani E, Drosera M, Gasparini G, Parodi A. Serology of Lupus Erythematosus: Correlation between Immunopathological Features and Clinical Aspects. *Autoimmune Dis.* 2014;2014:321359.
188. Binder SR. Autoantibody detection using multiplex technologies. *Lupus.* 2006;15(7):412–21.
189. Fritzler MJ, Fritzler ML. Microbead-based technologies in diagnostic autoantibody detection. *Expert Opin Med Diagn.* Januar 2009;3(1):81–9.
190. Kim Y, Park Y, Lee EY, Kim H-S. Comparison of automated multiplexed bead-based ANA screening assay with ELISA for detecting five common anti-extractable nuclear antigens and anti-dsDNA in systemic rheumatic diseases. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 18. Januar 2012;413(1–2):308–11.
191. Avaniss-Aghajani E, Berzon S, Sarkissian A. Clinical value of multiplexed

- bead-based immunoassays for detection of autoantibodies to nuclear antigens. *Clin Vaccine Immunol* CVI. Mai 2007;14(5):505–9.
192. Martins TB, Burlingame R, von Mühlen CA, Jaskowski TD, Litwin CM, Hill HR. Evaluation of multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for detection of autoantibodies to nuclear antigens. *Clin Diagn Lab Immunol*. November 2004;11(6):1054–9.
193. Uto K, Hayashi N, Kinoshita S, Kawano S, Kumagai S. [Evaluation of simultaneous detection of specific antinuclear antibodies using multiplexed technology]. *Rinsho Byori*. Oktober 2009;57(10):941–53.
194. Shovman O, Gilburd B, Barzilai O, Shinar E, Larida B, Zandman-Goddard G, u. a. Evaluation of the BioPlex 2200 ANA screen: analysis of 510 healthy subjects: incidence of natural/predictive autoantibodies. *Ann N Y Acad Sci*. Juni 2005;1050:380–8.
195. Shovman O, Gilburd B, Zandman-Goddard G, Yehiely A, Langevitz P, Shoenfeld Y. Multiplexed AtheNA multi-lyte immunoassay for ANA screening in autoimmune diseases. *Autoimmunity*. Februar 2005;38(1):105–9.
196. Copple SS, Martins TB, Masterson C, Joly E, Hill HR. Comparison of three multiplex immunoassays for detection of antibodies to extractable nuclear antibodies using clinically defined sera. *Ann N Y Acad Sci*. August 2007;1109:464–72.
197. Hanly JG, Thompson K, McCurdy G, Fougere L, Theriault C, Wilton K. Measurement of autoantibodies using multiplex methodology in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods*. 31. Januar 2010;352(1–2):147–52.
198. Gilburd B, Abu-Shakra M, Shoenfeld Y, Giordano A, Bocci EB, delle Monache F, u. a. Autoantibodies profile in the sera of patients with Sjogren’s syndrome: the ANA evaluation--a homogeneous, multiplexed system. *Clin Dev Immunol*. März 2004;11(1):53–6.
199. Nifli A-P, Notas G, Mamoulaki M, Niniraki M, Ampartzaki V, Theodoropoulos PA, u. a. Comparison of a multiplex, bead-based fluorescent assay and immunofluorescence methods for the detection of ANA and ANCA autoantibodies in human serum. *J Immunol Methods*. 20. April 2006;311(1–2):189–97.
200. Smith J, Onley D, Garey C, Crowther S, Cahir N, Johanson A, u. a. Determination of ANA specificity using the UltraPlex platform. *Ann N Y Acad Sci*. Juni 2005;1050:286–94.
201. Chandratilleke D, Silvestrini R, Culican S, Campbell D, Byth-Wilson K, Swaminathan S, u. a. Comparison of two extractable nuclear antigen testing algorithms: ALBIA versus ELISA/line immunoassay. *Pathology (Phila)*. August 2016;48(5):491–7.
202. Moder KG, Wener MH, Weisman MH, Ishimori ML, Wallace DJ, Buckeridge DL, u. a. Measurement of antinuclear antibodies by multiplex immunoassay: a prospective, multicenter clinical evaluation. *J Rheumatol*. Mai 2007;34(5):978–86.
