



Die vorliegende Veröffentlichung ist der Begleitband des Innovationsforums „Multiparameteranalytik“ 2008 in Senftenberg, organisiert und ausgerichtet durch die HomogenAss GmbH in Zusammenarbeit mit dem Netzwerk Multiplex, dem Wachstumskern *BioResponse* der Fachhochschule Lausitz, dem Institut für Immunologie der TU Dresden und der Gesellschaft zur Förderung der Immundiagnostik (GFID) e.V. Das Innovationsforum wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung im Rahmen der Innovationsinitiative für die Neuen Länder „Unternehmen Region“ gefördert mit dem Ziel, eine interdisziplinäre Plattform zum Erfahrungsaustausch zu schaffen und neue Akzente in der Entwicklung und Anwendung von multiparametrischen Technologien zu setzen. Neben der pharmazeutischen Wirkstoffforschung und der medizinischen Diagnostik wurde ein besonderer Fokus auf die Ergebnisse und Entwicklungen im BioResponse-Verbund gelegt. Dieser Verbund wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung über das Programm „Innovative regionale Wachstumskerne“ im Zeitraum 2004-2007 gefördert. Die Ergebnisse, die bis zu ersten Produktanwendungen geführt wurden, sind in dieser Schrift dargestellt. Die durch die Partner entwickelte Plattform BioResponse®, bestehend aus dem VideoScan und dem Bead- bzw. Zellarray, kann durch Integration weiterer Testsysteme technologisch erweitert und an eine Vielzahl von Anwendungen und Anwendungsgebieten angepasst werden. So sollen mit dieser Publikation auch Anregungen für künftige Optionen gegeben und für deren Umsetzung notwendige Partnerschaften angeregt bzw. vertieft werden.

ISBN 978-3-89967-461-3
www.pabst-publishers.de

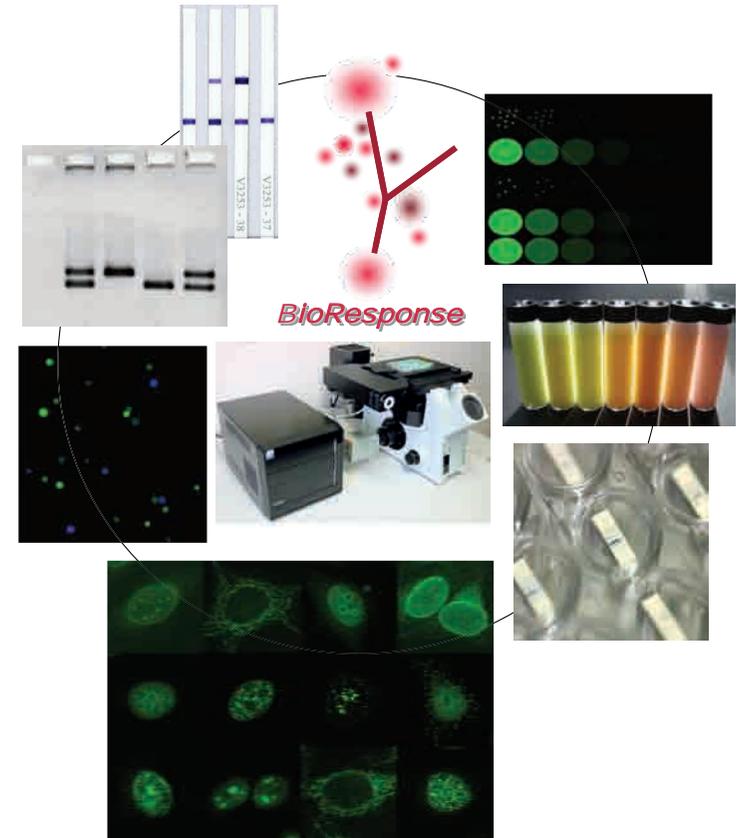


Multiparameteranalytik – Methoden, Applikationen, Perspektiven

K. Conrad, W. Lehmann, U. Sack, U. Schedler (Hrsg.)

Karsten Conrad, Werner Lehmann, Ulrich Sack, Uwe Schedler
(Hrsg.)

Multiparameteranalytik – Methoden, Applikationen, Perspektiven



Immundiagnostische Bibliothek
der Gesellschaft zur Förderung der Immundiagnostik e.V.



Inhalt

Grußwort	IX
Vorwort	XI
1 Einleitung: Multiparameteranalytik — Eine interdisziplinäre Herausforderung <i>Werner Lehmann</i>	XIII

Kapitel 1 Technologische Entwicklungen in der Multiparameteranalytik

2 Array-Technologien für die Multiparameteranalytik von Proteomen <i>Thomas Herget, Tanja Henzler, Scott Hayes and Thomas Joos</i>	3
3 Technische Realisierung des Multiparameter-Screenings mit dem Reader LF502 NanoScan FLT <i>Lutz Pfeifer, Karsten Stein</i>	16
4 Zellkultur und Zellpräparation für die Multiparameteranalytik <i>Jörg Michel, Frank Martin, Jessica Rößler, Alin Berndt, Frank Brand, Stefan Philipp, Kristin Kaltschmidt, Kerstin Mannigel, Rico Hiemann, Ulrich Sack, Ursula Anderer</i>	32
5 Multiplex-DNA-Mikropartikeltechnologien und deren Anwendungen <i>Stefan Rödiger, Peter Schierack, Christian Schröder</i>	48
6 Die Bedeutung von Material- und Oberflächeneigenschaften für multiparametrische Technologien <i>Uwe Schedler</i>	77
7 Die HEp-2-Zelle als Target für multiparametrische Autoantikörperanalytik — Automatisierung und Standardisierung <i>Rico Hiemann, Karsten Conrad, Dirk Roggenbuck, Kai Großmann, Jörg Michel, Ursula Anderer, Ulrich Sack</i>	98

- 8 Die universelle Plattform BioResponse® für die kombinierte zelluläre und partikelbasierte Analytik 118
Kai Großmann, Rico Hiemann, Ingo Berger, Alexander Böhm, Jörg Nitschke, Björn Tanneberger, Karsten Conrad, Dirk Roggenbuck, Ulrich Sack, Werner Lehmann

Kapitel 2 Multiparameter-Screening in der pharmazeutischen Wirkstoffforschung

- 9 Multiparameter-Messungen im pharmazeutischen Hochdurchsatz-Screening 133
Franz-Josef Meyer-Almes
- 10 Nano-TRF und Tandem Assays für HTS und Multiparameteranalytik 147
Werner M. Nau, Mara Florea, Harekrushna Sahoo, Huseyin Bakirci, Andreas Hennig, David Bailey
- 11 Multiparameter-Screening in der Biomarkerforschung am Beispiel des Unternehmens F. Hoffmann–La Roche AG 163
Maziar Assadi, Everson Nogoceke, Thomas Schindler
- 12 High Throughput Screening in der Entwicklung von Aufreinigungsprozessen 169
Jürgen Hubbuch
- 13 Cytomics and drug discovery – brief overview 172
Attila Tárnok, Arkadiusz Pierzchalski
- 14 3D Zellsysteme – *In vitro* Testsysteme als Alternativmethoden zu Tierversuchen in der pharmazeutischen und chemischen Industrie 181
Jacqueline Michaelis, Johanna Schanz, Jan Hansmann, Martina Hampel, Heike Mertsching
- 15 Embryonale Stammzellen zur Prädiktion von Entwicklungstoxizität im pharmakologischen Screening 198
Nicole I. zur Nieden

Kapitel 3 Multiparameter-Analytik in medizinischer Diagnostik und Forschung

- 16 Möglichkeiten und Perspektiven der Multiparameterdiagnostik 223
Ulrich Sack, Karsten Conrad

17	Multiparameteranalytik in der Diagnostik – Gegenwärtiger Stand und Entwicklungen	241
	<i>Dirk Roggenbuck, Werner Lehmann, Karsten Conrad</i>	
18	Integrierte Mikroarray-Plattformen zum Hochdurchsatz-Screening — Design und Applikationen	250
	<i>Heinrich Jehle und Björn Breth</i>	
19	Verbesserung der serologischen Autoimmundiagnostik durch multiparametrische Autoantikörper-Analytik	261
	<i>Karsten Conrad, Werner Schöblier, Ulrich Sack</i>	
20	Autoantikörper-Diagnostik mittels eines neuen colorimetrischen Protein-Mikroarray-Systems	303
	<i>Bernd Stöckl</i>	
21	BioPlex 2200™, vollautomatische Multiplex-Beadtechnologie für die klinische Routinediagnostik	308
	<i>Franz Schanz und Gebhard Geier</i>	
22	FlowCytomix in Life Sciences	313
	<i>Birgit Osterhoff</i>	
23	Line-Immunoassays zur Bestimmung von Antikörperprofilen	315
	<i>Arno Kromminga</i>	
	Autorenverzeichnis	325
	Sachverzeichnis	327

Grußwort

Hans-Peter Hiepe

Referatsleiter Regionale Innovationsinitiativen; Neue Länder des BMBF

Um als Wirtschaftsstandort erfolgreich zu sein, braucht eine Region ein unverkennbares Profil. Sie muss sich unterscheiden durch spezifische Kompetenzen und Stärken.

Diese eigenen regionalen Stärken zu identifizieren und systematisch weiter zu entwickeln ist ein langwieriger und oftmals schwieriger Prozess.

Aber es lohnt sich, denn damit bieten sich einmalige Chancen und faszinierende Herausforderungen für alle Beteiligten. Eine solche Aufgabe ist ohne funktionierende Allianzen nicht zu bewältigen. Der Erfolg stellt sich nur ein, wenn alle wichtigen Partner aus Unternehmen, Wissenschaft, Politik und Bildung an einem Strang ziehen, eine gemeinsame Strategie verfolgen und sich mit den Zielen eindeutig identifizieren.

Um innovative Bündnisse anzustoßen, brauchen wir Plattformen. Plattformen wie dieses Innovationsforum „Multiparameteranalytik“. Hier wird ein Erfahrungsaustausch möglich zwischen Wissenschaft, Wirtschaft und Anwendern, bewusst auch zwischen verschiedenen Disziplinen mit dem klaren Ziel, neue Akzente zu setzen in der Entwicklung und Anwendung von multiparametrischen Technologien. Diese Akzente braucht die Branche, braucht die Region. Denn der Aufschwung ist nur durch innovatives Wachstum möglich, durch neue Produkte und Märkte, die daraus entstehen.

„Multiparameteranalytik“ will die richtigen Weichen für die Region Südbrandenburg stellen und überwindet auf der Suche nach neuen Ideen Grenzen. In einem Prozess des offenen Austauschs zwischen Wirtschaft, Wissenschaft und Verwaltung, in einem bewussten „nach draußen gehen“ und sich dem Urteil anderer aussetzen, will „Multiparameteranalytik“ den Grundstein legen für den Cluster BioResponse in Südbrandenburg.

Die strategische Positionierung von „Multiparameteranalytik“ am Markt hat das Bundesministerium für Bildung und Forschung überzeugt. Aus diesem Grund unterstützt es das sechsmonatige Innovationsforum im Rahmen seiner Innovationsinitiative für die Neuen Länder „Unternehmen Region“.

„Unternehmen Region“ umfasst fünf Förderprogramme, die nicht nur den besonderen Bedingungen Ostdeutschlands gerecht werden, sondern für wesentliche Phasen des Innovationsprozesses geeignete Förderinstrumente zur Verfügung stellen. Ihr Ziel ist, die vorhandenen wissenschaftlich-technologischen Kompetenzen einer Region systematisch auszubauen und auf dieser Basis erfolgreiche Innovationen und dauerhaft wettbewerbsfähige Regionen zu schaffen.

Das Innovationsforum „Multiparameteranalytik“ folgt den Grundgedanken von „Unternehmen Region“ und der BMBF-Innovationsförderung: Querdenken, kooperieren, strategisch planen und unternehmerisch handeln. Genau dies erhoffe ich mir auch von dieser Tagung und ihren Teilnehmern.

In diesem Sinne wünsche ich den Veranstaltern und allen Teilnehmern viel Erfolg. Ich wünsche Ihnen viele interessante Gespräche, neue Kontakte und Impulse für Ihre weitere Arbeit.



Vorwort

Die vorliegende Veröffentlichung ist der Begleitband des Innovationsforums „Multiparameteranalytik“ 2008 in Senftenberg, organisiert und ausgerichtet durch die HomogenAss GmbH in Zusammenarbeit mit dem Netzwerk Multiplex, dem Wachstumskern *BioResponse* der Fachhochschule Lausitz, dem Institut für Immunologie der TU Dresden und der Gesellschaft zur Förderung der Immundiagnostik (GFID) e.V. Nachdem sich die ersten drei Innovationsforen der präsymptomatischen Tumordiagnostik gewidmet haben, sind diesmal die aktuellen Entwicklungen auf dem Gebiet der Multiparameteranalytik das zentrale Thema.

Die Multiparameteranalytik — die gleichzeitige und parallele Bestimmung mehrerer analytischer Parameter in einer Probe — verspricht die Verkürzung von Analyseprozessen, die Einsparung von Verbrauchs- und Probenmaterial sowie einen breiten Einsatz in Forschung, Entwicklung und Diagnostik. Der vorliegende Band beschäftigt sich daher in drei Kapiteln mit den technologischen Entwicklungen, dem Multiparameterscreening in der pharmazeutischen Wirkstoffforschung sowie der Multiparameteranalytik in der medizinischen Diagnostik und Forschung. Obwohl kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben werden kann, war es das Ziel, einen Überblick über Methoden, Applikationen und Perspektiven der Multiparameteranalytik zu geben.

Ein besonderer Fokus wurde auf die Ergebnisse und Entwicklungen im Bio-Response-Verbund gelegt. Dieser Verbund wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung über das Programm regionale „Innovative Wachstumskerne“ im Zeitraum 2004–2007 gefördert. Die Ergebnisse, die bis zu ersten Produktanwendungen geführt wurden, sind in dieser Schrift dargestellt. Die durch die Partner entwickelte Plattform BioResponse®, bestehend aus dem VideoScan, dem Bead- bzw. Zellarray kann durch Integration weiterer Testsysteme technologisch erweitert werden und auf eine Vielzahl von Anwendungen und Anwendungsgebiete angepasst werden. So sollen mit dieser Publikation auch Anregungen für künftige Optionen gegeben und für deren Umsetzung notwendige Partnerschaften initiiert werden.

In Bezug auf Applikationen der Multiparameteranalytik wurden entsprechend ihrer Bedeutung die Schwerpunkte auf die pharmazeutische Wirkstoffforschung sowie die medizinische Diagnostik gelegt. Hauptaugenmerk der Diagnostik wie-

derum war die Immundiagnostik, wodurch das Erscheinen dieses Bandes in der Buchreihe „Immundiagnostische Bibliothek“ angemessen erscheint. Die Multiparameteranalytik hat jedoch bereits weitere Anwendungsgebiete in der Forschung und in der Diagnostik, für die Analyse menschlicher und tierischer Proben, im Rahmen von innovativen proteomischen, metabolomischen oder zytomischen Verfahren erreicht. Es ist bereits jetzt abzusehen, dass die Breite der Applikationen bei zunehmender Verbesserung der technischen Möglichkeiten enorm steigen und Grundlage weiterer Innovationsforen wird.

Die Herausgeber hoffen, mit dem vorliegenden Buch eine Orientierungshilfe für den sich schnell entwickelnden Bereich der Multiparameteranalytik zur Verfügung zu stellen, die in das Gebiet einführt und aktuelle Trends erkennbar macht. Unser Dank gilt allen Autoren für ihre interessanten Beiträge, dem Bundesforschungsministerium für die Finanzierung im Rahmen der Innovationsinitiative für die neuen Länder „Unternehmen Region“ und allen Sponsoren, die das Innovationsform ermöglicht haben.

Senftenberg, im März 2008.

Karsten Conrad, Werner Lehmann, Ulrich Sack, Uwe Schedler

Verbesserung der serologischen Autoimmundiagnostik durch multiparametrische Autoantikörper-Analytik

Karsten Conrad¹, Werner Schöblier², Ulrich Sack³

1) Karsten Conrad, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der Technischen Universität Dresden, Fetscherstraße 74, 01307 Dresden
K_Conrad@mail.zih.tu-dresden.de

2) Werner Schöblier, Rathenaustraße 12, 16341 Panketal
Dr.Schoessler@arcor.de

3) Ulrich Sack, Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Medizinische Fakultät der Universität Leipzig, Johannisallee 30, 04103 Leipzig
Ulrich.Sack@medizin.uni-leipzig.de

Zusammenfassung

Die älteste Form der multiparametrischen Autoantikörper-Analytik ist die indirekte Immunfluoreszenz an HEp-2-Zellen, sind doch mit dieser Methode mehr als 30 diagnostisch relevante Autoantikörper detektierbar. An Hand der Musterdifferenzierung sind jedoch diese Autoantikörper nur in Ausnahmefällen spezifizierbar. Assays auf der Basis hoch gereinigter natürlicher oder rekombinanter Autoantigene (Dot/Line-Immunoassays, Partikelarrays, Proteinchips) erlauben die parallele Bestimmung von 10 oder mehr Autoantikörperspezifitäten in einem Ansatz. Voraussetzungen hierfür sind v. a. der Erhalt der autoantigenen Epitope und die Adaptation des Gesamtsystems auf die optimale Detektion der verschiedenen Autoantikörper eines bestimmten Diagnoseprofils in einem Schritt. Ziele der multiparametrischen Autoantikörperanalytik sind neben Zeiteinsparung und höherer Kosteneffizienz auch die weitere Verbesserung der klinisch-diagnostischen Aussagen (Steigerung der diagnostischen Sensitivität, Spezifität sowie der prädiktiven Werte) und die Erschließung neuer Anwendungsgebiete (z. B. Prognostik von Autoimmun- aber auch

degenerativen Erkrankungen, Tumordiagnostik). Hierfür sind sowohl die ständige Weiterentwicklung der technologischen Basis als auch die Integration neuer Parameter erforderlich.

