

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie,
Rheumatologie und Pulmologie

Analyse von Anti-Topoisomerase I-Antikörpern und
Evaluierung ihrer immundominanten Epitope bei Patienten
mit diffus kutaner systemischer Sklerose vor und nach
autologer hämatopoetischer Stammzelltransplantation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Glaeser, Lennard Arnd Karl Johannes

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Klein
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. U. Holzer
3. Berichterstatter: Privatdozent Dr. T. Daikeler

Tag der Disputation: 21.03.2018

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1. Systemische Sklerose	8
1.2. Geschichte	8
1.3. Diagnose- und Klassifikationskriterien.....	10
1.3.1. Diagnosekriterien ARA 1980	10
1.3.2. Klassifikationskriterien nach Leroy und Medsger 2001	10
1.3.3. ACR/EULAR Klassifikation 2013	10
1.4. Prävalenz und Inzidenz	12
1.5. Krankheitsaktivität	13
1.6. Krankheitsmanifestationen	14
1.7. Ätiopathogenese	17
1.7.1. Genetik	17
1.7.2. Adaptives Immunsystem.....	18
1.7.3. Angeborenes Immunsystem	21
1.7.4. Nicht-infektiöse Umwelteinflüsse	23
1.7.5. Infektiöse Agentien	24
1.8. Therapeutische Ansätze.....	24
1.8.1. Stammzelltransplantation	25
1.9. Autoantikörper.....	27
1.9.1. Anti-Topoisomerase I-AAb	28
1.10. Einfluss der aHSCT auf Krankheitsaktivität und AAb	36
1.11. Ziel der Arbeit.....	37
2. Material und Methoden.....	38
2.1. Materialien.....	38
2.1.1. Verbrauchsmaterial	38
2.1.2. Chemikalien	38
2.1.3. Geräte.....	39
2.1.4. Puffer	39
2.1.5. Antikörper	40
2.1.6. Antigene	40
2.2. Methoden	44
2.2.1. ELISA Scatterboard	44
2.2.2. ELISA	46
2.2.3. Immundiffusion	47

2.2.4.	Immunfluoreszenz	48
2.3.	Patienten	48
2.3.1.	Patienten, deren Seren auf Antikörper gegen Topo FL/Topo Tr getestet wurden.....	49
2.3.2.	Patienten, deren Seren auf Antikörper gegen Peptide und Topo489- 573 getestet wurden.....	50
2.3.3.	Klinische Daten von Patienten, bei denen eine aHSCT durchgeführt wurde	51
2.4.	Statistik.....	55
3.	Ergebnisse	56
3.1.	Häufigkeit und Reaktivität von Anti-Topo I-Antikörpern bei Patienten mit dcSSc und anderen Erkrankungen	56
3.1.1.	Häufigkeit von Anti-Topoisomerase I-Antikörpern	56
3.1.2.	Reaktivität von Anti-Topoisomerase I-Antikörpern	58
3.1.3.	Synopsis	61
3.2.	Verhalten der Anti-Topoisomerase I-Antikörper unter verschiedenen Therapieformen	61
3.2.1.	Häufigkeit der ATA im Verlauf.....	61
3.2.2.	Reaktivität der Anti-Topoisomerase I-Antikörper im Verlauf	64
3.2.3.	Synopsis	65
3.3.	Korrelation der Anti-Topoisomerase I-Antikörper mit dem klinischen Verlauf bei Patienten mit aHSCT	72
3.3.1.	Vergleich der Häufigkeiten und Reaktivitäten der Kollektive vor Therapiebeginn	72
3.3.2.	Verlauf der Anti-Topoisomerase I-Antikörper nach aHSCT in Relation zum klinischen Verlauf	73
3.4.	Nachweis von Antikörpern gegen Epitope der Topoisomerase in Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen.....	81
3.4.1.	Häufigkeit von Anti-Peptid-Antikörpern	81
3.4.2.	Reaktivität der Anti-Peptid-Antikörper	90
3.4.3.	Verhalten der Anti-Peptid-Antikörper im Verlauf bei Patienten mit dcSSc	112
3.5.	Nachweis von Antikörpern gegen das immundominante Epitop Topo489-573 in Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen	125
3.5.1.	Prävalenz verschiedener Kollektive gegen Topo489-573	125
3.5.2.	Reaktivität der Anti-Topo489-573-Antikörper bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen.....	126
3.5.3.	Verlauf der Anti-Topo489-573-Antikörper bei dcSSc-Patienten nach aHSCT	128

3.5.4.	Korrelation der Anti-Topo489-573-Antikörper mit dem klinischen Verlauf nach aHSCT	133
3.6.	Analyse der Korrelationen zwischen den verschiedenen Topo-I-Antikörpern	134
3.6.1.	Korrelation zwischen Antikörpern gegen Topo Tr und Topo FL... ..	135
3.6.2.	Korrelation von Anti-Topo FL und Tr-Antikörpern mit Antikörpern gegen Peptide der Topoisomerase I.....	144
3.6.3.	Korrelation der Antikörper gegen die Topoisomerase mit Anti-Topo489-573-Antikörpern.....	161
3.6.4.	Korrelation der Anti-Peptid-Antikörper untereinander	168
4.	Diskussion.....	174
4.1.	Häufigkeit und Reaktivität der Anti-Topoisomerase I-Antikörper.....	174
4.2.	Longitudinale Betrachtung der Anti-Topoisomerase I-Antikörper.....	176
4.3.	Korrelation von Anti-Topoisomerase I Antikörpern mit dem klinischen Verlauf nach aHSCT	177
4.4.	Bedeutung der Antikörper gegen das immundominante Epitop und gegen die Peptide der Topoisomerase.....	178
4.5.	Korrelationen.....	182
4.6.	Einfluss einer autologen Stammzelltransplantation auf die Anti-Topoisomerase I-Antikörper	185
5.	Zusammenfassung.....	188
6.	Literaturverzeichnis	190
7.	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	212
8.	Veröffentlichungen.....	213

Abkürzungsverzeichnis:

(m)RSS	-	(modifizierter) Rodnan Skin Score
AA	-	amino acid, Aminosäure
AAb	-	Autoantibodies / Autoantikörper
Ab	-	Antibodies / Antikörper
ACA	-	Anti-Centromer-Autoantikörper / Anti-Kinetochor-Autoantikörper
ACE	-	Angiotensin Converting Enzyme
ACR	-	American College of Rheumatology
AFA	-	Anti-Fibrillarin-Autoantikörper / Anti-U3-RNP-Autoantikörper
aHSCT	-	autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation
AID	-	Autoimmune Disease/ Autoimmunkrankheit
ANA	-	Anti-Nukleäre-Autoantikörper
ARA	-	American Rheumatism Association
AT1	-	Angiotensin II-Rezeptor (Subtyp 1)
ATA	-	Anti-Topoisomerase I-Autoantikörper / Anti-Scl 70-Autoantikörper
BAFF	-	B-Cell activating factor
CD	-	Cluster of differentiation
CMV	-	(humanes) Cytomegalievirus
CYC	-	Cyclophosphamid
DAMP	-	Danger Associated Molecular Pattern
dcSSc	-	diffus kutane Systemische Sklerose
EBV	-	Epstein Barr Virus
ECOG	-	Eastern Cooperative Oncology Group-Performance Status
EKG	-	Elektrokardiogramm
ELISA	-	Enzyme Linked Immunosorbent Essay
EMS	-	Eosinophilie Myalgie Syndrom
ENA	-	extrahierbare nukleäre Antigene
EULAR	-	European League Against Rheumatism
FVC	-	Funktionelle Vitalkapazität
G-CSF	-	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor

GI(T)	-	Gastrointestinal(-trakt)
HCV	-	Hepatitis C Virus
HLA	-	Humanes Leukozytenantigen
i.v.	-	intravenös
IFN	-	Interferon
IL	-	Interleukin
ILD	-	Interstitielle Lungenerkrankung / interstitial lung disease
kDa	-	Kilodalton
lcSSc	-	limitiert kutane Systemische Sklerose
ISSc	-	limitierte Systemische Sklerose
MBP	-	Mannose-binding Protein
MCP	-	metacarpophalangeal
MCTD	-	Mixed Connective Tissue Disease, Mischkollagenose,
MWU-Test	-	Mann-Whitney-U-Test
PAH	-	pulmonalarterielle Hypertonie
PAMP	-	Pathogen Associated Molecular Pattern
PDE-5	-	Phosphodiesterase 5
PDGF(R)	-	Platelet-Derived Growth Factor (Receptor)
RNA	-	Ribonukleinsäure
RP	-	Raynaud Phänomen
SjS	-	Sjögren-Syndrom
SLE	-	Systemischer Lupus Erythematoses
SRC	-	Scleroderma renal crisis
SSc	-	Systemische Sklerose
Th1 bzw. 2	-	T- Helfer 1 bzw. 2 (- Zellen)
TLR	-	Toll Like Receptor
Topo I	-	Topoisomerase I
TOS	-	Toxic Oil Syndrome
U3 RNP	-	U3 Ribonucleoprotein

1. Einleitung

1.1. Systemische Sklerose

Die systemische Sklerose (SSc) ist eine chronisch progrediente Systemerkrankung aus dem Formenkreis der Kollagenosen. Sie ist abzugrenzen von der zirkumskripten Sklerodermie, der Morphea. Die systemische Sklerose wird unterteilt in eine limitiert kutane Form (lcSSc) und eine diffus kutane Form (dcSSc) sowie limitierte systemische Sklerose (lSSc), die sich in ihrer klinischen Symptomatik, Prognose und ihrem Autoantikörperprofil unterscheiden[1]. Des Weiteren werden Sklerodermie-Overlap Formen unterschieden: so z.B. Skleroderma/Polymyositis-Overlap und die Mischkollagenose (MCTD/M. Sharp) -jeweils mit einem charakteristischen Profil von Autoantikörpern (AAb); aber auch ein simultanes Auftreten der SSc mit rheumatoider Arthritis, Sjögren-Syndrom (SjS) oder systemischem Lupus erythematodes (SLE) ist nicht selten[2].

Charakteristisch für die SSc sind drei pathologisch-pathogenetische Korrelate: eine Mikroangiopathie mit Hypoxämie, eine Fibroblastendysfunktion mit Fibrose des Bindegewebes, der Haut und innerer Organe und eine Immunsystemdysregulation in Form einer T- und B-Zell-Funktionsstörung mit konsekutiver Produktion von Autoantikörpern[3]. Während bei der lcSSc vor allem Frauen der fünften bis siebten Lebensdekade betroffen sind und die Krankheit eine langsame, vor allem zentripetale Progredienz zeigt, ist die Dominanz des weiblichen Geschlechts sowie das mediane Erkrankungsalter für die dcSSc geringer, und der Verlauf zeigt eine frühere Stamm- sowie innere Organbeteiligung[4].

1.2. Geschichte

Wer als Erstbeschreiber der systemischen Sklerose gelten darf, ist nach wie vor umstritten[5]. Möglich wäre eine Beschreibung durch Hippokrates (460-370 v.Chr.)[6], die Beschwerden des von Hippokrates als „Mann aus Athen“ beschriebenen Patienten wurden aber auch mit anderen Erkrankungen in Verbindung gebracht[7]. Weitere Berichte, die eine gewisse symptomatische Kompatibilität bieten, finden sich u.a. bei Galen (131-201 n.Chr.), Oribasius (325-

403 n. Chr.), Paulus Aegineta (625-690 n.Chr.) und Avicenna (980-1036 n.Chr.); aufgrund fehlender Eindeutigkeit ist eine klare Zuordnung zur systemischen Sklerose allerdings schwierig[8].

Als erste zuverlässige Beschreibung galt lange die des Falles einer 17-jährigen Frau durch Carlo Curzio 1753[9]. Inzwischen wird dies aber bezweifelt und vielfach angenommen, dass es sich um ein Sklerödem adultorum gehandelt haben dürfte[10].

Spekulationen über Laienbeschreibungen der SSc in Kunst und Literatur wie etwa in Turgenews „Eine lebende Reliquie“[11] sind ebenso zu finden wie Abhandlungen über den Einfluss der Erkrankung auf das Werk von betroffenen Künstlern, wie z.B. Paul Klee[12, 13].

Eine Trennung von linearer Form (Morphea) und diffuser Sklerodermie wurde von Duhring bereits 1881 vorgeschlagen[8]. Den Terminus „Progressive Systemische Sklerose“ forderte Goetz 1945 aufgrund der Organbeteiligung[in[8]], während Tuffanelli et al. 1962 den Begriff „diffuse Sklerodermie“ als „maligne“ Variante prägten[14]. 1964 wurde der Symptomenkomplex des CRST Syndroms (Calcinosis Cutis, Raynaud-Symptomatik, Sklerodaktylie, Teleangiectasien) beschrieben[15] und später zum CREST (E= Ösophagusmotilitätsstörungen) ausgeweitet[16], welches neben dem Thibierge-Weissenbach-Syndrom als Subform der Akrosklerose gegen die diffuse progressive Sklerodermie abgegrenzt wurde[17]. 1988 schlug Leroy eine Trennung in lcSSc und dcSSc im Hinblick auf eine bessere prognostische Diskrimination vor[18] wobei das CREST Syndrom nach der Klassifikation der American Rheumatism Association (ARA) als Unterform des lcSSc klassifiziert wurde[1]. Der Symptomenkomplex kommt allerdings auch bei dcSSc vor.[3] Leroy und Medsger regten 2001 an, eine (Früh-)Form in den klinischen Gebrauch einzuführen: ISSc[1].

Seit den frühen sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts sind antinukleäre Autoantikörper (ANA) in den meisten SSc-Patienten beschrieben[19]. Später wurden 1979 bzw. 1980 Anti-Scl 70-Antikörper[20] bzw. Anti-Centromer-Antikörper (ACA)[21] nachgewiesen. Erstere wurden 1986 als reaktiv gegenüber der Topoisomerase I (Topo I) beschrieben[22]. Weitere AAb-Beschreibungen folgten.

1.3. Diagnose- und Klassifikationskriterien

1.3.1. Diagnosekriterien ARA 1980

Nach der Klassifikation der ARA von 1980 müssen ein Major- oder zwei oder mehr Minor-Kriterien erfüllt sein[23].

Major-Kriterium:

Sklerodermie-artige Hautveränderungen proximal der Fingergrundgelenke

Minor-Kriterien:

1. Sklerodaktylie; 2. Grübchenförmige Narben oder Substanzverlust der distalen Finger- und/oder Zehenweichteile; 3. Bilaterale, basale Lungenfibrose

1.3.2. Klassifikationskriterien nach Leroy und Medsger 2001

Leroy und Medsger schlugen 2001 eine Ergänzung der Klassifikationen mit folgenden Kriterien vor:

1. Limitierte Sklerodermie: Die Hautmanifestation beschränkt sich auf das Gesicht, die Hände und Füße und geht nicht über die Ellbogen oder das Knie hinaus.

2. Diffuse Sklerodermie: Die Hautmanifestation geht über Ellenbogen und Knie hinaus und befällt neben dem Gesicht den Körperstamm.

3. Systemische Sklerodermie sine Sklerodermie: Patienten mit typischen Organmanifestationen und serologischen Parametern ohne Hautmanifestation.

4. Overlap-Syndrom: Die Patienten zeigen Zeichen einer Sklerodermie in Kombination mit anderen rheumatischen Erkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematoses, der Dermatomyositis, oder der rheumatoiden Arthritis[1].

1.3.3. ACR/EULAR Klassifikation 2013

2013 wurden von einer gemeinsamen Expertenkommission des American College of Rheumatology (ACR) und der European League Against Rheumatism (EULAR) neue Klassifikationskriterien entworfen und als den ACR Kriterien von 1980 überlegen beschrieben. Sie sind in Tab. 1-1 dargestellt.

Tab. 1-1 ACR/EULAR Klassifikation 2013[24]

Item	Subitem	Gewichtung
Hautverdickung der Finger beider Hände mit Ausdehnung nach proximal der MCP Gelenke (hinreichendes Kriterium)	-	9
Hautverdickung der Finger (nur höherer Score ist zu zählen)	Geschwollene Finger	2
	Sklerodaktylie (distal der MCP Gelenke, aber proximal der PIP Gelenke)	4
Läsionen der Fingerspitzen (nur höherer Score)	Ulcera der Fingerspitzen	2
	Grübchenförmige Narben der Fingerspitzen	3
Teleangiektasien	-	2
Abnormale Nagelfalzkapillaren	-	2
PAH und/oder ILD (Höchstscore beträgt 2)	PAH	2
	ILD	2
RP	-	3
SSC assoziierte AAb (ACA, ATA, Anti RNA Polymerase II) (Höchstscore beträgt 3)	ACA	3

	ATA	
	Anti-RNA Polymerase III- AAb	

AAb = (Auto)Antikörper, ACA = Anti-Centromer-Antikörper, ATA = Anti-Topoisomerase-Antikörper, ILD = Interstitielle Lungenerkrankung, MCP = Metacarpophalangeal, PAH = Pulmonalarterielle Hypertonie, RP = Raynaud Phänomen.

Der Gesamtscore ist definiert als Addition der gewichteten Höchstscores der jeweiligen Kategorien. Wird ein Gesamtscore von größer/gleich neun Punkten erreicht, kann eine SSc diagnostiziert werden[24].

1.4. Prävalenz und Inzidenz

Die Prävalenz und Inzidenz der systemischen Sklerose zeigt deutliche interethnische und interregionale Unterschiede und stellt sich je nach angewandten Klassifikationskriterien (ARA Klassifikation 1980; Leroy und Medsger 2001) variabel dar[25]. So zeigte sich für ein italienisches Kollektiv eine Prävalenz bzw. Inzidenz von 25,4 bzw. 3,2 pro 100.000 nach ARA bzw. von 34,1 bzw. 4,3 nach Leroy und Medsger mit einem Subklassifikationsverhältnis von ISSc zu lcSSc zu dcSSc von 19,2% zu 62,1% zu 18,7% und einer weiblich zu männlich Ratio von 9,7 zu 1. In den USA, Süd-Australien und Argentinien bestehen eher höhere Prävalenzen, in Nordeuropa und Ostasien deutlich geringere (Tab. 1-2).

Tab. 1-2 Prävalenzen und Inzidenzen der SSc mit interethnischen Unterschieden

Kollektiv	SSc (LeRoy, 2001)	SSc (ARA 1980)	lcSSc	dcSSc
	Prävalenz/Inzidenz [100000 ⁻¹]			
Italien[26]	34,1/4,3	25,4/3,2	21,2/-	6,4/-
Argentinien[27]		29,6 / 2,12	24/1,52	5,7/0,61
Taiwan[28]		5,63/1,09		
Nord-Indien[29]		12,0/-		
USA[30]		27,6/2,1		
Süd-Australien[31]		21,4/1,5		
Island[32]		7,1/0,38		
Japan[33]		3,8 /0,72		
Griechenland[34]		15,4/1,1	11,5/-	3,85/-

ARA = American Rheumatism Association, SSc = Systemische Sklerose, dcSSc = diffus kutane SSc, lcSSc = limitiert kutane SSc.

1.5. Krankheitsaktivität

Um die Wirksamkeit von therapeutischen Ansätzen sowohl am Krankheitsverlauf individueller Patienten als auch im Studiensetting beurteilen zu können, ist es notwendig, Parameter für die Krankheitsaktivität zu definieren. Als problematisch stellt sich hierbei die große interindividuelle Heterogenität der Krankheitsmanifestationen dar. Die Palpation verschiedener, definierter Körperstellen und Bildung eines Scores (Rodnan Skin Score) durch Beurteilung

der Hautdicke lässt sich mit dem Grad des Hautbefalls korrelieren[35, 36]. Für den modifizierten Rodnan Skin Score (mRSS) ist eine akzeptable Inter- und Intraobserver-Reliabilität[37] und eine Korrelation mit Nierenbeteiligung, Mortalität sowie mit der Handfunktion, Gelenkkontrakturen und Arthritiszeichen beschrieben[38]. Für die Beurteilung der Lungenbeteiligung sind verschiedene Verfahren vorgeschlagen worden. Validiert für Patienten mit SSc sind für Patienten mit interstitieller Lungenerkrankung (ILD) die Messung der funktionellen Vitalkapazität (FVC)[39] und als Goldstandard für die Messung der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH) die Rechtsherzangiographie[40, 41]. Um den Grad einer kardialen Beteiligung zu dokumentieren, werden durch klinische Untersuchung, Elektrokardiogramm (EKG) und Echokardiografie Zeichen der Herzinsuffizienz[42], Blockbilder[43] und Perikardaffektion[44] evaluiert.

Ein der Beurteilung gut zugängliches Symptom ist das Raynaud-Phänomen (RP). Hier existieren verschiedene, gut validierte Methoden zur Dokumentation, in der Regel visuelle Analogskalen (VAS), welche Häufigkeit, Dauer und Schmerzintensität erfassen und diese sowohl für Patienten als auch für Untersucher dokumentierbar machen, z.B. der Raynaud Condition Score (RCS)[45]. Die als diagnostisches Kriterium nützliche Nagelfalzkapillarmikroskopie[46] ist hingegen als Verlaufsparemeter nicht validiert[41].

Der Nachweis einer Nierenbeteiligung und einer renalen Krise kann mittels Blutdruckmessung, Serum-Kreatinin und 24-Stunden-Kreatinin-Clearance erfolgen[47, 48].

Eine integrative Möglichkeit der Verlaufsdokumentation stellt der Scleroderma Health Assessment Score (SHAQ) dar. Hier werden –zusätzlich zum ursprünglich für Arthritiden entworfenen HAQ– fünf eher sklerodermiespezifische VAS für Lungenbefall, Fingerulzera, RP, Gastrointestinal- und Hautbefall hinzugezogen[49].

1.6. Krankheitsmanifestationen

Je nach SSc-Subform reichen die Krankheitsmanifestationen von milden

Verläufen, deren Symptomatik –bestehend z.B. aus dem RP, einer akralen Hautbeteiligung und einer leichten Organbeteiligung– über viele Jahre stabil bleibt, bis hin zu schnell progredienten Indurationen der gesamten Körperoberfläche und schweren Organbeteiligungen, im Sinne einer ILD, einem Nierenbefall mit renaler Krise (SRC), oder einer PAH. Symptome, die nicht nur die Lebensqualität stark einschränken, sondern auch mit einer hohen Letalität assoziiert sind, da diese sich trotz verbesserter therapeutischer Optionen oft auch bei Therapieeskalation noch therapieresistent zeigen. Nach wie vor ist die systemische Sklerose die Kollagenose mit dem schlechtesten Outcome[50]. War in den neunzehnhundertsiebziger Jahren noch die SRC die häufigste Todesursache bei SSc-Patienten, so nimmt heute die ILD diesen Platz ein[51]. 2007 veröffentlichten Walker et al.[4] eine Analyse der Daten von 3656 Patienten (1349 mit dcSSc und 2101 mit lcSSc) der EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR)Gruppe: Die Alters- und Geschlechtsverteilung sowie die Häufigkeit der Organmanifestationen in den jeweiligen Untergruppen sind für eine überwiegend kaukasische Population in Tabelle 1-3 dargestellt.

Tab. 1-3 Klinische und serologische Parameter sowie Häufigkeit einer Organmanifestation bei Patienten mit dcSSc und lcSSc nach Walker et al. [4]

Walker et al. 2007	dcSSc [%]	lcSSc [%]
Weibliches Geschlecht	81.1	90.9
Alter MW (SD) [Jahre]	52.3 (13.7)	57.4 (13.1)
Alter bei Auftreten RP MW (SD) [Jahre]	42.9 (14,7)	42,9 (14,5)
Dauer: RP bis erstes non-RP-Symptom MW (SD) [Jahre]	1,9 (5,4)	4,8 (8,5)
ANA	92.1	91.3%
ATA	60.8	23.4

ACA	6.0	46.7
mRSS MW (SD) [Scorepunkte]	19.0 (10.0)	8.1 (5.3)
RP	96.1	95.9
Ösophagus	68.2	66.8
ILD (Lungenfibrose)	53.4	34.7
Gelenkkontrakturen	47.1	24.4
Fingerulcera	42.7	32.9
Muskelschwäche	37.1	22.8
Magen	26.6	22.8
Dünndarm	22.5	21.7
PAH	22.3	20.5
Tendon friction rubs	22.1	7.4
Muskelatrophie	21.1	10.8
Synovitis	20,8	13,7
Hypertonie	19.3	18.6
Herz: diastolische Dysfunktion	16.6	15.4
Herz: Leitungsblock	12.7	10.4
CK-Erhöhung	11.3	4.4

Proteinurie	9.2	3.7
Hypertensive renale Krise	4.2	1.1

MW = Mittelwert, dcSSc = diffus kutane systemische Sklerose, SD = Standardabweichung, lcSSc = limitiert kutane systemische Sklerose, CK = Creatininkinase, RP = Raynaud Phänomen, PAH = pulmonalarterielle Hypertonie, ACA = Anti-Centromer-Antikörper, ATA = Anti-Topoisomerase-Antikörper, ANA = antinukleäre Antikörper, mRSS = modifizierter Rodnan Skin Score.

Ebenso wie bei der Epidemiologie der SSc können auch bei der Krankheitsmanifestation interethnische Unterschiede ausgemacht werden; so ist z.B. eine afroamerikanische Abstammung mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für diffuse Hautbeteiligung, Fingerulzera, PAH und einer geringeren Frequenz von ACA assoziiert[52].

1.7. Ätiopathogenese

1.7.1. Genetik

Es existieren eine Reihe verschiedener humaner Leukozytenantigene (HLA) und Non-HLA Gene, die hinsichtlich einer erhöhten Suszeptibilität für SSc untersucht worden sind. Die meisten der genetischen Risikofaktoren für SSc spielen auch in anderen Autoimmunkrankheiten eine Rolle[53].

1.7.1.1 HLA Gene:

Alle bisher mit der Erkrankung, mit Krankheitsuntergruppen, oder mit dem Autoantikörperprofil assoziierten HLA-Gene sind vom HLA Typ II[53]. Es besteht eine signifikante Assoziation von HLA-DRB1*1104 mit SSc[54]. Der HLA-DQB1*0501/HLA-DRB1*0101-Haplotyp korreliert mit dem Auftreten von ACA.[54, 55] Die Haplotypen HLA-DRB1*1104[56] und HLA-DPB1*1301 wiederum sind mit der Existenz von Anti-Topoisomerase I-AAb (ATA) assoziiert[57].

1.7.1.2 Non-HLA

Unter den Non-HLA Genen kann man als orientierende Unterscheidung eine jedoch nicht immer scharf trennende Unterteilung in solche, die der angeborenen und solche, die der adaptiven Immunität zuzurechnen sind, vornehmen. Unter ersteren sind bestimmte Polymorphismen des IRF5 (*Interferon regulatory factor 5*)-Gens, die sich sowohl mit SSc insgesamt[58], mit dcSSc und fibrosierender Alveolitis im Speziellen [59], aber auch mit SLE korrelieren lassen[60]; ferner Polymorphismen des MIF (*Macrophage Migration Inhibitory Factor*)-Gens, die eine Assoziation mit dcSSc zeigen[61] sowie des ITGAM (*integrin αM*)-Gens, die mit lcSSc- und ACA-Vorkommen assoziiert sind[62].

Unter den untersuchten Genpolymorphismen der adaptiven Immunantwort sind STAT4 und BANK1 zu nennen; STAT 4, einer von sieben *Signal Transducers and Activators of Transcription*, der sowohl eine Rolle in der angeborenen[63] als auch in der adaptiven Immunantwort spielt[64], konnte mit SSc[58], mit der lcSSc Subform[56] und –in Kombination mit bestimmten IRF5-Allelen– mit fibrosierender Alveolitis assoziiert werden[65].

BANK1 (*B-Cell Scaffold Protein with Ankyrin Repeats*) korreliert mit dem Auftreten von dcSSc[66] und ATA[67].

Andere Non-HLA Risikofaktoren für SSc, die bisher –anders als die zuvor aufgezählten– nicht auch für SLE beschrieben wurden, sind RHOB (*Ras Homolog Gene Family Member B*) und PSORS1C1 (*Psoriasis Susceptibility Candidate 1*)[68].

1.7.2. Adaptives Immunsystem

1.7.2.1 T-Zellen

T-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der SSc. In betroffenen Hautpartien zeigen sich neben Makrophagen vor allem aktivierte T-Zellen. Der Grad der Infiltration korreliert positiv mit der Hautdicke[69, 70]. Die SSc-T-Zellen zeigen hinsichtlich der Polarisierung in einen Interferon(IFN) γ sezernierenden T-Helfer(Th)1-Zellen- und einen Interleukin-(IL)-4 und IL-13 produzierenden Th2-Subtyp[71], anders als andere Autoimmunerkrankungen, eine Th2-Dominanz.

Dies gilt sowohl für die die Haut infiltrierenden T-Zellen[72], als auch für diejenigen im Blutkreislauf[73]. Das entscheidende Signal zur Th2-Polarisierung könnte von aktivierten monozytären Zellen und Makrophagen kommen, die ihrerseits IL-4 und IL-13 sezernieren und damit einen sich verselbstständigenden und selbst verstärkenden Prozess der Rekrutierung von Th2-Zellen und Sekretion der profibrotischen Th2-Zytokine anstoßen[74]; möglicherweise aber auch von aktivierten B-Zellen (s.u.). Alternativ aktivierte, als profibrotisch wirkend beschriebene M2-Makrophagen sind ebenfalls in befallener Haut von SSc-Patienten nachgewiesen worden[75].

IL-4 scheint nicht nur eine profibrotische Wirkung zu entfalten; es wurde im Mausmodell sogar als notwendig für die Produktion von ATA beschrieben.[76] Eine neu entdeckte Untergruppe von Cluster of Differentiation (CD)4- und CD8-doppelpositiven T Zellen wurden in Hautproben von SSc-Patienten nachgewiesen. Diese sind potente IL-4-Produzenten und dürften somit zur vermehrten Ablagerung extrazellulärer Matrix beitragen[77].

Teils widersprüchliche Ergebnisse ergaben Untersuchungen zu regulatorische T-Zellen (T_{regs}): Während eine Studie eine normale Anzahl von diesen in peripherem Blut von SSc Patienten, aber eine geringere Zahl T_{regs} in Hautbiopsien von SSc-Patienten beschrieb[78], zeigten andere Studien übernormal viele T_{regs} im peripheren Blut[79, 80]. In einer der beiden genannten Studien bestanden keine Funktionseinschränkungen der T_{regs} und eine positive Korrelation mit der Krankheitsaktivität[79], in der anderen wurde eine Funktionsbeeinträchtigung der T_{regs} nachgewiesen[80].

1.7.2.2 B-Zellen

Dass B-Zellen als Vorgängerzellen der antikörperproduzierenden Plasmazellen eine Rolle in der Pathogenese der SSc spielen, ist angesichts der SSc-assoziierten AAb naheliegend.

B-Zellen fungieren daneben auch als Regulatoren der Immunantwort, indem sie unter anderem Antigene präsentieren, Zytokine sezernieren und in die Differenzierung von T-Effektorzellen sowie die Modulation der Funktion

dendritischer Zellen eingreifen[81, 82].

B-Zellen von SSc-Patienten zeigen verschiedene Abnormitäten:

DNA-Expressionsanalysen, die an Proben betroffener Haut durchgeführt wurden, wiesen eine Hochregulation B-Zell-assoziiertes Gene nach[83]. In Haut und Lungengewebe von Patienten mit SSc-assoziiertes ILD konnten B-Zell Infiltrate nachgewiesen werden[83, 84]. Die B-Zellen von SSc-Patienten exprimieren vermehrt CD19[85], und ein Polymorphismus in der Promoterregion des CD19-Gens korreliert mit der Überexpression von CD19 sowie der Suszeptibilität für SSc[86]. CD19 besitzt die Funktion eines positiv verstärkenden Regulators der Immunantwort; eine antagonistische Wirkung entfaltet CD22[87].

Eine mögliche Folge der CD19 Überexpression ist eine chronische Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen. Während bei der SSc insgesamt ein kontinuierlicher Verlust von Gedächtnis B-Zellen und Plasmazellen vorherrscht, scheint den in ihrer Zahl verminderten Gedächtnis-B-Zellen eine erhöhte Fähigkeit, Immunglobuline –und damit möglicherweise auch AAb– zu produzieren, zu eigen zu sein[88].

Ein Polymorphismus, der zu einer verminderten CD22 Expression auf B-Zellen führt, korreliert mit der Krankheitsaktivität bei lcSSc-Patienten[89].

Ebenfalls erhöht und positiv mit dem Schweregrad der SSc korrelierbar sind der Serumspiegel des löslichen B-Cell activating factor (BAFF, auch BLyS) und die Expression der BAFF-mRNA in betroffener Haut[90].

Einige dieser Auffälligkeiten, die bei SSc Patienten beobachtet wurden, konnten in Mausmodellen reproduziert werden. So hatte der Verlust des CD19 Signalwegs im Tight Skin Mouse (TSK/+)-Modell zur Folge, dass die üblicherweise präsente ATA-Produktion nicht stattfand und sich die Hautdicke der Mäuse deutlich reduzierte[91]. Ebenfalls im TSK/+-Modell zeigte eine Studie einen –wie in SSc-Seren– erhöhten BAFF Serumspiegel. Die Gabe eines BAFF-Antagonisten hemmte die AAb-Produktion und verminderte die Dicke der Haut[92]. Ein weiterer Effekt der veränderten B-Zell-Homöostase könnte die oben diskutierte Induktion der Th2-Polarisation naiver T-Zellen sein, da diese auch durch die von aktivierten B-Zellen sezernierten IL-6 und IL-10 angestoßen werden kann[93, 94].

1.7.3. Angeborenes Immunsystem

1.7.3.1 Interferone

Interessanterweise sind die im Rahmen der verschiedenen Genpolymorphismen besprochenen STAT4 und BANK1 involviert in die Sekretion von IFN α , welchem in der Pathogenese der SSc eine bedeutende Rolle zugeschrieben wird, da viele SSc Patienten in Hautproben oder zirkulierenden Immunzellen eine deutliche Typ I Interferon-Signatur zeigen[95, 96]. Interferonabhängige Gene wie Siglec-I (Sialoadhesin) und IFI44 (interferon-inducible 44) korrelieren mit dem Rodnan Skin Score und wurden als Bestandteil eines Biomarkers zum Monitoring der Krankheitsaktivität vorgeschlagen[97].

1.7.3.2 Toll-Like Rezeptoren

Toll Like Rezeptoren (TLRs) sind integraler Bestandteil der angeborenen Immunabwehr, indem Sie evolutionär konservierte, pathogenassoziierte Strukturen –Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMP)– bzw. durch Nekrose/Apoptose freiwerdendes Material –Danger Associated Molecular Patterns (DAMP)– erkennen und die Expression von proinflammatorischen Genen induzieren[98]. Die Mehrzahl der TLRs nutzt den MyD88/NF κ B-Signalweg, TLR3 und TLR4 bewirken aber auch über den IRF3-Signalweg eine erhöhte Sekretion u.a. von Typ I Interferon[99-101]. Es wurde gezeigt, dass in Fibroblasten aus der Haut von SSc-Patienten Typ I Interferone die Expression von TLR3, dem ein profibrotischer Effekt zugeschrieben wird[102], heraufregulieren können[103], was hinsichtlich der Affinität des TLR3 zu RNA-Molekülen auf eine Aktivierung dieser Immunkaskade durch virale Infektionen aber vor allem auch durch nekrotisches bzw. apoptotisches, körpereigenes Material hinweisen mag[104]. Ferner ließ sich in zumindest einer Studie eine erhöhte Konzentration zirkulierender TLR4 in SSc-Patientenserum nachweisen[105].

1.7.3.3 Inflammasom

Das Inflammasom ist ein Oligoproteinkomplex, der eine zentrale Rolle im inflammatorischen Prozess spielt. Es besteht aus NOD (nucleotide-binding oligomerization domain receptors) -like-Rezeptoren (NLRs), und (Pro)Caspase 1, sowie einem Adapter-Protein. Nach Aktivierung wird die Pro-Caspase 1 in die aktive Form Caspase 1 überführt, welche u.a. pro-IL-1 β zu Interleukin 1 β spaltet. Je nach beteiligtem NLR wird das jeweilige Inflammasom benannt, z.B. NLRP1 (NALP1)-Inflammasom[106, 107]. Bestimmte Polymorphismen im NLRP1-Gen sind mit einer Suszeptibilität für Autoimmunerkrankungen (AID) assoziiert[108], eine seltene Variante auch mit fibrosierender Alveolitis und ATA, wobei sich in Kombination mit oben beschriebenen STAT4- und IRF5-Polymorphismen ein additiver Effekt zeigen ließ[109].

1.7.3.4 Interleukin 1 β

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β wird von aktivierten Makrophagen und Epithelzellen produziert, bewirkt u.a. die Sekretion von TNF α und IL-6[110] und kommt als Schlüsselenzym für die Genese einer Fibrose in Betracht[111]. Schon lange bekannt ist, dass Fibroblasten aus der Haut von SSc-Patienten vermehrt IL-1-Rezeptoren exprimieren und auf geringere Konzentrationen von IL-1 β mit stärkerer Zytokinsekretion reagieren[112, 113]. Außerdem sind die IL-1 β -Serumspiegel im peripheren Blut, sowie Bronchialsekret von SSc-Patienten erhöht und lassen sich invers mit der funktionellen Vitalkapazität (FVC) korrelieren[114]. Ferner induziert IL-1 β zusammen mit IL-6 die Differenzierung von naiven CD4 $^{+}$ -T Zellen zu Th₁₇ Zellen[115]. Diese IL-17 positiven T-Zellen sind bei SSc Patienten im Vergleich zu Gesunden vermehrt[116].

1.7.4. Nicht-infektiöse Umwelteinflüsse.

Schon 1914 berichtete B. Bradwell von einer erhöhten Prävalenz der „diffusen Sklerodermie“ bei Steinmetzen[117]. Seit 1957 eine Studie zur Sklerodermie bei Goldminenarbeitern in Südafrika veröffentlicht wurde[118], waren Umwelteinflüsse in Form von Silikaten[119, 120], Lösungsmitteln[121, 122] und anderen Toxinen als Faktoren in der Ätiopathogenese der SSc immer wieder Gegenstand von Studien und Diskussionen. Nicht zuletzt rückten die „Sklerodermie-like“ Syndrome, - z.B. das „Toxic Oil“ Syndrom (TOS) in Spanien Anfang der neunzehnhundertachtziger Jahre oder das Eosinophilie-Myalgie Syndrom (EMS) in den USA Ende der neunzehnhundertachtziger Jahre - toxikologische Umweltfaktoren in einen größeren gesamtgesellschaftlichen Fokus. Bei beiden Syndromen zeigten sich wie bei der Sklerodermie als pathologisches Korrelat endotheliale Läsionen mit nachfolgender Fibrose[123] bzw. okklusive mikroangiopathische Veränderungen[124]. Des Weiteren bestanden in beiden Fällen sklerodermiforme, fibrotische Veränderungen der Haut, beim TOS vor allem in der chronischen Phase[125]. Typische Antikörperkonstellationen konnten nicht ausgemacht werden. Niedrigtitrige Autoantikörper (ANA, Anti-Smooth-Muscle), die in einer gewissen Frequenz beim TOS vorkommen, korrelieren nicht mit der Krankheitsaktivität[126].

Wenn auch viele Studien bestimmte Umwelteinflüsse als Risikofaktoren für die Entwicklung einer SSc benennen und eine Metaanalyse von 2010 die Korrelation von Silikalexposition mit der Entwicklung von SSc als gut reproduzierbar ausweist[127], bleibt der ätiopathogenetische Mechanismus für Entwicklung einer Autoimmunität weiter unklar. Aufgrund einer Assoziation von Trichlorethylen mit dem Vorhandensein von ATA wurde postuliert, dieses oder seine Metaboliten könnten mit der Topoisomerase reagieren und in bestimmten genetisch suszeptiblen Individuen Autoimmunität induzieren[128]. Dazu passend wurde gezeigt, dass Xenobiotika (Campothecin, Topotekan, Silicatpartikel) eine Degradierung von Topo I induzieren können, worauf eine Prozession und Präsentation von autoimmunogenen Bestandteilen des Enzyms folgen könnte[129].

1.7.5. Infektiöse Agentien

Eine ganze Reihe von bakteriellen und viralen Infektionen ist in Hinsicht auf eine mögliche Rolle in der Pathogenese der SSc untersucht worden. Darunter das humane Cytomegalievirus (CMV)[130], das Epstein Barr Virus (EBV)[131], Parvovirus B 19[132], Retroviren[133] und Helicobacter pylori[134].

Für die Entstehung der Autoimmunität sind dabei mehrere, sich teils konzeptionell überschneidende Mechanismen diskutiert worden. Hier ist das molekulare Mimikry, d.h. die Auslösung von Autoimmunität durch strukturelle Ähnlichkeiten zwischen einem exogenen Agens und einem Autoantigen[135], zu nennen; ferner eine direkte Endothelschädigung durch das infektiöse Agens[136] sowie eine Aktivierung und Rekrutierung von vorhandenen autoreaktiven T-Zellen durch lang andauernde Inflammation (eine sogenannte Bystander Aktivierung)[137]. Darüber hinaus ist die Aktivierung von vorhandenen autoreaktiven Immunzellen durch bakterielle Superantigene ebenso diskutiert worden[138] wie das Epitope-Spreading, das die im Verlauf einer Erkrankung auftretende Ausdehnung einer zunächst gegen ein spezifisches Antigen gerichteten Immunantwort gegen andere Antigene bzw. Epitope des gleichen Proteins oder auch gegen strukturell ähnliche Epitope anderer Proteine bezeichnet[139, 140].

1.8. Therapeutische Ansätze

Berichtete Curzio 1753 über eine aus heutiger Sicht die Diagnose in Frage stellende, zügige und vollständige Genesung seiner jungen Patientin nach Anwendung von heißen Dampfbädern, Quecksilberapplikation und Aderlässen[10], so ließen viele der mannigfaltigen Therapieansätze, die in den mehr als 250 Jahren seither versucht worden sind, eine Wirksamkeit vermissen. Wenn auch die EULAR Empfehlungen 2009 zumindest für Behandlungsoptionen mit guter Evidenz für einige Krankheitsmanifestationen benennen, so ist doch von keiner bis heute eine Heilung zu erwarten[141].

Unter den nicht-immunsuppressiven Therapien sind vor allem die Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-Inhibitoren, die seit ihrer Einführung ein Benefit in der

Behandlung der Nierenbeteiligung gezeigt haben[142], und die vasoaktiven Medikamente wie Calciumkanalblocker[143], Prostacyclin(-analoga)[144], Endothelinrezeptor-Antagonisten[145], Angiotensin II-Rezeptor (Subtyp 1) (AT1)-Rezeptorantagonisten[146], Phosphodiesterase 5 (PDE-5)-Inhibitoren[147], die evidente Wirksamkeit in der Behandlung des RP und PAH zeigen, zu nennen.

Unter den immunsuppressiven bzw. immunmodulatorischen Agentien wurde in der Behandlung der fibrosierenden Alveolitis neben Cyclophosphamid (CYC)[148, 149] auch für Mycophenolat mofetil eine Wirksamkeit gezeigt[150, 151]. Methotrexat ist in der Behandlung der Hautmanifestationen wirksam[152], auch für Ciclosporin A und Tacrolimus[153] sowie Immunglobuline[154] konnten dies einige Studien zeigen. Der Einsatz von hochdosierten Corticosteroiden ist mit einem erhöhten Risiko für eine SRC assoziiert[155]. Zusammenfassend bleibt die SSc die am schwierigsten zu behandelnde Kollagenose.

1.8.1. Stammzelltransplantation

Für therapierefraktäre und schwerste Fälle kommt daher seit 1996 im Rahmen verschiedener Studien die autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation (aHSCT) zum Einsatz[156]. Nachdem im Rahmen von Hochdosischemotherapien mit aHSCT zur Behandlung von hämatologischen Malignomen positive Effekte bis hin zu Remissionen auf zusätzlich bestehende Autoimmunerkrankungen dokumentiert wurden[157-159], wendete man dieses Schema auch primär auf AID an[160, 161]. Traten anfänglich relativ hohe transplantationsbezogene Mortalitätsraten bei der SSc auf[162], so zeigten sich nach Reevaluation der Einschlusskriterien[163] akzeptable Mortalitätsraten[164] und vor allem eine gute Wirksamkeit hinsichtlich der kutanen Manifestationen, aber auch eine Verbesserung der inspiratorischen Vitalkapazität[165] und eine geringere Mortalität als bei Patienten mit schweren Verläufen einer dcSSc ohne aHSCT[166]. Neben einem adäquaten Performancestatus (ECOG) des Patienten sowie der Erfahrung an den behandelnden Zentren hinsichtlich der Toxizität der je nach Regime eingesetzten Therapeutika, hat sich vor allem eine

genaue Beurteilung der kardialen Funktion als unerlässlich erwiesen. Insbesondere ist hier eine zuverlässige Beurteilung der rechtsventrikulären Funktion mindestens echokardiografisch, besser noch durch eine Rechtsherzangiographie als Goldstandard wichtig, da eine PAH mit einer deutlich erhöhten therapieassoziierten Mortalität vergesellschaftet ist. Daher wurden ein deutlich erhöhter pulmonalarterieller Druck und eine höhergradige Trikuspidalklappendysfunktion sowie eine konstriktive Perikarditis als Ausschlusskriterien vorgeschlagen[167].

Die aHSCT bezeichnet einen komplexen therapeutischen Vorgang, bei dem drei Schritte unterschieden werden können, welche in Ihrer Ausführung zwischen unterschiedlichen Regimen variieren:

1. Mobilisierung der Stammzellen mittels Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF), ggf. mit Cyclophosphamid.
2. Leukapherese, ggf. mit ex-vivo-Manipulation.
3. Konditionierung und Reinfusion.

Je nach Regime erfolgt die Konditionierung mit Cyclophosphamid, oder Antithymozyten-Globulin (equines oder leporines). Einige Regimes beinhalten eine Ganzkörperbestrahlung, oder auch die Busulfan-Applikation.[168]

Die zu Grunde liegende Hypothese postuliert einen Neustart des Immunsystems durch eine Eradikation der autoreaktiven Lymphozyten. Die Reinfusion körpereigener Stammzellen soll daraufhin zu einer adäquaten Ausreifung neuer Generationen von nicht-autoreaktiven T-Zellen führen[169].

Es muss hierbei zwischen myeloablativen und nicht-myeloablativen Verfahren unterschieden werden. Myeloablative Verfahren setzen einen irreversiblen Knochenmarksschaden, daher wird obligat eine autologe Stammzelltransplantation angeschlossen. Myeloablative Verfahren werden vornehmlich in der Therapie hämatologischer Malignome verwendet, zeigten jedoch bei der SSc eine gute Wirksamkeit auf die Hautmanifestationen bei allerdings erhöhter therapieassoziiertes Mortalität und Morbidität[170, 171] sowie einer erhöhten Rate von sekundären Leukämien und myelodysplastischen Syndromen (MDS). Die in der Therapie der SSc und anderer AIDs am häufigsten verwendeten aHSCT-Protokolle sind daher nicht-myeloablativ. Hier werden

lymphozytenpezifischere Substanzen verwendet, die mit einer deutlich geringeren Knochenmarkstoxizität einhergehen, bei jedoch möglicherweise erhöhter Rezidivrate[172]. Festzuhalten ist jedoch in beiden Fällen, dass es sich nicht um eine Transplantation im eigentlichen Sinne handelt, da das Transplantat aus patienteneigenen CD34+ Zellen besteht, die dem Patienten nach der Konditionierung wieder zugeführt werden; ähnlich einer Eigenblutspende, bei der der zu operierende Patient vor dem Eingriff Blut spendet, welches er dann bei Bedarf während der Operation reinfundiert bekommt[167].

In jüngerer Zeit entstanden drei kontrollierte Studien, die die HSCT gegenüber der CYC i.v. Pulstherapie vergleichen und sich hinsichtlich der einzelnen obengenannten Schritte unterscheiden: ASSIST, SCOT, ASTIS[173-175].

1.9. Autoantikörper

Seitdem Anfang der 1960er Jahre antinukleäre Antikörper (ANA) bei Patienten mit SSc entdeckt wurden[19], haben sich diese mit einer Prävalenz von ca. 95%[176, 177] als ein wichtiges diagnostisches Kriterium sowie als prädiktiver Parameter für die Progression eines Raynaud-Syndroms in eine SSc erwiesen[178]. 1979 wurden Anti-Scl 70-AAb[20], welche 1986 als reaktiv gegenüber der Topoisomerase I beschrieben wurden[22], und 1980 Anti-Centromer-AAb (ACA)[21] entdeckt. Mit PM/Sci-AAb[179], Anti-RNA-Polymerase III-AAb[180], Anti-Fibrillarin-AAb (AFA)[181, 182], Anti-Th/To[183], Anti-Ku[184, 185] und Anti-U1-RNP[186, 187] wurden in der Folge weitere, mehr oder weniger krankheitsspezifische bzw. subformassoziierte Antikörper beschrieben. Unspezifische AAb wie Anti-Ro52 und Anti-p35/p23 zeigen eine nennenswerte Prävalenz in SSc Patientenseren. Die Häufigkeiten der verschiedenen AAb bei Patienten aller SSc-Subformen variieren in zwei großen Studien, die 2005 und 2011 veröffentlicht wurden, je nach AAb zwischen 0,2 und 35,9 % (Tab. 1-4).

Tab. 1-4 Häufigkeit von AAb bei der SSc in zwei maßgeblichen Studien. (RNAP=RNA-Polymerase III)

Antikörper	Mierau, 2011 [177]	Steen, 2005 [176]
	Anzahl getesteter Patienten	
	n = 863	n = 1432
	% positiv	
Anti-Centromer	35,9	20,3
Anti-Topoisomerase I	30,1	22,2
Anti-Polymyositis/Scl	4,9	2,5
Anti-U1-RNP	4,8	5
Anti-RNA Polymerase III	3,8	8,4
Anti-Fibrillarin	1,8	3,8
Anti-Ku	1,2	/
Anti-Th/To	0,2	5

1.9.1. Anti-Topoisomerase I-AAb

1979 wurde ein 70 Kilodalton (kDa) großes Kernprotein aus Rattenlebern extrahiert, mit dem IgG-Ab aus SSc-Patientenseren in der Immundiffusion präzipitierten[20]. Später konnte nachgewiesen werden, dass dieses Protein in Gegenwart von Proteaseinhibitoren ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa besitzt und identisch ist mit der DNA-Topoisomerase I[22, 188, 189]. Die DNA-Topoisomerase I ist ein die negativen Supercoils doppelsträngiger DNA durch Einzelstrangbrüche entwindendes, in pro-[190] und eukaryoten[191] Zellen vorkommendes Enzym[192].

Die eukaryotische Topoisomerase I besteht aus vier Hauptregionen: der N-

terminalen Region (die Aminosäuren (AA) 1-215 umfassend), der Kern-Subdomäne (AA 216-636), der Linker-Domäne (AA 637-713) und der C-terminalen Domäne (AA 714-76). Die Kern-Subdomäne, die sich in Kern-Subdomäne I-II (AA 216-435) und Kern-Subdomäne III (AA 436-636) unterteilen lässt, ist zusammen mit der C-terminalen Domäne (AA 714-765) evolutionär hochkonserviert und für die Reaktion mit der DNA verantwortlich[193].

Es konnte demonstriert werden, dass sich durch eine Interaktion mit IgG-ATA in ausreichender Konzentration die Aktivität der Topo I inhibieren lässt[188, 194].

Die deutliche Mehrzahl der Studien zu ATA untersucht IgG-AAb; IgM- und IgA-Isotypen hingegen sind deutlich seltener Gegenstand von Untersuchungen und zeigen in den betreffenden Studien eine deutlich geringere Prävalenz[195, 196].

1.9.1.1 Testmethoden

Zunächst wurden Immundiffusionsverfahren, z.B. die radiale Immundiffusion nach Ouchterlouny, oder die Gegenimmunelektrophorese für den Nachweis der ATA verwendet[20, 197]. Besagte Verfahren bedürfen allerdings eines Zeitraums von einigen Tagen bis zur Auswertung und sind relativ arbeitsaufwändig, sodass ein hoher diagnostischer Durchsatz nur schwierig zu erreichen ist. Später wurden Testverfahren mittels Enzyme Linked Immunosorbent Essay (ELISA) oder Immunoblot eingeführt, die schneller und in höheren Stückzahlen durchführbar sind.

Viele große Studien sind mit den klassischen Immundiffusionsmethoden durchgeführt worden, welche sich im Rahmen dieser Erfahrungen vor allem durch eine sehr hohe Spezifität sowohl gegenüber gesunden Kontrollen, Patienten mit anderen Kollagenosen, als auch gegenüber Patienten mit Raynaud-Syndrom und lcSSc/CREST-Syndrom auszeichneten (Tab. 1-5). Im Immunoblotting zeigte sich ebenfalls eine gute Sensitivität und Spezifität gegenüber Gesunden und Kollagenosepatienten. Beim Nachweis mit dem ELISA, der neben seinen ökonomischen Vorzügen die Quantifizierbarkeit als Alleinstellungsmerkmal besitzt, lagen Probleme in einer geringeren Spezifität, die später zum Teil gelöst wurden[198], wobei Vorbehalte hinsichtlich einer

ausreichenden Abgrenzbarkeit z.B. gegenüber SLE oder Hepatitis C- (HCV)-Infektionen bleiben[199, 200].

Tab. 1-5 Sensitivität und Spezifität verschiedener Testverfahren zum Nachweis der Anti-Topoisomerase/Scl 70-Antikörper.

Modus	Studie	Sens.(%)	Spez. (%)
Immundiffusion			
SSc/Kontrolle	Aeschlimann, 1989[201]	17	100
	Takehara, 1985[202]	67	100
	Pooled Analysis, Reveille 2003[203]	20,2	100
SSc/Kollagenose	Aeschlimann, 1989[201]	17	100
	Bunn, 1998[204]	21	100
	Jarzabek-Chorzelska, 1986[205]	56	97,8
	Pooled Analysis, Reveille 2003[203]	26	99,5
Immunoblot			
SSc/Kontrolle	Weiner, 1988[206]	28	97
	Aeschlimann, 1989[201]	48	100
	Pooled Analysis, Reveille 2003[203]	41	99,4

SSc/Kollagenose	Aeschlimann, 1989[201]	48	90
	De Rooij, 1988[207]	42	99,3
	Pooled Analysis, Reveille 2003[203]	40	99
ELISA			
SSc/Kontrolle	Hildebrandt, 1990[208]	31	100
	Tsay, 1990[209]	75	100
	Pooled Analysis, Reveille 2003[203]	43	100
SSc/Kollagenose	Hildebrandt, 1990[208]	31	98
	Tsay, 1990[209]	75	76
	Pooled Analysis, Reveille 2003[203]	43	90

Sens. = Sensitivität; *Spez.* = Spezifität, *Immundiff.* = Immundiffusion, *SSc* = Systemische Sklerose, *ELISA* = Enzyme Linked Immunosorbent Essay.

Unterschiedliche Antigene haben Eingang in die ATA-Diagnostik gefunden. Zunächst wurden aufgereinigte Proteine aus Rattenleber[210] oder Kalbsthymus[208] verwendet. Wegen des hohen Aufwands, ein hochreines Antigen herzustellen, bemühte man schon früh Rekombinationstechniken zur Herstellung der Topo I[211-213] sowohl in ihrer gesamten Ausdehnung, als auch - u.a. wegen methodischer Schwierigkeiten, das gesamte Protein rekombinant herzustellen - in Form überlappender rekombinanter Peptide[214].

1.9.1.2 Prävalenz in unterschiedlichen Testverfahren

Abhängig vom angewendeten Verfahren und den unterschiedlichen Kollektiven ergeben sich deutlich unterschiedliche Prävalenzen für ATA bzw Scl 70-AAb. Es finden sich Prävalenzwerte zwischen 9% (Immundiffusion) und 75% (ELISA) bzw. 77% (Immundiffusion) (s. Tab 1-6).

Tab. 1-6 Prävalenzen von Anti-Topoisomerase/Scl 70 Antikörpern nachgewiesen mit verschiedenen Methoden in den in Tab. 1-5 dargestellten Studien

Methode	Studie	Prävalenz [%]
Immundiffusion	Aeschlimann, 1989[201]	9
	Takehara, 1985[202]	67
	Pooled Analysis, Reveille 2003[203]	21-28
	Bunn, 1998[204]	59
	Jarzabek-Chorzelska, 1986[205]	77
Immunoblot	Weiner, 1988[206]	28
	Aeschlimann, 1989[201]	48
	Pooled Analysis, Reveille 2003[203]	41
	De Rooij, 1988[207]	42
ELISA	Hildebrandt, 1990[208]	47
	Tsay, 1990[209]	75
	Pooled Analysis, Reveille 2003[203]	43

ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Essay

1.9.1.3 Immundominante Epitope

In Hinsicht auf eine Vereinfachung der Diagnostik, aber natürlich auch auf eine mögliche ätiopathogenetische Rolle der AAb ist mit Fragmenten verschiedener Größe nach immundominanten Epitopen gesucht worden[215]. Bei einer Vielzahl von möglichen Epitopen zeigen die meisten Studien eine erhöhte Reaktivität der Patientenseren mit Domänen, die zentral oder näher am C-Terminus liegen. Vor allem für Peptide zwischen den Aminosäuren (AA) 450-600 besteht in vielen Studien eine hohe Avidität; dennoch existieren deutliche Diskrepanzen zwischen den unterschiedlichen Studien und auch für andere Regionen, z.B. am N-Terminus, konnte eine Reaktivität der Antikörper gezeigt werden (Tab. 1-7).

Tab. 1-7 Auswahl unterschiedlicher Studien mit den jeweiligen immundominanten Epitopen der Topoisomerase I (AA= Aminosäure)

Studie	Immundominante Epitope [AA]
Piccinini, 1991[215]	405-484
Kuwana, 1993[216]	74-248; 485-601
Cram, 1993[213]	453-560, aber auch 1-139, 342-458, 656-765
Meesters, 1992[217]	653-704
Kuwana, 1999[218]	489-573
Simon, 2009[219]	450-600
Hu, 2004[220]	207-441 aber auch 433–636
Rizou, 2000 [221]	205-224, 349-368, 397-368, 517-536
Kato, 1993 [222]	547-565
Verheijen, 1990 [211]	70-344 und/oder 589-657, 344-589, 657-765
Maul, 1989 [223]	656-765

AA = Aminosäure.

1.9.1.3.1 Lineare und konformationale Epitope

Antikörper können lineare, d.h. allein durch die (zweidimensionale) Abfolge der Aminosäuren charakterisierte, oder dreidimensionale, durch Faltung entstehende, sog. konformationale Epitope erkennen. Z.B. unterscheiden sich zwei Formen von AAb gegen die Glutamatdecarboxylase (GAD), die sowohl beim Diabetes Mellitus Typ 1 als auch beim Stiff-Person-Syndrom vorkommen,

zwischen beiden Erkrankungen unter anderem hinsichtlich ihrer Spezifität für konformationale bzw. denaturierte (lineare) Epitope[224, 225]. Im Bereich der Kollagenosen ist bekannt, dass Anti-Sm, Anti-RO/SSA und Anti LA/SSB-ABs konformationale Epitope erkennen[226-228]. Nach Kuwana et al.[218] zeichnen sich ATA in SSc Patienten durch eine fehlende Reaktivität mit linearen Epitopen aus: In besagter Arbeit wurde gezeigt, dass die Mehrzahl der ATA-positiven Seren zwar mit verschiedenen Fragmenten der Topo I eine so geartete Reaktivität zeigten, dass auf ein immundominantes Epitop zwischen AA 512-563 geschlossen werden konnte, die AA Sequenz aber mehr als 51 AA lang sein musste. Mit 5 synthetischen, überlappenden Peptiden, die AA 512-563 umspannten, jedoch kürzer als 52 AA waren, reagierte keines der getesteten Seren.

1.9.1.4 Korrelationen der AAb mit dem Krankheitsverlauf

ATA zeigen eine Assoziation mit dcSSc, Fingerulcera, erhöhten akute-Phase-Proteinen, pulmonaler Fibrose und restriktiver Lungenerkrankung[4, 229] –wobei letzterem Zusammenhang auch Studien widersprechen[230]– ferner EKG-Veränderungen und Gelenkkontrakturen[231]. Die Höhe des IgG-AAb-Titers konnte positiv mit dem Rodnan Skin Score und der Krankheitsaktivität korreliert werden[232]. Auch eine neuere Querschnittsstudie reproduziert diese Korrelation hoher Titer mit einer schlechteren Prognose sowie die fehlende Assoziation mit den einzelnen Krankheitsmanifestationen.[231] Der AAb-Titerverlauf unter Therapie ist äußerst selten Fokus von Studien. Insgesamt gibt es nur wenige longitudinale Studien, weder hinsichtlich der Prävalenz noch der Reaktivität der ATA. Ausnahmen sind hierbei die Studien von Tsukamoto et al.[169], in welcher eine signifikante Abnahme der ATA-Titer unter aHSCT gezeigt werden konnte, von Hildebrandt et al.[233], in welcher kein signifikanter Abfall der ATA in einem Kollektiv ohne spezifische Therapie dokumentiert werden konnte, sowie von Kuwana et al.[234], in welcher zumindest eine Subgruppe mit benignem Verlauf ausgemacht werden konnte, die sich durch einen Verlust von ATA auszeichnete. Dieser Verlauf war unabhängig von einer therapeutischen Intervention.

1.9.1.5 ATA als ätiopathogenetischer Faktor

Nach Entdeckung der AAb in den späten neunzehnhundertsiebziger Jahren wurde nach ätiopathogenetischen Zusammenhängen zwischen den Krankheitsmanifestationen und den immunologischen Auffälligkeiten in Patientenseren gesucht[235, 236]. Als mögliche pathogenetische Verbindung wurde die Beeinflussung von Epidermal Growth Factor-Rezeptoren durch ATA diskutiert[194]. Doch sowohl die geringe Prävalenz von maximal 60% in dcSSc- bzw. das Nichtvorhandensein in der Mehrzahl der SSc-Patienten als auch das Fehlen eines überzeugenden pathogenetischen Konzepts für die Entstehung des typischen polysymptomatischen Krankheitsbildes führten zu einer Fokussierung auf das diagnostische Potential der ATA im Folgenden[237]. Erst in jüngerer Zeit wurden –neben anderen, möglicherweise an der Pathogenese beteiligten AAb wie AFA und Anti-Platelet-Derived Growth Factor Rezeptor (PDGFR)-AAb[238]– erneut Studien zu einer möglichen ätiopathogenetischen Bedeutung der ATA veröffentlicht: Henault et al.[239, 240] postulierten eine Aktivierung von Monozyten und sukzessive das Anstoßen einer profibrotischen Kaskade durch das Binden eines Topo I-ATA-Komplexes an die Zelloberfläche von Fibroblasten. Chizzolini et al.[241] vermuteten ebenfalls eine Stimulierung von Fibroblasten über die Bindung von Anti-Fibroblasten-AAb an TLR4 auf der Fibroblastenoberfläche sowie eine Stimulation der Autoimmunität in Form einer IFN- α -Produktion durch plasmocytoide dendritische Zellen, die ihrerseits durch die Bindung von Immunkomplexen unter Beteiligung von ATA aktiviert werden.

1.10. Einfluss der aHSCT auf Krankheitsaktivität und AAb

In Bezug auf die Einflüsse der aHSCT auf das Immunsystem, die Wiederherstellung desselben sowie die Krankheitsaktivität wurde wiederholt eine anhaltende Reduktion von CD4+-Zellen und B-Lymphozyten demonstriert [169, 242]. Szodoray et al.[243] fanden zwar eine passagere Reduktion der meisten relevanten Immunzellen (nicht jedoch der regulatorischen T-Zellen), gefolgt jedoch von einer Normalisierung aller Zellreihen inklusive der CD4+-Zellen innerhalb von 150 Tagen. Divergierende Studienergebnisse existieren auch

hinsichtlich der ATA-Reaktivität nach aHSCT; so zeigten Storek et al.[244] eine deutlich erhöhte Reaktivität während der ersten 24 Monate nach Therapie, während andere eine signifikante Reduktion fanden. Tsukamoto et al.[169], die ein Kollektiv von 11 Patienten nach aHSCT untersuchten, konnten eine Verschiebung der Th1/Th2 Ratio hin zu einer Th1-Dominanz sowie eine Abnahme der Serumspiegel von TNF- α , TGF- β , IL-6 und des löslichen Interleukin-2-Rezeptors zeigen.

1.11. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist, zunächst ein ELISA-Verfahren mit zwei Topoisomerase I-Antigenen (Topo I full length (FL) und Topo I truncated (Tr)) zu etablieren. Hiermit sollen dann dcSSc-Patienten auf die Prävalenz von ATA untersucht und mit Patienten mit lcSSc/CREST, mit anderen Kollagenosen (M. Sharp/Sjögren Syndrom), mit gesunden Probanden sowie mit einer Subgruppe von dcSSc-Patienten, bei denen bioptisch eine Herzbeteiligung nachgewiesen wurde, hinsichtlich der AAb-Häufigkeit und der AAb-Reaktivität verglichen werden.

Im Folgenden soll der Verlauf des Antikörperprofils unter verschiedenen Therapieformen untersucht werden. Hierfür wird eine Patientengruppe untersucht, bei der eine autologe Stammzelltransplantation durchgeführt wurde, gegenüber Patientengruppen, die mit einer Cyclophosphamid-Stoßtherapie behandelt bzw. bei denen weder eine Cyclophosphamid, noch eine aHSCT durchgeführt wurden. Es sollen darüber hinaus Patienten, die ein gutes Outcome nach aHSCT boten, mit solchen, die kein Ansprechen, oder ein Rezidiv der Erkrankung zeigten, hinsichtlich des Antikörperprofils verglichen werden. Ferner werden neben den beiden Topo I-Antigenen 45 überlappende Peptidfragmente der Topo I in einer Länge von jeweils 25 Aminosäuren sowie das von Kuwana et al.[218] 1999 als immundominant beschriebene Peptid im ELISA hinsichtlich ihrer möglichen Immundominanz untersucht, mit der Frage, ob die AAb gegen Konformations-spezifische oder lineare Epitope gerichtet sind und ob sich ein Epitop-Spreading, wie für T-Zell Epitope der Topo I im Verlauf der Erkrankung beschrieben[140] darstellen lässt.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Verbrauchsmaterial

Deepwellplatten, Polystyrol 1,2 mm (Wicker GmbH, Kirchheim-Teck)
epT.I.S.Standard 1000 µl (Eppendorf AG, Hamburg)
Ni-NTA Spin Columns (Qiagen GmbH, Hilden)
Nunc TM Immunoplate (Nunc TM Brand Products, Roskilde, Dänemark)
Optifit Tips Bulk 1200µl für 8-Kanal Pipette (Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinki, Finnland)
Petrischale 60*15mm (Greiner BioOneGmbH, Frickenhausen)
Pipettenspitzen 200µl (Sarstedt AG, Nümbrecht)
Pipettenspitzen Plastibrand® Pipettetips (Brand GmbH, Wertheim)
Reaction Tubes (Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen)

2.1.2. Chemikalien

Agarose, Lonza Group, Basel, Schweiz
Bovines Serum Albumin (PAA, The Cell Culture Company, Pasching, Österreich)
Citronensäure-Monohydrat (ROTH, Karlsruhe)
Di-Natriumhydrogenphosphat (MERCK, Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (AppliChem GmbH, Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (MERCK, Darmstadt)
Natrium-Azid
Natriumchlorid (VWR International GmbH Darmstadt)
Natriumcarbonat (MERCK, Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat (MERCK, Darmstadt)
Schwefelsäure 25 % (MERCK, Darmstadt)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrate (MERCK, Darmstadt)
Triton® X-100 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
Wasserstoffperoxid 30 % (MERCK, Darmstadt)
α-Phenylenediaminedihydrochlorid (SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

2.1.3. Geräte

12-Kanal Pipette, Transferpipette 10-100µl (Brand GmbH, Wertheim)
8-Kanal Pipette, Biohit 50-1200 µl (Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinki, Finnland)
ELISA Reader SLT Rainbow (SLT LabInstruments, Salzburg, Österreich);
Software:
Magellan (Tecan® Trading AG, Männedorf, Schweiz)
pH-Meter pHenomenal TM, (VWR International GmbH, Darmstadt)
Pipetboy (Integra Biosciences, Baar, Schweiz)
Ultraschallgerät Sonorex Super RK 255 H (Bandelin electronic GmbH, Berlin)
Waage Mettler H 20 T, 0,01-160 g (Mettler-Waagen GmbH, Gießen)
Waage Sartorius, 5 g-820 g (Sartorius AG, Göttingen)
Wasserbad (Köttermann, Uetze/Hängisen)

2.1.4. Puffer

Bicarbonat-Puffer 0,2 M, pH 9,6 (64 mM Na₂CO₃, 136 mM NaHCO₃)
Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5,0 (80 mM tri-Natriumcitrat, 30 mM Citronensäure)
ELISA - Substrat (Citratpuffer, pH 5,0 + 0,5 mg/ml Phenylendiamine + 0,03 % Wasserstoffperoxid)
ELISA- Serumverdünnungspuffer (PBS-Puffer + 0,08 % Triton X 100 + 0,004 mg/ml)
ELISA Waschpuffer 1 (PBS-Puffer + 0,5 % BSA)
ELISA Waschpuffer 2 (PBS-Puffer + 0,25 % BSA+ 0,2 % Triton X 100)
Ouchterlony-Puffer 0,06 M
(1,5 L a.d mit 12,75 g Na₂ H PO₄(wasserfrei) und 12,8 g NaCl)
+ (0,5 L a.d. mit 4,08g K H₂ PO₄ (wasserfrei) und 4,2 g NaCl) zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,4
+ 5 g Na-Azid
PBS-Puffer, pH 7,4 (10 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, 63 mM Na₂HPO₄)

2.1.5. Antikörper

Peroxidase-conjugated AffiniPure Anti-Human IgG (H+L) (Jackson Immuno-Research Lab. Inc., West Grove, USA)

Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgM Fc5 μ Fragment Specific (Jackson-Immuno Research Lab. Inc., West Grove, USA)

2.1.6. Antigene

Topoisomerase Full Length (Topo FL, AA 1-765)

Produkt Nr.: 12400 SCL-70; full length (50 μ g)

Produkt Nr.: 12401 SCL-70; full length (1mg)

Lot Nr.: 24701

Pufferzusammensetzung: 16mM HEPES, ph 7,5; 400mM NaCl; 20%

Glycerol

Diarect AG, Freiburg.

Topoisomerase Truncated (Topo Tr, AA191-765)

Produkt Nr.: 14500 SCL-70; truncated (50 μ g)

Produkt Nr.: 14501 SCL-70; truncated (1mg)

Lot Nr.: 45B01

Pufferzusammensetzung: 20mM HEPES, ph 8,0; 500mM NaCl; 20%

Glycerol

Diarect AG, Freiburg.

Epitop Topo489-573

Produkt: Topo489-573 (gebunden an Maltose bindendes Protein (MBP), freundlicherweise hergestellt durch die Firma Diarect AG, Freiburg)

Lot Nr.: 99C12

Pufferzusammensetzung: 20mM HEPES, pH 8,0; 150mM NaCl; 20%

Glycerol

Diarect AG, Freiburg.

MBP

Produkt MBP (Maltose bindendes Protein)

Lot Nr.: 99C11

Pufferzusammensetzung: 20mM HEPES, pH 8,0; 150mM NaCl; 20% Glycerol

Diarect AG, Freiburg.

Peptide

Von der Firma Biotrend Chemikalien GmbH in Köln wurden freundlicherweise 45 Peptide á 25 Aminosäuren (AA), die die gesamte Länge der Topoisomerase I mit jeweils 8 überlappenden AA abdecken, synthetisiert (Reinheit HPLC > 95%) (Tab. 2-1).

Tab. 2-1 Peptide 1-45 (á 25 Aminosäuren, jeweils 8 AA Überlappung), die die gesamte Topoisomerase I umfassen, mit entsprechender Aminosäuresequenz (im Einbuchstabencode) und Molekulargewicht (MG). Grau markiert das immundominante Epitop AA 489-573

Peptid	AA Nr.	AA-Sequenz	MG [g/mol]
1	1-25	MSGDH LHNDS QIEAD FRLND SHKHK	2973
2	18-42	LNDSH KHKDK HKDRE HRHKE HKKEK	3267
3	35-59	HKEHK KEKDR EKSKH SNSEH KDSEK	3127
4	52-76	SEHKD SEKKH KEKEK TKHKD GSSEK	3006
5	69-93	HKDGS SEKHK DKHKD RDKEK RKEEK	3144
6	86-110	KEKRK EEKVR ASGDA KIKKE KENGF	2974
7	103-127	KKEKE NGFSS PPQIK DEPED DGYFV	2925
8	120-144	PEDDG YFVPP KEDIK PLKRP RDEDD	3012
9	137-161	LNDSH KHKDK HKDRE HRHKE HKKEK	3267
10	154-178	TEDTK KEKCR KLEEE EDGKL KKPKN	3070
11	171-195	GKLKK PKNKD KDKKV PEPDN KKKKP	2957
12	188-212	PDNKK KKPCK EEEQK WKWWE EERYP	3385

13	205-229	WWEEE RYPEG IKWKF LEHKG PVFAP	3200
14	222-246	HKGPV FAPPY EPLPE NVKFY YDGKV	2933
15	239-263	KFYD GKVMK LSPKA EEVAT FFAKM	2970
16	256-280	VATFF AKMLD HEYTT KEIFR KNFFK	3153
17	273-297	HKEHK KEKDR EKSKH SNSEH KDSEK	3127
18	290-314	EKNII TNLSK CDFTQ MSQYF KAQTE	3009
19	307-331	QYFKA QTEAR KQMSK EEKLE IKEEN	3126
20	324-348	KLKIK EENEK LLKEY GFCIM DNHKE	3121
21	341-365	CIMDN HKERI ANFKI EPPGL FRGRG	2940
22	358-382	PGLFR GRGNH PKMGM LKRRI MPEDI	2948
23	375-399	RRIMP EDIII NCSKD AKVPS PPPGH	2812
24	392-416	VPSPP PGHKW KEVRH DNKVT WLVSU	3021
25	409-433	KVTWL VSWTE NIQGS IKYIK LNPSS	2936
26	426-450	YIMLN PSSRI KGEKD WQKYE TARRL	3124
27	443-467	KYETA RRLKK CVDKI RNQYR EDWKS	3255
28	460-484	QYRED WKSKE MKVRQ RAVAL YFIDK	3229
29	477-501	VALYF IDKLA LRAGN EKEEG ETADT	2795
30	494-518	EEGET ADTVG CCSR VEHIN LHPEL	2793
31	511-535	HINLH PELDG QEYVV EFDL GKDSI	2956
32	528-552	DFLGK DSIRY YNKVP VEKRV FKNLQ	3096

33	545-569	KRVFK NLQLF MENKQ PEDDL FDRLN	3179
34	562-586	DDLFD RLNTG ILNKH LQDLM EGLTA	2884
35	579-603	DLMEG LTAKV FRTYN ASITL QQQLK	2910
36	596-620	ITLQQ QLKEL TAPDE NIPAK ILSYN	2882
37	613-637	PAKIL SYNRA NRAVA ILCNH QRAPP	2815
38	630-654	CNHQR APPKT FEKSM MNLQT KIDAK	2958
39	647-671	LQTKI DAKKE QLADA RRDLE SAKAD	2854
40	664-688	DLKSA KADAK VMKDA KTKKV VESKK	2788
41	681-705	KKVVE SKKKA VQRLE EQLMK LEVQA	2981
42	698-722	LMKLE VQATD REENK QIALG TSKLN	2871
43	715-739	ALGTS KLNLY DPRIT VAWCK KWGVP	2858
44	732-756	WCKKW GVPIE KIXNK TQREK FAWAI	3164
45	741-765	EKIYN KTQRE KFAWA IDMAD EDYEF	3182

AA = Aminosäure, MG = Molekulargewicht, A = Alanin, R= Arginin, N = Asparagin, D = Asparaginsäure, C = Cystein, Q = Glutamin, E = Glutaminsäure, G = Glycin, H = Histidin, I = Isoleucin, L = Leucin, K = Lysin, M = Methionin, F = Phenylalanin, P = Prolin, S = Serin, T = Threonin, W = Tryptophan, Y = Tyrosin, V = Valin.

