

Aus dem Bereich Onkologie und Rheumatologie

Klinische Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes Homburg/Saar, Klinik für Innere Medizin I

Direktor Prof. Dr. med. Michael Pfreundschuh

**Rheumafaktor und Anti-Cyclin-Citrullinierte Peptid-Antikörper
(A-CCP-AK) im Serum von Patienten mit diffus-großzelligem
B-Non-Hodgkin Lymphom (DLCL) und Multiplem Myelom**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von: Klara Shihadeh

geb. am: 04.04.1986 in Beit Jala (Bezirk Bethlehem)

Erster Berichterstatter und Doktorvater: PD Dr. med. Gunter Aßmann

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	3
2. EINLEITUNG	5
3. MATERIAL UND METHODEN	12
3.1 PATIENTEN	12
3.2 KONTROLLEN	12
3.3 ANTI-RHEUMAFAKTOR- UND ANTI-CCP-ELISA	14
3.3.1 Die Untersuchungsmethode	14
3.3.2 Übersicht über Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	15
3.3.3 Vorbereitung der Serumproben.....	16
3.3.4. Untersuchungsdurchführung.....	16
3.3.5 Auswertung und Titerbestimmung.....	19
3.4. STATISTISCHE ANALYSE.....	21
4. ERGEBNISSE	23
4.1 SEROPRÄVALENZ: DLBCL-PATIENTEN VERSUS KONTROLLEN	23
4.2 GESCHLECHTSSPEZIFISCHE SEROPRÄVALENZ: DLBCL PATIENTEN VERSUS KONTROLLEN	25
4.3 KORRELATION RF-IGM UND A-CCP-IGG BEI DLBCL PATIENTEN VERSUS KONTROLLEN	27
4.4. KRANKHEITSTADIUM UND GESAMTÜBERLEBEN DER DLBCL-PATIENTEN BEI ANTI- CCP-SEROPOSITIVITÄT	27
4.4.1 Subgruppenanalyse der Anti-CCP positiven DLBCL-Patienten.....	28
4.4.2 Subgruppenanalyse der A-CCP-positiven im Vergleich zu den A-CCP- negativen DLBCL-Patienten	29

4.4.3 Gesamtüberleben der A-CCP positiven versus der A-CCP negativen DLBCL-Patienten.....	30
4.5. SEROPRÄVALENZ: MM PATIENTEN VERSUS KONTROLLEN.....	31
5. DISKUSSION	33
5.1 INTERPRETATION UND BEWERTUNG DER IN DIESER STUDIE ERMITTELTEN ERGEBNISSE.	33
5.1.1 Seroprävalenz: DLBCL-Patienten versus Kontrollen.....	33
5.1.2 Korrelation: RF-IgM und A-CCP-IgG bei DLBCL Patienten versus Kontrollen .	36
5.1.3 Seroprävalenz: MM Patienten versus Kontrollen.....	38
5.2 AUSBLICK.....	39
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	40
LITERATURVERZEICHNIS	41
PUBLIKATIONEN.....	47
DANKSAGUNG	48
LEBENS LAUF	49

1. Zusammenfassung

Chronisch entzündlich-rheumatische Erkrankungen, wie die Rheumatoide Arthritis (RA) und das Sjögren-Syndrom, sind mit einem erhöhten Risiko einer Lymphom-Erkrankung assoziiert [1, 2, 3]. Umgekehrt gibt es Hinweise für ein vermehrtes Auftreten autoimmuner Phänomene bei Lymphom-Erkrankungen [2, 3, 10]. Des Weiteren konnten einige Autoimmunmarker, unter anderem der Rheumafaktor (RF) und der Antinukleäre Antikörper (ANA) mit einer erhöhten Frequenz im Serum von Lymphompatienten ohne klinische Manifestation einer rheumatologischen Erkrankung nachgewiesen werden [2, 6, 12, 13]. Der komplizierte Vorgang der Citrullination ist ein ubiquitärer pathophysiologischer Vorgang während der Entzündungsreaktion, für den eine eigenständige pathogenetische Relevanz in der Entwicklung der RA angenommen wird [16, 17, 19]. Gegenstand dieser Studie ist der Nachweis von RF und Anti-Cyclin-Citrullinierte Peptid-Antikörper (A-CCP-AK) bei zwei typischen Lymphom-Erkrankungen im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv.

Dazu untersuchten wir insgesamt 401 Patienten mit diffus-großzelligem B-Non-Hodgkin-Lymphom (DLCL) und 141 Patienten mit Multiplem Myelom nach Ausschluss einer zeitgleich bestehenden rheumatologischen Erkrankung vor antineoplastischer Therapie. Hierbei wurden mittels eines enzymgekoppelten Immunadsorptionstests die Seroprävalenzen der RF-IgM AK niedrig- und hoch-titrig, der RF-IgG AK und der RF-IgA AK wie auch Titer des A-CCP-IgG AK bestimmt. Als Kontrollgruppe fungierten 258 gesunde Probanden. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kreuztabellen und des χ^2 -Tests für zwei unabhängige Stichproben.

Im Vergleich zu den Kontrollgruppen, ergab sich in der Gruppe der DLCL-Patienten kein Unterschied im Nachweis der drei RF-Immunglobulinklassen (RF-IgM, -IgG, -IgA). Für den A-CCP-IgG AK zeigten sich jedoch signifikant höhere Seroprävalenzen. Im DLCL-Patientenkollektiv (3,5% versus 0,8%; $p= 0,030$). Bei der nach Geschlecht getrennten

Subgruppenanalyse war der Unterschied zwischen männlichen Probanden und Patienten noch größer (4.4% versus 0%; $p= 0,018$). In der Gruppe der Multiplem Myelom-Patienten konnte für keinen der drei bestimmten RF Immunglobulinklassen noch für den A-CCP-IgG AK ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe ermittelt werden.

Dieses Ergebnis untermauert zum einen die Hypothese einer Assoziation mit vermehrter Auto-AK-Bildung bei Lymphomen. Die A-CCP-positiven Lymphompatienten zeigten dabei keine Unterschiede in den prognostischen Parametern auf für das DLCBL. Welche pathogenetische Relevanz der A-CCP-Nachweis für die spätere Entstehung einer RA bei Lymphompatienten hat, muss anhand von Langzeitbeobachtungen untersucht werden.