1 Einleitung

Die Bestimmung von Autoantikörpern (AAK) hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten als wertvolle Hilfe in der Diagnostik, Differenzialdiagnostik, Vorhersage, Prognostik und dem Monitoring von Autoimmunerkrankungen erwiesen (1). Der Einsatz von AAK in der Routinediagnostik ist abhängig von den diagnostischen Variablen (v. a. Sensitivität und Spezifität für eine bestimmte Erkrankung), der Verfügbarkeit des Zielantigens bzw. kommerzieller Assays sowie der Kosten-Nutzen-Effizienz im Vergleich zu anderen diagnostischen Maßnahmen. Darüber hinaus entscheiden Kenntnisstand der einsendenden Ärzte sowie der Laborärzte, individuelle und gesellschaftliche Akzeptanz gegenüber dem entsprechenden Parameter und die Anerkennung durch die Kassenärztlichen Vereinigungen über Einsatz oder Nicht-einsatz in der Routinediagnostik. Die gesundheitspolitische Bedeutung der AAK-Diagnostik ergibt sich aus der Prävalenz von Autoimmunerkrankungen in der Bevölkerung von 3–5 %. Derzeit werden autoimmune Schilddrüsenerkrankungen und die rheumatoide Arthritis als häufigste Autoimmunerkrankungen angesehen, gefolgt von Vitiligo und Diabetes mellitus Typ 1 (2). Von einigen (möglicherweise häufigen) Erkrankungen wie dem Anti-Phospholipid-Syndrom liegen leider bisher keine gesicherten Daten zur Inzidenz und Prävalenz vor. Für die Mehrzahl der als autoimmun charakterisierten Erkrankungen, auch für jene, welche im Wesentlichen durch autoreaktive T-Lymphozyten verursacht werden, gelten die jeweils assoziierten AAK als serologische Marker. Meist ist die Bestimmung mehrerer AAK-Spezifitäten für eine optimale Diagnostik erforderlich. Die bisher in der Autoimmundiagnostik etablierten Methoden sind relativ zeitaufwendig, kostenintensiv und gestatten in der Regel nicht die simultane Bestimmung *aller* notwendigen Parameter.

2 Autoantikörper – Definition und Charakteristika

AAK sind von B-Lymphozyten produzierte Immunglobuline, die gegen körpereigene („Auto-“) Antigene gerichtet sind. Zielstrukturen von AAK sind Proteine (z. B. intrazelluläre Enzyme, Rezeptoren, Strukturproteine), Glykoproteine (z. B. β 2-Glykoprotein I), Nukleinsäuren (z. B. DNA, RNA), Phospholipide (z. B. Cardiolipin) sowie Glykolipide (z. B. Ganglioside). AAK sind im Serum und anderen Körperflüssigkeiten (z. B. Synovial-, Zerebrospinalflüssigkeit) nachweisbar. Sie können aber auch in Abhängigkeit von der erkannten Zielstruktur im Gewebe (z. B. nach Bindung an Strukturen der extrazellulären Matrix) zu finden sein.

AAK können durch spezifischen Antigenkontakt induziert werden ($\hat{=}$ nicht-natürliche oder pathologische AAK) oder aber ohne derartige Induktion im natürlichen Repertoire vorliegen ($\hat{=}$ natürliche AAK). Während den natürlichen AAK eher eine physiologische Rolle (z. B. erste Infektabwehr, Immunregulation) zukommt, können nicht-natürliche AAK auch pathogenetisch wirksam sein (z. B. Blockierung oder Stimulierung von Rezeptoren). Unabhängig, ob pathogenetisch wirksam oder nicht, kommt einer Vielzahl von nicht-natürlichen AAK auf Grund ihrer Assoziation mit bestimmten Erkrankungen oder Krankheitsmanifestationen sowie Krankheitsverläufen eine große klinische Bedeutung zu. Die Bestimmung von AAK ist daher zu einem wesentlichen Bestandteil in der Labordiagnostik geworden. Sie kann eine wertvolle Hilfe in der Diagnostik (v. a. der Frühdiagnostik) und Prognostik von klassischen Autoimmunerkrankungen und darüber hinaus von medikamentös, infektiös sowie paraneoplastisch induzierten Autoimmunerkrankungen sein (Tabelle 1). Hinsichtlich der autoantigenen Zielstrukturen kann man zell- und organspezifische von den nichtorganspezifischen AAK abgrenzen. Nichtorganspezifische AAK erkennen spezieübergreifend konservierte, in allen kernhaltigen Zellen exprimierte Autoantigene, welchen in zell- und molekularbiologischen Prozessen (z. B. Zellteilung, DNA-Replikation, RNA-Synthese und -Processing, Proteinsynthese und -translokation) eine bedeutende Rolle zukommt. Sie werden vorwiegend bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises gefunden. Dagegen sind AAK bei organspezifischen Autoimmunerkrankungen meist gegen organspezifisch exprimierte Autoantigene gerichtet.

Tabelle 1. Darstellung der Bestimmung von AAK bei Erkrankungen unterschiedlicher Genese.

Erkrankungen	Autoantikörper
Klassische Autoimmunerkrankungen, z.B. <ul style="list-style-type: none"> • Chronisch entzündliche rheumatische Erkrankungen • Typ 1 Diabetes mellitus • Primär biliäre Zirrhose 	Nichtorganspezifische und organspezifische AAK, z.B. <ul style="list-style-type: none"> Antinukleäre Antikörper (ANA) AAK gegen Pankreas-Inselzellantigene Antimitochondriale Antikörper (AMA)
Postinfektiöse Autoimmunerkrankungen, z.B. Guillain-Barré-Syndrom	AAK gegen Ganglioside
Paraneoplastische autoimmune Erkrankungen	AAK gegen onkoneurale Proteine

3 Autoantikörper in der Diagnostik

Die Bestimmung von AAK kann sinnvoll bzw. notwendig sein in der Diagnostik, Differenzialdiagnostik, Prognostik oder im Monitoring von Autoimmunerkrankungen. Wichtige Kriterien für die Evaluierung der diagnostischen Relevanz eines bestimmten AAK für eine definierte Erkrankung sind die diagnostische Sensitivität, die diagnostische Spezifität, sowie der positive und der negative prädiktive Wert. Je höher diese Werte sind, desto wertvoller sind die jeweiligen AAK für die entsprechende Diagnostik, wobei mitunter ein AAK mit einer vergleichsweise geringen Sensitivität, aber hohen Spezifität zielführend für eine bestimmte Erkrankung sein kann (z. B. Sm-Antikörper beim systemischen Lupus erythematoses/SLE). Die diagnostische Sensitivität entspricht dem Anteil der Patienten mit der entsprechenden Erkrankung, welche mit dem Test korrekt identifiziert wurden (= Quotient aus der Anzahl richtig positiver Testergebnisse und der Gesamtzahl der Patienten mit dieser Erkrankung). Die diagnostische Spezifität ergibt sich aus dem Quotienten der Anzahl richtig negativer Testergebnisse und der Gesamtzahl der Patienten/Probanden ohne die entsprechende Erkrankung. Sie entspricht dem Anteil der Patienten/Probanden ohne die entsprechende Erkrankung, welche mit dem Test korrekt identifiziert wurden. Die Werte der genannten diagnostischen Variablen können jedoch in Abhängigkeit von eingesetzter Nachweismethode, ethnischem Background, Aktivität der Erkrankung sowie Studiendesign (z. B. Art und Größe der Kontrollgruppe) für die jeweilige AAK-Spezifität recht unterschiedlich ausfallen (1).

Ideal für die Diagnostik wären eine Sensitivität von 100 % *und* eine Spezifität von 100 %, was jedoch für keinen der diagnostisch relevanten AAK zutrifft. So gibt es beispielsweise AAK mit einer nahezu 100 %igen Spezifität, aber einer sehr geringen Sensitivität (z. B. PL-7-Antikörper bei der Polymyositis). Andererseits gibt es AAK mit geringer Spezifität, aber hoher Sensitivität (z. B. Rheumafaktoren bei der rheumatoiden Arthritis). Sehr hohe Werte beider diagnostischer Kriterien ergeben sich in der Regel für AAK welche an der Pathogenese der entsprechenden Erkrankung beteiligt sind (z. B. Proteinase 3-Antikörper bei der Wegener-Granulomatose). In solchen Fällen besteht meist auch eine Assoziation des AAK-Titers mit der Krankheitsaktivität, so dass die hohe Sensitivität „nur“ in den aktiven Phasen der Erkrankung erreicht wird.

AAK gelten z.T. als ein Kriterium für die Klassifizierung einer definierten Erkrankung (z. B. Kriterien des American College of Rheumatology/ACR für die Klassifizierung des systemischen Lupus erythematoses oder der rheumatoiden Arthritis). Dies kann auch der Fall sein, wenn die AAK keine hohe Spezifität für die entsprechende Erkrankung haben (z. B. Rheumafaktoren und rheumatoide Arthritis; Anti-Phospholipid-Antikörper und Anti-Phospholipid-Syndrom), aber im Zusammenhang mit typischen Symptomen diagnostisch wegweisend sind (3–5). Andererseits gibt es zahlreiche AAK-Spezifitäten, welche trotz ihrer hohen Spezifität (bisher) nicht in den Kriterienkatalog für die Klassifizierung einer bestimmten

Erkrankung aufgenommen wurden, wie z. B. DNA-Topoisomerase I-Antikörper bei systemischer Sklerodermie oder citrullinierte Protein/Peptid-Antikörper bei rheumatoider Arthritis (3, 6). Neben der „Diagnosesicherung“ bei typischer Symptomatik kommt einer Reihe von erkrankungsspezifischen AAK große Bedeutung in der Frühdiagnostik bei mono- oder oligosymptomatischen oder atypisch verlaufenden Fällen zu (7, 8). Viele der diagnostisch relevanten AAK können Jahre vor Erkrankungsmanifestation nachweisbar sein.

Die Optimierung der AAK-Nachweismethoden sowie die Einführung neuer AAK-Spezifitäten mit diagnostischer Relevanz führen zu einer ständigen Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten für Autoimmunerkrankungen.

4 Bestimmung von Autoantikörpern – Methodenkritik

Für die Bestimmung von AAK stehen zahlreiche Methoden zur Verfügung (Tabelle 2). Traditionell wird bei nichtorganspezifischen AAK die indirekte Immunfluoreszenz an HEp-2-Zellen (s. Buchbeitrag Hiemann, S. 98) mit spezifischen Nachweismethoden auf molekularer Ebene kombiniert. Für den spezifischen Nachweis von AAK werden vorwiegend Enzymimmunoassays (EIA) und zunehmend auch Dot- bzw. Line-Immunoassays auf der Basis hoch gereinigter natürlicher oder rekombinanter Autoantigene eingesetzt. Dagegen werden die doppelte radiale Immundiffusion (Ouchterlony-Technik), Agglutinationstechniken sowie der Western-Blot seltener eingesetzt. In einer Reihe von Fällen gibt es zu Radioimmunoassays (z. B. AAK gegen Acetylcholinrezeptoren) oder Radioimmunpräzipitation (z. B. seltene Sklerodermie- oder Myositis-assoziierte AAK) nach wie vor keine vernünftige Alternative, da die hier vorhandenen Konformationsepitope durch die Festphasenbindung im Enzym- oder Line-Immunoassay zerstört werden. Neue multiparametrische Verfahren wie Chip- oder Partikel-basierte Assays wurden für AAK-Profilbestimmungen entwickelt, haben aber in Deutschland bisher (noch) nicht den Eingang in die routinemäßige Bestimmung von AAK gefunden.

Tabelle 2. Übersicht über AAK-Nachweismethoden.

Methoden	Vorteil(e)	Nachteil(e)
Indirekte Immunfluoreszenz <u>PRINZIP:</u> Bindung des AAK in situ an Antigene von Zellen oder Geweben; Nachweis der Bindung durch FITC-markierte Antikörper.	Screening auf zahlreiche AAK-Spezifitäten möglich, hohe Sensitivität	Erfordert meist nachfolgende Bestimmung der AAK-Spezifität, subjektive Bewertung, erfordert viel Erfahrung, bisher nicht automatisierbar, semiquantitative Auswertung

Tabelle 2. Übersicht über AAK-Nachweismethoden. (Forts.)

Methoden	Vorteil(e)	Nachteil(e)
Ouchterlony-Technik PRINZIP: Präzipitation des AAK mit löslichem Antigen nach radialer Immundiffusion im Gel; Spezifitätsbestimmung über Referenzantikörper.	Hohe diagnostische Spezifität	Geringe Sensitivität, lange Testdauer, nicht für große Serienlängen geeignet
Enzymimmunoassay PRINZIP: Bindung des AAK mit dem an die feste Phase (Mikrotiterplatte bzw. Membran) gebundenen Antigen; Nachweis der Bindung über Enzym-markierte Antikörper.	Gute Quantifizierbarkeit, automatisierbar, Differenzierung der Immunglobulinklassen	Mitunter unspezifische Reaktionen oder Verlust an Sensitivität aufgrund Epitopveränderungen während Festphasen-insolubilisierung
Western-Blot (Immunoblot) PRINZIP: Bindung des AAK an elektrophoretisch aufgetrennte und auf Nitrozellulosemembran transferierte Antigene; Nachweis der Bindung über Enzym-markierte Antikörper.	Screening auf zahlreiche AAK-Spezifitäten möglich	Denaturierung von Proteinen während der Elektrophorese
Radioimmunoassay PRINZIP: Bindung des AAK an radioaktiv markierte Antigene und Messung der Radioaktivität nach Fällung der Komplexe oder Konkurrenz des AAK mit anderen, an das radioaktiv markierte Antigen bindende Proteine	Hohe Sensitivität und Spezifität, Erhalt der Konformation von Proteinen durch Direktassayprinzip	Aufgrund des Arbeitens mit Radioaktivität hohe Anforderungen an die Laborausstattung und die Beseitigung der radioaktiven Abfälle, Differenzierung der Immunglobulinklassen nicht immer möglich
Agglutinationstechniken PRINZIP: Bindung des Autoantigens an Latex-Partikel; nach Zugabe eines Autoantikörpers erfolgt eine Agglutination.	Einfache und schnelle Durchführung, geringe Kosten	Geringe Sensitivität, keine Differenzierung der Immunglobulinklassen möglich, nur für wenige Parameter etabliert
Chip-Techniken PRINZIP: Bindung der Autoantigene in kleinsten Mengen (Spot-Technik) an Trägerflächen, Nachweis der gebundenen AAK über Fluoreszenz- oder Enzym-markierte Antikörper.	Hoher Probendurchsatz, simultane Bestimmung vieler AAK, geringe Kosten	Die Messung der Fluoreszenz oder Chemolumineszenz erfordert teure Auswertetechnik
Partikel-Array PRINZIP: Bindung der Autoantigene an individuell mit Fluorophoren gefärbte Polystyren-Partikel und Nachweis der gebundenen AAK mittels Fluoreszenz-markierter Antikörper und Messung mit zwei Laser-Detektoren unterschiedlicher Wellenlänge.	Hoher Probendurchsatz, simultane Bestimmung vieler AAK, geringe Personalkosten, automatisierbar	Hohe Kosten der Auswertetechnik

Die Frage, welche Methode oder welche Methodenkombination für die AAK-Bestimmung in der Routinediagnostik eingesetzt werden soll, ist nicht einfach zu beantworten und hängt u. a. von der jeweiligen klinischen Fragestellung (Screening, Therapieindikation, Monitoring), den Kosten, der Budgetierung, der Serienlänge und weiteren Faktoren ab. Hinzu kommt, dass auf Grund der unterschiedlichen Bindungsverfahren der Autoantigene an die feste Phase, möglicher Denaturierungen von Proteinen im Western-Blot, des Einsatzes unterschiedlich gereinigter nativer Antigene humanen oder tierischen Ursprungs bzw. rekombinanter Antigene aus bakteriellen oder Baculoviren-Expressionssystemen sowie der Heterogenität der AAK-Feinspezifität und -Avidität mit unterschiedlichen Assays häufig unterschiedliche AAK-Subpopulationen erfasst werden. Daher können die diagnostischen Variablen bezüglich einer bestimmten AAK-Spezifität je nach eingesetzter Methode mitunter stark differieren. Es ist daher schwierig, einen „goldenen Standard“ für die jeweilige AAK-Bestimmung zu definieren. Für eine qualitativ hochstehende Diagnostik ist die Kombination einer Screeningmethode (meist indirekte Immunfluoreszenz) mit einem spezifischen Assay zu empfehlen. Bei solchem Vorgehen können z. B. auch falsch positive Befunde von Enzymimmunoassays, die auf Verunreinigungen bei Einsatz von nativen bzw. in bakteriellen Expressionssystemen exprimierten Antigenen oder auf der Bindung von Antikörpern gegen Blockierungsproteine beruhen können, ausgeschlossen werden (9). Auf Grund der Besonderheiten in der AAK-Analytik (biologische Heterogenität des Analyten, Erkennen von Konformationsepitopen, unzureichende Standardisierungsmöglichkeiten, zahlreiche Störgrößen und Einflussfaktoren) ist auch davon auszugehen, dass eine optimale Diagnostik mit nur *einem* multiparametrischen Verfahren nicht realisierbar ist. Trotz dieser Einschränkung wird der Einsatz neuer multiparametrischer Verfahren die AAK-Analytik auf Grund zahlreicher Vorteile und Entwicklungsmöglichkeiten erheblich verbessern und zu einer Reduzierung der Kosten in der Autoimmundiagnostik führen. Im Rahmen des BioResponse-Verbundes wird daher auf die Kombination von automatisierter und standardisierter Immunfluoreszenz mit Partikelarrays orientiert (siehe Buchbeiträge Anderer, S. 32; Hiemann, S. 98; Großmann, S. 118 und Roggenbuck, S. 241).

5 Vorteile multiparametrischer AAK-Bestimmung

Bei simultaner Bestimmung von mehreren AAK mittels multiparametrischer Assays kann die Zeit der Diagnosefindung im Vergleich zur konventionellen Stufendiagnostik verkürzt werden. Neben der Zeiteinsparung sind auch die Automatisierbarkeit und (in Abhängigkeit von der technologischen Lösung) die deutliche Kostenreduktion Argumente, die für den Einsatz multiparametrischer Assays spre-

chen. Darüber hinaus ergeben sich zahlreiche Vorteile aus klinisch-diagnostischer Sicht:

1. Erhöhung der diagnostischen Sensitivität durch Kombination unabhängiger Marker-Antikörper (z.B. AAK-Profile für die Diagnostik der systemischen Sklerodermie oder der Autoimmunmyositis).
2. Erhöhung der diagnostischen Spezifität durch parallelen Nachweis von AAK (so ist z.B. die Kombination von Rheumafaktor und RA33-Antikörper spezifischer für die rheumatoide Arthritis als der alleinige Nachweis nur eines dieser AAK).
3. Relativ kostenneutrale Integration seltener AAK (Beispiele siehe Tabelle 3) in die Routinediagnostik.
4. Schnellere Integration neuer AAK (Beispiele siehe Tabellen 4 und 5) in die Routinediagnostik.

Tabelle 3. Diagnostisch relevante, aber nicht oder sehr selten routinemäßig bestimmbare Autoantikörper.