2.2. Methoden

2.2.1. ELISA Scatterboard

Zur Bestimmung der optimalen Antigen- und Serumverdünnungen wurde mit den beiden Topo I-Antigenen ein Elisa-Scatterboard angefertigt

2.2.1.1 Vorbereitungen:

In Vorversuchen wurden im ELISA drei Seren als Standardseren für weitere Untersuchungen ausgewählt (ein stark positives, ein schwach positives und ein negatives Serum) unter Verwendung einer Topo I-Konzentration von 10µg/ml und einer Serumendverdünnung von 1:500. Diese Standardseren wurden für die weitere Bestimmung sowohl von IgG- als auch von IgM-Antikörpern verwendet.

2.2.1.2 Antigenbeschichtung

Die initial vorliegende Konzentration betrug 105,4 mg/ml, die Anfangs-Soll-Konzentration 10 µg/ml.

Zur Verdünnung wurden in die 96-Well-Platten je 100 µl BICA-Puffer pro Well (Reihe B bis G) pipettiert. In Reihe A befanden sich initial 200 µl (10µg Antigen/ml BICA), von denen dann jeweils 100 µl in die Reihe B und von dort jeweils weitere 100 µl herüber pipettiert wurden, um die gewünschte Verdünnung zu erreichen. Der letzten Reihe (Reihe G) wurden am Schluss 100 µl entnommen.

2.2.1.3 Serumverdünnung

Begonnen wurde die Verdünnungsreihe mit einer Serumverdünnung von 1:500. Dazu wurde eine Vorverdünnung (1 zu 51: 1000 µl Serumverdünnungspuffer (SVP) + 20 µl Serum) in Eppendorf Cups und eine Endverdünnung (1 zu 10 aus 100 µl Vorverdünnung + 900 µl SVP) in Deep Well Platten hergestellt.

In den Deep Well Platten wurden in Reihe 2 bis 12 jeweils 500 µl SVP pro Well pipettiert. In Reihe 1 befanden sich wie oben genannt 1000 µl Endverdünnung pro Well. Von dort wurden konsekutiv jeweils 500 µl pro Well in die folgende Reihe

(Reihe 2 etc.) überpipettiert (Tab. 2-2). In Reihe 12 befand sich nur SVP.
 Aus dieser Verdünnungsreihe in der Deep Well Platte wurden nun 100 µl pro Well
 in die 96- Well Platten überpipettiert.

Tab. 2-2 Serumverdünnungen im ELISA-Scatterboard. Dargestellt sind die jeweiligen Verdünnungen von Reihe 1 bis 12.

1.	1:500 Verdünnung:	7.	1:32000 Verdünnung:
	100 µl Vorverdünnung (1:51) + 900 µl SVP		500 µl (1:1600) + 500 µl SVP
2.	1:1000 Verdünnung:	8.	1:64000 Verdünnung:
	500 µl (1:50) + 500 µl SVP		500 µl (1:3200) + 500 µl SVP
3.	1:2000 Verdünnung:	9.	1:128000 Verdünnung:
	500 µl (1:100) + 500 µl SVP		500 µl (1:6400) + 500 µl SVP
4.	1:4000 Verdünnung:	10.	1:256000 Verdünnung:
	500 µl (1:200) + 500 µl SVP		500 µl (1:12800) + 500 µl SVP
5.	1:8000 Verdünnung:	11.	1:512000 Verdünnung:
	500 µl (1:400) + 500 µl SVP		500 µl (1:25600) + 500 µl SVP
6.	1:16000 Verdünnung:	12.	nur Serumverdünnungspuffer
	500 µl (1:800) + 500 µl SVP		pro Well 100 µl

SVP = Serumverdünnungspuffer

2.2.2. ELISA

2.2.2.1 Antigene

Die Antigene wurden mit Bicarbonat-Puffer bis zur im Scatterboard bestimmten Soll-Konzentration von 2,5 µg/ml verdünnt

2.2.2.2 Serumverdünnung

Die Serumverdünnung wurde in zwei Schritten durchgeführt:

- Vorverdünnung des betreffenden Serums in Eppendorfcups im Verhältnis 1:50 mit Serumverdünnungspuffer.
- Weiterverdünnung auf die Endverdünnung 1:2000 in Deep-Well-Platten

Die Antikörper wurden gemäß der Empfehlung des Herstellers (Jackson-Immuno Research Laboratories INC, West Grove, PA, USA) verdünnt. Anti-Human IgG Antikörper und Anti-Human IgM-Antikörper wurden in einer 1:2000-Verdünnung verwendet.

2.2.2.3 Waschvorgang

Die Nunc-Platten wurden jeweils viermal in Waschpuffer 1 bzw. 2 gewaschen und nach anschließender 15-minütiger Inkubation ausgeklopft.

2.2.2.4 Durchführung

Die Nunc-Platten wurden mit 100 µl pro Well der oben beschriebenen Antigenverdünnung für einen Zeitraum von 14–20 h bei +4 °C inkubiert. Durch anschließendes Waschen mit dem Waschpuffer 1 (s. Abs. 2.1.4) wurden die noch freien Bindungsstellen abgedeckt. Je Well wurden nun 100 µl Serumverdünnung pipettiert und anschließend bei Raumtemperatur 90 Minuten inkubiert.

In einem weiteren Schritt wurden pro Well 100 µl Peroxidase-konjugierte Antikörper (s. oben) pipettiert und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschvorgang erfolgte die Sichtbarmachung der

eingegangenen Antikörper-Reaktionen mittels 150 µl der Substratlösung pro Well. Nach circa 10–15 Minuten wurde die Reaktion mit 50 µl einer 25 prozentigen Schwefelsäure gestoppt und im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgewertet. Diese Methode ist in domo etabliert, validiert und bereits publiziert worden[245, 246]. Alle Testungen wurden in Doppelansätzen durchgeführt.

Die Normwerte für die unterschiedlichen Antigene wurden mithilfe von 21 Seren gesunder Probanden bestimmt, indem die Mittelwerte der Absorption (x1000) zuzüglich der zweifachen Standardabweichung als Obergrenze des Normbereichs gewählt wurden.

2.2.3. Immundiffusion

Präzipitierende Antikörper gegen Topo I bzw. Scl 70 wurden mittels radialer Immundiffusion unter Verwendung von extrahierbaren nukleären Antikörpern (ENA) bestimmt, wie von Tan et al. zum Nachweis von AAb bei Kollagenosepatienten beschrieben wurde[247, 248]. Hierfür wurden 300 ml Ouchterlony-Puffer und 1,35 g Agarose-Pulver (=0,45%) in einen Erlenmeyerkolben mit Hohlschliff gegeben, die Lösung auf einem Magnetrührer unter Rühren bis zum Kochen und konsekutiven Aufklaren erhitzt. Dann erfolgte mit Hilfe eines 6 ml fassenden, sogenannten „Papageienschnabels“ die Portionierung von je 6 ml Lösung und das Umfüllen in Petrischalen. Diese wurden umgedreht für sechs Tage im Kühlschrank gelagert und in der Folge mittels eines Metallröhrchens und einer Schablone mit sechs kreisförmig um eine gleichartige zentrale Vertiefung angeordneten Vertiefungen ausgestanzt. Ein Antigengemisch (ENA) wurde in die mittlere Vertiefung der so vorbereiteten Platten und sechs Seren in die umgebenden Vertiefungen der Agarosegelplatte pipettiert, von denen aus sie aufeinander zu diffundieren. Der Kontakt eines spezifischen Antigens und eines passenden Antikörpers aus dem Serum zeigte sich dann durch eine Präzipitationslinie.

2.2.3.1 Identifizierung von ENA-Subspezifitäten mittels radialer Immundiffusion

Nach der oben beschriebenen, radialen Immundiffusion wurde das bekannte Antigengemisch (ENA) in die Mitte pipettiert, daneben ein Markerserum (in diesem Falle ein Serum mit dem bekanntem Antikörper Anti-Scl 70, dieses war ursprünglich vom Center of Disease Control, Atlanta, Georgia, bereitgestellt worden, wurde aber in der Zwischenzeit durch unsere eigenen Positivkontrollen ersetzt) und in die dritte Vertiefung das zu testende Serum.

Eine positive Reaktion wird durch die Bildung einer charakteristischen Präzipitationslinie auf gleicher Höhe mit ineinander übergehenden Linien dargestellt. Sind nicht die gleichen Antikörper im Serum und der Probe enthalten, führt dies zu überkreuzenden Linien.

2.2.4. Immunfluoreszenz

Nicht im Rahmen dieser Arbeit, jedoch in der vorangegangenen Diagnostik wurden alle Patientenseren mittels Immunfluoreszenztest (IFT) auf ACA, AFA sowie NOR-AAb untersucht. Hierfür wurden Gefrierschnitte entweder von Rattenherz, -niere, -leber, -magen oder Zellkulturen (Chang Cells) verwendet[249, 250]. Für die erstgenannte Methode wurde ein polyvalenter FITC-konjugierter anti-humaner IgG-, IgA- und IgM-Antikörper aus Kaninchenserum verwendet (DAKO, Hamburg, Deutschland, Verdünnung 1:200); für letztere ein monovalenter, Rhodamin-konjugierter anti-humaner IgG-Antikörper aus Ziegenserum (DIANOVA, Hamburg, Deutschland; Verdünnung 1:200). In beiden Fällen wurden die Patientenseren in einer 1:10 Verdünnung verwendet. Titer über 1:40 bzw. über 1:160 für die IFT auf Gefrierschnitten bzw. auf Zellkulturen wurden als positiv definiert.

2.3. Patienten

Seren von Patientin mit unterschiedlichen Erkrankungen und Krankheitsverläufen wurden auf ihre Antikörperreaktivität gegenüber Topo Full Length und Topo Truncated untersucht:

2.3.1. Patienten, deren Seren auf Antikörper gegen Topo FL/Topo Tr getestet wurden

2.3.1.1 dcSSc/PSS

Untersucht wurden Seren von 58 Patienten mit Progressiver Systemischer Sklerose/dcSSc (Geschlecht: [männlich: 19], [weiblich: 39]; Alter: [Median: 45], [Maximum: 72], [Minimum: 17]).

Diese Patienten wurden in vier Gruppen unterteilt:

1. Patienten, bei denen eine autologe Stammzelltransplantation durchgeführt wurde (n=24; männlich n= 9, weiblich n= 15; Alter: Median 41,5 Jahre, Maximum 57 Jahre, Minimum 19 Jahre) (Siehe Absatz 5.3). Von diesen Patienten waren 18 vor aHSCT in der ID Scl 70-positiv und/oder im ELISA ATA-positiv.

2. Patienten, bei denen Cyclophosphamid-Stoßtherapien durchgeführt wurden (n=14; männlich n=3, weiblich n=11; Alter: Median 53,5 Jahre, Maximum 69 Jahre, Minimum 29 Jahre).

3. Patienten, die weder eine Cyclophosphamid-, noch eine aHSCT erhielten (n=12; männlich n=1, weiblich n=11; Alter: Median 49 Jahre, Maximum 72 Jahre, Minimum 17 Jahre).

4. Patienten, bei denen eine bioptisch gesicherte Herzbeteiligung bestand (n=16, bei acht Patienten wurde eine aHSCT durchgeführt und sie wurden daher der Gruppe 1 zugerechnet; männlich n=12 bzw. 6, weiblich n=4 bzw. 2; Alter: Median 46 bzw. 47 Jahre, Maximum 56 bzw, 50 Jahre, Minimum 19 bzw. 38 Jahre).

Patienten der drei erstgenannten Gruppen wurden im zeitlichen Verlauf zu folgenden Zeitpunkten analysiert:

Zeitpunkt (Z) 0: vor Therapie; Z1: bis 4 Monate nach Therapie; Z2: 4-9 Monate nach Therapie; Z3:10-15 Monate nach Therapie; Z4: 16-24 Monate nach Therapie; Z5: mehr als 24 Monate nach Therapie.

2.3.1.2 Kontrollgruppen

Folgende Patienten und Probanden wurden als Kontrollgruppen untersucht:

1. Seren gesunder Probanden (n= 20; männlich n=6, weiblich n=14; Alter: Median 51,5 Jahre, Maximum 63 Jahre, Minimum 21 Jahre); freundlicherweise

bereitgestellt von Dr. D. Wernet (Institut für Transfusionsmedizin, Tübingen),
2. Patienten mit lcSSc/CREST-Syndrom (n=24; männlich n=2, weiblich n=22;
Alter: Median 52,5 Jahre, Maximum 79 Jahre, Minimum 21 Jahre)
3. Seren von 42 Patienten mit anderen Kollagenerkrankungen (Sjögren Syndrom
(SjS/M. Sjögren) n=25, MCTD/M. Sharp n=17; männlich n=3, weiblich n=39;
Alter: Median 43,5 Jahre, Maximum 72 Jahre, Minimum 17 Jahre).

2.3.2. Patienten, deren Seren auf Antikörper gegen Peptide und Topo489-573 getestet wurden.

Die Seren der genannten Patientengruppen wurden auch in Hinsicht auf das
Vorkommen von Antikörpern gegen die 45 Peptide der Topo I sowie gegen
Topo489-573 analysiert. Da aber nicht von allen Patienten eine ausreichende
Serummengende zur Verfügung stand, waren die Gruppen kleiner.

2.3.2.1 dcSSc/PSS

Patienten mit dcSSc (n=40; männlich n=17, weiblich n=24; Alter: Median 42
Jahre, Maximum 72 Jahre, Minimum: 17 Jahre):

Auch diese Patienten wurden in vier Gruppen unterteilt

1. Patienten, bei denen eine autologe Stammzelltransplantation durchgeführt
wurde (n=21; männlich n=9, weiblich n=12; Alter: Median 40 Jahre, Maximum 57
Jahre, Minimum 19 Jahre). Von diesen Patienten waren 16 vor der aHSCT in der
ID Scl 70-positiv und/oder im ELISA ATA-positiv.

2. Patienten, bei denen eine Cyclophosphamidtherapie durchgeführt wurde (n=7;
männlich n=2, weiblich n=5; Alter: Median 50 Jahre, Maximum 64 Jahre,
Minimum 29 Jahre).

3. Patienten, bei denen weder eine Cyclophosphamidtherapie, noch eine aHSCT
durchgeführt wurde (n=8; männlich n=1, weiblich n=7; Alter: Median 42 Jahre
Maximum 72 Jahre, Minimum 17 Jahre).

4. Patienten, bei denen eine bioptisch gesicherte Herzbeteiligung bestand (n=11;
männlich n=10, weiblich n=1; Alter: Median 46 Jahre, Maximum 57 Jahre,
Minimum 19 Jahre). Von diesen Patienten sind 7 in der Gruppe der autolog

transplantierten enthalten.

Patienten der drei erstgenannten Gruppen wurden im zeitlichen Verlauf zu folgenden Zeitpunkten (Z) analysiert:

Z0: vor Therapie, Z1: bis 9 Monate nach Therapie, Z2: 9 bis 18 Monate nach Therapie, Z3: mehr als 24 Monate nach Therapie.

2.3.2.2 Kontrollgruppen

Ferner wurden untersucht:

1. Seren gesunder Probanden (n=11; männlich n=3, weiblich n=8; Alter: Median 51 Jahre, Maximum 63 Jahre, Minimum 21 Jahre), freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Dr. D. Wernet (Institut für Transfusionsmedizin, Tübingen)
2. Seren von Patienten mit lcSSc/CREST-Syndrom (n=7; männlich n=0, weiblich n=7; Alter: Median 52 Jahre, Maximum 67 Jahre, Minimum 34 Jahre).
3. Seren von Patienten mit M. Sjögren (n=6; männlich n=0, weiblich n=6; Alter: Median 46,5 Jahre, Maximum 67 Jahre, Minimum 28 Jahre).

2.3.3. Klinische Daten von Patienten, bei denen eine aHSCT durchgeführt wurde

Wie unter 2.3.1.1. aufgeführt, schlossen wir in unsere Studie 24 Patienten ein, bei denen eine aHSCT durchgeführt wurde. Diese gehörten zu einer Gruppe von 26 Patienten, die im Rahmen eines Therapieversuchs eine Stammzelltransplantation erhalten hatten.[165] Von zwei dieser 26 Patienten waren keine Serumproben mehr verfügbar. Detaillierte klinische Daten der eingeschlossenen 24 Patienten sind in Tabelle 2-3 aufgeführt.

Tab. 2-3 Klinische Daten von 24 Patienten mit SSc, die mit aHSCT behandelt wurden und in der Studie[165] publiziert wurden.

Pat.-Nr.	Geschlecht	Alter bei aHSCT	Ansprechen nach aHSCT	anti-Scl 70 (ID)	ATA (ELISA)	Andere Antikörper
1	m	41	Kein Ansprechen	neg	neg	neg
2	m	57	Ansprechen mit Rückfall	pos	pos	neg
3	f	25	Gutes Ansprechen	pos	pos	neg
4	f	43	Kein Ansprechen	neg	pos	neg
5	f	27	Ansprechen mit Rückfall	pos	pos	neg
6	m	43	Gutes Ansprechen	neg	neg	NOR pos
7	f	32	Gutes Ansprechen	neg	pos	AFA
8	f	29	Gutes Ansprechen	neg	neg	AFA
9	m	35	Ansprechen mit Rückfall	pos	pos	neg
10	f	30	Gutes Ansprechen	neg	pos	AFA
11	m	23	Ansprechen mit Rückfall	neg	pos	neg
12	f	46	Gutes Ansprechen	neg	neg	ANA
13	m	43	Ansprechen mit Rückfall	neg	pos	AFA
14	f	29	Gutes Ansprechen	pos	pos	neg

15	m	57	Kein Ansprechen	neg	pos	neg
16	f	19	Gutes Ansprechen	neg	pos	neg
17	m	54	Ansprechen mit Rückfall	pos	neg	AFA
18	f	42	Ansprechen mit Rückfall	neg	pos	neg
19	f	44	Gutes Ansprechen	neg	neg	neg
20	f	45	Gutes Ansprechen	neg	pos	neg
21	f	37	Gutes Ansprechen	pos	neg	neg
22	m	42	Gutes Ansprechen	Pos	neg	neg
23	f	48	Kein Ansprechen	neg	pos	neg
24	f	41	Gutes Ansprechen	neg	neg	AFA

f = weiblich, m = männlich, neg = negativ, pos = positiv, NOR = Nukleolus Organisierende Region, AFA = Anti-Fibrillar-Antikörper, ANA = Antinukleäre Antikörper

Die ursprünglich gestellte Diagnose der PSS war bei diesen Patienten anhand der Klassifikationskriterien für Systemische Sklerose von 2013[24] reevaluiert worden. Klinische und serologische Daten, Behandlung inklusive dem nicht-myeloablativen Transplantationsregime sowie Verlaufsparemeter wurden kürzlich beschrieben[165]. Alle Patienten zeigten entsprechend der Einschlusskriterien entweder ein inadäquates Ansprechen auf Cyclophosphamid oder eine „rapidly progressive disease“ mit schlechten prognostischen Indikatoren. Hauptausschlusskriterien stellten ein Karnofsky-Index von unter 70%, pulmonalerterielle Hypertonie mit einem systolischen pulmonalerteriellen Druck von über 50 mmHg sowie ein DLCO von unter 40% dar.

2.3.3.1 Transplantationsregime

Das Transplantationsregime bestand aus der Stammzellmobilisation mit Cyclophosphamid (2x2 g/m²) sowie G-CSF (10 µg/kg/Tag), gefolgt von der Leukapherese und CD34-Selektion des autologen Transplantats. Die Konditionierung erfolgte mit Cyclophosphamid (4 x 50 mg/kg KG) sowie Kaninchen-ATG (4 x 10 mg/kg KG).

Als Ansprechen auf die Behandlung wurde eine Besserung des mRSS um 25 % nach 6 oder 12 Monaten definiert, wohingegen ein Rückfall als jede Verschlechterung des mRSS oder Abnahme des DLCO mit neuen milchglasartigen Verschattungen in der CT-Morphologie der Lunge nach Transplantation definiert wurde. Insgesamt fand sich ein Ansprechen in 91% der Patienten nach 12 Monaten und während der Nachsorge (im Median 4,4 Jahre) sieben Rückfälle[165].

2.3.3.2 Autoantikörper-Profil

Alle Patienten wurden hinsichtlich SSc-assoziiertes AAb untersucht, d.h. für Anti-Sc1 70 mit Immundiffusion (ID), für ATA mit ELISA und für AAb gegen Zentromere (ACA), Nucleoli (Anti-Fibrillarin-AAb [AFA]) und gegen die Nucleolus organizing Region (NOR) mit Immunfluoreszenztest (IFT) in Zellkulturen. Von den 24 Patienten waren 18 für ATA/Sc170 in der ID und/oder ELISA positiv. Einer der sechs Sc170/ATA negativen Patienten hatte ANA mit einem homogenen Muster, mit fehlender Reaktion gegen sämtliche Subspezifitäten der extrahierbaren nukleären Antigene (ENA), zwei hatten AAb gegen Nucleoli (AFA), einer gegen NOR und zwei waren vollkommen ANA-negativ im IFT.

2.3.3.3 Klinisches Ansprechen

Die Patienten wurden entsprechend des klinischen Verlaufes nach aHSCT in drei Gruppen eingeteilt: Gruppe 1: Gutes Ansprechen und kein Rezidiv (n=13). Gruppe 2: Initiales Ansprechen aber Rezidiv oder primäres Nichtansprechen auf die Therapie (n=11).

Von diesen Patienten wurden insgesamt 117 Seren analysiert. Von 23 Patienten waren Seren von vor der Transplantation verfügbar (Zeitpunkt 0) von 18 Patienten innerhalb 1-4 (Zeitpunkt 1), von 18 Patienten innerhalb 5-9 (Zeitpunkt 2), von 18 innerhalb 10-17 (Zeitpunkt 3), von 13 innerhalb 18-24 (Zeitpunkt 4) und von 8 nach mehr als 24 Monaten nach aHSCT (Zeitpunkt 5).

2.4. Statistik

Für die statistischen Analysen nutzten wir SPSS Statistics Version 22.0 und Microsoft Excel 2013. Für den Vergleich von Prävalenzen wurde der χ^2 -Test mit Microsoft Excel 2013 sowie mit der frei zugänglichen Maske <http://www.daten-consult.de/forms/cht2x2.html> durchgeführt. Die übrigen Analysen wurden mit SPSS Statistics durchgeführt. Unabhängige Reaktivitätswerte wurden mittels Mann-Whitney-U-(MWU-)Test analysiert, verbundene Reaktivitätswerte mittels Wilcoxon Signed Rank-Test. Korrelationen wurden mit dem Korrelationskoeffizienten r nach Pearson, dem sich daraus berechnenden Bestimmtheitsmaß R^2 sowie dem Rangkorrelationskoeffizienten Rho nach Spearman berechnet.

Die Boxplot- und Liniendiagramme sowie die Balkendiagramme in Abschnitt 3.4.3 wurden mit SPSS Statistics erstellt. Die Balkendiagramme und Streudiagramme in Abschnitt 3.6 wurden mit Microsoft Excel 2013 erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Häufigkeit und Reaktivität von Anti-Topo I-Antikörpern bei Patienten mit dcSSc und anderen Erkrankungen

3.1.1. Häufigkeit von Anti-Topoisomerase I-Antikörpern

Wie in Tabelle 3-1 dargestellt, wiesen die Anti-Topo-FL und -Tr-Antikörper vom IgG-Typ eine hohe Spezifität für die dcSSc auf; 71 bzw. 75% der 56 Patienten waren positiv. Bei Patienten mit anderen Erkrankungen und bei gesunden Probanden waren sie in maximal 12% der Fälle vorhanden. Die Sensitivität und Spezifität von IgM-Antikörpern war bei Häufigkeiten von 51,8 bzw 42,9% im dcSSc-Kollektiv und bis zu 21% bei anderen Erkrankungen deutlich geringer.

Tab. 3-1 Häufigkeiten von IgG- und IgM-AAb gegen Topo I FL und Tr in verschiedenen Kollektiven

Alle Patienten			Topo FL		Topo Tr	
			IgG	IgM	IgG	IgM
		Anzahl getestet	Positiv [%]			
dcSSc		56*	71	52	75	43
	Herzbeteiligung	16	56	44	56	38
IcSSc/CREST		24	8	17	8	21
Kollagenosen (SjS/M. Sharp)		42	7	14	12	10
Gesunde		20	5	5	10	5

* insgesamt 58 Patienten mit dcSSc getestet, von 2 Patienten war das erste Serum erst nach Therapiebeginn verfügbar, daher hier nicht eingeflossen. Topo = Topoisomerase I, Tr = truncated, FL = full length, IcSSc = limitiert kutane systemische Sklerose, dcSSc = diffus kutane systemische Sklerose, SjS = Sjögren Syndrom.

Mit diesen dichotomen Daten wurde ein χ^2 -Vier-Felder-Test durchgeführt, um die Nullhypothese, dass die AAb-Positivität von der Zuordnung zu den verschiedenen Patienten- bzw. Kontrollkollektiven unabhängig ist, zu überprüfen (Tab 3-2).

Tab. 3-2 Vergleich der Häufigkeit der Anti-Topo-Antikörper bei Patienten mit dcSSc und anderen Erkrankungen und Angabe der Signifikanzen errechnet mit dem χ^2 -Test. ()

Anti- gen	Grup- pe	Vergleichs- gruppe	Zweisei- tige Signifi- kanz	χ^2 - Wert	FG	Ergebnis	AAb
Topo FL	dcSSc	Gesunde	< 0.001	26,175	1	Hochsignifi- kant	IgG
		Kollagenosen	< 0.001	40,277	1	Hochsignif- ikant	
		IcSSc/CREST	< 0.001	26,819	1	Hochsignifi- kant	
		Herzbeteili- gung	0,251	1,319	1	nicht signifikant	
Topo Tr	dcSSc	Gesunde	< 0.001	25,542	1	Hochsignifi- kant	IgG
		Kollagenosen	< 0.001	38,281	1	Hochsignifi- kant	
		IcSSc/CREST	< 0.001	30,168	1	Hochsignifi- kant	
		Herzbeteili- gung	0,146	2,118	1	Nicht verwertbar*)	
Topo FL	dcSSc	Gesunde	< 0.001	13,501	1	Hochsignifi- kant	IgM

		Kollagenosen	< 0.001	14,7	1	Hochsignifikant	
		lcSSc/CREST	0,003	8,55	1	sehr signifikant	
		Herzbeteiligung	0,571	0,321	1	nicht signifikant	
Topo Tr	dcSSc	Gesunde	0,002	9,568	1	sehr signifikant	IgM
		Kollagenosen	< 0.001	13,067	1	Hochsignifikant	
		lcSSc/CREST	0,06	3,526	1	nicht signifikant	
		Herzbeteiligung	0,701	0,147	1	nicht signifikant	

**zu geringe erwartete Häufigkeit in der Vier-Felder-Tafel. Topo = Topoisomerase I, Tr = truncated, FL = full length, lcSSc = limitiert kutane systemische Sklerose, dcSSc = diffus kutane systemische Sklerose, FG= Freiheitsgrade, AAb = Autoantikörper.*

Wie zu erwarten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit von ATA (sowohl gegen Topo FL als auch Topo Tr) bei Patienten mit dcSSc und ihrer Subgruppe von Patienten mit Herzbeteiligung. In den anderen Patientengruppen waren insbesondere IgG-ATA signifikant seltener nachweisbar als bei den dcSSc-Patienten.

3.1.2. Reaktivität von Anti-Topoisomerase I-Antikörpern

Wie in Abb. 3.1A-D dargestellt, wiesen die Seren von Patienten mit dcSSc und ihre Subgruppe von Patienten mit Herzbeteiligung signifikant höhere IgG- und IgM-ATA-Reaktivitäten –letztere allerdings nicht so deutlich ausgeprägt– auf als Patienten mit anderen Erkrankungen und als die gesunden Probanden.

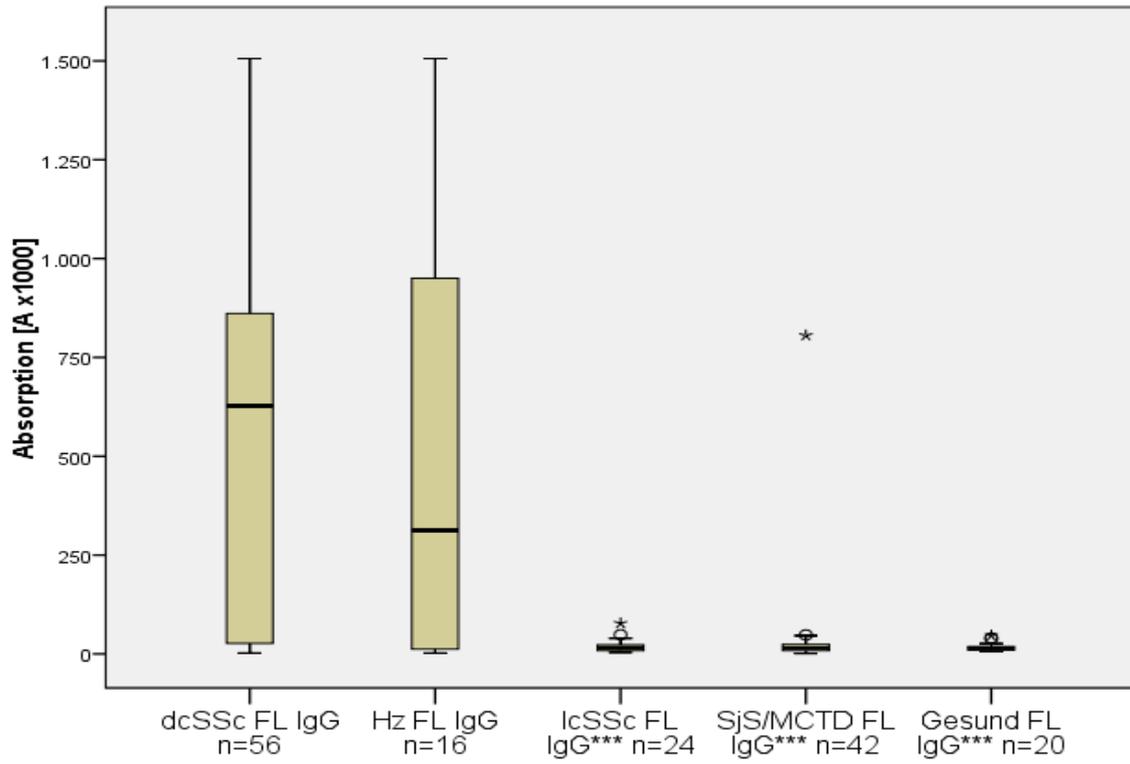


Abb. 3-1A

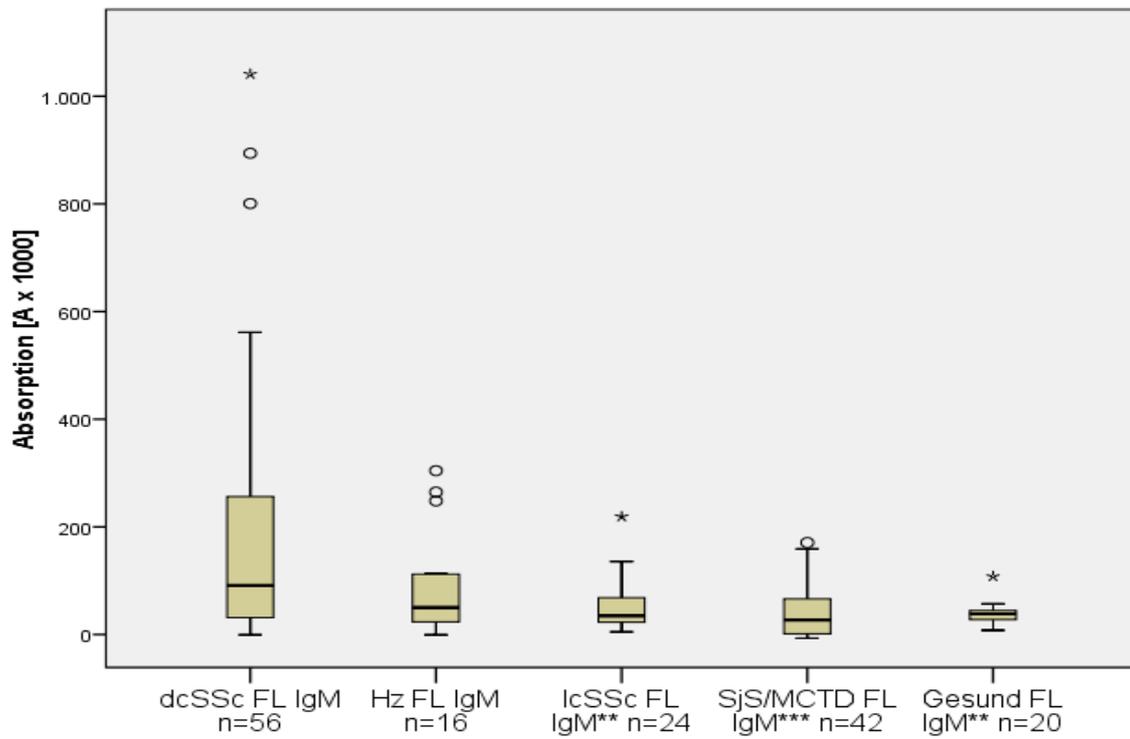


Abb. 3-1B

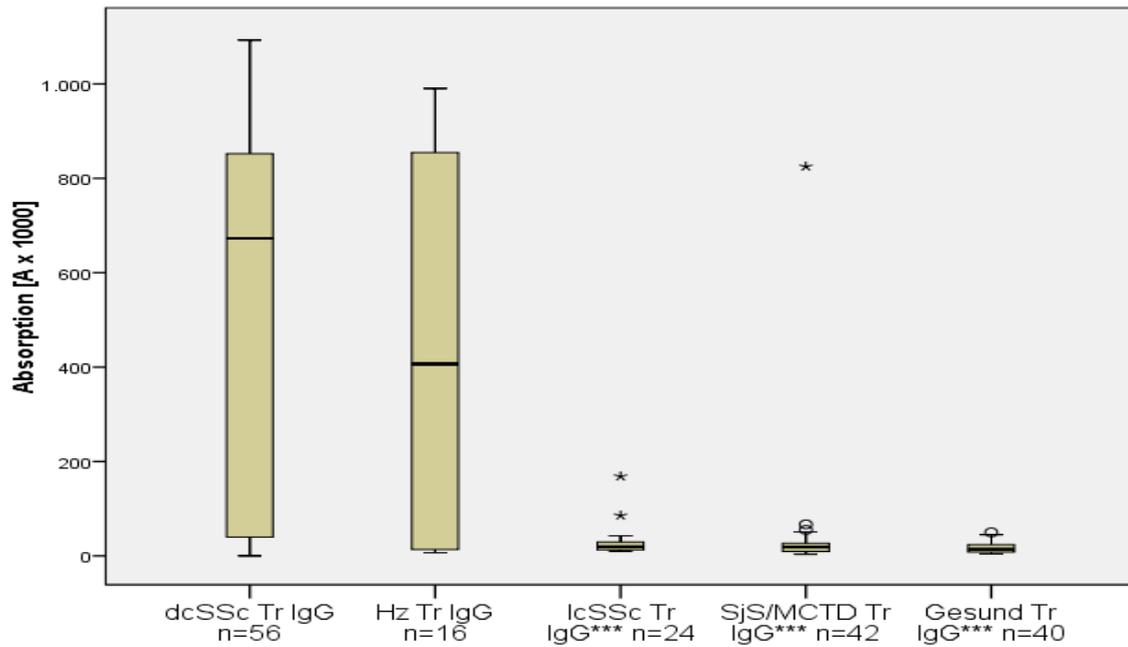


Abb. 3-1C

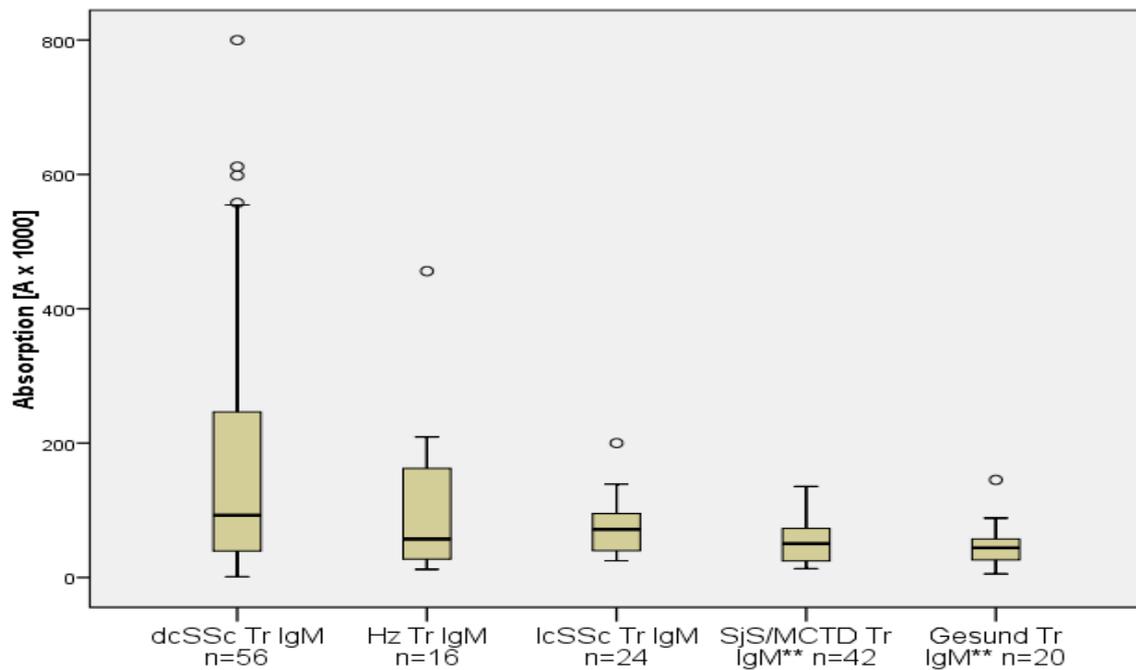


Abb. 3-1D

Abb. 3-1A-D: AAb-Reaktivität der Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen gegen Topo I im ELISA, dargestellt als Boxplot. A) IgG-AAb-Reaktivität gegenüber Topo I FL; B) IgM-AAb-Reaktivität gegenüber Topo I FL; C) IgG-AAb-Reaktivität gegenüber Topo I TR; D) IgM-AAb-Reaktivität gegenüber Topo I TR. Ausreißer (1,5- bis 3-faches der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) sind als Kreise, Extremwerte (mehr als das 3-fache der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) als Kreuze dargestellt. Querbalken stellen Median, 25%- und 75%-Perzentile, T-Balken den maximalen bzw. minimalen Wert dar, der weder Ausreißer noch Extremwert ist. (Signifikanz gegenüber dcSSc: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Hz = Herzbeteiligung, Tr = truncated, FL = full length, Topo = Topoisomerase I, SjS = Sjögren Syndrom, MCTD = Mischkollagenose, lcSSc = limitiert kutane systemische Sklerose, dcSSc = diffus kutane systemische Sklerose)

3.1.3. Synopsis

Patienten mit dcSSc mit und ohne Herzbeteiligung hatten sowohl signifikant häufiger ATA als auch signifikant höhere ATA-Titer (dies gilt sowohl für AAb gegen Topo FL als auch gegen Topo Tr) als Patienten mit anderen Erkrankungen und gesunde Probanden. Für die IgM-Antikörper waren die Unterschiede weniger stark ausgeprägt.

3.2. Verhalten der Anti-Topoisomerase I-Antikörper unter verschiedenen Therapieformen

Die dcSSc-Patienten wurden hinsichtlich der Prävalenz und Reaktivität von AAb gegen Topo FL und Topo Tr im Verlauf unter Einfluss unterschiedlicher Therapien untersucht.

3.2.1. Häufigkeit der ATA im Verlauf

Es folgte die Untersuchung der prozentualen Häufigkeiten AAb-positiver Seren unter dem Einfluss von aHSCT, CYC sowie ohne eine von beiden Therapien

3.2.1.1 Bei Patienten, bei denen eine aHSCT durchgeführt wurde

Die prozentualen Häufigkeiten IgG- und IgM-ATA-positiver Patientenserum im Verlauf nach aHSCT zu verschiedenen Zeitpunkten sind in Tab. 3-3 und 3-4 dargestellt. Nur in den ersten vier Monaten nach der Therapie nahm die Häufigkeit der IgG-ATA etwas ab, im Wesentlichen bot sich aber keine signifikante Änderung im Vergleich zum Zeitpunkt vor der aHSCT. Im Gegensatz dazu nahm die Häufigkeit der IgM-AAb nach der Therapie signifikant ab und blieb für Anti-Topo Tr auch signifikant niedriger als zum Zeitpunkt vor der aHSCT.

Tab. 3-3 Prozentuale Häufigkeit von IgG-ATA (gegen Topo FL bzw. Topo Tr) bei 24 Patienten vor aHSCT und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Therapie[#] (Signifikanzen [χ^2 -Test]: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ^x=zu geringe erwartete Häufigkeiten).

IgG-Antikörper gegen		dcSSc-Patienten					
		vor TX	1-4 Mon	5-9 Mon	10-17 Mon	18-24 Mon	> 24 Mon
		n=23 [#]	n=18	n=18	n=18	n=13	n=8
		Positiv [%]					
Topo I FL		61	50	67	72	77	75 ^x
Topo I Tr		70	50	67	72	77	75 ^x

[#]Von einem der 24 Patienten war das erste verfügbare Serum einen Monat nach aHSCT abgenommen worden. dcSSc = diffus kutane systemische Sklerose, FL = full length, Tr = truncated, Mon = Monate, TX = Therapie.

Tab. 3-4 Prozentuale Häufigkeit von IgM-ATA (gegen Topo FL bzw. Topo Tr) bei 24 Patienten vor aHSCT und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Therapie[#].

IgM-Antikörper gegen		dcSSc-Patienten					
		vor TX	1-4 Mon	5-9 Mon	10-17 Mon	18-24 Mon	> 24 Mon
		n=23 [#]	n=18	n=18	n=18	n=13	n=8
		Positiv [%]					
Topo I FL		57	11 ^{**}	11 ^{**}	50	54	13 ^x
Topo I Tr		57	6 ^{***}	6 ^{**}	22 [*]	15 ^{**}	0 ^x

[#]Von einem der 24 Patienten war das erste verfügbare Serum einen Monat nach aHSCT abgenommen worden. dcSSc = diffus kutane systemische Sklerose, FL = full length, Tr = truncated, Mon = Monate, TX = Therapie.

3.2.1.2 Bei Patienten, bei denen eine Cyclophosphamidstoßtherapie durchgeführt wurde

Die prozentualen Häufigkeiten von IgG-und-IgM-ATA vor und im Verlauf nach Cyclophosphamidstoßtherapie sind in Tab. 3-5 und 3-6 dargestellt. Die Häufigkeit der IgG-ATA wurde durch die Therapie nicht beeinflusst, während die Häufigkeit der IgM-ATA abnahm.

Diese Regredienz war allerdings nicht statistisch signifikant ($p=0,199$ bzw. $p=0,582$ nach 1-4 Monaten; $p=0,309$ bzw. $p=0,707$ nach 5-9 Monaten). Mit zunehmendem Zeitintervall nach Therapie wurde das Kollektiv zu klein, so dass eine statistische Auswertung nicht mehr möglich ist.

Tab. 3-5 Prozentuale Häufigkeit von IgG-ATA (gegen Topo FL und Tr) bei Patienten vor Cyclophosphamidgabe und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Therapie (TX= Therapie; Mon = Monate).

IgG-Antikörper gegen	dcSSc-Patienten					
	vor TX	1-4 Mon	5-9 Mon	10-17 Mon	18-24 Mon	> 24 Mon
	n=12	n=8	n=5	n=7	n=5	n=4
	Positiv [%]					
Topo FL	83	88	80	86	100	100
Topo Tr	83	88	80	86	100	75

dcSSc = diffus kutane systemische Sklerose, FL = full length, Tr = truncated, Mon = Monate, TX = Therapie.

Tab. 3-6 Prozentuale Häufigkeit von IgM-ATA (gegen Topo FL und Tr) bei Patienten vor Cyclophosphamidgabe und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Therapie.

IgM-Antikörper gegen	dcSSc-Patienten					
	vor TX	1-4 Mon	5-9 Mon	10-17 Mon	18-24 Mon	> 24 Mon
	n=12	n=8	n=5	n=7	n=5	n=4
	Positiv [%]					
Topo FL	67	38	40	57	60	25
Topo Tr	50	38	40	57	40	0

dcSSc = diffus kutane systemische Sklerose, FL = full length, Tr = truncated, Mon = Monate, TX = Therapie.

3.2.2. Reaktivität der Anti-Topoisomerase I-Antikörper im Verlauf

3.2.2.1 Bei Patienten, bei denen eine aHSCT durchgeführt wurde

Die Reaktivität der IgG-ATA (vor allem gegen Topo FL, aber auch gegen Topo Tr) nahm unter aHSCT signifikant ab, wurde aber bei keinem der Patienten vollständig negativ, auch wenn es bei einigen Seren zu einer eindrucksvollen Verminderung der AAb-Titer kam (z.B. Patienten 18 und 21) (Abb. 3-2A+B). Im Gegensatz dazu wurden die IgM-ATA –wie auch aus den Tabellen 3-3 und 3-4 hervorgeht– nach aHSCT bei nahezu allen Patienten negativ (Abb. 3-2C+D).

3.2.2.2 Bei Patienten, bei denen eine Cyclophosphamidstoßtherapie durchgeführt wurde

Wie bereits für die Häufigkeit der Antikörper gezeigt, änderte sich auch die Reaktivität der IgG- und IgM-ATA (sowohl gegen Topo FL als auch Topo Tr) unter bzw. nach einer Cyclophosphamidtherapie nicht signifikant (Abb. 3-3A-D).

Die Seren zweier Patienten (C5 u C11) zeigten eine gewisse Verminderung der Reaktivität, ein Patient (C10) entwickelte während der CYC leicht positive

Antikörpertiter gegen Topo FL, ein Patient (C9) hatte in der ersten dokumentierten Kontrolle im ELISA wie in der Immundiffusion keine ATA aufgewiesen, fünf Jahre später (kurz vor Therapiestart) waren diese aber im ELISA positiv (FL und Tr).

3.2.2.3 Bei Patienten, bei denen keine Therapie durchgeführt wurde

Keine signifikante Veränderung der Antikörperreaktivitäten im Verlauf wurden bei Patienten beobachtet, die keine immunsuppressive Therapie erhielten (Abb. 3-4A-D). Allerdings wurde ein Patient im Verlauf ATA-positiv (N3), während bei einem anderen Patienten (N12) keine ATA mehr nachweisbar waren.

3.2.3. Synopsis

Nach aHSCT nahm die Reaktivität der IgG-ATA signifikant ab, nicht jedoch die Häufigkeit. IgM-ATA zeigten sowohl eine signifikante Abnahme der Reaktivität als auch der Häufigkeit. Unter Cyclophosphamidstoßtherapie waren keine signifikanten Veränderungen zu beobachten. Gleiches galt für die Patienten, die keine immunsuppressive Therapie erhielten. In den beiden letztgenannten Patientengruppen gab es einzelne Patienten, bei denen die Antikörper positiv oder negativ wurden.

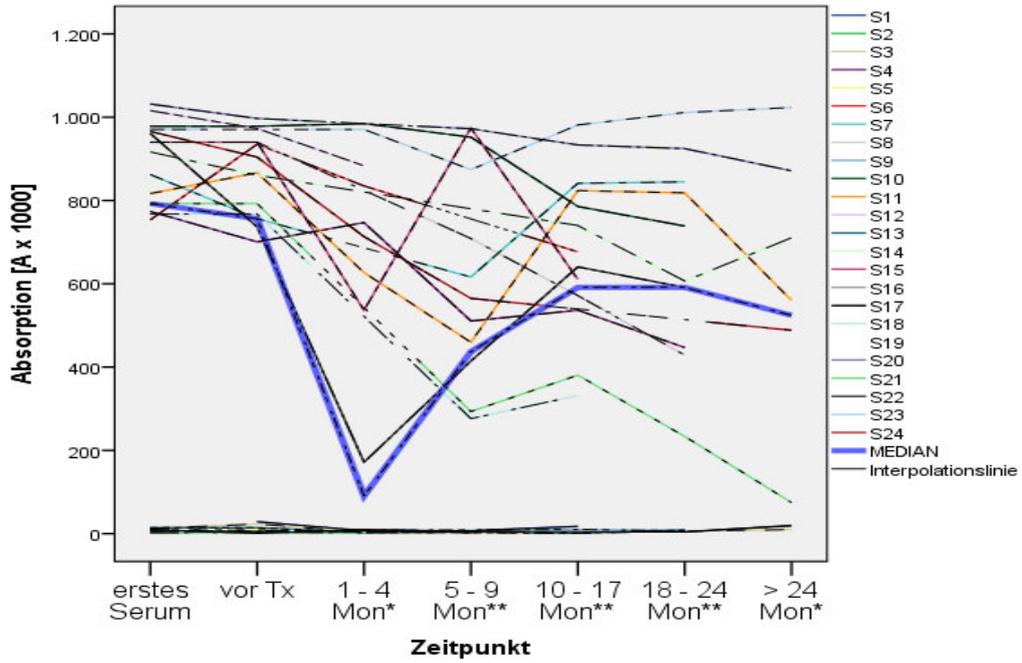


Abb. 3-2A

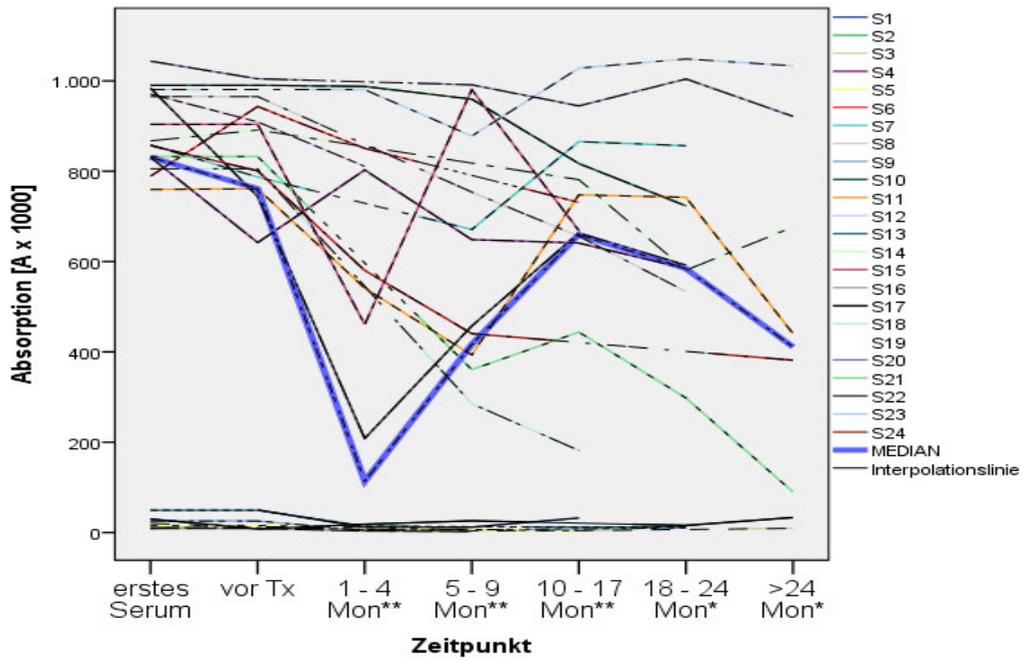


Abb. 3-2B

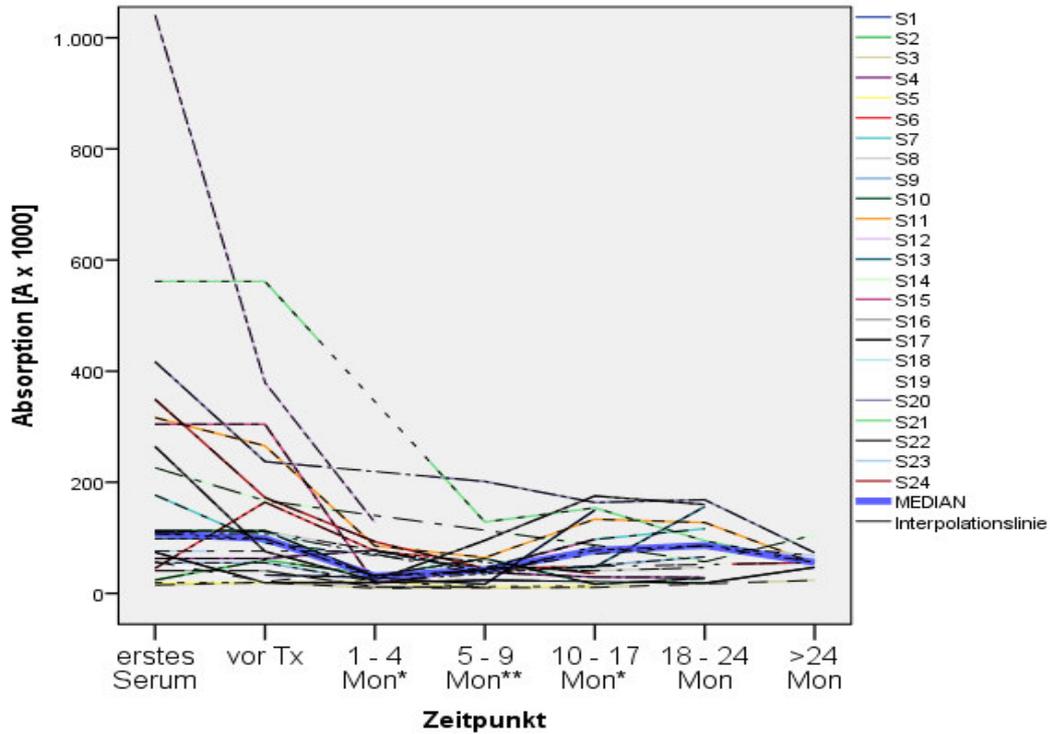


Abb. 3-2C

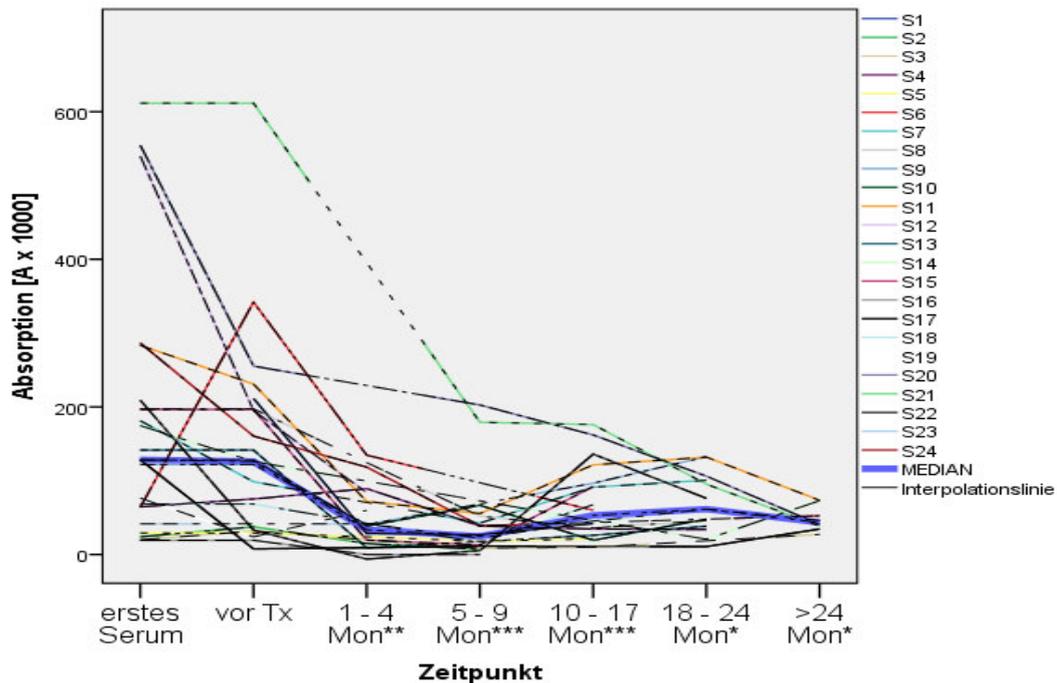


Abb. 3-2D

Abb. 3-2A-D IgG- und IgM-AAb Reaktivitäten gegen Topo FL und Topo Tr vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach aHSCT. A) IgG-AAb-Reaktivitäten gegen Topo FL, Abb. B) IgG-AAb-Reaktivitäten gegen Topo Tr, Abb. C) IgM-AAb-Reaktivitäten gegen Topo FL, Abb. D) IgM-AAb-Reaktivitäten gegen Topo Tr (Signifikanz gegenüber vor Therapie: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; S = Patient mit Stammzelltransplantation)

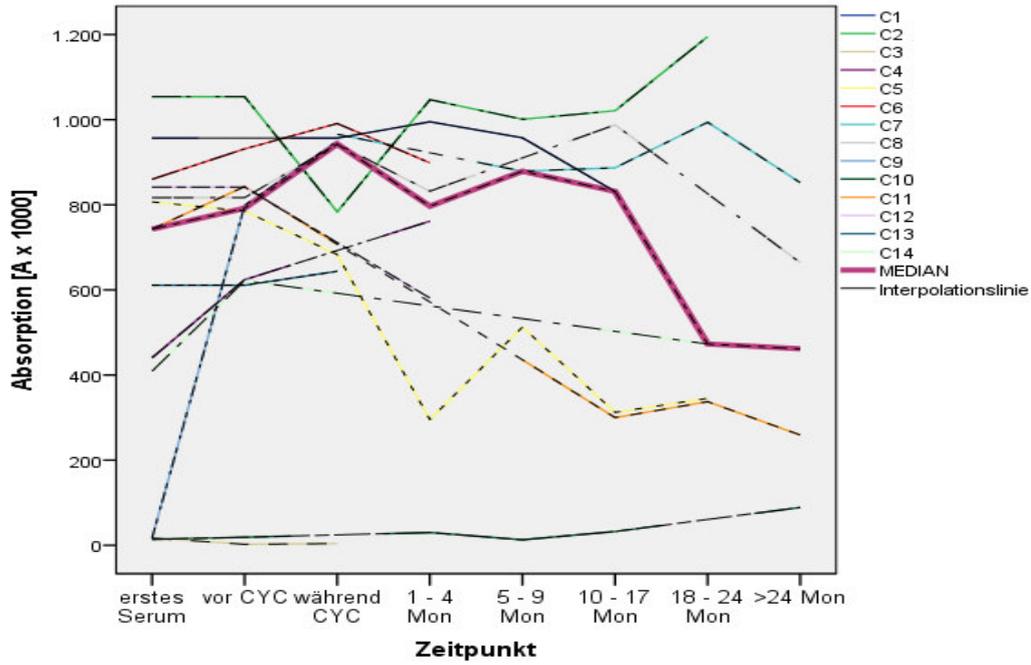


Abb. 3-3A

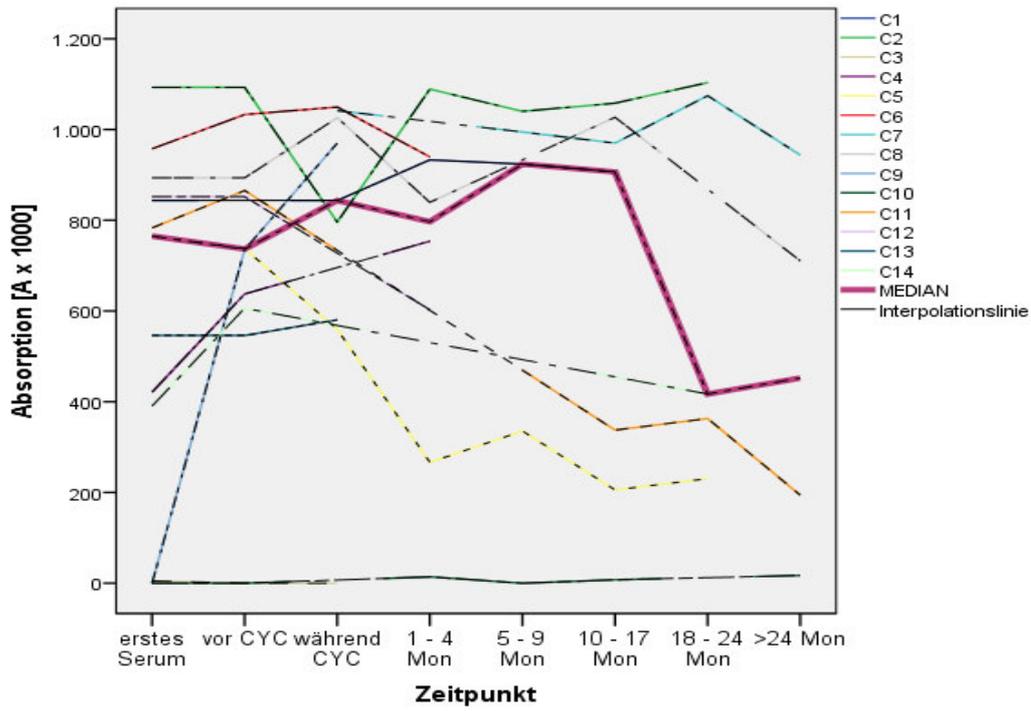


Abb. 3-3B

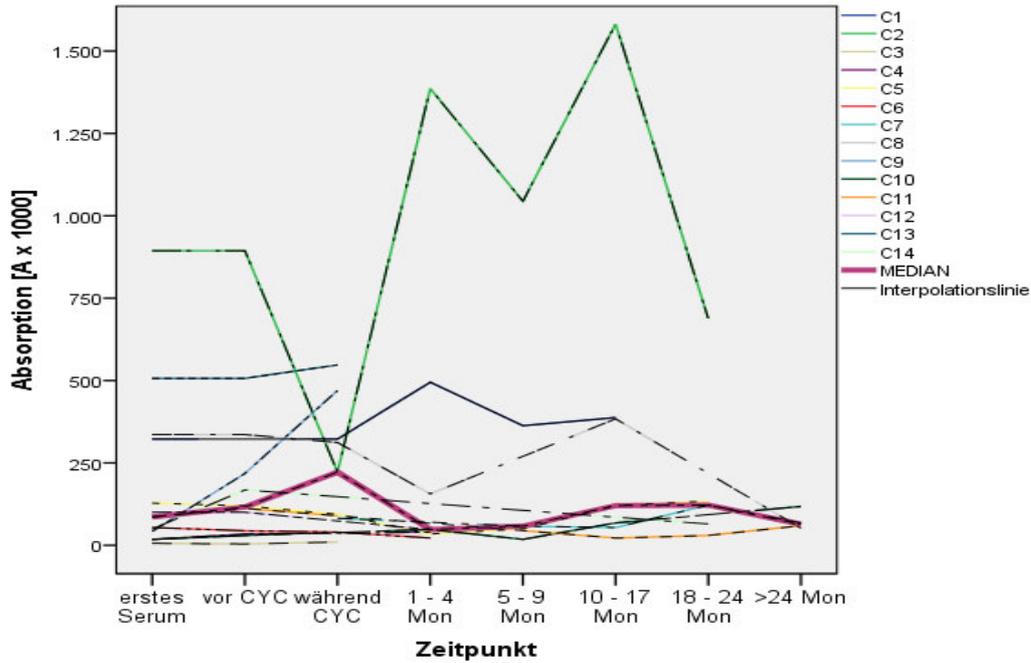


Abb. 3-3C

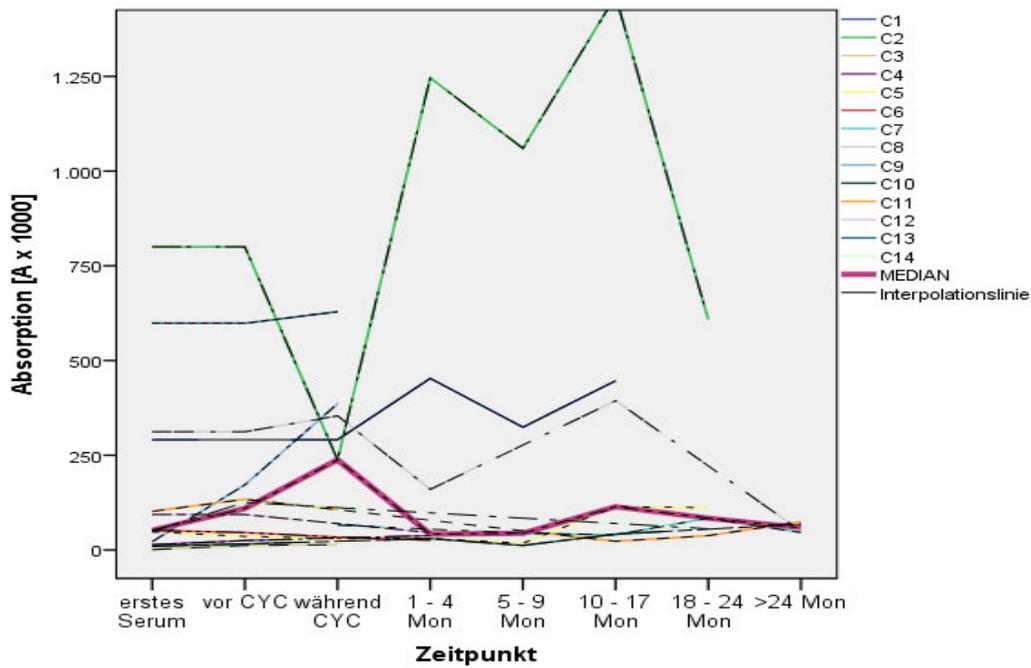


Abb. 3-3D

Abb. 3-3A-D IgG- und IgM-AAb Reaktivitäten gegen Topo FL und Tr vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Cyclophosphamidtherapie. A) IgG-AAb-Reaktivitäten gegen Topo FL, B) IgG-AAb-Reaktivitäten gegen Topo Tr, C) IgM-AAb-Reaktivitäten gegen Topo FL, D) IgM-AAb-Reaktivitäten gegen Topo Tr; Die Veränderung der Reaktivität nach Therapie im Vergleich zum Zeitpunkt vor CYC ist nicht signifikant (C= Patient mit Cyclophosphamidtherapie, CYC = Cyclophosphamidtherapie, Mon = Monate, Topo = Topoisomerase I, FL = full length, Tr = truncated)

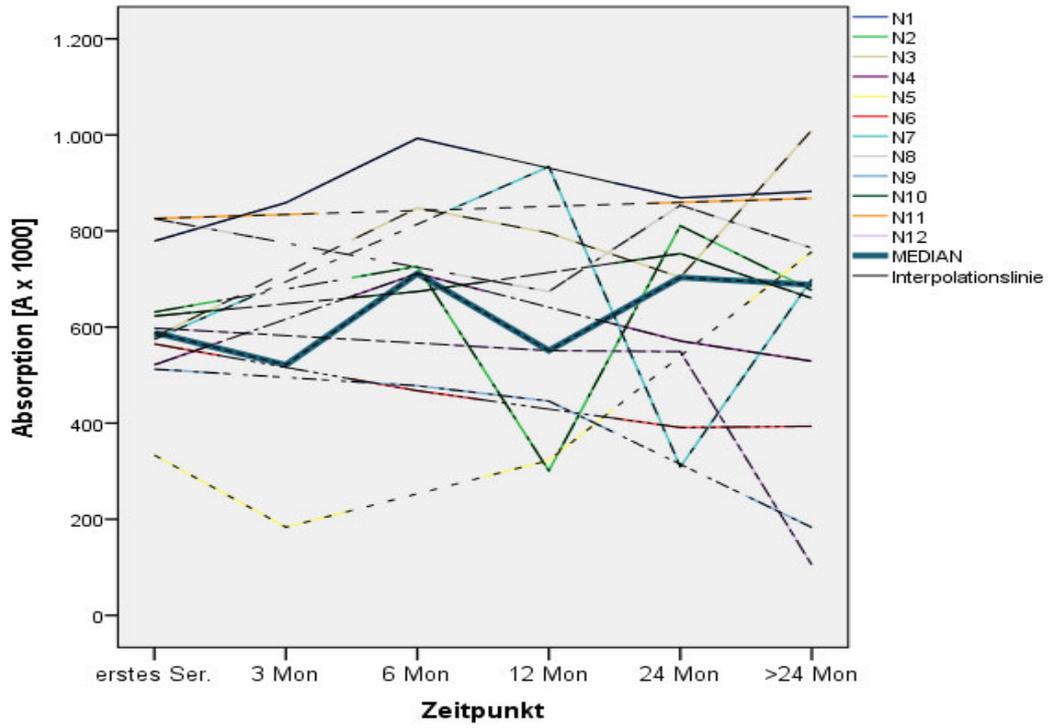


Abb. 3-4A

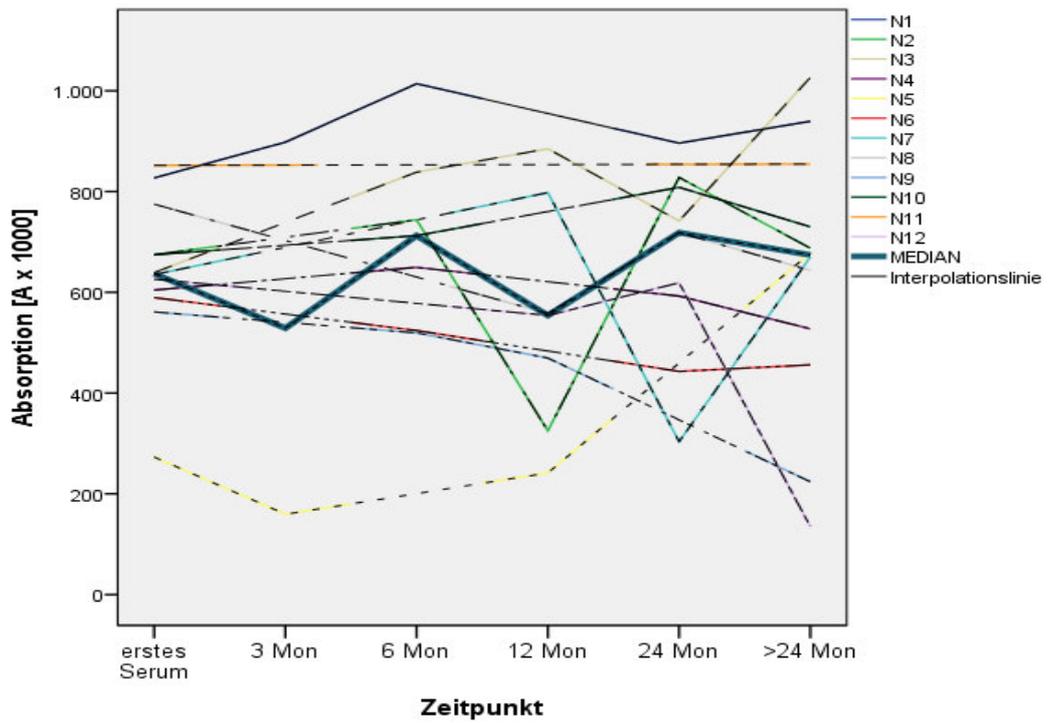


Abb. 3-4B

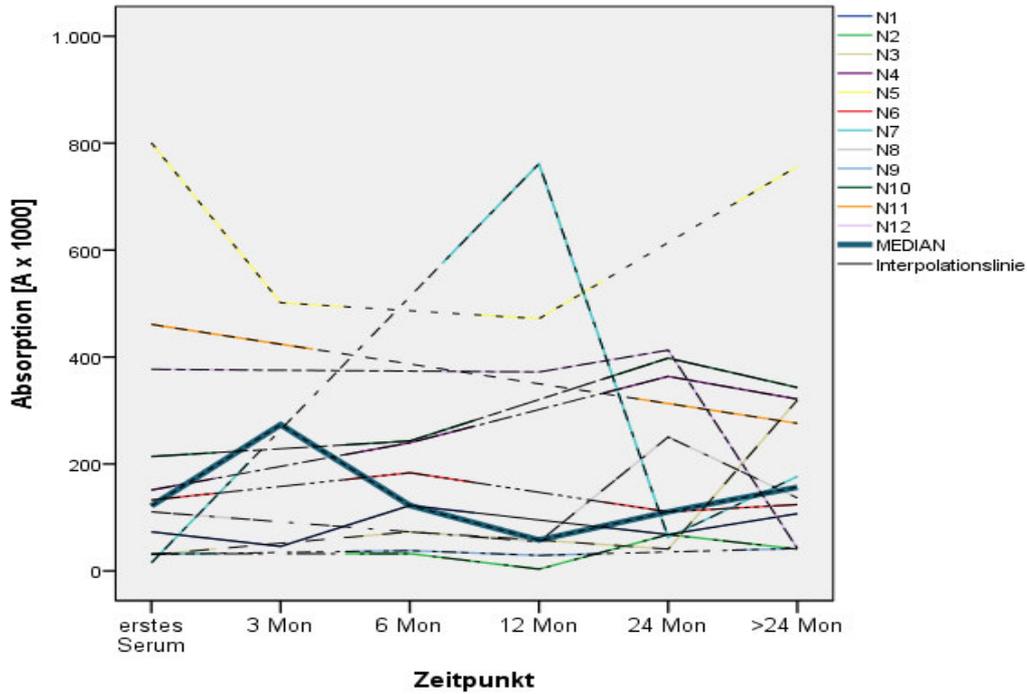


Abb. 3-4C

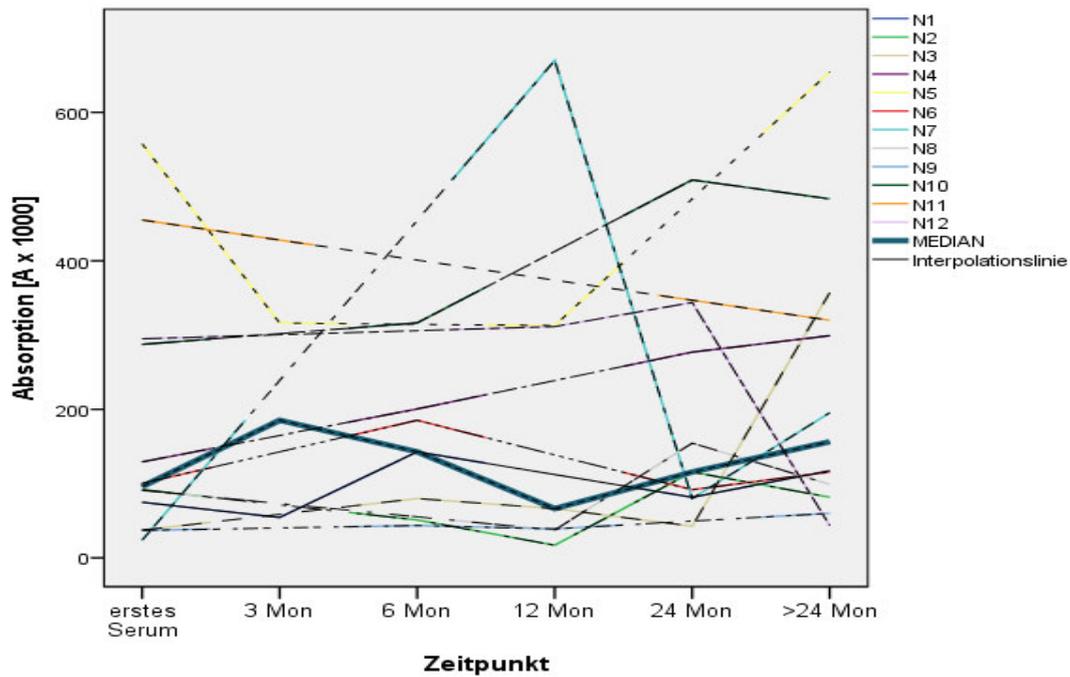


Abb. 3-4D

Abb. 3-4A-D AAb-Reaktivitäten gegen Topo FL und Topo Tr bei Patienten, bei denen keine spezifische immunsuppressive Therapie durchgeführt wurde, A) IgG-AAb-Reaktivität gegenüber Topo FL, B) IgG-AAb-Reaktivität gegenüber Topo Tr, C) IgM-AAb-Reaktivität gegenüber Topo FL; D) IgM-AAb-Reaktivität gegenüber Topo Tr. Die Veränderung der Reaktivität im Verlauf ist im Vergleich zum Zeitpunkt 0 (erstes Serum, das zur Verfügung stand) nicht signifikant (N = Patient ohne Therapie, Mon = Monate, Topo = Topoisomerase I, FL = full length, Tr = truncated).