2. Einleitung

Es gibt einen Zusammenhang zwischen dem gehäuften Auftreten von lymphoproliferativer Erkrankungen bei bestimmten entzündlich-rheumatischen Erkrankungen. Laut Goldin et al. wurde diese Assoziation schon seit über 50 Jahren anhand von Fallberichten über Autoimmunerkrankungen, die vor oder während einer Lymphom Erkrankung auftraten, als auch anhand von Tierversuche beschrieben [1]. Es gilt inzwischen als bewiesen, dass unter anderem die Rheumatoide Arthritis (RA), das Sjögren-Syndrom und der systemische Lupus Erythematoses (SLE) mit einem erhöhten Risiko für Lymphome assoziiert sind [1, 2, 3].

Im Falle der RA gibt es diverse Studien, die das erhöhte Risiko lymphoproliferativer Erkrankungen im Vergleich zur Gesamtbevölkerung belegen. Ehrenfeld et al. berichteten von einem 1.5- bis 8.7-fach erhöhten Risiko lymphoproliferativer Erkrankungen [3]. Whelan und Smedby et al. wiesen wiederum ein verdoppeltes Lymphom Risiko bei RA-Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung nach [4, 5]. Zudem wurde ein Zusammenhang gehäufte Lymphomentwicklung mit zunehmender Krankheitsaktivität der RA beschrieben [5, 3, 9].

Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) und Hodgkin-Lymphome sind laut Whelan die wichtigsten Tumorerkrankungen bei Rheumapatienten [4]. Auch für NHL wie das aggressive diffus-großzellige B-NHL (DLCL) wurde in mehreren Studien eine Assoziation mit der RA beschrieben [1, 7, 5]. In einigen Studien wurde weiter ein erhöhtes Risiko für das Multiple Myelom bei RA-Patienten beschrieben, während andere Studien jedoch diesen Zusammenhang bestritten. Whelan beschrieb ein erhöhtes Risiko für Myelome und Leukämien bei RA-Patienten [4]. So fanden Brown et al. sowohl bei Patienten mit Multiplem Myelom als auch bei Patienten mit Monoklonaler Gammopathie unbestimmter signifikanz (MGUS), einer Vorstufe des Multiplen Myeloms, ein um das 1,78-fach erhöhtes Risiko systemischer Autoimmunerkrankungen in der Vorgeschichte; dabei wurden auch die Polymyalgia rheumatica und die perniziöse Anämie untersucht [1, 8]. Laut Anderson et al.

war das erhöhte Multiple Myelom-Risiko jedoch lediglich mit der perniziösen Anämie assoziiert [7].

Die Ursachen solcher Assoziation sind noch weitgehend ungeklärt [3]. Ursächlich wird das Vorhandensein der bei Autoimmunerkrankungen bestehenden chronischen Entzündungsreaktion für die Entwicklung von Lymphome diskutiert. Vermutet werden zudem prädisponierende genetische Faktoren und mögliche Umwelt-Einflüsse für pathogenetische immunregulatorische Mechanismen [1, 6]. Beispielsweise wurden gemeinsame Mutationen im Fas-Gen beschrieben: Mutationen des FAS-Gens können die somatischen Chromosomen als auch die Keimzellbahn betreffen. Im Rahmen von Tierversuche zeigte sich bei Mäusen eine Assoziation sowohl mit dem Auftreten von Autoimmun- als auch mit Lymphomerkkrankungen. Dies konnte auch bei in-vitro Untersuchungen mit humanen Zellen eruiert werden. Pathogenetisch ist dies am ehesten auf eine Beeinträchtigung der Apoptose zurückzuführen [1, 39]. Weiter konnte eine gemeinsame Überexpression des B-Zell-aktivierenden Faktors aus der TNF-Familie (BAFF) gefunden werden [1,40]. Dieser Faktor verlängert das Überleben der B-Zellen [1, 40]. Sowohl bei Patienten mit RA, Sjögrens Syndrom und SLE als auch bei Lymphompatienten, wurde eine vermehrte Produktion dieses Faktors nachgewiesen. Auch in transgenen Mäusen, war dieser Faktor mit ähnlicher Manifestation wie beim Sjögrens Syndrom oder dem SLE assoziiert [1, 47].

Betrachtet man nun die Umkehrung dieser Assoziation, so gibt es Belege dafür, dass auch Lymphom-Patienten ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen, inklusive entzündlicher Gelenkerkrankungen, wie die RA, haben können [10, 3, 2]. Inzwischen untersuchten Brickmann et al. Seren von 107 Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (B-CLL), die klinisch keine Arthritis aufwiesen, aber der Rheumafaktor (RF) in 50% der Seren, der Anti-Cyclin-Citrullinierte Peptid-Antikörper (A-CCP-AK) jedoch in keinem der Seren positiv getestet wurde [26].

Zudem wurden im Falle einer Lymphom-Erkrankung gehäuft autoimmunologische klinische Manifestationen beobachtet. Diese traten sowohl vor, während, als auch nach der Lymphomentwicklung auf und betrafen hauptsächlich Arthritiden/Polyarthritiden, lupus-ähnliche Erytheme oder Myositiden [10]. Die Ursache dieser Manifestationen ist noch weitgehend ungeklärt. Diskutiert werden unter anderem die Bildung von tumorinduzierten Autoantikörper, paraneoplastische Syndrome, direkte Tumorzellinvasion der Gelenke und Muskeln oder Nebenwirkungen einer applizierten Chemotherapie als mögliche Ursachen [2, 3, 10].

Laut Ehrenfeld et al. können diese, in Folge einer lymphoproliferativen Erkrankung auftretenden immunologischen Manifestationen eine Vielzahl von Organen betreffen [3]. Es kommt zu hämatologischen Erkrankungen wie die autoimmun-hämolytische Anämie und Thrombozytopenie bei Lymphompatienten [2, 3, 10, 15]. Das periphere Nervensystem kann z.B. in Form einer Polyneuropathie oder Mononeuritis betroffen sein [3, 15]. Zusätzlich entwickeln die Patienten eine Mono- oder Polyarthritis, eine systemische Vaskulitis oder Myositiden nicht nur bei Lymphomen, sondern bei verschiedenen hämatologischen Neoplasien [3, 10, 15].