Autoantikörper gegen	Erkrankung	Ausgewählte Literatur
SRP54 Mas Glycyl-tRNA-Synthetase Glutaminyl-tRNA-Synthetase Aspariginyl-tRNA-Synthetase Isoleucyl-tRNA-Synthetase KJ-Antigen Fer-Antigen Wa-Antigen	Autoimmune Myositis	33, 34, 122,123
Th/To-Antigen	Sklerodermie	29
Pankreas-Acinus-Antigen	Morbus Crohn	62,63
Becherzell-Antigen	Colitis ulcerosa	62,63
21-Hydroxylase (CYPc21)	Morbus Addison, Nebenniereninsuffizienz bei polyglandulärem Syndrom	107,108
17a-Hydroxylase (CYPc17) CYPsc	Gonadeninsuffizienz Nebenniereninsuffizienz	107,108
CYP1A2	Hepatitis bei polyglandulärem Syndrom	124
Tryptophan-Hydroxylase	Interstinale Dysfunktion bei polyglandulärem Syndrom	125
ADAMTS3	Thrombotisch- thrombozytopenische Purpura (TTP)	126
CaSR	Idiopathischer Hypoparathyreoidismus	127,128
β 1-Adrenoceptor	Dilatative Kardiomyopathie	129,138

Tabelle 4. Neue, potentiell relevante Autoantikörper für die Diagnostik, Differentialdiagnostik und/oder Prognostik von organspezifischen Autoimmunerkrankungen.

Erkrankung	Neue, potentiell diagnostisch relevante Parameter	Ausgewählte Literatur
Aplastische Anämie	Kinektin-Antikörper PMS1-Antikörper Moesin-Antikörper	130–132
Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	Tropomyosin-Antikörper (TM5) Glycan-Antikörper (ALCA, ACCA und AMCA) anti-mikrobielle Antikörper (OmpC-, I2-, CBir1-Antikörper)	75–79
Diabetes mellitus Typ 1	ZnT8-Antikörper Densin-Antikörper Filtrin-Antikörper	133,134
Diabetes mellitus Typ 2	Perizyten-Antikörper bei Retinopathien ICA (bedeutsam für Therapie?)	135,136
Dilatative Kardiomyopathie	Verschiedene Myokard-spezifische Autoantikörper	137
Encephalitis, autoimmune	GluR3-Antikörper	139
Epilepsie	GluR3-Antikörper	140
Folat-Defizienz	Folatzeptor-Antikörper	141
Hypophysitis (autoimmune Entzündung der Hypophyse)	Autoantikörper gegen ein 22 kD zytosolisches Hypophysenprotein PGSF1a-Antikörper PGSF2- Antikörper GH-Antikörper	132,143
Morbus Addison (Subtyp?)	AADC-Antikörper	144
Morbus Basedow-Ophthalmopathie	Calsequestrin-Antikörper	145
Multiple Sklerose	Autoantikörper gegen citrullinierte Proteine des Nervensystems (z.B. citGFAP, citMBP)	146,147
Myokarditis	Verschiedene Myokard-spezifische Autoantikörper	137
Pankreatitis, autoimmune	PST1-Antikörper	148
Paraneoplastische limbische Encephalitis	BRSK2-Antikörper	149
Polyglanduläre Syndrome	TDRD6-Antikörper	150
Polyneuropathien, autoimmune	GD4-Antikörper	89
Primär biliäre Zirrhose	P97/VCP-Antikörper SUMO-1/-2_Antikörper	87,151
Urtikaria	FcεRIα-Antikörper	152,153
Vitiligo	MDHR1-Antikörper	154

Tabelle 5. Neue, potentiell relevante Autoantikörper für die Diagnostik, Differentialdiagnostik und/oder Prognostik von systemischen Autoimmunerkrankungen.

Erkrankung	Neue, potentiell diagnostisch relevante Parameter	Ausgewählte Literatur
Antiphospholipid-Syndrom	tPA-Antikörper FVII/VIIa-Antikörper	155, 156
Arteriosklerose	oxLDL/ β 2GPI-Komplexe sowie Autoantikörper gegen diesen Komplex Lipoprotein-Lipase-Antikörper	157, 158
Morbus Behcet	Sip1-Antikörper Kinektin-Antikörper	159, 160
Myositis, idiopathische	CADM-140-Antikörper Sumo-1-Antikörper PMS1-Antikörper	30-32
Polymyositis/Sklerodermie-Overlap	PM/Sci-75-Antikörper Rrp-Antikörper	161, 162
Rheumatoide Arthritis	MCV-Antikörper AAK gegen citrullinierte Telopeptide von Kollagen Typ I und II, citrulliniertes Fibrinogen, citrulliniertes Filaggrin CAST-C27-Antikörper	46-52
Sjögren-Syndrom	Muskarinerge Rezeptor-Antikörper	40, 41
Sklerodermie	PDGF-Antikörper Fibrillin-1-Antikörper Matrix-Metalloproteinase 3-Antikörper M-Phasen Phosphoprotein 10-Antikörper	18, 19, 23, 24,
Systemischer Lupus erythematodes	NMDAR/NR2A-Antikörper RNA-Helikase A-Antikörper Aktinin-Antikörper Thrombopoitin-Rezeptor-Antikörper	13-17

5. Variable Kombinationen von AAK (AAK-Profile) je nach diagnostischer Fragestellung.
6. Möglichkeit der Kombination von AAK mit anderen Parametern (z. B. Antikörpern gegen mikrobielle Erreger).

Künftig könnten sich sogar Einsatzgebiete multiparametrischer AAK-Bestimmungen bei nicht autoimmunen Erkrankungen (Tumoren, degenerative Erkrankungen, postinfektiöse Manifestationen, Arteriosklerose) ergeben, wenn bestimmte AAK-Profile mit diesen Erkrankungen assoziiert, also von jenen bei Gesunden oder anders Erkrankten signifikant different sind (10–12, 157, 158).

6 AAK-Profile bei systemischen Autoimmunerkrankungen

Bei den meisten systemischen Autoimmunerkrankungen sind zahlreiche AAK nachweisbar. Diese können im Bezug auf ihre klinische Bedeutung in drei Gruppen eingeteilt werden: (a) nicht relevant für die Diagnostik (meist bedingt durch nicht ausreichende diagnostische Spezifität), (b) Datenlage nicht ausreichend für endgültige Beurteilung der diagnostischen Relevanz (c) diagnostische oder prognostische Marker. Die mit Systemerkrankungen assoziierten AAK können überlappend in variablen Kombinationen auftreten (SLE, rheumatoide Arthritis) oder sich gegenseitig ausschließen (systemische Sklerodermie, Autoimmunmyositis). Daraus resultiert, dass für eine optimale Diagnostik auf mehrere AAK parallel getestet werden sollte. Einige dieser Marker-Antikörper (z. B. PL-7-, PL-12-, KJ-, Mas-Antikörper bei Polymyositis, Th/To-Antikörper bei systemischer Sklerodermie, PCNA beim SLE) sind nur in einer geringen Frequenz zu finden und können daher nur über eine multiparametrische Lösung kostengünstig einem breiten Einsatz in der Routinediagnostik zugänglich gemacht werden. Aber selbst wenn alle bisher bekannten diagnostisch relevanten AAK der Multiparameteranalytik zugeführt werden können, bleibt für einige Erkrankungen (Autoimmunmyositis, systemische Sklerodermie) eine Sensitivitätslücke bestehen. Somit sollte die Suche nach weiteren (auch seltenen) Marker-Antikörpern für die Erweiterung erkrankungsassoziierter AAK-Profile vorangetrieben werden. Einige Kandidaten hierfür sind in Tabelle 5 aufgelistet.

6.1 Systemischer Lupus erythematoses (SLE)

Bei Vorliegen der typischen Symptomatik (vier oder mehr der klinischen ACR-Kriterien für die Diagnose eines SLE) könnte die Diagnose auch ohne die Bestimmung der entsprechenden Marker-Antikörper gestellt werden. Trotzdem sollten die AAK zur Diagnosesicherung herangezogen werden. Darüber hinaus sind diese auch von prognostischer Bedeutung. Wichtiger jedoch ist der Wert der erkrankungsspezifischen AAK für eine frühzeitige Diagnosestellung bei noch nicht voll ausgeprägter Symptomatik (mono- oder oligosymptomatische Frühformen) oder atypischen Verlaufsformen. Gerade für die Frühdiagnostik werden sich die Vorteile der Multiparameteranalytik (optimale AAK-Profile zur Steigerung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität) bewähren. Auch ist zu erwarten, dass prognostische Aussagen in Bezug auf Krankheitsentwicklung und Manifestationsspektrum verbessert werden können. Welche AAK sollten nun für die Diagnostik und Prognostik des SLE im Rahmen eines multiparametrischen Assays kombiniert werden? Neben den spezifischen Marker-Antikörpern (dsDNA-, Sm-, Nukleosom-, PCNA-, ribosomale Phosphoprotein-Antikörper) sind dies zunächst weitere SLE-assozierte AAK, welche für SLE-Subtypen oder bestimmte Manifestationen (allein oder in Kombination) charakteristisch sind (Cardiolipin-, Ro/SS-A-, La/SS-B-, U1-RNP-Antikörper). Die Einbeziehung weiterer AAK ist u. a. abhängig

von der technologischen Plattform (Zahl der parallel bestimmbar Parameter) und der Verfügbarkeit der entsprechenden Autoantigene. Bei neuen AAK sind die Ergebnisse von Evaluierungsstudien maßgebend für einen potentiellen Einsatz. Alternativ könnten jedoch neue AAK mit multiparametrischen Assays parallel zur Routinediagnostik evaluiert werden. Kandidaten hierfür sind beispielsweise AAK gegen die NMDA-Glutamatrezeptor-Untereinheit NR2A (von den Marker-Antikörpern unabhängiger Parameter, assoziiert mit neuropsychiatrischen Manifestationen?), gegen alpha-Aktinin (nephritogene kreuzreagierende dsDNA-Antikörper), gegen RNA-Helikase A (Marker zur Frühdiagnostik des SLE?) oder gegen den Thrombopoietin-Rezeptor (Assoziation mit Thrombozytopenie und megakaryozytärer Hypoplasie) (13–17).

6.2 Systemische Sklerose (Sklerodermie), Autoimmunmyositiden, Mischkollagenosen

Im Gegensatz zu den Autoantikörpern beim SLE, welche überlappend in variablen Kombinationen auftreten können, schließen sich die bei der systemischen Sklerodermie sowie bei Autoimmunmyositiden (Polymyositis, Dermatomyositis) auftretenden und meist für diese Erkrankungen hoch spezifischen AAK nahezu gegenseitig aus. Daraus resultiert, dass alle Marker-Antikörper, auch die seltenen, zur Erhöhung der diagnostischen Sensitivität parallel getestet werden sollten (Tabelle 3). Somit kann mit Hilfe multiparametrischer Assays die serologische Diagnostik dieser Erkrankungen wesentlich verbessert werden in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit der entsprechenden Autoantigene in hochreiner Form und unter Bewahrung der autoantigenen Epitope. Für die Sklerodermie und Sklerodermie-assoziierten Mischkollagenosen stehen derzeit hierfür CENP-B (Anti-Centromer-Antikörper, ACA), DNA-Topoisomerase I (Scl-70-Antikörper), PM/Scl-100 (antinukleolärer Antikörper), Fibrillarin (antinukleolärer Antikörper), U1-RNP-Proteine und RNA-Polymerase III zur Verfügung. Neben AAK gegen nukleäre Antigene sind bei der Sklerodermie auch AAK gegen Proteine der extrazellulären Matrix und der Zellmembran zu finden. Relativ Sklerodermie-spezifisch, aber bisher nicht für die Routinediagnostik eingesetzt, sind Fibrillin 1- und PDGF („platelet-derived growth factor“)-Rezeptor-Antikörper (18, 19). Während ACA, anti-Scl-70-, U1-RNP- und antinukleoläre Antikörper mit unterschiedlichen Subsets der Sklerodermie assoziiert sind, korrelieren Fibrillin 1-Antikörper weder mit der Ausdehnung der Hautbeteiligung noch mit bestimmten Organmanifestationen. Es bleibt zu klären, ob Fibrillin 1-Antikörper in Kombination mit anderen AAK einen Gewinn für die Diagnostik oder Prognostik der Sklerodermie darstellen. PDGF-Rezeptor-Antikörper scheinen an der Pathogenese der Sklerodermie beteiligt zu sein, indem sie über die Stimulation des Rezeptors u. a. zur erhöhten Expression des Kollagen Typ I-Gens in Fibroblasten führen (18). Falls diesen AAK tatsächlich eine bedeutende pathogenetische Bedeutung zukommt, sollten sie präsymptomatisch nachweisbar sein und als prädiktiver Marker die Entwicklung einer Sklerodermie in AAK positiven Perso-

nen anzeigen. Von ACA und Scl-70-Antikörpern ist bekannt, dass sie viele Jahre vor Erkrankungsmanifestation nachweisbar sein können (20–22). In Kombination mit weiteren AAK wie den PDGF-Rezeptor-Antikörpern könnte die Vorhersage der Krankheitsentwicklung in Risikogruppen möglicherweise verbessert werden. Weitere Kandidaten für einen potentiellen Einsatz in multiparametrischen Assays sind u. a. AAK gegen Matrix-Metalloproteinase 3 (pathogenetische Bedeutung im Fibrosierungsprozess? Titer korrelieren mit dem Grad der Fibrose von Haut, Lunge sowie Nierengefäßen), gegen M-Phasen Phosphoprotein 10 (früher Marker?, Assoziation mit Oesophagus- und Lungenbeteiligung) sowie gegen Zentriol- und Midbody-Antigene (23–27). Die autoantigenen Targets der relativ selten nachweisbaren Zentriol- und Midbody-Antikörper müssen jedoch noch identifiziert werden, um die reale klinische Relevanz dieser AAK evaluieren zu können. Wichtig ist weiterhin die Integration des Th/To-Antikörpers, eines Markerantikörpers der Sklerodermie mit prognostischer Relevanz. Th/To-Antikörper, gegen Komponenten der RNase MRP/RNase P-Komplexe gerichtet, sind mit den limitierten Formen der systemischen Sklerose assoziiert. Die Prognose der Th/To-Antikörper positiven Patienten ist wegen häufigerer schwerer Organmanifestationen (Lungenfibrose, pulmonale Hypertonie, renale Krise) jedoch schlechter als bei den ACA-positiven Patienten mit limitierter Sklerodermie (28). Auch sind diese AAK bei Patienten mit „idiopathischer“ Lungenfibrose, in diesem Fall einer Sonderform der Sklerodermie („sclerosis sine sclerodema“), nachweisbar (29).

Markerantikörper von Autoimmunmyositiden oder Mischkollagenosen mit Myositis, welche gegenwärtig für die Routinediagnostik zur Verfügung stehen sind AAK gegen verschiedene tRNA-Synthetasen (Jo-1-, PL7-, PL12-Antikörper), gegen eine DNA/Nukleosom-abhängige Helikase/ATPase (Mi-2-Antikörper), gegen DNA-bindende Nicht-Histon-Proteine (Ku-Antikörper), gegen U1-RNP-spezifische Proteine (U1-RNP-Antikörper) sowie gegen PM/Scl-100 (antinukleärer Antikörper). Es besteht die berechtigte Hoffnung, dass durch Einbeziehung weiterer Markerantikörper (AAK gegen andere tRNA-Synthetasen und gegen Signalerkennungspartikel) sowie neuer AAK-Spezifitäten die diagnostische Lücke („seronegative“ Poly- oder Dermatomyositis) in Zukunft geschlossen werden kann. Kandidaten neuer Autoimmunmyositismarker sind AAK gegen ein 140-kD Polypeptid bei Patienten mit klinisch amyopatischer Dermatomyositis (daher CADM-140-Antikörper), SUMO-1 („small ubiquitin-like modifier activating enzyme“) und PMS1, einem DNA-Mismatch-Repairprotein (30–32). Aber nicht nur für die Erhöhung der diagnostischen Sensitivität ist die Kombination der „alten“ wie der neuen Autoimmunmyositismarker in einem Assay sinnvoll. Wie auch bei der Sklerodermie sind die genannten AAK mit unterschiedlichen klinischen Subsets (Progredienz der Myositis, Art und Schwere der Organmanifestation, Ansprechen auf therapeutische Maßnahmen) assoziiert und damit prognostische Marker, welche für das Monitoring und die Therapie der Erkrankung herangezogen werden können (33, 34). So sind beispielsweise die neu beschriebenen CADM-140-Anti-

körper signifikant mit einer rapid-progressiven interstitiellen Lungenerkrankung assoziiert (30).

6.3 Sjögren-Syndrom

Obwohl nicht spezifisch für diese Erkrankung, gelten Ro/SS-A- und La/SS-B-Antikörper als Marker und Klassifikationskriterium für das Sjögren-Syndrom (35, 36). Ein weiterer, jedoch kontrovers diskutierter Marker ist der AAK gegen Alpha-Fodrin. Dieser wurde in einigen Studien bei Patienten mit Sjögren-Syndrom in hoher Sensitivität und Spezifität gefunden (u. a. 37). Andere Studien zeigten jedoch eine weitaus geringere diagnostische Spezifität und damit Relevanz für das Sjögren-Syndrom (38, 39), wobei unterschiedliche Patientenkollektive und methodische Aspekte diskutiert werden. So sinken z. B. die Antikörper-Titer unter Glukokortikoidtherapie, was die niedrigen Frequenzen in einigen Studien erklären könnte. Ein interessanter, wahrscheinlich an der Pathogenese des Sjögren-Syndroms beteiligter AAK ist gegen den muskarinergen Typ 3 Acetylcholinrezeptor (M3mAchR) gerichtet (40). Wegen fehlender Standardisierung der Antikörperbestimmung können noch keine definitiven Angaben zur diagnostischen Sensitivität und Spezifität für das Sjögren-Syndrom gemacht werden. Immunoassays unter Verwendung von M3mAchR-Peptiden sind wahrscheinlich nicht geeignet für die Diagnostik, da die relevanten Autoantikörper Konformationsepitope des Rezeptors erkennen. Mittels Flowzytometrie unter Verwendung von transfizierten CHO („Chinese hamster ovary“)-Zellen konnten M3mAchR-Antikörper in 82 % der Patienten, nicht jedoch bei Blutspendern gefunden werden (41). Es bleibt zu prüfen, ob diese Rezeptoren für eine multiparametrische AAK-Analytik zugänglich gemacht werden können. Weitere AAK, deren klinisches Potential im Rahmen von AAK-Profilen geprüft werden könnte, sind u. a. gegen CENP-C, Coilin-p80, sowie gegen Antigene des „nukleären mitotischen Apparates“ (NuMA) oder den Golgi-Apparat gerichtet.