3.3. Korrelation der Anti-Topoisomerase I-Antikörper mit dem klinischen Verlauf bei Patienten mit aHSCT

Die dcSSc-Patienten wurden hinsichtlich ihres klinischen Ansprechens in zwei Gruppen aufgeteilt. Gruppe 1: klinisch gutes Ansprechen auf HSCT ohne Rezidiv (n=13). Gruppe 2: klinisch fehlendes Ansprechen oder primäres Ansprechen mit Rezidiv (n=11). Diese wurden hinsichtlich ihrer IgG- und IgM-AAb-Häufigkeit und Reaktivität für Topo FL und Tr untersucht.

3.3.1. Vergleich der Häufigkeiten und Reaktivitäten der Kollektive vor Therapiebeginn

Die Häufigkeiten der AAb-positiven Seren vor Therapiebeginn wurden mittels χ^2 -Test verglichen, die Reaktivitäten mittels Mann-Whitney-Test.

Die Reaktivität der IgG-ATA war signifikant höher bei Patienten mit schlechterem Outcome (Gruppe 2) als bei Patienten mit gutem Ansprechen ohne Rezidiv (Gruppe 1) (Abb. 3-5). Auch die Häufigkeit der Antikörper war bei Patienten der Gruppe 2 größer als bei Patienten der Gruppe 1, der Unterschied war aber statistisch nicht signifikant (Tab. 3-7).

Für IgM-AAb ließ sich kein signifikanter Unterschied ermitteln.

Tab. 3-7 Häufigkeiten der IgG- und IgM-ATA vor aHSCT bei 23* dcSSc-Patienten in Relation zum Ansprechen auf die aHSCT

Vor aHSCT	Gutes Ansprechen		Schlechtes Ansprechen	
	IgG	IgM	IgG	IgM
Antigen	n= 13		n= 10	
	Positiv [%]			
Topo FL	46	54	80	60
Topo Tr	54	46	90	70

* von einem der 24 Patienten ist kein Serum zum Zeitpunkt vor der aHSCT vorhanden. aHSCT = autologe Stammzelltransplantation, Topo = Topoisomerase I, FL = full length, Tr = truncated.

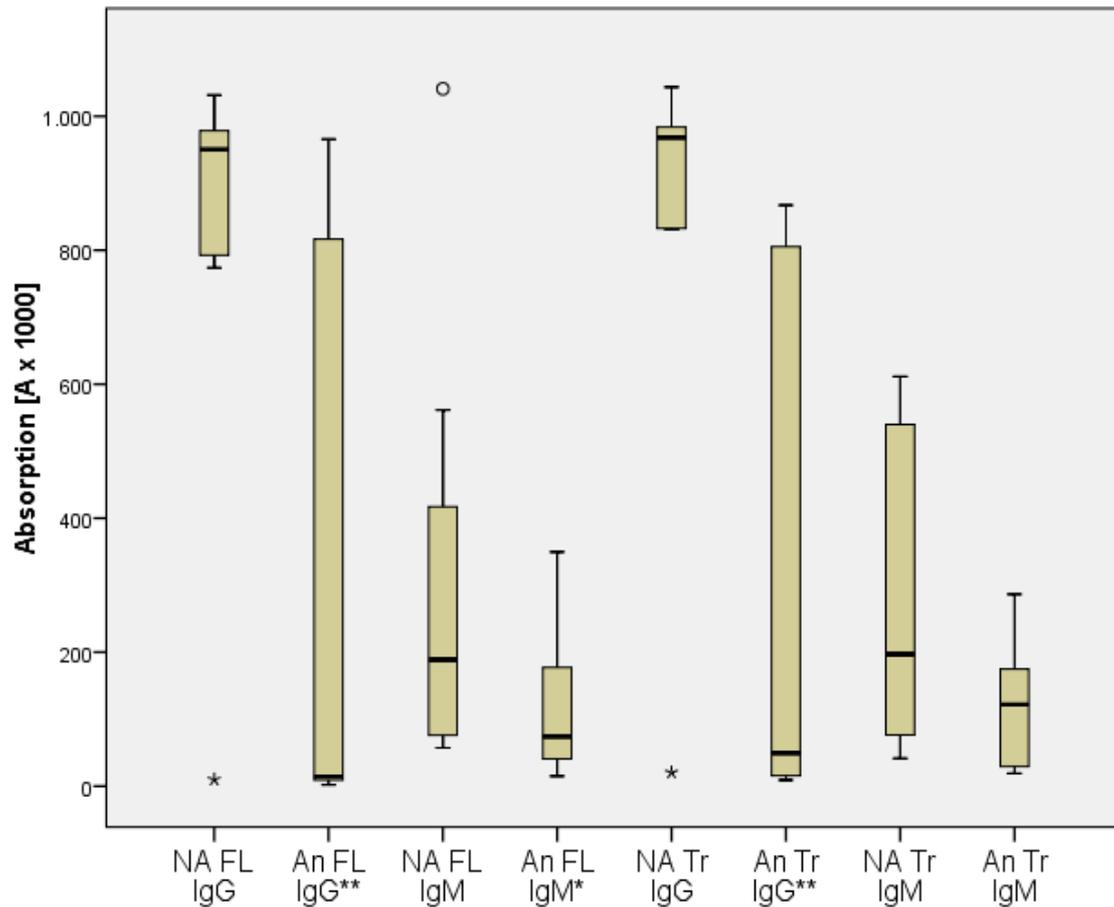


Abb. 3-5 Boxplots der IgG- und IgM-AAb-Reaktivitäten gegen Topo FL und Tr bei 23 dcSSc-Patienten, bei denen eine aHSCT durchgeführt wurde. Zeitpunkt vor Beginn der Therapie. An = Ansprechen (n=13). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, Vergleich „NA“ mit „An“ mittels Mann-Whitney-U-Test. Ausreißer (1,5- bis 3-faches der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) sind als Kreise, Extremwerte (mehr als das 3-fache der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) als Kreuze dargestellt. Querbalken stellen Median, 25%- und 75%-Perzentile, T-Balken den maximalen bzw. minimalen Wert dar, der weder Ausreißer noch Extremwert ist. FL = full length, Tr = truncated.

3.3.2. Verlauf der Anti-Topoisomerase I-Antikörper nach aHSCT in Relation zum klinischen Verlauf

3.3.2.1 Häufigkeiten der Antikörper

Wie in den Tabellen 3-8 und 3-9 dargestellt, ergaben sich weder für Patienten der Gruppe 1 mit gutem Ansprechen (Tab. 3-8), noch für Patienten der Gruppe 2 mit schlechterem Ansprechen (Tab. 3-9) signifikante Veränderungen in der Häufigkeit der IgG-ATA nach der aHSCT. Die IgM-ATA hingegen nahmen in beiden Gruppen gleichermaßen in ihrer Häufigkeit ab.

Tab. 3-8 Analyse der Häufigkeit von IgG- und IgM-ATA (Topo FL und Tr) bei dcSSc-Patienten, bei denen eine aHST durchgeführt wurde. Vergleich der prozentualen Häufigkeiten der Positivität für Topo FL und Tr bei Patienten mit **gutem klinischem Ansprechen (Gruppe 1)** vor und zu mehreren Zeitpunkten nach aHST. Signifikanz (χ^2 -Test): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Gruppengröße im Verlauf zu klein.

IgG-Antikörper gegen	dcSSc-Patienten					
	vor TX	1-4 Mon	5-9 Mon	10-17 Mon	18-24 Mon	> 24 Mon
	n=13	n=10	n=9	n=9	n=6	n=5
	Positiv [%]					
Topo FL	46	30	44	56	50	60
Topo Tr	54	30	44	56	50	60
IgM-Antikörper gegen	dcSSc -Patienten					
	vor TX	1-4 Mon	5-9 Mon	10-17 Mon	18-24 Mon	> 24 Mon
	n=13	n=10	n=9	n=9	n=6	n=5
	Positiv [%]					
Topo FL	54	20	0**	44	50	20
Topo Tr	46	20	0*	11	33	0*

Topo = Topoisomerase I, FL = full length, Tr = truncated, Mon = Monate, dcSSc = diffus kutane Systemische Sklerose

Tab. 3-9 Analyse der Häufigkeit von IgG- und IgM-ATA (Topo FL und Tr) bei dcSSc-Patienten, bei denen eine aHSCT durchgeführt wurde. Vergleich der prozentualen Häufigkeiten der Positivität für Topo FL und Tr bei Patienten mit **schlechterem klinischem Ansprechen bzw. Rezidiv (Gruppe 2)** vor und zu mehreren Zeitpunkten nach aHSCT. Zweiseitige Signifikanz (χ^2 -Test): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; wegen zu geringer erwarteter Häufigkeiten allerdings nicht verwertbar.

IgG-Antikörper gegen	dcSSc-Patienten					
	vor TX	1-4 Mon	5-9 Mon	10-17 Mon	18-24 Mon	> 24 Mon
	n=10	n=8	n=9	n=9	n=7	n=3
	(%) positiv					
Topo FL	80	75	89	89	100	100
Topo Tr	90	75	89	89	100	100
IgM-Antikörper gegen	dcSSc -Patienten					
	vor TX	1-4 Mon	5-9 Mon	10-17 Mon	18-24 Mon	> 24 Mon
	n=10	n=8	n=9	n=9	n=7	n=3
	(%) positiv					
Topo FL	60	13*	33	56	57	0**
Topo Tr	70	0**	22*	33	0**	0**

Topo = Topoisomerase I, FL = full length, Tr = truncated, Mon = Monate, dcSSc = diffus kutane Systemische Sklerose

3.3.2.2 Reaktivität der Antikörper

Um die Reaktivitäten der Patientenserum im Verlauf unter dem Einfluss der aHSCT im Kollektiv mit gutem Ansprechen mit jenen im Kollektiv mit schlechtem Outcome zu vergleichen, wurde jeweils der Wilcoxon-Signed-Rank-Test gewählt.

Die IgG-ATA-Serum-Reaktivitäten der Patienten mit **gutem Ansprechen** (Gruppe 1) fallen im Zeitraum von ein bis neun Monaten nach aHSCT signifikant ab (Abb. 3-6A+B). In der Folge besteht jedoch kein signifikanter Unterschied zum Ausgangsniveau mehr. Kein Serum wird negativ. Interessanterweise zeigt der Median bei im Verlauf geringer werdender Gruppengröße jeweils ein Ansteigen. Die IgM-ATA-Serum-Reaktivitäten der Patienten mit gutem Ansprechen sind im Zeitraum von ein bis 17 Monaten nach aHSCT signifikant niedriger als vorher. In der Folge nehmen die Reaktivitäten wieder zu. Sie bleiben zwar niedriger als vor der Therapie, es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied zum Ausgangsniveau mehr (Abb. 3-6C+D).

Die IgG-ATA-Serum-Reaktivitäten der Gruppe 2 mit **schlechterem Outcome** fallen ebenfalls nach Therapie ab, signifikant ist diese Verminderung im Zeitraum von fünf bis 24 Monaten (Topo FL) bzw. von zehn bis 24 Monaten (Topo Tr) nach Therapie (Abb. 3-7A+B).

Für die IgM-ATA-Reaktivitäten der Gruppe mit schlechterem klinischem Outcome besteht eine signifikante Abnahme lediglich zwischen fünf und neun (Topo FL) bzw. fünf und 17 Monaten (Topo Tr) nach Therapie (Abb. 3-7C+D).

Zusammenfassend gibt es keine signifikanten Unterschiede im ATA-Verlauf nach aHSCT zwischen Patienten mit gutem und Patienten mit schlechterem Ansprechen auf die Therapie, d.h. sie können nicht als prognostischer Indikator herangezogen werden.

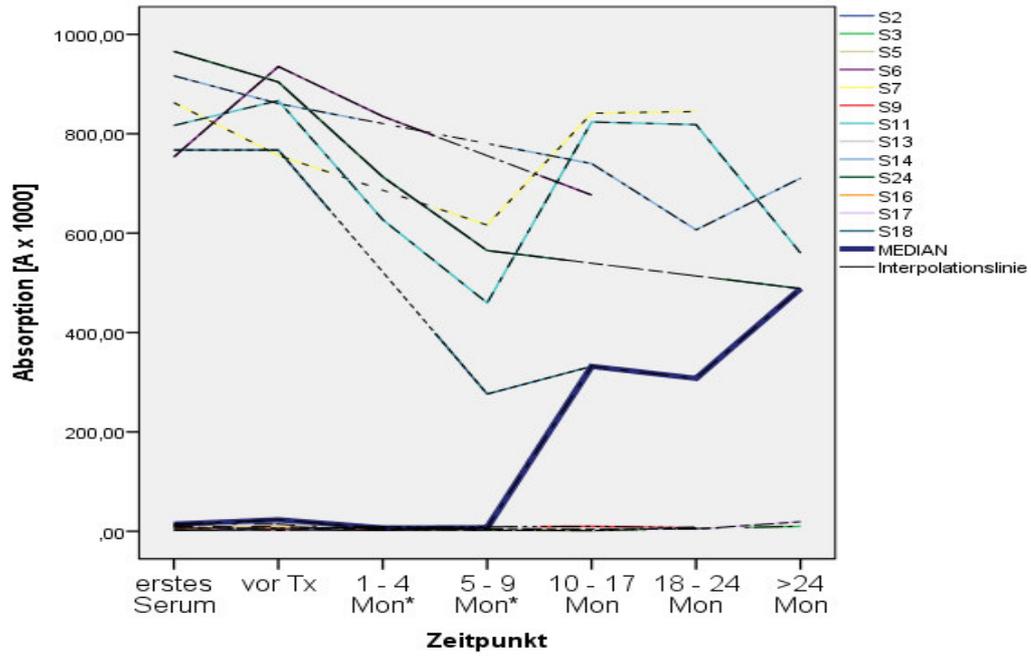


Abb. 3-6A

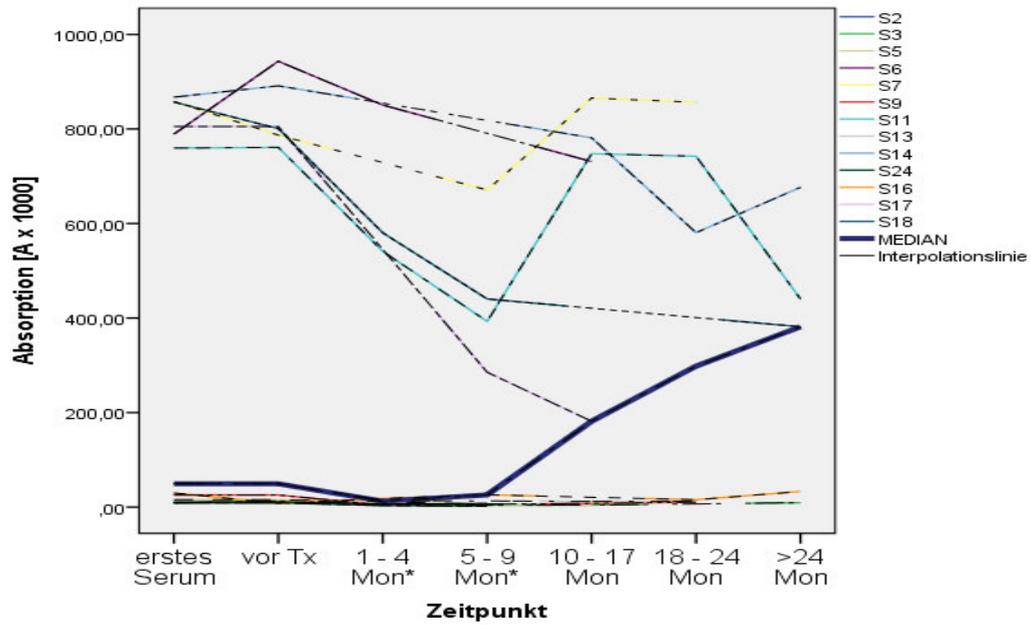


Abb. 3-6B

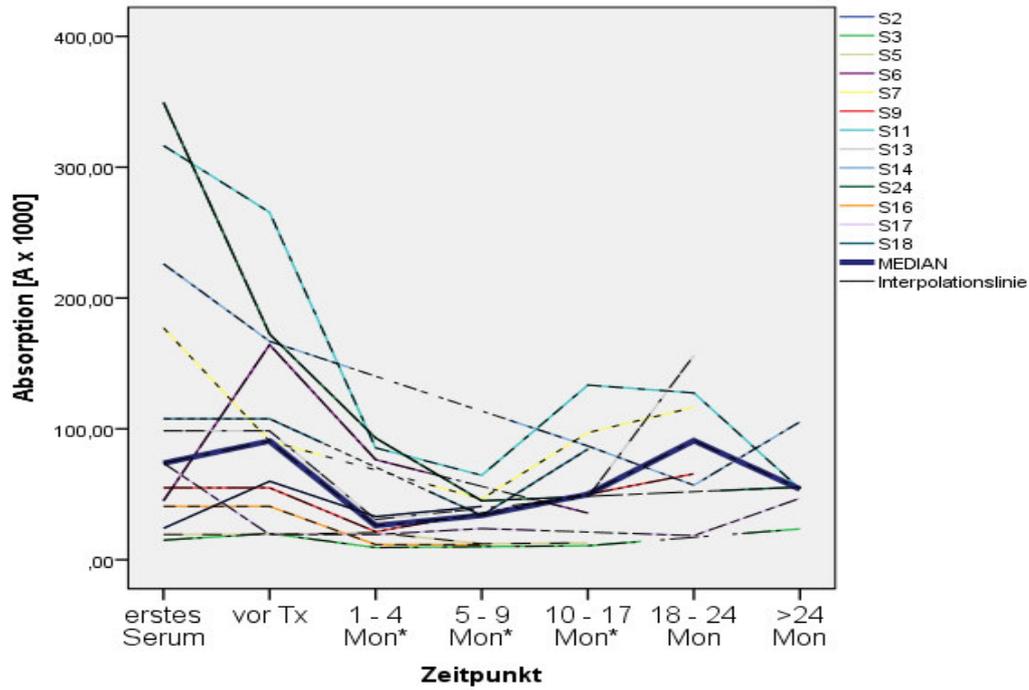


Abb. 3-6C

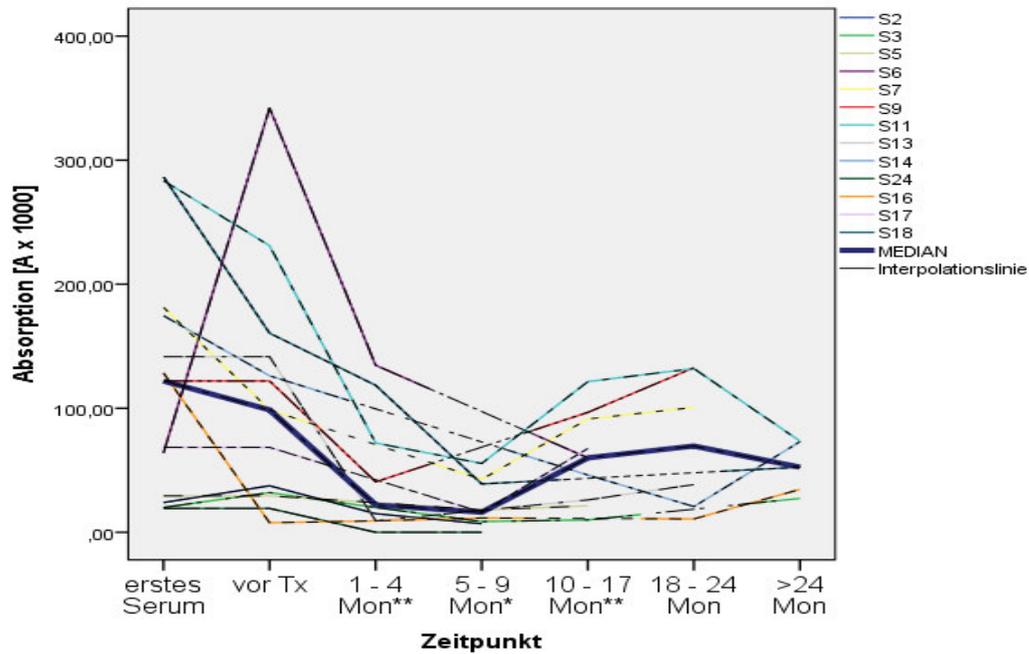


Abb. 3-6D

Abb. 3-6A-D AAb-Reaktivitäten gegenüber Topo FL und Tr vor und nach aHSCT bei Patienten mit **gutem klinischem Ansprechen** auf aHSCT (Gruppe 1). A) IgG-AAb-Reaktivität gegenüber Topo FL; B) IgG-AAb-Reaktivität gegenüber Topo Tr; C) IgM-AAb-Reaktivität gegenüber Topo FL; D) IgM-AAb-Reaktivität gegenüber Topo Tr. Reaktivitäten verglichen mit der Ausgangsreaktivität vor aHSCT, Wilcoxon-Signed-Rank-Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. S = Patienten mit Stammzelltransplantation, Mon = Monate, Tx = Therapie.

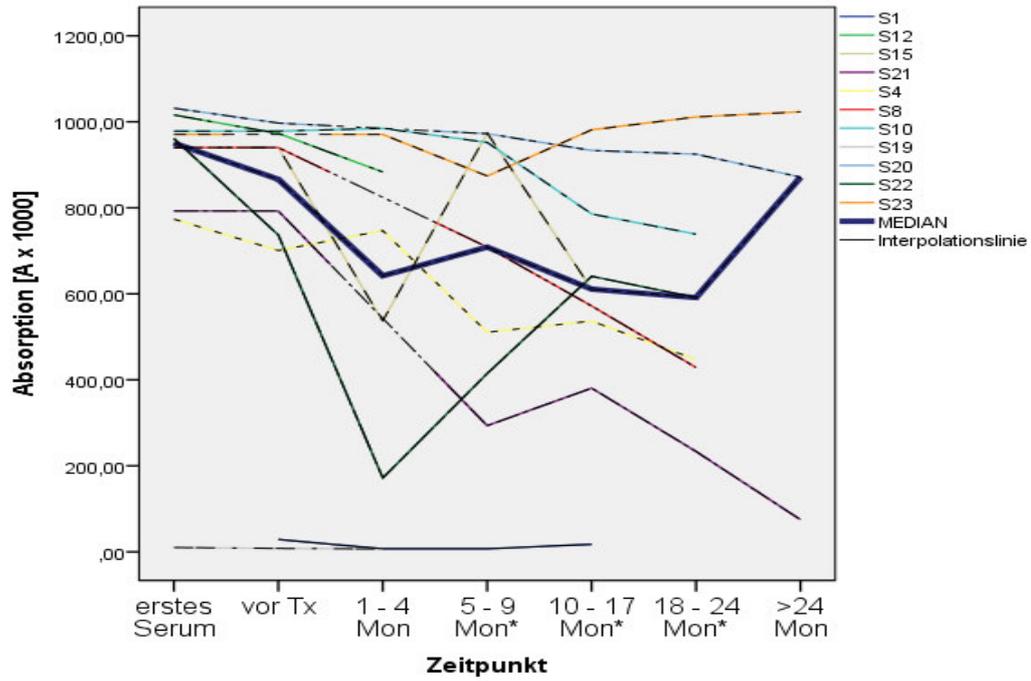


Abb. 3-7A

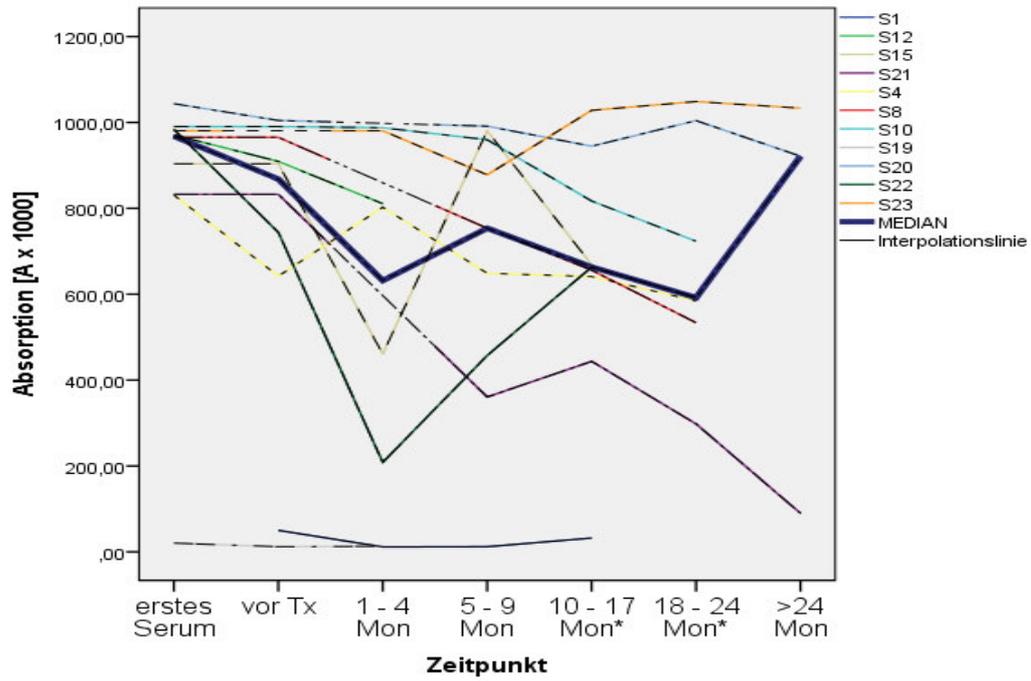


Abb. 3-7B

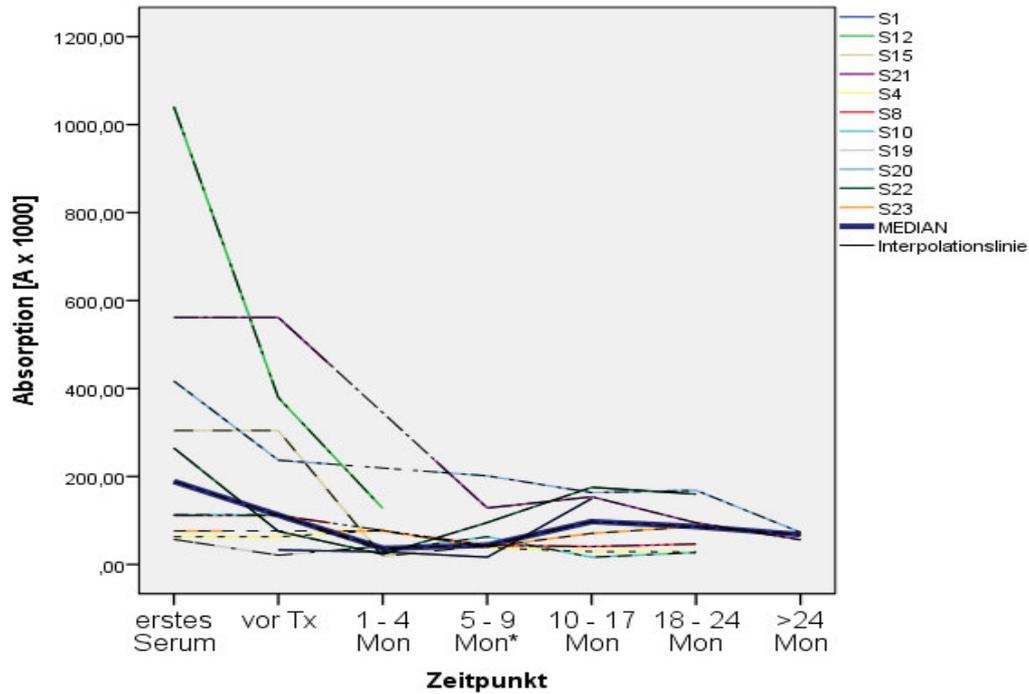


Abb. 3-7C

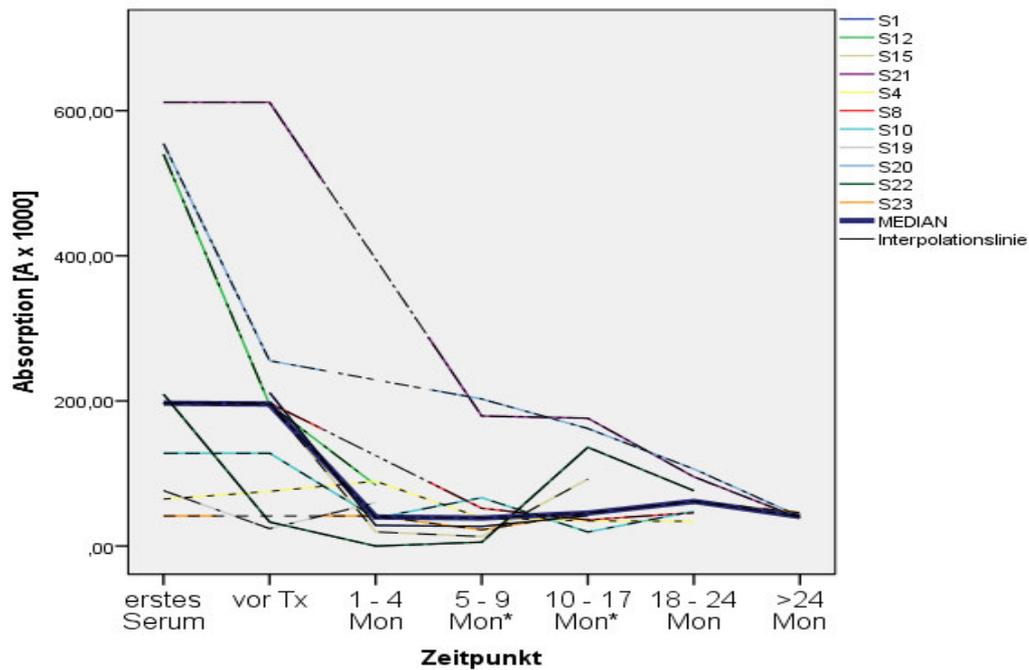


Abb. 3-7D

Abb. 3-7A-D AAb-Reaktivitäten gegenüber Topo FL und Tr vor und nach aHSCT bei Patienten mit **schlechterem klinischem Ansprechen** auf aHSCT (Gruppe 2). A) IgG-AAb-Reaktivität gegenüber Topo FL; B) IgG-AAb-Reaktivität gegenüber Topo Tr; C) IgM-AAb-Reaktivität gegenüber Topo FL; D) IgM-AAb-Reaktivität gegenüber Topo Tr. Reaktivitäten verglichen mit der Ausgangsreaktivität vor aHSCT, Wilcoxon-Signed-Rank-Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. S = Patienten mit Stammzelltransplantation, Mon = Monate, Tx = Therapie.

3.4. Nachweis von Antikörpern gegen Epitope der Topoisomerase in Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen.

Seren von ausgewählten Patienten mit dcSSc, lcSSc, SjS/MCTD sowie gesunden Probanden wurden gegen 45 Peptide der Topoisomerase I von je 25 Aminosäuren (AA) Länge mit je 8 AA Überlappung getestet. Diese wurden hinsichtlich der AAb-Prävalenz sowie hinsichtlich ihrer Reaktivität untersucht mit der Intention, mögliche immundominante Epitope nachzuweisen. Hierfür wurde die Gruppe der dcSSc-Patienten, die sich der aHSCT unterzogen, einerseits als gesamtes Kollektiv betrachtet, andererseits in zwei Gruppen geteilt: Patienten, deren Seren in ELISA oder Immundiffusion ATA/Scl 70-positiv waren, sowie solche, deren Seren in beiden Testmethoden negativ waren.

3.4.1. Häufigkeit von Anti-Peptid-Antikörpern

Die Häufigkeiten von Antikörpern gegen die verschiedenen Peptide sowie gegen das immundominante Epitop Topo489-573 bei Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen sind in den Tabellen 3-10 und 3-11 dargestellt. Seren von Patienten mit dcSSc hatten insbesondere gegen die Peptide 3, 7, 8, 15, 22, 23, 24, 29, 31, 35 IgG-Antikörper, diese Peptide wurden aber auch von Seren von Patienten mit anderen Erkrankungen erkannt. So ergab sich zwar ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit von **IgG**-Antikörpern zwischen dcSSc-Patienten und gesunden Probanden (χ^2 -Test) für die Peptide 1-8, 10, 12-16, 22-26, 29-32, 34-36, 38, 39, 41, 42, 45, zwischen dcSSc-Patienten und Patienten mit lcSSc und SjS/MCTD aber nur für die Peptide 3 ($p=0,02$; $p=0,03$) und 39 ($p=0,045$; $p=0,011$) (vorbehaltlich der Tatsache, dass der χ^2 -Test hier hinsichtlich der geringen Größe der lcSSc und SJS/MCTD-Patientengruppen in seiner Aussagekraft beschränkt ist).

Die höchste Prävalenz für Anti-Peptid-**IgM**-AAb (>60%) bei den dcSSc Patienten ergab sich für die Peptide 8, 11, 16, 23 und 32. Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Anti-Peptid-IgM-AAb fand sich zwischen dcSSc-Patienten und Gesunden bei den Peptiden 1, 7, 8, 10-14, 16, 17, 23, 24, 27, 28, 32, 35, 43, 44. Zwischen den Häufigkeiten von Anti-Peptid-IgM-Antikörpern bei dcSSc-Patienten und Patienten mit anderen Erkrankungen ergab sich kein signifikanter

Unterschied.

Interessanterweise ist die Prävalenz von AAb gegen einige Peptide bei Patienten mit lcSSc oder SjS/MCTD sogar signifikant höher als bei Patienten mit dcSSc (z.B. Peptid 9, 21, 32-34).

In einem weiteren Ansatz wurde die Häufigkeit der Anti-Peptid-Antikörper bei den Patienten mit dcSSc analysiert, bei denen eine aHSCT durchgeführt wurde; und zwar in Relation zum Nachweis von Anti-Topo I-Antikörpern. Sechzehn dieser Patienten waren Anti-Topo I/Scl 70-positiv, fünf waren negativ. In beiden Gruppen waren aber die Antikörper gegen die Peptide ähnlich verteilt. Für Anti-Peptid-IgG-Antikörper ergab sich ein signifikanter Unterschied lediglich für Peptid 5, für IgM-Antikörper für die Peptide 2, 5, 10, 11, 44. Gegen Peptid 5 wurden auch bei Patienten mit lcSSc oder SjS/MCTD keine IgG-Antikörper gefunden.

Patienten mit Herzbeteiligung hatten insgesamt weniger Anti-Peptid-Antikörper als die dcSSc-Patienten ohne Herzbeteiligung, signifikant war der Unterschied aber lediglich für die Peptide 3 und 18.

Tab. 3-10 Häufigkeiten von IgG-AAb gegen Peptide der Topoisomerase I bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen. Grau: immundominantes Epitop. Beige: IgG-Prävalenz dcSSc >60%. * p<0,05; ** p<0,01 dcSSc im Vergleich zum jeweiligen Kollektiv. (X²-Test). Gelb: höhere Prävalenz als dcSSc. + signifikant höhere Prävalenz (p<0,05, χ²-Test) für ATA/Scl 70-positive gegenüber ATA/Scl 70-negativen Patienten.

Pep-tid	AA	dcSSc (n=40)	Herz-beteili-gung (n=11)	IcSSc/CREST (n=7)	SjS/MCTD (n=6)	Ge-sun-de (n=11)	dcSSc Patienten vor aHSCt	
							ATA/Scl 70 positiv (n=16)	ATA/Scl 70 negativ (n=5)
% positiv								
1	1-25	43	27	43	67	0**	44	40
2	18-42	45	46	43	83	9*	44	20
3	35-59	63	18*	14*	17*	9**	63	60
4	52-76	53	55	71	50	9*	44	20
5	69-93	40	27	0*	0	0*	44 ⁺	0
6	86-110	58	46	29	33	0**	69 ⁺	20
7	103-127	78	73	57	83	9**	63	60
8	120-144	75	64	57	17**	0**	88	60
9	137-161	33	18	14	83	9	25	40
10	154-178	45	36	57	83	0**	63	40

11	171- 195	25	18	0	0	18	38	20
12	188- 212	35	9	14	17	0*	38	60
13	205- 229	45	27	29	67	0**	31	20
14	222- 246	28	18	29	50	0*	13	40
15	239- 263	60	36	57	33	0**	63	60
16	256- 280	38	27	43	50	0*	25	40
17	273- 297	28	27	29	83	9	19	40
18	290- 314	25	36	0	33	0	19	40
19	307- 331	40	22	27	0	9	38	60
20	324- 348	23	27	0	33	0	31	60
21	341- 365	20	9	57	50	0	6	40
22	358- 382	60	46	57	67	0**	38	60
23	375- 399	68	46	43	17*	9**	75	60
24	392- 416	75	46	43	50	0**	81	80
25	409- 433	30	9	0	17	0*	19	40
26	426- 450	50	27	57	83	9*	44	40

27	443- 467	25	11	18	17	0	25	40
28	460- 484	13	9	14	50*	0	13	20
29	477- 501	65	55	29	67	0**	75	80
30	494- 518	58	36	43	50	9**	57	60
31	511- 535	68	55	57	83	9**	63	60
32	528- 552	58	55	71	100	9**	38	40
33	545- 569	15	9	14	67	9	0	40
34	562- 586	45	36	43	100	0**	50	40
35	579- 603	63	18**	43	67	9**	56	80
36	596- 620	53	46	43	83	9*	44	40
37	613- 637	13	18	14	50*	18	6	0
38	630- 654	35	18	43	67	0*	38	40
39	647- 671	58	46	14*	0**	9**	63	40
40	664- 688	25	9	29	0	9	25	20
41	681- 705	58	64	57	100	9**	63	40
42	698- 722	40	46	43	83	0*	44	40

43	715- 739	10	0	0	0	0	6	20
44	732- 756	0	0	14	17	0	0	0
45	741- 765	45	55	43	67	0**	44 ⁺	0
Top o 489- 573	489- 573	70	46	57	83	9**	69	60
MB P		20	9	0	50	9	19	40

AA = Aminosäure, ATA = Anti-Topoisomerase I-Autoantikörper, dcSSc = diffus kutane Systemische Sklerose, lcSSc = limitiert kutane Systemische Sklerose, Topo I = Topoisomerase I, SjS = Sjögren Syndrom, MCTD = Mischkollagenose, MBP = Mannose-binding Protein.

Tab. 3-11 Häufigkeit von IgM-AAb gegen Peptide der Topoisomerase I bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen. Grau: immundominantes Epitop. Beige: IgM-Prävalenz dcSSc >60%. * p<0,05; ** p<0,01, dcSSc im Vergleich zum jeweiligen Kollektiv (X²-Test). + signifikant höhere Prävalenz (p<0,05, X²-Test) für ATA/Scl 70-positive gegenüber ATA/Scl 70-negativen Patienten.

Pep- tid	AA	dcSSc (n=40)	Herz- betei- ligung (n=11)	IcSSc/ CREST (n=7)	SjS/ MCTD (n=6)	Ge- sun- de (n=11)	dcSSc Patienten vor aHSCt	
							ATA/ Scl 70 positiv (n=16)	ATA/ Scl 70 negativ (n=5)
% positiv								
1	1-25	40	27	43	17	0*	25	20
2	18- 42	30	18	57	33	9	31+	0
3	35- 59	45	18	57	0*	18	56	40
4	52- 76	18	0	14	0	9	25	0
5	69- 93	40	36	29	0	9	56+	0
6	86- 110	15	9	29	17	18	44	0
7	103- 127	58	27	57	67	0**	69+	20
8	120- 144	70	36*	43	0**	18**	69	60
9	137- 161	38	36	14	33	18	44	20

10	154- 178	48	27	43	33	9*	63 ⁺	20
11	171- 195	68	46	57	17*	0**	81 ⁺	40
12	188- 212	58	27	29	17	18*	56	40
13	205- 229	55	36	29	50	0**	75	40
14	222- 246	38	18	57	67	0*	31	20
15	239- 263	15	0	43	33	18	13	20
16	256- 280	60	36	71	83	9**	56	20
17	273- 297	28	9	29	17	0*	25	0
18	290- 314	33	27	14	0	9	50	20
19	307- 331	35	11	9	17	10	50	40
20	324- 348	10	9	14	0	0	6	20
21	341- 365	25	18	14	0	0	19	0
22	358- 382	28	9	43	0	9	25	20
23	375- 399	60	36	57	33	0**	56	20
24	392- 416	43	27	29	17	9*	31	20
25	409- 433	3	0	14	0	9	0	0

26	426-450	25	18	29	0	0	13	20
27	443-467	45	44	46	17	9*	44	40
28	460-484	55	36	29	83	9**	75	60
29	477-501	13	0	0	0	18	13	20
30	494-518	33	27	14	0	9	38	20
31	511-535	20	9	0	0	0	13	0
32	528-552	75	55	29*	50	18**	75	40
33	545-569	23	0	43	33	0	13	20
34	562-586	35	27	57	67	9	56	20
35	579-603	33	27	57	33	0*	38	20
36	596-620	18	18	0	17	0	19	0
37	613-637	15	18	14	17	0	0	0
38	630-654	18	9	43	17	0	6	20
39	647-671	35	27	0	17	9	44	20
40	664-688	20	9	14	17	9	19	0
41	681-705	20	18	29	33	0	19	20

42	698- 722	23	9	14	0	0	13	40
43	715- 739	33	18	43	17	0*	38	20
44	732- 756	58	55	43	83	9**	69	40
45	741- 765	35	27	29	50	18	44 ⁺	0
Topo 489- 573	489- 573	40	18	29	50	18	38	20
MBP		40	9	43	50	18	44	40

AA = Aminosäure, ATA = Anti-Topoisomerase I-Autoantikörper, dcSSc = diffus kutane Systemische Sklerose, lcSSc = limitiert kutane Systemische Sklerose, Topo I = Topoisomerase I, SjS = Sjögren Syndrom, MCTD = Mischkollagenose, MBP = Mannose-binding Protein.

3.4.2. Reaktivität der Anti-Peptid-Antikörper

Die stärkste IgG-AAb-Reaktivität (Median > 150 [A *1000]) ließ sich im dcSSc-Kollektiv gegen die Peptide 7, 14, 27, 28, 31, 37, 38, 43 und 44 (s. Tab. 3-12), die stärkste IgM-Reaktivität gegen die Peptide 11, 20, 21, 23, 27, 37, 38, 44 (s. Tab 3-13) zeigen.

Für die meisten Peptide fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen dcSSc-Patienten und gesunden Probanden (s. Abb. 3-18 und 3-19).

Weniger häufig bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Reaktivitäten der dcSSc- und der SjS/MCTD-Patienten (s. Abb. 3-14 und 3-15), noch seltener zwischen dcSSc und lcSSc-Patienten (s. Abb. 3-16 und 3-17). Patienten mit lcSSc wiesen insgesamt eine hohe Anti-Peptid-AAb-Reaktivität auf. Besonders die Antikörperreaktivitäten des Patienten „lcSSc-Pat. 8“ fielen mit Werten bis zu 4000 [Ax1000] auf. Es ergaben sich im MWU-Test signifikant höhere IgG-AAb-Reaktivitätswerte für die lcSSc-Patienten als für das gesamte dcSSc-Kollektiv gegen die Peptiden 33, 34, 37, 42, 44 (s. Tab. 3-12).

Für die IgM-Antikörper waren die Unterschiede zwischen den verschiedenen Patientengruppen nicht so deutlich.

Signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit dcSSc einerseits und lcSSc sowie SjS/MCTD und gesunden Probanden andererseits waren im MWU-Test lediglich für die Peptide 3 ($p=0,013$ bzw. $p=0,06$ und $p<0,001$) 24 ($p=0,023$ bzw. $p=0,021$ und $p<0,001$), und 39 ($p=0,005$ bzw. $p=0,006$ und $p<0,001$) für IgG- sowie für Peptid 8 ($p=0,042$ bzw. $p=0,002$ und $p=0,002$) für IgM-Antikörper zu beobachten.

Anti-Topo I/ScI70 positive Seren von dcSSc-Patienten, bei denen eine aHSCT durchgeführt wurde, zeigten die höchste IgG-Reaktivität mit den Peptiden 11, 27, 28, 31, 37, 38, 43, 44 (s. Tab 3-12) und die höchste IgM-Reaktivität mit den Peptiden 5, 11, 20, 21, 23, 27, 37, 38, 43, 44 (s. Tab 3-13). Für IgG-Antikörper war kein Unterschied zu den ATA/ScI70-negativen Patienten zu beobachten, für die IgM-Anti-Peptid-AAb bestanden signifikante Unterschiede für die Peptide 2, 5, 6, 10, 13, 17, 26, 30, 37 und 41 ($p<0,05$).

Besonders stark reagierte das Serum von Patient S9 mit allen Peptiden. Dieses Serum hatte zwar hochtitrig antinukleäre Antikörper im Immunfluoreszenztest, war aber ATA/ScI70-negativ und wies auch sonst keine spezifischen Kollagenose-relevanten Antikörper auf.

Tab. 3-12 Reaktivität von IgG-Antikörpern gegen Peptide der Topoisomerase I bei Patienten mit dcSSc und anderen Erkrankungen. Angegeben sind die Medianwerte [A x 1000] Grau: immundominantes Epitop. Beige: Median IgG dcSSc >150. *p<0,05; **p<0,01 (Mann-Whitney-U-Test) #/Grün: Signifikant gegenüber lcSSc, SjS/MCTD und Gesunden im Mann-Whitney-U-Test. Gelb: höhere Prävalenz als dcSSc

Pep- tid	AA	dcSSc (n=40)	Herz- betei- ligung (n=11)	lcSSc/ CREST (n=7)	SjS/ MCTD (n=6)	Ge- sun- de (n=11)	dcSSc- Patienten vor aHST	
							ATA/ Scl70 positiv (n=16)	ATA/ Scl70 negativ (n=5)
Median								
1	1-25	70	48	81	101	53	76	51
2	18- 42	86	81	94	129	55*	68	49
3	35- 59	86#	45	50*	39**	33**	93	67
4	52- 76	75	86	88	73	38**	70	51
5	69- 93	74	62	44	63	59	75	69
6	86- 110	77	68	51	65	52**	80	66
7	103- 127	152	110	106	116	63**	108	150
8	120- 144	60	52	47	31*	25**	74	40
9	137- 161	86	60	58	145*	66*	78	80

10	154- 178	81	63	102	94	38**	101	82
11	171- 195	131	110	104	110	103	171	154
12	188- 212	99	77	98	93	65**	97	175
13	205- 229	84	68	53	98	66**	75	78
14	222- 246	156	120	114	179	110**	140	136
15	239- 263	147	107	172	110	73**	142	194
16	256- 280	65	58	62	82	45**	54	71
17	273- 297	41	32	37	66*	22**	39	29
18	290- 314	41	41	36	54	27**	45	39
19	307- 331	89	73	88	78	57**	81	105
20	324- 348	102	104	60*	116	78*	101	146
21	341- 365	60	54	92	92*	68	55	60
22	358- 382	146	142	176	173	84**	118	152
23	375- 399	145	120	102	80**	46**	126	187
24	392- 416	102 [#]	63	62*	66*	37**	90	100
25	409- 433	76	61	52	88	54*	75	77

26	426- 450	70	61	74	95	35**	61	55
27	443- 467	279	235	286	310	253	320	431
28	460- 484	206	163	137	296	171	206	220
29	477- 501	102	100	58*	11	69**	103	109
30	494- 518	144	97	91	132	60**	140	139
31	511- 535	275	234	231	366	131**	242	332
32	528- 552	134	133	133	187	87**	114	122
33	545- 569	82	57	91	223	60*	65	141
34	562- 586	79	69	74	136	42**	82	78
35	579- 603	109	75*	77	119	69**	109	132
36	596- 620	99	89	70	130	71**	92	95
37	613- 637	183	182	199	280	184	175	188
38	630- 654	302	228	324	411	171**	241	316
39	647- 671	81#	45	34**	30**	12**	84	54
40	664- 688	120	108	139	95	65**	113	130
41	681- 705	94	97	97	120	54**	97	72

42	698- 722	90	90	100	133	42**	92	90
43	715- 739	163	107*	186	182	144	164	162
44	732- 756	355	337	348	492	379	327	373
45	741- 765	51	58	37	62	34**	49	50
Topo 489- 573	489- 573	96	55	47*	58	22**	96	66
MBP		60	39	80	114	54	55	93

AA = Aminosäure, ATA = Anti-Topoisomerase I-Autoantikörper, dcSSc = diffus kutane Systemische Sklerose, lcSSc = limitiert kutane Systemische Sklerose, Topo I = Topoisomerase I, SjS = Sjögren Syndrom, MCTD = Mischkollagenose, MBP = Mannose-binding Protein.

Tab. 3-13 Reaktivität von IgM-Antikörpern gegen Peptide der Topoisomerase I bei Patienten mit dcSSc und anderen Erkrankungen. Angegeben sind die Medianwerte [A x 1000]. Grau: immundominantes Epitop. Beige: Median dcSSc >150. *p<0,05; **p<0,01 (Mann-Whitney-U-Test) #/Grün: Signifikant gegenüber lcSSc, SjS/MCTD und Gesunden im Mann-Whitney-U-Test. + signifikant höhere Prävalenz (p<0,05, MWU-Test) für ATA/ScI 70-positive gegenüber ATA/ScI 70-negative.

Peptid	AA	dcSSc (n=40)	Herz- betei- ligung (n=11)	lcSSc/ CREST (n=7)	SjS/ MCTD (n=6)	Ge- sun- de (n=11)	dcSSc- Patienten vor aHSCt	
							ATA/ ScI70 positiv (n=16)	ATA/ ScI70 negativ (n=5)
Median								
1	1-25	93	57	78	78	69	60	28
2	18- 42	61	38	132	61	58	59 ⁺	17
3	35- 59	89	73	96	58	60	104	28
4	52- 76	77	64	86	54	65	70	27
5	69- 93	116	97	59	86	66 ^{**}	169 ⁺	77
6	86- 110	70	70	65	59	41	88 ⁺	40
7	103- 127	70	26	77	55	29 ^{**}	65	38
8	120- 144	111 [#]	68	69 [*]	32 ^{**}	33 ^{**}	103	51
9	137- 161	63	45	46	65	33	68	26

10	154- 178	55	46	41	32	28**	67 ⁺	26
11	171- 195	198	131*	164	77*	105**	204	122
12	188- 212	88	52	72	53	44	97	54
13	205- 229	81	59	30	76	29**	99 ⁺	69
14	222- 246	74	54	94	133	47	77	55
15	239- 263	65	46	127	77	68	65	42
16	256- 280	38	26	33	52	1**	40	22
17	273- 297	30	12	31	29	21	30 ⁺	10
18	290- 314	58	56	46	48	40	83	8
19	307- 331	31	23	43	26	20	61	20
20	324- 348	156	139	57	130	164	160	73
21	341- 365	255	193	217	212	227	261	176
22	358- 382	97	62	102	53	27**	77	39
23	375- 399	246	130	320	142	107**	223	134
24	392- 416	144	83	98	36*	56**	142	87
25	409- 433	19	15*	14	12	3*	19	12

26	426- 450	66	36	61	40	44	63 ⁺	19
27	443- 467	285	276	264	233	148*	291	223
28	460- 484	85	56	58	106	45*	107	132
29	477- 501	17	14	18	20	11	21	12
30	494- 518	99	66	65	56*	51*	108 ⁺	54
31	511- 535	105	72	58	61	54	95	69
32	528- 552	107	81	60	77	10*	144	73
33	545- 569	50	52	100	77	31	47	22
34	562- 586	25	14	40	32	7*	32	14
35	579- 603	76	60	147	111	65	110	46
36	596- 620	56	59	24	41	26	66	36
37	613- 637	184	182	139	197	150	192 ⁺	96
38	630- 654	300	199	355	214	192	305	242
39	647- 671	64	50	30*	29	13**	93	13
40	664- 688	145	84	108	98	76**	145	92
41	681- 705	52	53	63	43	37	55 ⁺	20

42	698- 722	54	27	36	50	60	54	115
43	715- 739	137	135	205	106	131	154	64
44	732- 756	222	251	169	232	113**	261	156
45	741- 765	83	70	47	114	67	115	66
Topo 489- 573	489- 573	79	51	65	103	51	79	38
MBP		38	27	42	59	21*	41	30

AA = Aminosäure, ATA = Anti-Topoisomerase I-Autoantikörper, dcSSc = diffus kutane Systemische Sklerose, lcSSc = limitiert kutane Systemische Sklerose, Topo I = Topoisomerase I, SjS = Sjögren Syndrom, MCTD = Mischkollagenose, MBP = Mannose-binding Protein.

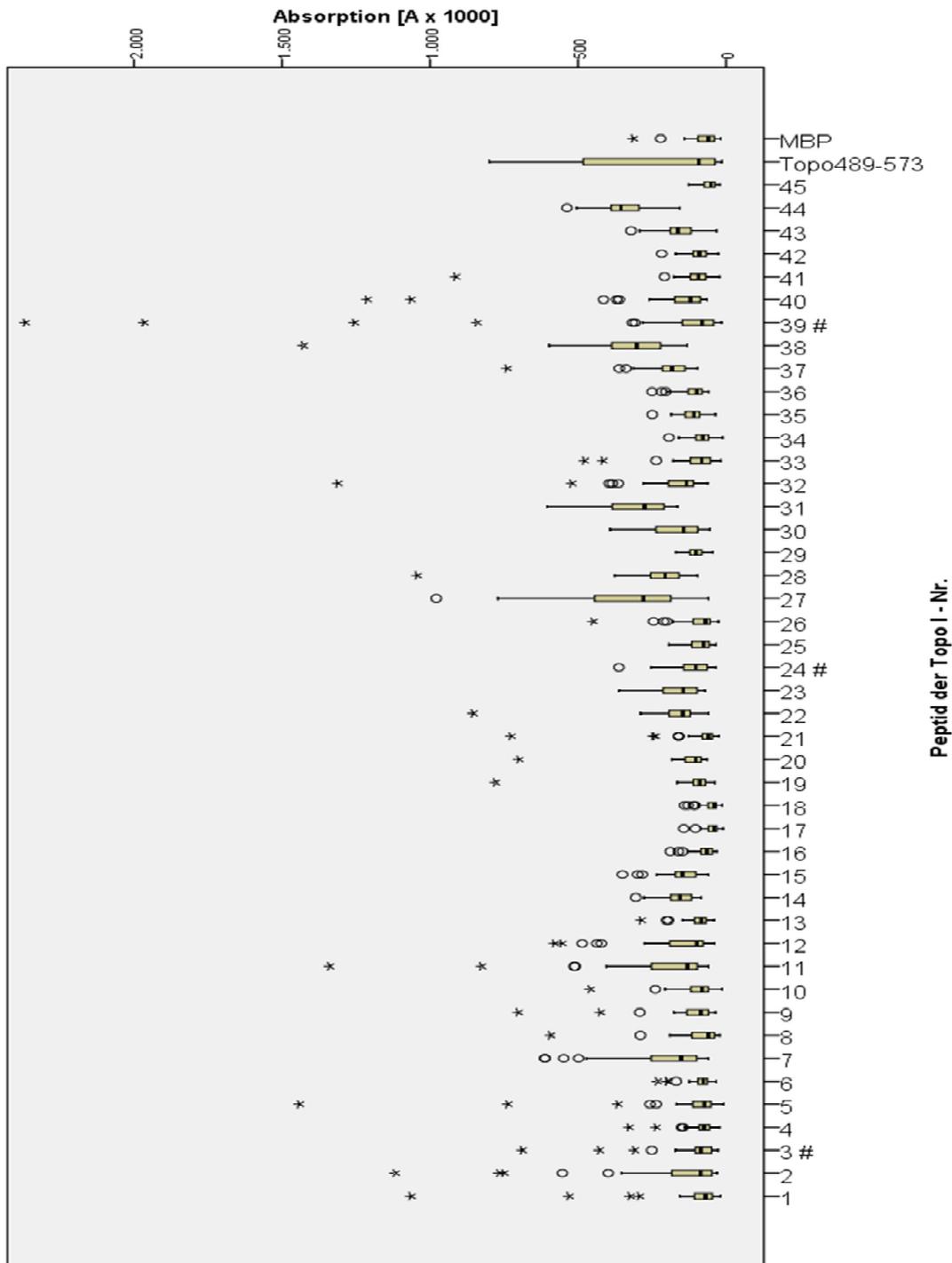


Abb. 3-8 Boxplots der IgG-Anti-Peptid-AAb-Reaktivitäten der dcSSc-Patienten. Ausreißer (1,5- bis 3-faches der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) sind als Kreise, Extremwerte (mehr als das 3-fache der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) als Kreuze dargestellt. Querbalken stellen Median, 25%- und 75%-Perzentile, T-Balken den maximalen bzw. minimalen Wert dar, der weder Ausreißer noch Extremwert ist. # = signifikant ($p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test) gegenüber SjS/MCTD, lcSSc sowie Gesunden. Topo I = Topoisomerase I, MBP = Mannose-binding Protein.

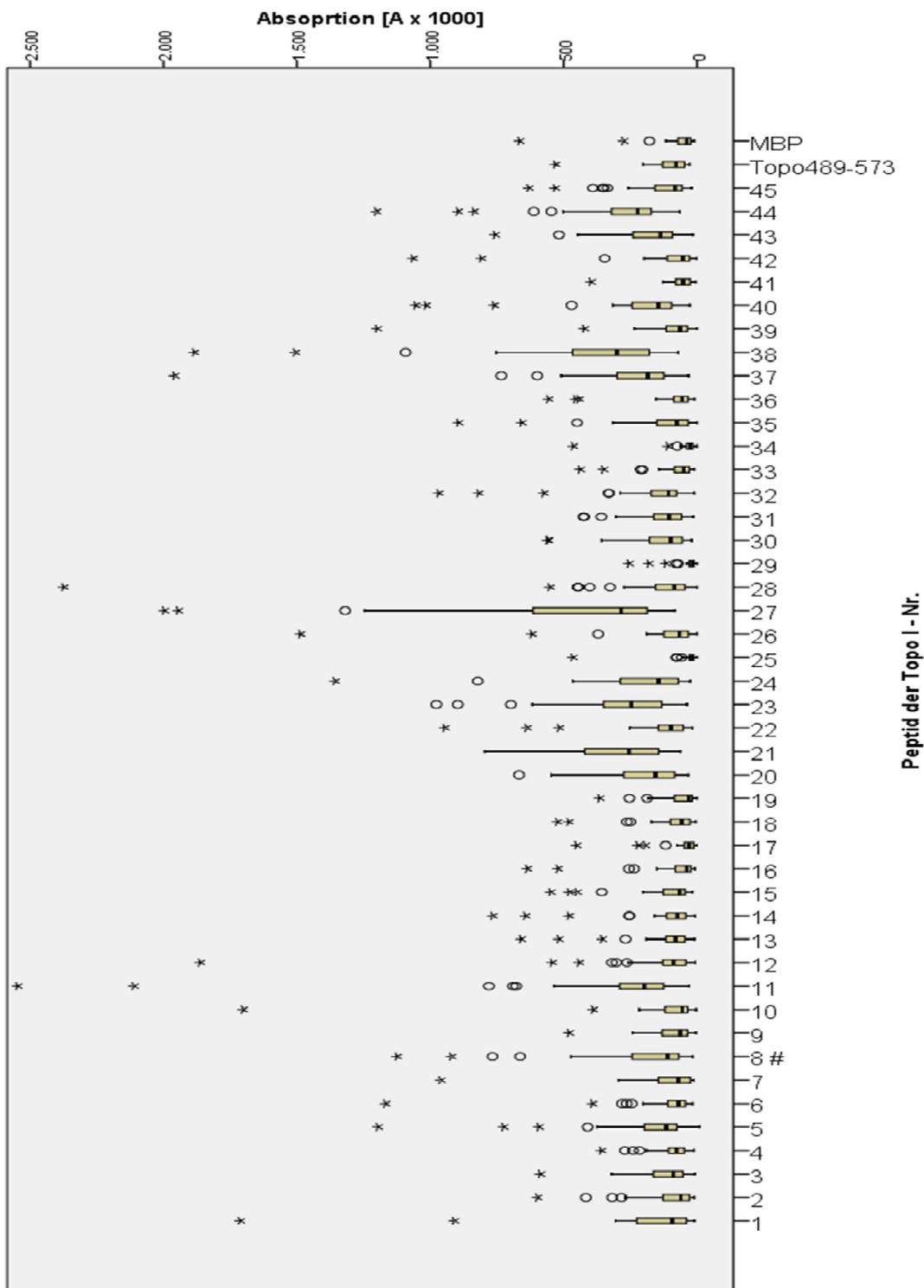


Abb. 3-9 Boxplots der IgM-Anti-Peptid-AAb-Reaktivitäten der dcSSc-Patienten. (1,5- bis 3-faches der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) sind als Kreise, Extremwerte (mehr als das 3-fache der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) als Kreuze dargestellt. Querbalken stellen Median, 25%- und 75%-Perzentile, T-Balken den maximalen bzw. minimalen Wert dar, der weder Ausreißer noch Extremwert ist. # = signifikant ($p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test) gegenüber SjS/MCTD, lcSSc sowie Gesunden. Der Extremwert für Peptid Nr. 40 von Pat. N5 ist mit 3927 [A x 1000] nicht dargestellt. Topo I = Topoisomerase I, MBP = Mannose-binding Protein.

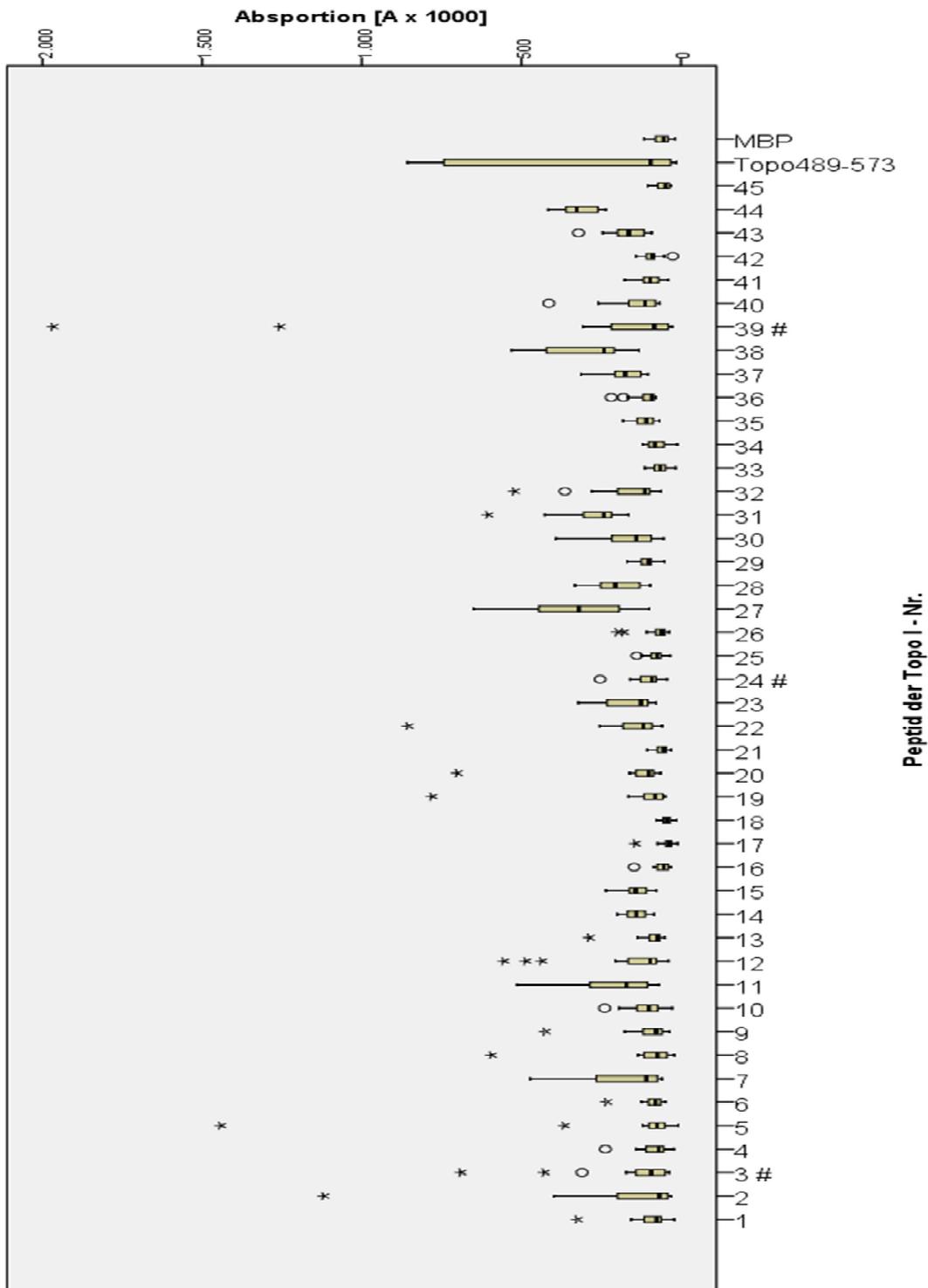


Abb. 3-10 Boxplots der IgG-Anti-Peptid-AAb-Reaktivitäten der ATA/Scl 70-positiven dcSSc-Patienten. Ausreißer (1,5- bis 3-faches der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) sind als Kreise, Extremwerte (mehr als das 3-fache der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) als Kreuze dargestellt. Querbalken stellen Median, 25%- und 75%-Perzentile, T-Balken den maximalen bzw. minimalen Wert dar, der weder Ausreißer noch Extremwert ist. # = signifikant ($p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test) gegenüber SjS/MCTD, lcSSc sowie Gesunden. Topo I = Topoisomerase I, MBP = Mannose-binding Protein.

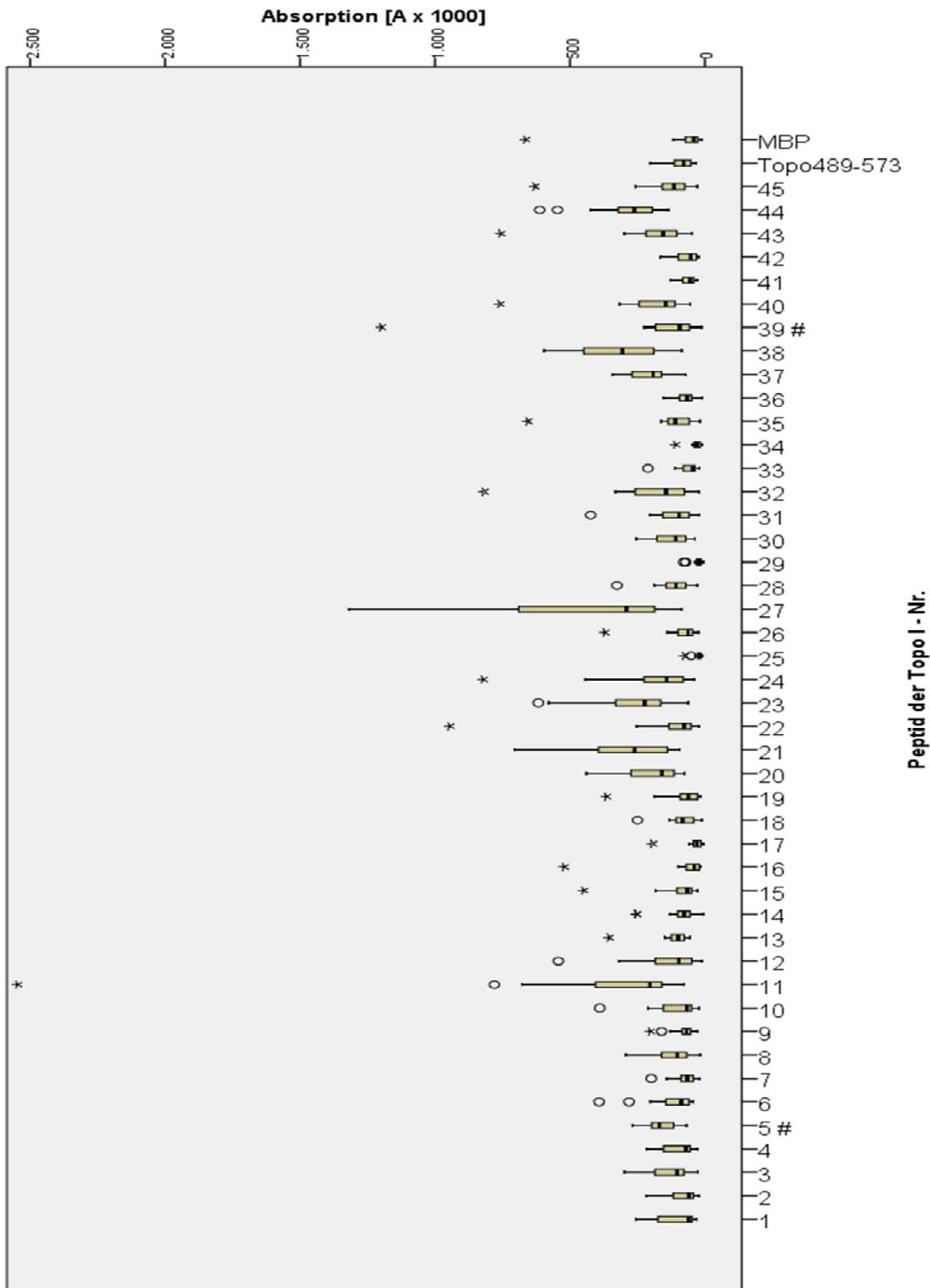


Abb. 3-11 Boxplots der IgM-Anti-Peptid-AAb-Reaktivitäten der ATA/Scl 70-positiven dcSSc-Patienten. Ausreißer (1,5- bis 3-faches der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) sind als Kreise, Extremwerte (mehr als das 3-fache der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) als Kreuze dargestellt. Querbalken stellen Median, 25%- und 75%-Perzentile, T-Balken den maximalen bzw. minimalen Wert dar, der weder Ausreißer noch Extremwert ist. # = signifikant ($p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test) gegenüber Sjs/MCTD, lcSSc sowie Gesunden. Topo I = Topoisomerase I, MBP = Mannose-binding Protein.