Für die nähere Zuordnung der genannten Assoziation erfolgten verschiedene Studien, die verschiedene Autoantikörper, unter anderem den RF und Antinukleäre Antikörper (ANA) mit einer erhöhten Seroprävalenz in Seren von Lymphompatienten nachgewiesen haben. So fanden Guyomard et al. hoch signifikant erhöhte ANA-Seroprävalenzen bei 66 von 347 (19%) NHL-Patienten im Vergleich zu 12 von 213 (5,6%) Kontrollen [12]. Auch Chloraki et al. und Altintas et al. fanden erhöhte ANA-Titer in Seren von Lymphompatienten [6, 13]. Abu-Shakra et al. berichteten desweiteren über den Nachweis von RF in Seren von Multiplem Myelom-Patienten [2], während Hardiman et al. zuvor keine erhöhte Prävalenz von RF- oder

der ANA-Titer in Seren von Patienten mit Multiplem Myelom oder MGUS im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektive nachgewiesen hatte [14].

Die RF und der ANA, welche bereits im Rahmen der obengenannten Studien in Seren von Lymphom-Patienten bestimmt wurden, sind Autoantikörper, welche in der Diagnostik der RA und Kollagenosen routinemäßig eingesetzt werden.

Die RF sind Autoantikörper gegen das FC-Fragment des IgG [11]. Sie können verschiedener IgG-Klassen zugehören, üblicherweise wird jedoch der RF-IgM in der RA-Diagnostik bestimmt. Song et al entsprechend ist dieser in ca. 60-80% aller RA-Fälle positiv [11], nach anderen Studien in 50-80% der Fälle positiv [41]. Der RF ist jedoch mit einer mittleren Spezifität von 81% nicht RA-spezifisch [16, 41]. Niedrig positive Titer werden z. B. auch beim Sjögren-Syndrom, bei Kollagenosen, und chronischen Infektionskrankheiten, wie z.B. der Hepatitis C gefunden [11, 16, 41]. Zudem können niedrig positive Titer auch bei klinisch Gesunden und vermehrt im höheren Lebensalter nachgewiesen werden [11, 41]. Diese sind jedoch meist multireaktive, sich an verschiedene Antigene bindende AK, im Gegensatz zu den spezifisch gegen das FC-Fragment des IgG gerichteten Auto-AK im Falle der RA. Sie sind auch durch eine niedrige Affinität charakterisiert [11]. Die Spezifität des RF für die RA steigt allerdings bei höheren Titern (RF IgM >50 IU/ml) und ist relativ hoch für die IgA-Subtypen [11].

Der ANA wurde laut Nishimura et al. bei 37,5% der RA-Patienten gefunden. Die Prävalenz stieg mit zunehmender Schwere und Dauer der Erkrankung an [30]. Laut Yukawa et al. konnten hochpositive ANA-Titer (> 1:160) bei 25% der RA-Patienten vor Therapiebeginn festgestellt werden [31].

Die A-CCP-AK sind Autoantikörper gegen citrullinierte Proteine, welche im Gegensatz zum RF schon bis zu 14 Jahren vor Krankheitsbeginn einer RA nachgewiesen werden können [16, 18]. Dabei können sie gegen verschiedene citrullinierte Proteine unter anderem gegen

citrulliniertes (mutiertes) Vimentin, citrulliniertes Fibrinogen, citrulliniertes Typ-II Kollagen und citrullinierter α -Enolase gerichtet sein [16, 18]. Routinemäßig werden jedoch synthetisch hergestellte zyklische citrullinierte Peptide im sogenannten anti-CCP-Test in der RA-Diagnostik benutzt [16, 17, 18, 43].

Die Sensitivität der A-CCP-AK ist geringer als der des RF-IgM. Sie sind jedoch hochspezifisch für die RA. Surrmond et al. weisen bis ca. 70% der Patienten mit RA positive Titer auf, während Sie in weniger als 1% der Normalbevölkerung nachgewiesen werden können [29]. Laut Schellekens et al. liegt die Spezifität der A-CCP-AK bei 98% [41]. Des Weiteren, konnten A-CCP-AK in Seren von bis zu 35-40% der RF-negativen Patienten nachgewiesen werden [17, 41].

Die Citrullination an sich ist jedoch ein physiologischer, nicht RA-spezifischer Vorgang, der z.B. auch während der Keratinisierung der Haut oder bei der Genregulation durch Histonmodifikation vorkommt [16, 42]. Die Citrullination findet vor allem während der Zell-Apoptose statt. Hauptsächlich jedoch können Citrullinierte Proteine in entzündlich veränderten Geweben nachgewiesen werden [17, 42, 44]. Bongartz et al. berichteten, dass citrullinierte Proteine sowohl im pulmonalen Gewebe der RA-assoziierten als auch der idiopathischen interstitiellen Pneumonie nachgewiesen wurden [44]. Auch durch Nikotinkonsum, kann die Citrullination von Proteinen in der Lunge induziert werden [19, 45].

Bei dem Vorgang der Citrullination erfolgt eine Deaminierung der Aminosäure Arginin eines Proteins in die Aminosäure Citrullin, wobei eine endständige positive geladene Aminogruppe des Arginins durch das Enzym Peptidylargininendiminase (PADI) abgespalten wird. Dadurch wird das ursprünglich an dieser Stelle positive geladene Protein neutral geladen, in deren Folge eine Veränderung seiner Tertiärstruktur und seiner Intra- und Intermolekularen Wechselwirkungen auftritt [16, 42, 43, 45].