6.4 Rheumatoide Arthritis (RA)

Seit der Einführung der CCP-Antikörper (AAK gegen zyklisch citrullinierte Peptide) hat sich die serologische Diagnostik der rheumatoiden Arthritis (RA) wesentlich verbessert. CCP-Antikörper sind, im Gegensatz zu den Rheumafaktoren (RF) hoch spezifisch für die RA bei gleichzeitig besserer Prädiktion der RA-Entwicklung bei Patienten mit einer undifferenzierten Arthritis (42–44). Bei gleichzeitigem Nachweis von RF oder RA33-Antikörpern kann der positiv prädiktive Wert weiter gesteigert werden (42). Auf der Erkenntnis, dass die frühe RA klinisch und radiologisch eine besonders schnelle Progredienz aufweist und die Therapie in dieser Phase kurz- und langfristig besonders erfolgreich ist (strukturelle Schäden verlangsamt oder gar vermieden werden können) beruht das Konzept der frühen aggressiven Therapie der RA („hit hard and early“). Hieraus resultiert

die Notwendigkeit einer frühen Sicherung der Diagnose, um eine effektive Therapie einleiten zu können. Das klinische Bild der frühen oder sehr frühen RA ist jedoch häufig uncharakteristisch und die Klassifikationskriterien des American College of Rheumatology (3) sind meist noch nicht erfüllt, so dass in der Regel eine undifferenzierte Arthritis diagnostiziert wird. Mit den Autoantikörpern gegen CCP oder citrullinierte Proteine besteht nun die Möglichkeit einer relativ sicheren Frühdiagnostik (43, 45). Allerdings ist die Nachweisfrequenz der CCP-Antikörper in frühen Stadien wesentlich geringer als in späteren Stadien. Somit sollten mittels multiparametrischer Analytik weitere RA-assoziierte AAK parallel bestimmt werden. Kandidaten hierfür sind AAK mit relativ hoher diagnostischer Spezifität, welche auch in frühen Erkrankungsstadien und bei CCP-negativen Patienten gefunden werden können, wie AAK gegen das A2-Protein von hnRNP-Komplexen (RA33), gegen mutiertes citrulliniertes Vimentin (MCV), gegen CAST-C27 (AAK gegen C-terminales Peptid des Calpastatin), gegen citrullinierte Telopeptide von Kollagen Typ I und II, gegen citrulliniertes Fibrinogen und gegen citrulliniertes Filaggrin (46–52). Da einige dieser AAK auch beim SLE oder beim Sjögren-Syndrom nachweisbar sein können, ist zur Erhöhung der diagnostischen Spezifität für die RA zu empfehlen, auch SLE- und Sjögren-Marker (dsDNA-, Sm-, Ro/SS-A-, La/SS-B-Antikörper) in die AAK-Profilanalytik einzubeziehen. Bei Einsatz multiparametrischer Assays unter Einbeziehung aller für die RA-Diagnostik relevanten AAK sollte es durch Steigerung der diagnostischen Spezifität und der prädiktiven Werte (gleichzeitiger Nachweis RA-assoziiertes AAK, Ausschluss von SLE- und Sjögren-Markerantikörpern) sowie durch Steigerung der diagnostischen Sensitivität in der Frühphase der Erkrankung (kompetitive Reaktivitäten relativ RA-spezifischer AAK) gelingen, mehr Patienten als bisher einer effektiven frühzeitigen Therapie zuzuführen. Erste Ergebnisse einer Mikroarray-basierten AAK-Profilanalytik scheinen dies trotz nicht optimaler Auswahl der in diesem Assays nachweisbaren AAK zu bestätigen (53). Es bleibt zu hoffen, dass die Entwicklung optimaler multiparametrischer Assays für eine spezifische und frühe RA-Diagnostik nicht durch patentrechtliche Probleme verzögert oder gar verhindert wird!

6.5 Anti-Phospholipid-Syndrom (APS)

Entsprechend den Klassifikationskriterien ist das Anti-Phospholipid-Syndrom (APS) definiert durch das Vorliegen mindestens eines klinischen Kriteriums wie vaskuläre Thrombose(n) und Schwangerschaftsmorbidität und mindestens eines Laborkriteriums. Als Laborkriterium gelten der mindestens zweimalige Nachweis von Lupus-Antikoagulanz und/oder Cardiolipin-Antikörpern des IgG- und/oder IgM-Isotyps in mittleren bis hohen Titern und/oder β 2-Glykoprotein I-Antikörpern des IgG- und/oder IgM-Isotyps in mittleren bis hohen Titern im Abstand von 12 Wochen (54). Allein aufgrund dieser Klassifikationskriterien ist bei einem Verdacht auf ein APS die Bestimmung von vier Autoantikörpern mittels Immunoassay erforderlich. Das bedeutet gegenwärtig für die labordiagnostische Praxis,

dass zum einen vier unterschiedliche Testkits abgearbeitet werden müssen und zum anderen, dass dadurch das Budget zur Bestimmung von Autoantikörpern gemäß EBM fast vollständig ausgeschöpft ist und somit weitere Untersuchungen nicht mehr honoriert werden. Neben den oben angeführten Anti-Phospholipid-Antikörpern haben in den letzten Jahren weitere AAK klinische Bedeutung erlangt. Hervorzuheben sind hier insbesondere die Phosphatidylserin-Antikörper, die in 11 % der Fälle von Patienten mit einem APS isoliert auftreten, die Phosphatidylethanolamin-Antikörper, die bei ca. 20 % der Patientinnen mit unklaren Aborten und Thrombosen bei negativen Cardiolipin-Antikörper-Befunden gefunden werden, sowie Phosphatidylinositol-Antikörper, Annexin V-Antikörper und Prothrombin-Antikörper, die u. a. mit einer Abortneigung assoziiert sind (55–58). Es ist davon auszugehen, dass zumindest einige diese AAK Eingang in die klinische Routinediagnostik finden werden (1). Dem stehen bisher ausschließlich die hohen Kosten der parallelen Bestimmung mittels Enzymimmunoassay gegenüber. Durch Einsatz einer Multiparameteranalytik ließen sich diese AAK schnell und kostengünstig synchron bestimmen. Hieraus ergäbe sich ein beträchtlicher Gewinn an Informationen für den Kliniker und eine sichere Diagnostik durch Steigerung der Sensitivität. Durch die dramatische Reduzierung der Kosten könnten diese Parameter ohne Verluste für das Labor im Rahmen der bestehenden Budgetierung bestimmt werden.

7 AAK-Profile bei organspezifischen Autoimmunerkrankungen

Die Anzahl der für die Diagnostik und Prognostik der verschiedenen organspezifischen Autoimmunerkrankungen relevanten AAK ist etwas geringer als jene für systemische Autoimmunerkrankungen. Dennoch ergeben sich bei Bestimmung von AAK-Profilen die gleichen Vorteile wie bei Systemerkrankungen. Einige ausgewählte Beispiele sollen dies im Folgenden belegen:

7.1 Typ 1 Diabetes (T1D)

Viele Marker-Antikörper gelten, unabhängig ob pathogenetisch wirksam oder nicht, als biologische Indikatoren einer Krankheitsentwicklung. Bisher liegen aber nur für den T1D sowohl retrospektive als auch prospektive Studien zur Ermittlung der prädiktiven Relevanz erkrankungsspezifischer AAK in Risikogruppen vor. Die für die Diagnostik des T1D relevanten AAK sind die zytoplasmatischen Inselzell-Antikörper (ICA) sowie AAK gegen Glutamat-Decarboxylase (GAD), Tyrosin-Phosphatase (IA-2) und Insulin (IAA). Kinder, aber auch Erwachsene mit T1D-Antikörpern haben ein erhöhtes Risiko, einen T1D zu entwickeln. Das T1D-Risiko steigt mit dem Titer und der Anzahl der nachweisbaren AAK. Wenn drei oder vier der T1D-spezifischen AAK in mittleren oder hohen Titern vorliegen, entwickeln mehr als 80 % (in einigen Studien bis zu 100 %) innerhalb von 10 Jahren einen T1D

(u. a. 59–61). Unter Einbeziehung neuer potentieller T1D-Marker, wie AAK gegen den Kationen-Transporter ZnT8, gegen Densin und Filtrin könnte die Prädiktion der T1D-Entwicklung weiter verbessert werden (133, 134).

7.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Den CED liegt eine fehlgesteuerte Regulation der Mucosa-assoziierten Immunabwehr, z. T. bedingt durch genetische Defekte von Komponenten des nicht-adaptiven Immunsystems, zu Grunde. Obwohl damit nicht zu den klassischen Autoimmunerkrankungen gehörig, sind beim Morbus Crohn und bei der Colitis ulcerosa, den zwei Hauptformen dieser Erkrankungsgruppe, spezifische AAK nachweisbar. Sie sind gerichtet gegen Antigene von Becherzellen (BAK), Pankreas-Azinus-Zellen (PAK) und neutrophilen Granulozyten (atypische pANCA oder xANCA) (62–64). Daneben sind zahlreiche anti-mikrobielle Antikörper mit CED assoziiert. Eine hohe Spezifität für den Morbus Crohn weisen Antikörper gegen Mannan von *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) auf (62, 65, 66). Obwohl die Relevanz serologischer Parameter bei CED häufig noch kontrovers diskutiert wird, eröffnen sich durch Multiparameteranalytik zahlreiche Möglichkeiten in der Diagnostik und Betreuung der CED-Patienten: (a) Verbesserung der Diagnostik durch Erhöhung von diagnostischer Sensitivität und/oder Spezifität (u. a. 62, 67–69). Damit könnten initial unnötige invasive Eingriffe vermieden werden, was v. a. in der Diagnostik der CED bei Kindern anzustreben ist. Da ASCA auch bei nicht behandelter Zöliakie in höherer Frequenz nachweisbar sind, sollten in die diagnostischen Profile zum Ausschluss dieser auch Gewebstransglutaminase-Antikörper integriert werden (62). (b) Prädiktion der Erkrankungsentwicklung bei Risikopersonen: Die Frequenz von ANCA und ASCA bei Verwandten 1. Grades von CED-Erkrankten ist gegenüber Kontrollgruppen signifikant erhöht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Antikörper in bis zu 38 Monaten vor Erkrankungsmanifestation nachweisbar sein können (66, 70). Große prospektive Studien sind erforderlich zur Evaluierung der Bedeutung serologischer Parameter in Bezug auf die Prädiktion der Entwicklung einer CED. Je mehr potentiell relevante Antikörper (AAK als auch anti-mikrobielle Antikörper) analysiert werden können, desto größer sollten die Erfolgsaussichten diesbezüglich sein. Darüber hinaus sind bei einer solchen Vorgehensweise neue Erkenntnisse zur Ätiopathogenese zu erwarten. (c) Verbesserung der Differenzialdiagnostik: Die beiden Entitäten Colitis ulcerosa und Morbus Crohn können, insbesondere in frühen Erkrankungsphasen, schwierig zu differenzieren sein. In der Gastroenterologie ist für solche Fälle die vorläufige Diagnose Colitis indeterminata eingeführt worden. Für die Abschätzung der weiteren Entwicklung des Krankheitsverlaufes bei solchen Patienten können AAK und anti-mikrobielle Antikörper hilfreich sein. So sind z. B. ASCA und PAK relativ spezifisch für den Morbus Crohn, während ANCA und BAK vorwiegend mit Colitis ulcerosa assoziiert sind (62, 63, 66). (d) Verbesserung prognostischer Aussagen: Hinsichtlich Verlauf und Schwere der Erkrankung weisen beide CED-Entitäten diverse Untergruppen auf, deren Dif-

ferenzierung auch für die Therapieoptimierung von entscheidender Bedeutung ist. Beim Morbus Crohn können z. B. drei Verlaufsformen mit unterschiedlichen Komplikationen (stenosierend, chronisch inflammatorisch, fistelnd) unterschieden werden. Eine serologische Stratifizierung unterschiedlicher Verlaufsformen kann somit zur Therapieoptimierung beitragen (71–73). Auch für die Prädiktion der Wirksamkeit bestimmter Therapien oder postoperativer Komplikationen könnten Profile serologischer Parameter hilfreich sein (74). Für alle genannten Punkte gilt: je mehr potentiell relevante Parameter zur Verfügung stehen, desto größer sind die Chancen für eine Optimierung von Diagnostik und Prognostik chronisch entzündlicher Darmerkrankungen durch Multiparameteranalytik. Neben den bereits genannten Antikörpern kommen hierfür als Kandidaten sowohl verschiedene AAK, wie die anti-Glycan- (ALCA, ACCA und AMCA) und anti-Tropomyosin-Antikörper als auch verschiedene anti-mikrobielle Antikörper wie z. B. OmpC-, I2-, CBir1-Antikörper in Betracht (75–79). Darüber hinaus müssen die autoantigenen Zielstrukturen der BAK, der PAK und der atypischen ANCA identifiziert werden, um in multiparametrischen Assays eingesetzt werden zu können.

7.3 Autoimmune Lebererkrankungen (AIL)

Autoimmune Lebererkrankungen sind charakterisiert durch immunvermittelte Schädigung (chronische Entzündungen, Fibrosierung) von hepatozellulärem und/oder cholangiozellulären Gewebe. Je nach Hauptlokalisation der pathologischen Prozesse (proximale oder distale Gallenwegsabschnitte oder Hepatozyten) werden drei nosologische Entitäten unterschieden: die primär biliäre Zirrhose (PBC), die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) und die Autoimmunhepatitis (AIH). Diese unterscheiden sich in ihrem klinischen Profil, ihrer Remissionswahrscheinlichkeit, ihren Assoziationen mit anderen immunvermittelten Erkrankungen und Tumoren, und damit auch in der diagnostischen Strategie und der Therapie (Übersicht bei 80). Auch können therapeutisch relevante Überlappungssyndrome oben genannter Entitäten auftreten (80, 81). Zusammen mit bildgebenden Verfahren und Histologie sind erkrankungsspezifische AAK wegweisend im diagnostischen Prozess. Da eine frühe Diagnose und Therapie die prognostische Entwicklung der AIL wesentlich beeinflussen kann, wurde und wird der Entwicklung und Etablierung sensitiver und spezifischer Assays zum Nachweis von AAK als effektive und nichtinvasive diagnostische Möglichkeit große Aufmerksamkeit geschenkt. Ziele sind nicht nur eine frühe und sichere Diagnose von AIH, PBC und PSC, sondern auch eine Differenzierung unterschiedlicher Verlaufsformen und Überlappungssyndrome sowie die frühe Identifikation assoziierter Erkrankungen (Autoimmunthyreopathien, Colitis ulcerosa, T1D, CREST-Syndrom, RA, Glomerulonephritis). Auf Grund der Vielzahl zu bestimmender AAK kann eine kosteneffektive serologische Diagnostik von AIL (und assoziierten extrahepatischen Immunsyndromen) nur über eine multiparametrische Lösung erfolgen. Der einfachste multiparametrische Test ist die indirekte Immunfluoreszenz an Ratten-

organkryostatschnitten (Kombination von Leber-, Nieren- und Magenschnitten), welche ein Screening auf wichtige serologische Marker der PBC (antimitochondriale Antikörper, AMA) und der AIH („liver-kidney microsomal antibodies“, LKM; „smooth muscle antibodies“, SMA; antinukleäre Antikörper, ANA) erlaubt (Abb. 1). Aber auch seltene Parameter wie die LC-1-Antikörper sind detektierbar. Seit einigen Jahren sind verschiedene Dot/Line-Immunoassays für die Bestimmung leberspezifischer AAK-Profile auf der Basis rekombinanter Autoantigene im Einsatz. Für die ANA ist aber nach wie vor die Immunfluoreszenz die Methode der Wahl, da die molekulare Analyse der Zielantigene bisher keinen diagnostischen Gewinn erbrachte.

Derzeit sind für die Diagnostik der AIH und die Differenzierung der AIH-Subtypen AAK gegen nukleäre Antigene (ANA), F-Aktin glatter Muskelzellen (SMA), Cytochrom p450 2D6 (LKM-1-Antikörper), Formiminotransferase Cyclodeaminase (LC1-Antikörper), UGA-Repressor-tRNA-assoziertes Protein (SLA/LP-Antikörper) und Asialoglykoproteinrezeptor (ASGPR-Antikörper) der Routinediagnostik zugänglich. In die internationalen diagnostischen Kriterien gehen ANA, SMA, LKM-1, AMA, aber auch andere definierte AAK (s. assoziierte Immunopathien) zur Ermittlung des AIH-Score ein (82). Im Rahmen von kosteneffektiven multiparametrischen Assays ist die Integration weiterer Parameter denkbar, wie AAK gegen die Cytochrome P450 2C9, 2A6 und 1A2 sowie gegen die UDP-Glucuronosyl-Transferase 1A (80, 83).

AMA von Typ M2 (AMA-M2) sind *die* Marker in der Immundiagnostik der PBC. Sie sind gegen Proteine des Ketosäuredehydrogenase-Multienzymkomplexes der inneren Mitochondrienmembran gerichtet. Die Hauptzielantigene dieses Komplexes sind die E2-Untereinheiten der Pyruvatdehydrogenase (PDH), der Ketoglutaratdehydrogenase („oxoacid dehydrogenase“, OADC) und der Verzweigtketten-Ketosäuredehydrogenase („branched-chain oxoacid dehydrogenase“, BCKD) (84, 85). PDH-E2 wird in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund von 65 % bis zu 95 % der PBC-Seren erkannt. Gegen OADC-E2 sind 39–88 % und gegen BCKD-E2 53–55 % der AAK von PBC-Patienten gerichtet. In einem neu entwickelten Bead-Array unter Verwendung rekombinanter PDH-E2, OADC-E2 und BCKD-E2 konnte gezeigt werden, dass 20 % der AMA-negativen Seren mit mindestens einer dieser Untereinheiten reagierten (86). Bei bis zu 50 % der PBC-Patienten sind ANA nachweisbar. Diese können Kollagenose-assoziierte Antikörper (v. a. Anti-Centromer-Antikörper), AIH-assoziierte ANA (Hinweis auf Overlap-Syndrom) oder aber relativ PBC-spezifische AAK sein (80, 87). Die PBC-spezifischen bzw. -assoziierten ANA sind entweder gegen Antigene der sogenannten PML nuclear bodies (Sp100, PML, SUMO-1, SUMO-2) oder gegen Antigene der nukleären Envelope (Lamin B-Rezeptor, Glykoprotein gp210, Nukleoporin p62) gerichtet (Abb. 2). Sie schließen die diagnostische Lücke bei AMA-M2-negativen Patienten. Eine prognostische Bedeutung wird von einigen der ANA-Spezifitäten diskutiert, bedarf aber weiterer Evaluierung.