203. Albon S, Bunn C, Swana G, Karim Y. Performance of a multiplex assay compared to enzyme and precipitation methods for anti-ENA testing in systemic lupus and systemic sclerosis. *J Immunol Methods*. 28. Februar 2011;365(1–2):126–31.
204. Vercammen M, Meirlaen P, Sennesael J, Velkeniers B, T’Kint S, Verbruggen L, u. a. Diagnostic accuracy of the FIDIS multiplex fluorescent microsphere immunodetection system for anti-extractable nuclear antigen (ENA) antibodies in connective tissue diseases. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(4):505–12.
205. Infantino M, Bentow C, Seaman A, Benucci M, Atzeni F, Sarzi-Puttini P, u. a. Highlights on novel technologies for the detection of antibodies to Ro60, Ro52, and SS-B. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:978202.
206. Hanly JG, Su L, Farewell V, Fritzler MJ. Comparison between multiplex assays

- for autoantibody detection in systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods*. 30. Juni 2010;358(1–2):75–80.
207. Mahler M, Meroni P-L, Bossuyt X, Fritzler MJ. Current concepts and future directions for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *J Immunol Res*. 2014;2014:315179.
208. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. September 1997;40(9):1725.
209. Vordenbäumen S, Böhmer P, Brinks R, Fischer-Betz R, Richter J, Bleck E, u. a. High diagnostic accuracy of histone H4-IgG autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Oxf Engl*. 01 2018;57(3):533–7.
210. Sitzer M, Skutta M, Siebler M, Sitzer G, Siegrist J, Steinmetz H. Modifiable stroke risk factors in volunteers willing to participate in a prevention program. *Neuroepidemiology*. 1998;17(4):179–87.
211. Liang MH, Socher SA, Larson MG, Schur PH. Reliability and validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1. September 1989;32(9):1107–18.
212. Liang MH, Socher SA, Roberts WN, Esdaile JM. Measurement of systemic lupus erythematosus activity in clinical research. *Arthritis Rheum*. 1. Juli 1988;31(7):817–25.
213. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, u. a. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. März 1996;39(3):363–9.
214. Vordenbäumen S, Lueking A, Budde P, Zucht H-D, Goehler H, Brinks R, u. a. Sequential high-content profiling of the IgG-autoantibody repertoire reveals novel antigens in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 12. Oktober 2016;18(1):235.
215. Budde P, Zucht H-D, Vordenbäumen S, Goehler H, Fischer-Betz R, Gamer M, u. a. Multiparametric detection of autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. Juli 2016;25(8):812–22.
216. Houser B. Bio-Rad's Bio-Plex® suspension array system, xMAP technology overview. *Arch Physiol Biochem*. Oktober 2012;118(4):192–6.
217. MAGPIX Hardware and Installation Manual - German - 89-00002-00-269.pdf [Internet]. [zitiert 25. September 2014]. Verfügbar unter: <http://www.luminexcorp.com/prod/groups/public/documents/lmncorp/89-00002-00-269.pdf>
218. Young KA, Terrell DR, Guthridge JM, Kamen DL, Gilkeson GS, Karp DR, u. a. Smoking is not associated with autoantibody production in systemic lupus erythematosus patients, unaffected first-degree relatives, nor healthy controls. *Lupus*. April 2014;23(4):360–9.
219. Aganovic-Musinovic I, Karamehic J, Zecevic L, Gavrankapetanovic F, Avdagic N, Zaciragic A, u. a. Evaluation of ENA-6 Profile by ELISA Immunoassay in Patients with Systemic Lupus Erythematoses. *Autoimmune Dis*. 11. Oktober 2012;2012:e321614.
220. Bose N, Wang X, Gupta M, Yao Q. The clinical utility of anti-chromatin antibodies as measured by BioPlex 2200 in the diagnosis of systemic lupus erythematosus versus other rheumatic diseases. *Int J Clin Exp Med*. 22. August 2012;5(4):316–20.
221. Eissfeller P, Sticherling M, Scholz D, Hennig K, Lüttich T, Motz M, u. a. Comparison of Different Test Systems for Simultaneous Autoantibody Detection in

- Connective Tissue Diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 1. Juni 2005;1050(1):327–39.
222. Bruner BF, Guthridge JM, Lu R, Vidal G, Kelly JA, Robertson JM, u. a. Comparison of autoantibody specificities between traditional and bead-based assays in a large, diverse collection of patients with systemic lupus erythematosus and family members. *Arthritis Rheum.* November 2012;64(11):3677–86.