Die Bestimmung von A-CCP-AK in Seren von Lymphompatienten ist vor folgendem Hintergrund zu sehen: wie bereits erwähnt weisen Studien vermehrt erhöhten RF in Seren von Lymphompatienten nach, ohne dass eine pathogenetische Relevanz weder für die Lymphomkrankung noch für die RA nachgewiesen werden konnte. Zunächst liegt die Vermutung nahe, dass es sich um ein unspezifisches Epiphenomen einer lymphoproliferativen Erkrankung mit polyklonalen Auto-AK handeln kann. Mit der Untersuchung von A-CCP-AK im Serum von Lymphompatienten in Korrelation mit den Rheumafaktoren können Hinweise herausgearbeitet werden, ob sich gehäuft „rheumatologisch“ relevante Auto-AK entwickeln [2]. Auf der einen Seite ist die Citrullination zwar ein ubiquitärer nicht spezifisch rheumatologischer Vorgang [16, 44, 45]. Auf der anderen Seite existiert die bestehende Hypothese, dass der A-CCP-AK eine eigenständige pathogenetische Potenz in der Entstehung der RA haben könnte. Diese Hypothese wurde bereits durch einige Untersuchungen untermauert, die nachgewiesen haben, dass A-CCP-AK schon viele Jahre vor der RA-Krankheitsmanifestation als prädisponierender Faktor nachgewiesen werden konnten. Sie können somit in der Frühphase der Entstehung beteiligt sein und nicht nur als Folge der RA auftreten [16, 19]. Derartige Untersuchungsergebnisse werfen die Frage auf, ob Seropositivität für RF zusammen mit A-CCP-AK bei Lymphompatienten nur ein unspezifisches paraneoplastisches Autoimmunphänomen sind, oder ob sie krankheitsspezifische Relevanz für den Krankheitsverlauf und der Entwicklung einer rheumatologischen Zweiterkrankung bei Lymphompatienten haben.

Unterstützt werden solche Überlegungen dadurch, dass Hinweise im Mausmodell gewonnen werden konnten, indem früh im Verlauf einer Kollagen-induzierten Arthritis A-CCP-AK gebildet wurden, die gegen verschiedene citrullinierte Proteine, unter anderem auch gegen das citrullinierte Vimentin, gerichtet waren. Zusammen mit den Anti-Kollagen-AK waren sie direkt an der Initiierung der Gelenkentzündung beteiligt [16, 45]. Laut Klareskog et al. trugen

auch AK gegen citrulliniertes Fibrinogen zur Arthritisentwicklung im Mausmodell bei [19]. Klareskog et al. entsprechend können auch verschiedene unspezifische Stimuli eine Citrullination von Proteine und Peptide im Synovialgewebe induzieren [19]. Des Weiteren berichteten Klareskog et al. darüber, dass Nikotinkonsum als gesicherter Risikofaktor für die RA die Citrullination von Proteinen in den Lungen induzieren konnte und möglicherweise auf diesem Weg der A-CCP-positiven Synovitis bei RA Vorschub leistet [19].

Gegenstand dieser Studie ist die Autoimmundiagnostik mit RF und A-CCP-AK bei zwei typischen Lymphomerkkrankungen im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv mit dem Ziel, die gehäufte Assoziation vermehrter RA-spezifischer Auto-AK-Bildung bei Lymphomen zu untersuchen. Hierzu werden Serum-Titer der verschiedenen RF-Immunglobulinklassen, RF-IgM, -IgG, und -IgA AK und Titer des A-CCP-IgG AK in Seren von Patienten mit diffus großzelligem B-NHL (DLCL) und Multiplem Myelom untersucht. Anschließend erfolgt die Subgruppenanalyse nach Geschlecht sowie der Abgleich von A-CCP-Seropositivität mit dem Krankheitsverlauf der untersuchten Patienten mit DLCL.

3. Material und Methoden

3.1 Patienten

An dieser Studie nahmen insgesamt 401 Patienten mit DLCBL und 141 Patienten mit Multiplem Myelom teil. Die DLCBL-Patienten-Seren stammten vorwiegend aus der NHL B98 Studie [36] an der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums des Saarlandes zwischen 1993-2000. Die Multiple Myelom-Patienten waren in der stationären und ambulanten Betreuung der Inneren Medizin I zwischen 2003-2008 gewesen.

Einschlusskriterium für die Patienten war die Diagnose eines DLCBL oder eines Multiplen Myeloms, jeweils mit histologischer Sicherung. Zudem wurden die Seren der Patienten vor antineoplastischer Therapie herangezogen. Außerdem durfte bei den Patienten gemäß den vorliegenden Krankenakten keine RA bestehen. 6 DLCBL-Patienten mussten aufgrund der Sicherung der Diagnose einer RA (laut der ACR-Kriterien) ausgeschlossen werden. Bei 65 DLCBL-Patienten war das Geschlecht nicht bekannt, diese konnten bei der Bestimmung der geschlechtsspezifischen Seroprävalenzen (siehe 4.2) nicht mitberücksichtigt werden.

Tabelle 1a zeigt die Anzahl, den Mittelwert des Alters, den Median und die prozentuale Geschlechtsverteilung der Patienten.

3.2 Kontrollen

Es konnten insgesamt 258 gesunde Kontrollen im Zeitraum von 2007-2008 für Serenbestimmungen gewonnen werden. Hiervon waren 104 in der Inneren Medizin I und in der Orthopädischen Klinik am Universitätsklinikum des Saarlandes vorstellig gewesen. Die weiteren 154 gesunden Blutspenden stammten aus der Abteilung der Hämostaseologie und der orthopädischen Klinik des Universitätsklinikums des Saarlandes.

Bei allen Kontrollpatienten war sowohl eine Lymphomerkkrankung als auch eine RA nach anamnestischen und klinischen Kriterien ausgeschlossen wurden.

Bezüglich der Altersverteilung der Kontrollen zeigte sich mittels des „Mann-Whitney-Tests“ kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den DLCBL-Patienten [p= 0,192], die Multiple Myelom-Patienten waren jedoch im Durchschnitt 7,3 Jahre älter als die gesunden Kontrollen [p= 0,001]. Im Hinblick auf die Geschlechtsverteilung gab es bei den Kontrollen mehr männliche Personen als im untersuchten Patientenkollektiv der DLCBL-Patienten, [p= 0,038]. Bei den Multiple Myelom-Patienten gab es keine geschlechtsbezogenen Häufigkeitsunterschiede [p-Wert= 0,202].