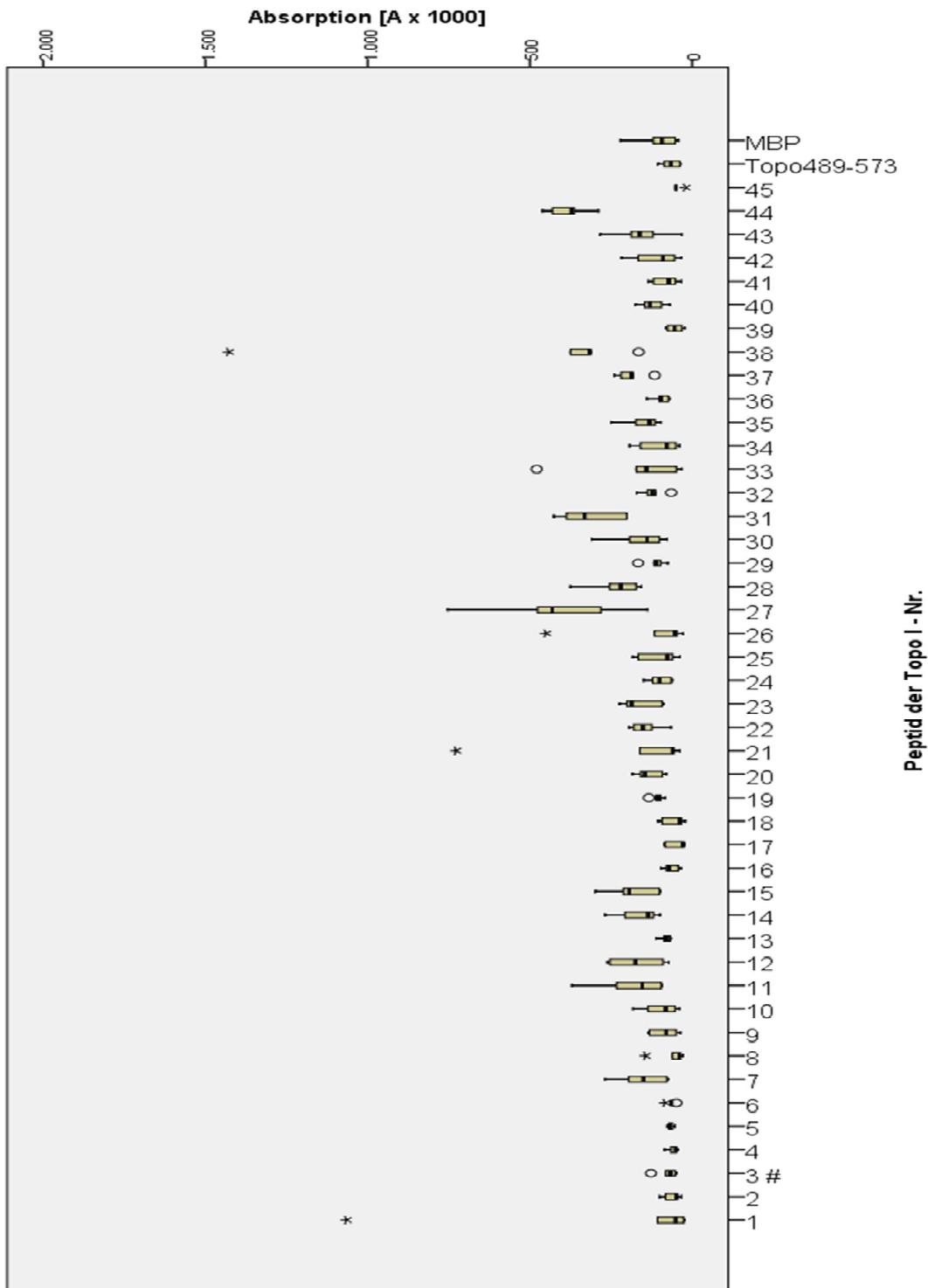


Abb. 3-12 Boxplots der IgG-Anti-Peptid-AAb-Reaktivitäten der ATA/Scl 70-negativen dcSSc-Patienten. Ausreißer (1,5- bis 3-faches der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) sind als Kreise, Extremwerte (mehr als das 3-fache der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) als Kreuze dargestellt. Querbalken stellen Median, 25%- und 75%-Perzentile, T-Balken den maximalen bzw. minimalen Wert dar, der weder Ausreißer noch Extremwert ist. # = signifikant ($p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test) gegenüber SjS/MCTD, lcSSc sowie Gesunden. Topo I = Topoisomerase I, MBP = Mannose-binding Protein.

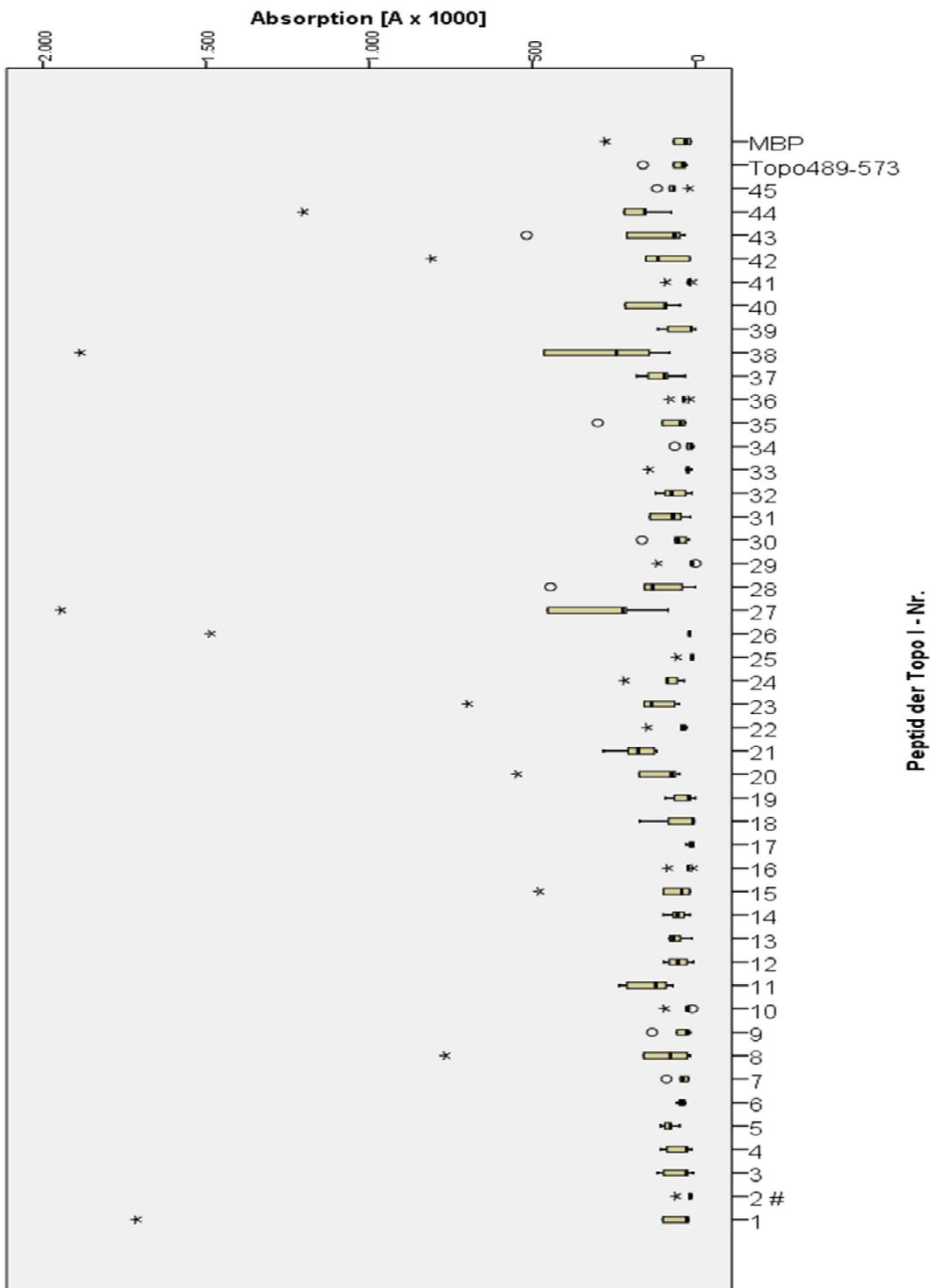


Abb. 3-13 Boxplots der IgM-Anti-Peptid-AAb-Reaktivitäten der ATA/Scl 70-positiven dcSSc-Patienten. Ausreißer (1,5- bis 3-faches der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) sind als Kreise, Extremwerte (mehr als das 3-fache der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) als Kreuze dargestellt. Querbalken stellen Median, 25%- und 75%-Perzentile, T-Balken den maximalen bzw. minimalen Wert dar, der weder Ausreißer noch Extremwert ist. # = signifikant ($p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test) gegenüber SjS/MCTD, lcSSc sowie Gesunden. Topo I = Topoisomerase I, MBP = Mannose-binding Protein.

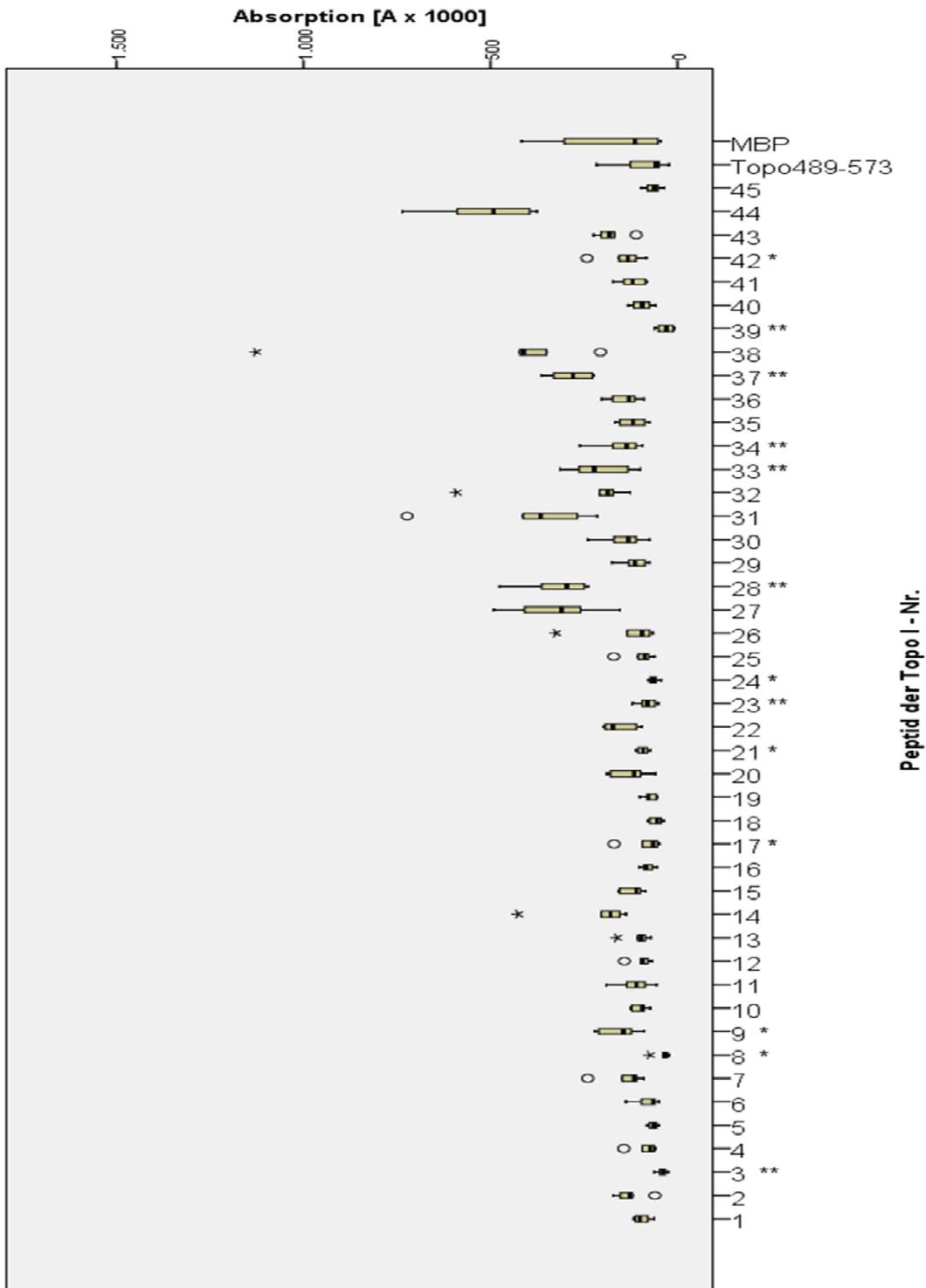


Abb. 3-14 Boxplots der IgG-Anti-Peptid-AAb-Reaktivitäten der SjS/MCTD-Patienten. Ausreißer (1,5- bis 3-faches der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) sind als Kreise, Extremwerte (mehr als das 3-fache der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) als Kreuze dargestellt. Querbalken stellen Median, 25%- und 75%-Perzentile, T-Balken den maximalen bzw. minimalen Wert dar, der weder Ausreißer noch Extremwert ist. * = dcSSc gesamt signifikant gegenüber dem jeweiligen Kollektiv ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U). Topo I = Topoisomerase I, MBP = Mannose-binding Protein.

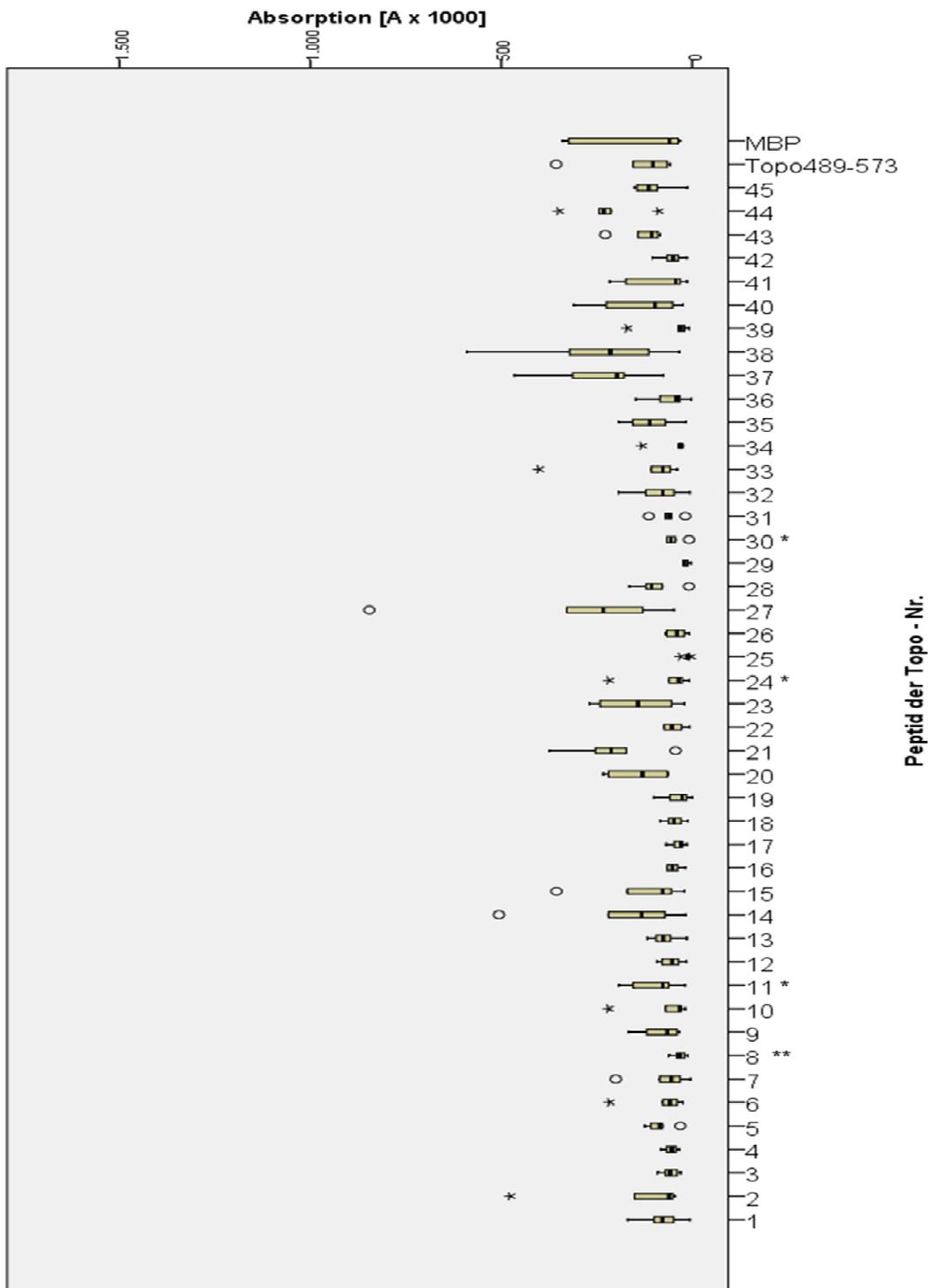


Abb. 3-15 Boxplots der IgM-Anti-Peptid-AAb-Reaktivitäten der SjS/MCTD-Patienten. Ausreißer (1,5- bis 3-faches der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) sind als Kreise, Extremwerte (mehr als das 3-fache der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) als Kreuze dargestellt. Querbalken stellen Median, 25%- und 75%-Perzentile, T-Balken den maximalen bzw. minimalen Wert dar, der weder Ausreißer noch Extremwert ist. * = dcSSc gesamt signifikant gegenüber dem jeweiligen Kollektiv ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U). Topo 1 = Topoisomerase I, MBP = Mannose-binding Protein.

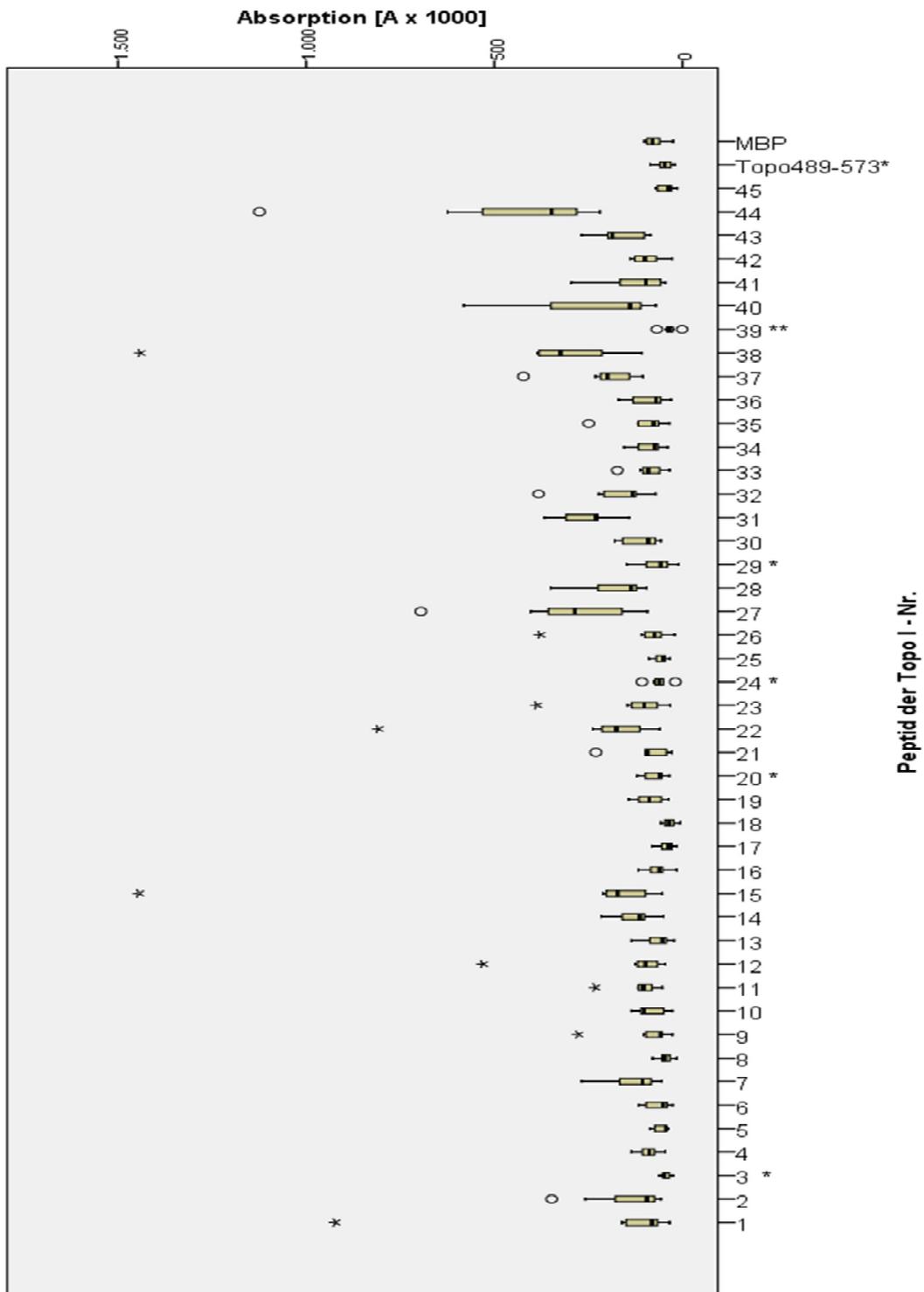


Abb. 3-16 Boxplots der IgG-Anti-Peptid-AAb-Reaktivitäten der 1cSSc-Patienten. Ausreißer (1,5- bis 3-faches der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) sind als Kreise, Extremwerte (mehr als das 3-fache der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) als Kreuze dargestellt. Querbalken stellen Median, 25%- und 75%-Perzentile, T-Balken den maximalen bzw. minimalen Wert dar, der weder Ausreißer noch Extremwert ist. * = dcSSc gesamt signifikant gegenüber dem jeweiligen Kollektiv ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U). Topo I = Topoisomerase I, MBP = Mannose-binding Protein.

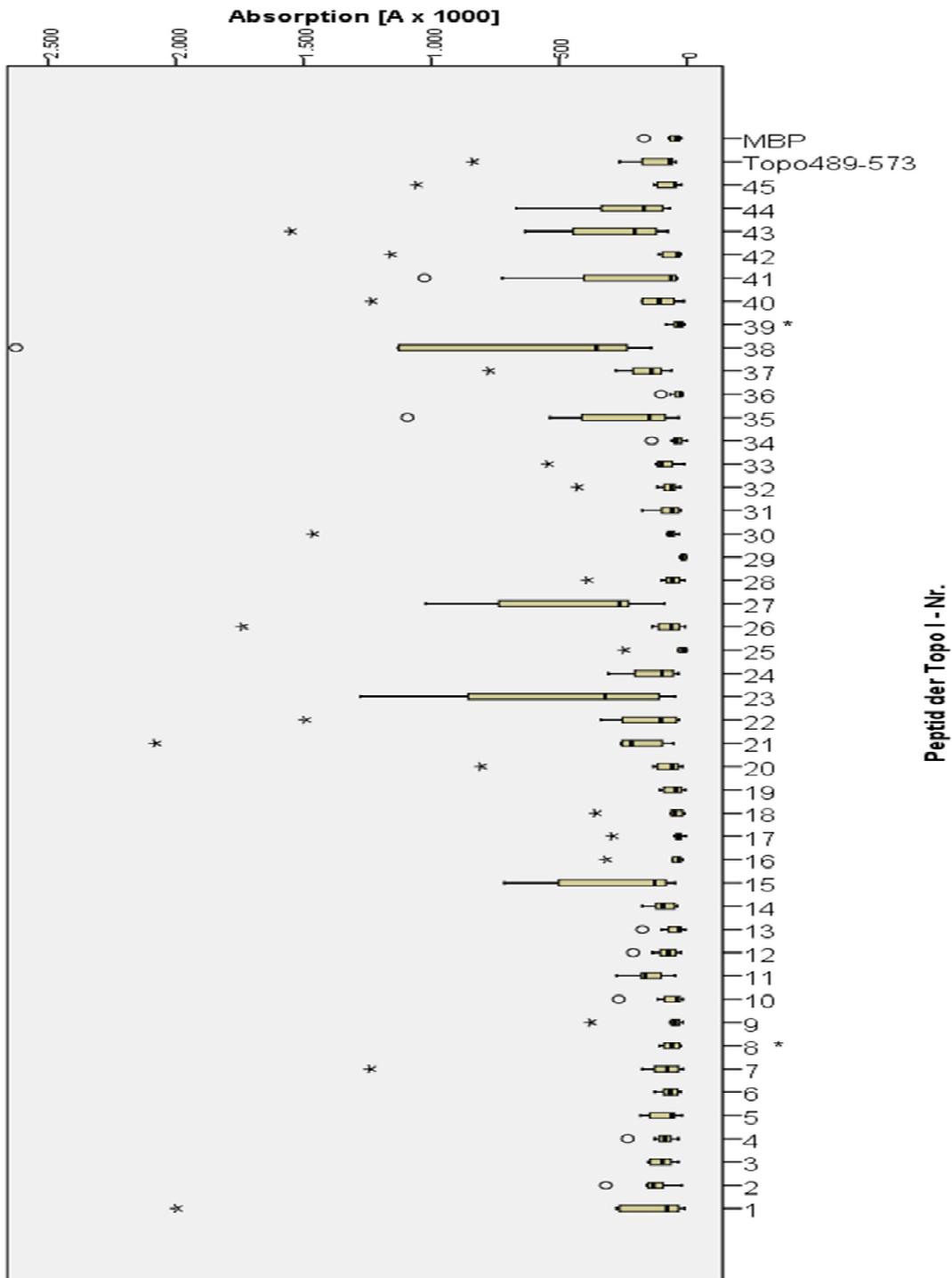


Abb. 3-17 Boxplots der IgM-Anti-Peptid-AAb-Reaktivitäten der lcSSc-Patienten. Ausreißer (1,5- bis 3-faches der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) sind als Kreise, Extremwerte (mehr als das 3-fache der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) als Kreuze dargestellt. Querbalken stellen Median, 25%- und 75%-Perzentile, T-Balken den maximalen bzw. minimalen Wert dar, der weder Ausreißer noch Extremwert ist. * = dcSSc gesamt signifikant gegenüber dem jeweiligen Kollektiv ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U); Extremwerte von Patient lcSSc 8 für Peptid 15 (4226 [A x 1000]) und Peptid 23 (3212 [A x 1000]) nicht dargestellt. Topo I = Topoisomerase I, MBP = Mannose-binding Protein.

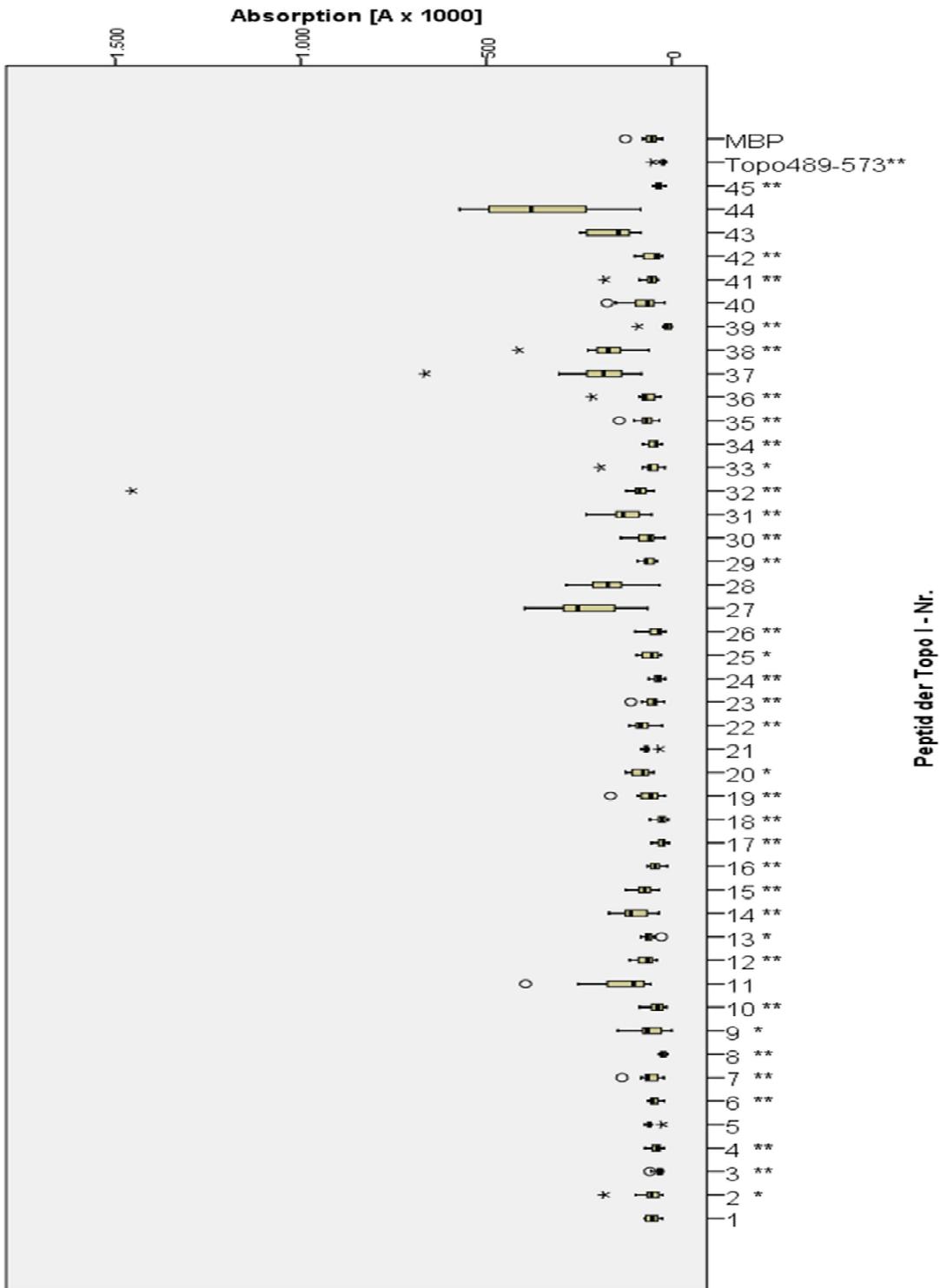


Abb. 3-18 Boxplots der IgG-Anti-Peptid-AAb-Reaktivitäten gesunder Probanden. Ausreißer (1,5- bis 3-faches der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) sind als Kreise, Extremwerte (mehr als das 3-fache der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) als Kreuze dargestellt. Querbalken stellen Median, 25%- und 75%-Perzentile, T-Balken den maximalen bzw. minimalen Wert dar, der weder Ausreißer noch Extremwert ist. * = dcSSc gesamt signifikant gegenüber dem jeweiligen Kollektiv ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U). Topo I = Topoisomerase I, MBP = Mannose-binding Protein.

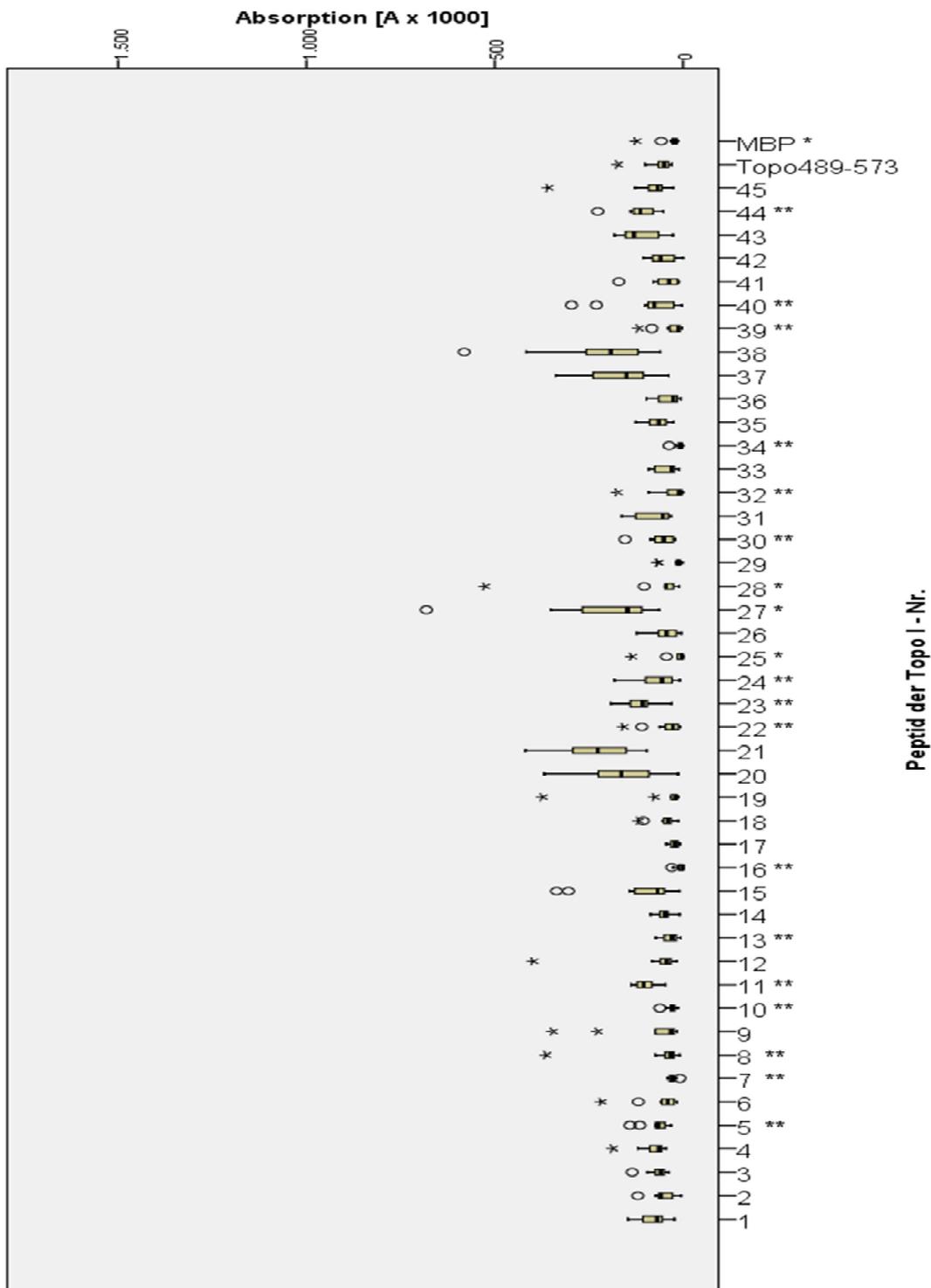


Abb. 3-19 Boxplots der IgM-Anti-Peptid-AAb-Reaktivitäten gesunder Probanden. Ausreißer (1,5- bis 3-faches der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) sind als Kreise, Extremwerte (mehr als das 3-fache der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) als Kreuze dargestellt. Querbalken stellen Median, 25%- und 75%-Perzentile, T-Balken den maximalen bzw. minimalen Wert dar, der weder Ausreißer noch Extremwert ist. * = dcSSc gesamt signifikant gegenüber dem jeweiligen Kollektiv ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U). Topo I = Topoisomerase I, MBP = Mannose-binding Protein.

3.4.3. Verhalten der Anti-Peptid-Antikörper im Verlauf bei Patienten mit dcSSc

3.4.3.1 Häufigkeit der Anti-Peptid-Antikörper

Die Häufigkeit der Antikörper gegen die verschiedenen Peptide variierte im Verlauf bei Patienten vor und nach aHSCT nicht wesentlich. Eine vorübergehend signifikante Verminderung der Prävalenz zeigte sich bei IgG-Antikörpern gegen die Peptide 6, 8, 19 und 38 sowie IgM-Antikörpern gegen die Peptide 3, 10, 11, 19, 24 und 30. Die Häufigkeit der Antikörper gegen die Peptide 27, 30 und 31 war lediglich am Ende des Beobachtungszeitraums signifikant vermindert im Vergleich zum Zeitpunkt vor aHSCT (bei jedoch abnehmender Gruppengröße) (Siehe Tab 3-14).

Tab. 3-14 Häufigkeiten von IgG- und IgM-Antikörpern gegen Peptide der Topoisomerase I bei Patienten mit dcSSc vor und zu mehreren Zeitpunkten nach aHSCT. Grau: immundominantes Epitop. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ im Vergleich zum ersten Serum/vor Therapie (X^2 -Test).

Peptid	Erstes Serum (n=21)	Bis 9 Mon (n=17)	9 Mon – 18 Mon (n=19)	>18 Mon (n=12)	Erstes Serum (n=21)	Bis 9 Mon (n=17)	9 Mon – 18 Mon (n=19)	>18 Mon (n=12)
	IgG				IgM			
Positive [%]								
1	43	24	21	33	24	12	16	17
2	38	24	16	33	24	12	16	17
3	62	53	63	50	52	18*	21*	33
4	38	24	26	17	19	0	0*	8
5	33	18	32	33	43	6*	16	33
6	57	18*	26*	33	33	6*	21	17

7	62	53	58	25*	52	18*	42	33
8	81	35**	68	58	67	35	31*	50
9	29	18	26	8	38	12	11*	25
10	57	47	42	58	52	12**	26	50
11	33	12	5*	0*	71	35*	37*	50
12	43	35	53	17	52	41	26	33
13	29	6	32	17	67	35	26*	33
14	19	12	16	8	29	18	26	50
15	62	29*	42	33	14	6	5	17
16	29	12	21	0*	48	24	37	50
17	24	24	21	17	19	12	11	17
18	24	29	21	17	43	12*	16	50
19	43	12*	32	25	48	6**	16*	33
20	33	12	16	17	10	6	5	8
21	14	12	16	25	14	6	5	0
22	43	24	32	25	24	12	11	0
23	71	47	53	42	48	24	32	42
24	81	47*	74	42*	29	0*	5	8
25	24	24	26	17	0	0	0	0
26	43	47	63	42	19	12	11	17

27	29	12	16	0*	43	29	32	50
28	14	0	11	0	71	47	53	67
29	71	35*	42	25*	14	0	0	0
30	57	29	53	8**	33	6*	5*	8
31	62	41	63	17*	10	6	5	8
32	38	24	37*	17	67	41	32	58
33	10	12	11	8	14	24	11*	17
34	48	41	47	42	48	24	11	42
35	62	47	47	33	33	12	11	33
36	43	41	32	8*	14	0	0	0
37	5	0	11	0	0	6	11	0
38	38	12	5*	17	10	6	11	17
39	48	35	32	0**	43	0**	11*	17
40	24	12	16	17	14	6	5	0
41	57	35	47	42	19	6	11	17
42	43	29	32	42	19	0	0*	8
43	10	6	5	0	33	18	11	17
44	0	0	0	0	62	35	47	50
45	33	12	26	17	33	0**	0**	25
Top	67	65	47	42	33	12	32	33

O								
489-573								
MBP	24	12	16	0	43	12*	37	75
P								

Mon = Monate, Topo = Topoisomerase I, MBP = Mannose-binding Protein.

3.4.3.2 Reaktivität der Anti-Peptid-Antikörper

In der Betrachtung der Anti-Peptid-AAb-Reaktivitäten im zeitlichen Verlauf nach aHSCT-Therapie ergab sich für deutlich mehr Peptide eine signifikante Regredienz der Reaktivitäten, als dies bei den Prävalenzen zu sehen war. Es bestand eine zumindest passager signifikante Verminderung der Antikörperreaktivität gegen die Peptide 3, 4, 5, 6, 8, 13, 15, 16, 19, 21, 22, 23, 30, 38, und 40. Die Antikörperreaktivität gegenüber den Peptiden 6, 7, 27, 28, 29, 32, 39, 43, 44 war im Vergleich zum Zeitpunkt vor aHSCT bis zum Ende des Beobachtungszeitraums signifikant erniedrigt.

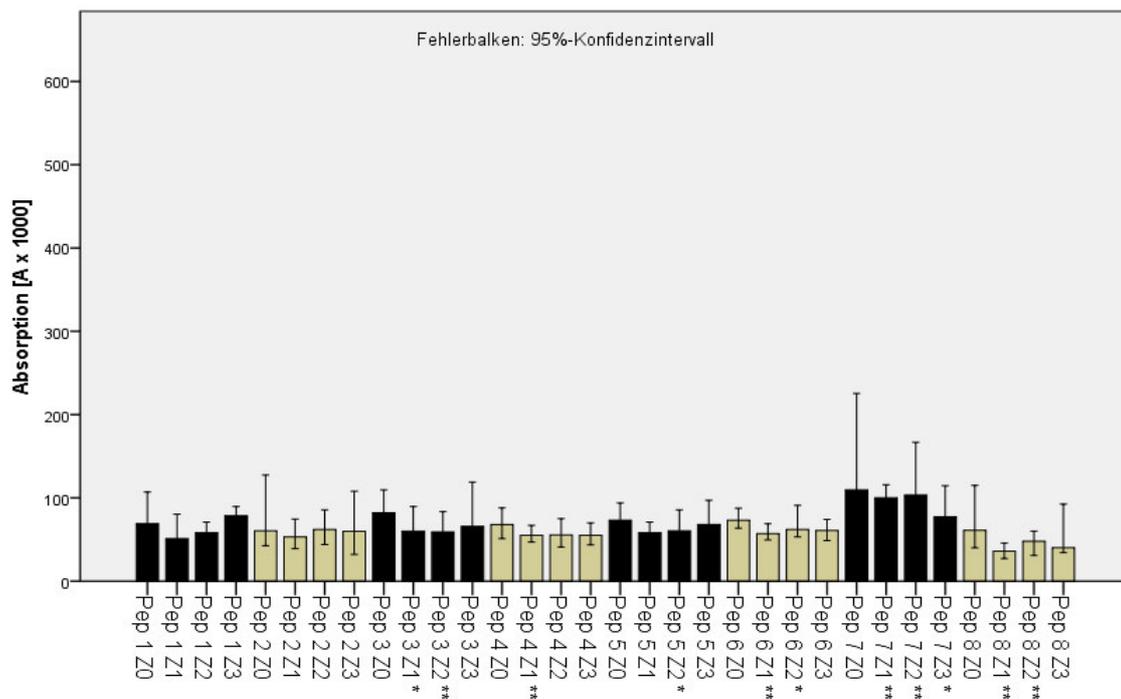


Abb. 3-20A

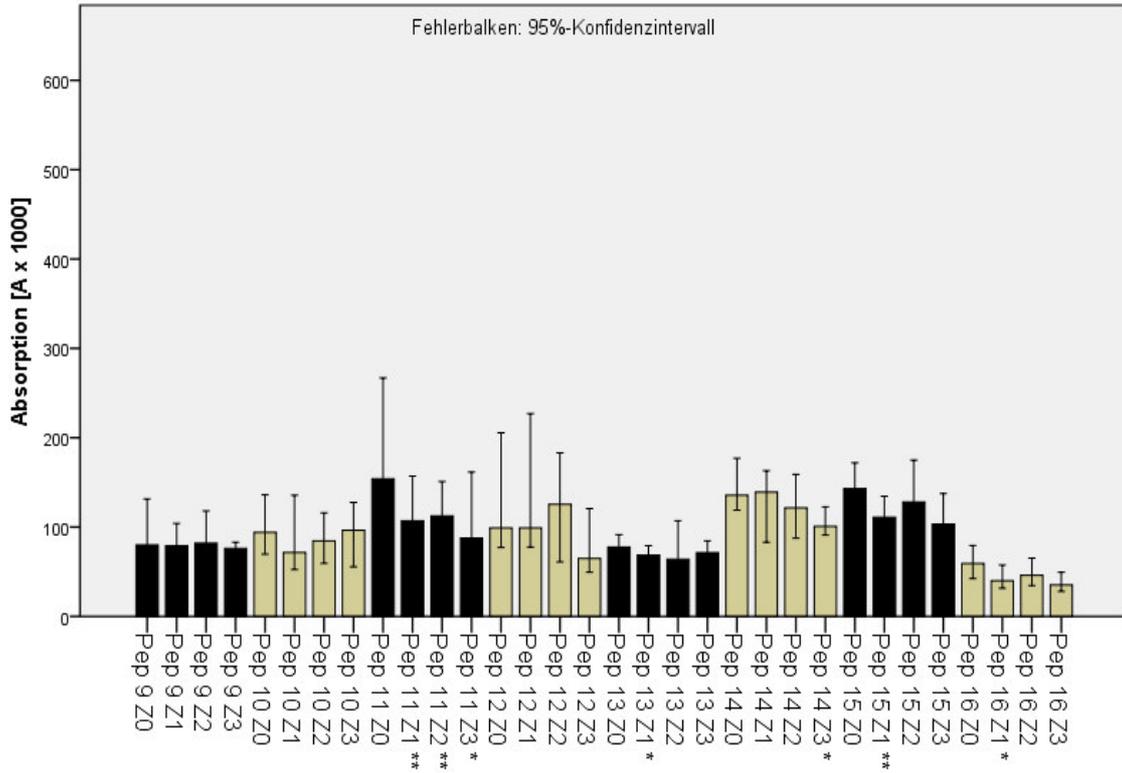


Abb. 3-20B

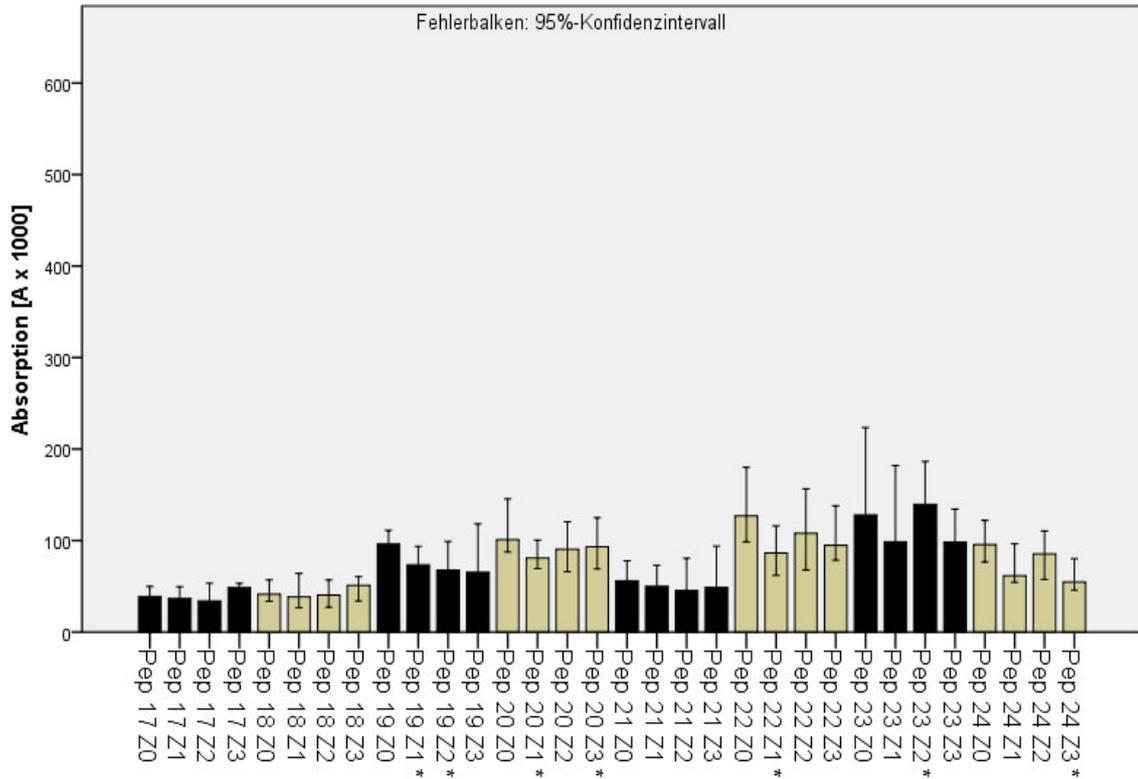


Abb. 3-20C

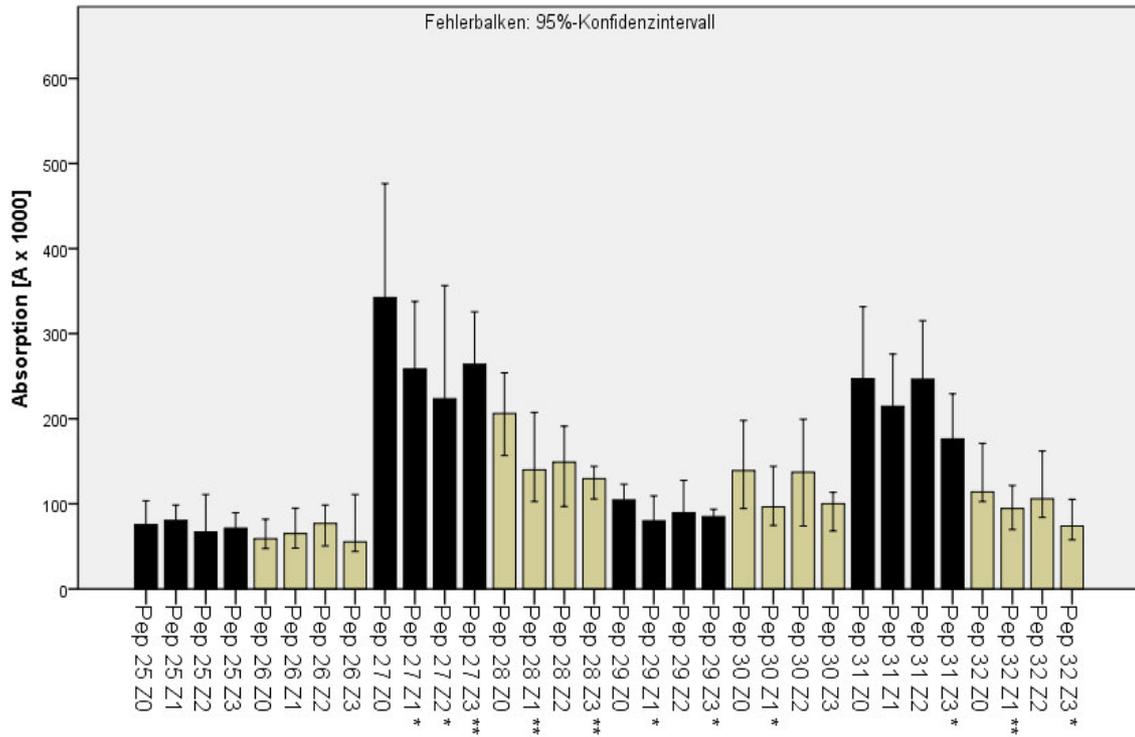


Abb. 3-20D

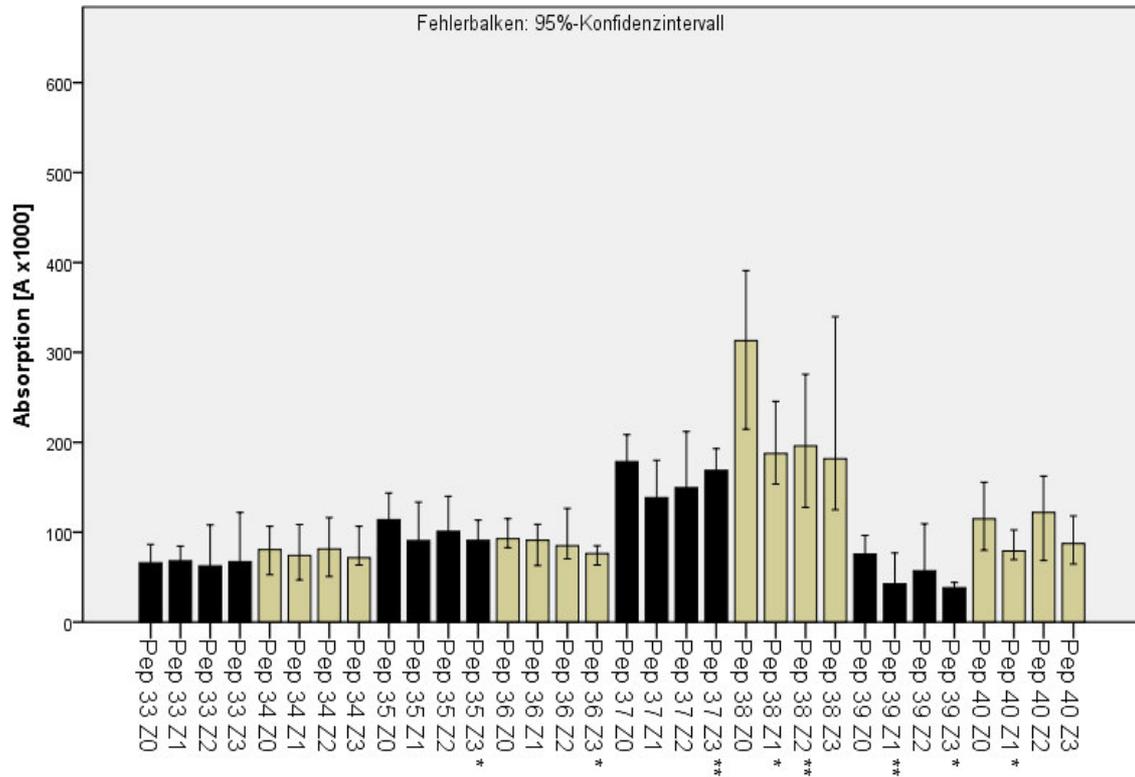


Abb. 3-20E

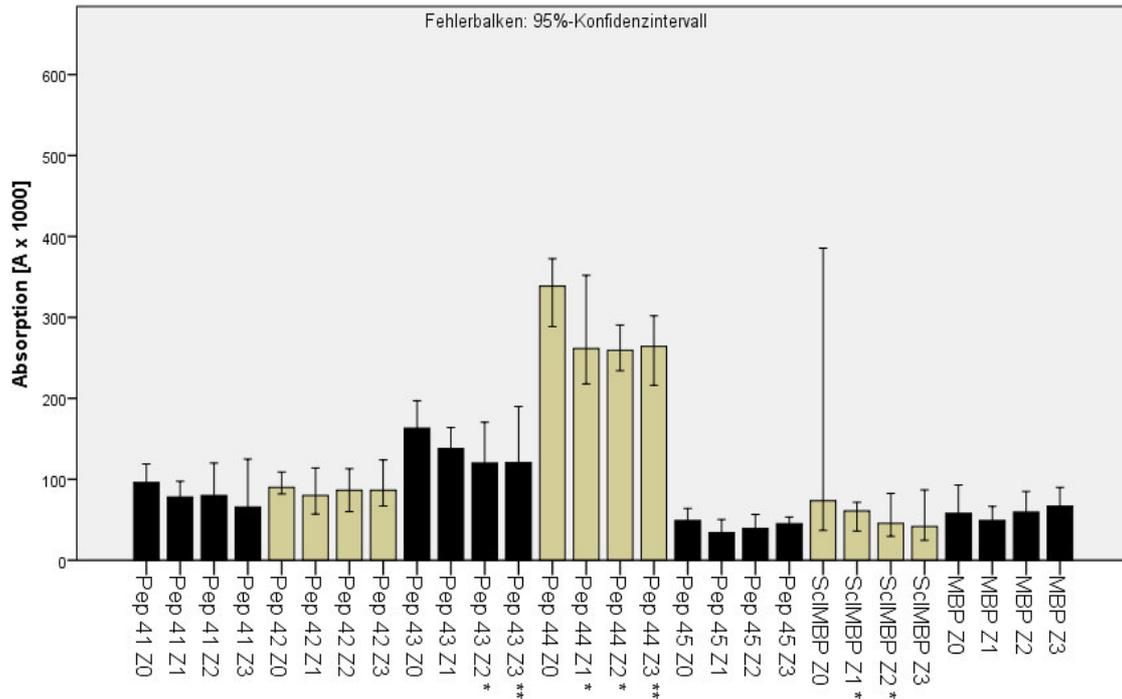


Abb. 3-20F

Abb. 3-20A-F Reaktivitäten von IgG-Antikörpern gegen Peptide der Topoisomerase I bei dcSSc-Patienten vor und zu mehreren Zeitpunkten nach aHSCT. A) Peptide 1-8, B) Peptide 9-16, C) Peptide 17-24, E) Peptide 25-32, E) Peptide 33-40, F) Peptide 43-45 sowie Topo489-573 * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; (Wilcoxon Signed Rank Test). Z0: vor Therapie, Z1 bis neun Monate, Z2: neun bis 18 Monate, Z3 mehr als 18 Monate nach Therapie. Balken stellen Mediane, Fehlerbalken 95%iges Konfidenzintervall dar. Pep = Peptid. Z = Zeitpunkt.

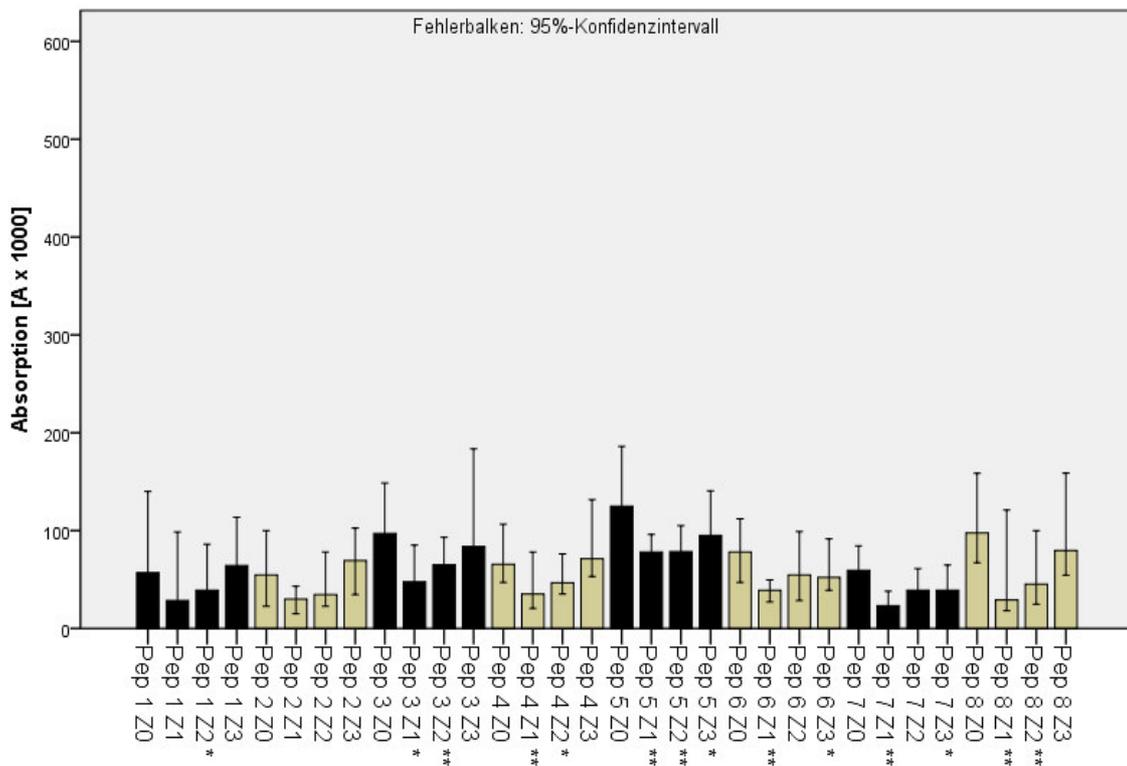


Abb. 3-21A

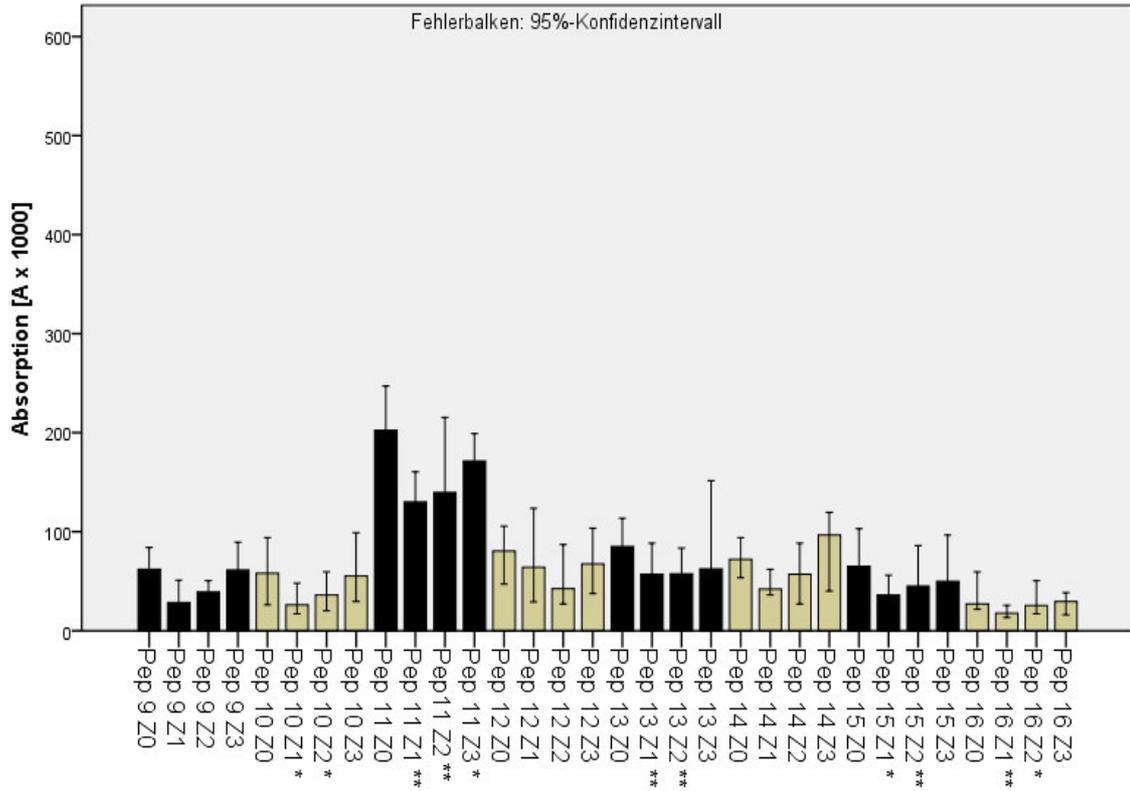


Abb. 3-21B

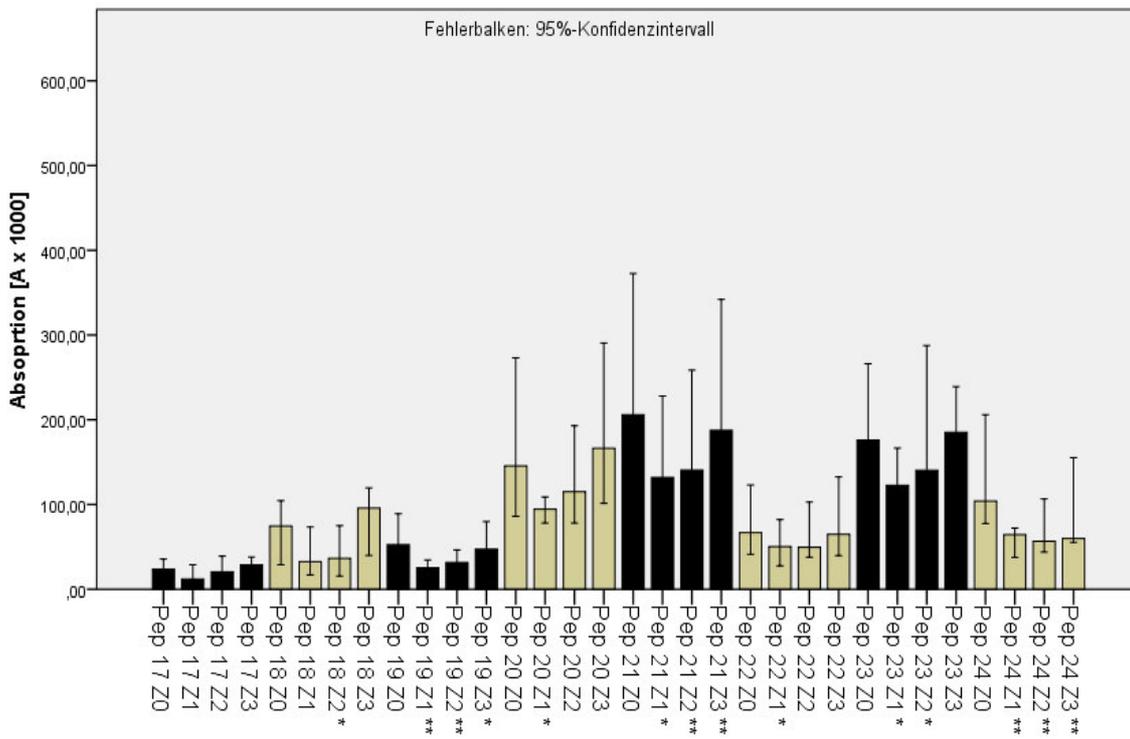


Abb. 3-21C

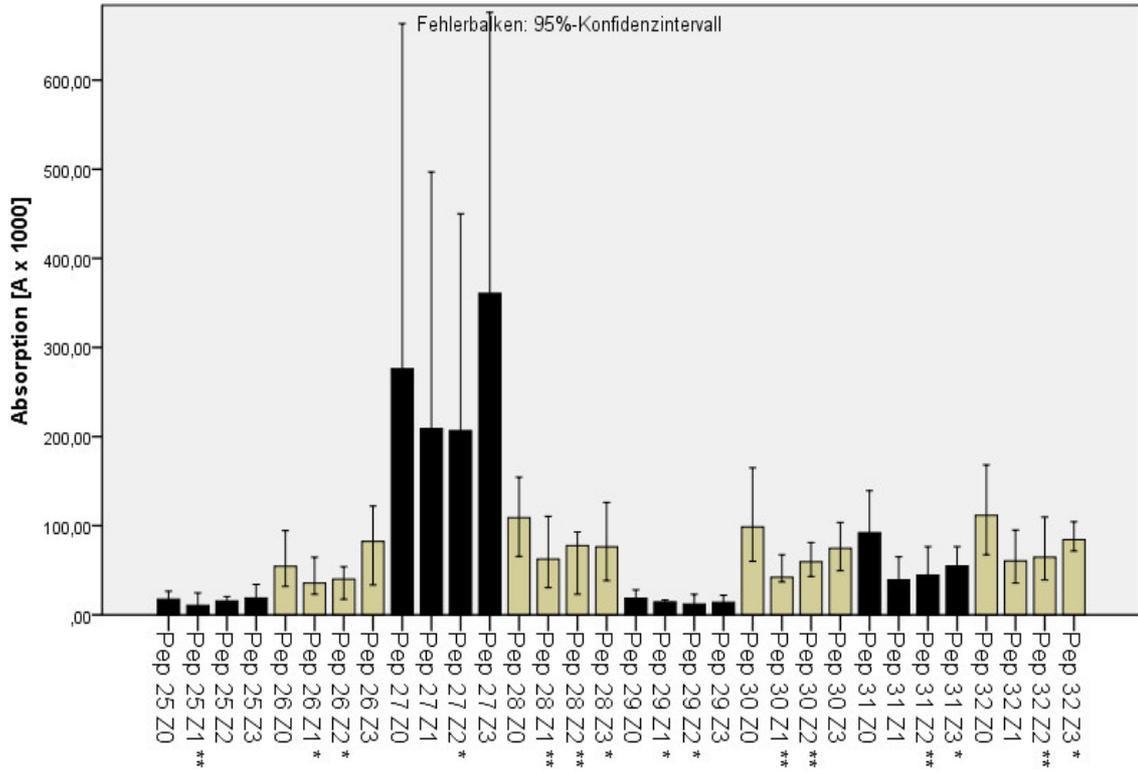


Abb. 3-21D

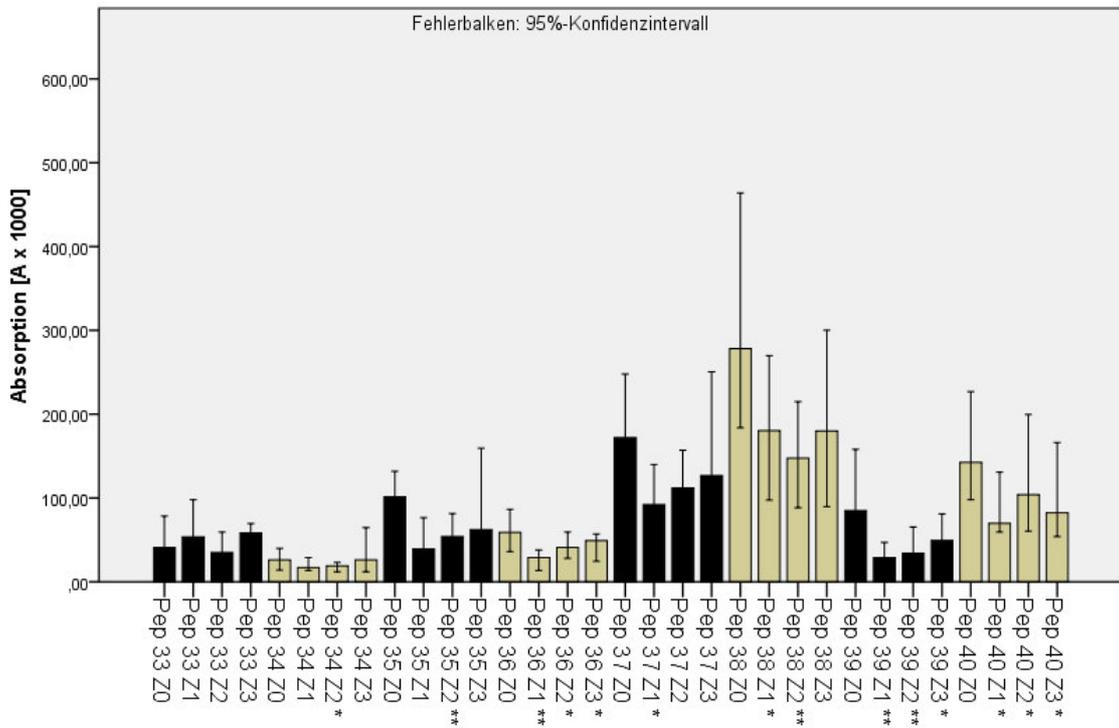


Abb. 3-21E

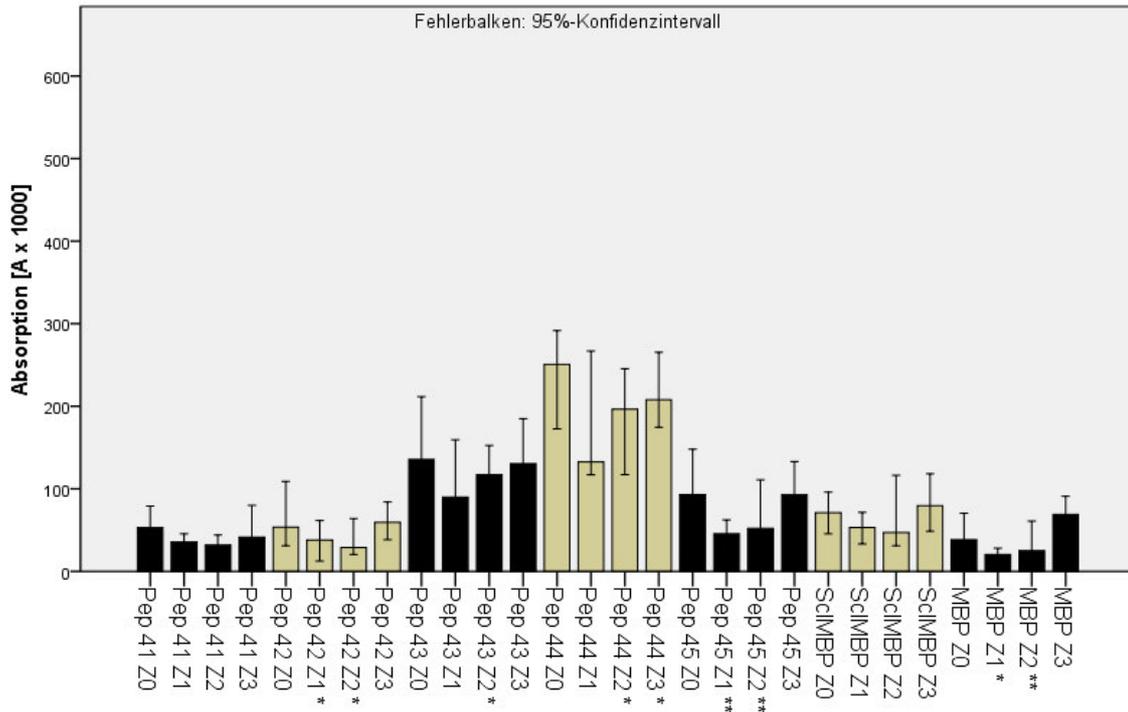


Abb. 3-21F

Abb. 3-21A-F Reaktivitäten von IgM-Antikörpern gegen Peptide der Topoisomerase I bei dcSSc-Patienten vor und nach aHSCT. A) Peptide 1-8, B) Peptide 9-16, C) Peptide 17-24, E) Peptide 25-32, E) Peptide 33-40, F) Peptide 43-45 plus Topo489-573; Z0: vor Therapie, Z1 bis neun Monate, Z2: neun bis 18 Monate, Z3 mehr als 18 Monate nach Therapie. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; (Wilcoxon Signed Rank Test). Balken stellen Mediane, Fehlerbalken 95%iges Konfidenzintervall dar. Pep = Peptid. Z = Zeitpunkt.

In Abb. 6-22A-F wurden die Seren der IgG-ATA/ScI 70-positiven und -negativen dcSSc Patienten nochmals getrennt voneinander hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber den Peptiden betrachtet.

Eine vorübergehend signifikante Abnahme der IgG-AAb-Reaktivitäten ergab sich für die Peptide 1, 3-8, 11, 23, 29 und 38. Eine auch zu Z3 signifikant niedrige Reaktivität bestand bei den Peptiden 27, 28, 37, 39 und 43.

Für die IgM-AAb zeigte sich nur für Peptide 6, 7, 8, 11, 15, 16, 22, 23, 24, 30, 32, 39 und 40 eine vorübergehende, signifikante Abnahme. Eine anhaltende, signifikante Reduktion bot sich hier nicht. Die IgM-Daten sind nicht gezeigt.