223. Grossmann K, Roggenbuck D, Schröder C, Conrad K, Schierack P, Sack U. Multiplex assessment of non-organ-specific autoantibodies with a novel microbead-based immunoassay. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* Februar 2011;79(2):118–25.
224. Caramaschi P, Ruzzenente O, Pieropan S, Volpe A, Carletto A, Bambara LM, u. a. Determination of ANA specificity using multiplexed fluorescent microsphere immunoassay in patients with ANA positivity at high titres after infliximab treatment: preliminary results. *Rheumatol Int.* Mai 2007;27(7):649–54.
225. Rouquette A-M, Desgruelles C, Laroche P. Evaluation of the new multiplexed immunoassay, FIDIS, for simultaneous quantitative determination of antinuclear antibodies and comparison with conventional methods. *Am J Clin Pathol.* November 2003;120(5):676–81.
226. Harich R, Roger C, Garnier L, Bienvenu J, Fabien N. Comparison of anti-CCP autoantibodies measurement by ELISA and a bead-based assay in a large patient cohort. *Clin Biochem.* April 2014;47(6):485–8.
227. Bardin N, Desplat-Jego S, Daniel L, Jourde Chiche N, Sanmarco M. BioPlex 2200 multiplexed system: simultaneous detection of anti-dsDNA and anti-chromatin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* Januar 2009;42(1):63–8.
228. Desplat-Jego S, Bardin N, Larida B, Sanmarco M. Evaluation of the BioPlex 2200 ANA screen for the detection of antinuclear antibodies and comparison with conventional methods. *Ann N Y Acad Sci.* August 2007;1109:245–55.
229. Op De Beéck K, Vermeersch P, Verschueren P, Westhovens R, Mariën G, Blockmans D, u. a. Antinuclear antibody detection by automated multiplex immunoassay in untreated patients at the time of diagnosis. *Autoimmun Rev.* Dezember 2012;12(2):137–43.
230. Shanmugam VK, Swistowski DR, Saddic N, Wang H, Steen VD. Comparison of indirect immunofluorescence and multiplex antinuclear antibody screening in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.* Oktober 2011;30(10):1363–8.
231. Zandman-Goddard G, Gilburd B, Shovman O, Blank M, Berdichevski S, Langevitz P, u. a. The homogeneous multiplexed system--a new method for autoantibody profile in systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol.* Juni 2005;12(2):107–11.
232. Buliard A, Fortenfant F, Ghillani-Dalbin P, Musset L, Oksman F, Olsson No. [Analysis of nine autoantibodies associated with systemic autoimmune diseases using the Luminex technology. Results of a multicenter study]. *Ann Biol Clin (Paris).* 2005;63(1):51–8.
233. Satoh M, Tanaka S, Chan EKL. The uses and misuses of multiplex autoantibody assays in systemic autoimmune rheumatic diseases. *Front Immunol.* 2015;6:181.
234. Tervaert JWC, Heeringa P. Pathophysiology of ANCA-associated vasculitides: are ANCA really pathogenic? *Neth J Med.* Dezember 2003;61(12):404–7.
235. Geetha D, Jefferson JA. ANCA-Associated Vasculitis: Core Curriculum 2020. *Am J Kidney Dis.* 1. Januar 2020;75(1):124–37.
236. Chin HJ, Ahn C, Lim CS, Chung HK, Lee JG, Song YW, u. a. Clinical Implications of Antineutrophil Cytoplasmic Antibody Test in Lupus Nephritis. *Am J Nephrol.* 1. Februar 2000;20(1):57–63.

237. Jarrot P-A, Chiche L, Hervier B, Daniel L, Vuiblet V, Bardin N, u. a. Systemic Lupus Erythematosus and Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis Overlap Syndrome in Patients With Biopsy-Proven Glomerulonephritis. *Medicine (Baltimore)*. Mai 2016;95(22):e3748.
238. Manolova I, Dancheva M, Halacheva K. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: prevalence, antigen specificity, and clinical associations. *Rheumatol Int*. Juli 2001;20(5):197–204.
239. Schnabel A, Csernok E, Isenberg DA, Mrowka C, Gross WL. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. Prevalence, specificities, and clinical significance. *Arthritis Rheum*. Mai 1995;38(5):633–7.