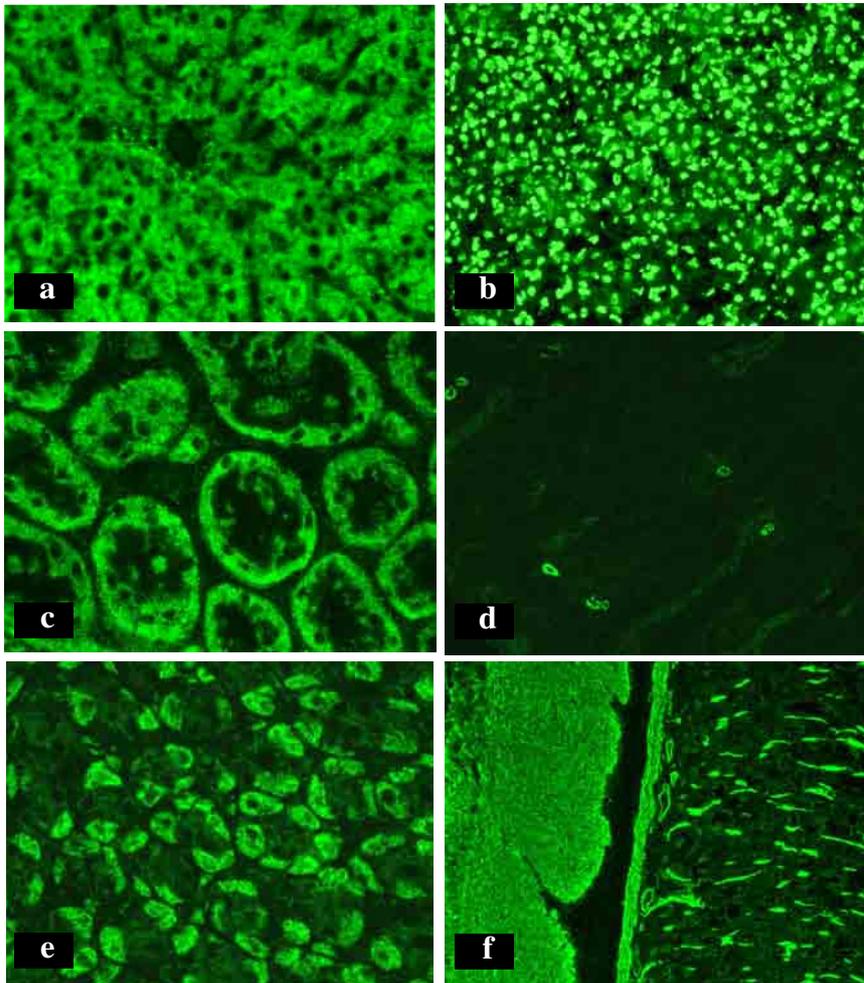


Abb. 1. Kombination von Rattenleber (a, b), Rattenniere (c, d) und Rattenmagen (e, f) als Targets für multiparametrische AAK-Bestimmungen mittels indirekter Immunfluoreszenz: Antimitochondriale Antikörper (AMA) färben das Zytoplasma der Hepatozyten (a), der Tubuluszellen (c) und der Parietalzellen (e). LKM-Antikörper färben ebenfalls Hepatozyten (meist stärker als AMA) und Tubuluszellen, nicht aber die Parietalzellen des Magens. Antinukleäre Antikörper (ANA) zeigen eine Kernfluoreszenz an allen Zellen, hier exemplarisch an Hepatozyten gezeigt (b). AAK gegen glatte Muskelzellen (SMA) sind an der starken Fluoreszenz der Muskularis und der Septen der Mukosa des Magens (f) sowie der Muskularis der Gefäße in Niere (d) und Leber zu identifizieren. Weiterhin sind mit dieser Methode auch Parietalzellantikörper (PCA), antiribosomale (ARA), endomysiale (EmA) und LC1-Antikörper detektierbar.

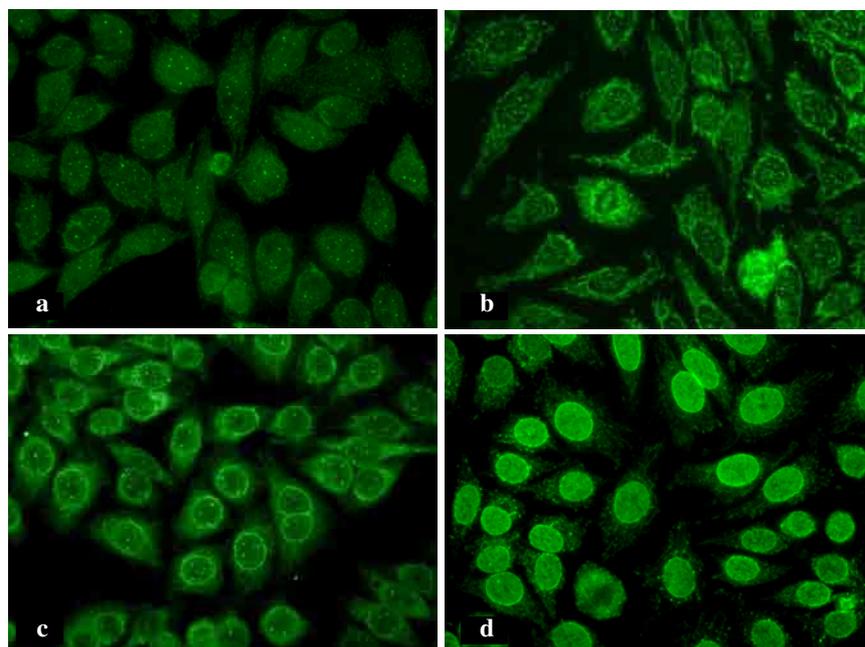


Abb. 2. Mittels indirekter Immunfluoreszenz an HEp-2-Zellen (GA Generic Assays GmbH, Dahlewitz) können verschiedene PBC-spezifische ANA detektiert werden: ANA gegen Antigene der PML nuclear bodies (a-c) und gegen nukleäre Envelope (c, d). (a) Sp100, (b) AMA-M2 + ACA + Sp100, (c) Sp100 + AAK gegen nukleäre Envelope, (d) gp210.

Für die PSC sind bisher nur die atypischen ANCA, welche auch mit der Colitis ulcerosa assoziiert sind (s. 7.2), relevant. Für optimale multiparametrische AAK-Analysen bei AIL ist es erforderlich, die autoantigenen Zielstrukturen sowohl dieser ANCA als auch der AIH-assoziierten ANA zu identifizieren. Auch ist wichtig zu erwähnen, dass extrahepatische Immunsyndrome der Manifestation der AIH vorausgehen können. So können z. B. AIL-assoziierte AAK bei Patienten mit initialer Rheumasymptomatik auf eine sich entwickelnde AIL hinweisen. Insofern sind für bestimmte Fragestellungen auch erweiterte Profile mit Kombination von organ- und nicht organspezifischen AAK sinnvoll.

7.4 Autoimmune Neuropathien

Periphere autoimmune Neuropathien (PNP) sind charakterisiert durch motorische, sensorische oder autonome Dysfunktionen. AAK gegen Ganglioside gelten als Markerantikörper für die Diagnostik und Differenzialdiagnostik dieser Erkrankungen. So sind z. B. GQ1b-Antikörper spezifisch für das Miller-Fisher-Syndrom, wäh-

rend GM1-Antikörper stark mit den verschiedenen Formen des Guillain-Barré-Syndroms assoziiert sind (Übersicht in 88). Das diagnostische Potential der Gangliosid-Antikörper ist bisher aber noch längst nicht ausgeschöpft. Neue Möglichkeiten ergeben sich durch den Einsatz von multiparametrischen Assays. Ein seit 2006 verfügbarer Line-Immunoassay erlaubt derzeit die parallele Bestimmung von AAK gegen 11 verschiedene Ganglioside. Beispiele von Gangliosid-Antikörperprofilen sind in der Abb. 3 dargestellt.

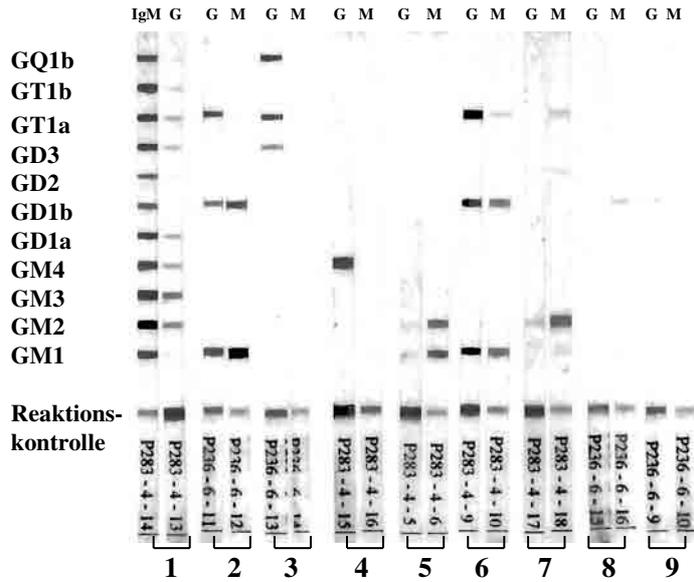


Abb. 3. Beispiele von Anti-Gangliosid-Reaktivitäten in Seren von Patienten mit Neuropathien und systemischem Lupus erythematodes: (1) Das Serum eines Patienten mit multifocal motorischer Neuropathie diente als Positivkontrolle, da eine IgM-Reaktivitäten gegen alle Ganglioside vorliegt (erster Streifen), (2) Serumreaktivität gegen GM1, GD1b (IgG und IgM) sowie GT1a (IgG) eines Patienten mit Guillain-Barré-Syndrom, (3) Serumreaktivität gegen GQ1b, GT1a, und GD3 (nur IgG) eines Patienten mit Miller-Fisher-Syndrom, (4–6) verschiedene Anti-Gangliosid-Reaktivitäten bei Patienten mit nicht klassifizierbaren peripheren Neuropathien, (7, 8) Serumreaktivität von SLE-Patienten: Mit Ausnahme von anti-GM2-IgM waren die Färbungen schwächer als die anti-Gangliosid-Reaktivitäten der Seren von Neuropathie-Patienten, (9) negative Kontrolle (Blutspenderserum).

Mit dem Einsatz von multiparametrischen Assays zur Bestimmung von Gangliosid-Antikörperprofilen werden folgende Ziele verbunden: (a) Erhöhung von diagnostischer Sensitivität und Spezifität für autoimmune periphere Neuropathien. So konnte bereits gezeigt werden, dass mit der Anzahl der nachweisbaren Gangliosid-Antikörper auch die Spezifität für autoimmune periphere Neuropathien

steigt (89). (b) Bessere Differenzierung der verschiedenen akuten und chronischen Neuropathien. (c) Identifizierung weiterer Krankheitsentitäten oder -subtypen mit autoimmuner Pathogenese. (d) Des Weiteren werden neue Erkenntnisse zur Ätiopathogenese dieser Erkrankungen erwartet. Letztlich soll mit der angestrebten Verbesserung der Diagnostik eine Optimierung der Therapie einhergehen.

7.5 Paraneoplastische neurologische Syndrome (PNS)

Neurologische Syndrome, welche mit einem Tumor assoziiert, aber nicht auf eine lokale Wirkung des Tumors oder seiner Metastasen zurückzuführen sind, werden als paraneoplastisch definiert. Die Ursachen hierfür können Hormone, aber auch Autoimmunprozesse sein. Bei den autoimmunen Formen kommt es, induziert durch ektopisch im Tumor exprimierte Antigene, zur Bildung von Autoantikörpern und autoreaktiven T-Lymphozyten gegen das kreuzreagierende Antigen im neuralen Gewebe. PNS gehen in 60–70 % der Entdeckung des Tumors voraus. Sie sind schwere, aber potentiell behandelbare Erkrankungen, die eine frühe und sichere Diagnose erfordern. Die bei diesen Erkrankungen in bis zu 80 % nachweisbaren AAK gegen onkoneurale Antigene (ONA) sind hochspezifisch für PNS (90). Die ONA-Antikörperspezifitäten sind jedoch mehr mit den zu Grunde liegenden Tumoren als den neurologischen Syndromen assoziiert. Da nahezu alle Neuropathieformen einen paraneoplastischen Hintergrund haben können, sollte somit bei Verdacht auf ein PNS auf möglichst alle bisher bekannten ONA-Antikörper gescreent werden (91, 92). Mit der Immunfluoreszenz an Kryostatschnitten von Kleinhirn und anderen Organen (s. Abb. 4) können AAK gegen neuronale nukleäre (Hu/ANNA-1, Ri/ANNA-2, ANNA-3, Zic4) oder nukleoläre (Ma-1, Ta/Ma-2, Ma-3) Antigene, gegen zytoplasmatische Antigene von Purkinje-Zellen (Yo/PCA-1, PCA-2, Tr/PCA-Tr) oder Oligodendrozyten (CV-2/CRMP-5) und gegen Bergmann-Glia (AGNA) gefunden werden (92–101). Auch AAK gegen Glutamat-Decarboxylase (GAD), Amphiphysin (Abb. 4) und metabotrope Glutamat-Rezeptoren (mGluR1) sind nachweisbar (92, 102–104). Entsprechend den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Neurologie sollte ein positiver Befund immer durch eine zweite unabhängige Methode bestätigt werden. Hierfür stehen derzeit Dot/Line-Immunoassays und Immunoblots zur Verfügung. Die Anzahl der bestimmbareren AAK wird sicher in Zukunft in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit entsprechender rekombinanter ONA noch steigen. Für die Bestimmung von AAK gegen bestimmte Rezeptorstrukturen, wie VGCC („voltage gated calcium channel“) oder VGKC („voltage gated potassium channel“) sind aber nach wie vor Radioimmunoassays der „Goldene Standard“ (105, 106).

Für eine optimale Multiparameteranalytik aller relevanten ONA-Antikörper sind noch folgende Arbeiten erforderlich: 1. Suche nach und Identifizierung von weiteren ONA-Antikörpern zur Steigerung der diagnostischen Sensitivität (bei ca. 30 % der PNS können keine der bisher bekannten ONA-Antikörper nachgewiesen werden), 2. Identifizierung der antigenen Targets von bisher nur in der

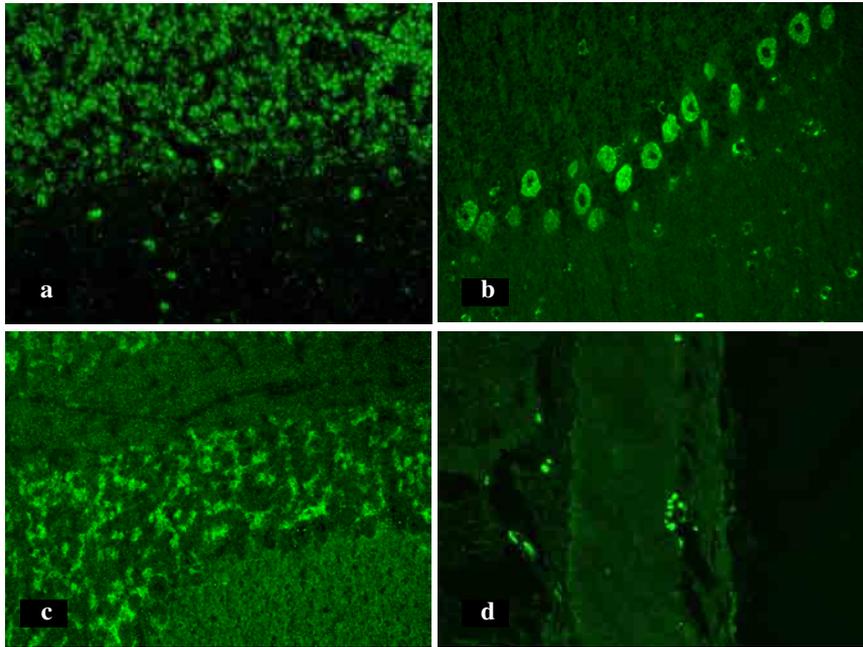


Abb. 4. Organkryostatschnitte vom Kleinhirn (a–c) in Kombination mit anderen Organkryostatschnitten, hier Magen (d) erlauben eine multiparametrische Analytik von AAK gegen onkoneurale Antigene: (a, d) Hu-Antikörper: Färbung der Zellkerns der Neuronen sowie des Plexus Myentericus (b) Yo-Antikörper: Färbung des Zytoplasma der Purkinje-Zellen, (c) Amphiphysin-Antikörper: Färbung der Neuropili in der Molekularschicht und intensive granuläre Färbung der Perikarya in der Körnerschicht.

Immunfluoreszenz nachweisbarern AAK (z. B. ANNA-3, AGNA), und 3. rekombinante Darstellung weiterer ONA.

Die Bedeutung der Multiparameteranalytik ließe sich an weiteren Krankheitsgruppen, wie den autoimmunen Endokrinopathien (107, 108, 132, 143, 144, 150), der Infertilität (109), den rasch progredienten Glomerulonephritiden (110, 111), den bullösen Dermatosen (112) und den autoimmunen Zytopenien (113, 130–132) eindrucksvoll verdeutlichen. Im Folgenden soll noch ein Beispiel eines potentiellen Einsatzes von AAK-Profilen bei nicht autoimmunen Erkrankungen diskutiert werden.

8 Autoantikörper bei Tumoren

Es ist bereits seit Jahrzehnten bekannt, dass AAK gehäuft bei Tumoren zu finden sind (114, 115). AAK gegen Proteine oder Glykoproteine, die im Rahmen der Tumor-

genese neo-, über- oder aberrant exprimiert werden, können relativ spezifisch für Tumoren und damit Kandidaten für die Diagnostik sein (Übersicht in 10). In der Abbildung 5 sind die wichtigsten Antigen-Gruppen, welche zur Produktion von AAK bei Tumoren führen können, aufgeführt. Die Liste der über SEREX („serological analysis of recombinant cDNA expression libraries of human tumors with autologous serum“) oder Proteomtechnologien identifizierten tumorassoziierten AAK wächst von Jahr zu Jahr. Unter den hunderten von AAK, welche bisher in Seren von Tumorpatienten gefunden wurden, finden sich immer mehr Spezifitäten, welche auf ihre klinische Relevanz hin evaluiert werden bzw. werden sollten (Beispiele hierfür sind in Abb. 5 aufgelistet). Derartige AAK können mit bestimmten Tumorentitäten assoziiert sein (z. B. HCC1-Antikörper beim Leberzellkarzinom) oder aber in einem breiten Spektrum von verschiedenen Tumoren (meist Karzinome) gefunden werden (z. B. p53- und Survivin-Antikörper).