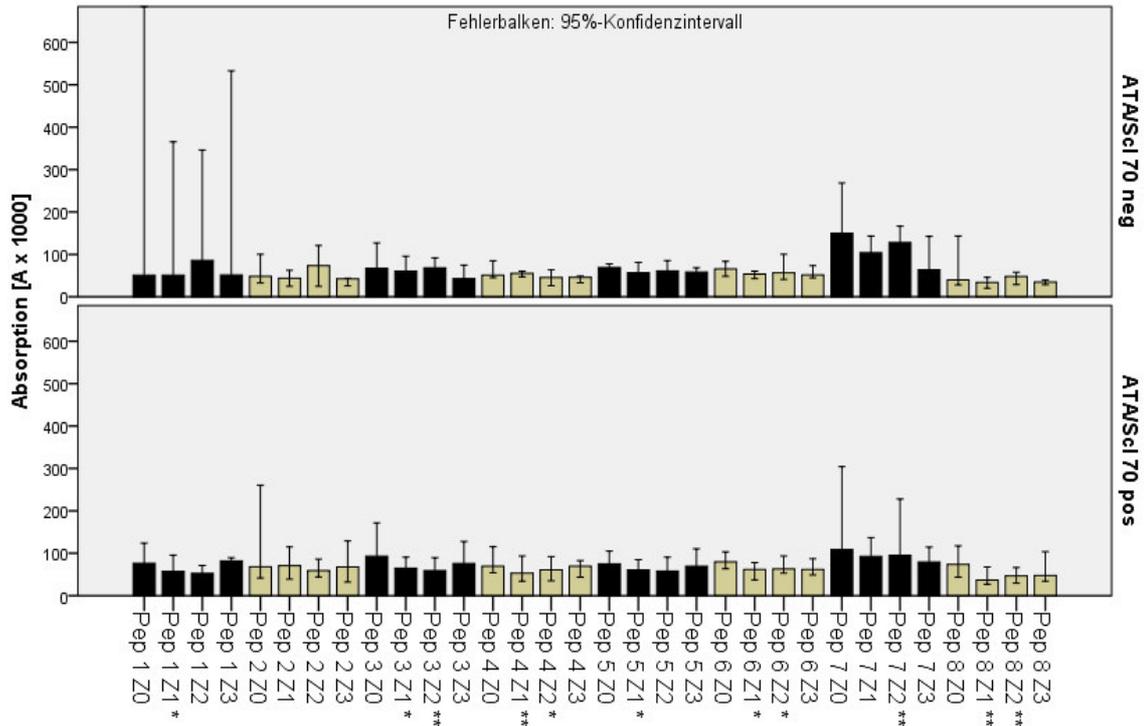


Abb. 3-22A Oberer Wert des Konfidenzintervalls von Pep 1 Z 0 (ATA neg) bei 1065 [A x1000]

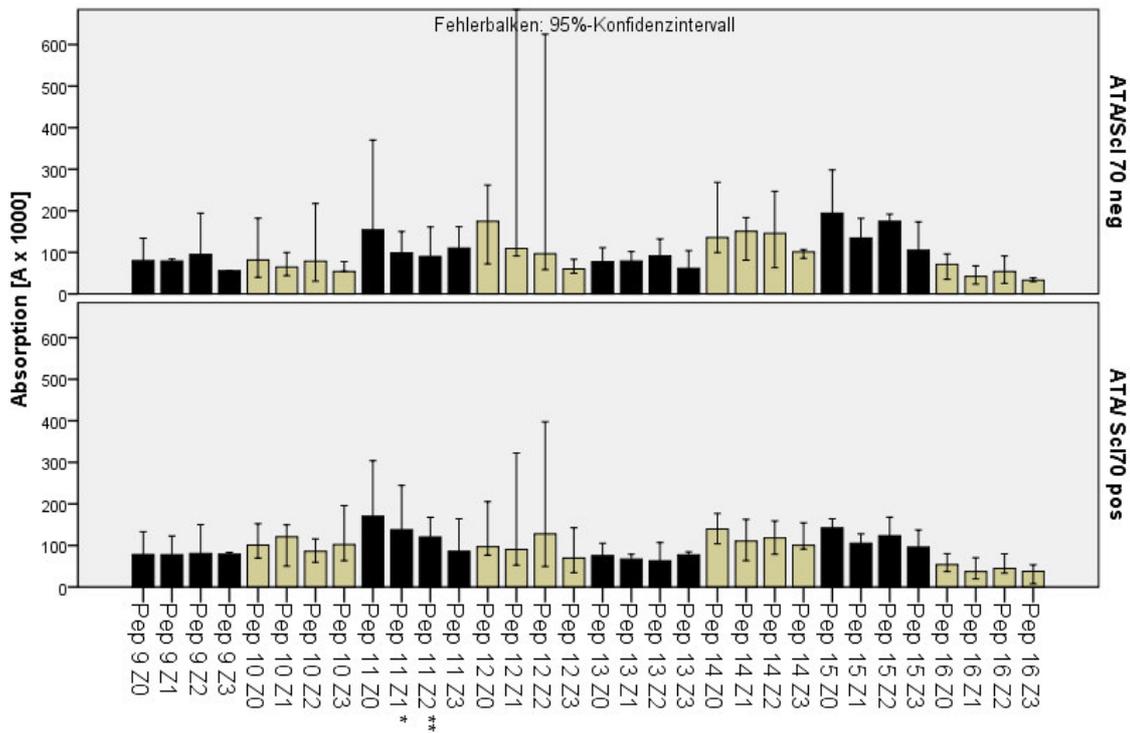


Abb. 3-22B Oberer Wert des Konfidenzintervalls von Pep 12 Z 1 (ATA neg) bei 1848 [A x1000]

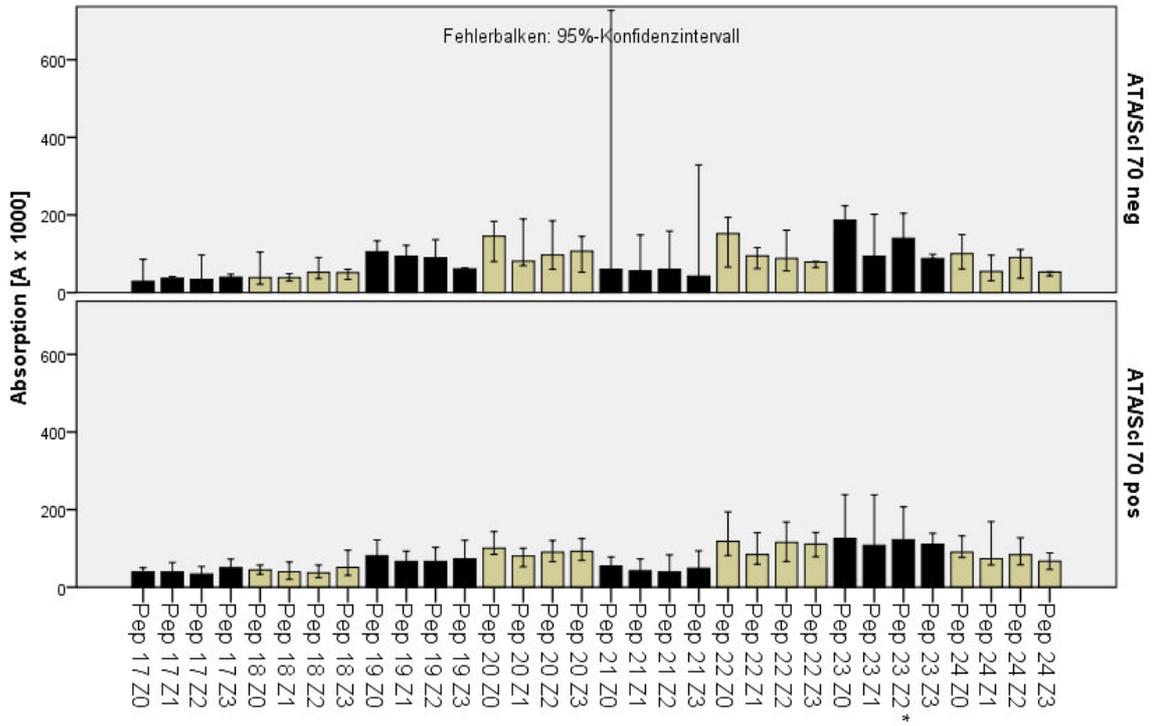


Abb. 3-22C

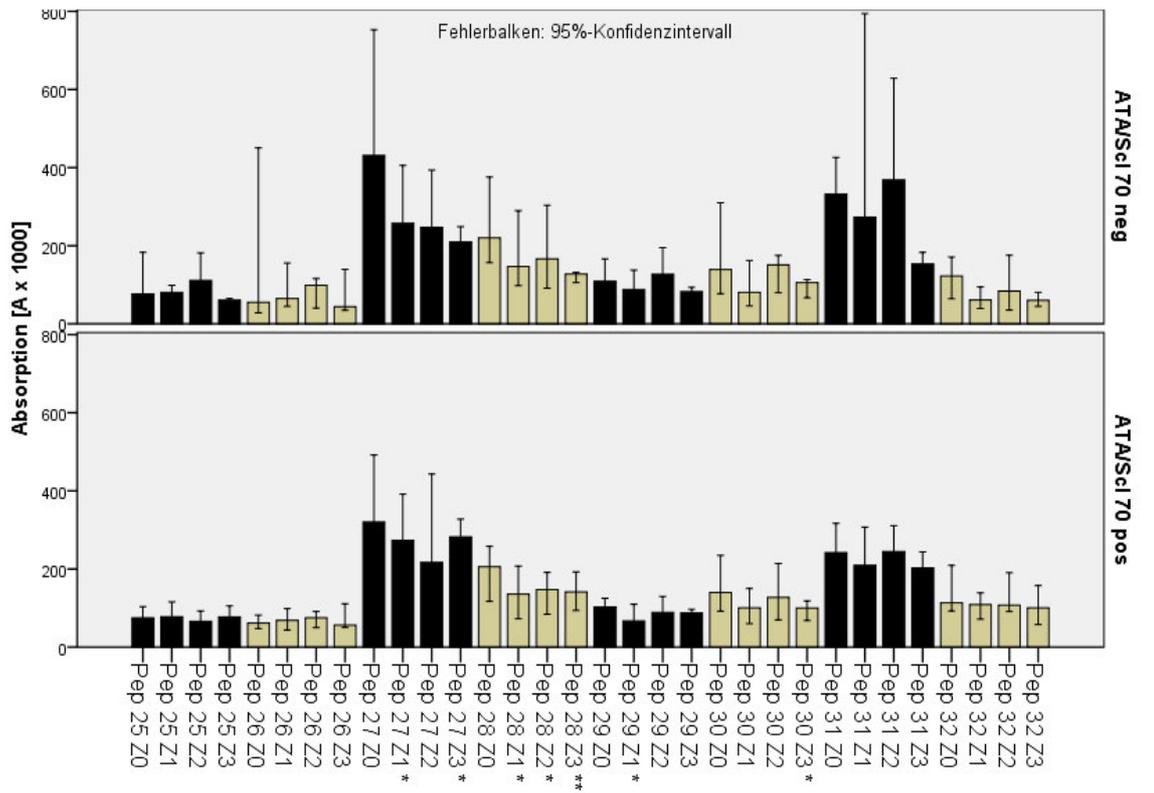


Abb. 3-22D

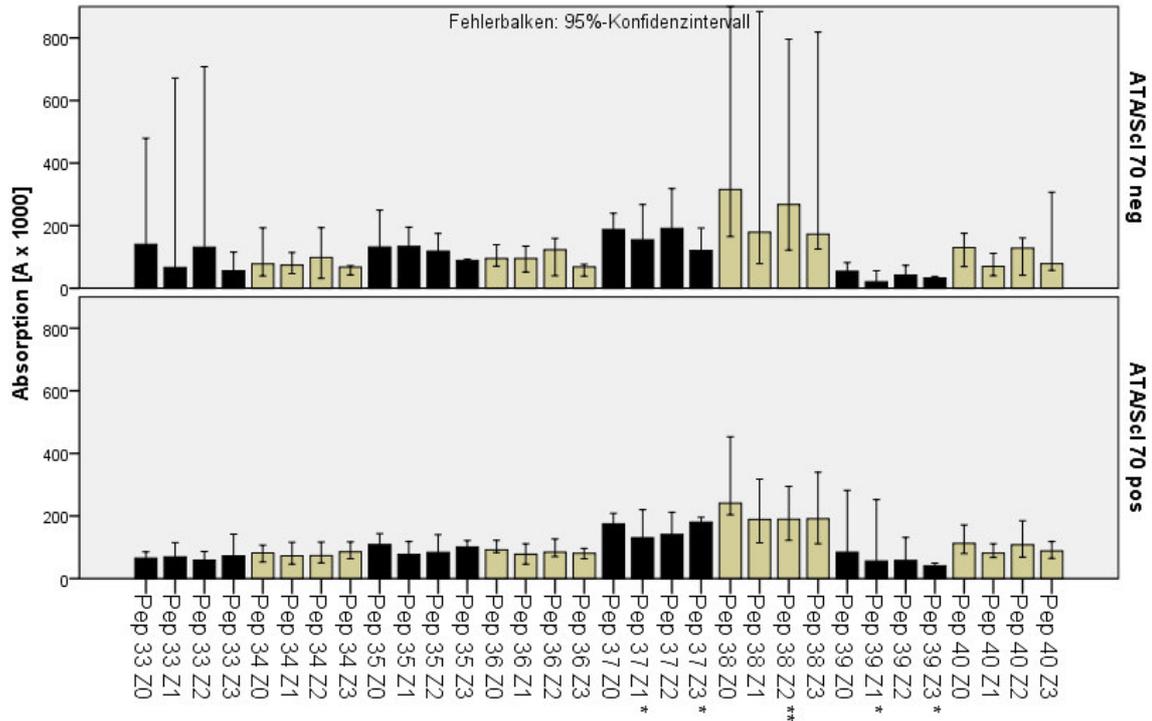


Abb. 3-22E Oberer Wert des Konfidenzintervalls von Pep 38 Z0 (ATA neg) bei 1427 [A x1000]

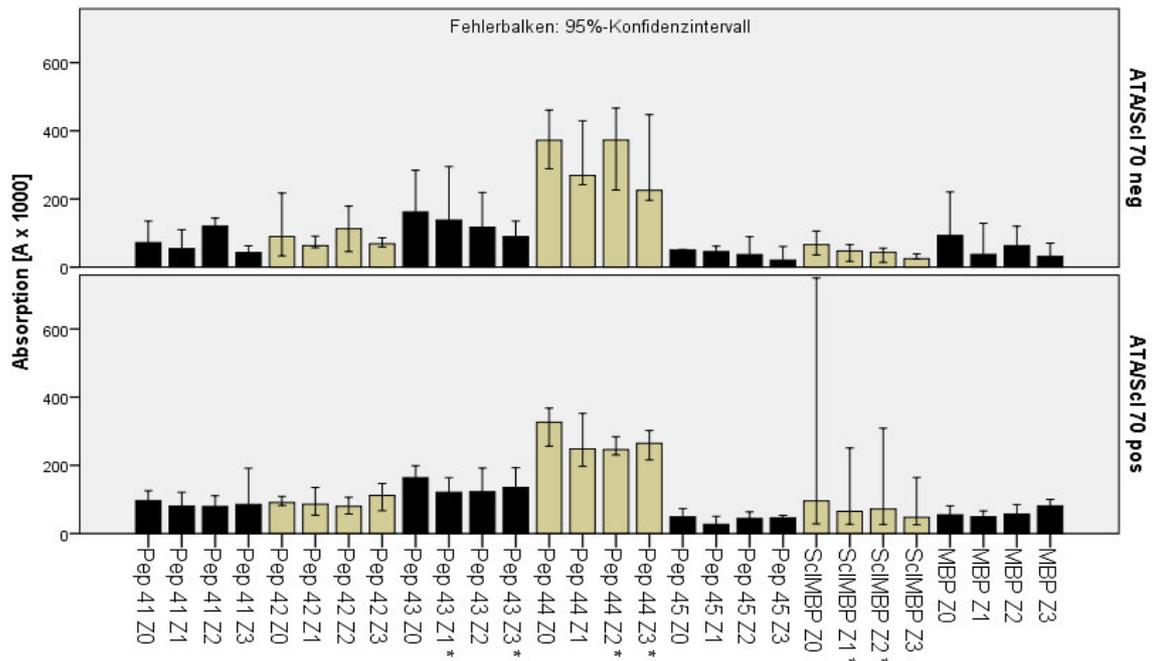


Abb. 3-22F

Abb. 3-22A-F Reaktivitäten von IgG-Antikörpern gegen Peptide der Topoisomerase I bei dcSSc-Patienten vor und nach aHSCT in Relation zum Vorhandensein von ATA/ScI 70-Antikörpern. A) Peptide 1-8, B) Peptide 9-16, C) Peptide 17-24, E) Peptide 25-32, E) Peptide 33-40, F) Peptide 43-45 plus Topo489-573; Z0: vor Therapie, Z1 bis neun Monate, Z2: neun bis 18 Monate, Z3 mehr als 18 Monate nach Therapie. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; (Wilcoxon Signed Rank Test). Balken stellen Mediane, Fehlerbalken 95%iges Konfidenzintervall dar. Pep = Peptid. Z = Zeitpunkt, ATA = Anti-Topoisomerase I-Antikörper, pos = positiv, neg = negativ.

3.5. Nachweis von Antikörpern gegen das immundominante Epitop Topo489-573 in Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen
 3.5.1. Prävalenz verschiedener Kollektive gegen Topo489-573

IgG-Antikörper gegen das immundominante Epitop Topo489-573 waren bei 70% der Patienten mit dcSSc nachweisbar, aber auch in einem hohen Prozentsatz bei Patienten mit anderen ATA-negativen Erkrankungen (Tab. 3-15). Ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit des Vorkommens von Anti-Topo489-573-IgG-AAb fand sich im Vergleich zwischen dcSSc-Patienten und gesunden Probanden. Hinsichtlich IgM-Antikörpern war zwischen den Patientengruppen kein signifikanter Unterschied zu beobachten. Bei aHSCT-Patienten war vor der aHSCT kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit zwischen den ATA/ScI 70-positiven und -negativen Patienten zu beobachten.

Tab. 3-15 Prozentuale Häufigkeiten von Anti-Topo489-573-Antikörpern vom IgG- und IgM-Typ bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen. ** $p < 0,01$ dcSSc im Vergleich zum jeweiligen Kollektiv. (χ^2 -Test).

	dcSSc (n=40)	Herz- beteili- gung (n=11)	IcSSc/ CREST (n=7)	SjS/ MCTD (n=6)	Gesun- de (n=11)	dcSSc- Patienten vor aHSCT (n=21)	
						ATA/ ScI 70 positiv n=16	ATA/ ScI 70 negativ n=5
% positiv							
IgG-Anti- körper	70	46	57	83	9**	69	60
IgM-Anti- körper	40	18	29	50	18	38	20

ATA = Anti-Topoisomerase I-Autoantikörper, dcSSc = diffus kutane Systemische Sklerose, IcSSc = limitiert kutane Systemische Sklerose, Topo I = Topoisomerase I, SjS = Sjögren Syndrom, MCTD = Mischkollagenose.

3.5.2. Reaktivität der Anti-Topo489-573-Antikörper bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen

Bei der Betrachtung der Anti-Topo489-573-AAb-Reaktivitäten der Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen fiel auf, dass die Unterschiede zwischen den dcSSc-Patienten und den übrigen Gruppen deutlich geringer waren, als dies für ATA gegen Topo FL und Tr der Fall war.

Dennoch waren die IgG-Anti-Topo489-573-Reaktivitäten bei den dcSSc-Patienten signifikant höher als bei Patienten mit lcSSc oder bei gesunden Probanden ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$; siehe Abb. 3-23A). Gegenüber den anderen Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied.

Für die IgM-Anti-Topo489-573-Reaktivitäten war kein signifikanter Unterschied zwischen dcSSc-Patienten und Patienten mit anderen Erkrankungen sowie insbesondere auch kein signifikanter Unterschied von dcSSc Patienten zu gesunden Probanden nachweisbar (s. Abb. 3-23B).

Innerhalb der dcSSc-Patienten, bei denen eine aHSCT durchgeführt wurde, bestand kein Unterschied in der Anti-Topo489-573-Reaktivität zwischen ATA/ScI 70-positiven und ATA/ScI 70-negativen Patienten.

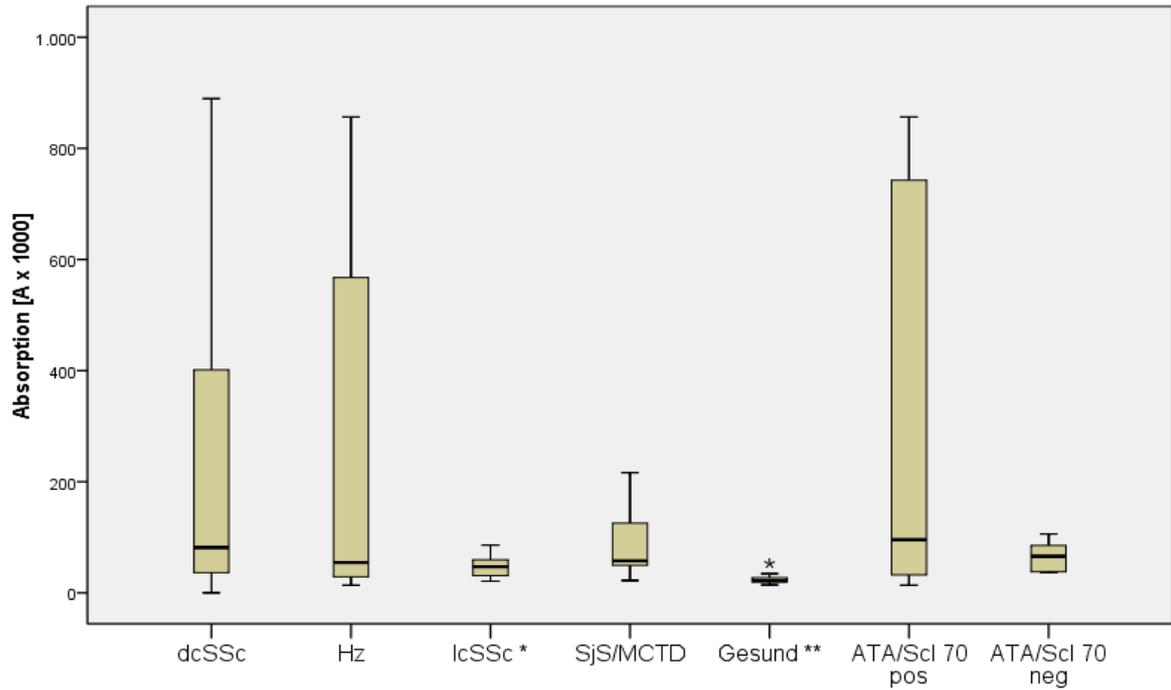


Abb. 3-23A

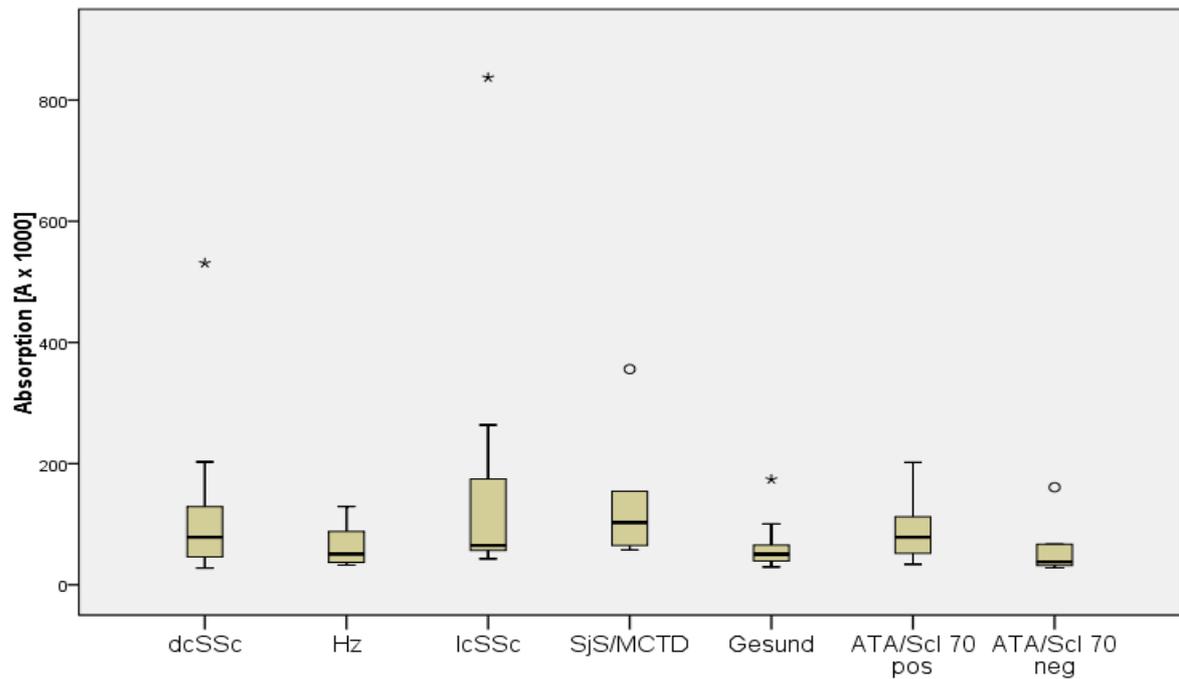


Abb. 3-23B

Abb. 3-23A+B Reaktivität von (A) IgG- und (B) IgM-Antikörpern gegen Topo489-573 bei Patienten mit dcSSc und anderen Erkrankungen dargestellt als Boxplot. Ausreißer (1,5- bis 3-faches der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) sind als Kreise, Extremwerte (mehr als das 3-fache der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) als Kreuze dargestellt. Querbalken stellen Median, 25%- und 75%-Perzentile, T-Balken den maximalen bzw. minimalen Wert dar, der weder Ausreißer noch Extremwert ist. (Signifikanz gegenüber dcSSc: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) Hz = Herzbeteiligung, ATA = Anti-Topoisomerase I-Autoantikörper, dcSSc = diffuse kutane Systemische Sklerose, lcSSc = limitiert kutane Systemische Sklerose, SjS = Sjögren Syndrom, MCTD = Mischkollagenose, pos = positiv, neg = negativ.

3.5.3. Verlauf der Anti-Topo489-573-Antikörper bei dcSSc-Patienten nach aHSCT

3.5.3.1 Häufigkeit

Um größere Gruppen für die statistische Analyse zu schaffen wurden vier Zeitpunkte gewählt: Z0: vor aHSCT (n= 21), Z1: ein bis neun Monate nach aHSCT (n=17), Z2: zehn bis 18 Monate nach aHSCT (n=19), Z3: mehr als 19 Monate nach aHSCT (n=12). Ähnlich wie bei den IgG-AAb gegen Topo FL und Topo Tr zeigte sich keine signifikante Veränderung der Häufigkeiten IgG-Anti-Topo489-573-AAb-positiver Seren unter der Therapie. Die Häufigkeiten IgM-AAb-positiver Seren nahm ab, diese Veränderung war jedoch nicht signifikant.

Tab. 3-16 Häufigkeit von Anti-Topo489-573 Antikörpern vom IgG- und IgM-Typ bei dcSSc-Patienten vor und nach aHSCT

	Vor aHSCT (n=21)	Bis 9 Mon (n=17)	9 Mon – 18 Mon (n=19)	>18 Mon (n=12)
	% positiv			
IgG-Anti- körper	67	65	47	42
IgM-Anti- körper	33	12	32	33

aHSCT = autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation, Mon = Monate.

Tab. 3-17 Häufigkeit Anti-Topo489-573 Antikörpern vom IgG- und IgM-Typ bei ATA/Scl 70-positiven dcSSc-Patienten vor und nach aHSCT

	Vor aHSCT (n=16)	Bis 9 Mon (n=12)	9 Mon – 18 Mon (n=14)	>18 Mon (n=9)
	% positiv			
IgG-Anti- körper	69	67	57	56
IgM-Anti- körper	38	8	29	44

aHSCT = autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation, Mon = Monate.

3.5.3.2 Reaktivität

Die IgG-Anti-Topo489-573-AAb-Reaktivitäten nahmen von Z0 zu den Zeitpunkten Z1 und Z2 signifikant ab, und zwar sowohl im gesamten dcSSc-Kollektiv (Abb. 3-24A) als auch im Kollektiv der Patienten die vor aHSCT ATA/Scl 70-positiv waren (Abb. 3-25A). Auffallend war, dass bei einem Patienten (S23) mit hoher Anti-Topo489-573-Reaktivität, kein Einfluss der aHSCT sichtbar war. Dasselbe Antikörperverhalten war für diesen Patienten bereits für die ATA gegen Topo FL und Tr gezeigt worden (Abb. 3-2A+B).

Die IgM-Anti-Topo489-573-Reaktivitäten wurden weder im gesamten dcSSc-Kollektiv noch bei den ATA/Scl 70-positiven Patienten signifikant durch die aHSCT beeinflusst (Abb. 3-24B, 3-25B+D). Interessant war, dass bei Patient S1, der primär ATA/Scl 70-negativ war, zum Zeitpunkt Z1 ein transienter Anstieg der Reaktivität zu beobachten war. Da dieses Verhalten gegenüber Topo FL und Tr nicht darzustellen war, ist auch ein Messfehler als Erklärung denkbar.

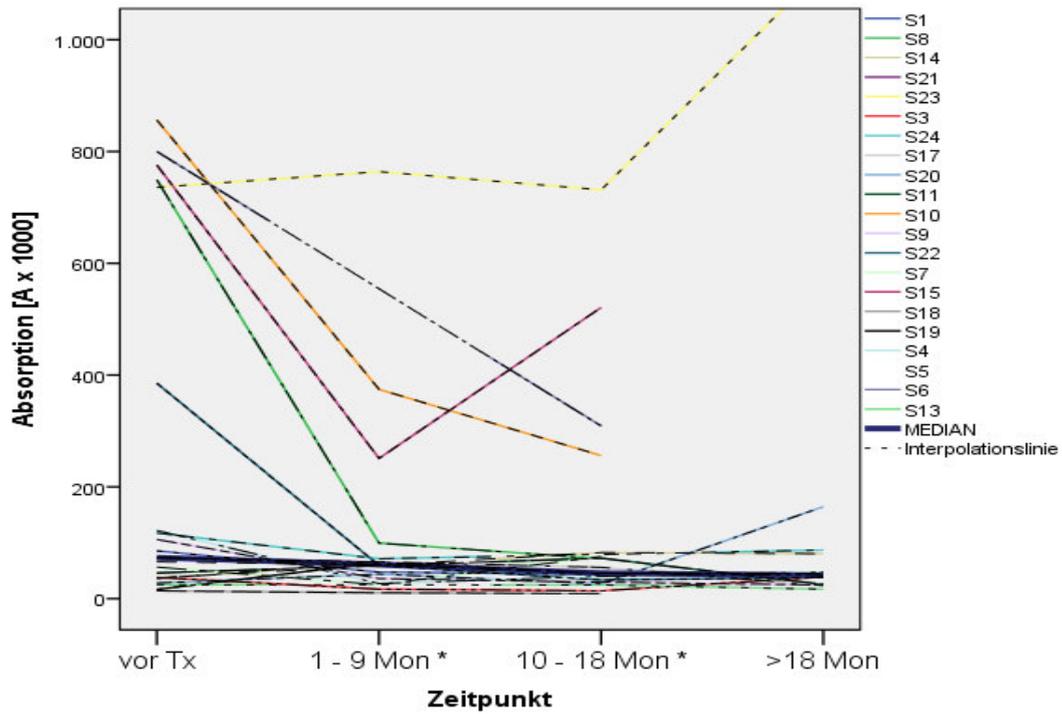


Abb. 3-24A

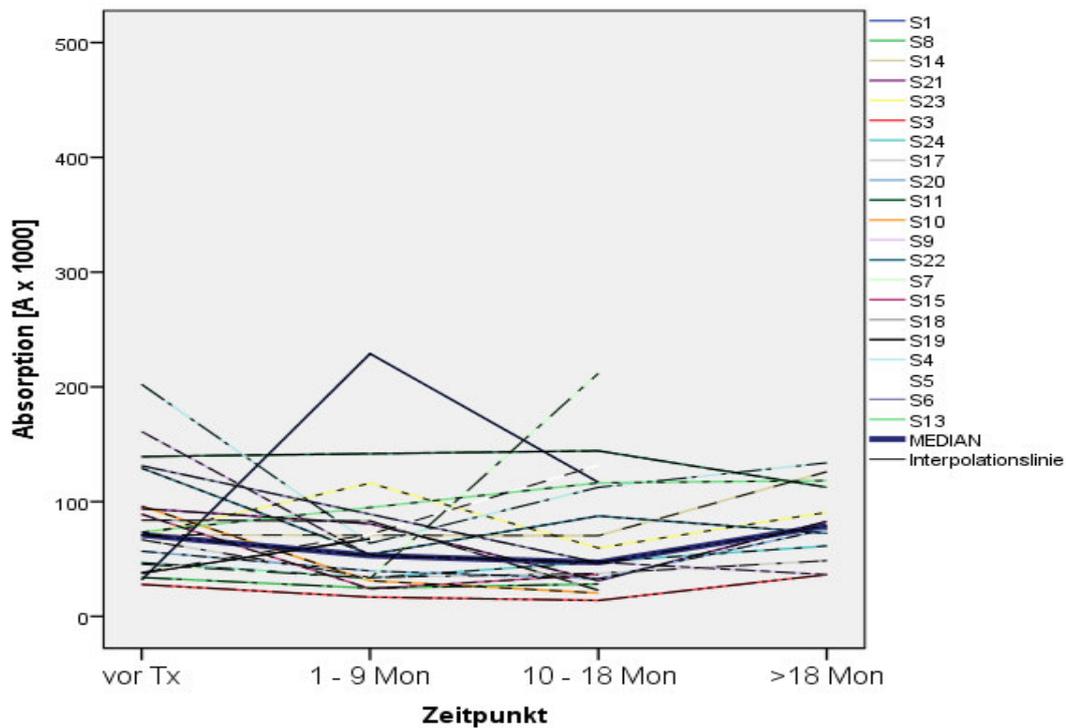


Abb. 3-24B

Abb. 3-42A+B Reaktivität von IgG (A) und IgM-Antikörpern (B) gegen Topo489-573 bei dcSSc-Patienten, bei denen eine aHSCT durchgeführt wurde zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach aHSCT. * $p < 0,05$ Wilcoxon Signed Rank-Test. S = Patient mit Stammzelltransplantation, Mon = Monate, Tx = Therapie.

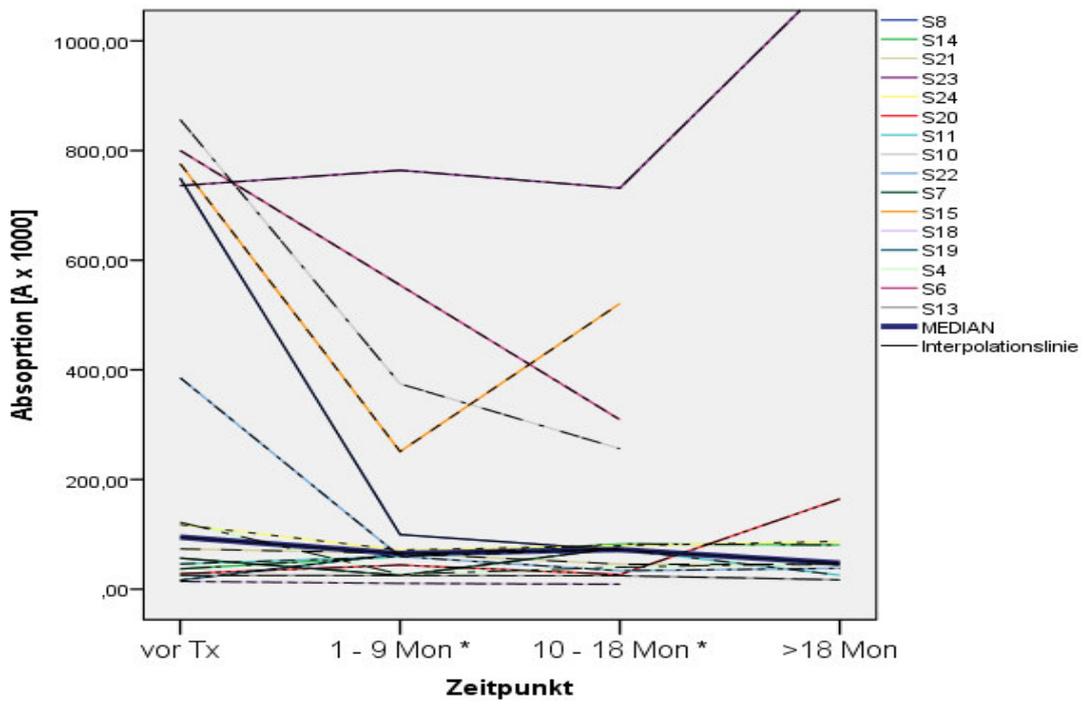


Abb. 3-25A

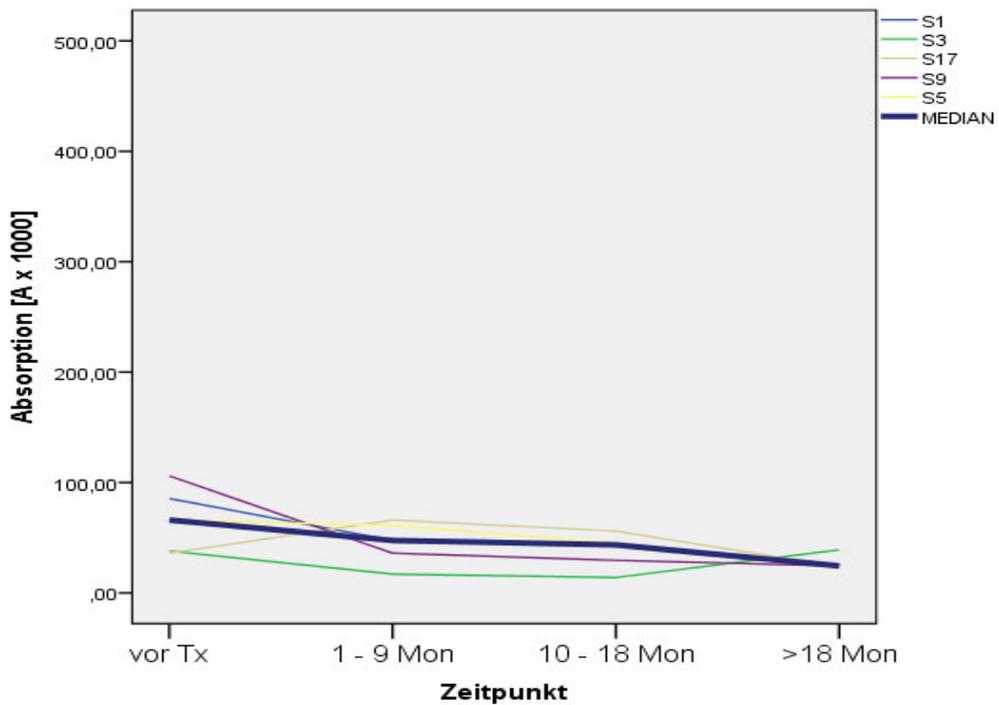


Abb. 3-25B

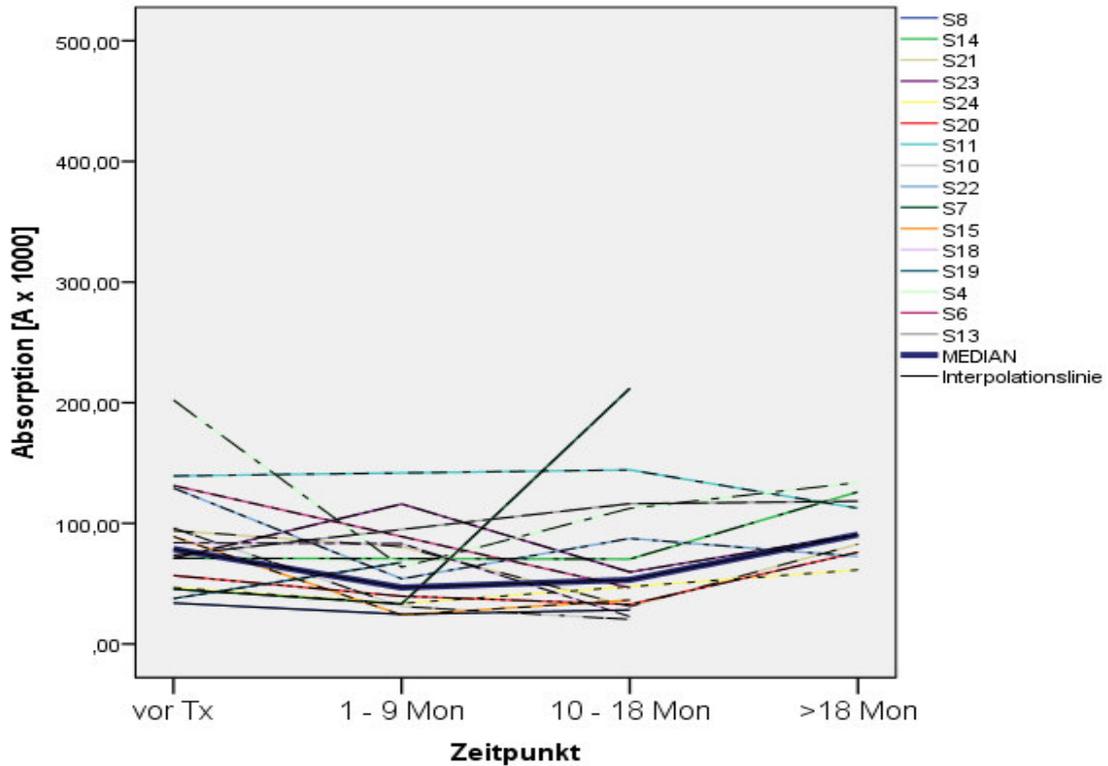


Abb. 3-25C

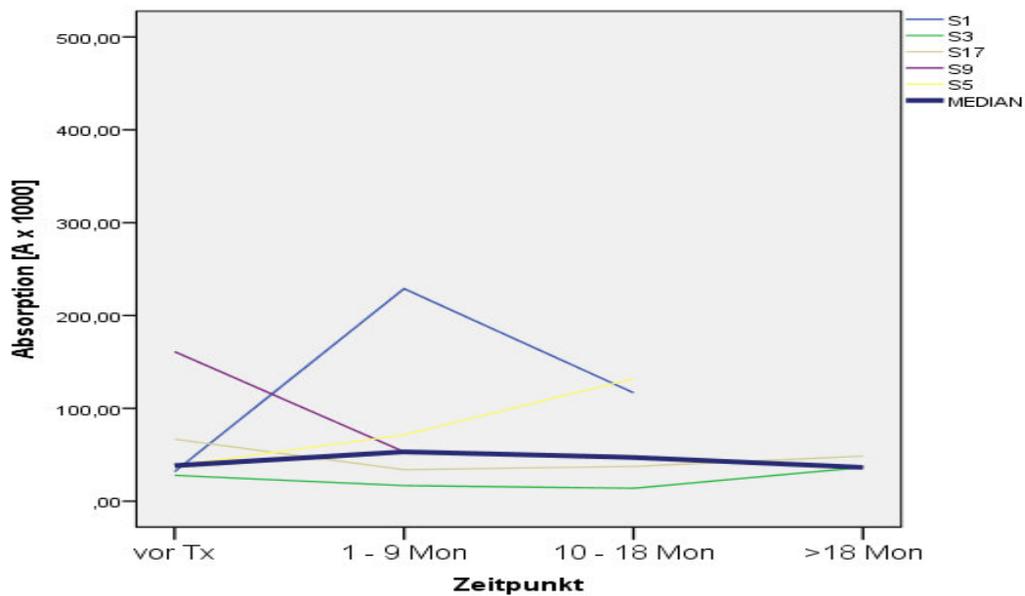


Abb. 3-25D

Abb. 3-25A-D Reaktivität von Antikörpern gegen Topo489-573 bei dcSSc-Patienten, bei denen eine aHSCT durchgeführt wurde zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach aHSCT in Relation zum Nachweis von ATA/ScI 70-Antikörpern vor der aHSCT. Dargestellt sind die Anti-Topo489-573-Antikörper vom IgG (A) und IgM-Typ (C) bei ATA/ScI 70-positiven Patienten sowie die Anti-Topo489-573-Antikörper vom IgG (B) und IgM-Typ (D) bei ATA/ScI 70-negativen Patienten. * $p < 0,05$, Wilcoxon Signed Rank-Test. S = Patient mit Stammzelltransplantation, Mon = Monate, Tx = Therapie.

3.5.4. Korrelation der Anti-Topo489-573-Antikörper mit dem klinischen Verlauf nach aHSCT

Die Patienten, die sich einer autologen Stammzelltransplantation unterzogen, wurden wie unter Abschnitt 3.3 beschrieben in zwei Gruppen hinsichtlich des Outcomes nach aHSCT unterteilt. Patienten der Gruppe 2 (schlechteres Outcome) hatten mit 80% häufiger Anti-Topo489-573-AAb vom IgG-Typ als Patienten der Gruppe 1 (gutes Ansprechen) mit 55% (Tab. 3-18) Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p=0,217$; χ^2 -Test). Gleiches galt für IgM-Anti-Topo489-573-AAb ($p=0,537$) Die IgG-Anti-Topo489-573-AAb-Reaktivitäten vor aHSCT waren bei Patienten der Gruppe 2 höher als bei solchen der Gruppe 1, jedoch nicht signifikant höher ($p=0,078$; MWU). Bei der Höhe der IgM-AAb-Reaktivitäten zeigte sich kein relevanter Unterschied (Abb. 3-26).

Tab. 3-18 Häufigkeiten der IgG- und IgM-Anti-Topo489-573-Antikörper vor aHSCT in Relation zum Ansprechen auf die aHSCT.

	Gutes Ansprechen Gruppe 1 (n=11)		Schlechtes Ansprechen Gruppe 2 (n=10)	
Antikörper	IgG	IgM	IgG	IgM
% positiv	55	27	80	40

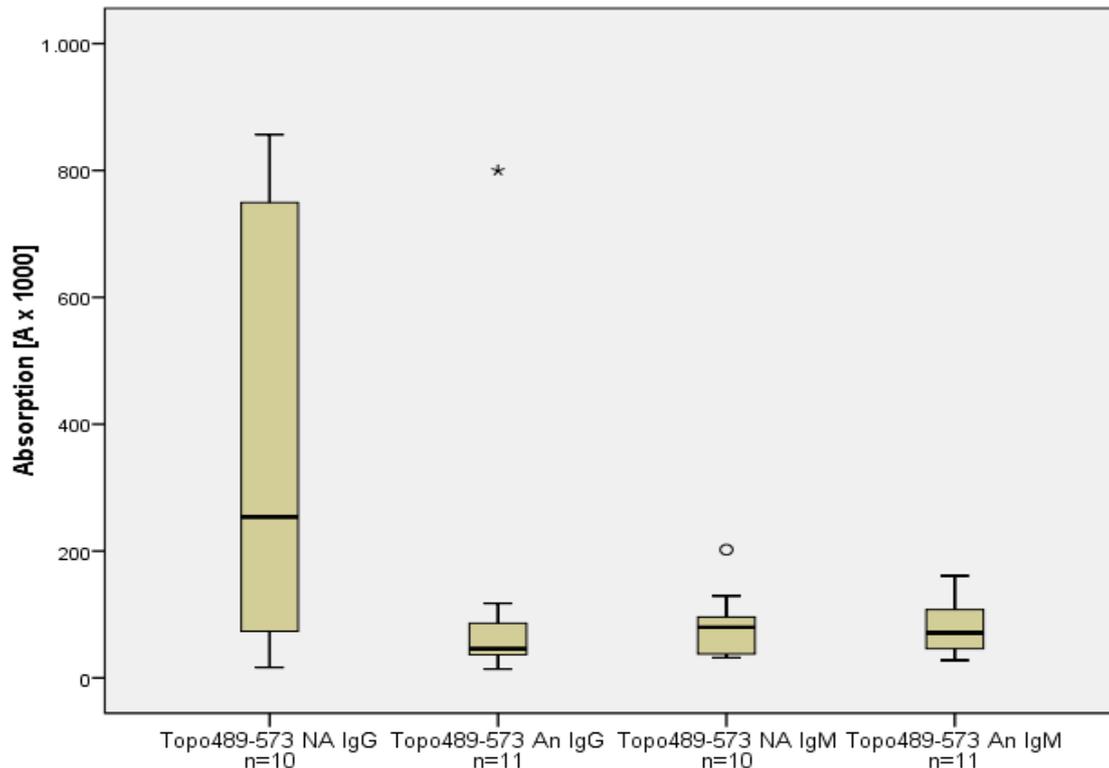


Abb. 3-26 Boxplots der IgG- und IgM-AAb-Reaktivitäten gegen Topo489-573 des dcSSc Kollektivs, das sich einer HSCT-Therapie unterzog. Zeitpunkt vor Beginn der Therapie.

Ausreißer (1,5- bis 3-faches der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) sind als Kreise, Extremwerte (mehr als das 3-fache der Boxbreite über oder unter der 75% bzw. 25%-Perzentile) als Kreuze dargestellt. Querbalken stellen Median, 25%- und 75%-Perzentile, T-Balken den maximalen bzw. minimalen Wert dar, der weder Ausreißer noch Extremwert ist. NA = Nicht-Ansprechen, An = Ansprechen, Topo = Topoisomerase I.

3.6. Analyse der Korrelationen zwischen den verschiedenen Topo-I-Antikörpern

Korrelationen zwischen den Antikörperreaktivitäten gegenüber den verschiedenen Topoisomerase I-Antigenen einschließlich der Peptide wurden mit Hilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten r bzw. des Bestimmtheitsmaßes R^2 ermittelt. Angesichts deutlicher Ausreißerwerte und –insbesondere bei den Topo I-Peptid-AAb– eher schwacher Korrelationen, wurde zusätzlich der Rangkorrelationskoeffizient Rho nach Spearman errechnet.

3.6.1. Korrelation zwischen Antikörpern gegen Topo Tr und Topo FL

Zwischen den Topoisomeraseantigenen ließen sich mit unterschiedlichen Methoden signifikante Korrelationen ermitteln. Insbesondere korrelierten die IgG-AAb von Topo FL und Topo Tr sehr stark miteinander (Korrelationskoeffizient nach Pearson $r = 0,98$; Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,91$; Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman $Rho = 0,93$). Die Korrelationen von IgG- mit IgM-AAb (auch desselben Antigens) sind ebenfalls signifikant, jedoch schwächer, während zwischen den IgM-AAb der beiden Topo-Antigene eine starke Korrelation besteht siehe Tab. 3-19 bis 3-21.

Tab. 3-19 Korrelationskoeffizient r nach Pearson für IgG- und IgM-Autoantikörper gegen die beiden Topoisomerase I-Antigene analysiert bei 56 dcSSc Patienten.

Pearson r		FL IgG	Tr IgG	FL IgM	Tr IgM
FL IgG	Pearson-Korrelation	1,00	0,96	0,45	0,40
	Sig. (2-seitig)		<0,001	<0,001	0,002
Tr IgG	Pearson-Korrelation	0,96	1,00	0,44	0,43
	Sig. (2-seitig)	<0,001		0,001	0,001
FL IgM	Pearson-Korrelation	0,45	0,44	1	0,90
	Sig. (2-seitig)	<0,001	0,001		<0,001
Tr IgM	Pearson-Korrelation	0,40	0,43	0,9	1,00
	Sig. (2-seitig)	0,002	0,001	<0,001	

FL = full length; Tr = truncated; Sig. = Signifikanz.

Tab. 3-20 Bestimmtheitsmaß R^2 für IgG- und IgM-Autoantikörper gegen die beiden Topoisomerase I-Antigene analysiert bei 56 dcSSc Patienten.

Bestimmtheitsmaß R^2	FL IgG	Tr IgG	FL IgM	Tr IgM
FL IgG	1,00	0,91	0,20	0,16
Tr IgG	0,91	1,00	0,20	0,18
FL IgM	0,20	0,20	1,00	0,80
Tr IgM	0,16	0,18	0,80	1,00

FL = full length; Tr = truncated; Sig. = Signifikanz.

Tab. 3-21 Rangkorrelationskoeffizient Rho nach Spearman für IgG- und IgM-Autoantikörper gegen die beiden Topoisomerase I-Antigene analysiert bei 56 dcSSc Patienten. (FL = full length; Tr = truncated; Sig. = Signifikanz)

Spearman-Rho		FL IgG	Tr IgG	FL IgM	Tr IgM
FL IgG	Rho	1,00	0,93	0,66	0,54
	Sig. (2-seitig)		<0,001	<0,001	<0,001
Tr IgG	Rho	0,93	1,00	0,67	0,61
	Sig. (2-seitig)	<0,001		<0,001	<0,001
FL IgM	Rho	0,66	0,67	1,00	0,93
	Sig. (2-seitig)	<0,001	<0,001		<0,001
Tr IgM	Rho	0,54	0,61	0,93	1,00
	Sig. (2-seitig)	<0,001	<0,001	<0,001	

FL = full length; Tr = truncated; Sig. = Signifikanz.

Die Stärke der jeweiligen Korrelationen zeigte sich auch in den Streudiagrammen. In der grafischen Darstellung von Topo Tr- und Topo FL-IgG-AAb im Streudiagramm, ergab sich, wie angesichts der Korrelationskoeffizienten zu erwarten, ein schmaler Bereich, in dem sich die Punkte verteilten (Abb. 3-27A-D). Ausreißer kamen kaum vor; lediglich das Serum eines Patienten mit Herzbeteiligung (Patient Hz1) wies einen deutlichen Unterschied zwischen der Reaktivität gegenüber Topo FL (1506 A x 1000) und Topo Tr (776 A x 1000) auf. Die Verteilung von Topo FL-IgM gegenüber Topo Tr-IgM ergab ebenfalls eine signifikante, starke Korrelation. Ähnlich wie bei den IgG-AAb fanden sich nur wenige Ausreißer. Zu nennen sind hier die Seren der Patienten S12 (1041 A x 1000 [Topo FL]/ 540 A x 1000[Topo Tr]) sowie Hz6 (96/456 A x 1000). Sowohl im Vergleich der Reaktivitäten der Topo FL IgG-AAb mit den Topo FL-IgM-AAb, als auch der Topo Tr IgG-AAb mit den Topo Tr-IgM-AAb ergab sich eine zwar noch signifikante, jedoch schwache Korrelation mit deutlich größerer Anzahl an Ausreißern. Insbesondere bestanden in beiden Fällen für viele Seren hohe IgG-AAb-Titer, während die IgM-Titer niedrig waren.

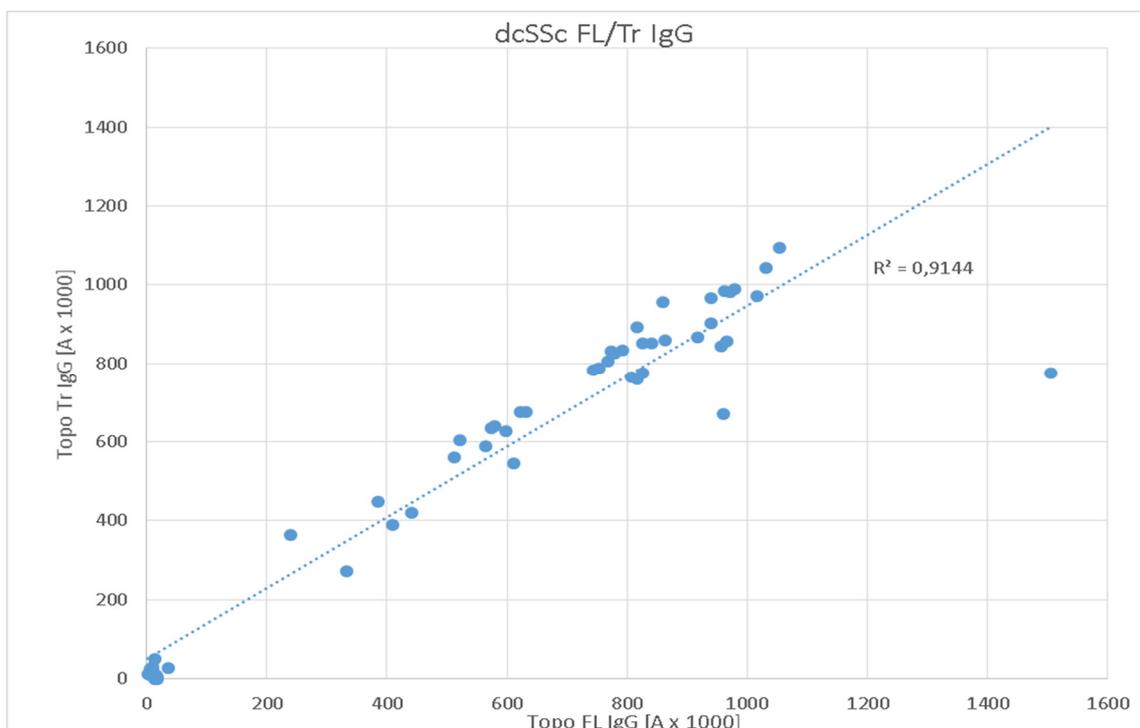


Abb. 3-27A

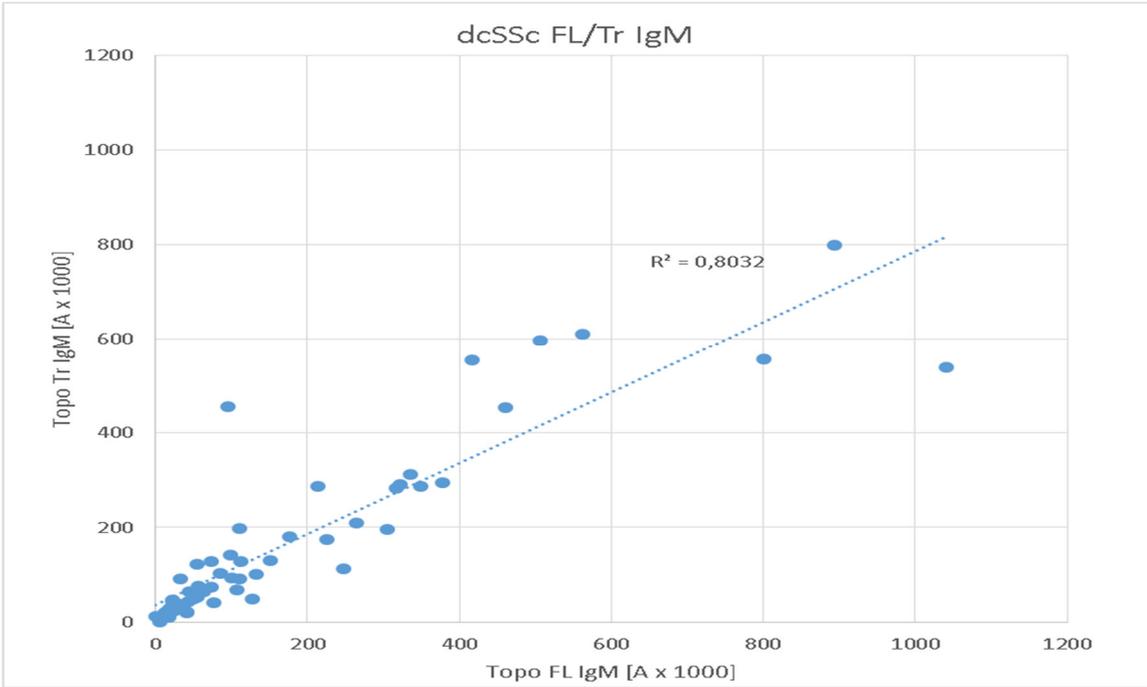


Abb. 3-27B

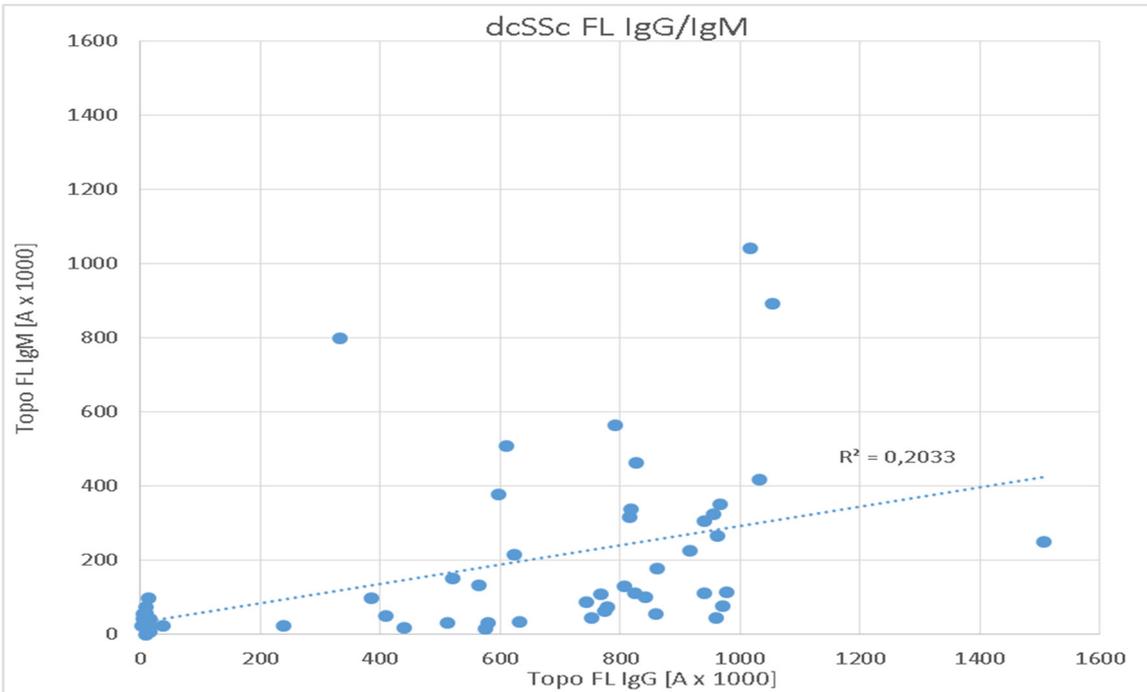


Abb. 3-27C

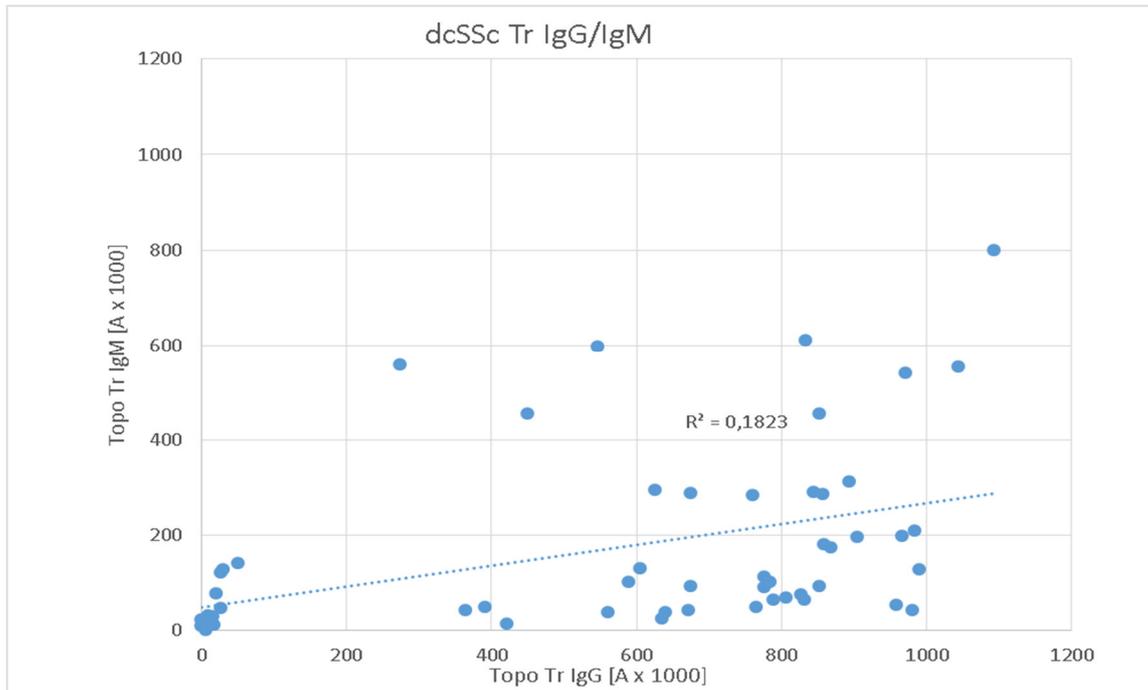


Abb. 3-27D

Abb. 3-27A-D Streudiagramme für IgG- und IgM-AAb gegen Topoisomerase I-Antigene bei 56 dcSSc Patienten. A) Topo Tr-IgG-AAb gegen Topo FL-IgG-AAb aufgetragen. B) Topo Tr-IgM gegen Topo FL-IgM. C) Topo FL-IgG gegen Topo FL-IgM. D) Topo Tr-IgG gegen Topo Tr-IgM. Topo = Topoisomerase I, FL = full length, Tr= Truncated, R^2 =Bestimmtheitsmaß, dcSSc = diffuse kutane Systemische Sklerose.

Ähnliche Befunde ergaben sich bei der Analyse der Antikörper im Kollektiv der 18 ATA/Scl 70-positiven dcSSc-Patienten, bei denen eine aHST durchgeführt wurde. Die stärkste Korrelation (Pearson $r = 0,99$; $R^2=0,99$) fand sich zwischen den IgG-AAb-Reaktivitäten gegen beide Topo I-Antigene. Eine ebenfalls starke Korrelation miteinander boten die IgM-Reaktivitäten gegen die beiden Topo I-Antigene. Die IgM- und IgG-AAb gegen die jeweiligen Antigene korrelierten nicht signifikant miteinander (Pearson r). Mittels des Rangkorrelationskoeffizienten Spearman Rho ließen sich für nahezu alle oben genannten Fälle signifikante Korrelationen ermitteln, lediglich die Korrelation zwischen Topo Tr-IgG- und Topo Tr-IgM-AAb war nicht signifikant. Anders als im Gesamtkollektiv der dcSSc-Patienten ist bei den ATA/Scl 70-positiven Patienten der Rangkorrelationskoeffizient der IgM-AAb gegen beide Topo I-Antigene sogar geringfügig höher als der entsprechende der IgG-AAb (Rho = 0,94 bzw Rho = 0,93).

Tab. 3-22 Korrelationskoeffizient r nach Pearson für IgG- und IgM-Autoantikörper gegen die beiden Topoisomerase I-Antigene analysiert bei 18 ATA/Scl 70-positiven dcSSc-Patienten, bei denen eine aHSCt durchgeführt wurde.

Pearson r		FL IgG	Tr IgG	FL IgM	Tr IgM
FL IgG	Pearson Korrelation	1,00	0,99	0,42	0,40
	Sig. (2-seitig)		<0,001	0,087	0,099
FL IgM	Pearson Korrelation	0,42	0,37	1,00	0,86
	Sig. (2-seitig)	0,087	0,126		<0,001
Tr IgG	Pearson Korrelation	0,99	1,00	0,37	0,38
	Sig. (2-seitig)	<0,001		0,126	0,118
Tr IgM	Pearson Korrelation	0,40	0,38	0,86	1,00
	Sig. (2-seitig)	0,099	0,118	<0,001	

FL = full length; Tr = truncated; Sig. =Signifikanz

Tab. 3-23 Bestimmtheitsmaß R^2 für IgG- und IgM-Autoantikörper gegen die beiden Topoisomerase I-Antigene analysiert bei 18 ATA/Scl 70-positiven dcSSc-Patienten, bei denen eine aHSCt durchgeführt wurde.

Bestimmtheitsmaß R^2		FL IgG	Tr IgG	FL IgM	Tr IgM
FL IgG	R^2	1,00	0,99	0,17	0,16
FL IgM	R^2	0,17	0,14	1,00	0,74
Tr IgG	R^2	0,99	1,00	0,14	0,15
Tr IgM	R^2	0,16	0,15	0,74	1,00

FL = full length; Tr = truncated; Sig. =Signifikanz

Tab. 3-24 Rangkorrelationskoeffizient Rho nach Spearman gegen die beiden Topoisomerase-Antigene analysiert bei 18 ATA/Scl 70 positiven dcSSc-Patienten, bei denen eine aHSCT durchgeführt wurde.

Spearman-Rho		FL IgG	Tr IgG	FL IgM	Tr IgM
FL IgG	Rho	1,00	0,93	0,66	0,53
	Sig. (2-seitig)		<0,001	0,003	0,025
FL IgM	Rho	0,66	0,51	1,00	0,94
	Sig. (2-seitig)	0,003	0,030		<0,001
Tr IgG	Rho	0,93	1,00	0,51	0,40
	Sig. (2-seitig)	<0,001		0,030	0,099
Tr IgM	Rho	0,53	0,40	0,94	1,00
	Sig. (2-seitig)	0,025	0,099	<0,001	

FL = full length; Tr = truncated; Sig. = Signifikanz

Die Streudiagramme der IgG-AAb-Reaktivitäten gegen die Topo I-Antigene der 18 ATA/Scl 70 positiven dcSSc-Patienten vor aHSCT wiesen eine homogene Verteilung ohne relevante Ausreißer auf. Bei den IgM-AAb zeigten sich insbesondere in den höheren Reaktivitätsbereichen einige Ausreißer (Abb. 3-28 A-D). Zwischen IgM- und IgG-AAb ergab sich ein ähnliches Bild wie bereits oben für das gesamte dcSSc-Kollektiv beschrieben: Insbesondere fielen Patientenseren mit hohen IgG-Reaktivitäten, jedoch ohne die entsprechenden IgM-Reaktivitäten auf.