Subgruppe	Anzahl	Alters- Mittelwert (J)	Alters- Median (J)	Geschlecht (%)	
				m	w
DLBCL	395	59,1	61	55,2	44,8
MM	141	64,5	65	53,2	46,8

Tabelle 1a. Demographische Daten der Patienten

DLBCL: diffuse-großzelliges B-Non-Hodgkin Lymphom, MM: Multiples Myelom, J: Jahre

Anzahl	Alters- Mittelwert (J)	Alters- Median (J)	Geschlecht (%)	
			m	w
258	57,8	57	46,5	53,5

Tabelle 1b. Demographische Daten der Kontrollpatienten

J: Jahre

3.3 Anti-RF- und A-CCP-ELISA

3.3.1 Die Untersuchungsmethode

Der Nachweis der Anti-RF-AK (IgM, IgA bzw. IgG) und der A-CCP-AK (IgG) in den Blutserumproben der Patienten und Kontrollen erfolgte durch den enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA). Dabei wurde eine mit dem Fc-Fragment von IgG, das spezifische Antigen gegen dessen die RF gebildet werden, bzw. die mit synthetischen cyclischen citrullinierten Peptiden beschichtete Mikrotiterplatte mit den jeweiligen Serumproben inkubiert. Mit dieser Versuchsanordnung konnte im Falle AK-positiver Proben eine Antigen-Antikörper Reaktion stattfinden. Anschließend wurde ein Enzym-markierter Zweitantikörper (Peroxidase-markiertes Anti-Human-IgM, -IgA bzw. -IgG) appliziert, der wiederum an den gebildeten Antigen-Antikörper Komplex binden konnte. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Platte mit einem Waschpuffer gespült. Dieser Waschvorgang diente der Entfernung nicht spezifisch gebundener Antikörper und damit der Vermeidung unspezifischer Reaktionen. Nach dem letzten Waschschrift wurde ein Substrat dazu gegeben, welches von dem Peroxidase-markiertem AK in ein Farbprodukt umgewandelt wurde. Diese Farbreaktion wurde nach einer festgelegten Zeit wieder unterbrochen. Die Farbdichte ist von der Menge des gebundenen Antikörpers abhängig und erlaubt nach Kalibrierung anhand von positiven und negativen Kontrollen Rückschlüsse auf die Konzentration der A-CCP-AK in der jeweiligen Probe. Siehe Abbildung Kalibrierungsschema 3.3.5. Das Verfahren erfolgt nach einem standardisierten Protokoll mit dem kommerziell erwerbbaeren AK-Set von EUROIMMUN [21, 22, 23, 24, 25].

3.3.2 Übersicht über Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Die zur Ausführung des Anti-Rheumafaktor-ELISA (IgM, IgA bzw. IgG) und des Anti-CCP-ELISA (IgG) verwendeten Testsätze sind samt Reagenzien in Tabelle 2 dargestellt [22, 23, 24, 25].

ELISA Testsatz	Reagenzien und Materialien
Euroimmun Anti-RF-ELISA (IgM, IgA bzw. IgG)	Antigen-beschichtete Reagenzgefäße
	Kalibratoren 1 bis 3: 200, 20, 2 RE/ml (IgM, IgA bzw. IgG human)
	Kontrolle Positive und Negative (IgM, IgA bzw. IgG human)
	Enzymkonjugat (peroxidase-markiertes Anti-Human-IgM, -IgA, bzw. -IgG)
	Probenpuffer
	Waschpuffer 10 fach konzentriert
	Chromogen/Substrat Lösung (TMB/H ₂ O ₂)
	Stopplösung (0,5 M Schwefelsäure)
Euroimmun Anti-CCP-ELISA (IgG)	Antigen-beschichtete Reagenzgefäße
	Kalibratoren 1 bis 5: 1, 5, 20, 100, 200 RE/ml (IgG, human)
	Kontrolle Positive und Negative (IgG, human)
	Enzymkonjugat (peroxidase-markiertes Anti-Human-IgG)
	Probenpuffer
	Waschpuffer 10 fach konzentriert
	Chromogen/Substrat Lösung (TMB/H ₂ O ₂)
	Stopplösung (0,5 M Schwefelsäure)

Tabelle 2. Übersicht über verwendete Materialien und Reagenzien

RF: Rheumafaktor, Anti-CCP: Anti-Cyclin-Citrulliniertes Peptid, ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay, IgA: Immunglobulin A, IgG: Immunglobulin G, IgM: Immunglobulin M

3.3.3 Vorbereitung der Serumproben

Die Serumproben der DLCBL-Patienten und ein Großteil derjenigen der Multiplen Myelom-Patienten und gesunden Kontrollen waren an der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums des Saarlandes vorhanden. Dabei handelte es sich um Seren von Blut-Proben, die für die NHL B98 Studie gemäß Studienprotokoll vor und unter Therapie gesammelt wurden. Die Seren der Myelom-Patienten wurden sukzessive für die Jahre 2005-2008 gesammelt. Weitere Proben für das gesunde Kontrollkollektiv wurden in der Ambulanz und auf den Stationen der Inneren Medizin I und in der Orthopädischen Klinik des Universitätsklinikums des Saarlandes in Serumröhrchen abgenommen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 1000 bis 1500g und einer Drehzahl von 4000 U/min für die Dauer von 5 Minuten. Sofort danach wurde der Serumüberstand mittels Einmal-Plastikpipetten abpipettiert. Die Lagerung aller Serum-Proben erfolgte bei -20°C.

Für die Anti-RF- und Anti-CCP-ELISA Verfahren wurden Verdünnungen der Serumproben benötigt. Dazu wurden die gelagerten Proben bei Raumtemperatur (+18°C bis +25°C) aufgetaut und anschließend für das Anti-RF-ELISA (IgM, IgA, bzw. IgG) im Verhältnis von 1:201 (5µl Probe in jeweils 1,0 ml Probenpuffer) und für das Anti-CCP-ELISA (IgG) im Verhältnis von 1:101 (10µl Probe in jeweils 1,0 ml Probenpuffer) mit Probenpuffer nach standardisiertem Protokoll verdünnt [22, 23, 24, 25].

3.3.4. Untersuchungsdurchführung

In einem ersten Schritt wurden jeweils 100µl der Positiv- und Negativ-Kontrollen, der verdünnten Serumproben und für den Anti-RF-ELISA der Kalibratoren 1 bis 3 bzw. für den Anti-CCP-ELISA der Kalibratoren 1 bis 5, entsprechend dem in der Herstelleranleitung beigefügten Pipettierschema in die einzelnen Reagenzgläser pipettiert.