240. Spronk PE, Bootsma H, Horst G, Huitema MG, Limburg PC, Tervaert JW, u. a. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol*. Juli 1996;35(7):625–31.
241. Galeazzi M, Morozzi G, Sebastiani GD, Bellisai F, Marcolongo R, Cervera R, u. a. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in 566 European patients with systemic lupus erythematosus: prevalence, clinical associations and correlation with other autoantibodies. European Concerted Action on the Immunogenetics of SLE. *Clin Exp Rheumatol*. Oktober 1998;16(5):541–6.
242. Merkel PA, Polisson RP, Chang Y, Skates SJ, Niles JL. Prevalence of antineutrophil cytoplasmic antibodies in a large inception cohort of patients with connective tissue disease. *Ann Intern Med*. 1. Juni 1997;126(11):866–73.
243. Fauzi AR, Kong NCT, Chua MK, Jeyabalan V, Idris MN, Azizah R. Antibodies in systemic lupus antineutrophil cytoplasmic erythematosus: prevalence, disease activity correlations and organ system associations. *Med J Malaysia*. August 2004;59(3):372–7.
244. Curtiss P, Liebman T, Khorolsky C, Brinster N, Beasley J, Lo Sicco K. Systemic lupus erythematosus and antineutrophil cytoplasmic antibody–associated vasculitis: An emerging overlap syndrome with cutaneous manifestations. *JAAD Case Rep*. 7. Mai 2018;4(5):493–6.
245. Betteridge Z, McHugh N. Myositis-specific autoantibodies: an important tool to support diagnosis of myositis. *J Intern Med*. 2016;280(1):8–23.
246. Benveniste O, Drouot L, Jouen F, Charuel J-L, Bloch-Queyrat C, Behin A, u. a. Correlation of anti–signal recognition particle autoantibody levels with creatine kinase activity in patients with necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum*. 2011;63(7):1961–71.
247. Kao AH, Lacomis D, Lucas M, Fertig N, Oddis CV. Anti-signal recognition particle autoantibody in patients with and patients without idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Rheum*. Januar 2004;50(1):209–15.
248. Miller T, Al-Lozi MT, Lopate G, Pestronk A. Myopathy with antibodies to the signal recognition particle: clinical and pathological features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. Oktober 2002;73(4):420–8.
249. Haddon DJ, Diep VK, Price JV, Limb C, Utz PJ, Balboni I. Autoantigen microarrays reveal autoantibodies associated with proliferative nephritis and active disease in pediatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 17. Juni 2015;17:162.
250. Zhao Y, Li J, Li X, Li C, Li L, Li Z. What can we learn from the presence of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in systemic lupus erythematosus? *Jt Bone Spine Rev Rhum*. Oktober 2009;76(5):501–7.
251. Ziegelasch M, van Delft MAM, Wallin P, Skogh T, Magro-Checa C, Steup-Beekman GM, u. a. Antibodies against carbamylated proteins and cyclic citrullinated peptides in systemic lupus erythematosus: results from two well-defined European

- cohorts. *Arthritis Res Ther.* 3. Dezember 2016;18(1):289.
252. Budhram A, Chu R, Rusta-Sallehy S, Ioannidis G, Denburg JA, Adachi JD, u. a. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody as a marker of erosive arthritis in patients with systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *Lupus.* Oktober 2014;23(11):1156–63.
253. Bonilla E, Francis L, Allam F, Ogrinc M, Neupane H, Phillips PE, u. a. Immunofluorescence microscopy is superior to fluorescent beads for detection of antinuclear antibody reactivity in systemic lupus erythematosus patients. *Clin Immunol Orlando Fla.* Juli 2007;124(1):18–21.
254. Isenberg DA, Manson JJ, Ehrenstein MR, Rahman A. Fifty years of anti-dsDNA antibodies: are we approaching journey's end? *Rheumatology.* 1. Juli 2007;46(7):1052–6.
255. Swaak AJ, Groenwold J, Aarden LA, Staius van Eps LW, Feltkamp EW. Prognostic value of anti-dsDNA in SLE. *Ann Rheum Dis.* August 1982;41(4):388–95.