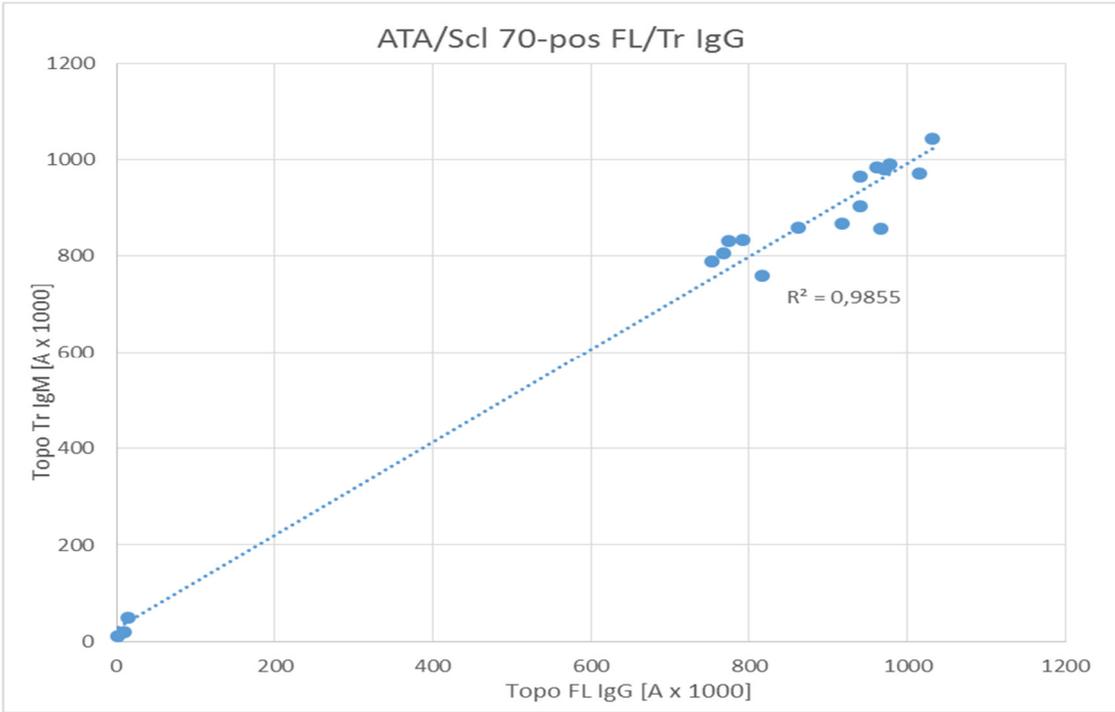


Abb. 3-28A

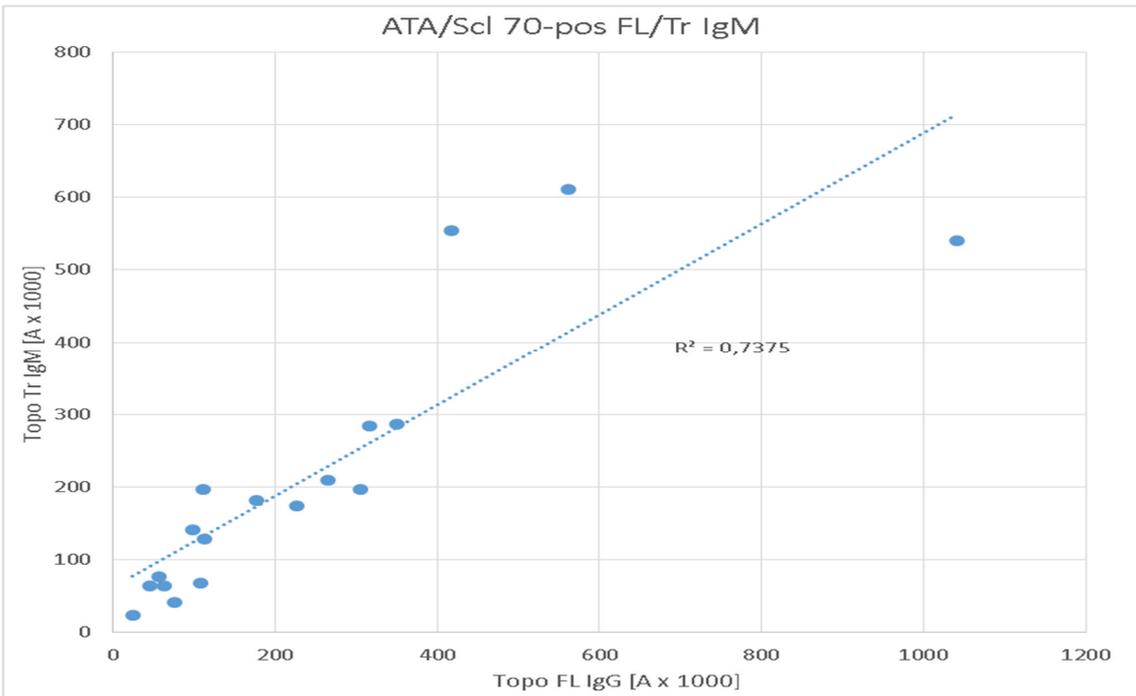


Abb. 3-28B

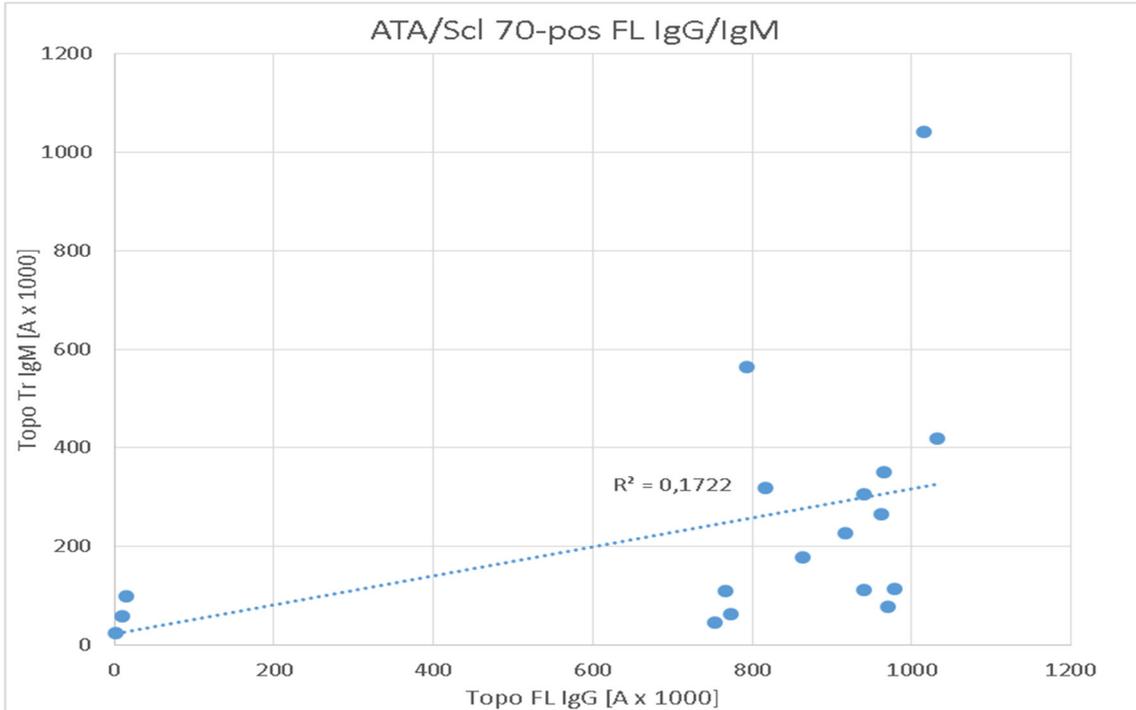


Abb. 3-28C

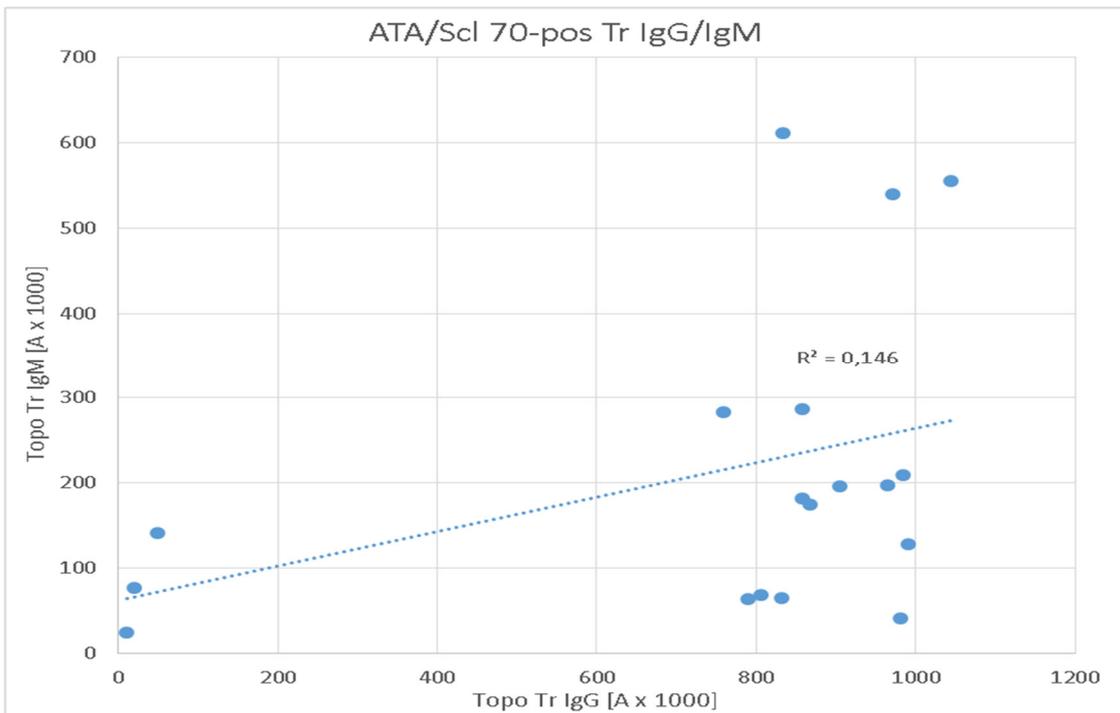


Abb. 3-28D

Abb. 6-28A-D Streudiagramme für IgG- und IgM-AAb gegen Topoisomerase I-Antigene bei 18 ATA/Scl 70-positiven dcSSc-Patienten, bei denen eine aHSCT durchgeführt wurde. A) Topo Tr-IgG-AAb gegen Topo FL-IgG-AAb aufgetragen. B) Topo Tr-IgM gegen Topo FL-IgM. Abb. C) Topo FL-IgM gegen Topo FL-IgG. D) Topo Tr-IgM gegen Topo Tr-IgG. Topo = Topoisomerase I, FL = full length, Tr = truncated, R^2 = Bestimmtheitsmaß, ATA = Anti-Topoisomerase I-Antikörper.

3.6.2. Korrelation von Anti-Topo FL und Tr-Antikörpern mit Antikörpern gegen Peptide der Topoisomerase I

Die Korrelationen der ATA (FL und Tr) mit den Anti-Peptid-AAb wurden ebenfalls mittels Pearson-Korrelationskoeffizient und dem Bestimmtheitsmaß R^2 einerseits sowie dem Rangkorrelationskoeffizienten Rho nach Spearman andererseits ermittelt.

Bei den dcSSc-Patienten fand sich eine schwache Korrelation zwischen den IgG-AAb-Reaktivitäten gegen Topo FL bzw. Topo Tr und denen gegen Peptid 2 und 3 ($r=0,33$ bzw. $r=0,34$), ferner eine reziproke Korrelation mit Antikörpern gegen das Peptid 33 (Abb. 3-29A). Das Bestimmtheitsmaß der Korrelation der ATA-Reaktivitäten mit den Antikörperreaktivitäten gegen die Peptide 2 und 3 war mit 0,11 bzw. 0,12 (FL und Tr) sehr gering (Abb. 3-30A).

Die Analyse der IgM-AAb-Reaktivitäten der dcSSc-Patientenserum mittels Pearson-Korrelationskoeffizient r ergab signifikante Korrelationen von Anti-Topo FL-Antikörpern mit Antikörpern gegen die Peptide 2-14, 21, 24, 27, 28, 37 und 45. (Abb. 3-29B). Das Bestimmtheitsmaß R^2 war im Vergleich von Anti-Topo FL-AAb mit Anti-Peptid 2- und 3-Antikörper am höchsten ($R^2=0,415$ bzw. $R^2=0,341$). Signifikante Korrelationen ließen sich mit Pearsons r zwischen den Anti-Topo Tr-AAb-Reaktivitäten und den Antikörperreaktivitäten gegen die Peptide 2, 3, 4, 5, 9, 11, 14, 23, 24, 37 und 45 ermitteln. Das Bestimmtheitsmaß war zwischen den Anti-Topo Tr-AAb-Reaktivitäten und den Reaktivitäten gegen Peptid 2 und 45 am höchsten ($R^2=0,35$, bzw. $R^2=0,34$) (Abb. 3-30B).

Bei der Analyse der 16 ATA/Scl 70-positiven Patienten, bei denen eine aHSCt durchgeführt wurde, zeigte sich für IgG-AAb eine signifikante, jedoch reziproke Korrelation der Antikörperreaktivitäten gegenüber beiden Topo I-Antigene (Topo Tr und FL) mit Antikörpern gegen das Peptid 24 (Abb. 3-29C). Das Bestimmtheitsmaß (R^2) der reziproken Korrelation lag bei $R^2=0,52$ bzw. $R^2=0,53$ (Abb. 3-30C). Für IgM-AAb Reaktivitäten zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen den Antikörperreaktivitäten gegen beide Topo I-Antigene mit Antikörpern gegen die Peptiden 2, 3, 14 und 27, ferner eine Korrelation von Anti-Topo FL-Antikörpern mit Antikörpern gegen Peptid 5 (Abb. 3-29D). Die Bestimmtheitsmaße der beiden o.g. starken Korrelationen waren entsprechend

die höchsten ($R^2=0,67$ für Peptid 3 und Topo FL). Bestimmtheitsmaße von $R^2>0,3$ bestehen ferner für die Korrelationen mit Antikörpern gegen die Peptide 2, 3, 27 (Abb. 3-30D).

Zur weiteren Einordnung wurde der Spearman Rangkorrelationskoeffizient (Rho) bestimmt. Werden hiermit die IgG-AAb der 40 dcSSc Patienten analysiert, so ergeben sich signifikante, jedoch schwache Korrelationen von Antikörpern gegen Topo FL mit Antikörpern gegen die Peptide 5, 16, 31 und 39; ferner bestehen signifikante, schwache Korrelationen von Anti-Topo Tr-Antikörpern mit den Antikörpern gegen die Peptide 5 und 39 (Abb. 3-31A). Für die IgM-AAb zeigen sich mittels des Rangkorrelationskoeffizienten signifikante Korrelationen von Anti-Topo FL-Antikörpern mit Antikörpern gegen nahezu alle Peptide der Topoisomerase mit Ausnahme der Peptide 16, 18, 20 und 42. Korrelationen mittlerer Stärke ($0,5 < \text{Rho} < 0,7$) finden sich für Anti-Topo FL-Antikörper und Antikörper gegen die Peptide 2, 3, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 19, 29, 30, 41, starke Korrelationen für Antikörper gegen die Peptide 5 ($\text{Rho} = 0,8$) und 45 ($\text{Rho} = 0,71$); Ähnliche Korrelationen werden von IgM-AAb gegen Topo Tr mit den Anti-Peptid-Antikörpern nachgewiesen (Abb. 3-31B).

Korreliert man mittels des Korrelationskoeffizienten Rho nach Spearman die IgG-Anti-Topo FL-Antikörper bei den 16 Patienten mit ATA/Scl 70-positiver dcSSc, bei denen eine aHSCT durchgeführt wurde, ergaben sich mittels Korrelationskoeffizienten Rho reziproke Korrelationen der IgG-Anti-Topo FL-AAb mit Antikörpern gegen die Peptide 7 und 24 (Abb. 3-31C). Für IgM-AAb zeigten sich signifikante Korrelationen der Antikörper gegen beide Topo-Antigene mit den Peptiden 2, 5, 9, 11 und 14, sowie zusätzlich von Anti-Topo FL Antikörpern mit Antikörpern gegen Peptid 3.

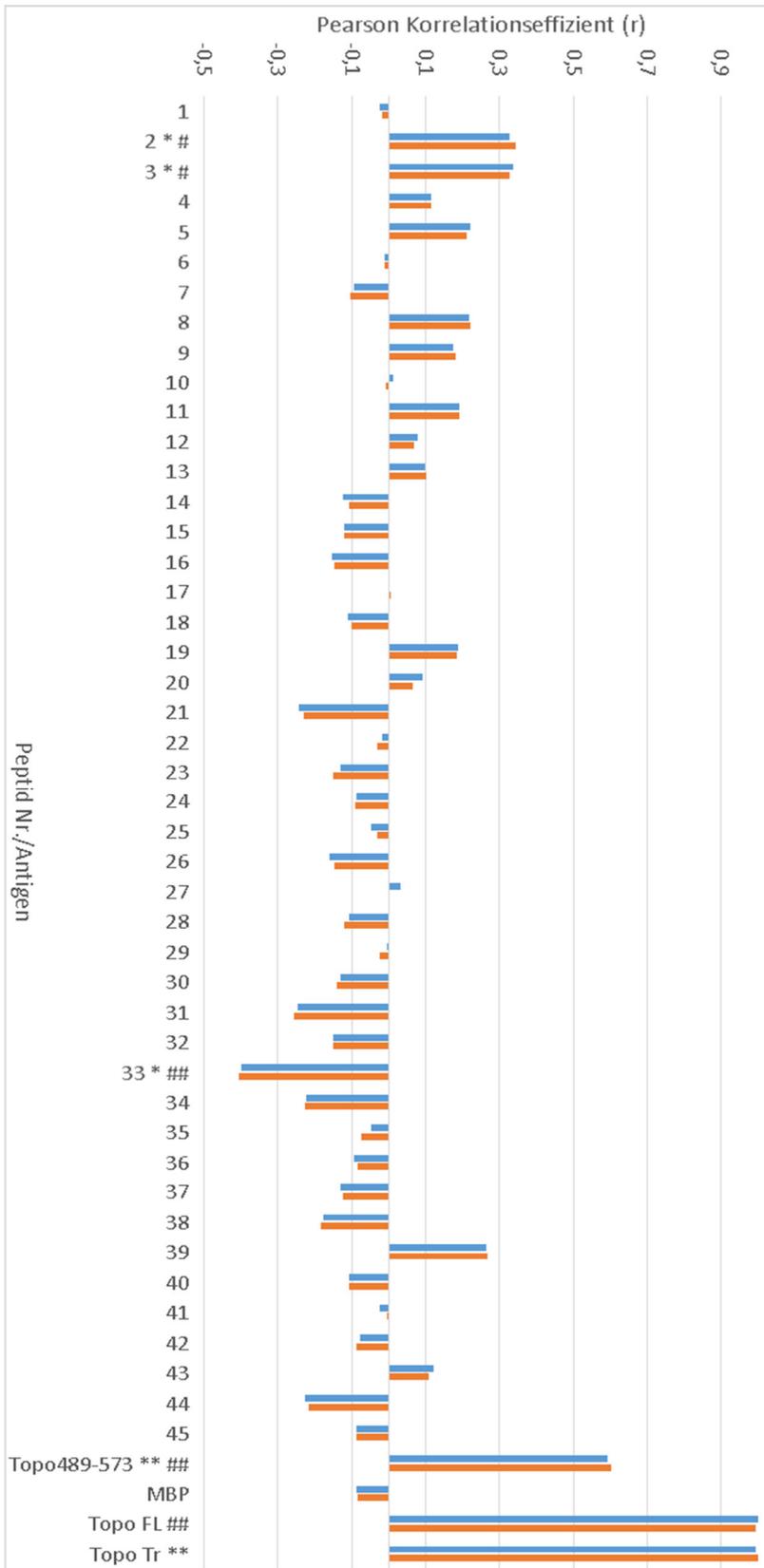


Abb. 3-29A

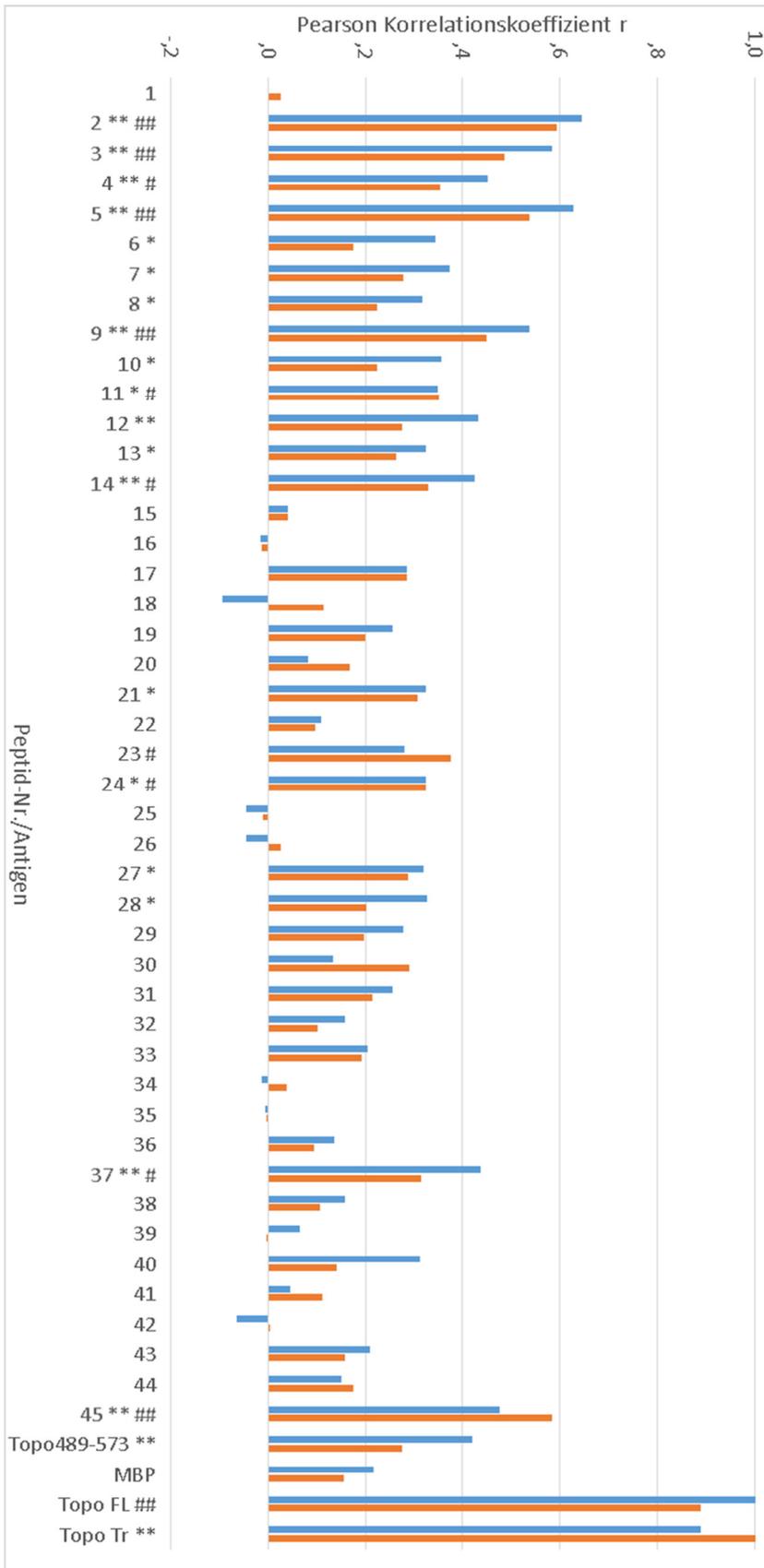


Abb. 3-29B

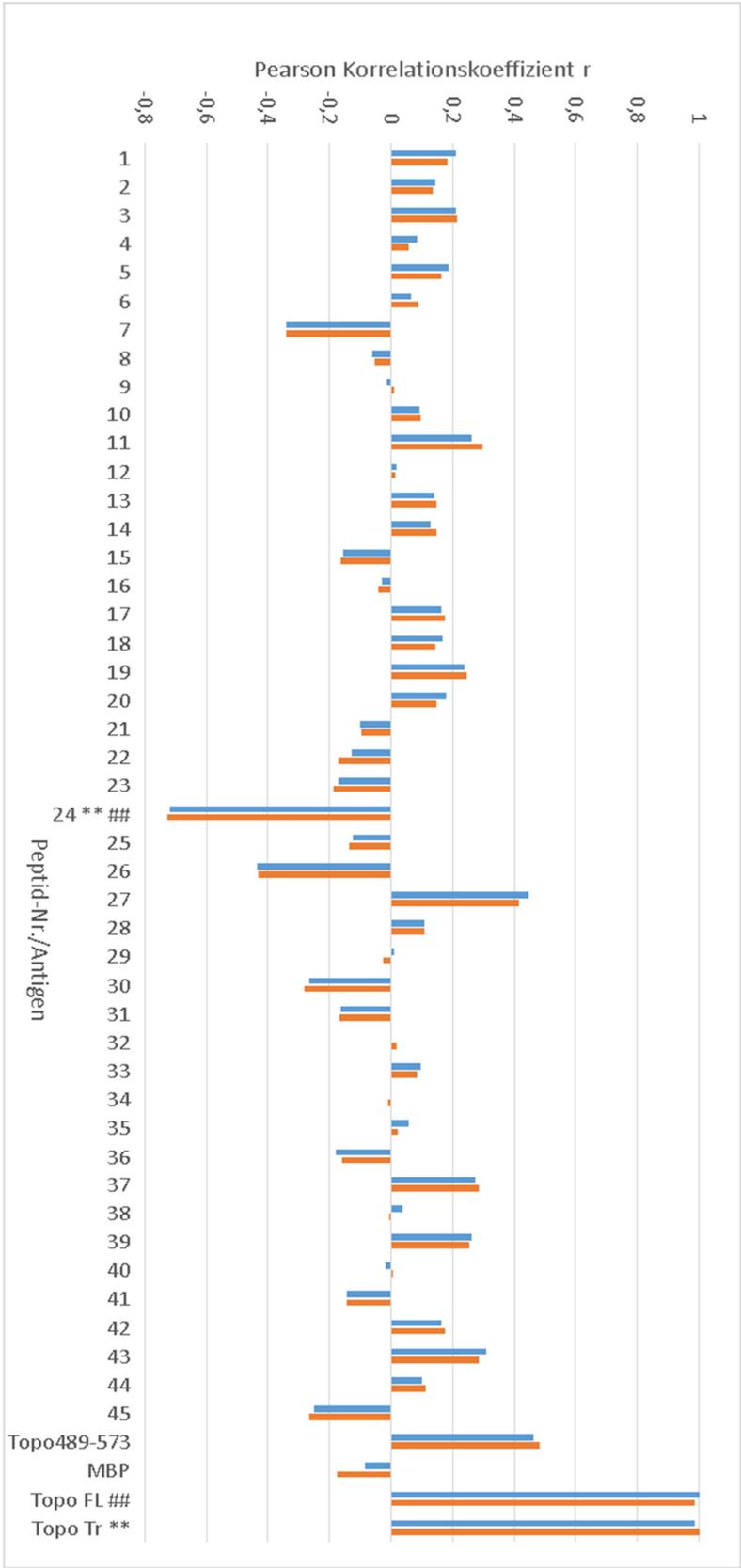


Abb. 3-29C

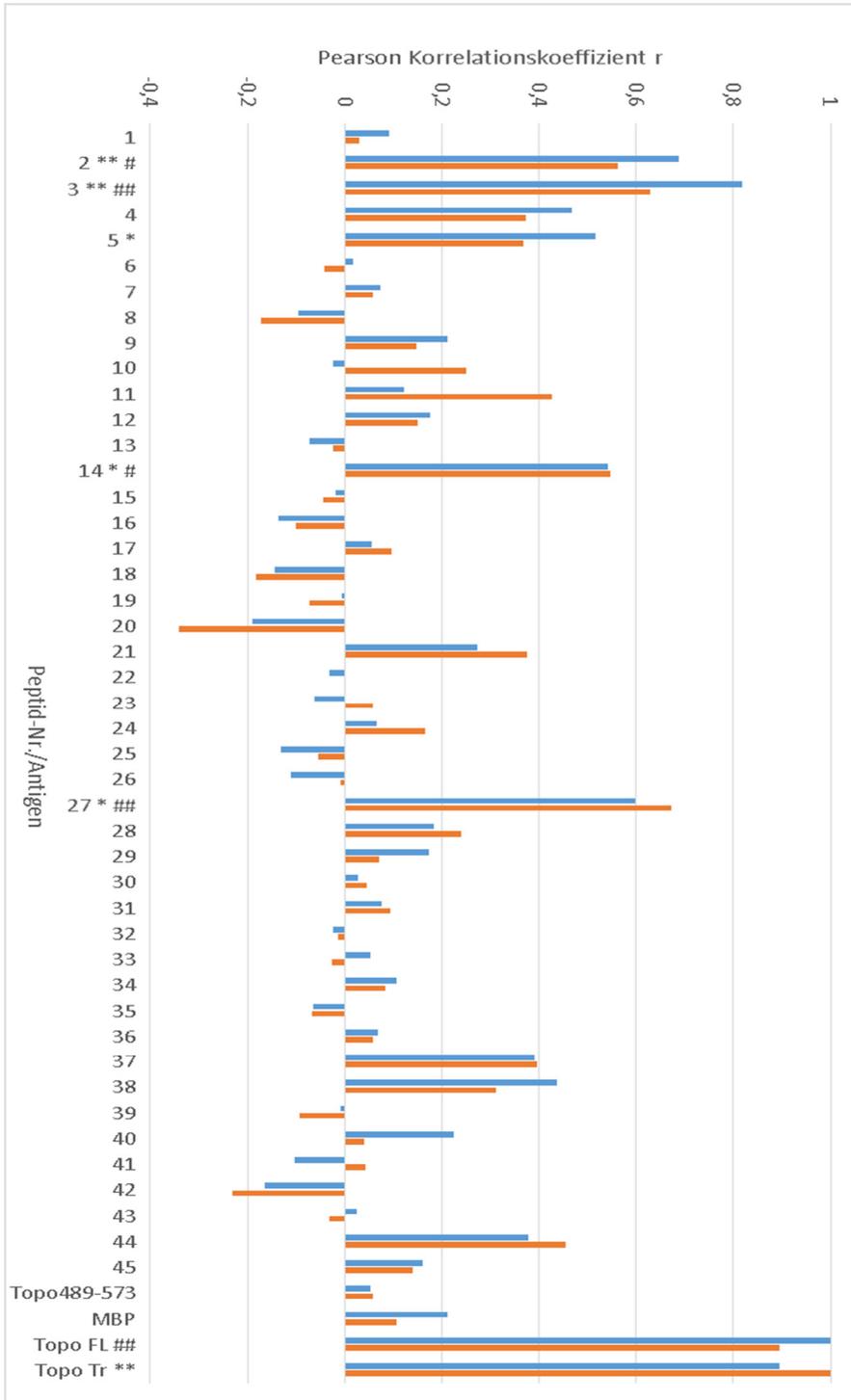


Abb. 3-29D

Abb. 3-29A-D Pearson Korrelationskoeffizient r zwischen Antikörperreaktivitäten gegen 45 Peptide der Topoisomerase I sowie das immundominante Epitop Topo489-573 und Antikörper gegen Topo FL (Blau, 1. Balken) und gegen Topo Tr (Orange, 2. Balken). A) für IgG-Antikörper bei 40 dcSSc-Patienten, B) für IgM-Antikörper bei 40 dcSSc-Patienten, C) für IgG-Antikörper bei 16 ATA/Scl 70-positiven dcSSc-Patienten vor aHSCT, D) für IgM Antikörper bei 16 ATA/Scl 70-positiven dcSSc-Patienten vor aHSCT. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ jeweils gegenüber Topo FL, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ jeweils gegenüber Topo Tr. Topo = Topoisomerase I, FL = full length, Tr = truncated, MBP = Mannose-binding Protein.

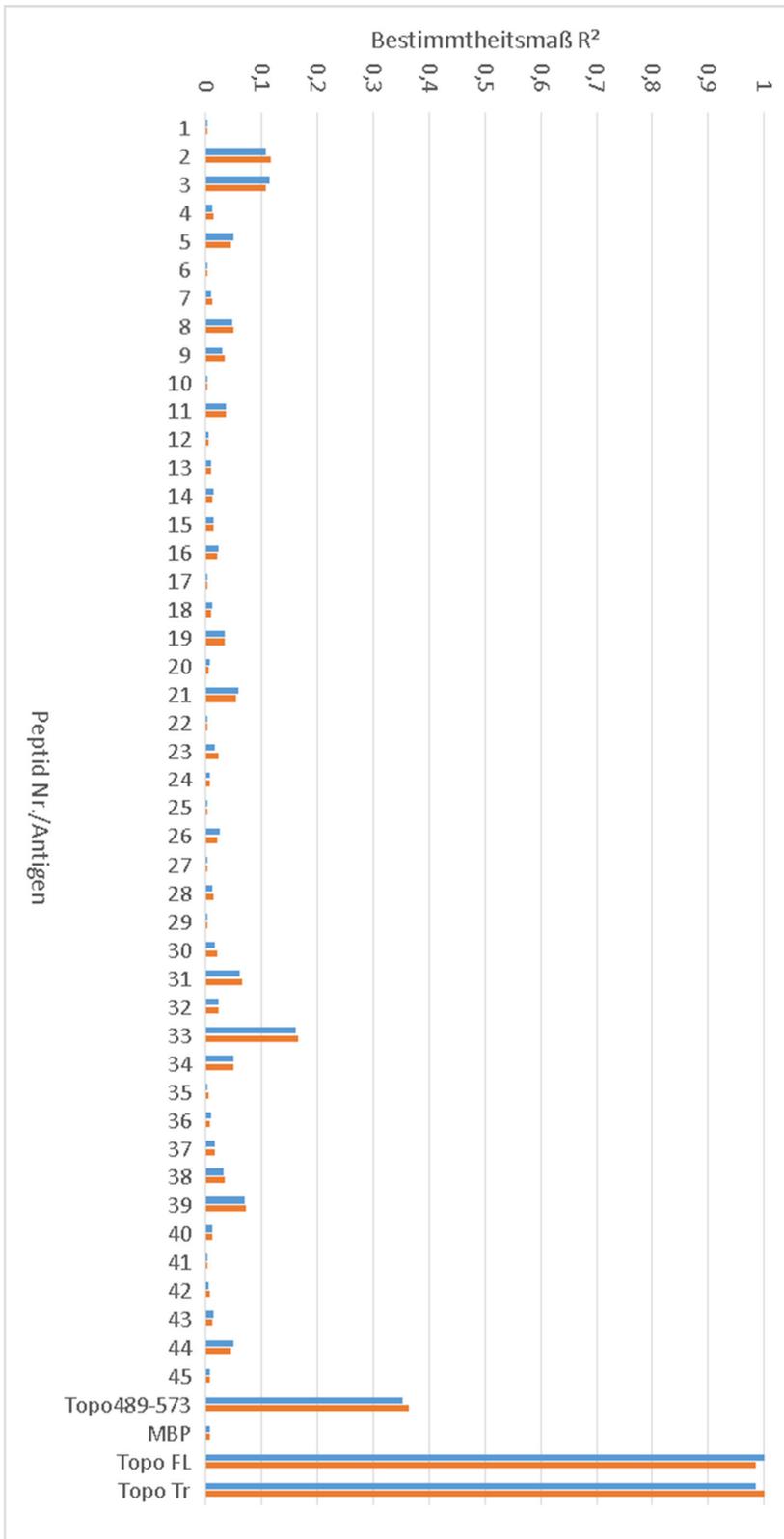


Abb. 3-30A

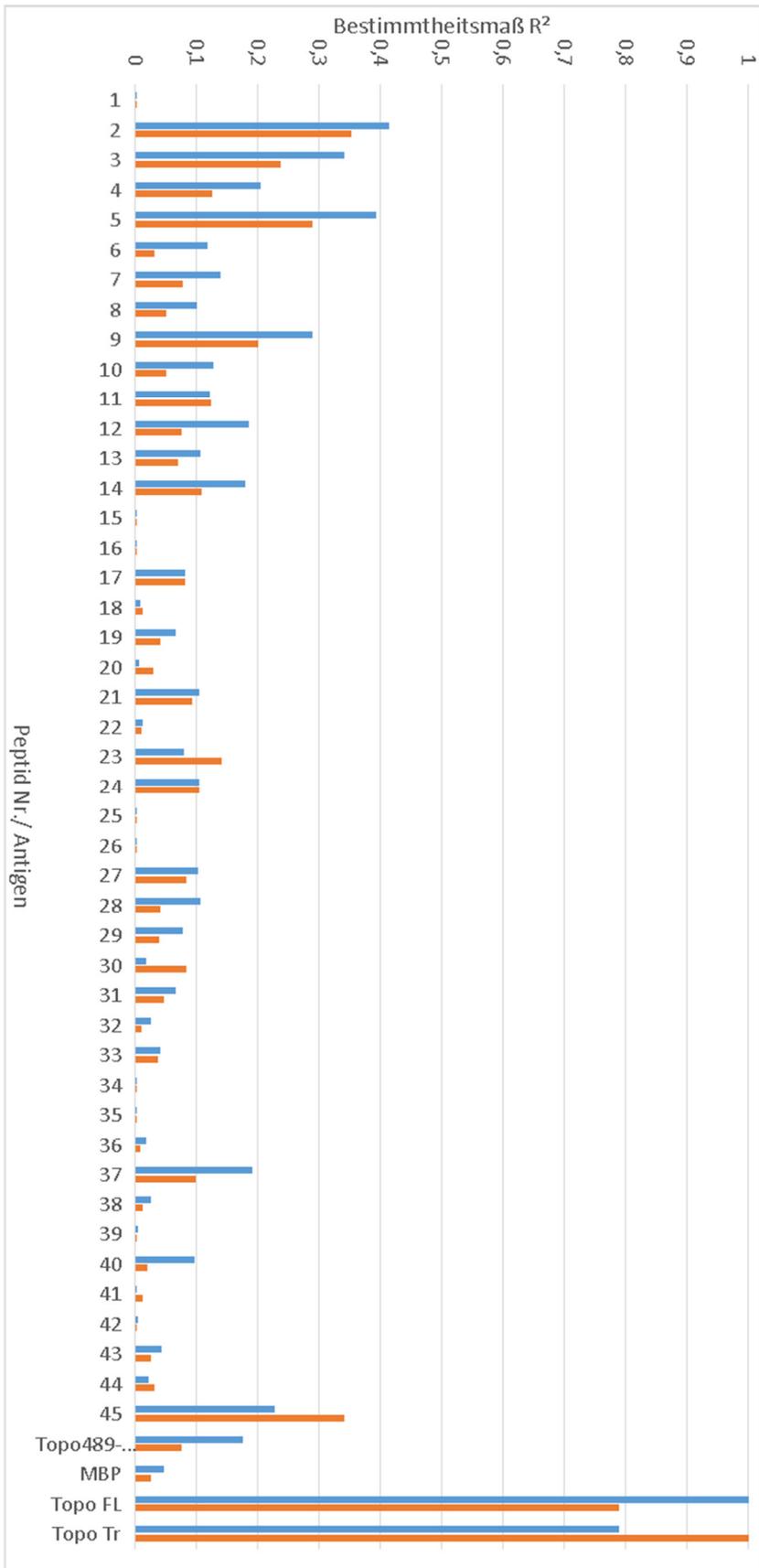


Abb. 3-30B

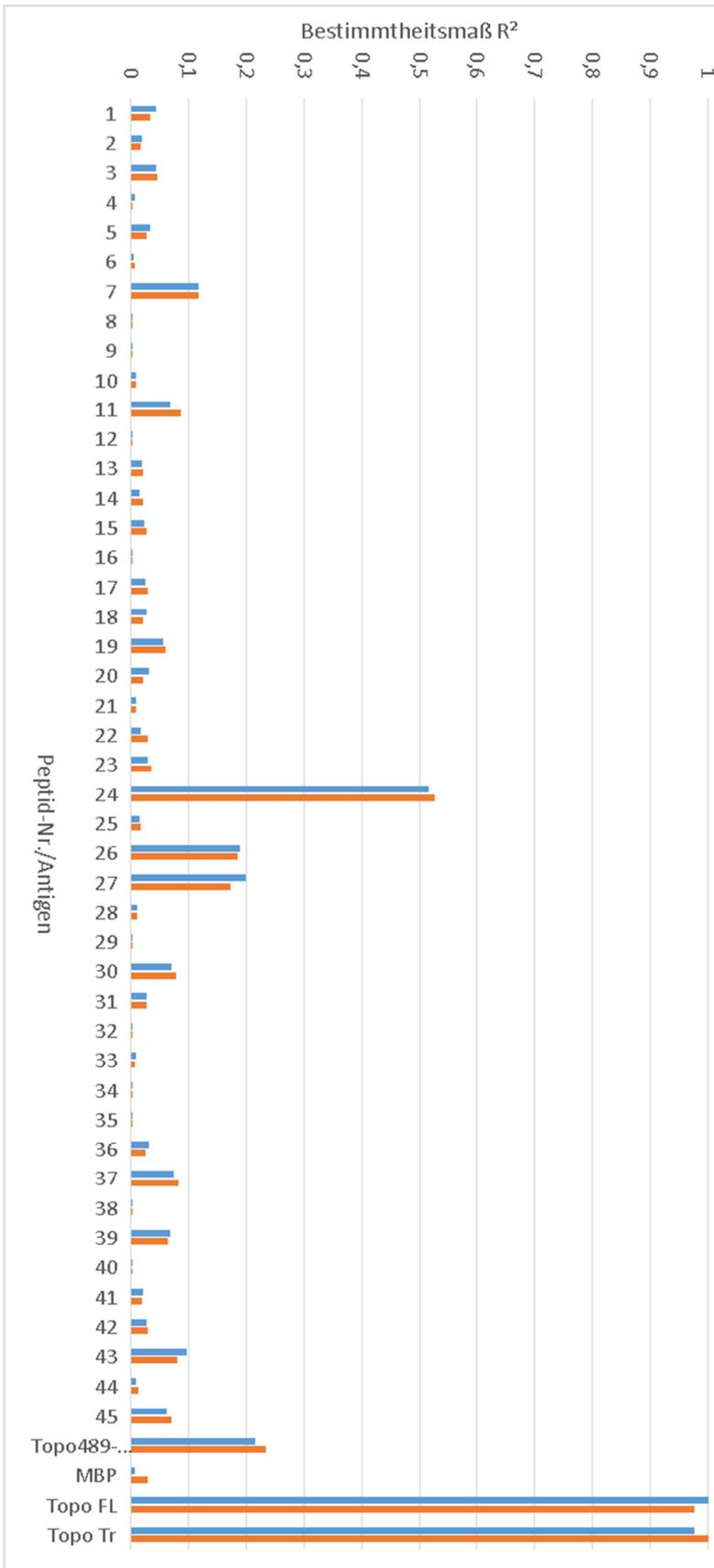


Abb. 3-30C

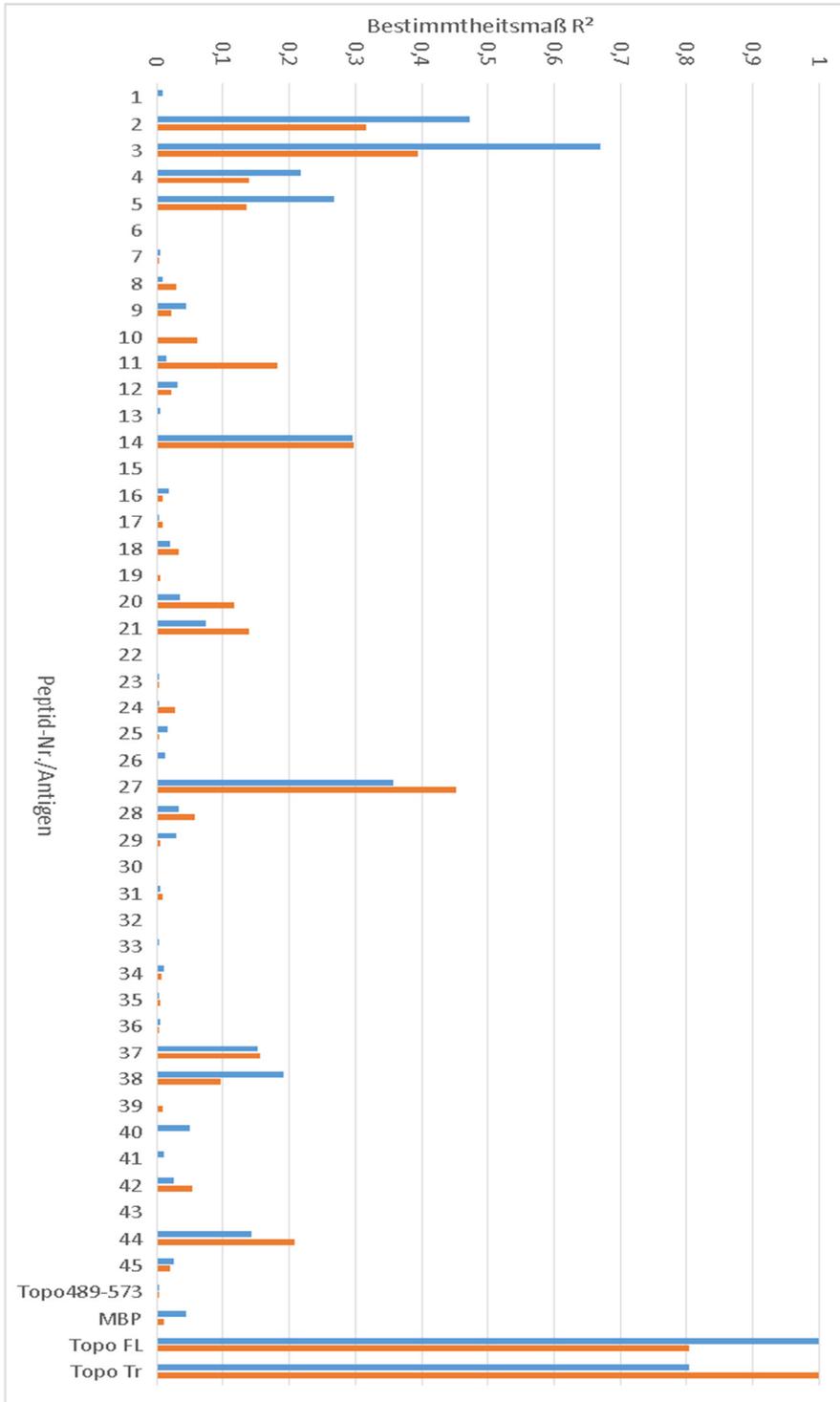


Abb. 3-30D

Abb. 3-30A-D Bestimmtheitsmaß R^2 für Antikörperreaktivitäten gegen 45 Peptide der Topoisomerase I sowie das immundominante Epitop Topo489-573 und Antikörper gegen Topo FL (Blau, 1. Balken) und gegen Topo Tr (Orange, 2. Balken). A) für IgG-Antikörper bei 40 dcSSc-Patienten, B) für IgM-Antikörper bei 40 dcSSc-Patienten, C) für IgG-Antikörper bei 16 ATA/ScI 70-positiven dcSSc-Patienten vor aHSCT, D) für IgM Antikörper bei 16 ATA/ScI 70-positiven dcSSc-Patienten vor aHSCT. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ jeweils gegenüber Topo FL, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ jeweils gegenüber Topo Tr. Topo = Topoisomerase I, FL = full length, Tr = truncated, MBP = Mannose-binding Protein.

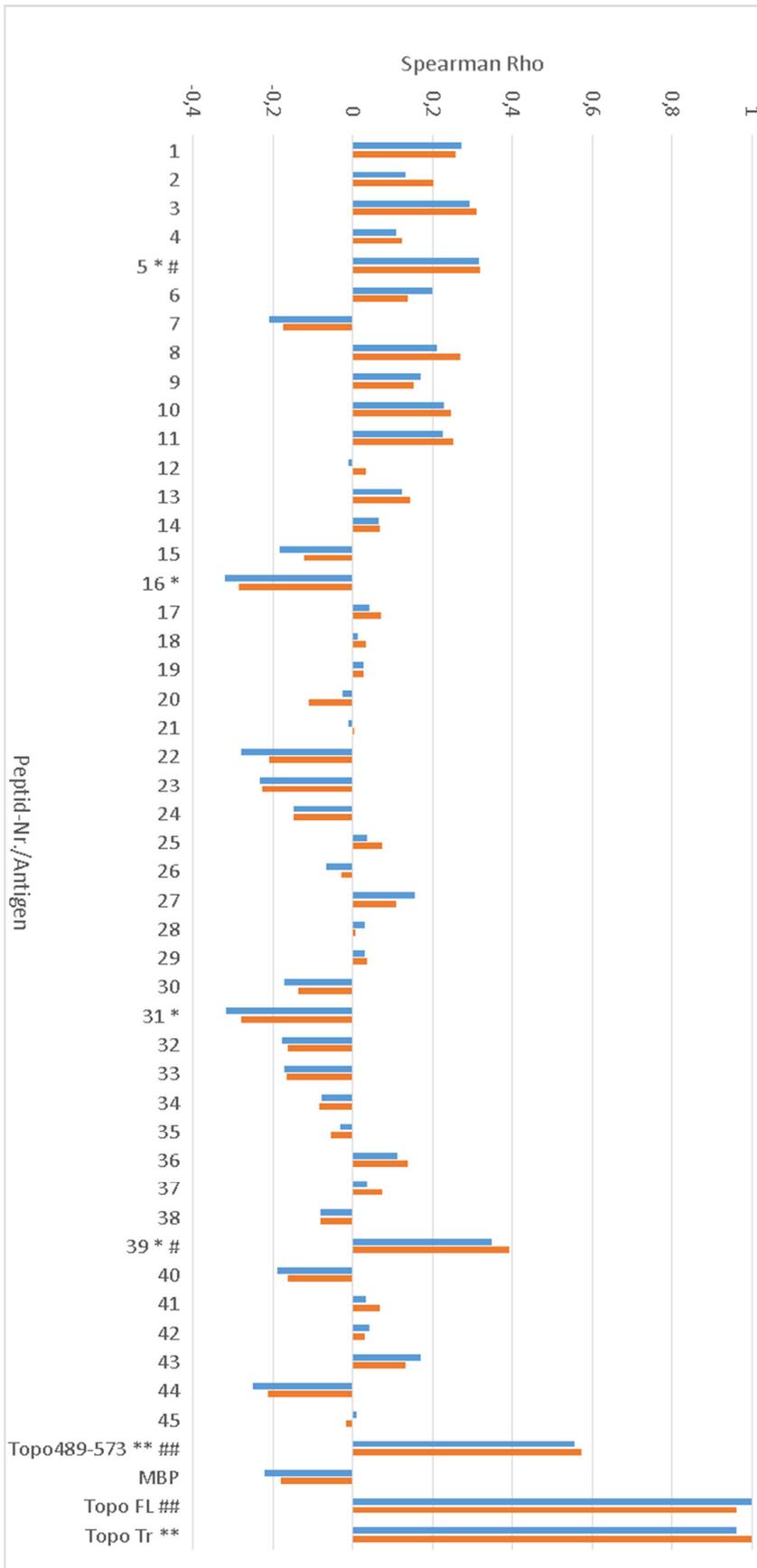


Abb. 3-31A

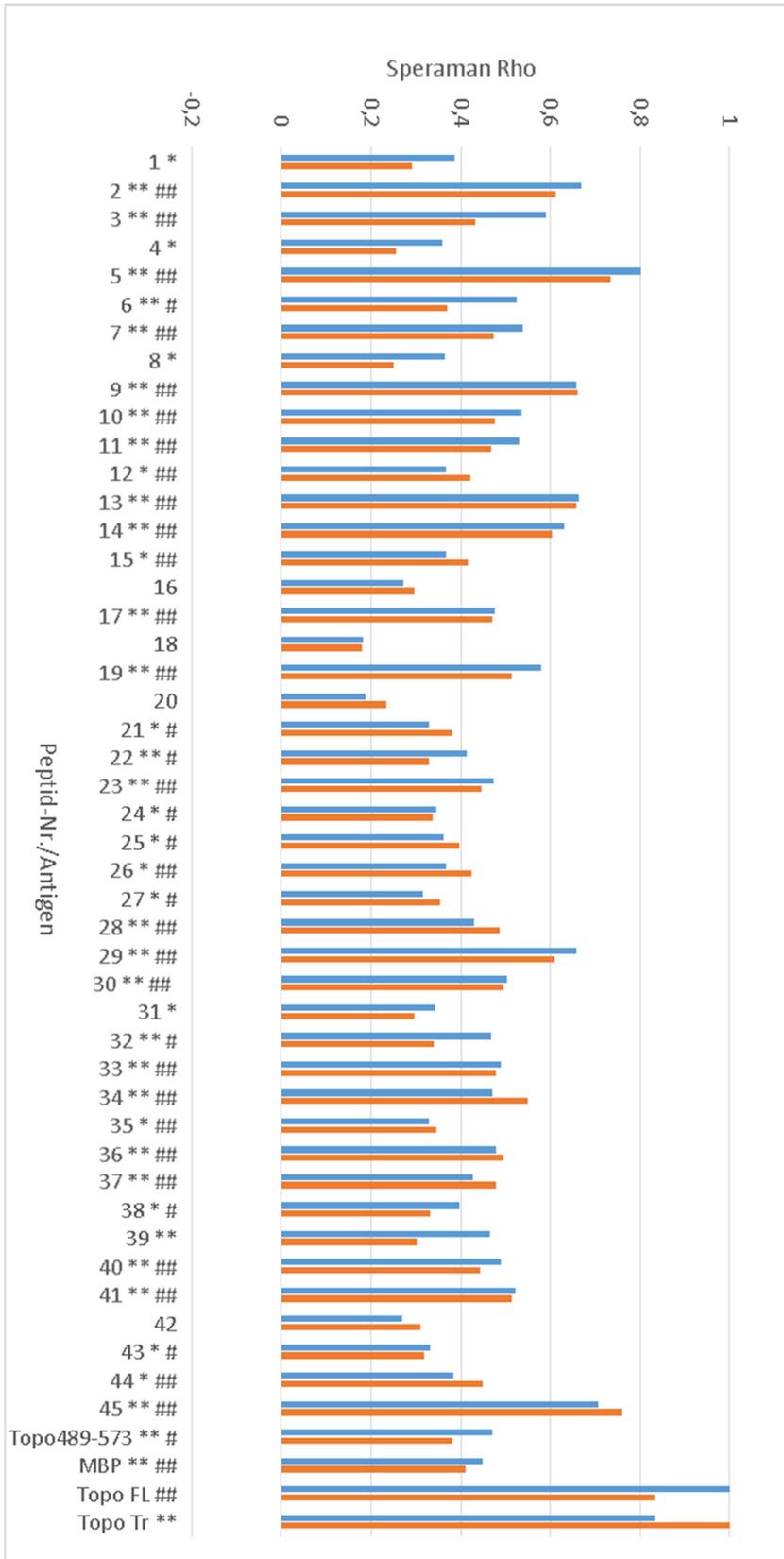


Abb. 3-31B

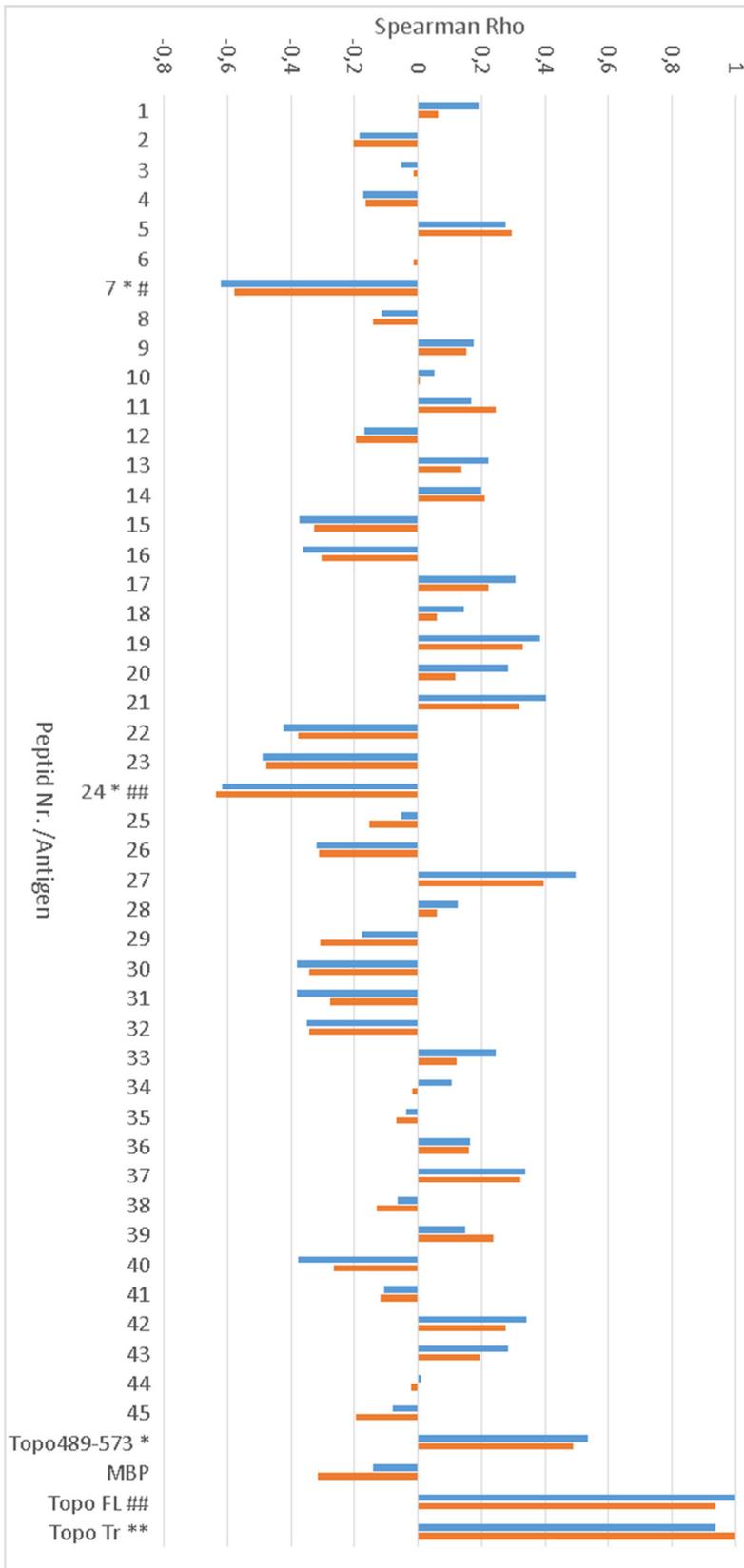


Abb. 3-31C

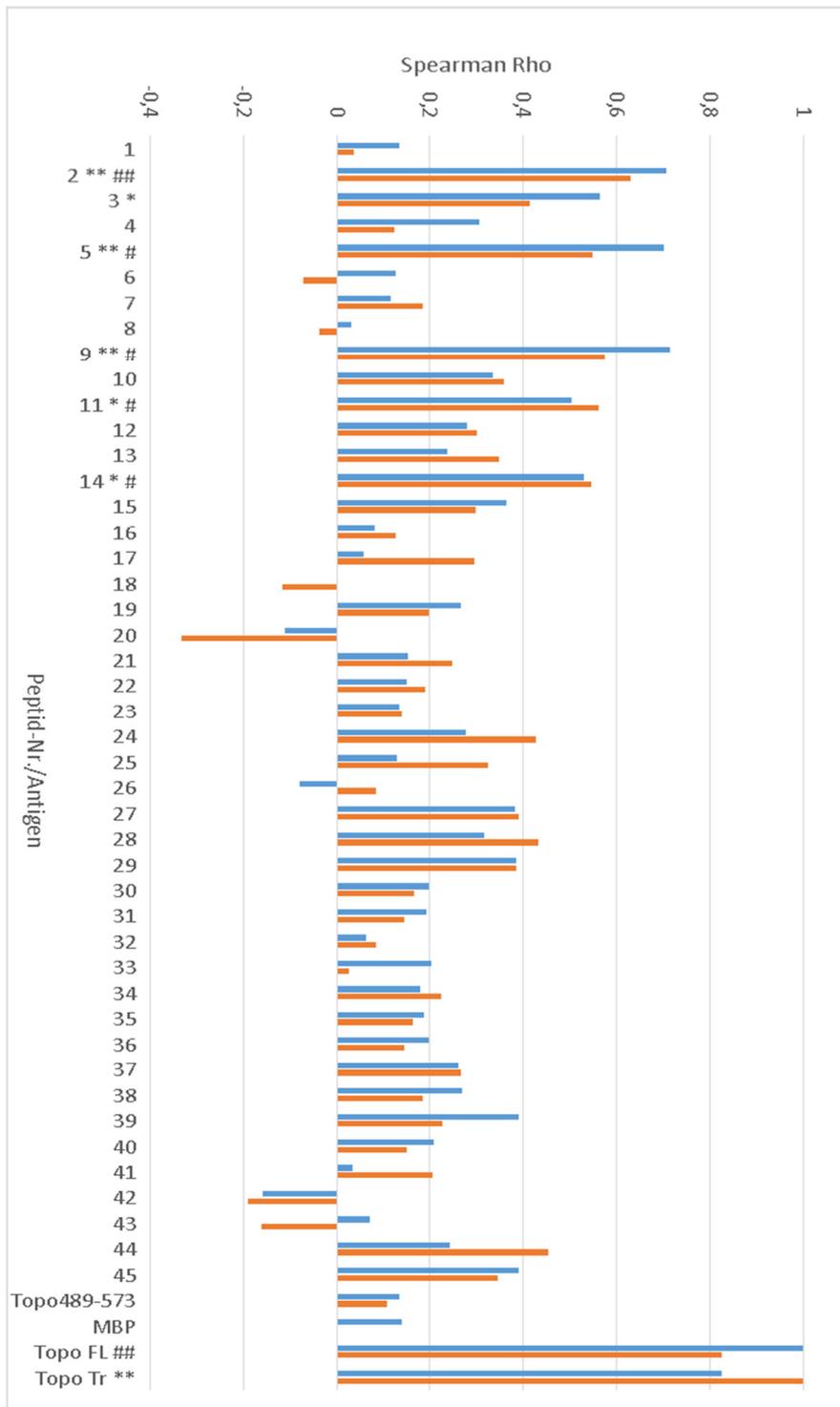


Abb. 3-31D

Abb. 3-31A-D Spearman Rangkorrelationskoeffizient Rho für Antikörperreaktivitäten gegen 45 Peptide der Topoisomerase I sowie das immundominante Epitop Topo489-573 und Antikörper gegen Topo FL (Blau, 1. Balken) und gegen Topo Tr (Orange, 2. Balken). A) für IgG-Antikörper bei 40 dcSSc-Patienten, B) für IgM-Antikörper bei 40 dcSSc-Patienten, C) für IgG-Antikörper bei 16 ATA/ScI 70-positiven dcSSc-Patienten vor aHSCT, D) für IgM-Antikörper bei 16 ATA/ScI 70-positiven dcSSc-Patienten vor aHSCT. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ jeweils gegenüber Topo FL, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ jeweils gegenüber Topo Tr. Topo = Topoisomerase I, FL = full length, Tr = truncated, MBP = Mannose-binding Protein.

Für die IgG-Antikörperreaktivitäten gegen die beiden Peptide 2 und 3, die signifikant mit den IgG-AAb-Reaktivitäten gegen Topo FL und Tr korrelieren, zeigte sich im Streudiagramm passend zur schwachen Korrelation eine inhomogene Verteilung mit vielen Ausreißern. Insbesondere boten viele Patientenseren eine hohe Reaktivität mit Topo FL/Tr bei geringer Reaktivität mit den Peptiden (Abb. 3-32A+B).

Die stärksten Korrelationen von Anti-Peptid-IgM-AAb mit den Anti-Topo I-IgM-AAb hatten die Peptide 2, 5 und 45. Hier bot sich vor allem im Vergleich von Peptid 2 und 5 mit Topo FL im unteren Bereich der Skala ein relativ homogenes Bild (Abb. 3-32C+D). In den oberen Bereichen der Reaktivitätsskala gab es jedoch einige Ausreißer. Im Vergleich von Peptid 45 mit Topo Tr ergab sich insgesamt über den gesamten Skalenbereich ein homogenes Bild. Es ergaben sich jedoch vier deutliche Ausreißer (Abb. 3-32E).

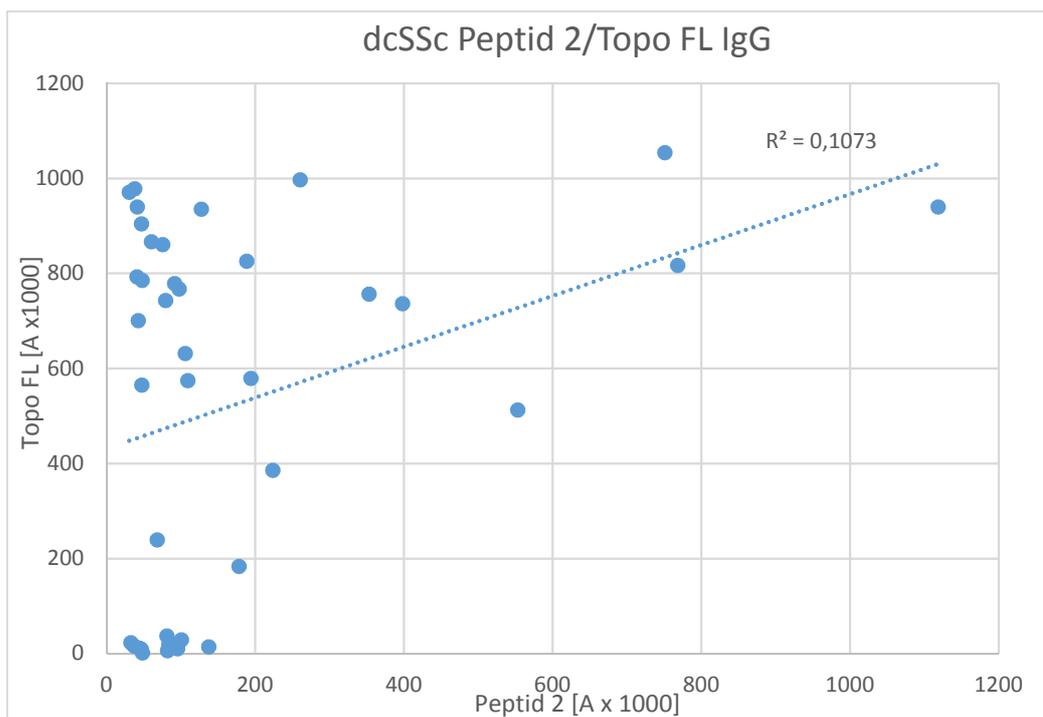


Abb. 3-32A

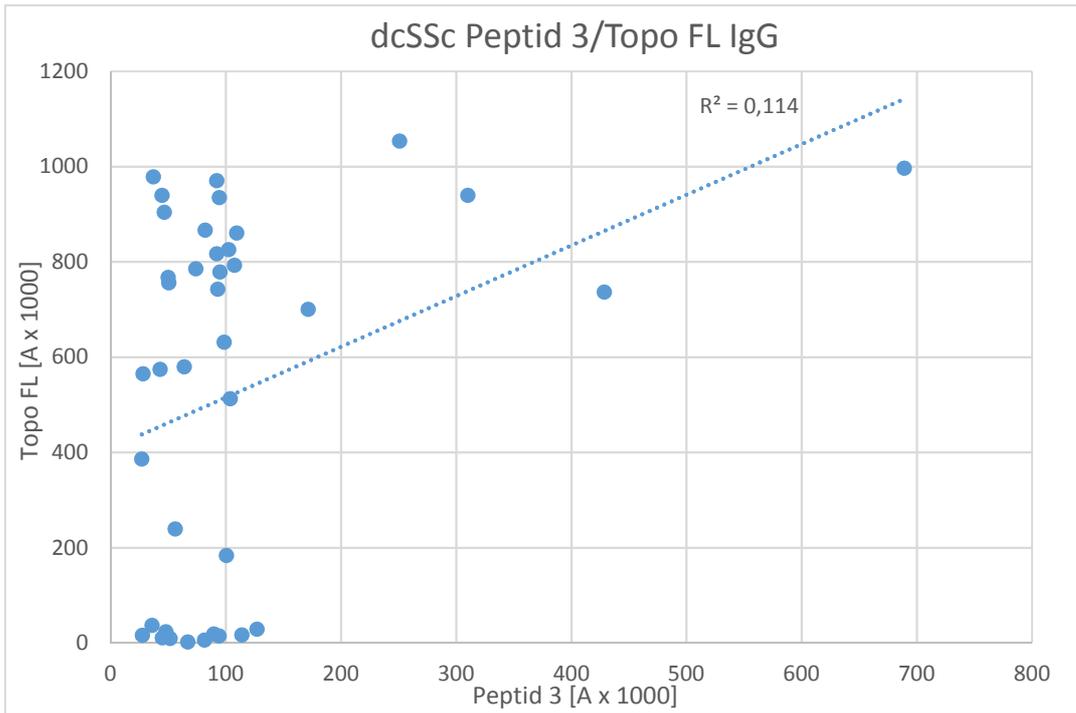


Abb. 3-32B

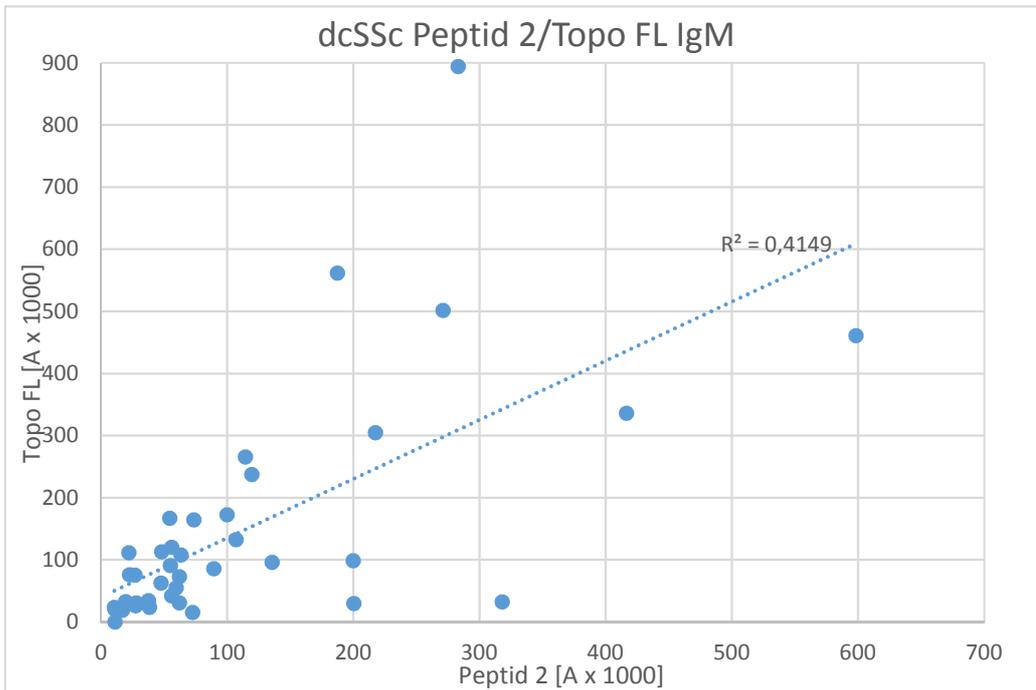


Abb. 3-32C

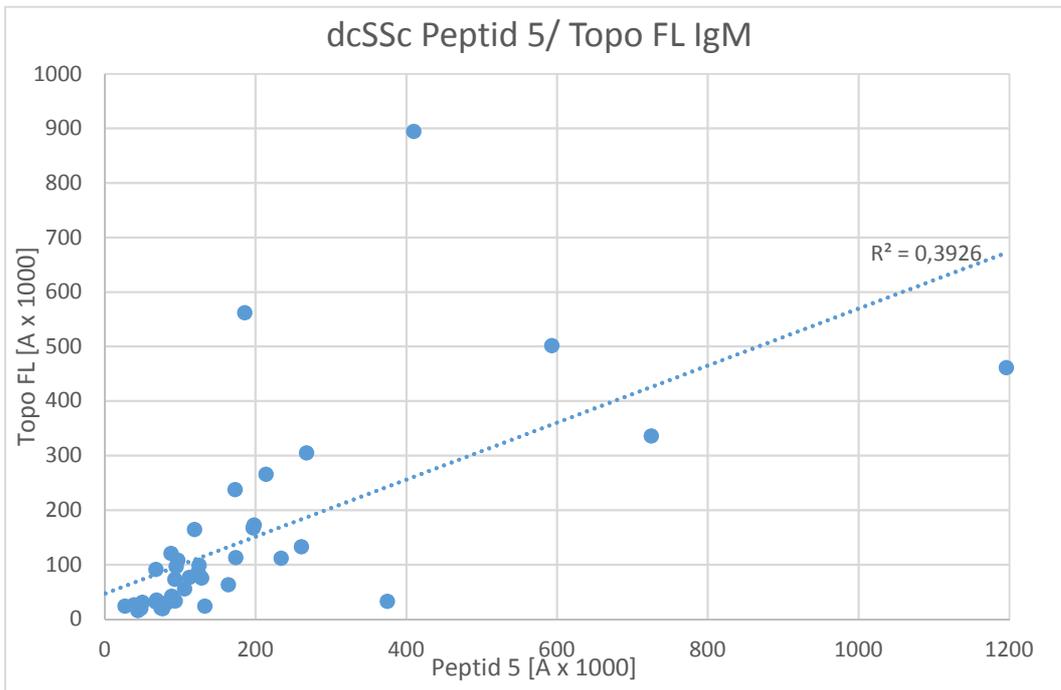


Abb. 3-32D

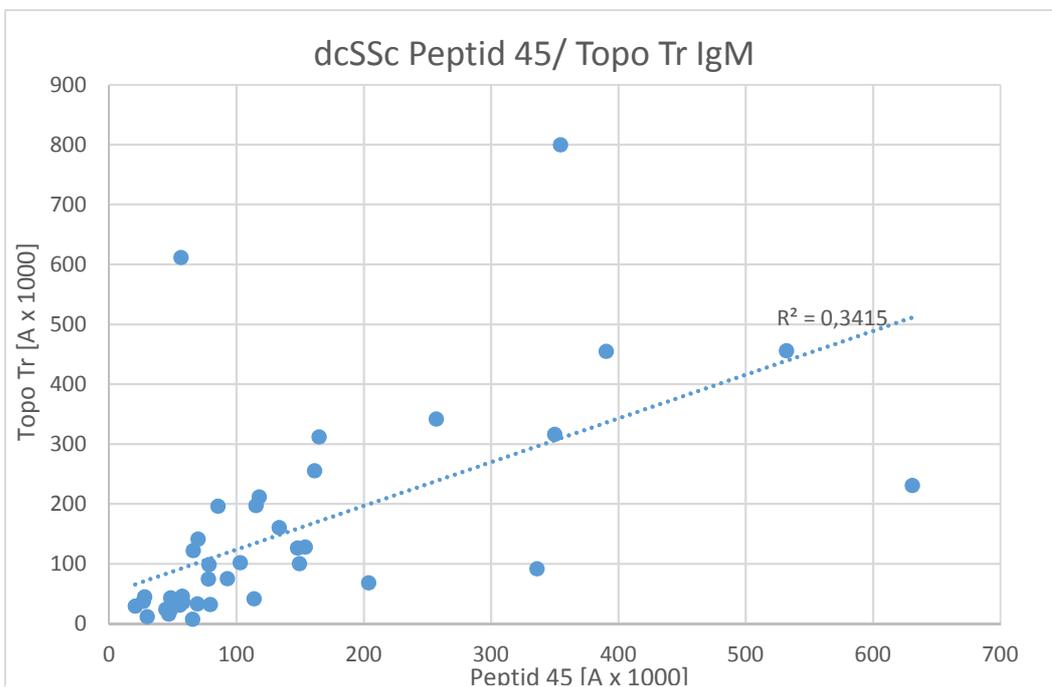


Abb. 3-32E

Abb. 3-32A-E Punktdiagramme der Anti-Peptid-Antikörperreaktivitäten aufgetragen gegen die Anti-Topo I-Antikörperreaktivitäten von 40 dcSSc-Patienten. A) IgG-AAb gegen Topo fl und Peptid 2. B) IgG-AAb gegen Topo fl und Peptid 3. C) IgM-AAb gegen Topo fl und Peptid 2. D) IgM-AAb gegen Topo fl und Peptid 5. E) IgM-AAb gegen Topo tr und Peptid 45. Topo = Topoisomerase I, FL = full length, Tr = truncated, R^2 = Bestimmtheitsmaß, dcSSc= diffus kutane Systemische Sklerose.

3.6.3. Korrelation der Antikörper gegen die Topoisomerase mit Anti-Topo489-573-Antikörpern

Im Vergleich der AAb-Reaktivitäten gegen Topo FL und Tr mit denen gegen Topo489-573 ergab sich zwar insgesamt ein homogenes Bild, es bestand jedoch ebenso wie bei den Anti-Peptid-AAb eine deutlich höhere Reaktivität für einige Patientenseren gegenüber den Topo I-Antigenen als gegen Topo489-573.

Mittels des Korrelationskoeffizienten r nach Pearson ließ sich für IgG-AAb gegen das immundominante Epitop Topo489-573 eine sehr signifikante Korrelation mit den Topoisomeraseantigenen Topo FL ($r = 0,59$) und Topo Tr ($r = 0,60$) von allerdings nur mittlerer Stärke ermitteln (Tab. 3-25). Es ergab sich hier ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,35$ bzw. $R^2 = 0,36$ (Tab. 3-26). Hinsichtlich des Rangkorrelationskoeffizienten Rho stellten sich mit $Rho = 0,56$ bzw. $Rho = 0,57$ sehr signifikante Korrelationen von jedoch ebenfalls nur mittlerer Stärke (Tab. 3-27) dar. Die IgM-AAb gegen das immundominante Epitop korrelierten signifikant, jedoch nur schwach mit den IgM-AAb gegen Topo FL ($r=0,42$) (Tab. 3-25). Mit Topo Tr-IgM-AAb bestand keine signifikante Korrelation. Das Bestimmtheitsmaß für erstere Korrelation belief sich auf $R^2 = 0,18$ (Tab. 3-26). Mittels des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ließ sich eine signifikante, aber schwache Korrelation von Anti-Topo489-573-IgM-AAb mit IgM-AAb gegen Topo FL ($Rho = 0,47$) und gegen Topo Tr ($Rho = 0,38$) darstellen (Tab. 3-27).

Tab. 3-25 Korrelationskoeffizient r nach Pearson der IgG- und IgM-Autoantikörper gegen das immundominante Epitop Topo489-573 mit den AAb gegen die beiden Topoisomerase I-Antigene in Seren von 40 getesteten dcSSc-Patienten.