Nach 30-minütiger Inkubation im Falle des Anti-RF-ELISA bzw. nach 60-minütiger Inkubation im Falle des Anti-CCP-ELISA bei Raumtemperatur (+18°C bis +25°C) erfolgten unter Verwendung eines Mehr-Kanal-Waschgerätes drei Waschschrte mit je 450 µl des zuvor im Verhältnis von 1 zu 9 mit destilliertem Wasser verdünnten Waschpuffers. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit den Öffnungen nach unten kräftig auf Fließpapier ausgeschlagen, um Waschpufferreste zu entfernen.

In einem weiteren Schritt erfolgte die Inkubation mit jeweils 100µl Enzymkonjugat (Peroxidase-markiertes Anti-Human-IgM bzw. -IgA bzw. -IgG). Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (+18°C bis +25°C) erfolgten erneut die oben beschriebenen Waschschrte.

In einem letzten Schritt wurden die Reagenzgefäße mit jeweils 100 µl Chromogen/Substrat-Lösung bei Raumtemperatur (+18°C bis +25°C) inkubiert. Nach 15 Minuten im Falle des Anti-RF-ELISA (IgM, IgA, bzw. IgG) bzw. nach 30 Minuten im Falle des Anti-CCP-ELISA (IgG) wurden die Farbreaktionen durch Zugabe von jeweils 100 µl einer Stopplösung beendet.

Eine kurze Übersicht über die Untersuchungsdurchführung gibt das Verfahrensschema in Tabelle 3.

	Arbeitsschritt	Reagenz	Menge	Zeit
1	Verdünnungs-herstellung	Serumproben	Für den Anti-RF-ELISA: 1: 201 (5 µl Probe: 1,0 ml Puffer)	
			Für den Anti-CCP-ELISA: 1: 101 (10µl Probe: 1,0 ml Puffer)	
2	Serum-inkubation	Serum und Kontrollen	100 µl je Reagenzgefäß	Anti-RF-ELISA: 30 Min. bei 18-25°C
				Anti-CCP-ELISA: 60 Min. bei 18-25°C
3	Waschschritt 1	1: 9 (Waschpuffer : destilliertes Wasser)	3x waschen jew. 450 µl	jew. 30-60 Sec.
4	Konjugat-inkubation	Peroxidase-markiertes Anti-Human -IgM, -IgA bzw. -IgG	100 µl je Reagenzgefäß	30 Min bei 18 -25°C
5	Waschschritt 2	1: 9 (Waschpuffer : destilliertes Wasser)	3x waschen jew. 450 µl	jew. 30-60 Sec.
6	Substrat-inkubation	Chromogen/ Substrat Lösung	100µl	Anti-RF-ELISA: 15 Min bei 18-25 °C
				Anti-CCP-ELISA: 30 Min bei 18-25 °C
7	Beendigung der Farbreaktion	Stopplösung	100µl	

Tabelle 3. Verfahrensschema zur Untersuchungsdurchführung

RF: Rheumafaktor, Anti-CCP: Anti-Cyclin-Citrulliniertes Peptid, ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay, IgA: Immunglobulin A, IgG: Immunglobulin G, IgM: Immunglobulin M

3.3.5 Auswertung und Titerbestimmung

Zur Ermittlung der Antikörperkonzentration der einzelnen Proben erfolgte die photometrische Auswertung der Farbintensität bei 450 nm Meßwellenlänge und einer Referenzwellenlänge zwischen 620 nm und 650 nm. Anschließend wurde computergesteuert eine Standardkurve durch Auftragen der gemessenen Extinktionen für die Kalibratoren 1 bis 3 gegen die entsprechenden Konzentrationen in den Serumproben (linear/linear) im Falle des Anti-RF-ELISA (s. Abbildung 1a) bzw. durch Auftragen der gemessenen Extinktionen für die Kalibratoren 1 bis 5 gegen die entsprechenden Konzentrationen der Proben (linear/logarithmisch) im Falle des Anti-CCP-ELISA erstellt (s. Abbildung 1b).

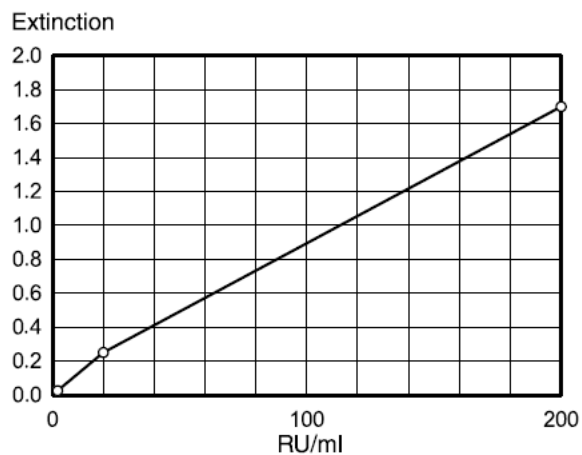


Abbildung 1a: Kalibrierungskurve Anti-RF-ELISA [22, 23, 24]

RF: Rheuma Faktor, ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

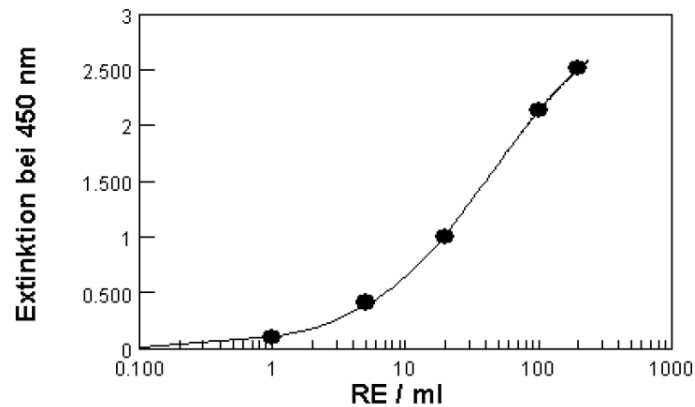


Abbildung 1b: Kalibrierungskurve Anti-CCP-ELISA [25]

Anti-CCP: Anti-Cyclin-Citrulliniertes Peptid, ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Da für den Nachweis der RF bzw. der A-CCP-AK kein internationales Referenzserum existiert, wurden die Ergebnisse in Form einer Ratio angegeben, welche ein relatives Maß für die Konzentration der AK im Serum darstellt.