256. Hassan AB, Lundberg IE, Isenberg D, Wahren-Herlenius M. Serial analysis of Ro/SSA and La/SSB antibody levels and correlation with clinical disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol.* 2002;31(3):133–9.
257. Agarwal S, Harper J, Kiely PDW. Concentration of antibodies to extractable nuclear antigens and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* April 2009;18(5):407–12.
258. Gussin HA, Ignat GP, Varga J, Teodorescu M. Anti-topoisomerase I (anti-Scl-70) antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* Februar 2001;44(2):376–83.
259. Aringer M. Inflammatory markers in systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 1. Juni 2020;110:102374.
260. BERTOLI AM, VILÁ LM, REVEILLE JD, ALARCÓN GS. Systemic Lupus Erythematosus in a Multiethnic US Cohort (LUMINA): LXI. Value of C-Reactive Protein as a Marker of Disease Activity and Damage. *J Rheumatol.* Dezember 2008;35(12):2355.
261. ter Borg EJ, Horst G, Limburg PC, van Rijswijk MH, Kallenberg CG. C-reactive protein levels during disease exacerbations and infections in systemic lupus erythematosus: a prospective longitudinal study. *J Rheumatol.* Dezember 1990;17(12):1642–8.
262. Barnes EV, Narain S, Naranjo A, Shuster J, Segal MS, Sobel ES, u. a. High sensitivity C-reactive protein in systemic lupus erythematosus: relation to disease activity, clinical presentation and implications for cardiovascular risk. *Lupus.* 2005;14(8):576–82.
263. Firooz N, Albert DA, Wallace DJ, Ishimori M, Berel D, Weisman MH. High-sensitivity C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* Mai 2011;20(6):588–97.
264. Wj M, Da I, Hf P, Ml S. C-reactive protein in sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1981;8(4):599–604.
265. Bertouch JV, Roberts-Thompson PJ, Feng PH, Bradley J. C-reactive protein and serological indices of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* Dezember 1983;42(6):655–8.
266. Gabay C, Kushner I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *N Engl J Med.* 11. Februar 1999;340(6):448–54.
267. Konstantinov K, Russanova V, Russeva V. Antibodies to histones and disease activity in systemic lupus erythematosus: a comparative study with an enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *Arch Dermatol Res.* 1986;278(5):410–5.

268. Helve T, Gripenberg M, Kurki P, Teppo AM, Wegelius O. Enzyme-linked immunosorbent assays for antibodies to poly(A), poly dAT and histones: possibly useful tools for the evaluation of prognosis and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 1984;4(2):75–8.
269. Cohen MG, Pollard KM, Webb J. Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus: prevalence, specificity, and relationship to clinical and laboratory features. *Ann Rheum Dis.* Januar 1992;51(1):61–6.
270. Bernstein RM, Hobbs RN, Lea DJ, Ward DJ, Hughes GRV. Patterns of antihistone antibody specificity in systemic rheumatic disease. I. Systemic lupus erythematosus, mixed connective tissue disease, primary sicca syndrome, and rheumatoid arthritis with vasculitis. *Arthritis Rheum.* 1. März 1985;28(3):285–93.
271. Epstein A, Greenberg M, Halbert S, Kramer L, Barland P. The clinical application of an ELISA technique for the detection of antihistone antibodies. *J Rheumatol.* April 1986;13(2):304–7.
272. Fishbein E, Alarcon-Segovia D, Vega JM. Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* April 1979;36(1):145–50.
273. Gompertz NR, Isenberg DA, Turner BM. Correlation between clinical features of systemic lupus erythematosus and levels of antihistone antibodies of the IgG, IgA, and IgM isotypes. *Ann Rheum Dis.* Juli 1990;49(7):524–7.
274. Muller S, Barakat S, Watts R, Joubaud P, Isenberg D. Longitudinal analysis of antibodies to histones, Sm-D peptides and ubiquitin in the serum of patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and tuberculosis. *Clin Exp Rheumatol.* Oktober 1990;8(5):445–53.
275. Fritzler M, Ryan P, Kinsella TD. Clinical Features of Systemic Lupus Erythematosus Patients With Antihistone Antibodies. *J Rheumatol.* Februar 1982;9(1):46–51.
276. Dalle Vedove C, Simon JC, Girolomoni G. Medikamenteninduzierter Lupus erythematosus unter besonderer Berücksichtigung von Hautmanifestationen und Anti-TNF α -Therapeutika. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges.* 2012;10(12):889–97.