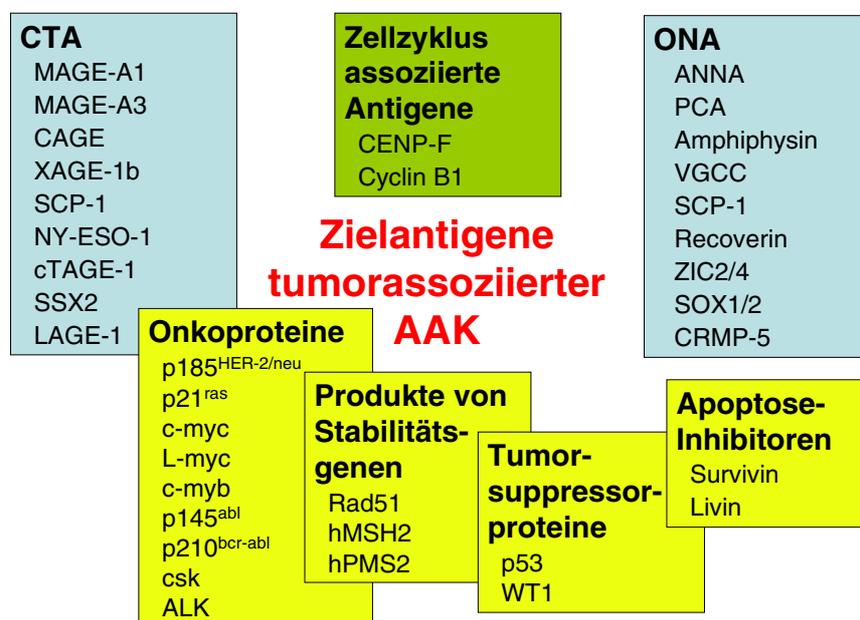


Abb. 5. Autoantigene, welche während der Tumorgenese aberrant oder neo-exprimiert werden, können zur Produktion von tumorassoziierten AAK führen. Die betrifft v. a. Proteine, welche direkt am Pathogeneseprozess beteiligt sind (gelber Hintergrund) sowie Proteine, welche differentiell exprimiert werden (hellblauer Hintergrund). Aber auch Zellzyklus abhängig exprimierte Proteine können Zielantigene von AAK bei Tumoren sein bei jedoch geringerer Tumorspezifität (grüner Hintergrund). CTA: „cancer/testis class of tumor antigens“; ONA: „onconeural antigens“.

Da die Induktion von AAK weniger von der Tumorgröße als von genetischen Faktoren (HLA-Allele) sowie Änderungen der Struktur und/oder Expression der entsprechenden Autoantigene abhängt, sollten tumorassoziierte AAK sehr frühzeitig in der Tumorgenese zu finden sein. In der Tat konnte in retrospektiven Untersuchungen gezeigt werden, dass p53-, Survivin-, NY-ESO-1- und Koc-Antikörper mehrere Monate bis mehrere Jahre vor klinischer Manifestation bzw. diagnostischer Nachweisbarkeit des Tumors exprimiert werden können (116–120). Auch sind diese AAK in Risikogruppen für die Entwicklung von Tumoren (z. B. ehemalige Uranerzbergarbeiter) signifikant häufiger nachweisbar als in Kontrollgruppen ohne das entsprechende Risiko. Es fehlen allerdings bisher prospektive Studien, die aufzeigen könnten, welche Relevanz bezüglich Früh- oder Risikodiagnostik den tumorassoziierten AAK tatsächlich zukommt.

Wenn AAK die Frühdiagnostik von Tumoren verbessern helfen sollen, müssen sie folgende Kriterien erfüllen: Sie sollten (a) eine möglichst hohe Spezifität für Tumoren aufweisen, (b) bei der Mehrzahl der Tumorpatienten nachweisbar sein (d. h. eine hohe diagnostische Sensitivität aufweisen) und (c) vor klinischer Manifestation bzw. Nachweisbarkeit mit „herkömmlichen“ Diagnoseverfahren zu finden sein. Daher ist zunächst erforderlich, AAK mit genügend hoher Tumorspezifität für weitere Untersuchungen auszuwählen. Die diagnostische Sensitivität derartiger AAK ist in der Regel recht gering und erreicht selten mehr als 20 %. Daraus folgt,

p53	Survivin	Koc	p62	NY-ESO1	POSITIV n (%)
+	-	-	-	-	3 (5%)
+	-	-	-	+	1 (1,7%)
-	+	-	-	+	2 (3,3%)
-	+	+	+	-	1 (1,7%)
-	+	-	-	-	11 (18,3%)
-	-	+	-	-	4 (6,7%)
-	-	-	-	+	9 (15%)
-	-	+	-	+	1 (1,7%)
4 (6,7%)	14 (23,3%)	6 (10%)	1 (1,7%)	13 (21,7%)	32 (53,3%)

Abb. 6. AAK-Profile bei 60 ehemaligen Uranerzbergarbeitern mit Bronchialkarzinom. Während die Bestimmung nur eines AAK maximal 23 % diagnostische Sensitivität (hier bei Survivin-Antikörpern) erbringt, kann diese durch Kombination von 5 tumorspezifischen AAK auf über 50 % gesteigert werden.

dass nur über eine multiparametrische Lösung mit der Möglichkeit der Bestimmung von mehreren (mindestens 10?) tumorassoziierten AAK ein serologischer Test zur Früh- oder Risikodiagnostik von Tumoren entwickelt und evaluiert werden kann (121). Eine Kombination von AAK ist jedoch nur bei höchster Tumorspezifität und geringster Überlappung der AAK-Reaktivitäten sinnvoll. So konnten wir zeigen, dass mit der parallelen Bestimmung der AAK gegen p53, Survivin, Koc und NY-ESO1 die Sensitivität für das Bronchialkarzinom auf 53,3 % gesteigert werden kann (Abb. 6).

9 Gegenwärtiger Stand und Perspektiven der multiparametrischen Analytik von Autoantikörpern

Eine multiparametrische AAK-Analytik auf einer einheitlichen Plattform ist, von wenigen Ausnahmen abgesehen, für die Diagnostik, Differentialdiagnostik und Prognostik von Autoimmunerkrankungen auf Grund zahlreicher Vorteile (Zeit- und Kosteneinsparung, Verbesserung der diagnostischen oder prognostischen Aussagen) anzustreben. Derzeit scheinen zwei konkurrierende technologische Lösungen, Proteinchips (s. Buchbeitrag Stöckl, S. 303) und Partikelarrays (s. Buchbeitrag Schanz, S. 308), der automatisierbaren AAK-Profilanalytik den Weg zu ebnen. Bis sich derartige Assays in der Routinediagnostik durchgesetzt haben (s. a. Buchbeiträge von Sack, S. 223 und Roggenbuck, S. 241), bieten sich v. a. Line-Immunoassays als „Übergangslösung“ für die Bestimmung von AAK-Profilen an. Zur Etablierung optimaler in der Routine einsetzbarer multiparametrischer Assays sind jedoch noch eine Reihe von Problemen zu lösen:

1. Bei Heterogenität der Analyten (hier: differente Autoantigene für die Bestimmung von Autoantikörperprofilen) ist eine einheitliche technologische Plattform schwer realisierbar. Eigene Studien an neuen Multiparameterassays für die Autoimmundiagnostik zeigten Einbußen in der diagnostischen Spezifität für einzelne Autoantikörper aus dem jeweiligen Autoantikörperprofil und schienen uns daher für eine qualitativ gute Immundiagnostik nicht geeignet. Insbesondere zeigte sich hier, dass das einfache Übertragen von ELISA-Prinzipien auf Array-Plattformen problematischer ist als allgemein kommuniziert. Ein kritischer Schritt ist u. a. das „Spotten“ kleinster Volumina der biochemisch und immunologisch unterschiedlichsten Autoantigene an Trägermaterialien, was die Gefahr von Konformationsveränderungen oder gar Denaturierungen in sich birgt.
2. Für einige klinische Fragestellungen sind zwar theoretisch optimale AAK-Profile denkbar (s. Abschnitt 6), jedoch müssen die bisher nicht routinemäßig eingesetzten autoantigenen Targets noch auf die entsprechende technologische Plattform adaptiert werden. Wo dies nicht gelingt, müssen Alternativen für optimale AAK-Profile gefunden werden.
3. Für andere klinische Fragestellungen sind noch AAK mit entsprechenden diagnostischen/prognostischen Aussagen zu identifizieren.

4. AAK können nur bei Kenntnis des methodischen Hintergrundes als Diagnosekriterien gewertet werden, da bei Einsatz differenter Assays in Abhängigkeit von unterschiedlichen Bindungsverfahren der Autoantigene an die feste Phase und möglichen Denaturierungen von Proteinen, von der Nutzung unterschiedlich gereinigter nativer Antigene humanen oder tierischen Ursprungs bzw. rekombinanter Antigene aus bakteriellen oder Baculoviren-Expressionssystemen sowie von der Feinspezifität und Affinität/Avidität unterschiedliche Subpopulationen von Antikörpern mit unterschiedlicher klinischer Relevanz detektiert werden. Das bedeutet, dass vor Einführung neuer multiparametrischer Assays in die Routinediagnostik die tatsächlich mit dieser Methode erreichbaren diagnostischen Variablen mittels multizentrischer Studien evaluiert werden müssen.

Da bisher keine allen Anforderungen gerecht werdende technologische Multiparameter-Plattform für den Einsatz *in der Routinediagnostik* zur Verfügung steht, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt eine Stufendiagnostik (z. B. Screening mittels indirekter Immunfluoreszenz, gefolgt von spezifischen Immunoassays) oder parallele Analytik mit alternativen Assays (z. B. ENA-Antikörper mittels Enzymimmunoassay, Line-Immunoassays und Immundiffusion) die qualitativ beste, aber zeit- und arbeitsintensive Variante der Bestimmung von Antikörperprofilen (Infektionserologie, Autoimmundiagnostik). Nach Kenntnis, Erfahrung und Meinung der Autoren wird eine optimale Multiparameterimmundiagnostik (hohe Kosteneffizienz PLUS hohe Werte der diagnostischen Variablen) nur durch Kopplung von zwei unterschiedlichen multiparametrischen Verfahren zu erreichen sein. Im Rahmen des BioResponse-Verbundes wird daher eine Kombination von automatisiertem und standardisiertem Immunfluoreszenzscreening mit Partikelarray-basierten AAK-Profilen entwickelt.

Literatur

- (1) Conrad K, Schößler W, Hiepe F: Autoantikörper bei systemischen Autoimmunerkrankungen. Ein diagnostischer Leitfaden. 3. Auflage, Pabst Science Publishers, Lengerich 2006
- (2) Cooper GS, Stroehla BC: The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2003;2: 119–125
- (3) Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al.: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31: 315–324
- (4) Hochberg MC, for the Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American College of Rheumatology. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [letter]. *Arthritis Rheum* 1997;40: 1725

- (5) Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al.: The revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25: 1271–1277
- (6) Masi AT, Rodnan GP, Medsger TA Jr, et al. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980;23: 581–590
- (7) Poormoghim H, Lucas M, Fertig N, Medsger TA: Systemic sclerosis sine scleroderma. Demographic, clinical, and serologic features and survival in forty-eight patients. *Arthritis Rheum* 2000;43: 444–451
- (8) Le Roy EC, Medsger TA Jr.: Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2001;28: 1573–1576
- (9) Rupprecht S, Leupold W, Hahn G, Conrad K: Exogen-allergische Alveolitis mit Antikörpern gegen Nahrungsmittelproteine — Fallbeschreibung. *Allergologie* 2001;24: 186
- (10) Conrad K, Bachmann M. Tumor-Associated Autoantibodies. In: *Autoantibodies*, 2nd Ed (ed. by Y. Shoenfeld, M. E. Gershwin, P. L. Meroni), Elsevier 2006, pp 423–436
- (11) Joachim SC, Bruns K, Lackner KJ, Pfeiffer N, Grus FH: Analysis of IgG antibody patterns against retinal antigens and antibodies to α -crystallin, GFAP, and α -enolase in sera of patients with “wet” age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;45: 619–626
- (12) Fritzler MJ, Zhang M, Stinton LM, Rattner JB: Spectrum of centrosome autoantibodies in childhood varicella and post-varicella acute cerebellar ataxia. *BMC Pediatr* 2003;3: 11 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2431/3/11/prepub>)
- (13) Husebye ES, Sthoeger ZM, Dayan M, Zinger H, Elbirt D, Levite M, Mozes E: Autoantibodies to a NR2A peptide of the glutamate/NMDA receptor in sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2005;64: 1210–1213
- (14) Kowal C, DeGiorgio LA, Lee JY, Edgar MA, Huerta PT, Volpe BT, Diamond B: Human lupus autoantibodies against NMDA receptors mediate cognitive impairment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103: 19854–19859
- (15) Croquefer S, Renaudineau Y, Jousse S, Gueguen P, Ansart S, Saraux A, Youinou P: The anti-alpha-actinin test completes anti-DNA determination in systemic Lupus erythematosus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005;1050: 170–175.
- (16) Yamasaki Y, Narain S, Yoshida H, Hernandez L, Barker T, Hahn PC, Sobel ES, Segal MS, Richards NB, Chan EKL, Reeves WH, Satoh M: Autoantibodies to RNA helicase A: A new serologic Marker of Early Lupus. *Arthritis Rheum* 2007;56: 596–604
- (17) Kuwana M, Okazaki Y, Kajihara M, Kaburaki J, Miyazaki H, Kawakami Y, Ikeda Y: Autoantibody to c-Mpl (thrombopoietin receptor) in systemic lupus erythematosus: relationship to thrombocytopenia with megakaryocytic hypoplasia. *Arthritis Rheum* 2002;46: 2148–2159

- (18) Tan FK, Arnett FC, Reveille JD, Ahn C, Antohl S, Sasaki T, Nishioka K, Bona CA: Autoantibodies to fibrillin 1 in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000;43: 2464–2471
- (19) Svegliati Baroni S, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M, Fraticelli P, Sambo P, Funaro A, Kazlauskas A, Avvedimento RV, Gabrielli A: Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *New Engl J Med* 2006;354: 2667–2676
- (20) Conrad K, Mehlhorn J: Diagnostic and prognostic relevance of autoantibodies in uranium miners. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123: 77–91
- (21) Tramposch HD, Smith CD, Sénécal JL, Rothfield NF: A long-term longitudinal study of anticentromere antibodies. *Arthritis Rheum.* 1984; 27: 121–4
- (22) Weiner ES, Hildebrandt S, Sénécal JL: Prognostic significance of anticentromere antibodies and anti-topoisomerase I antibodies in Raynaud's disease. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 68–77
- (23) Nishijima C, Hayakawa I, Matsushita T, Komura K, Hasegawa M, Takehara K, Sato S: Autoantibody against matrix metalloproteinase-3 in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2004;138: 357–363
- (24) Yang JM, Hildebrandt B, Luderschmidt C, Pollard KM: Human scleroderma sera contain autoantibodies to protein components specific to the U3 small nucleolar RNP complex. *Arthritis Rheum* 2003;48: 210–217
- (25) Hayakawa I, Sato S, Hasegawa M, Echigo T, Takehara K: A case of scleroderma spectrum disorder with anticentriole antibody and pulmonary hypertension. *Clin Rheumatol* 2004; (10.1007/s10067-004-0871-1)
- (26) Tausche AK, Conrad K, Seidel W, Roch B: Anti-midbody antibodies as a possible predictive factor for a special limited or abortive form of systemic sclerosis? *Ann Rheum Dis* 2005;64: 1237–1238
- (27) Fritzler MJ, Ayer LM, Gohill J, O'Connor C, Laxer RM, Humbel RL: An antigen in metaphase chromatin and the midbody of mammalian cells binds to scleroderma sera. *J Rheumatol* 1986; 14: 291–294
- (28) Mitri GM, Lucas M, Fertig N, Steen VD, Medsger TA, Jr.: A comparison between anti-Th/To- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis patients with limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum* 2003;48: 203–209
- (29) Fischer A, Pfalzgraf FJ, Feghali-Bostwick CA, Wright TM, Curran-Everett D, West SG, Beown KK: Anti-Th/To-positivity in a cohort of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 2006;33: 1600–1605
- (30) Sato S, Hirakata M, Kuwana M, Suwa A, Inada S, Mimori T, Nishikawa T, Oddis CV, Ikeda Y: Autoantibodies to a 140-kD polypeptide, CADM-140, in Japanese patients with clinically amyopathic dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 2005;52: 1571–1576

- (31) Betteridge Z, Gunawardena H, North J, Slinn J, McHugh N: Identification of a novel autoantibody directed against small ubiquitin-like modifier activating enzyme in dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 2007;56: 3132–3137
- (32) Casciola-Rosen LA, Pluta AF, Plot PH, Cox AE, Morris S, Wigley FM, Petri M, Gelber AC, Rosen A: The DNA mismatch repair enzyme PMS1 is a myositis-specific autoantigen. *Arthritis Rheum* 2001;44: 389–396
- (33) Hengstman GJD, van Engelen BGM, van Venrooij WJ: Myositis specific autoantibodies: changing insights in pathophysiology and clinical associations. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16: 692–699
- (34) Sordet C, Goetz J, Sibilia J: Contribution of autoantibodies to the diagnosis and nosology of inflammatory muscle disease. *Joint Bone Spine* 2006;73: 535–654
- (35) Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox PC, Fox RI, Kassan SS, Pillemer SR, Talal N, Weisman MN: Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61: 554–558
- (36) Manthorpe R: Sjögren's syndrome criteria: American-European and Japanese Groups' criteria compared and contrasted. *Ann Rheum Dis* 2002;61: 482–484
- (37) Witte T, Matthias T, Oppermann M, Helmke K, Peter HH, Schmidt RE, Tishler M: Prevalence of Antibodies Against α -Fodrin in Sjögren's Syndrome: Comparison of 2 Sets of Classification Criteria. *J Rheumatol* 2003;30: 2157–2159
- (38) Zandbelt MM, Vogelzangs J, van de Putte LBA, van Venrooij WJ, van den Hoogen FHJ: Anti- α -fodrin antibodies do not add much to the diagnosis of Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther* 2004;6: R33–R38
- (39) Sordet C, Gottenberg JE, Goetz J, Bengoufa D, Humbel RL, Mariette X, Sibilia J: Anti-alpha-fodrin autoantibodies are not useful diagnostic markers of primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2005;64: 1244–1245
- (40) Dawson LJ, Stanbury J, Venn N, Hasdimir B, Rogers SN, Smith PM: Antimuscarinic antibodies in primary sjögren's syndrome reversibly inhibit the mechanism of fluid secretion by human submandibular salivary acinar cells. *Arthritis Rheum* 2006;54: 1165–1173
- (41) Gao J, Cha S, Jonsson R, Opalko J, Peck AB: Detection of anti-type 3 muscarinic acetylcholine receptor autoantibodies in the sera of Sjögren's syndrome patients by use of a transfected cell line assay. *Arthritis Rheum* 2004;50: 2615–2621
- (42) Raza K, Breese M, Nightingale P, Kumar K, Potter T, Carruthers DM, Situnayake D, Gordon C, Buckley CD, Salmon M, Kitas GD: Predictive value of antibodies to cyclic citrullinated peptide in patients with very early inflammatory arthritis. *J Rheumatol* 2005;32: 231–238