Der empfohlene obere Grenzwert des Normalbereichs (Cut-off) beträgt für die RF-IgA und -IgG jeweils 20 Relative Einheiten (RE)/ml. Dem entsprechend wurden die Proben mit einer Ratio < 20 RE/ml als negative und diejenigen mit einer Ratio ≥ 20 Relative Einheiten (RE)/ml als positive interpretiert. Bezüglich des RF-IgM galt das Testergebnis als niedrig positive bei einem Titer von 50-100 RE/ml und als hochpositive bei einem Titer $> 100-200$ RE/ml.

Für das A-CCP-IgG liegt der Cut-off bei 5 Relative Einheiten (RE)/ml. Somit wurden diejenigen Proben mit einer Ratio ≤ 5 RE/ml als negative und diejenigen mit einem Ratio $> 5-200$ Relative Einheiten (RE)/ml als positive gewertet [25].

In Tabelle 4 sind die Grenzwerte der Titerauswertung nochmal zusammengefasst [22, 23, 24, 25].

Antikörper	Titer	Antikörper-Nachweis
RF-IgM	<50 RE/ml	Negative
	50-100 RE/ml	Niedrig positive
	>100-200 RE/ml	Hochpositive
RF-IgA	<20 RE/ml	Negative
	≥20 RE/ml	Positive
RF-IgG	<20 RE/ml	Negative
	≥20 RE/ml	Positive
Anti-CCP-IgG	≤ 5 RE/ml	Negative
	> 5-200 RE/ml	Positive

Tabelle 4. Titerauswertung

RF: Rheumafaktor, Anti-CCP: Anti-Cyclin-Citrulliniertes Peptid, IgA: Immunglobulin A, IgG: Immunglobulin G, IgM: Immunglobulin M

3.4. Statistische Analyse

Die durch ELISA Verfahren ermittelten Seroprävalenzen der RF und der A-CCP-AK in den Patientenseren wurden statistisch im Programms SPSS mittels Kreuztabellen und des X^2 -Tests hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz im Vergleich zum gesunden kontrollkollektive analysiert. Bei kleineren Fallzahlen wurde der exakte Test nach Fischer verwendet. Das Signifikanz-Niveau (p) wurde auf <5% festgelegt.

Die Überprüfung der Kontroll- und Patienten Gruppen auf Gleichverteilung des Alters erfolgte im Programm SPSS mittels des „Mann Whitney Tests“. Für die Überprüfung der Gleichverteilung des Geschlechtes wurden Kreuztabellen und der X^2 -Test verwendet. Das Signifikanzniveau (p) lag bei <5%.

Die Subgruppenanalyse der Patienten mit DLCBL nach Erkrankungsalter, Krankheitsstadium, Allgemeinzustand (ECOG), LDH-Erhöhung und BSG wurde ebenfalls nach dem Mann Whitney Test für A-CCP- positive und -negative vorgenommen.

Das overall survival für A-CCP-positive im Vergleich zu A-CCP-negative Lymphompatienten erfolgt nach Kaplan Meyer Testung (Log Rank, Mantel Cox).

4. Ergebnisse

4.1 Seroprävalenz: DLCBL-Patienten versus Kontrollen

Vergleicht man die Testergebnisse der DLCBL-Patientenserum mit denen der Kontrollgruppe, so ist festzustellen, dass für keinen der drei bestimmten RF Immunglobulinklassen [RF-IgM, -IgG, -IgA) eine erhöhte Seropositivität bei Lymphompatienten als in der jeweiligen Kontrollgruppe ermittelt werden konnte. Für den A-CCP-IgG AK zeigten sich jedoch signifikant höhere Seroprävalenzen in der Gruppe der DLCBL-Patienten im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv.

In der Gruppe der DLCBL-Patienten waren 90 von 395 (22,8%) seropositiv für den RF-IgM (Titer ≥ 50 RE/ml) im Vergleich zu 57 der 258 (22,1%) gesunden Kontrollen. Dies ergab mit einem P-Wert von 0,836 keine statistische Signifikanz.

Da der RF in einigen Fällen auch bei gesunden im steigenden Alter zunehmend niedrigpositiv ist [11], betrachteten wir die Ergebnisse der RF-IgM Titer aufgeschlüsselt nach niedrig positiven (50-100 RE/ml) und hochpositiven Titer (>100 -200 RE/ml). Dabei zeigten 29 der 395 (7,3%) DLCBL-Patienten niedrig positive Titer im Vergleich zu 16 der 258 (6,2%) gesunden Kontrollen. Hochpositive RF-IgM Titer ließen sich bei 61 der Patienten (15,4%) im Vergleich zu 41 der gesunden Kontrollen (15,9%) nachweisen. Der p-Wert lag mit 0,850 hier auch oberhalb des Signifikanzniveaus.

Für den RF-IgA wiesen 59 von 392 (15,1%) DLCBL-Patienten im Vergleich zu 28 der 223 gesunden Kontrollen (12,6%) positive Titer (≥ 20 RE/ml) auf. Positive RF-IgG Werte (≥ 20 RE/ml) ließen sich bei 11 von 392 (2,8%) DLCBL-Patienten im Vergleich zu 4 der 223 (1,8%) gesunden Kontrollen nachweisen. Die Unterschiede für RF-IgA und RF-IgG markieren nur einen Trend ohne signifikanten Unterschied.

Von den 395 DLCBL-Patienten wiesen mit 14 (3,5%) Patienten signifikant vermehrt positive A-CCP-AK Titer (> 5-200 RE/ml) als die gesunden Kontrollen (2 der 249, 0,8%, p= 0,030).

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der RF- und A-CCP-AK Seroprävalenzen der DLCBL-Patientengruppe und der jeweiligen Kontrollgruppe nochmal gegenübergestellt.