Pearson r		FL IgG	Tr IgG	FL IgM	Tr IgM
Topo489-573 IgG	Pearson-Korrelation	0,59	0,60	/	/
	Sig. (2-seitig)	<0,001	<0,001	/	/
Topo489-573 IgM	Pearson-Korrelation	/	/	0,42	0,27
	Sig. (2-seitig)	/	/	0,007	0,09

FL = full length; Tr = truncated; Sig. = Signifikanz

Tab. 3-26 Bestimmtheitsmaß R^2 der IgG- und IgM-Autoantikörper gegen das immundominante Epitop Topo489-573 mit den AAb gegen die beiden Topoisomerase I-Antigene in Seren von 40 getesteten dcSSc-Patienten.

Bestimmtheitsmaß R^2		FL IgG	Tr IgG	FL IgM	Tr IgM
Topo489-573 IgG		0,35	0,36	/	/
Topo489-573 IgM		/	/	0,18	0,08

FL = full length; Tr = truncated; Sig. = Signifikanz

3-27 Rangkorrelationskoeffizient Rho nach Spearman der IgG- und IgM-Autoantikörper gegen das immundominante Epitop Topo489-573 mit den AAb gegen die beiden Topoisomerase I-Antigene in Seren von 40 getesteten dcSSc-Patienten

Spearman-Rho		FL IgG	Tr IgG	FL IgM	Tr IgM
Topo489-573 IgG	Rho	0,56	0,57	/	/
	Sig. (2-seitig)	<0,001	<0,001	/	/
Topo489-573 IgM	Rho	/	/	0,47	0,38
	Sig. (2-seitig)	/	/	0,002	0,02

FL = full length; Tr = truncated; Sig. = Signifikanz

Tab. 3-28 Korrelationskoeffizient r der IgG- und IgM-Autoantikörper gegen das immundominante Epitop Topo489-573 mit den AAb gegen die beiden Topoisomerase I-Antigene in Seren von 16 ATA/ScI 70-positiven dcSSc-Patienten, die eine aHSCT erhielten

Pearson r		FL IgG	Tr IgG	FL IgM	Tr IgM
ATA/ScI 70 pos.					
Topo489-573 IgG	Pearson Korrelation	0,46	0,48	/	/
	Sig. (2-seitig)	0,07	0,06	/	/
Topo489-573 IgM	Pearson Korrelation	/	/	0,05	0,06
	Sig. (2-seitig)	/	/	0,85	0,83

FL = full length; Tr = truncated; Sig. = Signifikanz

Tab. 3-29 Bestimmtheitsmaß R^2 der IgG- und IgM-Autoantikörper gegen das immundominante Epitop Topo489-573 mit den AAb gegen die beiden Topoisomerase I-Antigene in Seren von 16 ATA/ScI 70-positiven dcSSc-Patienten, die eine aHSCT erhielten.

Bestimmtheitsmaß R^2		FL IgG	Tr IgG	FL IgM	Tr IgM
ATA/ScI 70-pos					
Topo489-573 IgG		0,22	0,23	/	/
Topo489-573 IgM		/	/	0,003	0,003

FL = full length; Tr = truncated; Sig. = Signifikanz

Tab. 3-30 Rangkorrelationskoeffizient Rho nach Spearman der IgG- und IgM-Autoantikörper gegen das immundominante Epitop Topo489-573 mit den AAb gegen die beiden Topoisomerase I-Antigene in Seren von 16 ATA/ScI 70-positiven dcSSc-Patienten, die eine aHSCT erhielten.

Spearman-Rho		FL IgG	Tr IgG	FL IgM	Tr IgM
ATA/ScI 70-pos					
Topo489-573 IgG	Rho	0,53	0,49	/	/
	Sig. (2-seitig)	0,03	0,06	/	/
Topo489-573 IgM	Rho	/	/	0,13	0,11
	Sig. (2-seitig)	/	/	0,62	0,69

FL = full length; Tr = truncated; Sig. = Signifikanz

In Streudiagrammen, in denen die IgG- und IgM-Reaktivitäten gegen das immundominante Epitop Topo489-573 aufgetragen sind gegen die Antikörperreaktivitäten gegenüber den Topo I-Antigenen (Topo FL und Tr) boten sich heterogene Bilder. Im Vergleich mit den Topo FL- und Topo Tr-IgG-AAb, mit denen, wie oben gezeigt, die stärksten Korrelationen bestanden, zeigte sich für die Patientenserum mit hoher Anti-Topo489-573-Reaktivität auch eine hohe ATA-Reaktivität mit einem relativ homogenen Verteilungsmuster. Vice versa boten viele Seren mit hoher Reaktivität für die Topo-Antigene nur geringe Reaktivitäten gegen Topo489-573 mit dem Ergebnis eines inhomogenen Verteilungsbildes in den unteren Bereichen der Skala (Abb. 3-33A+B).

In der entsprechenden Betrachtung der IgM-Reaktivitäten fand sich nur jeweils ein Patientenserum, welches gleichzeitig eine hohe Anti-Topo489-573- und ATA-Reaktivität bot. Die übrigen Seren zeigen eine geringere Reaktivität gegen Topo489-573; bei einigen besteht gleichzeitig eine hohe ATA-Reaktivität (Abb. 3-33C+D).

Betrachtete man ausschließlich die ATA/Scl 70-positiven Patienten, so entsprach das Bild für die IgG-AAb-Reaktivitäten weitestgehend demjenigen, welches sich bereits in der Betrachtung des gesamten dcSSc-Patienten-Kollektivs geboten hatte. Es gab einige Seren mit hoher Reaktivität gegen Topo489-573 und die Topoisomerase-Antigene, einige mit fehlender Reaktivität gegen die jeweiligen Antigene und es gab die Mehrzahl der Seren, die zwar eine hohe ATA-Reaktivität, jedoch eine nur geringe Anti-Topo489-573-Reaktivität zeigten (Abb. 3-34A+B). Die entsprechenden Streudiagramme für IgM-AAb der 16 ATA/Scl 70-positiven Patienten sind aufgrund der sehr schwachen Korrelationen nicht dargestellt.

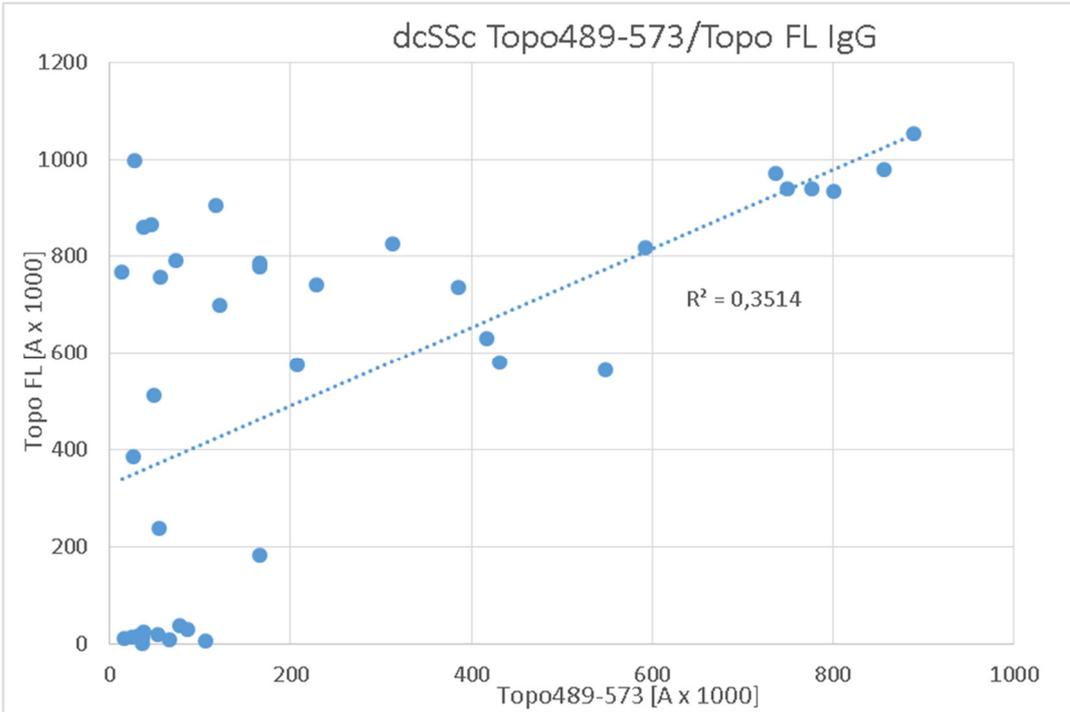


Abb. 3-33A

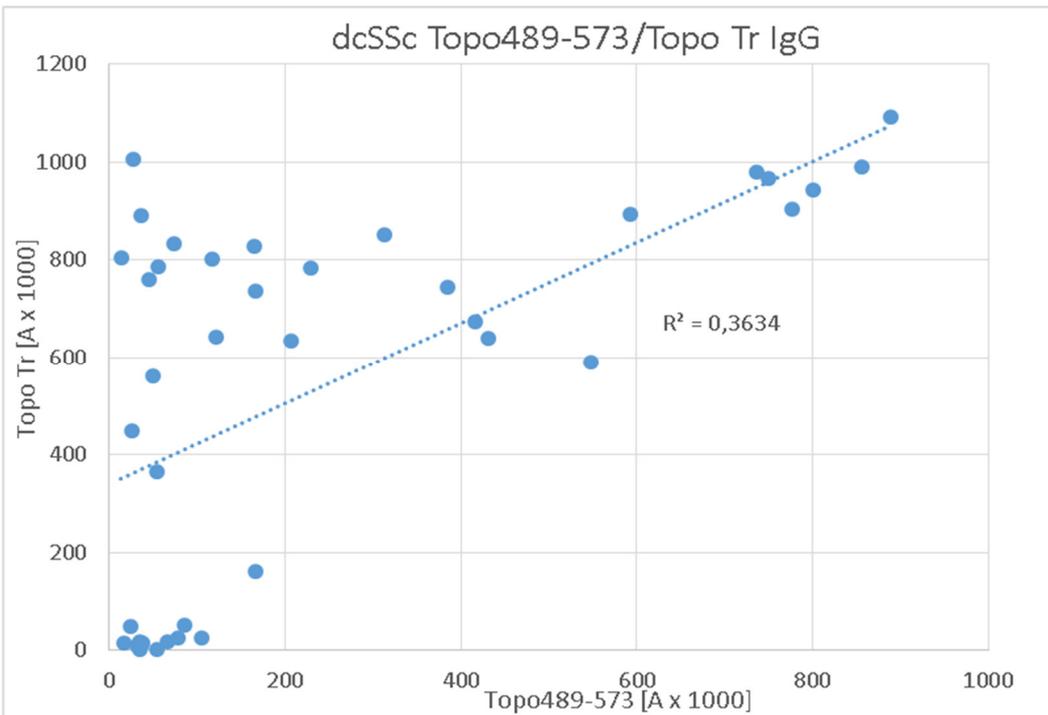


Abb. 3-33B

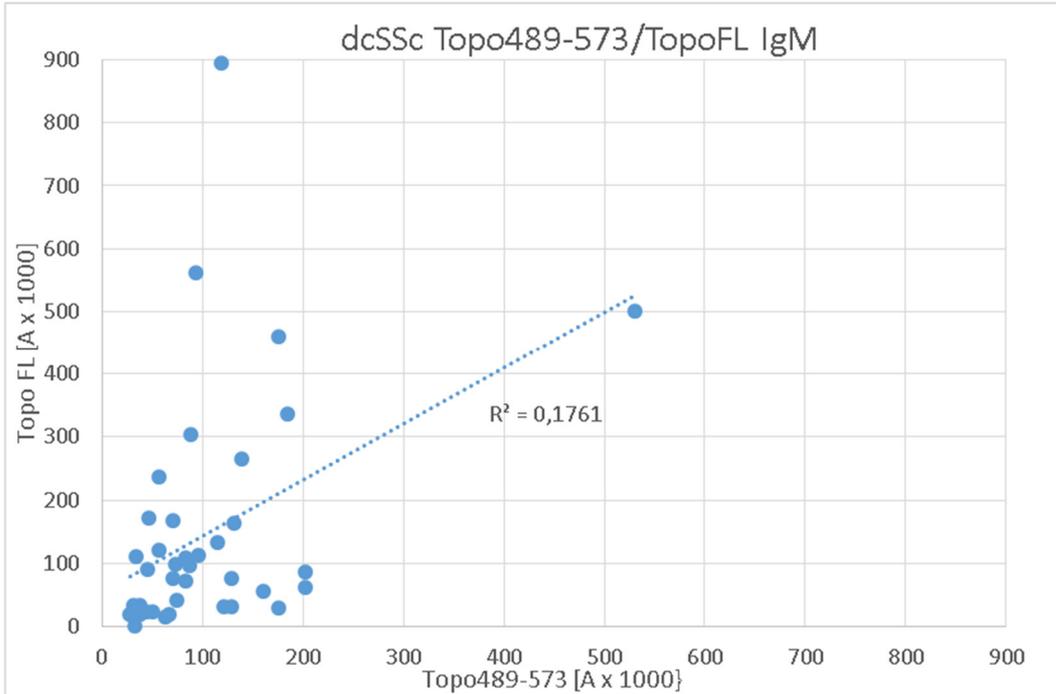


Abb. 3-33C

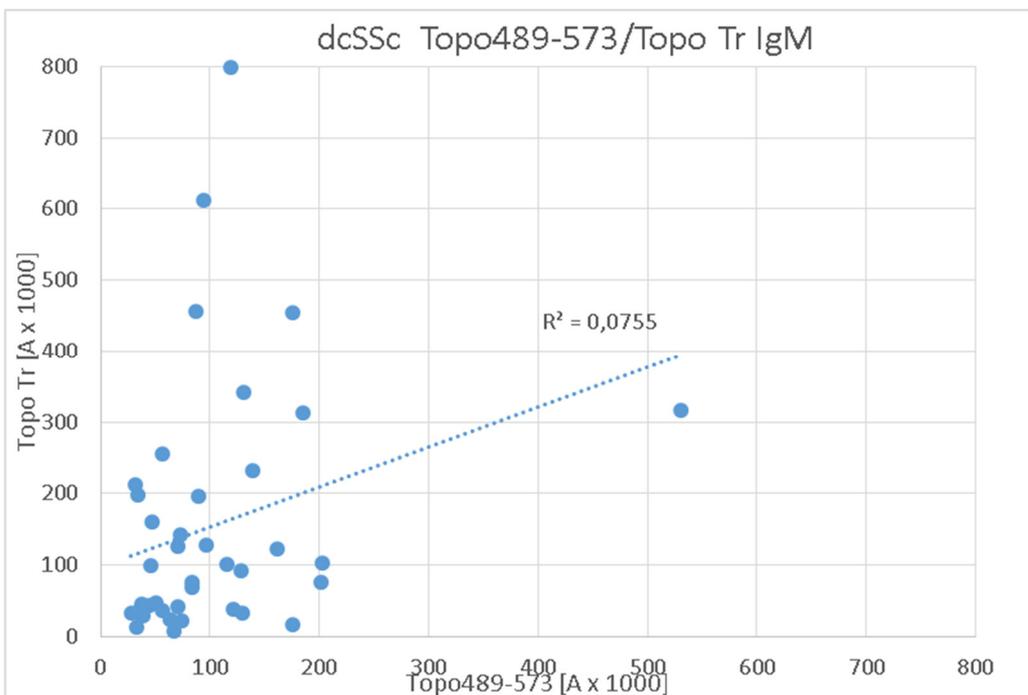


Abb. 3-33D

Abb. 3-33A-D Streudiagramme der IgG- und IgM-AAb gegen das immundominante Epitop Topo489-573 gegenüber der ATA-Reaktivität von 40 dcSSc-Patienten. A) Topo489-573-IgG-AAb gegen Topo FL-IgG-AAb aufgetragen. B) Topo489-573-IgG gegen Topo Tr-IgG. C) Topo489-573-IgM gegen Topo FL-IgM. D) Topo489-573-IgM gegen Topo Tr-IgM. Topo = Topoisomerase I, dcSSc = diffus kutane systemische Sklerose, FL = full length, Tr = Truncated, R^2 =Bestimmtheitsmaß

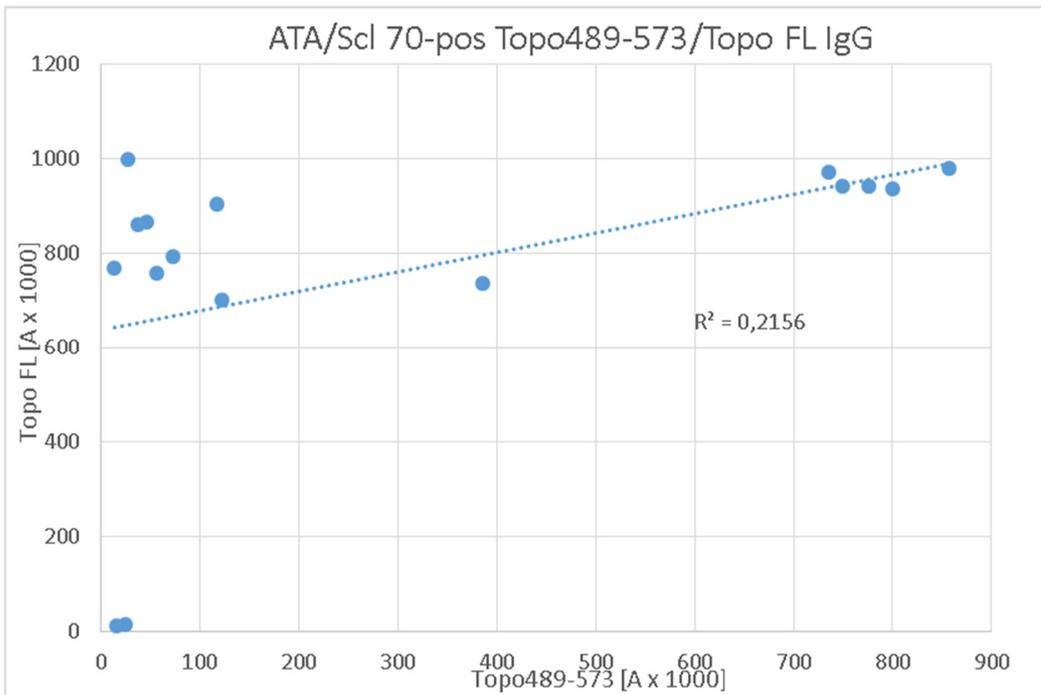


Abb. 3-34A

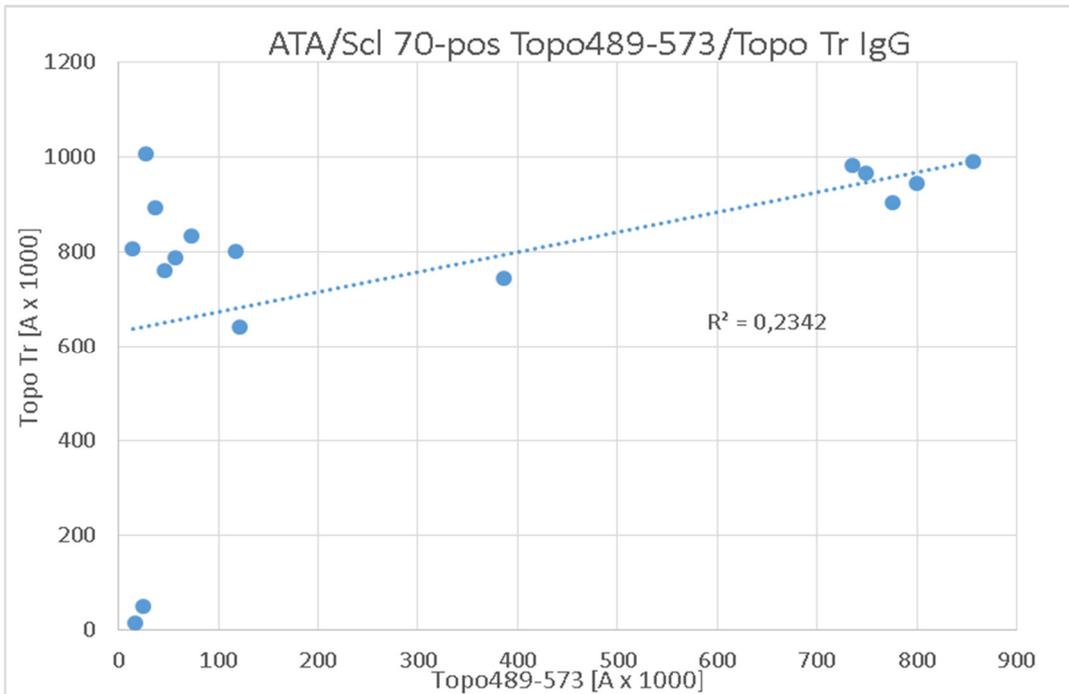


Abb. 3-34B

Abb. 3-34A+B Streudiagramme der IgG- und IgM-AAb gegen das immundominante Epitop Topo489-573 gegenüber der ATA-Reaktivität von 16 ATA/Scl 70-positiven dcSSc-Patienten. A) Topo489-573-IgG-AAb gegen Topo FL-IgG-AAb. B) Topo489-573-IgG gegen Topo Tr-IgG. Topo = Topoisomerase I, dcSSc = diffus kutane systemische Sklerose, FL = full length, Tr = Truncated, R^2 =Bestimmtheitsmaß, ATA = Anti-Topoisomerase I-Antikörper.

3.6.4. Korrelation der Anti-Peptid-Antikörper untereinander

Auch untereinander wurden die einzelnen Peptide mittels Pearson Korrelationskoeffizient r sowie mittels Rangkorrelationskoeffizient Rho nach Spearman korreliert. Hier ergaben sich –angesichts der geringen Anzahl signifikanter Korrelationen der ATA mit den Anti-Peptid-AAb– überraschend viele signifikante und sehr signifikante Korrelationen. Eine nicht geringe Zahl dieser Korrelationen war von größerer Stärke. Betrachtete man die Anti-Peptid-IgG-AAb im Kollektiv aller 40 untersuchten dcSSc-Patienten, so fanden sich starke Pearson-Korrelationen (mit $r > 0,7$) zwischen den Peptiden 1 und 26 bzw. 38, den Peptiden 2 und 5, den Peptiden 5 und 20, den Peptiden 9 und 11, den Peptiden 10 und 28 bzw. 40, den Peptiden 14 und 36, den Peptiden 15 und 16, 23, 25, 26, 30 bzw. 31, den Peptiden 16 und 23, 30 bzw. 31, den Peptiden 17 und 34, den Peptiden 18 und 34, den Peptiden 23 und 30 bzw. 31, den Peptiden 25 und 26, 34 bzw. 42, den Peptiden 26 und 34, 38 bzw. 42, den Peptiden 28 und 32, den Peptiden 29 und 36, den Peptiden 30 und 31 sowie den Peptiden 34 und 42. Mittels des Rangkorrelationskoeffizienten Rho nach Spearman fanden sich starke Korrelationen ($Rho > 0,7$) zwischen den Peptiden 7 und 24 bzw. 30, den Peptiden 9 und 1 bzw. 12, den Peptiden 13 und 36 bzw. 45, den Peptiden 14 und 21, 28 bzw. 35, den Peptiden 15 und 23, 25, 30 bzw. 31, den Peptiden 16 und 22 bzw. 31, den Peptiden 17 und 18 bzw. 34, den Peptiden 18 und 34 bzw. 42, den Peptiden 23 und 30 bzw. 31, den Peptiden 24 und 30, den Peptiden 29 und 36, den Peptiden 30 und 31, den Peptiden 31 und 40 sowie den Peptiden 34 und 42. Betrachtete man nur die ATA/Scl 70-positiven Patienten, so ergab sich ein ähnliches Bild mit vielen signifikanten Korrelationen, die insbesondere auch zwischen den o.g. Peptiden höhere Stärken zeigen. Sehr starke Korrelationen ließen sich hier mittels Pearson-Korrelationseffizient ($r > 0,9$) zwischen den Peptiden 1 und 20, den Peptiden 2 und 5 bzw. 20, den Peptiden 5 und 20, den Peptiden 7 und 30, den Peptiden 15 und 16 bzw. 30 sowie den Peptiden 23 und 30 ermitteln. Mittels des Rangkorrelationseffizienten nach Spearman stellten sich sehr starke Korrelationen ($Rho > 0,9$) zwischen den Peptiden 15 und 16 bzw. 23, den Peptiden 16 und 22, den Peptiden 31 und 40 sowie den Peptiden 30 und 15,

16, 22 und 23 dar.

Im Vergleich der Reaktivitäten einzelner Peptide mittels Streudiagrammen wie oben beschrieben ergab sich trotz dieser starken Korrelationen ein heterogenes Bild. So zeigte sich im Vergleich von Peptid 2 mit Peptid 5 ebenso wie im Vergleich von Peptid 5 mit Peptid 20 ein Großteil der Werte im Skalenbereich unter 200 [A x 1000] mit einer mehr oder weniger homogenen Verteilung (Abb. 3-35A+B). Ferner gab es in beiden Fällen Ausreißer mit Werten deutlich jenseits von 1000 [A x 1000]. Verglich man Peptid 15 mit 16 bzw. Peptid 15 mit 30, so gruppieren sich die Werte im Bereich von unter 250 [A x 1000] im erstgenannten Fall (Abb. 3-35C) visuell homogener als im zweiten (Abb. 3-35D). In beiden Fällen bestanden keine Ausreißer in deutlich höhere Skalenwerte. Ein ähnliches Bild mit einer jedoch noch homogeneren Verteilung zeigte sich, wenn nur die ATA/ScI 70-positiven betrachtet wurden (Abb. 3-36A-D).

Im Vergleich der IgM-Reaktivitäten der einzelnen Peptide mit den o.g. Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman fanden sich in der großen Mehrzahl signifikante Korrelationen. Die meisten hiervon mindestens von mittlerer Stärke, viele jedoch auch von höherer Stärke (r bzw. $Rho > 0,7$). Diese Daten sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt.

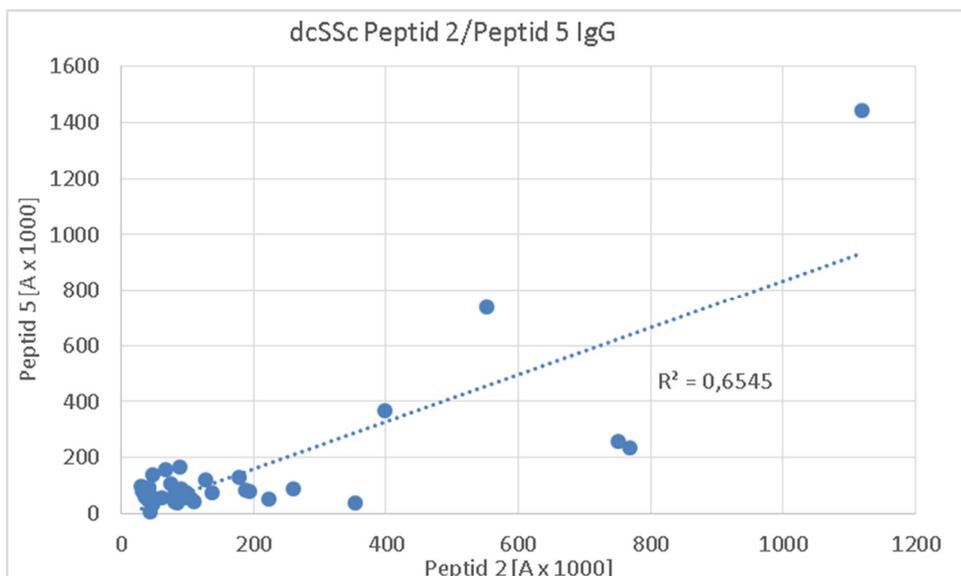


Abb. 3-35A

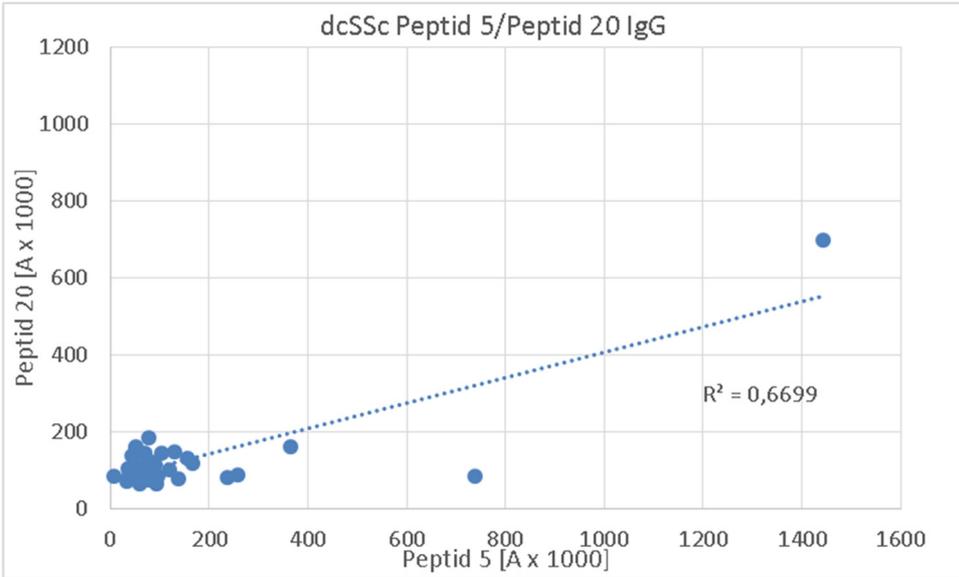


Abb. 3-35B

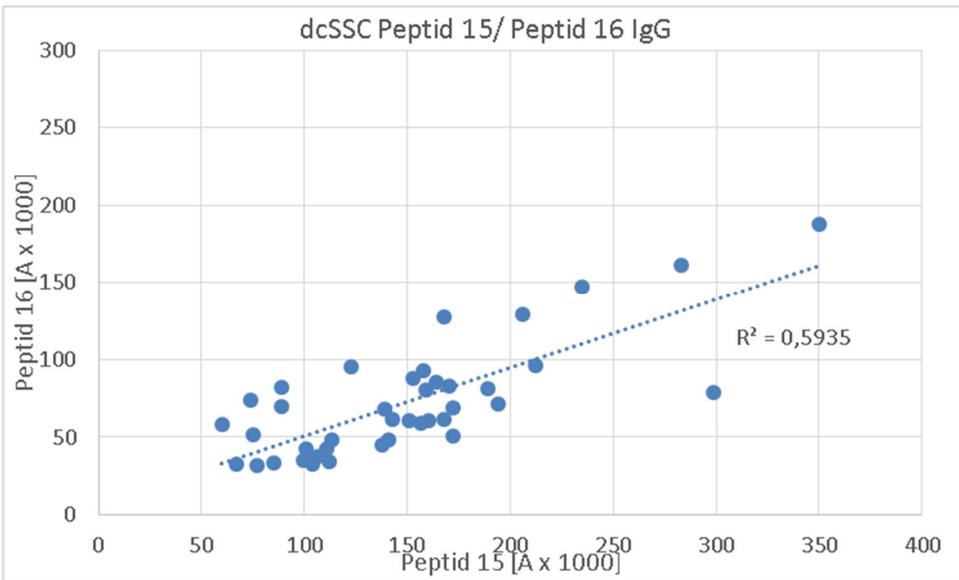


Abb. 3-35C

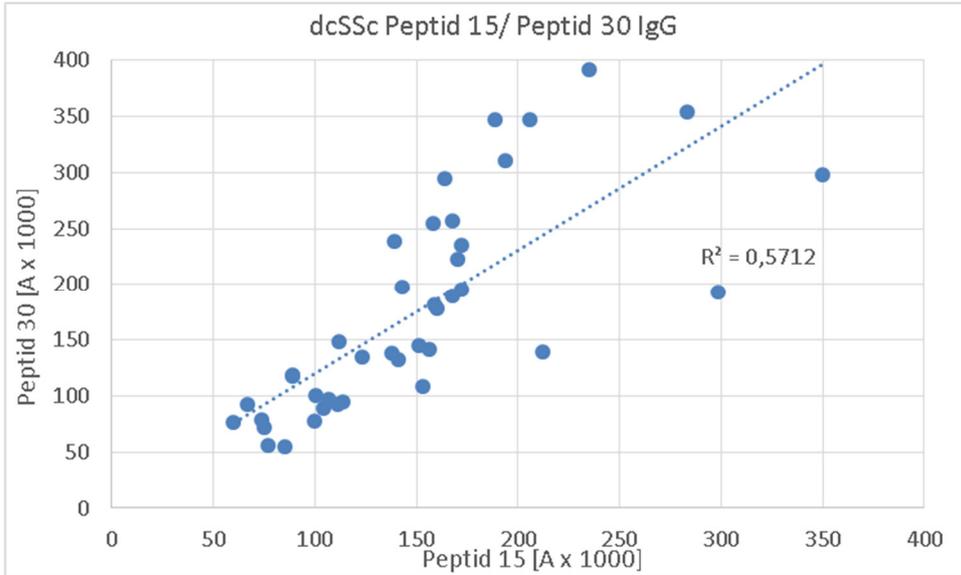


Abb. 3-35D

Abb. 3-35A-D Streudiagramme der IgG-Anti-Peptid-AAb verglichen mit anderen Anti-Peptid-AAb von 40 dcSSc Patienten. A) Anti-Peptid 2-IgG-AAb gegen Anti-Peptid 5-IgG-AAb aufgetragen. B) Anti-Peptid 5-IgG gegen Anti-Peptid 20-IgG. C) Anti-Peptid 15-IgG gegen Anti-Peptid 16-IgG. D) Anti-Peptid 15-IgG gegen Anti-Peptid 30-IgG. R^2 = Bestimmtheitsmaß, dcSSc = diffus kutane systemische Sklerose.

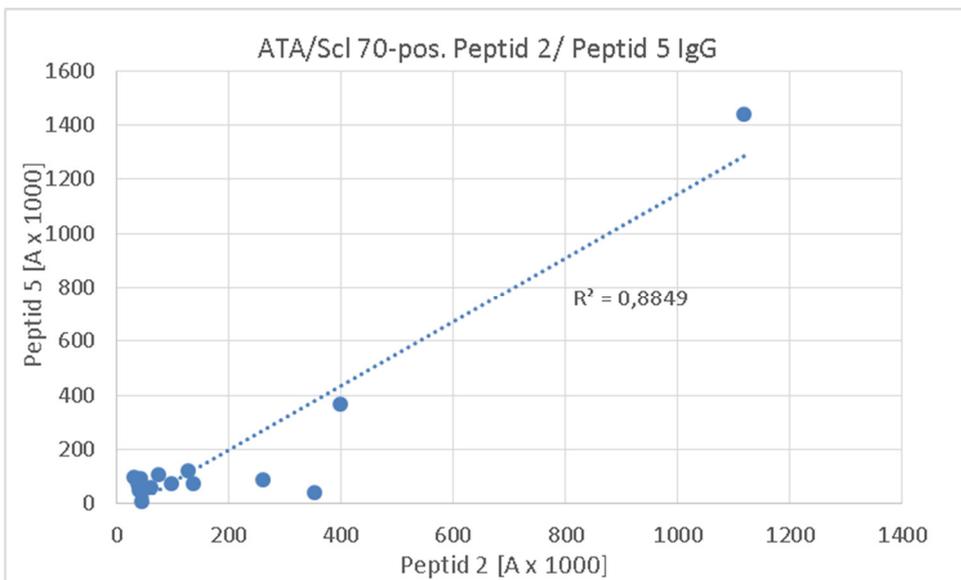


Abb. 3-36A

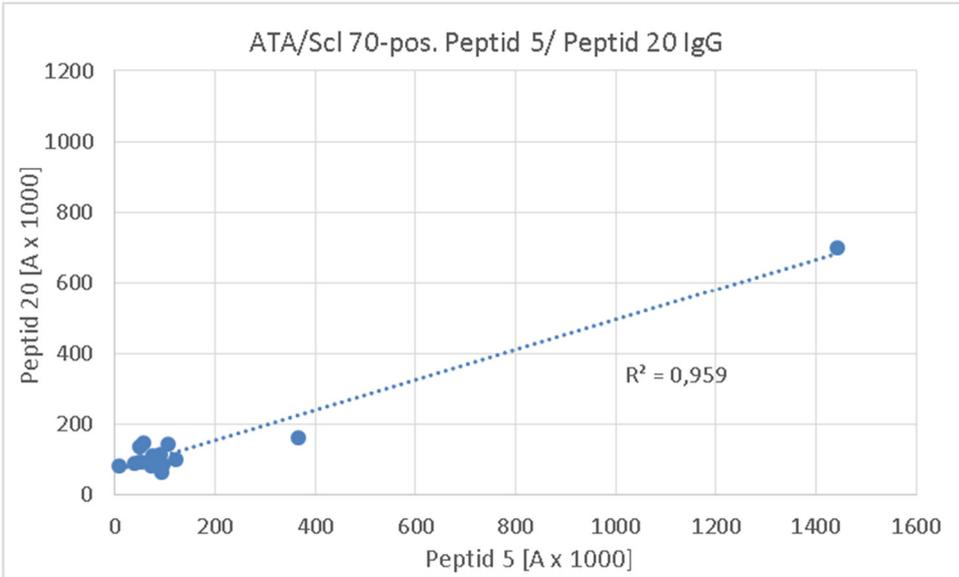


Abb. 3-36B

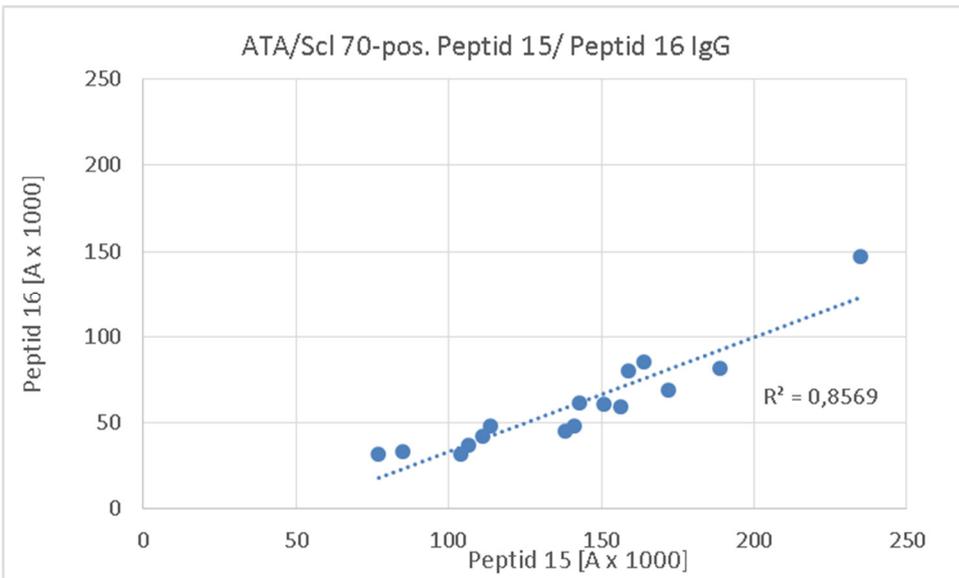


Abb. 3-36C

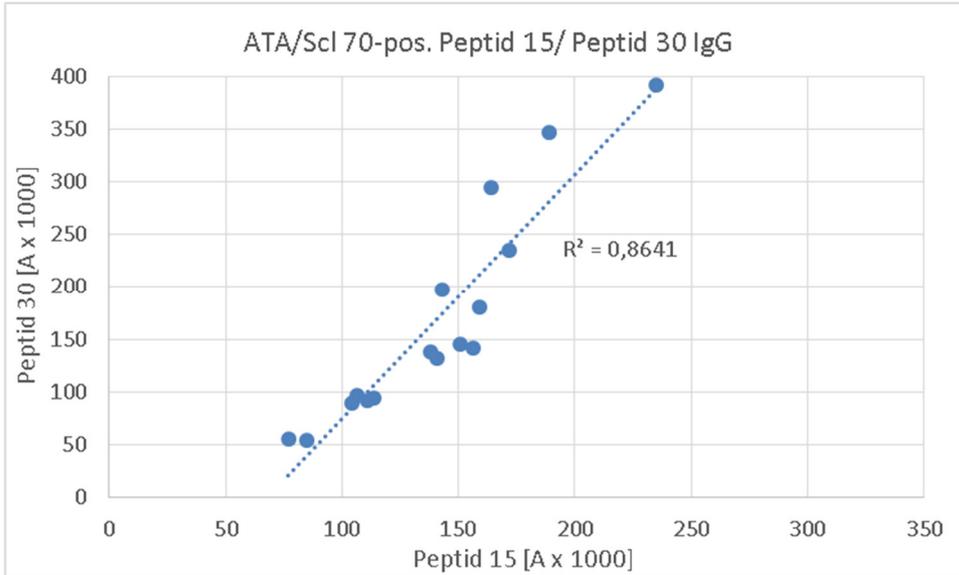


Abb. 3-36D

Abb. 3-36A-D Streudiagramme der IgG-Anti-Peptid-AAb verglichen mit anderen Anti-Peptid-AAb-Reaktivitäten von 16 ATA-/Scl 70-positiven dcSSc-Patienten. A) Anti-Peptid 2-IgG-AAb gegen Anti-Peptid 5-IgG-AAb aufgetragen. B) Anti-Peptid 5-IgG gegen Anti-Peptid 20-IgG. C) Anti-Peptid 15-IgG gegen Anti-Peptid 16-IgG. D) Anti-Peptid 15-IgG gegen Anti-Peptid 30-IgG. R^2 =Bestimmtheitsmaß, ATA = Anti-Topoisomerase I-Antikörper.

4. Diskussion

4.1. Häufigkeit und Reaktivität der Anti-Topoisomerase I-Antikörper

Anti-Scl 70-Antikörper wurden erstmals 1979 bei Patienten mit PSS beschrieben[20]. Das Targetantigen wurde 1986 als Topoisomerase I identifiziert[22, 188, 189]. Mit verschiedenen Messmethoden (z.B. ID, ELISA, Immunoblot) sowie mit auf verschiedene Arten gewonnenen Antigenen (aus Kalbsthymus extrahiert, rekombinant), als ganzes Protein und als Fragmente von diesem wurden unterschiedliche Prävalenzen zwischen 9 und 86% für verschiedene SSc- Kollektive gezeigt. So erhielten Aeschlimann et al.[201] Prävalenzen von 9% mittels Immundiffusionsverfahren, 48% mittels Immunoblot. Jarzabek-Chorzelska et al.[205] ermittelten eine Häufigkeit von 77% mit der Immundiffusion. Im ELISA beschrieben Hildebrandt et al.[208] eine Prävalenz von 48%, in der Immundiffusion von 29%. Tsay et al.[209] zeigten mittels ELISA eine Häufigkeit von 75% in einem Kollektiv in Taiwan.

Von unseren Patienten mit dcSSc, die hinsichtlich der Diagnosen nach den modifizierten Kriterien der ACR von 2013 reevaluiert worden waren, hatten 71% IgG-AAb gegen Topo FL und 75% IgG-AAb gegen Topo Tr.

Im Vergleich mit anderen Studien zeigte sich hiermit in der vorliegenden Arbeit eine etwas höhere Prävalenz als beispielsweise in der maßgeblichen Studie von Walker et al.[4] mit 61% bei 1349 Patienten mit dcSSc. Ähnliche Werte (60%) ermittelten Hanke et al.[231] in einem deutlich kleineren Kollektiv von 96 dcSSc-Patienten. Spencer-Green et al.[251] ermittelten in einer großen vergleichenden Studie eine durchschnittliche Prävalenz von 34% bei Patienten mit lcSSc und eine Häufigkeit von 40% bei dcSSc-Patienten, deren Anzahl in der Studie nicht genannt wird. Kleinere Studien, die lediglich ELISA-Methoden benutzten, berichteten neben deutlich niedrigeren Werten –25% durch Russo et al.[252]– durchaus auch von noch größeren Häufigkeiten bis 86% (n=45)[196].

Unsere im Vergleich zu den großen Vergleichsstudien etwas höhere Prävalenz mag durch die Einschlusskriterien des an der aHSCT teilnehmenden Kollektivs bedingt sein, da mehrfach von höheren Prävalenzen sowie höheren Aktivitäten in schwerer betroffenen Patientenkollektiven berichtet wird[231, 232] und da schwere Verlaufsformen ein Einschlusskriterium für die aHSCT darstellten.

Interessanterweise zeigte unser vergleichsweise kleines Kollektiv von dcSSc-Patienten mit bioptisch nachgewiesener Herzbeteiligung mit 56,3% eine geringere ATA-Prävalenz. Die Statistik mag in diesem Fall durch die relativ geringe Patientenzahl dieser Gruppe verfälscht sein. In der ursprünglichen Datenbank von Patienten mit bioptisch nachgewiesener Herzbeteiligung befanden sich auch wenige Patienten, bei denen im Routinelabor ACA nachgewiesen wurde und bei denen nach dem Befallsmuster eher eine lcSSc vorlag, diese waren für Topo FL und Tr IgG und IgM negativ (Daten sind nicht gezeigt) und wurden in der besagten Gruppe der Patienten mit Herzbeteiligung nicht berücksichtigt.

Eine geringere Prävalenz ergab sich im untersuchten Kollektiv für IgM-ATA (52 bzw. 43%), diese Beobachtung ist konkordant zu anderen Studien, die ebenfalls eine geringere Prävalenz im Vergleich mit anderen Isotypen zeigten[195, 253]. Im Vergleich mit diesen Studien ließ sich jedoch –wie bei IgG-ATA– in unserem Kollektiv eine größere Häufigkeit darstellen[195]. Ähnlich wie von Vazquez-Abad et al.[253] beschrieben, fanden sich zwar IgM-ATA vor allem bei IgG-ATA-positiven dcSSc-Patienten, es fanden sich jedoch auch IgM-AAb-positive Seren, die keine IgG-ATA aufwiesen. Es ergab sich allerdings eine deutlich höhere Prävalenz von IgM-ATA bei Patienten mit anderen Kollagenosen als dies für die IgG-Isotypen der Fall war –mit der Folge einer geringeren Spezifität.

Viele der Patienten, die im ELISA eine positive Reaktion zeigten, waren in der ID negativ. Vice versa waren lediglich bei drei Patienten präzipitierende Antikörper in der ID nachweisbar, jedoch keine oder nur grenzwertige ATA im ELISA (Patienten S21, S2 und S17). Dies ist zumindest teilweise in Einklang mit den Beobachtungen von Kuwana et al.[218, 254], da dies so interpretiert werden kann, dass einige dcSSc-Patienten Antikörper bilden, die ausschließlich auf konformationale Epitope reagieren und lineare Antigene nicht erkennen.

Die dcSSc-Patienten boten signifikant höhere IgG- und IgM-AAb-Reaktivitäten gegen beide Topo I-Antigene als die gesunden Probanden, die SjS/MCTD- und die lcSSc-Patienten; hinsichtlich letzterer mit Ausnahme der IgM-AAb gegen Topo Tr. Dieser Unterschied war nicht signifikant.

Insgesamt bestanden höhere Titer sowohl für IgG- als auch für IgM-AAb im

dcSSc-Kollektiv, weitestgehend passend zu den wenigen Studien, die Antikörper-Isotypen untersuchten, wie z.B. Martinez-Cordero et al.[196], die eine höhere IgG-Prävalenz (87%) und niedrigere IgM-Prävalenz (20%) als wir ermittelten. Gleichzeitig war die IgG-Reaktivität deutlich höher als die IgM-Reaktivität.[196] Ebenso zeigten Hildebrandt et al.[233] und Vazquez-Abad et al.[253] eine geringere Häufigkeit der IgM-Isotypen als der IgG-Isotypen bei jedoch deutlich geringerer Gruppengröße von 13 bzw. sechs (auch longitudinal) untersuchten Patienten.

4.2. Longitudinale Betrachtung der Anti-Topoisomerase I-Antikörper

Es existieren nur wenige longitudinale Studien, die den Verlauf von ATA-Prävalenz und Reaktivität unter Therapie oder auch ohne spezifische Therapie untersucht haben. Tsukamoto et al.[169] konnten eine signifikante Abnahme der ATA-Titer unter aHSCT zeigen. Hildebrandt et al.[233] dokumentierten keine signifikante Abnahme der ATA in einem Kollektiv ohne spezifische Therapie, während Kuwana et al.[234] in einer Subgruppe mit benignem Verlauf einen Verlust von ATA darstellen konnten. Eine longitudinale Untersuchung von IgM-AAb findet sich in der Literatur nur bei den o.g. Arbeiten von Hildebrandt et al. [233] sowie Vazquez-Abad et al. [233, 253], jedoch jeweils ohne Berücksichtigung einer spezifischen Therapie.

Weitestgehend kongruent zu den genannten Veröffentlichungen konnten wir eine signifikante Reduktion der Reaktivität für IgG in Patientenseren unter aHSCT zeigen, wobei es zu keiner signifikanten Abnahme der Häufigkeit kam. Kein Patient wurde unter der aHSCT IgG-ATA-negativ. Die Reaktivität von IgM-ATA nahm ebenso signifikant unter aHSCT ab, hier wurden unter aHSCT sechs bzw. acht Seren (Topo FL bzw. Tr) langfristig negativ und es kam damit zu einer signifikanten Reduktion der Prävalenz IgM-positiver Seren.

Unter CYC-Therapie sowie bei Patienten, die keine spezifische, immunsuppressive Therapie erhielten, kam es weder zu einer signifikanten Regredienz der Reaktivität noch der Häufigkeit (IgG und IgM). Hiervon lässt sich -passend zu den drei oben genannten Arbeiten- ableiten, dass der Einfluss der

aHSCT auf das Immunsystem, insbesondere auf die Autoantikörper-Produktion –wie erwartet– höher ist, als der Einfluss der CYC-Stoßtherapie und anderer supportiver Therapiemaßnahmen. Ferner scheint ein größerer Einfluss auf die IgM-AAb-Produktion zu bestehen als auf die IgG-AAb-Produktion bzw. auf die jeweilige AAb-Persistenz. Erstere ist nach unseren Daten jedoch weniger spezifisch für das Vorliegen einer dcSSc.

Neben einzelnen Seren, die IgM-negativ wurden, konnte auch eine de novo Entwicklung von IgG- und IgM-ATA (Topo Tr und Topo FL) dokumentiert werden (Pat. C9). Auch eine solche Entwicklung im Rahmen einer longitudinalen Studie wurde bereits von Hildebrandt et al.[233] beschrieben. Diese ist auch eine der wenigen Studien, in denen die IgM-AAb im zeitlichen Verlauf beobachtet wurden. Von den 13 in dieser Studie untersuchten Patienten waren jedoch nur zwei positiv für IgM-ATA. Vazquez-Abad et al.[253] konnten in ihrem kleinen Kollektiv von sechs dcSSc-Patienten keine signifikanten Veränderungen der IgM-AAb-Prävalenz und Reaktivität zeigen.

4.3. Korrelation von Anti-Topoisomerase I Antikörpern mit dem klinischen Verlauf nach aHSCT

Es ist bekannt, dass der Nachweis von ATA einen wichtigen Risikofaktor für einen schwereren Krankheitsverlauf mit bestimmten klinischen Befunden darstellt. Hu et al.[232] konnten auch die Höhe der IgG-ATA-Titer positiv mit dem Schweregrad korrelieren. Bei unseren Patienten, bei denen eine aHSCT durchgeführt wurde, hatten diejenigen mit einem schlechteren Outcome nach aHSCT signifikant erhöhte IgG-ATA Reaktivitäten vor der Therapie im Vergleich zu den Patienten mit gutem Ansprechen auf die aHSCT. Für die IgM-ATA ergab sich kein signifikanter Unterschied. Nach aHSCT waren aber zwischen beiden Gruppen – anders als erwartet– keine signifikanten Unterschiede im Verhalten der Antikörper zu beobachten, d.h. hinsichtlich der Prävalenzen und Reaktivitäten der ATA waren die Verläufe ähnlich. Während es für IgG-ATA nur vorübergehend zu einer Reduktion kam, zeigten beide Gruppen eine deutliche Reduktion der IgM-ATA-Prävalenzen, die jedoch aufgrund der geringen Gruppengrößen nicht statistisch signifikant waren.

Eine Untersuchung unterschiedlicher AAb-Reaktivitätsverläufe entsprechend gutem oder schlechtem Ansprechen unter aHSCT ist bei Tsukamoto et al.[169] zu finden, die nach aHSCT von einer signifikanten Abnahme der ATA-AAb-Reaktivitäten berichten, ferner von einer Korrelation der Titer-Reduktion mit der Besserung des mRSS. Von einer positiven Korrelation der AAb-Reaktivitäten im ELISA mit der Erkrankungsaktivität in der longitudinalen Betrachtung ohne definierte therapeutische Intervention berichten neben der o.g. Studie von Kuwana et al.[234] auch Hasegawa et al.[255]; hier im Sinne einer positiven Korrelation mit dem mRSS im zeitlichen Verlauf. In der auf unserer Arbeit basierenden Publikation konnte keine Korrelation der ATA-Reaktivitäten oder der Anti-Topo489-573-Reaktivitäten mit dem mRSS nachgewiesen werden[256].

4.4. Bedeutung der Antikörper gegen das immundominante Epitop und gegen die Peptide der Topoisomerase

Es sind einige Studien zu immundominanten Epitopen der Topoisomerase veröffentlicht worden. Insgesamt bietet sich in diesen ein heterogenes Bild an möglichen immundominanten Epitopen und deren Lokalisation (Tab. 1-7). In der Mehrzahl der Fälle wurden wenige Epitope verschiedener Längen untersucht, teils waren diese per Epitop-Vorhersage-Programmen berechnet worden (so z.B. Veeraraghavan et al.[140]) oder über eine Affinitätsselektion aus einer Peptid-Bibliothek heraus (so z.B. Simon et al.[219]), teils wurden größere Fragmente des Enzyms, die noch eine Reaktivität boten, repetitiv einem Deletionsverfahren unterzogen, bis die Reaktion der AAb-positiven Seren ausblieb, um so per Ausschlussverfahren immundominante Epitope identifizieren zu können (z.B. Piccinini et al.[215]). Lediglich eine weitere Studie (Rizou et al.[221]) untersuchte mit 63 Peptiden von 20 AA Länge mit jeweils acht AA-Überlappung eine größere Anzahl an Peptiden als wir, von denen dann vier Epitope (AA 205-224, AA 349-368, AA 397-416, AA 517-536) hinsichtlich ihres prädiktiven Wertes für die Entwicklung einer ILD überprüft wurden. Die Autoren zeigten, dass Patienten, deren Antikörper drei oder vier dieser Epitope erkannten, eine ungefähr dreifach erhöhte Wahrscheinlichkeit hatten, an einer ILD zu erkranken, als solche, deren Antikörper zwei oder weniger Epitope erkannten. Wir untersuchten die genannten

45 Peptide an 21 dcSSc Patienten, die sich der aHSCT unterzogen (von denen 16 ATA/Scl 70-positiv waren), sowie weiteren 19 dcSSc-Patienten, die nicht transplantiert wurden und den Kontrollgruppen wie oben beschrieben.

In unserer Studie ließen sich im dcSSc-Kollektiv gegenüber den gesunden Blutspendern für etwa die Hälfte der untersuchten Peptide signifikant mehr positive Reaktionen sowohl für IgG-Anti-Peptid-AAb als auch für IgM-Anti-Peptid-AAb darstellen.

Eine signifikant größere Häufigkeit positiver Serumreaktionen gegenüber allen drei Vergleichskollektiven ließ sich jedoch nur für die Peptide 3 (AA 35-59) und 39 (AA 647-671) (IgG) (alle dcSSc-Patienten) bzw. Peptide 5 (AA 69-93) und 39 (IgG) (16 ATA/Scl 70-positive) darstellen. Für IgM-AAb bestanden für kein Serum signifikant höhere Werte gegenüber allen drei Vergleichsgruppen.

Im Vergleich der Reaktivitäten zeigten sich ebenfalls in einer Mehrzahl der Fälle signifikant höhere Werte als bei gesunden Probanden (sowohl für IgG, als auch für IgM). Ebenso bestanden gegen die Mehrzahl der Peptide sowohl im Kollektiv aller 40 getesteten dcSSc-Patienten als auch im Kollektiv der 16 ATA/Scl 70-positiven Patienten signifikant höhere Reaktivitäten als in den anderen Kontrollgruppen. Gegenüber allen drei Kontrollgruppen waren jedoch nur die AAb-Reaktivitäten gegen Peptid 3, Peptid 24 (AA 392-416) und Peptid 39 für IgG (alle 40 dcSSc und ATA/Scl 70-positive) signifikant erhöht. Bei IgM-Anti-Peptid-AAb bestand eine signifikant höhere Reaktivität für Peptid 8 (AA 120-144) (alle dcSSc) bzw. Peptide 5 und 39 (ATA/Scl 70-positive).

Wie beschrieben besteht die Topoisomerase I aus fünf unterschiedlichen Domänen: der N-terminalen Region (AA 1-214), den Kern-Subdomänen I-II (AA 215-435), der Kern-Subdomäne III (AA 436-636), der Linker-Domäne (AA 637-713) und der C-terminale Domäne (AA 714-765)[193].

Der Bereich von Peptid 3-5, gegen den dcSSc-Patienten hohe AAb-Reaktivitäten zeigten, liegt im Bereich des N-Terminus der Topoisomerase I. Des Weiteren boten dcSSc-Patienten auch gegen andere im N-terminalen Bereich liegende Peptide (z.B. Peptide 8 und 10) sowie gegen im Bereich der Kern-Subdomäne I-II liegende Peptide (Peptid 22-24) (hiervon Peptid 8 für IgM und Peptid 24 für IgG auch signifikant gegenüber allen übrigen Kontrollgruppen) hohe AAb-

Reaktivitäten. Letzteres passt zu den Beobachtungen von Hu et al.[220], die mit Hilfe von auf Basis der Domänenstruktur der Topoisomerase I generierten Fusionsproteinen demonstrierten, dass ATA-positive Seren die Kern-Subdomänen I-II häufiger erkannten als die Subdomäne II.

Auffallend waren ferner die sowohl signifikant erhöhten Häufigkeiten für IgG-AAb als auch die signifikant höheren IgG- und IgM-AAb-Reaktivitäten für Peptid 39, welches in der Linker-Domäne lokalisiert ist. Wir fanden zusätzlich eine hohe Reaktivität ATA/ScI70-positiver und -negativer Seren mit der Region AA 732-756 (Peptid 44). Allerdings boten auch gesunde Individuen erhöhte AAb-Reaktivitäten gegen diese Region. Beide Beobachtungen passen sowohl zu denen von Verheijen et al.[257] als auch von Maul et al.[258], die immundominante Epitope in dieser Region vermuteten: Rekombinante Proteine, die die Regionen AA 657-765 bzw. AA 656-765 enthielten, wurden von 72% (Verheijen) bzw. 86% (Maul) ATA-positiver Seren erkannt. Ebenfalls im C-terminalen Bereich lokalisierte eine weitere Studie ein immundominantes Epitop: Meesters et al.[217] zeigten bei 83% ATA-positiver Seren eine Reaktion mit der Region AA 653-704. Als Kuwana et al. 1999 dieses Epitop untersuchten, konnten sie eine Reaktivität der großen Mehrzahl (81-100%) der untersuchten Seren von Patienten mit afroamerikanischer, nordamerikanisch-kaukasischer sowie Choctaw-Ethnizität bestätigen, während dies bei japanischen Patienten deutlich seltener gegeben war[254].

Darüber hinaus lässt sich prinzipiell zwar die Beobachtung von Kuwana et al. stützen, dass die Region AA 489-573 ein immundominantes Epitop darstellen kann, gegen diese Region boten jedoch auch gesunde Probanden und vor allem Patienten der anderen Kontrollgruppen (insbesondere IcSSc-Patienten) starke Reaktivitäten, sodass weder für die Peptide der Core-Subdomain III noch für das vermutet immundominante Epitop die Unterschiede zu allen Kontrollgruppen signifikant waren. Insbesondere boten auch die 5 untersuchten ATA/ScI 70-negativen Seren hier eine hohe Reaktivität. Diese Beobachtung ist in Einklang mit der Arbeit von Simon et al.[219], die bereits demonstrierten, dass der besagte, von Kuwana et al.[218] als immundominant beschriebene Bereich ebenfalls von gesunden Probanden sowie von Patienten mit anderen Erkrankungen aus dem

rheumatoiden Formenkreis erkannt wird. Sie postulierten daher, dass diese epitopspezifischen AAb zu dem Pool der natürlich vorkommenden Antikörper gehören könnten.

Es gibt darüber hinaus weitere Epitop-Mapping-Studien, die unterschiedliche, rekombinante Topo I-Proteine untersuchten. Verheijen et al.[211] testeten in einer früheren Arbeit mittels Immunoblotting die Reaktivität von 85 ATA-positiven Seren mit drei überlappenden Proteinen. Dabei ergaben sich drei immundominante Epitop-Regionen: ER-1 (AA 70-344 und/oder AA 589-657), ER-2 (AA 344-589) und ER-3 (AA 657-765), wobei eine Reaktivität gegen ER-3 nicht ohne eine solche gegen ER1 und/oder ER2 vorkam. Die N-terminalen 70 AA wurden nicht untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie sind Grundlage der Diskussion in vielen folgenden Studien zur Immundominanz. Gleiches gilt für die Studie von D'Arpa et al.[259], in der mit Hilfe von fünf rekombinanten Polypeptiden sechs immundominante Epitope identifiziert wurden, die sich auf zwei Regionen zwischen AA 277-484 (Epitop 1 & 2) und 484 -765 (Epitop 3-6) verteilten. Alles in allem passen die Ergebnisse dieser beiden Studien zu denen einer genaueren Mappingstudie von Cram et al.[213], in der sechs 100 bis 140 AA-lange Polypeptide untersucht wurden und eine Immundominanz in den Bereichen AA 1-139, AA 342-458, AA 453-560 sowie AA 656-765 dargestellt werden konnte, wobei der Bereich AA 453-560 von beinahe allen Seren erkannt wurde. In dieser Studie, ebenso wie in der o.g. von D'Arpa et al.[259], wurden jeweils ähnliche Regionen identifiziert, die keine AAb banden (AA 139-242 bzw. AA 171-277). In unserer Studie zeigten sich signifikant erhöhte Häufigkeiten IgG-AAb-positiver Seren gegen Peptid 8, welches am Rand der genannten Bereiche liegt. Ferner eine erhöhte Prävalenz von Anti-Peptid 15-IgG-AAb. Insbesondere fanden wir für IgM-AAb erhöhte Reaktivitäten und/oder Prävalenzen gegen Peptid 8, 11, 13 und 16. Insofern wäre es insbesondere interessant zu wissen, ob in den o.g. Studien auch IgM-AAb untersucht wurden. Im Gegensatz zu besagten Studien konnten Piccinini et al.[215] keine Epitope in den Bereichen AA 70-405 und 485-765 entdecken, vermuteten im Bereich AA 405-485 aufgrund unterschiedlicher Reaktionsmuster abhängig von der Art der Präsentation des Peptides (als C-Terminus, N-Terminus, internalisiert in einem Peptid) mindestens zwei Epitope.

Cram et al.[213] diskutierten bereits als mögliche Ursache dieser Diskrepanz die geringe Anzahl der untersuchten Patienten (N=7) in der Studie von Piccinini, welche aufgrund ihrer sehr hohen Reaktivität im Boxplot ausgesucht worden waren. Wie bereits oben erwähnt, konnten Maul et al.[258] in einem Kollektiv von 85 Patienten eine Reaktion von 83% mit einem 109 AA langen Peptid der C-terminalen Region darstellen und diese als immundominant beschreiben. Diese Beobachtung passt sowohl zu unseren (Peptid 44) als auch zu den Beobachtungen von Cram und Verheijen[211, 213, 257].

Rizou et al.[221] berichten von vier Haupt-Epitopen mit den Sequenzen AA 205-224 (N-terminal bis Kern-Subdomäne I), AA 349-368 und AA 397-368 (Kern-Subdomäne I-II, passend zu Hu et al.[220]) sowie AA 517-536 (Kern-Subdomäne III). Schließlich muss die Studie von Kato et al.[222], die ein universelles B-Zell-Epitop im Bereich AA 547-565 beschrieben, erwähnt werden sowie die eingangszitierte Studie von Kuwana et al.[218], die im Bereich der Kern-Subdomäne III ein konformationales Epitop beschreibt (AA 489-573), welches von 89 von 100 ATA-positiven Seren erkannt wurde.

Antikörper gegen die Topoisomerase I bzw. deren Bestandteile könnten eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielen. So postulierten Douvas et al.[235] eine Aktivierung von Kollagen-codierenden Genen durch ATA. Eine Beeinflussung der Wirkung des Epidermal-Growth-Factor vermuteten Samuel et al.[194]. Ferner wurden die Aktivierung von Fibroblasten durch die Bindung von Antikörper-Antigenkomplexen an die Zelloberfläche beschrieben sowie die Entwicklung von Autoimmunität durch Bindung dieser Komplexe an die Oberfläche von dendritischen Zellen und Monozyten[239-241].

4.5. Korrelationen

Betrachtet man nun nicht nur die signifikanten Unterschiede zwischen den dcSSc-Gruppen und den entsprechenden Kontrollgruppen hinsichtlich der Prävalenzen und Reaktivitäten der verschiedenen untersuchten Antikörper, sondern ermittelt die Korrelationen der Antikörperreaktivitäten der dcSSc-Kollektive gegenüber den einzelnen Antigenen, so zeigt sich ein heterogenes

Bild.

Zunächst ist festzuhalten, dass zwischen der IgG-AAb-Reaktivität gegenüber der 100 kDa großen Topoisomerase –in dieser Arbeit Topo FL– und ihrem 70 kDa großen Spaltprodukt, dem klassischen Scl 70-Antigen –in dieser Arbeit Topo Tr – eine sehr starke Korrelation (sowohl mittels linearer, als auch mittels Rangkorrelationsverfahren) bestand ($r = 0,98$; $R^2 = 0,91$; $Rho = 0,93$) und dass letztlich kein relevanter Unterschied in der ELISA-Diagnostik zwischen diesen beiden rekombinanten Antigenen existieren dürfte. Auch zwischen den IgM-AAb-Reaktivitäten gegenüber Topo FL und Topo Tr bestand eine starke Korrelation ($r = 0,9$; $R^2 = 0,8$; $Rho = 0,93$). Zwischen den IgM- und IgG-AAb-Reaktivitäten jedoch ließ sich eine nur schwache bis mittlere Korrelation nachweisen. Diese dürfte aus dem Umstand resultieren, dass zwar die meisten IgM-AAb-positiven Patienten auch eine hohe IgG-Reaktivität aufweisen, jedoch IgM-AAb auch bei IgG-negativen Patienten vorkommen. Dies wurde in einem Kollektiv von 45 dcSSc-Patienten bereits von Martinez-Cordero et al.[196] beschrieben. Da in anderen Studien, die Antikörperisotypen untersuchten, meist ausschließlich IgG-positive Patienten auf das zusätzliche Vorkommen von anderen Isotypen untersucht wurden[195, 257], ist ein Vergleich mit unserer Studie nicht in letzter Konsequenz möglich. Die Hypothese, dass sich eine stärkere Korrelation von IgM- mit IgG-AAb-Reaktivitäten ermitteln lässt, wenn ausschließlich ATA-positive Patienten untersucht werden, muss angesichts der ebenfalls nur schwachen Korrelation im Kollektiv der ATA/Scl 70-positiven Patienten als sehr unwahrscheinlich angesehen werden.

Zwischen den IgG-AAb gegen das immundominante Epitop Topo 489-573 und gegen Topo FL bzw. Tr bestand eine signifikante Korrelation mittlerer Stärke ($r = 0,59$ bzw. $r = 0,60$, $Rho = 0,56$ bzw. $Rho = 0,57$). In der entsprechenden Betrachtung von IgM-Antikörpern ergaben sich deutlich schwächere Korrelationen. Angesichts dieses Ergebnisses und der oben diskutierten, weniger signifikanten Unterschiede der Prävalenzen und Reaktivitäten des immundominanten Epitops der dcSSc-Patienten gegenüber den vollständigen Topo I-Antigenen ist letztlich von einer geringeren diagnostischen Wertigkeit des Epitops auszugehen.

Zwischen den Peptiden der Topoisomerase und den Topo I-Antigenen Topo FL und Tr bestanden insgesamt deutlich mehr signifikante und auch stärkere Korrelationen für IgM-AAb als für IgG-AAb. Insbesondere sind hier die Peptide 2, 3, 5, 24, 39 und 45 zu nennen. Von diesen boten die Peptide 3, 5, 24 und 39 auch in dem Vergleich der Reaktivitäten bzw. Prävalenzen zwischen den dcSSc-Kollektiven und den Kontrollgruppen signifikante Unterschiede. Insbesondere Peptid 5 (AA 69-93) bot mit verschiedenen Korrelationskoeffizienten (Pearsons r bzw. Spearman's Rho) hinsichtlich IgG- und IgM-AAb signifikante, teils sogar starke Korrelationen. Letztlich befanden sich die Korrelationen zwischen den Reaktivitäten der AAb gegen die Topo I-Antigene und den genannten Peptiden meist in einem ähnlichen Bereich der Stärke wie die Korrelation von Topo489-573 mit den Topo I-Antigenen. Korrelationen von der Stärke der Reaktivitäten der AAb gegen die beiden Topo I-Antigene untereinander fanden sich nicht.

Interessanterweise bestanden zwischen den Peptid-Reaktivitäten untereinander teilweise hoch-signifikante Korrelationen. Erneut zeigten hier die IgM-AAb häufiger signifikante und stärkere Korrelationen. Aber auch für IgG-AAb bieten sich viele signifikante Korrelationen von großer Stärke. Es waren vor allem Korrelationen zwischen benachbarten Peptiden (z.B. Peptide 15 und 16, oder Peptide 22, 23, 25 und 26) zu finden. Dies passt einerseits zu einer Einteilung dieser Peptide in funktionelle bzw. strukturelle und letztlich auch immunogene Regionen innerhalb des Enzyms, andererseits könnte diese Beobachtung auch durch die Reaktion der Seren mit den jeweils überlappenden Aminosäuresequenzen zu erklären sein. Es bestanden aber auch Korrelationen zwischen weiter entfernt voneinander liegenden Peptiden (Peptide 1 und 26 bzw. 38 oder Peptide 5 und 20). Die Reaktivitäten der AAb gegen die vollständigen Topo I-Antigene korrelierten weder mit den Anti-Topo489-573-AAb, noch mit den Anti-Peptid-AAb so stark wie die Reaktivitäten der AAb gegen die beiden Topoisomerase-Antigene miteinander. Obwohl ebenso wenig eine herausragende Korrelation von Anti-Topo489-573 mit Anti-Peptid-AAb bestand, kann dennoch –aufgrund der hohen Korrelationsstärke zwischen den einzelnen Anti-Peptid-AAb untereinander– davon ausgegangen werden, dass hier signifikante und möglicherweise auch charakteristische Reaktionsmuster im

Rahmen der Autoimmunität der dcSSc-Patienten gegenüber den untersuchten Peptiden und Oligopeptiden der Topoisomerase bestehen. Möglicherweise ist dies das Ergebnis von langfristigen, repetitiven Prozessierungen von Fragmenten der Topoisomerase in Gegenwart eines aktivierten autoreaktiven Immunsystems. Ebenso wäre denkbar, dass diese Sequenzen –angesichts hoher Anti-Peptid-AAb-Reaktivitäten auch bei Patienten mit anderen Kollagenosen und gesunden Probanden– Bestandteile natürlich vorkommender Autoantikörper darstellen.

Die zitierten Studien mit teils diskrepanten Ergebnissen sowie unsere eigenen Ergebnisse belegen, dass die AAb-Reaktivität gegen die Topoisomerase I sehr heterogen ist und auch von der ethnischen Herkunft und genetischen Komponenten sowie vom Stadium und der Aktivität der Erkrankung bzw. den Krankheitsmanifestationen abhängig ist[221, 254, 260].

4.6. Einfluss einer autologen Stammzelltransplantation auf die Anti-Topoisomerase I-Antikörper

Die autologe Stammzelltransplantation (aHSCT) wurde 1996 in die Behandlung der SSc eingeführt und hat sich seitdem als effektivste Therapieoption für Patienten mit schwerer Erkrankung erwiesen[156, 261, 262]. Angesichts von potentiell lebensbedrohlichen, insbesondere kardialen und pulmonalen Nebenwirkungen der Therapie sollte die Indikation unter Berücksichtigung des Performancestatus, des kardialen Risikoprofils und im Speziellen unter Berücksichtigung der rechtsventrikulären Funktion (pulmonalarterieller Druck) gestellt werden[263, 264]. Das zu Grunde liegende Konzept der Anwendung der aHSCT bei Autoimmunerkrankungen besteht in der Hypothese, dass auf diesem Wege ein „Neustart“ des Immunsystems durch die Eradikation der autoreaktiven Lymphozyten im Rahmen der immunoablativen Konditionierung bzw. eine „Korrektur“ der dysregulierten Immunbalance durch neu ausgereifte Lymphozyten aus den transplantierten hämatopoetischen Stammzellen sowie auch eine veränderte Verteilung der Th1- und Th2-Zellen erwirkt werde[169, 265]. Wie bereits von Burt et al.[167] angemerkt wurde, ist allerdings der Begriff „autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation“ eine irreführende

Bezeichnung, da es sich nicht im eigentlichen Sinne um eine Transplantation handelt, sondern um die Infusion eines autologen Blutproduktes – analog zur Re-Infusion eines vor einem Eingriff gesammelten Eigenblutpräparates nach dieser Operation. Da es nur wenige Zentren gibt, an denen bei Patienten mit dcSSc diese Therapieform unter Studienbedingungen durchgeführt wird, gibt es auch nur wenige Studien, die die Wiederherstellung des Immunsystems nach aHSCT bei dcSSc-Patienten untersuchen. Farge et al.[242] berichteten von einer anhaltenden Reduktion der CD4+ T-Zellen und der B Zellen in sieben SSc Patienten nach aHSCT. In der Studie von Tsukamoto et al.[169] bestanden neben der bereits thematisierten Reduktion der ATA-Reaktivität Hinweise darauf, dass in der untersuchten Kohorte von elf Patienten die aHSCT eine Verlagerung von einer Th2- zu einer Th1-Prädominanz induziert hatte. Szodoray et al.[243] untersuchten Patienten mit Autoimmunerkrankungen einschließlich der SSc und konnten nach aHSCT eine Verminderung der AAb- und Zytokinkonzentration in Patientenseren nachweisen, regulatorische T-Zellen jedoch waren nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu zeigten Storek et al.[244], dass die ATA-Reaktivität während der 24 Monate nach Therapie ungewöhnlich hoch blieb. Dies passt zu unseren Beobachtungen: Obwohl die ATA-Reaktivität nach aHSCT signifikant abnahm, blieb sie doch in den meisten Patientenseren deutlich positiv. Die Reaktivitäten gegen die Peptide änderten sich ebenfalls nur bei wenigen Patienten und insbesondere die Peptidspezifität änderte sich nicht. Dies lässt drei Schlussfolgerungen zu:

1. die aHSCT führte nicht zu einer Neuprogrammierung des Immunsystems in den betreffenden Patienten, oder:
2. die re-infundierten CD34+ Stammzellen entwickelten sich erneut in autoreaktive Zellen, die in der Lage sind Topo I-Antigene zu erkennen.
3. die Therapieintensität war nicht ausreichend, um die autoreaktiven Zellen sowie die langlebigen, weiterhin AAb produzierenden Plasmazellen zu eradizieren.