277. Xu J, Zhang X, Monestier M, Esmon NL, Esmon CT. Extracellular histones are mediators of death through TLR2 and TLR4 in mouse fatal liver injury. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1. September 2011;187(5):2626–31.
278. Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, u. a. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med.* November 2009;15(11):1318–21.
279. Mok CC, Ho LY, Cheung MY, Yu KL, To CH. Effect of disease activity and damage on quality of life in patients with systemic lupus erythematosus: a 2-year prospective study. *Scand J Rheumatol.* April 2009;38(2):121–7.
280. Cardoso CRL, Signorelli FV, Papi J a. S, Salles GF. Initial and accrued damage as predictors of mortality in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus: a cohort study. *Lupus.* November 2008;17(11):1042–8.
281. Bruce IN, O’Keeffe AG, Farewell V, Hanly JG, Manzi S, Su L, u. a. Factors associated with damage accrual in patients with systemic lupus erythematosus: results from the Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) Inception Cohort. *Ann Rheum Dis.* September 2015;74(9):1706–13.
282. Sutton EJ, Davidson JE, Bruce IN. The systemic lupus international collaborating clinics (SLICC) damage index: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum.* Dezember 2013;43(3):352–61.
283. Rahman P, Gladman DD, Urowitz MB, Hallett D, Tam LS. Early damage as measured by the SLICC/ACR damage index is a predictor of mortality in systemic

- lupus erythematosus. *Lupus*. 2001;10(2):93–6.
284. Atkinson JP. Complement activation and complement receptors in systemic lupus erythematosus. *Springer Semin Immunopathol*. 1. Oktober 1986;9(2):179–94.
285. Lloyd W, Schur PH. Immune complexes, complement, and anti-DNA in exacerbations of systemic lupus erythematosus (SLE). *Medicine (Baltimore)*. Mai 1981;60(3):208–17.
286. Mastellos DC, Ricklin D, Lambris JD. Clinical promise of next-generation complement therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. September 2019;18(9):707–29.
287. Zelek WM, Cole J, Ponsford MJ, Harrison RA, Schroeder BE, Webb N, u. a. Complement Inhibition with the C5 Blocker LFG316 in Severe COVID-19. *Am J Respir Crit Care Med*. 1. November 2020;202(9):1304–8.
288. Flechsig A, Rose T, Barkhudarova F, Strauss R, Klotsche J, Dähnrich C, u. a. What is the clinical significance of anti-Sm antibodies in systemic lupus erythematosus? A comparison with anti-dsDNA antibodies and C3. *Clin Exp Rheumatol*. 3. März 2017;
289. Field M, Williams DG, Charles P, Maini RN. Specificity of anti-Sm antibodies by ELISA for systemic lupus erythematosus: increased sensitivity of detection using purified peptide antigens. *Ann Rheum Dis*. Oktober 1988;47(10):820–5.
290. Rubin RL, Joslin FG, Tan EM. Specificity of anti-histone antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1. Juli 1982;25(7):779–82.
291. Ghedira I, Landolsi H, Mankai A, Fabien N, Jeddi M. Anticorps antihistones au cours du lupus érythémateux systémique, comparaison entre trois techniques : Elisa, dot blot et immunotransfert. *Pathol Biol*. April 2006;54(3):148–54.

Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. Matthias Schneider für das Thema meiner Dissertation und das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit. Er stand mir immer mit Rat zur Seite und hat mit seinen Ideen, seiner Erfahrung und konstruktiver Kritik die Arbeit vorangetrieben.

Außerdem möchte ich mich ausdrücklich bei dem Betreuer meiner Doktorarbeit, Herrn Prof. Dr. Stefan Vordenbäumen, bedanken, der immer ein offenes Ohr hatte und mir mit seinen Korrekturen sehr geholfen hat. Ich danke dir vielmals für die langjährige Unterstützung.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau Ellen Bleck, die mich tatkräftig und stets freundlich unterstützt hat während der laborchemischen Arbeit.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für ihre seelische Unterstützung und Motivation danken.

Daneben möchte ich mich bei allen beteiligten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für Rheumatologie, der Protagen AG und allen Patientinnen und Patienten bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.