- (43) Van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, de Jong BA, Breedveld FC, Verweij CL, Toes REM, Huizinga TWJ: Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis. A prospective cohort study. *Arthritis Rheum* 2004;50: 709–715
- (44) Van Venrooij WJ, Zendman AJW, Pruijn GJM: Autoantibodies to citrullinated antigens in (early) rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2006;6: 37–41
- (45) Gao IK, Haas-Wöhrle A, Mueller KG, Lorenz HM, Fiehn C: Determination of anti-CCP antibodies in patients with suspected rheumatoid arthritis: does it help to predict the diagnosis before referral to a rheumatologist? *Ann Rheum Dis* 2005;64: 1516–1517
- (46) Mathsson L, Mullazehi M, Wick MC, Sjöberg O, van Vollenhoven R, Klareskog L, Rönnelid J: Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis. Higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Rheum* 2008;58: 36–45
- (47) Vittecoq O, Salle V, Jouen-Beades F, Krzanowska K, Ménard JF, Gayet A, Fardellone P, Tauveron P, Loet XL, Tron F: Autoantibodies to the 27 C-terminal amino acids of calpastatin are detected in a restricted set of connective tissue diseases and may be useful for diagnosis of rheumatoid arthritis in community cases of very early arthritis. *Rheumatol* 2001;40: 1126–1134
- (48) Koivula MK, Heliövaara M, Ramberg J, Knekt P, Rissanen H, Palosuo T, Risteli J: Autoantibodies binding to citrullinated telopeptide of type II collagen and to cyclic citrullinated peptides predict synergistically the development of seropositive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66: 1450–1455
- (49) Nielen MMJ, van der Horst AR, van Schaardenburg D, van der Horst-Bruinsma IE, van de Stadt RJ, Aarden L, Dijkmans BAC, Hamann D: Antibodies to citrullinated human fibrinogen (ACF) have diagnostic and prognostic value in early arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64: 1199–1204
- (50) Van der Cruyssen B, Cantaert T, Nogueira L, Clavel C, De Rycke L, Dendoven A, Sebag M, Deforce D, Vincent C, Elewaut D, Serre G, De Keyser F: Diagnostic value of anti-human citrullinated fibrinogen ELISA and comparison with four other anti-citrullinated protein assays. *Arthritis Res Ther* 2006, 8: R122
- (51) Vittecoq O, Inçaugarat B, Jouen-Beades F, Legoedec J, Letourneur O, Rolland D, Gervasi G, Ménard JF, Gayet A, Fardellone P, Daragon A, Jolivet M, Le Loët X, Tron F: Autoantibodies recognizing citrullinated rat filaggrin in an ELISA using citrullinated and non-citrullinated recombinant proteins as antigens are highly diagnostic for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2004;135: 173–180

- (52) Nell VPK, Machold KP, Stamm TA, Eberl G, Heinzl H, Uffmann M, Smolen JS, Steiner G: Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64: 1731–1736
- (53) Hueber W, Kidd BA, Tomooka BH, Lee BJ, Bruce B, Fries JF, Sønderstrup G, Monach P, Drijfhout JW, van Venrooij WJ, Utz PJ, Genovese MC, Robinson WH: Antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52: 2645–2566
- (54) Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brex RL, Cervera R, Derksen RHW, de Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA: International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4: 295–306
- (55) Toschi V, Motta A, Castelli C, Paracchini ML, Zerbi D, Gibelli A: High prevalence of antiphosphatidylinositol antibodies in young patients with cerebral ischemia of undetermined cause. *Strok* 1998;29: 1759–1764
- (56) Nojima J, Iwatani Y, Suehisa E, Kuratsune H, Kanakura Y: The presence of anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies as risk factor for both arterial and venous thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Hematol* 2006;91: 699–702
- (57) Sugi T, Matsubayashi H, Inomo A, Dan L, Makino T: Antiphosphatidylethanolamine antibodies in recurrent early pregnancy loss and mid-to-late pregnancy loss. *J Obstet Gynaecol Res* 2004;30: 326–332
- (58) Rand JH, Wu XX: Antibody-mediated interference with annexins in the antiphospholipid syndrome. *Thrombosis Research* 2004;114: 383–389
- (59) Bingley PJ, Bonifacio E, Williams AKJ, Genovese S, Bottazzo GF, Gale EAM: Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes* 1997;46: 1701–1710.
- (60) MacLaren NK, Lan MS, Schatz D, Malone J, Notkins AL, Krischer J: Multiple autoantibodies as predictors of Type 1 diabetes in a general population. *Diabetologia* 2003;46: 873–874.
- (61) Ziegler AG, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E: Autoantibody appearance and risk for the development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB study. *Diabetes* 1999;48: 460–468.
- (62) Conrad K, Schmechta H, Klafki A, Lobeck G, Uhlig H, Suhail G, Henker J: Serological differentiation of inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14: 1–7
- (63) Stöcker W, Otte M, Ulrich S, Normann D, Stöcker K, Jantschek G: Autoantibodies against the exocrine pancreas and against intestinal goblet cells in the diagnosis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Med Wochenschr* 1984;109: 1963–1969.

- (64) Bossuyt X: Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clin Chem* 2006;52: 171–181
- (65) Sendid B, Colombel JF, Jacquinet PM, Faille C, Fruit J, Cortot A, Lucidarme D, Camus D, Poulain D: Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn's disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996;3: 219–26
- (66) Seibold F, Stich O, Hufnagl R, Kamil S, Scheurlen M: Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in inflammatory bowel disease: a family study. *Scand J Gastroenterol.* 2001;36: 196–201
- (67) Canani RB, de Horatio LT, Terrin G, Romano MT, Miele E, Staiano A, Rapacciuolo L, Polito G, Bisesti V, Manguso F, Vallone G, Sodano A, Troncone R: Combined use of noninvasive tests is useful in the initial diagnostic approach to a child with suspected inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42: 9–15
- (68) Zholudev A, Zurakowski D, Young W, Leichtner A, Bousvaros A: Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's disease and ulcerative colitis: diagnostic value and correlation with disease phenotype. *Am J Gastroenterol* 2004;99: 2235–41
- (69) Desplat-Jégo S, Johanet C, Escande A, Goetz J, Fabien N, Olsson N, Ballot E, Sarles J, Baudon JJ, Grimaud JC, Veyrac M, Chamouard P, Humbel RL: Update on Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies, anti-nuclear associated anti-neutrophil antibodies and antibodies to exocrine pancreas detected by indirect immunofluorescence as biomarkers in chronic inflammatory bowel diseases: results of a multicenter study. *World J Gastroenterol* 2007;13: 2312–2318.
- (70) Israeli E, Grotto I, Gilburd B, Balicer RD, Goldin E, Wiik A, Shoenfeld Y: Anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic antibodies as predictors of inflammatory bowel disease. *Gut.* 2005;54: 1232–1236.
- (71) Dendrinou KG, Becker JM, Stucchi AF, Saubermann LJ, LaMorte W, Farraye FA. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies are associated with the development of postoperative fistulas following ileal pouch-anal anastomosis. *J Gastrointest Surg.* 2006;10: 1060–1064.
- (72) Spivak J, Landers CJ, Vasiliauskas EA, Abreu MT, Dubinsky MC, Papadakis KA, Ippoliti A, Targan SR, Fleshner PR: Antibodies to I2 predict clinical response to fecal diversion in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12: 1122–1130
- (73) Gupta N, Cohen SA, Bostrom AG, Kirschner BS, Baldassano RN, Winter HS, Ferry GD, Smith T, Abramson O, Gold BD, Heyman MB: Risk factors for initial surgery in pediatric patients with Crohn's disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006;3: 660–881.
- (74) Ferrante M, Vermeire S, Katsanos KH, Noman M, Van Assche G, Schnitzler E, Arijis I, De Hertogh G, Hoffman I, Geboes K, Rutgeerts P: Predictors of early

- response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13: 123–128
- (75) Dotan I, Fishman S, Dgani Y, Schwartz M, Karban A, Lerner A, Weishauss O, Spector L, Shtevi A, Altstock RT, Dotan N, Halpern Z: Antibodies against laminaribioside and chitobioside are novel serologic markers in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006; 131: 366–378
- (76) Ferrante M, Pierik M, Henckaerts L, Dotan N, Norman GL, Altstock RT, Dotan I, Shums Z, Schooler B, Claes K, Van Schuerbeek V, Van Assche G, Rutgeerts P, Vermeire S: A panel of serological antibodies (gASCA, OMP, ACCA, ALCA and AMCA) predicts complicated disease course and surgery in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2006; A: 129
- (77) Mirza ZK, Sastri B, Lin JJC, Amenta PS, Das KM: Autoimmunity against human tropomyosin isoforms in ulcerative colitis. localization of specific human tropomyosin isoforms in the intestine and extraintestinal organs. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12: 1136–1143
- (78) Ebert EC, Geng X, Lin J, Das KM: Autoantibodies against human tropomyosin isoform 5 in ulcerative colitis destroys colonic epithelial cells through antibody and complement-mediated lysis. *Cellular Immunology* 2006;244: 43–49
- (79) Papp M, Norman GL, Altorjay I, Lakatos PL: Utility of serological markers in inflammatory bowel diseases: Gadget or magic? *World J Gastroenterol* 2007;13: 2028–2036
- (80) Strassburg CP: Autoimmune Lebererkrankungen und Überlappungssyndrome. *Praxis* 2006;95: 1363–1381
- (81) Beuers U, Rust C: Overlap syndromes. *Semin Liver Dis* 2005;25: 311–320
- (82) Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31: 929–938
- (83) Invernizzi P, Lleo A, Podda M: Interpreting Serological tests in diagnosing autoimmune liver diseases. *Semin Liver Dis* 2007;27: 161–172
- (84) Gershwin ME, Mackay IR: Primary biliary cirrhosis: paradigm or paradox for autoimmunity. *Gastroenterology* 1991;100: 822–833
- (85) Berg PA, Klein R: Mitochondrial antigen/antibody systems in primary biliary cirrhosis: revisited. *Liver* 1995;15: 281–292
- (86) Oertelt S, Rieger R, Selmi C, Invernizzi P, Ansari AA, Coppel RL, Podda M, Leung PS, Gershwin ME: A sensitive bead assay for antimitochondrial antibodies: Chipping away at AMA-negative primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2007;45: 659–65.
- (87) Invernizzi P, Selmi C, Ranftler C, Podda M, Wesierska-Gadek J: Antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2005;25: 298–310
- (88) Wanschitz J, Deisenhammer F: Anti-Glykolipid-Antikörper in der Diagnostik von Immunneuropathien. *J Lab Med* 2004;28: 439–446

- (89) Conrad K, Schneider H, Ziemssen T, Talaska T, Reinhold D, Humbel RL, Rogenbuck D: A new line immunoassay for the multiparametric detection of antiganglioside autoantibodies in patients with autoimmune peripheral neuropathies. *Ann NY Acad Sci* 2007;1109: 256–264
- (90) Voltz R: Marker paraneoplastischer neurologischer Erkrankungen. *J Lab Med* 2004;28: 431–438
- (91) Pittock SJ, Kryzer TJ, Lennon VA: Paraneoplastic antibodies coexist and predict cancer, not neurological syndrome. *Ann Neurol* 2004;56: 715–719
- (92) Shams'ili S, Grefkens J, deLeeuw B, et al. Paraneoplastic cerebellar degeneration associated with antineuronal antibodies: analysis of 50 patients. *Brain* 2003;126: 1409–1418
- (93) Bataller L, Wade DF, Graus F, Stacey HD, Rosenfeld MR, Dalmau J: Antibodies to Zic4 in paraneoplastic neurologic disorders and small-cell lung cancer. *Neurology* 2004; 62: 778–782
- (94) Bernal F, Shams'ili S, Rojas I, et al.: Anti-Tr antibodies as markers of paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *Neurology* 2003;60: 230–234
- (95) Pittock SJ, Lucchinetti CF, Lennon VA: Anti-Neuronal Nuclear Autoantibody Type 2: Paraneoplastic Accompaniments. *Ann Neurol* 2003;53: 580–587.
- (96) Rosenfeld MR, Eichen JG, Wade DF, Posner JB, Dalmau J: Molecular and clinical diversity in paraneoplastic immunity to Ma proteins. *Ann Neurol* 2001;50: 339–348
- (97) Honnorat J, Antoine JC, Derrington E et al.: Antibodies to a subpopulation of glial cells and a 66 kDa developmental protein in patients with paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychol* 1996;61: 270–278
- (98) Chan KH, Vernino S, Lennon VA: ANNA-3 Anti-Neuronal Nuclear Antibody: Marker of Lung Cancer-Related Autoimmunity. *Annals of Neurology* 2001;50: 301–311
- (99) Graus F, Keime-Guibert F, Rene R, Benyahia B, Ribalta T, Ascaso C, Escaramis G, Delattre JY: Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis: analysis of 200 patients. *Brain* 2001;124: 1138–1148.
- (100) Vernino S, Lennon VA: New Purkinje Cell Antibody (PCA-2): Marker of lung cancer-related neurological autoimmunity. *Ann Neurol* 2000;47: 297–305
- (101) Graus F, Vincent A, Pozo-Rosich P, Sabater L, Saiz A, Lang B, Dalmau J: Anti-glial nuclear antibody: marker of lung cancer-related paraneoplastic neurological syndromes. *J Neuroimmunol* 2005;165: 166–171.
- (102) De Camilli P, Thomas A, Cofield R, Folli F, Lichte B, Piccolo G, Meinick HM, Austoni M, Fassetta G, Botazzo G, Bates D, Cartlidge N, Solimena M, Kilimann MW: The synaptic vesicle-associated protein amphiphysin is the 128-kD autoantigen of Stiff-Man syndrome with breast cancer. *J Exp Med* 1993;178: 2219–2223

- (103) Sillevis Smitt P, Kinoshita A, De Leeuw B, Moll W, Coesmans M, Jaarsma D, Herzen-Logmans S, Vecht C, De Zeeuw C, Sekiyama N, Nakanishi S, Shigemoto R: Paraneoplastic cerebellar ataxia due to autoantibodies against a glutamate receptor. *N Engl J Med* 2000;342: 21–27
- (104) Rakocevic G, Raju R, Dalakas MC: Anti-Glutamic acid decarboxylase antibodies in the serum and cerebrospinal fluid of patients with stiff person syndrome. *Arch Neurol* 2004;61: 902–904
- (105) Iwasa K, Takamori M, Komai K, Mori Y: Recombinant calcium channel is recognized by Lambert-Eaton myasthenic syndrome antibodies. *Neurology* 2000;54: 757–759.
- (106) Pozo-Rosich P, Clover L, Saiz A, Vincent A, Graus F: Voltage-gated potassium channel antibodies in limbic encephalitis. *Ann Neurol* 2003;54: 530–533.
- (107) Vogel A, Strassburg CP, Brabant G, Manns MP: Autoimmun polyglanduläre Syndrome. *Dt Ärztebl* 2002;99: A1428–A1434
- (108) Söderbergh A, Myhre AG, Ekwall O, Gebre-Medhin G, Hedstrand H, Landgren E, Miettinen A, Eskelin P, Halonen M, Tuomi T, Gustafsson J, Husebye ES, Perheentupa J, Gylling M, Manns MP, Rorsman F, Kämpe O, Nilsson T: Prevalence and clinical associations of 10 defined autoantibodies in autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89: 557–562
- (109) Shoenfeld Y, Carp HJ, Molina V, Blank M, Cervera R, Balasch J, Tincani A, Faden D, Lojcono A, Doria A, Konova E, Meroni PL: Autoantibodies and prediction of reproductive failure. *Am J Reprod Immunol* 2006;56: 337–344
- (110) Wolf G: Rasch progrediente Glomerulonephritis. Ein nephrologischer Notfall. *Dt Ärztebl* 2003;100: A2123–A2125
- (111) Birck R, van der Woude FJ: Rasch progrediente Glomerulonephritiden. Klassifikation, Pathogenese und Klinik. *Internist* 2003;44: 1107–1119
- (112) Yancey KB: The pathophysiology of autoimmune blistering diseases. *The Journal of Clinical Investigation* 2005;115: 825–828
- (113) Manny N, Zelig O: Laboratory diagnosis of autoimmune cytopenias. *Current Opin Hematol* 2000;7: 414–419
- (114) Burtin P, von Kleist S, Rapp W, Loisillier F, Bonatti A, Grabar P: Auto-anticorps chez les cancéreux. *Presse Med* 1995;73: 2599–2603
- (115) Wilkinson PC, Zeromski J: Immunofluorescent detection of antibodies against neurones in sensory carcinomatous neuropathy. *Brain* 1965;88: 529–583
- (116) Trivers GE, De Benedetti VMG, Cawley HL, Caron G, Harrington AM, Bennett WP, Jett JR, Colby TV, Tazelaar H, Pairolero P, Miller RD, Harris CC: Anti-p53 antibodies in sera from patients with chronic obstructive pulmonary disease can predate a diagnosis of cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2: 1767–1775

- (117) Lubin R, Zalcman G, Bouchet L, Tredanel J, Legros Y, Cazals D, Hirsch A, Soussi T: Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nature Med* 1995;1: 701–702
- (118) Conrad K: Autoantibodies in cancer patients and in persons with a higher risk of cancer development. In: Shoenfeld, Y.; Gershwin M. E. (Eds.): *Cancer and Autoimmunity*. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2000;159–173
- (119) Rohayem J, Diestelkoetter P, Weigle B, Oehmschen A, Schmitz M, Mehlhorn J, Conrad K, Rieber EP: Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein Survivin in cancer patients. *Cancer Res* 2000; 60: 1815–1817
- (120) Himoto T, Kuriyama S, Zhang JY, Chan EKL, Nishioka M, Tan EM: Significance of autoantibodies against insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2005;26: 311–317
- (121) Zhang JY, Casiano C, Peng XX, Koziol JA, Chan EKL, Tan EM: Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens. *Cancer Epid Biomarkers Prevent* 2003;12: 136–143
- (122) Miller FW: Myositis-specific autoantibodies. Touchstones for understanding the inflammatory myopathies. *J Amer Med Assoc* 1993;270: 1846–1849
- (123) Hirakata M: Humoral aspects of polymyositis/dermatomyositis. *Mod Rheumatol* 2000;10: 199–206
- (124) Obermayer–Straub P, Perheentupa J, Braun S, Kayser A, Barut A, Loges S, Harms A, Dalekos G, Strassburg CP, Manns MP: Hepatic autoantigens in patients with autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy. *Gastroenterol* 2001;121: 668–677
- (125) Ekwall O, Hedstrand H, Grimelius L, Haavik J, Perheentupa J, Gustafsson J, Husebye E, Kämpe O, Rorsman F: Identification of tryptophan hydroxylase as an intestinal autoantigen. *Lancet* 1998;352: 279–83
- (126) Tsai HM, Rice L, Sarode R, Chow TW, Moake JL: Antibody inhibitors to von Willebrand factor metalloproteinase and increased binding of von Willebrand factor to platelets in ticlopidine-associated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med* 2000;132: 794–799
- (127) Mayer A, Ploix C, Orgiazzi J, Desbos A, Moreira A, Vidal H, Monier JC, Bienvenu J, Fabien N: Calcium-sensing receptor autoantibodies are relevant markers of acquired hypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89: 4484–4488
- (128) Goswami R, Brown EM, Kochupillai N, Gupta N, Rani R, Kifor O, Chattopadhyay N: Prevalence of calcium sensing receptor autoantibodies in patients with sporadic idiopathic hypoparathyroidism. *Eur J Endocrinol* 2004; 150: 9–18
- (129) Wallukat G, Nissen E, Morwinski R, Müller J: Autoantibodies against the beta- and muscarinic receptors in cardiomyopathy. *Herz* 2000;25: 261–266.