Daher ist es unerlässlich, zwischen myeloablativen und nicht-myeloablativen Transplantationsmethoden zu unterscheiden: Konditionierungsprotokolle, die einen irreversiblen Knochenmarksdefekt bewirken und damit eine obligatorische

Stammzellreinfusion bedingen, werden als myeloablativ bezeichnet. Diese verursachen ein erheblich erhöhtes Risiko einer sekundären Leukämie, myelodysplastischer Syndrome sowie solider Tumoren. Im Gegensatz dazu sind nicht-myeloablative Konditionierungsprotokolle, wie sie bei unseren und weltweit bei den meisten der transplantierten dcSSc Patienten verwendet werden, weniger intensiv und verwenden relativ lymphozytenspezifische Chemotherapeutika und antilymphozytäre Antikörper, die antiinflammatorische Wirkungen besitzen, ohne das Regenerationspotential des Knochenmarkes schwer einzuschränken. Diese Art der Konditionierung bringt möglicherweise eine erhöhte Rückfallrate mit sich. Deswegen analysierten wir, ob die Persistenz bzw. das Wiederauftreten von ATA bzw. Anti-Peptid-AAb nach aHSCT mit einem Therapieversagen oder einem Krankheitsrezidiv korrelieren könnten. Hierfür gab es jedoch keine Hinweise.

Obwohl die aHSCT eine wirkungsvolle Therapieoption für ausgesuchte SSc Patienten darstellt, muss zusammenfassend festgehalten werden, dass keine Evidenz für einen nachhaltigen Effekt der Therapie auf das humorale Immunsystem der behandelten Patienten nachgewiesen werden konnte. Ferner können die ATA nur mit großen Einschränkungen, die AAb gegen Topo489-573 und gegen die Peptide der Topoisomerase überhaupt nicht als Biomarker für den Krankheitsverlauf nach der Therapie verwendet werden. Allerdings hatten Patienten mit schlechterem Ansprechen eine signifikant höhere ATA-Reaktivität vor der aHSCT. Ebenfalls bestand für diese Patienten eine höhere Anti-Topo489-573-AAb-Reaktivität; dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Dies stellt auch angesichts des heterogenen Reaktivitätsmusters gegenüber den verschiedenen untersuchten Antigenen die klinische bzw. ätiopathogenetische Relevanz der ATA für die SSc in Frage und zeigt im Weiteren eindeutig den großen Bedarf für intensivere Studien über die Immunrekonstitution und den „Neustart“ des Immunsystems nach aHSCT auf.

5. Zusammenfassung

Dies ist die erste Studie, die an einer großen Anzahl von Patienten mit dcSSc den Verlauf von Antikörpern gegen Topoisomerase I und ihre Peptide unter verschiedenen Therapieformen, insbesondere unter Cyclophosphamid-Therapie und nach einer autologen Stammzelltransplantation, untersucht.

In einem ersten Schritt wurde ein ELISA etabliert mit Topoisomerase I full length (AA 1-765) (FL), Topoisomerase I truncated (AA 191-765) (Tr), dem von Kuwana et al.[218] als immundominant beschriebenen Peptid Topo489-573 und 45 Peptidfragmenten der Topoisomerase I von 25 AA Länge mit einer Überlappung von jeweils 8 AA. Bei Testung von Seren von n=56 bzw n=40 Patienten mit dcSSc und n=76 bzw. n=24 anderen Probanden (Gesunde und andere Kollagenosen) ergab sich eine Spezifität für Topo I FL, Topo I Tr und Topo489-573 von 92%, 88% und 67% und eine Sensitivität von 71%, 75%, und 70%.

Die Patienten mit dcSSc wurden anhand ihrer Therapien in drei Gruppen unterteilt (Patienten mit aHSCT n=24, Patienten mit Cyclophosphamid-Stoßtherapie n=14, Patienten ohne immunsuppressive Therapie n=12) und die Antikörperreaktivität und -häufigkeit wurde im Verlauf nach der Therapie untersucht. Die Reaktivität der IgG-ATA nahm unter dem Einfluss der aHSCT signifikant ab, die Seren wurden jedoch nicht AAb-negativ. Bei Patienten, die mit einer Cyclophosphamidstoßtherapie oder mit keiner spezifischen immunsuppressiven Therapie behandelt wurden, bestand keine solche Veränderung der Reaktivität. Die Reaktivität der IgM-ATA nahm unter aHSCT signifikant ab, eine signifikante Anzahl von Patienten wurde IgM-ATA-negativ.

Die Patienten, die mit einer aHSCT behandelt worden waren, wurden in zwei Gruppen aufgeteilt: Gruppe 1 mit gutem Ansprechen auf die Therapie, Gruppe 2 mit schlechtem Ansprechen oder einem Rezidiv. Patienten mit gutem Ansprechen auf die aHSCT wiesen zwar vor der Therapie eine signifikant niedrigere IgG-ATA-Reaktivität auf als Patienten der Gruppe 2, zu einer stärkeren Abnahme der AAb-Reaktivität kam es jedoch im Verlauf nach der aHSCT nicht.

Bei der Analyse der Antikörperreaktivitäten gegen die 45 Peptide hatten dcSSc-Patienten nur gegen wenige signifikant häufiger Antikörper oder eine signifikant höhere Antikörperreaktivität als Patienten mit anderen Erkrankungen.

Die Reaktivitäten gegenüber den einzelnen Peptiden korrelierten nicht oder nur gering mit denen gegenüber Topo Tr bzw. FL; dagegen fanden sich teilweise sehr starke Korrelationen in den Reaktivitäten zwischen einzelnen Peptiden.

Die publizierte Immundominanz des Epitops Topo489-573 konnte nur teilweise bestätigt werden. Mit diesem Epitop sowie mit Peptiden in diesem Bereich der Topoisomerase zeigten auch Seren gesunder Probanden und Patienten mit anderen Kollagenerkrankungen starke Reaktivitäten. Eine signifikant höhere Reaktivität der dcSSc Patienten gegenüber den Vergleichsgruppen bestand nicht, sodass es sich hier auch um natürlich vorkommende Autoantikörper handeln kann.

Patienten mit schlechterem Ansprechen auf die aHSCT hatten vor der Therapie häufiger Anti-Topo489-573-AAb und höhere AAb-Reaktivitäten gegen Topo489-573 als Patienten mit besserem Ansprechen, dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant.

Ein Wechsel der Epitopspezifität unter der aHSCT konnte nicht gezeigt werden. Die in dieser Arbeit vorgelegten Befunde zeigen, dass die ATA bei der dcSSc in erster Linie gegen Konformations-spezifische und nicht gegen lineare Epitope gerichtet sind. Einzelne Peptide der Topoisomerase werden dagegen auch von natürlich vorkommenden Antikörpern bei Patienten mit anderen Erkrankungen oder gesunden Probanden erkannt. Die AAb-Reaktivität von Patienten mit dcSSc ist insgesamt heterogen und möglicherweise auch abhängig von der ethnischen Herkunft, Genetik oder auch dem Krankheitsstadium bzw. der Krankheitsmanifestation. Ferner wird deutlich, dass Cyclophosphamid-Therapie die ATA-Reaktivität nicht beeinflusst und auch eine aHSCT nur einen geringen Effekt hat. Man kann daher postulieren, dass die aHSCT nicht zu einer Rekonstitution der B-Zellen führt, trotz des beobachteten positiven klinischen Effektes. Dies lässt sich aber dadurch erklären, dass die ATA mit großer Wahrscheinlichkeit keine pathogenetische Bedeutung haben. Weitere Untersuchungen zur Immunrekonstitution insbesondere von spezifischen T- und vor allem regulatorischen T-Zellen nach aHSCT sind daher wichtig und könnten auch einen Beitrag zur Aufklärung der Immunpathogenese der dcSSc leisten.

6. Literaturverzeichnis

1. LeRoy EC, Medsger TA, Jr.: **Criteria for the classification of early systemic sclerosis.** *The Journal of rheumatology* 2001, **28**(7):1573-1576.
2. Balbir-Gurman A, Braun-Moscovici Y: **Scleroderma overlap syndrome.** *The Israel Medical Association journal : IMAJ* 2011, **13**(1):14-20.
3. Wollheim FA: **Classification of systemic sclerosis. Visions and reality.** *Rheumatology* 2005, **44**(10):1212-1216.
4. Walker UA, Tyndall A, Czirjak L, Denton C, Farge-Bancel D, Kowal-Bielecka O, Muller-Ladner U, Bocelli-Tyndall C, Matucci-Cerinic M: **Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database.** *Annals of the rheumatic diseases* 2007, **66**(6):754-763.
5. Armando Laborde H, Young P: **[History of systemic sclerosis].** *Gaceta medica de Mexico* 2012, **148**(2):201-208.
6. Farr S: **The History of Epidemics, by Hippocrates, in 7 Books, Translated Into English from the Greek, with Notes and Observations and a Preliminary Dissertation on the Nature and Cause of Infection, by Samuel Farr:** T. Cadell; 1780.
7. Norton SA: **What caused the Athenian itch in Hippocrates' On epidemics?** *Journal of the American Academy of Dermatology* 2007, **57**(6):1093-1094.
8. Rodnan GP, Benedek TG: **An historical account of the study of progressive systemic sclerosis (diffuse scleroderma).** *Annals of internal medicine* 1962, **57**:305-319.
9. Curzio C: **Discussioni Anatomico-Pratiche di un raro e stravagante morbo cutaneo in una giovane Donna felicemente curato in questo grande Ospedale degl' Incurabili.** Neapel: Di Simone, G.; 1755.
10. Capusan I: **Curzio's case of scleroderma.** *Annals of internal medicine* 1972, **76**(1):146.
11. Ellis RM, Moitra R, North N: **Turgenev's 'living relic': an early description of scleroderma?** *Journal of the Royal Society of Medicine* 2005, **98**(8):372-374.
12. Suter H: **Paul Klee's illness (systemic sclerosis) and artistic transfiguration.** *Frontiers of neurology and neuroscience* 2010, **27**:11-28.
13. Aronson JK, Ramachandran M: **The diagnosis of art: scleroderma in Paul Klee - and Rembrandt's scholar?** *Journal of the Royal Society of Medicine* 2010, **103**(2):70-71.
14. Tuffanelli DL, Winkelmann RK: **Diffuse systemic scleroderma. A comparison with acrosclerosis.** *Annals of internal medicine* 1962, **57**:198-203.
15. Winterbauer RH: **Multiple Telangiectasia, Raynaud's Phenomenon, Sclerodactyly, and Subcutaneous Calcinosis: A Syndrome Mimicking Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia.** *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 1964, **114**:361-383.
16. Salerni R, Rodnan GP, Leon DF, Shaver JA: **Pulmonary hypertension**

- in the CREST syndrome variant of progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Annals of internal medicine* 1977, **86**(4):394-399.
17. Martin D, Jr., Woeber KA, Smith LH, Jr.: **Progressive systemic sclerosis. "Something old, something new, something borrowed, something blue"**. *California medicine* 1973, **119**(2):35-42.
 18. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, Jr., Rowell N, Wollheim F: **Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis**. *The Journal of rheumatology* 1988, **15**(2):202-205.
 19. Beck JS, Anderson JR, Gray KG, Rowell NR: **Antinuclear and Precipitating Autoantibodies in Progressive Systemic Sclerosis**. *Lancet* 1963, **2**(7319):1188-1190.
 20. Douvas AS, Achten M, Tan EM: **Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma**. *The Journal of biological chemistry* 1979, **254**(20):10514-10522.
 21. Moroi Y, Peebles C, Fritzler MJ, Steigerwald J, Tan EM: **Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980, **77**(3):1627-1631.
 22. Guldner HH, Szosteki C, Vosberg HP, Lakomek HJ, Penner E, Bautz FA: **Scl 70 autoantibodies from scleroderma patients recognize a 95 kDa protein identified as DNA topoisomerase I**. *Chromosoma* 1986, **94**(2):132-138.
 23. **Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee**. *Arthritis and rheumatism* 1980, **23**(5):581-590.
 24. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, Matucci-Cerinic M, Naden RP, Medsger TA, Jr., Carreira PE *et al*: **2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative**. *Annals of the rheumatic diseases* 2013, **72**(11):1747-1755.
 25. Barnes J, Mayes MD: **Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers**. *Current opinion in rheumatology* 2012, **24**(2):165-170.
 26. Lo Monaco A, Bruschi M, La Corte R, Volpinari S, Trotta F: **Epidemiology of systemic sclerosis in a district of northern Italy**. *Clinical and experimental rheumatology* 2011, **29**(2 Suppl 65):S10-14.
 27. Rosa JE, Soriano ER, Narvaez-Ponce L, del Cid CC, Imamura PM, Catoggio LJ: **Incidence and prevalence of systemic sclerosis in a healthcare plan in Buenos Aires**. *Journal of clinical rheumatology : practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases* 2011, **17**(2):59-63.
 28. Kuo CF, See LC, Yu KH, Chou IJ, Tseng WY, Chang HC, Shen YM, Luo SF: **Epidemiology and mortality of systemic sclerosis: a nationwide population study in Taiwan**. *Scandinavian journal of rheumatology*

- 2011, **40**(5):373-378.
29. Minz RW, Kumar Y, Anand S, Singh S, Bamberi P, Verma S, Shegal S: **Antinuclear antibody positive autoimmune disorders in North India: an appraisal.** *Rheumatology international* 2012, **32**(9):2883-2888.
 30. Mayes MD, Lacey JV, Jr., Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ, Schottenfeld D: **Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population.** *Arthritis and rheumatism* 2003, **48**(8):2246-2255.
 31. Roberts-Thomson PJ, Walker JG, Lu TY, Esterman A, Hakendorf P, Smith MD, Ahern MJ: **Scleroderma in South Australia: further epidemiological observations supporting a stochastic explanation.** *Internal medicine journal* 2006, **36**(8):489-497.
 32. Geirsson AJ, Steinsson K, Guthmundsson S, Sigurthsson V: **Systemic sclerosis in Iceland. A nationwide epidemiological study.** *Annals of the rheumatic diseases* 1994, **53**(8):502-505.
 33. Tamaki T, Mori S, Takehara K: **Epidemiological study of patients with systemic sclerosis in Tokyo.** *Archives of dermatological research* 1991, **283**(6):366-371.
 34. Alamanos Y, Tsifetaki N, Voulgari PV, Siozos C, Tsamandouraki K, Alexiou GA, Drosos AA: **Epidemiology of systemic sclerosis in northwest Greece 1981 to 2002.** *Seminars in arthritis and rheumatism* 2005, **34**(5):714-720.
 35. Rodnan GP, Lipinski E, Luksick J: **Skin thickness and collagen content in progressive systemic sclerosis and localized scleroderma.** *Arthritis and rheumatism* 1979, **22**(2):130-140.
 36. Furst DE, Clements PJ, Steen VD, Medsger TA, Jr., Masi AT, D'Angelo WA, Lachenbruch PA, Grau RG, Seibold JR: **The modified Rodnan skin score is an accurate reflection of skin biopsy thickness in systemic sclerosis.** *The Journal of rheumatology* 1998, **25**(1):84-88.
 37. Clements P, Lachenbruch P, Siebold J, White B, Weiner S, Martin R, Weinstein A, Weisman M, Mayes M, Collier D *et al*: **Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis.** *The Journal of rheumatology* 1995, **22**(7):1281-1285.
 38. Clements PJ, Hurwitz EL, Wong WK, Seibold JR, Mayes M, White B, Wigley F, Weisman M, Barr W, Moreland L *et al*: **Skin thickness score as a predictor and correlate of outcome in systemic sclerosis: high-dose versus low-dose penicillamine trial.** *Arthritis and rheumatism* 2000, **43**(11):2445-2454.
 39. Steen VD, Conte C, Owens GR, Medsger TA, Jr.: **Severe restrictive lung disease in systemic sclerosis.** *Arthritis and rheumatism* 1994, **37**(9):1283-1289.
 40. Denton CP, Cailles JB, Phillips GD, Wells AU, Black CM, Bois RM: **Comparison of Doppler echocardiography and right heart catheterization to assess pulmonary hypertension in systemic sclerosis.** *British journal of rheumatology* 1997, **36**(2):239-243.
 41. Merkel PA, Clements PJ, Reveille JD, Suarez-Almazor ME, Valentini G, Furst DE, Omeract: **Current status of outcome measure development**

- for clinical trials in systemic sclerosis. Report from OMERACT 6.** *The Journal of rheumatology* 2003, **30**(7):1630-1647.
42. Owens GR, Follansbee WP: **Cardiopulmonary manifestations of systemic sclerosis.** *Chest* 1987, **91**(1):118-127.
 43. Follansbee WP, Curtiss EI, Rahko PS, Medsger TA, Jr., Lavine SJ, Owens GR, Steen VD: **The electrocardiogram in systemic sclerosis (scleroderma). Study of 102 consecutive cases with functional correlations and review of the literature.** *The American journal of medicine* 1985, **79**(2):183-192.
 44. McWhorter JEt, LeRoy EC: **Pericardial disease in scleroderma (systemic sclerosis).** *The American journal of medicine* 1974, **57**(4):566-575.
 45. Wigley FM, Korn JH, Csuka ME, Medsger TA, Jr., Rothfield NF, Ellman M, Martin R, Collier DH, Weinstein A, Furst DE *et al*: **Oral iloprost treatment in patients with Raynaud's phenomenon secondary to systemic sclerosis: a multicenter, placebo-controlled, double-blind study.** *Arthritis and rheumatism* 1998, **41**(4):670-677.
 46. ter Borg EJ, Piersma-Wichers G, Smit AJ, Kallenberg CG, Wouda AA: **Serial nailfold capillary microscopy in primary Raynaud's phenomenon and scleroderma.** *Seminars in arthritis and rheumatism* 1994, **24**(1):40-47.
 47. Mallee C, Meijers KA, Cats A: **Renal scleroderma, value of clinical markers.** *Clinical and experimental rheumatology* 1985, **3**(4):287-290.
 48. Traub YM, Shapiro AP, Rodnan GP, Medsger TA, McDonald RH, Jr., Steen VD, Osial TA, Jr., Tolchin SF: **Hypertension and renal failure (scleroderma renal crisis) in progressive systemic sclerosis. Review of a 25-year experience with 68 cases.** *Medicine* 1983, **62**(6):335-352.
 49. Steen VD, Medsger TA, Jr.: **The value of the Health Assessment Questionnaire and special patient-generated scales to demonstrate change in systemic sclerosis patients over time.** *Arthritis and rheumatism* 1997, **40**(11):1984-1991.
 50. Nihtyanova SI, Brough GM, Black CM, Denton CP: **Mycophenolate mofetil in diffuse cutaneous systemic sclerosis--a retrospective analysis.** *Rheumatology* 2007, **46**(3):442-445.
 51. Steen VD, Medsger TA: **Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002.** *Annals of the rheumatic diseases* 2007, **66**(7):940-944.
 52. Reveille JD, Fischbach M, McNearney T, Friedman AW, Aguilar MB, Lisse J, Fritzler MJ, Ahn C, Arnett FC, Group GS: **Systemic sclerosis in 3 US ethnic groups: a comparison of clinical, sociodemographic, serologic, and immunogenetic determinants.** *Seminars in arthritis and rheumatism* 2001, **30**(5):332-346.
 53. Martin JE, Bossini-Castillo L, Martin J: **Unraveling the genetic component of systemic sclerosis.** *Human genetics* 2012, **131**(7):1023-1037.
 54. Arnett FC, Gourh P, Shete S, Ahn CW, Honey RE, Agarwal SK, Tan FK, McNearney T, Fischbach M, Fritzler MJ *et al*: **Major histocompatibility**

- complex (MHC) class II alleles, haplotypes and epitopes which confer susceptibility or protection in systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls.** *Annals of the rheumatic diseases* 2010, **69**(5):822-827.
55. Kuwana M, Inoko H, Kameda H, Nojima T, Sato S, Nakamura K, Ogasawara T, Hirakata M, Ohosone Y, Kaburaki J *et al*: **Association of human leukocyte antigen class II genes with autoantibody profiles, but not with disease susceptibility in Japanese patients with systemic sclerosis.** *Internal medicine* 1999, **38**(4):336-344.
56. Rueda B, Broen J, Simeon C, Hesselstrand R, Diaz B, Suarez H, Ortego-Centeno N, Riemekasten G, Fonollosa V, Vonk MC *et al*: **The STAT4 gene influences the genetic predisposition to systemic sclerosis phenotype.** *Human molecular genetics* 2009, **18**(11):2071-2077.
57. Gilchrist FC, Bunn C, Foley PJ, Lympny PA, Black CM, Welsh KI, du Bois RM: **Class II HLA associations with autoantibodies in scleroderma: a highly significant role for HLA-DP.** *Genes and immunity* 2001, **2**(2):76-81.
58. Radstake TR, Gorlova O, Rueda B, Martin JE, Alizadeh BZ, Palomino-Morales R, Coenen MJ, Vonk MC, Voskuyl AE, Schuerwegh AJ *et al*: **Genome-wide association study of systemic sclerosis identifies CD247 as a new susceptibility locus.** *Nature genetics* 2010, **42**(5):426-429.
59. Dieude P, Guedj M, Wipff J, Avouac J, Fajardy I, Diot E, Granel B, Sibilia J, Cabane J, Mouthon L *et al*: **Association between the IRF5 rs2004640 functional polymorphism and systemic sclerosis: a new perspective for pulmonary fibrosis.** *Arthritis and rheumatism* 2009, **60**(1):225-233.
60. Graham RR, Kyogoku C, Sigurdsson S, Vlasova IA, Davies LR, Baechler EC, Plenge RM, Koeuth T, Ortmann WA, Hom G *et al*: **Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(16):6758-6763.
61. Bossini-Castillo L, Simeon CP, Beretta L, Vonk MC, Callejas-Rubio JL, Espinosa G, Carreira P, Camps MT, Rodriguez-Rodriguez L, Rodriguez-Carballeira M *et al*: **Confirmation of association of the macrophage migration inhibitory factor gene with systemic sclerosis in a large European population.** *Rheumatology* 2011, **50**(11):1976-1981.
62. Carmona FD, Simeon CP, Beretta L, Carreira P, Vonk MC, Rios-Fernandez R, Espinosa G, Navarrete N, Vicente-Rabaneda E, Rodriguez-Rodriguez L *et al*: **Association of a non-synonymous functional variant of the ITGAM gene with systemic sclerosis.** *Annals of the rheumatic diseases* 2011, **70**(11):2050-2052.
63. Deng JC, Zeng X, Newstead M, Moore TA, Tsai WC, Thannickal VJ, Standiford TJ: **STAT4 is a critical mediator of early innate immune responses against pulmonary Klebsiella infection.** *Journal of immunology* 2004, **173**(6):4075-4083.
64. Fukao T, Frucht DM, Yap G, Gadina M, O'Shea JJ, Koyasu S: **Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its**

- critical role in innate and adaptive immune responses. *Journal of immunology* 2001, **166**(7):4446-4455.
65. Dieude P, Guedj M, Wipff J, Ruiz B, Hachulla E, Diot E, Granel B, Sibilia J, Tiev K, Mouthon L *et al*: **STAT4 is a genetic risk factor for systemic sclerosis having additive effects with IRF5 on disease susceptibility and related pulmonary fibrosis**. *Arthritis and rheumatism* 2009, **60**(8):2472-2479.
 66. Dieude P, Wipff J, Guedj M, Ruiz B, Melchers I, Hachulla E, Riemekasten G, Diot E, Hunzelmann N, Sibilia J *et al*: **BANK1 is a genetic risk factor for diffuse cutaneous systemic sclerosis and has additive effects with IRF5 and STAT4**. *Arthritis and rheumatism* 2009, **60**(11):3447-3454.
 67. Rueda B, Gourh P, Broen J, Agarwal SK, Simeon C, Ortego-Centeno N, Vonk MC, Coenen M, Riemekasten G, Hunzelmann N *et al*: **BANK1 functional variants are associated with susceptibility to diffuse systemic sclerosis in Caucasians**. *Annals of the rheumatic diseases* 2010, **69**(4):700-705.
 68. Allanore Y, Saad M, Dieude P, Avouac J, Distler JH, Amouyel P, Matucci-Cerinic M, Riemekasten G, Airo P, Melchers I *et al*: **Genome-wide scan identifies TNIP1, PSORS1C1, and RHOB as novel risk loci for systemic sclerosis**. *PLoS genetics* 2011, **7**(7):e1002091.
 69. Fleischmajer R, Perlish JS, Reeves JR: **Cellular infiltrates in scleroderma skin**. *Arthritis and rheumatism* 1977, **20**(4):975-984.
 70. Roumm AD, Whiteside TL, Medsger TA, Jr., Rodnan GP: **Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations**. *Arthritis and rheumatism* 1984, **27**(6):645-653.
 71. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: **Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins**. *Journal of immunology* 1986, **136**(7):2348-2357.
 72. Mavalia C, Scaletti C, Romagnani P, Carossino AM, Pignone A, Emmi L, Pupilli C, Pizzolo G, Maggi E, Romagnani S: **Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis**. *The American journal of pathology* 1997, **151**(6):1751-1758.
 73. Sakkas LI, Tourtellotte C, Berney S, Myers AR, Platsoucas CD: **Increased levels of alternatively spliced interleukin 4 (IL-4delta2) transcripts in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis**. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 1999, **6**(5):660-664.
 74. O'Reilly S, Huggle T, van Laar JM: **T cells in systemic sclerosis: a reappraisal**. *Rheumatology* 2012, **51**(9):1540-1549.
 75. Higashi-Kuwata N, Makino T, Inoue Y, Takeya M, Ihn H: **Alternatively activated macrophages (M2 macrophages) in the skin of patient with localized scleroderma**. *Experimental dermatology* 2009, **18**(8):727-729.
 76. McGaha T, Saito S, Phelps RG, Gordon R, Noben-Trauth N, Paul WE, Bona C: **Lack of skin fibrosis in tight skin (TSK) mice with targeted mutation in the interleukin-4R alpha and transforming growth**

- factor-beta genes.** *The Journal of investigative dermatology* 2001, **116**(1):136-143.
77. Parel Y, Aurrand-Lions M, Scheja A, Dayer JM, Roosnek E, Chizzolini C: **Presence of CD4+CD8+ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis.** *Arthritis and rheumatism* 2007, **56**(10):3459-3467.
78. Klein S, Kretz CC, Ruland V, Stumpf C, Haust M, Hartschuh W, Hartmann M, Enk A, Suri-Payer E, Oberle N *et al*: **Reduction of regulatory T cells in skin lesions but not in peripheral blood of patients with systemic scleroderma.** *Annals of the rheumatic diseases* 2011, **70**(8):1475-1481.
79. Slobodin G, Ahmad MS, Rosner I, Peri R, Rozenbaum M, Kessel A, Toubi E, Odeh M: **Regulatory T cells (CD4+)CD25(bright)FoxP3(+) expansion in systemic sclerosis correlates with disease activity and severity.** *Cellular immunology* 2010, **261**(2):77-80.
80. Radstake TR, van Bon L, Broen J, Wenink M, Santegoets K, Deng Y, Hussaini A, Simms R, Cruikshank WW, Lafyatis R: **Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGFbeta expression.** *PloS one* 2009, **4**(6):e5981.
81. Hasegawa M: **B lymphocytes: shedding new light on the pathogenesis of systemic sclerosis.** *The Journal of dermatology* 2010, **37**(1):3-10.
82. Lipsky PE: **Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity.** *Nature immunology* 2001, **2**(9):764-766.
83. Whitfield ML, Finlay DR, Murray JI, Troyanskaya OG, Chi JT, Pergamenschikov A, McCalmont TH, Brown PO, Botstein D, Connolly MK: **Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(21):12319-12324.
84. Lafyatis R, O'Hara C, Feghali-Bostwick CA, Matteson E: **B cell infiltration in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease.** *Arthritis and rheumatism* 2007, **56**(9):3167-3168.
85. Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Takehara K: **Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity.** *Journal of immunology* 2000, **165**(11):6635-6643.
86. Tsuchiya N, Kuroki K, Fujimoto M, Murakami Y, Tedder TF, Tokunaga K, Takehara K, Sato S: **Association of a functional CD19 polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis.** *Arthritis and rheumatism* 2004, **50**(12):4002-4007.
87. Fujimoto M, Sato S: **B cell signaling and autoimmune diseases: CD19/CD22 loop as a B cell signaling device to regulate the balance of autoimmunity.** *Journal of dermatological science* 2007, **46**(1):1-9.
88. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K: **Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells.** *Arthritis and rheumatism* 2004, **50**(6):1918-1927.
89. Hitomi Y, Tsuchiya N, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Tokunaga

- K, Sato S: **Association of CD22 gene polymorphism with susceptibility to limited cutaneous systemic sclerosis.** *Tissue antigens* 2007, **69**(3):242-249.
90. Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, Koder M, Takehara K, Sato S: **Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes.** *Arthritis and rheumatism* 2006, **54**(1):192-201.
91. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, Komura K, Hamaguchi Y, Kaburagi Y, Nagaoka T, Takehara K, Tedder TF, Sato S: **CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse.** *The Journal of clinical investigation* 2002, **109**(11):1453-1462.
92. Matsushita T, Fujimoto M, Hasegawa M, Matsushita Y, Komura K, Ogawa F, Watanabe R, Takehara K, Sato S: **BAFF antagonist attenuates the development of skin fibrosis in tight-skin mice.** *The Journal of investigative dermatology* 2007, **127**(12):2772-2780.
93. Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM: **Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, **89**(13):6065-6069.
94. Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA: **Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells.** *The Journal of experimental medicine* 1997, **185**(3):461-469.
95. York MR, Nagai T, Mangini AJ, Lemaire R, van Seventer JM, Lafyatis R: **A macrophage marker, Siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and toll-like receptor agonists.** *Arthritis and rheumatism* 2007, **56**(3):1010-1020.
96. Duan H, Fleming J, Pritchard DK, Amon LM, Xue J, Arnett HA, Chen G, Breen P, Buckner JH, Molitor JA *et al*: **Combined analysis of monocyte and lymphocyte messenger RNA expression with serum protein profiles in patients with scleroderma.** *Arthritis and rheumatism* 2008, **58**(5):1465-1474.
97. Farina G, Lafyatis D, Lemaire R, Lafyatis R: **A four-gene biomarker predicts skin disease in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis.** *Arthritis and rheumatism* 2010, **62**(2):580-588.
98. Takeda K, Akira S: **Toll-like receptors in innate immunity.** *International immunology* 2005, **17**(1):1-14.
99. Toshchakov V, Jones BW, Perera PY, Thomas K, Cody MJ, Zhang S, Williams BR, Major J, Hamilton TA, Fenton MJ *et al*: **TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages.** *Nature immunology* 2002, **3**(4):392-398.
100. Hoshino K, Kaisho T, Iwabe T, Takeuchi O, Akira S: **Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation.** *International immunology* 2002, **14**(10):1225-1231.
101. Doyle S, Vaidya S, O'Connell R, Dadgostar H, Dempsey P, Wu T, Rao G, Sun R, Haberland M, Modlin R *et al*: **IRF3 mediates a TLR3/TLR4-**

- specific antiviral gene program. *Immunity* 2002, **17**(3):251-263.**
102. Farina GA, York MR, Di Marzio M, Collins CA, Meller S, Homey B, Rifkin IR, Marshak-Rothstein A, Radstake TR, Lafyatis R: **Poly(I:C) drives type I IFN- and TGFbeta-mediated inflammation and dermal fibrosis simulating altered gene expression in systemic sclerosis.** *The Journal of investigative dermatology* 2010, **130**(11):2583-2593.
 103. Agarwal SK, Wu M, Livingston CK, Parks DH, Mayes MD, Arnett FC, Tan FK: **Toll-like receptor 3 upregulation by type I interferon in healthy and scleroderma dermal fibroblasts.** *Arthritis research & therapy* 2011, **13**(1):R3.
 104. van Bon L, Cossu M, Radstake TR: **An update on an immune system that goes awry in systemic sclerosis.** *Current opinion in rheumatology* 2011, **23**(6):505-510.
 105. Roelofs MF, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, van Lieshout AW, Sprong T, van den Hoogen FH, van den Berg WB, Radstake TR: **The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells.** *Arthritis and rheumatism* 2005, **52**(8):2313-2322.
 106. Yu HB, Finlay BB: **The caspase-1 inflammasome: a pilot of innate immune responses.** *Cell host & microbe* 2008, **4**(3):198-208.
 107. Martinon F, Burns K, Tschopp J: **The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta.** *Molecular cell* 2002, **10**(2):417-426.
 108. Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, Fain PR, Spritz RA: **NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease.** *The New England journal of medicine* 2007, **356**(12):1216-1225.
 109. Dieude P, Guedj M, Wipff J, Ruiz B, Riemekasten G, Airo P, Melchers I, Hachulla E, Cerinic MM, Diot E *et al*: **NLRP1 influences the systemic sclerosis phenotype: a new clue for the contribution of innate immunity in systemic sclerosis-related fibrosing alveolitis pathogenesis.** *Annals of the rheumatic diseases* 2011, **70**(4):668-674.
 110. Dinarello CA: **Interleukin-1beta.** *Critical care medicine* 2005, **33**(12 Suppl):S460-462.
 111. Gasse P, Mary C, Guenon I, Noulin N, Charron S, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Akira S, Quesniaux VF, Lagente V *et al*: **IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice.** *The Journal of clinical investigation* 2007, **117**(12):3786-3799.
 112. Kawaguchi Y, Harigai M, Hara M, Suzuki K, Kawakami M, Ishizuka T, Hidaka T, Kitani A, Kawagoe M, Nakamura H: **Increased interleukin 1 receptor, type I, at messenger RNA and protein level in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis.** *Biochemical and biophysical research communications* 1992, **184**(3):1504-1510.
 113. Kawaguchi Y, Harigai M, Suzuki K, Hara M, Kobayashi K, Ishizuka T, Matsuki Y, Tanaka N, Nakamura H: **Interleukin 1 receptor on fibroblasts from systemic sclerosis patients induces excessive**

- functional responses to interleukin 1 beta. *Biochemical and biophysical research communications* 1993, **190**(1):154-161.
114. Hussein MR, Hassan HI, Hofny ER, Elkholy M, Fatehy NA, Abd Elmoniem AE, Ezz El-Din AM, Afifi OA, Rashed HG: **Alterations of mononuclear inflammatory cells, CD4/CD8+ T cells, interleukin 1beta, and tumour necrosis factor alpha in the bronchoalveolar lavage fluid, peripheral blood, and skin of patients with systemic sclerosis.** *Journal of clinical pathology* 2005, **58**(2):178-184.
 115. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F: **Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells.** *Nature immunology* 2007, **8**(9):942-949.
 116. Radstake TR, van Bon L, Broen J, Hussiani A, Hesselstrand R, Wuttge DM, Deng Y, Simms R, Lubberts E, Lafyatis R: **The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes.** *PloS one* 2009, **4**(6):e5903.
 117. **Reports of Societies.** *British medical journal* 1914, **1**(2772):371.
 118. Erasmus LD: **Scleroderma in goldminers on the Witwatersrand with particular reference to pulmonary manifestations.** *South African journal of laboratory and clinical medicine Suid-Afrikaanse tydskrif vir laboratorium- en kliniekwerk* 1957, **3**(3):209-231.
 119. Rodnan GP, Benedek TG, Medsger TA, Jr., Cammarata RJ: **The association of progressive systemic sclerosis (scleroderma) with coal miners' pneumoconiosis and other forms of silicosis.** *Annals of internal medicine* 1967, **66**(2):323-334.
 120. Haustein UF, Ziegler V, Herrmann K, Mehlhorn J, Schmidt C: **Silica-induced scleroderma.** *Journal of the American Academy of Dermatology* 1990, **22**(3):444-448.
 121. Lockey JE, Kelly CR, Cannon GW, Colby TV, Aldrich V, Livingston GK: **Progressive systemic sclerosis associated with exposure to trichloroethylene.** *Journal of occupational medicine : official publication of the Industrial Medical Association* 1987, **29**(6):493-496.
 122. Garabrant DH, Lacey JV, Jr., Laing TJ, Gillespie BW, Mayes MD, Cooper BC, Schottenfeld D: **Scleroderma and solvent exposure among women.** *American journal of epidemiology* 2003, **157**(6):493-500.
 123. Martinez-Tello FJ, Navas-Palacios JJ, Ricoy JR, Gil-Martin R, Conde-Zurita JM, Colina-Ruiz Delgado F, Tellez I, Cabello A, Madero-Garcia S: **Pathology of a new toxic syndrome caused by ingestion of adulterated oil in Spain.** *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histology* 1982, **397**(3):261-285.
 124. Martin RW, Duffy J, Engel AG, Lie JT, Bowles CA, Moyer TP, Gleich GJ: **The clinical spectrum of the eosinophilia-myalgia syndrome associated with L-tryptophan ingestion. Clinical features in 20 patients and aspects of pathophysiology.** *Annals of internal medicine* 1990, **113**(2):124-134.
 125. xPhilen RM, Posada M: **Toxic oil syndrome and eosinophilia-myalgia syndrome: May 8-10, 1991, World Health Organization meeting**

- report. *Seminars in arthritis and rheumatism* 1993, 23(2):104-124.**
126. Gutierrez C, Gaspar L, Muro R, Kreisler M, Ferriz P: **Autoimmunity in patients with Spanish toxic oil syndrome.** *Lancet* 1983, 1(8325):644.
 127. McCormic ZD, Khuder SS, Aryal BK, Ames AL, Khuder SA: **Occupational silica exposure as a risk factor for scleroderma: a meta-analysis.** *International archives of occupational and environmental health* 2010, 83(7):763-769.
 128. Nietert PJ, Sutherland SE, Silver RM, Pandey JP, Knapp RG, Hoel DG, Dosemeci M: **Is occupational organic solvent exposure a risk factor for scleroderma?** *Arthritis and rheumatism* 1998, 41(6):1111-1118.
 129. Chen M, Dittmann A, Kuhn A, Ruzicka T, von Mikecz A: **Recruitment of topoisomerase I (Sci-70) to nucleoplasmic proteasomes in response to xenobiotics suggests a role for altered antigen processing in scleroderma.** *Arthritis and rheumatism* 2005, 52(3):877-884.
 130. Neidhart M, Kuchen S, Distler O, Bruhlmann P, Michel BA, Gay RE, Gay S: **Increased serum levels of antibodies against human cytomegalovirus and prevalence of autoantibodies in systemic sclerosis.** *Arthritis and rheumatism* 1999, 42(2):389-392.
 131. Vaughan JH, Shaw PX, Nguyen MD, Medsger TA, Jr., Wright TM, Metcalf JS, Leroy EC: **Evidence of activation of 2 herpesviruses, Epstein-Barr virus and cytomegalovirus, in systemic sclerosis and normal skins.** *The Journal of rheumatology* 2000, 27(3):821-823.
 132. Zakrzewska K, Corcioli F, Carlsen KM, Giuggioli D, Fanci R, Rinieri A, Ferri C, Azzi A: **Human parvovirus B19 (B19V) infection in systemic sclerosis patients.** *Intervirolgy* 2009, 52(5):279-282.
 133. Jimenez SA, Diaz A, Khalili K: **Retroviruses and the pathogenesis of systemic sclerosis.** *International reviews of immunology* 1995, 12(2-4):159-175.
 134. Radic M, Martinovic Kaliterna D, Bonacin D, Morovic Vergles J, Radic J: **Correlation between Helicobacter pylori infection and systemic sclerosis activity.** *Rheumatology* 2010, 49(9):1784-1785.
 135. Fujinami RS, Oldstone MB: **Molecular mimicry as a mechanism for virus-induced autoimmunity.** *Immunologic research* 1989, 8(1):3-15.
 136. Hamamdzic D, Harley RA, Hazen-Martin D, LeRoy EC: **MCMV induces neointima in IFN-gammaR-/- mice: intimal cell apoptosis and persistent proliferation of myofibroblasts.** *BMC musculoskeletal disorders* 2001, 2:3.
 137. Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J, Sarvetnick N: **Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry.** *Nature medicine* 1998, 4(7):781-785.
 138. Schiffenbauer J, Soos J, Johnson H: **The possible role of bacterial superantigens in the pathogenesis of autoimmune disorders.** *Immunology today* 1998, 19(3):117-120.
 139. Vanderlugt CJ, Miller SD: **Epitope spreading.** *Current opinion in immunology* 1996, 8(6):831-836.
 140. Veeraraghavan S, Renzoni EA, Jeal H, Jones M, Hammer J, Wells AU, Black CM, Welsh KI, du Bois RM: **Mapping of the immunodominant T**

- cell epitopes of the protein topoisomerase I. *Annals of the rheumatic diseases* 2004, **63**(8):982-987.
141. Kowal-Bielecka O, Landewe R, Avouac J, Chwiesko S, Miniati I, Czirjak L, Clements P, Denton C, Farge D, Fligelstone K *et al*: **EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR)**. *Annals of the rheumatic diseases* 2009, **68**(5):620-628.
 142. Whitman HH, 3rd, Case DB, Laragh JH, Christian CL, Botstein G, Maricq H, Leroy EC: **Variable response to oral angiotensin-converting-enzyme blockade in hypertensive scleroderma patients**. *Arthritis and rheumatism* 1982, **25**(3):241-248.
 143. Thompson AE, Shea B, Welch V, Fenlon D, Pope JE: **Calcium-channel blockers for Raynaud's phenomenon in systemic sclerosis**. *Arthritis and rheumatism* 2001, **44**(8):1841-1847.
 144. Pope J, Fenlon D, Thompson A, Shea B, Furst D, Wells G, Silman A: **Iloprost and cisaprost for Raynaud's phenomenon in progressive systemic sclerosis**. *Cochrane database of systematic reviews* 2000(2):CD000953.
 145. Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, Badesch DB, Roux S, Rainisio M, Bodin F *et al*: **Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study**. *Lancet* 2001, **358**(9288):1119-1123.
 146. Dziadzio M, Denton CP, Smith R, Howell K, Blann A, Bowers E, Black CM: **Losartan therapy for Raynaud's phenomenon and scleroderma: clinical and biochemical findings in a fifteen-week, randomized, parallel-group, controlled trial**. *Arthritis and rheumatism* 1999, **42**(12):2646-2655.
 147. Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, Fleming T, Parpia T, Burgess G, Branzi A *et al*: **Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension**. *The New England journal of medicine* 2005, **353**(20):2148-2157.
 148. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, Goldin J, Roth MD, Furst DE, Arriola E, Silver R, Strange C, Bolster M *et al*: **Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease**. *The New England journal of medicine* 2006, **354**(25):2655-2666.
 149. Hoyles RK, Ellis RW, Wellsbury J, Lees B, Newlands P, Goh NS, Roberts C, Desai S, Herrick AL, McHugh NJ *et al*: **A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of corticosteroids and intravenous cyclophosphamide followed by oral azathioprine for the treatment of pulmonary fibrosis in scleroderma**. *Arthritis and rheumatism* 2006, **54**(12):3962-3970.
 150. Tzouveleki A, Galanopoulos N, Bouros E, Kolios G, Zacharis G, Ntoliou P, Koulelidis A, Oikonomou A, Bouros D: **Effect and safety of mycophenolate mofetil or sodium in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease: a meta-analysis**. *Pulmonary medicine* 2012, **2012**:143637.
 151. Henes JC, Horger M, Amberger C, Schmalzing M, Fierlbeck G, Kanz L,

- Koetter I: **Enteric-coated mycophenolate sodium for progressive systemic sclerosis-a prospective open-label study with CT histography for monitoring of pulmonary fibrosis.** *Clinical rheumatology* 2013, **32**(5):673-678.
152. Pope JE, Bellamy N, Seibold JR, Baron M, Ellman M, Carette S, Smith CD, Chalmers IM, Hong P, O'Hanlon D *et al*: **A randomized, controlled trial of methotrexate versus placebo in early diffuse scleroderma.** *Arthritis and rheumatism* 2001, **44**(6):1351-1358.
153. Morton SJ, Powell RJ: **Cyclosporin and tacrolimus: their use in a routine clinical setting for scleroderma.** *Rheumatology* 2000, **39**(8):865-869.
154. Levy Y, Amital H, Langevitz P, Nacci F, Righi A, Conforti L, Generini S, Matucci Cerinic M, Shoenfeld Y: **Intravenous immunoglobulin modulates cutaneous involvement and reduces skin fibrosis in systemic sclerosis: an open-label study.** *Arthritis and rheumatism* 2004, **50**(3):1005-1007.
155. Steen VD, Medsger TA, Jr.: **Case-control study of corticosteroids and other drugs that either precipitate or protect from the development of scleroderma renal crisis.** *Arthritis and rheumatism* 1998, **41**(9):1613-1619.
156. Tyndall A, Black C, Finke J, Winkler J, Mertlesmann R, Peter HH, Gratwohl A: **Treatment of systemic sclerosis with autologous haemopoietic stem cell transplantation.** *Lancet* 1997, **349**(9047):254.
157. Cooley HM, Snowden JA, Grigg AP, Wicks IP: **Outcome of rheumatoid arthritis and psoriasis following autologous stem cell transplantation for hematologic malignancy.** *Arthritis and rheumatism* 1997, **40**(9):1712-1715.
158. Kishimoto Y, Yamamoto Y, Ito T, Matsumoto N, Ichiyoshi H, Katsurada T, Date M, Ohga S, Kitajima H, Ikehara S *et al*: **Transfer of autoimmune thyroiditis and resolution of palmoplantar pustular psoriasis following allogeneic bone marrow transplantation.** *Bone marrow transplantation* 1997, **19**(10):1041-1043.
159. Meloni G, Capria S, Vignetti M, Mandelli F, Modena V: **Blast crisis of chronic myelogenous leukemia in long-lasting systemic lupus erythematosus: regression of both diseases after autologous bone marrow transplantation.** *Blood* 1997, **89**(12):4659.
160. Joske DJ, Ma DT, Langlands DR, Owen ET: **Autologous bone-marrow transplantation for rheumatoid arthritis.** *Lancet* 1997, **350**(9074):337-338.
161. Marmont AM, van Lint MT, Gualandi F, Bacigalupo A: **Autologous marrow stem cell transplantation for severe systemic lupus erythematosus of long duration.** *Lupus* 1997, **6**(6):545-548.
162. Binks M, Passweg JR, Furst D, McSweeney P, Sullivan K, Besenthal C, Finke J, Peter HH, van Laar J, Breedveld FC *et al*: **Phase I/II trial of autologous stem cell transplantation in systemic sclerosis: procedure related mortality and impact on skin disease.** *Annals of the rheumatic diseases* 2001, **60**(6):577-584.
163. Saccardi R, Tyndall A, Coghlan G, Denton C, Edan G, Emdin M, Farge

- D, Fassas A, Finke J, Furst D *et al*: **Consensus statement concerning cardiotoxicity occurring during haematopoietic stem cell transplantation in the treatment of autoimmune diseases, with special reference to systemic sclerosis and multiple sclerosis.** *Bone marrow transplantation* 2004, **34**(10):877-881.
164. Farge D, Passweg J, van Laar JM, Marjanovic Z, Besenthal C, Finke J, Peter HH, Breedveld FC, Fibbe WE, Black C *et al*: **Autologous stem cell transplantation in the treatment of systemic sclerosis: report from the EBMT/EULAR Registry.** *Annals of the rheumatic diseases* 2004, **63**(8):974-981.
165. Henes JC, Schmalzing M, Vogel W, Riemekasten G, Fend F, Kanz L, Koetter I: **Optimization of autologous stem cell transplantation for systemic sclerosis -- a single-center longterm experience in 26 patients with severe organ manifestations.** *The Journal of rheumatology* 2012, **39**(2):269-275.
166. Vonk MC, Marjanovic Z, van den Hoogen FH, Zohar S, Schattenberg AV, Fibbe WE, Larghero J, Gluckman E, Preijers FW, van Dijk AP *et al*: **Long-term follow-up results after autologous haematopoietic stem cell transplantation for severe systemic sclerosis.** *Annals of the rheumatic diseases* 2008, **67**(1):98-104.
167. Burt RK, Shah SJ, Gheorghide M, Ruderman E, Schroeder J: **Hematopoietic stem cell transplantation for systemic sclerosis: if you are confused, remember: "it is a matter of the heart".** *The Journal of rheumatology* 2012, **39**(2):206-209.
168. Huggle T, van Laar JM: **Stem cell transplantation for rheumatic autoimmune diseases.** *Arthritis research & therapy* 2008, **10**(5):217.
169. Tsukamoto H, Nagafuji K, Horiuchi T, Mitoma H, Niino H, Arinobu Y, Inoue Y, To K, Miyamoto T, Iwasaki H *et al*: **Analysis of immune reconstitution after autologous CD34+ stem/progenitor cell transplantation for systemic sclerosis: predominant reconstitution of Th1 CD4+ T cells.** *Rheumatology* 2011, **50**(5):944-952.
170. Burt RK, Patel D, Thomas J, Yeager A, Traynor A, Heipe F, Arnold R, Marmont A, Collier D, Glatstein E *et al*: **The rationale behind autologous autoimmune hematopoietic stem cell transplant conditioning regimens: concerns over the use of total-body irradiation in systemic sclerosis.** *Bone marrow transplantation* 2004, **34**(9):745-751.
171. Burt RK, Marmont A, Oyama Y, Slavin S, Arnold R, Heipe F, Fassas A, Snowden J, Schuening F, Myint H *et al*: **Randomized controlled trials of autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: the evolution from myeloablative to lymphoablative transplant regimens.** *Arthritis and rheumatism* 2006, **54**(12):3750-3760.
172. Oyama Y, Barr WG, Statkute L, Corbridge T, Gonda EA, Jovanovic B, Testori A, Burt RK: **Autologous non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation in patients with systemic sclerosis.** *Bone marrow transplantation* 2007, **40**(6):549-555.
173. van Laar JM, Farge D, Tyndall A: **Autologous Stem cell**

- Transplantation International Scleroderma (ASTIS) trial: hope on the horizon for patients with severe systemic sclerosis.** *Annals of the rheumatic diseases* 2005, **64**(10):1515.
174. Burt RK, Shah SJ, Dill K, Grant T, Gheorghide M, Schroeder J, Craig R, Hirano I, Marshall K, Ruderman E *et al*: **Autologous non-myeloablative haemopoietic stem-cell transplantation compared with pulse cyclophosphamide once per month for systemic sclerosis (ASSIST): an open-label, randomised phase 2 trial.** *Lancet* 2011, **378**(9790):498-506.
175. ClinicalTrials.gov: **Scleroderma: Cyclophosphamide or Transplantation (SCOT).**
<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00114530?term=SCOT&rank=4>.
 Abgerufen am 01.12.2014.
176. Steen VD: **Autoantibodies in systemic sclerosis.** *Seminars in arthritis and rheumatism* 2005, **35**(1):35-42.
177. Mierau R, Moinzadeh P, Riemekasten G, Melchers I, Meurer M, Reichenberger F, Buslau M, Worm M, Blank N, Hein R *et al*: **Frequency of disease-associated and other nuclear autoantibodies in patients of the German Network for Systemic Scleroderma: correlation with characteristic clinical features.** *Arthritis research & therapy* 2011, **13**(5):R172.
178. Koenig M, Joyal F, Fritzler MJ, Roussin A, Abrahamowicz M, Boire G, Goulet JR, Rich E, Grodzicky T, Raymond Y *et al*: **Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the progression of Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: a twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis.** *Arthritis and rheumatism* 2008, **58**(12):3902-3912.
179. Oddis CV, Okano Y, Rudert WA, Trucco M, Duquesnoy RJ, Medsger TA, Jr.: **Serum autoantibody to the nucleolar antigen PM-Scl. Clinical and immunogenetic associations.** *Arthritis and rheumatism* 1992, **35**(10):1211-1217.
180. Hirakata M, Okano Y, Pati U, Suwa A, Medsger TA, Jr., Hardin JA, Craft J: **Identification of autoantibodies to RNA polymerase II. Occurrence in systemic sclerosis and association with autoantibodies to RNA polymerases I and III.** *The Journal of clinical investigation* 1993, **91**(6):2665-2672.
181. Tormey VJ, Bunn CC, Denton CP, Black CM: **Anti-fibrillarin antibodies in systemic sclerosis.** *Rheumatology* 2001, **40**(10):1157-1162.
182. Bernstein RM, Steigerwald JC, Tan EM: **Association of antinuclear and antinucleolar antibodies in progressive systemic sclerosis.** *Clinical and experimental immunology* 1982, **48**(1):43-51.
183. Okano Y, Medsger TA, Jr.: **Autoantibody to Th ribonucleoprotein (nucleolar 7-2 RNA protein particle) in patients with systemic sclerosis.** *Arthritis and rheumatism* 1990, **33**(12):1822-1828.
184. Rozman B, Cucnik S, Sodin-Semrl S, Czirjak L, Varju C, Distler O, Huscher D, Aringer M, Steiner G, Matucci-Cerinic M *et al*: **Prevalence and clinical associations of anti-Ku antibodies in patients with**

- systemic sclerosis: a European EUSTAR-initiated multi-centre case-control study.** *Annals of the rheumatic diseases* 2008, **67**(9):1282-1286.
185. Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, Inada S, Yoshida S, Homma M: **Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap.** *The Journal of clinical investigation* 1981, **68**(3):611-620.
186. Agris PF, KiKuchi Y, Gross HJ, Takano M, Sharp GC: **Characterization of the autoimmune antigenic determinant for ribonucleoprotein (RNP) antibody.** *Immunological communications* 1984, **13**(2):137-149.
187. 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).** *The American journal of medicine* 1972, **52**(2):148-159.
188. Maul GG, French BT, van Venrooij WJ, Jimenez SA: **Topoisomerase I identified by scleroderma 70 antisera: enrichment of topoisomerase I at the centromere in mouse mitotic cells before anaphase.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986, **83**(14):5145-5149.
189. Shero JH, Bordwell B, Rothfield NF, Earnshaw WC: **High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Sci-70) in sera from scleroderma patients.** *Science* 1986, **231**(4739):737-740.
190. Wang JC: **Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega.** *Journal of molecular biology* 1971, **55**(3):523-533.
191. Champoux JJ, Dulbecco R: **An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA--a possible swivel for DNA replication (polyoma-ethidium bromide-mouse-embryo cells-dye binding assay).** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1972, **69**(1):143-146.
192. Wang JC: **DNA topoisomerases.** *Annual review of biochemistry* 1985, **54**:665-697.
193. Redinbo MR, Stewart L, Kuhn P, Champoux JJ, Hol WG: **Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA.** *Science* 1998, **279**(5356):1504-1513.
194. Samuels DS, Tojo T, Homma M, Shimizu N: **Inhibition of topoisomerase I by antibodies in sera from scleroderma patients.** *FEBS letters* 1986, **209**(2):231-234.
195. Hildebrandt S, Weiner E, Senecal JL, Noell S, Daniels L, Earnshaw WC, Rothfield NF: **The IgG, IgM, and IgA isotypes of anti-topoisomerase I and anticentromere autoantibodies.** *Arthritis and rheumatism* 1990, **33**(5):724-727.
196. Martinez-Cordero E, Trejo AP, Leon DE: **IgM, IgG, and IgA anti-DNA topoisomerase I antibodies in systemic sclerosis.** *Journal of clinical laboratory analysis* 2009, **23**(6):408-416.
197. Asero R, Origgi L, D'Agostino P, Bertetti E, Riboldi P: **Comparison between counterimmunoelectrophoresis and double radial immunodiffusion in the detection of antibodies to topoisomerase I in sera from scleroderma patients.** *Bollettino dell'Istituto sieroterapico*

- milanese* 1988, **67**(2):159-161.
198. Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Tozzoli R, Manoni F, Pirrone S, Piazza A, Rizzotti P, Pradella M: **Sensitivity and specificity of immunological methods for the detection of anti-topoisomerase I (Sci70) autoantibodies: results of a multicenter study. The Italian Society of Laboratory Medicine Study Group on the Diagnosis of Autoimmune diseases.** *Clinical chemistry* 2000, **46**(10):1681-1685.
 199. Gussin HA, Ignat GP, Varga J, Teodorescu M: **Anti-topoisomerase I (anti-Sci-70) antibodies in patients with systemic lupus erythematosus.** *Arthritis and rheumatism* 2001, **44**(2):376-383.
 200. Omagari K, Ohba K, Kadokawa Y, Hayashida K, Isomoto H, Takeshima F, Mizuta Y, Murata I, Kohno S: **Anti-extractable nuclear antigens (ENA) antibodies in patients with chronic hepatitis C before and after treatment with interferon.** *Autoimmunity* 2003, **36**(5):269-273.
 201. Aeschlimann A, Meyer O, Bourgeois P, Haim T, Belmatoug N, Palazzo E, Kahn MF: **Anti-Sci-70 antibodies detected by immunoblotting in progressive systemic sclerosis: specificity and clinical correlations.** *Annals of the rheumatic diseases* 1989, **48**(12):992-997.
 202. Takehara K, Moroi Y, Ishibashi Y: **Antinuclear antibodies in the relatives of patients with systemic sclerosis.** *The British journal of dermatology* 1985, **112**(1):23-33.
 203. Reveille JD, Solomon DH, American College of Rheumatology Ad Hoc Committee of Immunologic Testing G: **Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Sci-70, and nucleolar antibodies.** *Arthritis and rheumatism* 2003, **49**(3):399-412.
 204. Bunn CC, Denton CP, Shi-Wen X, Knight C, Black CM: **Anti-RNA polymerases and other autoantibody specificities in systemic sclerosis.** *British journal of rheumatology* 1998, **37**(1):15-20.
 205. Jarzabek-Chorzelska M, Blaszczyk M, Jablonska S, Chorzelski T, Kumar V, Beutner EH: **Sci 70 antibody--a specific marker of systemic sclerosis.** *The British journal of dermatology* 1986, **115**(4):393-401.
 206. Weiner ES, Earnshaw WC, Senecal JL, Bordwell B, Johnson P, Rothfield NF: **Clinical associations of anticentromere antibodies and antibodies to topoisomerase I. A study of 355 patients.** *Arthritis and rheumatism* 1988, **31**(3):378-385.
 207. de Rooij DJ, van de Putte LB, Habets WJ, Verbeek AL, van Venrooij WJ: **The use of immunoblotting to detect antibodies to nuclear and cytoplasmic antigens. Clinical and serological associations in rheumatic diseases.** *Scandinavian journal of rheumatology* 1988, **17**(5):353-364.
 208. Hildebrandt S, Weiner ES, Senecal JL, Noell GS, Earnshaw WC, Rothfield NF: **Autoantibodies to topoisomerase I (Sci-70): analysis by gel diffusion, immunoblot, and enzyme-linked immunosorbent assay.** *Clinical immunology and immunopathology* 1990, **57**(3):399-410.
 209. Tsay GJ, Fann RH, Hwang J: **Specificity of anti-Sci-70 antibodies in scleroderma: increased sensitivity of detection using purified DNA topoisomerase I from calf thymus.** *The Journal of rheumatology* 1990, **17**(10):1314-1319.

210. Geisler C, Hoier-Madsen M: **An enzyme-linked immunosorbent assay for autoantibodies against the nuclear protein Scl-70.** *Journal of immunological methods* 1985, **80**(2):211-219.
211. Verheijen R, Van den Hoogen F, Beijer R, Richter A, Penner E, Habets WJ, van Venrooij WJ: **A recombinant topoisomerase I used for autoantibody detection in sera from patients with systemic sclerosis.** *Clinical and experimental immunology* 1990, **80**(1):38-43.
212. D'Arpa P, Machlin PS, Ratrie H, 3rd, Rothfield NF, Cleveland DW, Earnshaw WC: **cDNA cloning of human DNA topoisomerase I: catalytic activity of a 67.7-kDa carboxyl-terminal fragment.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988, **85**(8):2543-2547.
213. Cram DS, Fisicaro N, McNeilage LJ, Coppel RL, Harrison LC: **Antibody specificities of Thai and Australian scleroderma sera with topoisomerase I recombinant fusion proteins.** *Journal of immunology* 1993, **151**(12):6872-6881.
214. Seelig HP, Schroter H, Ehrfeld H, Renz M: **Autoantibodies against topoisomerase I detected with the natural enzyme and overlapping recombinant peptides.** *Journal of immunological methods* 1993, **165**(2):241-252.
215. Piccinini G, Cardellini E, Reimer G, Arnett FC, Durban E: **An antigenic region of topoisomerase I in DNA polymerase chain reaction-generated fragments recognized by autoantibodies of scleroderma patients.** *Molecular immunology* 1991, **28**(4-5):333-339.
216. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Tojo T, Homma M: **Autoantigenic epitopes on DNA topoisomerase I. Clinical and immunogenetic associations in systemic sclerosis.** *Arthritis and rheumatism* 1993, **36**(10):1406-1413.
217. Meesters TM, Hoet M, van den Hoogen FH, Verheijen R, Habets WJ, van Venrooij WJ: **Analysis of an immunodominant epitope of topoisomerase I in patients with systemic sclerosis.** *Molecular biology reports* 1992, **16**(2):117-123.
218. Kuwana M, Kaburaki J, Medsger TA, Jr., Wright TM: **An immunodominant epitope on DNA topoisomerase I is conformational in nature: heterogeneity in its recognition by systemic sclerosis sera.** *Arthritis and rheumatism* 1999, **42**(6):1179-1188.
219. Simon D, Czompoly T, Berki T, Minier T, Peti A, Toth E, Czirjak L, Nemeth P: **Naturally occurring and disease-associated auto-antibodies against topoisomerase I: a fine epitope mapping study in systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus.** *International immunology* 2009, **21**(4):415-422.
220. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA, Jr., Wright TM: **Molecular recognition patterns of serum anti-DNA topoisomerase I antibody in systemic sclerosis.** *Journal of immunology* 2004, **173**(4):2834-2841.
221. Rizou C, Ioannidis JP, Panou-Pomonis E, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, Moutsopoulos HM, Vlachoyiannopoulos PG: **B-Cell epitope mapping of DNA topoisomerase I defines epitopes strongly**

- associated with pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2000, **22**(3):344-351.
222. Kato T, Yamamoto K, Takeuchi H, Okubo M, Hara E, Nakada S, Oda K, Ito K, Nishioka K: **Identification of a universal B cell epitope on DNA topoisomerase I, an autoantigen associated with scleroderma.** *Arthritis and rheumatism* 1993, **36**(11):1580-1587.
223. Jarzabek-Chorzelska M, Blaszczyk M, Kolacinska-Strasz Z, Chorzelski T, Jablonska S, Maul GG: **Antikinetochore and antitopoisomerase I antibodies in systemic scleroderma: comparative study using immunoblotted recombinant antigens, immunofluorescence, and double immunodiffusion.** *Archives of dermatological research* 1990, **282**(2):76-83.
224. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, De Camilli P: **Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase.** *Nature* 1990, **347**(6289):151-156.
225. Augstein P, Schlosser M, Ziegler B, Hahmann J, Mauch L, Ziegler M: **Comparison of the islet cell antibody pattern of monoclonal glutamic acid decarboxylase antibodies recognizing linear and conformational epitopes.** *Acta histochemica* 1996, **98**(2):229-241.
226. McNeilage LJ, Umaphathysivam K, Macmillan E, Guidolin A, Whittingham S, Gordon T: **Definition of a discontinuous immunodominant epitope at the NH2 terminus of the La/SS-B ribonucleoprotein autoantigen.** *The Journal of clinical investigation* 1992, **89**(5):1652-1656.
227. Hirakata M, Craft J, Hardin JA: **Autoantigenic epitopes of the B and D polypeptides of the U1 snRNP. Analysis of domains recognized by the Y12 monoclonal anti-Sm antibody and by patient sera.** *Journal of immunology* 1993, **150**(8 Pt 1):3592-3601.
228. Saitta MR, Arnett FC, Keene JD: **60-kDa Ro protein autoepitopes identified using recombinant polypeptides.** *Journal of immunology* 1994, **152**(8):4192-4202.
229. Catoggio LJ, Bernstein RM, Black CM, Hughes GR, Maddison PJ: **Serological markers in progressive systemic sclerosis: clinical correlations.** *Annals of the rheumatic diseases* 1983, **42**(1):23-27.
230. Kane GC, Varga J, Conant EF, Spirn PW, Jimenez S, Fish JE: **Lung involvement in systemic sclerosis (scleroderma): relation to classification based on extent of skin involvement or autoantibody status.** *Respiratory medicine* 1996, **90**(4):223-230.
231. Hanke K, Dahnrich C, Bruckner CS, Huscher D, Becker M, Jansen A, Meyer W, Egerer K, Hiepe F, Burmester GR *et al*: **Diagnostic value of anti-topoisomerase I antibodies in a large monocentric cohort.** *Arthritis research & therapy* 2009, **11**(1):R28.
232. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA, Jr., Wright TM: **Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis.** *Arthritis and rheumatism* 2003, **48**(5):1363-1373.
233. Hildebrandt S, Jackh G, Weber S, Peter HH: **A long-term longitudinal**

- isotypic study of anti-topoisomerase I autoantibodies.** *Rheumatology international* 1993, **12**(6):231-234.
234. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Kawakami Y, Tojo T: **Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis.** *Arthritis and rheumatism* 2000, **43**(5):1074-1084.
235. Douvas A: **Does Sc1-70 modulate collagen production in systemic sclerosis?** *Lancet* 1988, **2**(8609):475-477.
236. McNeilage LJ, Whittingham S: **Topoisomerases in human disease.** *Lancet* 1988, **1**(8589):822.
237. Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, Avvedimento EV: **Pathogenic autoantibodies in systemic sclerosis.** *Current opinion in immunology* 2007, **19**(6):640-645.
238. Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M, Fraticelli P, Sambo P, Funaro A, Kazlauskas A *et al*: **Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis.** *The New England journal of medicine* 2006, **354**(25):2667-2676.
239. Henault J, Robitaille G, Senecal JL, Raymond Y: **DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients.** *Arthritis and rheumatism* 2006, **54**(3):963-973.
240. Henault J, Tremblay M, Clement I, Raymond Y, Senecal JL: **Direct binding of anti-DNA topoisomerase I autoantibodies to the cell surface of fibroblasts in patients with systemic sclerosis.** *Arthritis and rheumatism* 2004, **50**(10):3265-3274.
241. Chizzolini C, Brembilla NC, Montanari E, Truchetet ME: **Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis.** *Autoimmunity reviews* 2011, **10**(5):276-281.
242. Farge D, Henegar C, Carmagnat M, Daneshpouy M, Marjanovic Z, Rabian C, Ilie D, Douay C, Mounier N, Clave E *et al*: **Analysis of immune reconstitution after autologous bone marrow transplantation in systemic sclerosis.** *Arthritis and rheumatism* 2005, **52**(5):1555-1563.
243. Szodoray P, Varoczy L, Papp G, Barath S, Nakken B, Szegedi G, Zeher M: **Immunological reconstitution after autologous stem cell transplantation in patients with refractory systemic autoimmune diseases.** *Scandinavian journal of rheumatology* 2012, **41**(2):110-115.
244. Storek J, Zhao Z, Lin E, Berger T, McSweeney PA, Nash RA, Akatsuka Y, Metcalf MD, Lu H, Kalina T *et al*: **Recovery from and consequences of severe iatrogenic lymphopenia (induced to treat autoimmune diseases).** *Clinical immunology* 2004, **113**(3):285-298.
245. Braun S, Berg C, Buck S, Gregor M, Klein R: **Catalytic domain of PDC-E2 contains epitopes recognized by antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis.** *World journal of gastroenterology : WJG* 2010, **16**(8):973-981.
246. Klein R, Pointner H, Zilly W, Glassner-Bittner B, Breuer N, Garbe W, Fintelmann V, Kalk JF, Muting D, Fischer R *et al*: **Antimitochondrial antibody profiles in primary biliary cirrhosis distinguish at early stages between a benign and a progressive course: a prospective**

- study on 200 patients followed for 10 years. *Liver* 1997, **17**(3):119-128.
247. Tan EM, Kunkel HG: **Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus.** *Journal of immunology* 1966, **96**(3):464-471.
248. Tan EM, Rodnan GP, Garcia I, Moroi Y, Fritzler MJ, Peebles C: **Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Anti-centromere antibody and its relationship to CREST syndrome.** *Arthritis and rheumatism* 1980, **23**(6):617-625.
249. Berg PA, Doniach D, Roitt IM: **Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. I. Localization of the antigen to mitochondrial membranes.** *The Journal of experimental medicine* 1967, **126**(2):277-290.
250. Klein R, Marx A, Strobel P, Schalke B, Nix W, Willcox N: **Autoimmune associations and autoantibody screening show focused recognition in patient subgroups with generalized myasthenia gravis.** *Human immunology* 2013, **74**(9):1184-1193.
251. Spencer-Green G, Alter D, Welch HG: **Test performance in systemic sclerosis: anti-centromere and anti-Scl-70 antibodies.** *The American journal of medicine* 1997, **103**(3):242-248.
252. Russo K, Hoch S, Dima C, Varga J, Teodorescu M: **Circulating anticentromere CENP-A and CENP-B antibodies in patients with diffuse and limited systemic sclerosis, systemic lupus erythematosus, and rheumatoid arthritis.** *The Journal of rheumatology* 2000, **27**(1):142-148.
253. Vazquez-Abad D, Russell CA, Cusick SM, Earnshaw WC, Rothfield NF: **Longitudinal study of anticentromere and antitopoisomerase-I isotypes.** *Clinical immunology and immunopathology* 1995, **74**(3):257-270.
254. Kuwana M, Kaburaki J, Arnett FC, Howard RF, Medsger TA, Jr., Wright TM: **Influence of ethnic background on clinical and serologic features in patients with systemic sclerosis and anti-DNA topoisomerase I antibody.** *Arthritis and rheumatism* 1999, **42**(3):465-474.
255. Hasegawa M, Imura-Kumada S, Matsushita T, Hamaguchi Y, Fujimoto M, Takehara K: **Anti-topoisomerase I antibody levels as serum markers of skin sclerosis in systemic sclerosis.** *The Journal of dermatology* 2013, **40**(2):89-93.
256. Henes J, Glaeser L, Kotter I, Vogel W, Kanz L, Klein R: **Analysis of anti-topoisomerase I antibodies in patients with systemic sclerosis before and after autologous stem cell transplantation.** *Rheumatology* 2016.
257. Verheijen R, de Jong BA, van Venrooij WJ: **A recombinant topoisomerase I ELISA: screening for IgG, IgM and IgA anti-topo I autoantibodies in human sera.** *Clinical and experimental immunology* 1992, **89**(3):456-460.
258. Maul GG, Jimenez SA, Riggs E, Ziemnicka-Kotula D: **Determination of an epitope of the diffuse systemic sclerosis marker antigen DNA**

- topoisomerase I: sequence similarity with retroviral p30gag protein suggests a possible cause for autoimmunity in systemic sclerosis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989, **86**(21):8492-8496.
259. D'Arpa P, White-Cooper H, Cleveland DW, Rothfield NF, Earnshaw WC: **Use of molecular cloning methods to map the distribution of epitopes on topoisomerase I (Sci-70) recognized by sera of scleroderma patients.** *Arthritis and rheumatism* 1990, **33**(10):1501-1511.
260. Krzyszczyk ME, Li Y, Ross SJ, Ceribelli A, Chan EK, Bubb MR, Sobel ES, Reeves WH, Satoh M: **Gender and ethnicity differences in the prevalence of scleroderma-related autoantibodies.** *Clinical rheumatology* 2011, **30**(10):1333-1339.
261. van Laar JM, Nihtyanova SI, Naraghi K, Denton CP, Tyndall A: **Autologous HSCT for systemic sclerosis.** *Lancet* 2013, **381**(9883):2079-2080.
262. Tyndall A: **Stem cells: HSCT for systemic sclerosis--swallows and summers.** *Nature reviews Rheumatology* 2011, **7**(11):624-626.
263. Burt RK, Oliveira MC, Shah SJ, Moraes DA, Simoes B, Gheorghiu M, Schroeder J, Ruderman E, Farge D, Chai ZJ *et al*: **Cardiac involvement and treatment-related mortality after non-myeloablative haemopoietic stem-cell transplantation with unselected autologous peripheral blood for patients with systemic sclerosis: a retrospective analysis.** *Lancet* 2013, **381**(9872):1116-1124.
264. Snowden JA, Akil M, Kiely DG: **Improving safety in autologous HSCT for systemic sclerosis.** *Lancet* 2013, **381**(9872):1081-1083.
265. Tsukamoto H, Nagafuji K, Horiuchi T, Miyamoto T, Aoki K, Takase K, Henzan H, Himeji D, Koyama T, Miyake K *et al*: **A phase I-II trial of autologous peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of refractory autoimmune disease.** *Annals of the rheumatic diseases* 2006, **65**(4):508-514.

7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde im immunpathologischen Labor der medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Tübingen unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Reinhild Klein durchgeführt.

Sie hatte maßgeblichen Einfluss auf die Konzeption der Arbeit und hat das Manuskript korrigiert.

Die Patientendaten wurden durch Herrn PD Dr. Jörg Henes zur Verfügung gestellt.

Sämtliche Versuche wurden eigenständig von mir durchgeführt. Die Einarbeitung erfolgte durch Frau Sandra Plankenhorn und Frau Elwira Herdt (ELISA), durch Frau Gülay Demirel (Immundiffusion) sowie durch Frau Maja Wilczek (Patientendatenbank).

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

8. Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Henes J*, Glaeser L*, Kötter I, Vogel W, Kanz L, Klein R - Analysis of anti-topoisomerase I antibodies in patients with systemic sclerosis before and after autologous stem cell transplantation - Rheumatology (Oxford) - 2016 Dec 10. pii: kew319. [Epub ahead of print]

*beide Autoren trugen gleichermaßen zu der Publikation bei.