- (130) Hirano N, Butler MO, Bergwelt-Baildon MS, Maecker B, Schultze JL, O'Connor KC, Schur PH, Kojima S, Guinan EC, Nadler LM: Autoantibodies frequently detected in patients with aplastic anemia. *Blood* 2003;102: 4567–4575
- (131) Hirano N, Butler MO, Guinan EC, Nadler LM, Kojima S: Presence of anti-kinectin and anti-PMS1 antibodies in Japanese aplastic anaemia patients. *Br J Haematol* 2004;128: 221–223
- (132) Takamatsu H, Feng X, Chuhjo T, Lu X, Sugimori C, Okawa K, Yamamoto M, Iseki S, Nakao S: Specific antibodies to moesin, a membrane-cytoskeleton linker protein, are frequently detected in patients with acquired aplastic anemia. *Blood* 2007;109: 2514–2520
- (133) Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar A, Gottlieb P, Rewer M, Eisenbarth GS, Jensen J, Davidson HW, Hutton JC: The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104: 17040–17045
- (134) Rinta-Valkama J, Aaltonen P, Lassila M, Palmén T, Tossavainen P, Knip M, Holtköfer H: Densin and filtrin in the pancreas and in the kidney, targets for humoral autoimmunity in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2007; 23: 119–126
- (135) Nayak, RC Agardh CD, Kwok MGK, Stjernquist H, Farthing-Nayak PJ, Agardh E: Circulating anti-pericyte autoantibodies are present in Type 2 diabetic patients and are associated with non-proliferative retinopathy. *Diabetologia* 2003;46: 511–513
- (136) Davis TME, Wright AD, Mehta, Cull CA, Stratton IM, Bottazzo GF, Bosi E, Mackay IR, Holman RR: Islet autoantibodies in clinically diagnosed type 2 diabetes: prevalence and relationship with metabolic control (UKPDS 70). *Diabetologia* 2005;48: 695–702
- (137) Caforio ALP, Mahon NJ, Tona F, McKennab WJ: Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur J Heart Failure* 2002;4: 411–417
- (138) Jahns R, Boivin V, J. Lohse MJ: β 1-adrenergic receptor function, autoimmunity, and pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Trends Cardiovasc Med* 2006;16: 20–24
- (139) Ito H, Moria K, Todaa Y, Sugimotoa M, Takahashib Y, Kuroda Y: A case of acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures, presenting autoantibody to glutamate receptor Glu32. *Brain Development* 2005;27: 531–534
- (140) Wiendl H, Bien CG, Bernasconi P, Fleckenstein B, Elger CE, Dichgans J, Mantegazza R, Melms A: GluR3 antibodies: Prevalence in focal epilepsy but no specificity for Rasmussen's Encephalitis. *Neurology* 2001;57: 1511–1514

- (141) Ramaekers VT, Rothenberg SP, Sequeira JM, Opladen T, Blau N, Quadros EV, Selhub J: Autoantibodies to folate receptors in the cerebral folate deficiency syndrome. *N Engl J Med* 2005;352: 1985–91
- (142) Takao T, Nanamiya W, Matsumoto R, Asaba K, Okabayashi T, Hashimoto K: Antipituitary antibodies in patients with lymphocytic hypophysitis. *Horm Res* 2001;55: 288–292
- (143) Tanaka S, Tatsumi K, Kimura M, Takano T, Murakami Y, Takao T, Hashimoto K, Kato Y, Amino N: Detection of autoantibodies against the pituitary-specific proteins in patients with lymphocytic hypophysitis. *Eur J Endocrinol* 2002;147: 767–775
- (144) Söderbergh A, Rorsman F, Halonen M, Ekwall O, Björnses P, Mpe OK, Husebye AS: Autoantibodies against aromatic L-amino acid decarboxylase identifies a subgroup of patients with Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85: 460–463
- (145) Gopinath B, Musselman R, Beard N, El-Kaissi S, Tani J, Adams CL, Wall JR: Antibodies targeting the calcium binding skeletal muscle protein calsequestrin are specific markers of ophthalmopathy and sensitive indicators of ocular myopathy in patients with Graves' disease. *Clin Exp Immunol* 2006;145: 56–62
- (146) Nicholas AP, Sambandam T, Echols JD, Tourtellotte WW: Increased citrullinated glial fibrillary acidic protein in secondary progressive multiple sclerosis. *Journal Comp Neurol* 2004;473: 128–136
- (147) Rajmakers R, Vogelzangs J, Croxford JL, Wesseling P, Van Venrooij WJ, Pruijn GJM: Citrullination of central nervous system proteins during the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Comp Neurol* 2005;486: 243–253
- (148) Asada M, Nishio A, Uchida K, Kido M, Ueno S, Uza N, Kiriya K, Inoue S, Kitamura H, Ohashi S, Tamaki H, Fukui T, Matsuura M, Kawasaki K, Nishi T, Watanabe N, Nakase H, Chiba T, Okazaki K: Identification of a novel autoantibody against pancreatic secretory trypsin inhibitor in patients with autoimmune pancreatitis. *Pancreas* 2006;33: 20–26
- (149) Sabater L, Gomez-Choco M, Saiz A, Graus F: BR serine/threonine kinase 2: A new autoantigen in paraneoplastic limbic encephalitis. *J Neuroimmunol* 2005;170: 186–190
- (150) Bensing S, Fetisov SO, Mulder J, Perheentupa J, Gustafsson J, Husebye ES, Oscarson M, Ekwall O, Crock PA, Hökfelt T, Hulting AL, Kämpe O: Pituitary autoantibodies in autoimmune polyendocrine syndrome type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104: 949–954
- (151) Miyachi K, Hosakay H, Nakamuray N, Miyakawaz H, Mimori T, Shibata M, Matsushima S, Chinohyy H, Horigomeyy T, Hankins RW, Zhangzz M, Fritlerz MJ: Anti-p97/VCP antibodies: An autoantibody marker for a subset

- of primary biliary cirrhosis patients with milder disease? *Scand J Immunol* 2006;63:376–382
- (152) Horn MP, Pachlopnik JM, Vogel M, Dahinden M, Wurm F, Stadler BM, Miescher SM: Conditional autoimmunity mediated by human natural anti-FcεRIα autoantibodies? *FASEB J* 2001;15: 2268–2274
- (153) Lee KH, Kim JY, Kang DS, Choi YJ, Lee WJ, Ro JY: Increased expression of endothelial cell adhesion molecules due to mediator release from human foreskin mast cells stimulated by autoantibodies in chronic urticaria sera. *J Invest Dermatol* 2002;118: 658–663
- (154) Kemp EH, Waterman EA, Hawes BE, O'Neill K, Gottumukkala RVSRK, Gawkrödger DJ, Weetman AP, Watson PF: The melanin-concentrating hormone receptor 1, a novel target of autoantibody responses in vitiligo. *J Clin Invest* 2002;109: 923–930
- (155) Lu CS, Horizon AA, Hwang KK, Fitzgerald J, Lin WS, Hahn BH, Wallace DJ, Metzger AL, Weisman MH, Chen PP: Identification of polyclonal and monoclonal antibodies against tissue plasminogen activator in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2005;52: 4018–4027
- (156) Bidot CJ, Jy W, Horstman LL, Huisheng H, Jimenez JJ, Yaniz M, Ahn YS: Factor VII/VIIa: a new antigen in the anti-phospholipid antibody syndrome. *Br J Haematol* 2003;120: 618–626
- (157) Matsuura M, Kobayashi K, Koike T, Shoenfeld Y: Autoantibody-mediated atherosclerosis. *Autoimm Rev* 2002;1: 348–353
- (158) De Carvalho JF, Borba EF, Viana VST, Bueno C, Leon EP, Bonfa E: Antilipoprotein lipase antibodies. A new player in the complex atherosclerotic process in systemic lupus erythematosus? *Arthritis Rheum* 2004;50: 3610–3615
- (159) Delunardo F, Conti F, Margutti P, Alessandri C, Priori R, Siracusano A, Riganò R, Profumo E, Valesini G, Sorice M, Ortona E: Identification and characterization of the carboxy-terminal region of Sip-1, a novel autoantigen in Behçet's disease. *Arthritis Res Ther* 2006;8: R71
- (160) Lu Y, Ye P, Chen S, Tan EM, Chan EKL: Identification of kinectin as a novel Behçet's disease autoantigen. *Arthritis Res Ther* 2005;7: R1133–R1139
- (161) Raijmakers R, Renz M, Wiemann C, Egberts WV, Seelig HP, van Venrooij WJ, Pruijn GJM: PM-Scl-75 Is the main autoantigen in patients with the polymyositis/scleroderma overlap syndrome. *Arthritis Rheum* 2004;50: 565–569
- (162) Brouwer R, Vree Egberts WTM, Hengstman GJD, Raijmakers R, van Engelen BGM, Seelig HP, Renz M, Mierau R, Genth E, Pruijn GJM, van Venrooij WJ: Autoantibodies directed to novel components of the PM/Scl complex, the human exosome. *Arthritis Res* 2002, 4: 134–138

Danksagung

Diese Arbeit wurde in Teilen durch eine Förderung des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) unterstützt („Bildungsprojekt Multiparameter-Immundiagnostik“, Projekt-Nummer 03WKR08).

Sachverzeichnis

- AKLIDES 241
Allergiediagnostik 86, 226, 245, 248, 314, 316
Aminosäuren 4, 11, 148, 150, 157 f, 319
AmpliChip® 164
Anti-Centromer-Antikörper (ACA) s. Centromer-Antikörper
Antimitochondriale Antikörper (AMA) 102, 108 f, 263, 279 f
Antinukleäre Antikörper (ANA) XXI, 34 f, 99 f, 125, 245, 263 f
ANA s. antinukleäre Antikörper
Anti-Phospholipid-Syndrom (APS) 103, 262 f, 275 f
APS s. Anti-Phospholipid-Syndrom
Arzneimittelentwicklung 163 f, 181 f, 198 f
Autoantikörper 13, 32 f, 98 f, 118 f, 244, 261 f, 303, 311, 315
Autoantikörperanalytik s. Autoantikörperdiagnostik
Autoantikörperdiagnostik 32 f, 98 f, 118 f, 261 f, 303, 311, 315
Autoimmundiagnostik s. Autoantikörperdiagnostik
Autoimmune Lebererkrankungen (AIL) 278, 319
Autoimmunerkrankungen 32 f, 100, 126, 227 f, 244, 248, 261 f
Autoimmunhepatitis 103, 268, 278
Automatische Mustererkennung 98 f, 123 f, 248
Automatisierung XVI f, 13, 17 f, 33 f, 64 f, 89, 98 f, 118 f, 123 f, 134, 169, 177, 184, 207 f, 224 f, 242 f, 256 f, 265 f, 304, 308 f
Bead(s) XVI f, 7 f, 50 f, 78 f, 118 f, 225 f, 247, 279, 308 f, 318
Bead-Array(s) s. Bead(s)
Bead-basierte Technologien/Arrays s. Bead(s)
Biomarker 5, 13, 163 f, 224, 226
BioPlex2200™ 308 f
BioResponse®-Technologie XX f, 118 f, 241 f
BioResponse-Verbund 32 f, 92, 225, 241 f, 26, 288
cAMP XIX, 16 f, 137
cAMP-Assay 16 f
cDNA-Mikroarray 48 f
Centromer-Antikörper 37 f, 100 f, 115, 246. 272. 279
Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) 277
Chronisch-entzündliche rheumatische Erkrankungen 34, 99 f, 241 f, 261 f
Colitis ulcerosa 268, 277, 289
Critical Path Initiative 163
Cytometry 172
Cytomics 172
Decarboxylasen 148 f
Diabetes, Typ 1 262, 269, 276
Diabetes, Typ 2 12, 312
Diagnostik XV, 12, 91, 98, 223, 241, 250, 261
DNA-Antikörper 110, 127, 246
DNA-Mikroarray 48 f, 78 f, 250
DNA-Mikropartikelarray 48 f
Drug discovery 172 f
Duplexassay 16 f

- Embryonale Stammzellen 198 f
Entwicklungstoxizität 198 f
Erregernachweis XIX f, 66 f, 230, 248, 258, 270, 315, 320 f
- Festphasen-PCR 58
Fluoreszenz 8 f, 16 f, 50 f, 78 f, 118 f, 133 f, 147 f, 213 f, 244 f, 250 f
Fluoreszenz-Bead-Technologie 308
Fluoreszenzlebensdauer 16, 23, 133
Fluoreszenzpolarisation 133
Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET) 17
- Gangliosid-Antikörper XX f, 229, 263, 281 f
Genotypisierung 58 f, 230, 252
- HEp-2-Zellen XXII, 32 f, 98 f, 118 f, 247, 261, 281
Hepatitisviren 243, 311
High content analysis 172
High-Throughput-Screening (HTS) s. Hochdurchsatz-Screening
Histondeacetylasen 133 f
Hochdurchsatz-Screening 17 f, 78, 133 f, 250 f
Homogene Assays XVIII, XXII, 17 f, 49, 138
HPV s. Papillomaviren, humane HTA™-Plate-Technologie 250 f
HTS s. Hochdurchsatz-Screening
Hybridisierung XX, 9, 50 f, 226, 251 f
- Illumina 59 f, 226
Immundiagnostik XV, 14, 32 f, 116 f, 224, 245, 261 f, 304, 315 f
Immunfluoreszenz 98 f, 119 f, 265 f, 306
Immunfluoreszenzmuster 32 f, 98 f
in vitro-Zellassay 184 f
in vitro Kinase-Assays 4 f
Infektionsserologie 228, 245, 308, 315, 320
- Kinasen 4 f, 137, 147 f
- Lab-on-a-chip 227
Labordiagnostik s. Diagnostik
La/SS-B-Antikörper 101 f, 110, 246, 125 f, 271 f, 311, 318
LIA s. Line-Immunoassay
Line-Immunoassay (LIA) 229, 248, 261 f, 304, 315 f
Luminex 7 f, 48 f, 92, 122, 166, 228, 244 f, 304, 308
Luminex xMAP 7 f, 66 f, 166
- Medizinische Diagnostik s. Diagnostik
Microzyme™ 303 f
Mikroarray 3 f, 48 f, 78 f, 237, 250 f, 303
Mikropartikel (s.a. Beads) 48, 85 f, 244 f, 308
Mikrotiterplatten-Reader LF502
NanoScan FLT 20 f, 143
Mischkollagenosen 272
Molecular Beacons 54
Molecular Surface Engineering (MSE) 77 f, 253
Morbus Crohn 268, 277
Multiparameterdiagnostik 223 f, 242 f, 261 f
Multiplex-Arrays XX f, 7 f, 48 f, 175 f, 128 f, 241 f, 308, 313
Mykoplasmen 258
Myositiden, autoimmune (idiopathische) 34, 101 f, 264 f, 315
- Nanopartikel 84 f
Nano-TRF 16 f, 147 f
Neuropathien, autoimmune 229, 269, 281 f
Niedrigdichte Mikroarrays 250
- Oberflächen 77
Oberflächenchemie 250
- Papillomaviren, humane (HPV) 64, 255
Paraneoplastische neurologische Syndrome (PNS) 283
Parodontitisdiagnostik 256
Phosphatasen 147 f
Phospholipid-Antikörper 264, 270, 276, 311

-
- Polymere 77 f, 251 f
Polymyositis s. Myositiden, autoimmune (idiopathische)
Primär biliäre Zirrhose (PBC) 101, 108, 110, 116, 263, 269, 278 f, 306
Primär sklerosierende Cholangitis 278
Proteasen 147
Protein-Mikroarray 4 f, 88 f, 303 f
- Quantendot(s) 16 f, 25, 53, 175
Quenching 17
- Rekombinante Proteine 7, 119, 124, 261 f, 315 f
Reverse Phase Proteinarrays 6 f, 163
Rheumatoide Arthritis (RA) 34, 262 f, 274, 311, 320
ROC-Analyse 166
Ro/SS-A-Antikörper 101 f, 110, 246, 271 f, 307, 311, 318
- Scl-70-Antikörper XXI, 101, 107, 112, 115, 127, 246, 272, 305, 311, 318
Sensoren (Sensorik) XIV f, 147, 225
Signaltransduktion 6, 11, 144
- Sjögren-Syndrom 34, 101, 270, 274, 305
Sklerodermie s. systemische Sklerose
Sm-Antikörper 101, 105, 246, 264, 275, 305, 311, 318
Standardisierung 98
synthetische Peptide 315
Systemische Sklerose 34, 101 f, 224, 265 f, 315, 319
Systemischer Lupus erythematoses (SLE) 34, 101 f, 248, 264 f, 271 f, 306, 318
- Tandem-Assay 148 f
Teratogen 198
Tissue Engineering 32, 186 f
Tumoren 102, 135, 164, 184, 194, 228 f, 270, 278, 283 f, 284
- U1-RNP-Antikörper XXI, 43 f, 101, 105, 115, 246, 271 f, 305, 311, 318
- Vaskularisierte Matrix 181
- Zellmodelle 182, 194
Zellpräparation 32 f