	DLCBL-Patienten			Kontrollen			P-Wert	Sig.
	Gesamt - zahl	Anzahl Pos.	(%)	Gesamt - zahl	Anzahl Pos.	(%)		
RF-IgM-pos. (≥50 RE/ml)	395	90	22,8	258	57	22,1	0,836	n.s. ¹
RF-IgM-niedrig-pos. (50-100 RE/ml)	395	29	7,3	258	16	6,2	0,850	n.s. ¹
RF-IgM-hoch-pos. (>100-200 RE/ml)	395	61	15,4	258	41	15,9		
RF-IgA-pos. (≥20 RE/ml)	392	59	15,1	223	28	12,6	0,393	n.s. ¹
RF-IgG-pos. (≥20 RE/ml)	392	11	2,8	223	4	1,8	0,434	n.s. ¹
A-CCP-IgG-pos. (>5-200 RE/ml)	395	14	3,5	249	2	0,8	0,030	s. ²

Tabelle 5. Gegenüberstellung der RF- und A-CCP Seroprävalenzen der DLBCL-Patienten mit derjenigen der gesunden Kontrollgruppe

¹n.s. = nicht signifikant, entspricht Signifikanzniveau $p > 0,05$, ²s. = signifikant, entspricht Signifikanzniveau $p \leq 0,05$, Odds-ratio: 1.028, CI (Konfidenzintervall): 1,005-1,051, DLCBL: diffus-großzelliges B-Non-Hodgkin-Lymphom, RF: Rheumafaktor, A-CCP: Anti-Cyclin-Citrulliniertes Peptid, IgA: Immunglobulin A, IgG: Immunglobulin G, IgM: Immunglobulin M, Sig.: Signifikanz, pos.: positive

4.2 Geschlechtsspezifische Seroprävalenz: DLCBL- Patienten versus

Kontrollen

Im Hinblick auf das Geschlecht gab es, wie bereits im Kapitel 3.2 dargestellt, zwischen den Kontrollen und den DLCBL-Patienten Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung. Demzufolge wurde für alle untersuchten Auto-AK eine geschlechtsgetrennte Aufschlüsselung der Ergebnisse der DLCBL-Patienten im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv vorgenommen.

Die Analyse der RF-Seroprävalenzen nach Geschlecht der DLCBL-Patienten aufgeschlüsselt ergab sowohl für die Gruppe der männlichen als auch für die Gruppe der weiblichen Patienten für keinen der drei RF Immunglobulinklassen (RF-IgM, -IgA, -IgG) eine signifikant unterschiedliche Seropositivität als in der jeweiligen Kontrollgruppe.

Tabelle 6 zeigt die einzelnen Häufigkeiten der getrennten Seropositivität der untersuchten Auto-AK nach männlichen und weiblichen Untersuchungsgruppen auf.

Bei dem Vergleich der Häufigkeit des Auftretens des A-CCP-IgG, ließen sich positive Titer in Seren von 8 der 182 männlichen DLCBL-Patienten (4,4%) dahingegen bei 0 der 116 gesunden männlichen Kontrollen (0,0%) nachweisen [exakter Test nach Fischer= 0,022]. In der Gruppe der 148 weiblichen DLCBL-Patientinnen konnten desweiteren 5 positive Titer (3,4%) verglichen mit 2 der 133 weiblichen gesunden Kontrollen (1,5%) bestimmt werden [exakter Test nach Fischer= 0,203].

Somit zeigten sich signifikant höhere Seroprävalenzen des A-CCP-IgG in der Gruppe der männlichen Patienten. Bei weiblichen DLCBL-Patienten ergaben sich lediglich tendenziell vermehrt erhöhte A-CCP-AK-Titer im Vergleich zum gleichgeschlechtlichen Kontrollkollektiv. (3,4 versus 1,5%, $p= 0,270$).

	M / W	DLBCL Patienten			Kontrollen			P- Wert	Sig.
		Gesamt - zahl	Anzahl Pos.	%	Gesamt - zahl	Anzahl Pos.	%		
RF-IgM-pos. ≥50 RE/ml	M	182	40	22	120	26	21,7	0,949	n.s. ¹
	W	148	37	25	138	31	22,5	0,615	n.s. ¹
RF-IgM-niedrig-pos. 50-100 RE/ml	M	182	9	4,9	120	4	3,3	0,776	n.s. ¹
RF-IgM-hoch-pos. > 100-200RE/ml		182	31	17,0	120	22	18,3		
RF-IgM-niedrig-pos. 50-100 RE/ml	W	148	14	9,5	138	12	8,7	0,879	n.s. ¹
RF-IgM-hoch-pos. > 100-200RE/ml		148	23	15,5	138	19	13,8		
RF-IgA-pos. ≥20 RE/ml	M	180	31	17,2	109	12	11,9	0,150	n.s. ¹
	W	148	21	14,2	114	16	14,0	0,972	n.s. ¹
RF-IgG- pos. ≥20 RE/ml	M	180	7	3,9	109	1	0,9	0,129	n.s. ¹
	W	148	3	2,0	114	3	2,6	0,529	n.s. ¹
A-CCP-IgG-pos. >5-200 RE/ml	M	182	8	4,4	116	0	0,0	0,022	s. ²
	W	148	6	3,4	133	2	1,5	0,203	n.s. ¹

Tabelle 6. Gegenüberstellung der geschlechtsspezifischen RF- und A-CCP Seroprävalenzen der DLBCL Patienten mit derjenigen der gesunden Kontrollgruppe

¹n.s. = nicht signifikant, entspricht Signifikanzniveau $p > 0,05$, ²s. = signifikant, entspricht Signifikanzniveau $p \leq 0,05$. Odds-ratio: 1,046. CI (Konfidenzintervall): 1,014-1,079. X^2 -Test für 2 unabhängige Stichproben. DLBCL: diffus-großzelliges B-Non-Hodgkin-Lymphom, RF: Rheumafaktor, A-CCP: Anti-Cyclin-Citrulliniertes Peptid, IgA: Immunglobulin A, IgG: Immunglobulin G, IgM: Immunglobulin, Sig.: Signifikanz, pos.: positive

4.3 Korrelation RF-IgM und A-CCP-IgG AK bei DLCBL-Patienten versus

Kontrollen

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Häufigkeiten des Auftretens beider Antikörper (A-CCP-IgG und RF-IgM) zu untersuchen, wurden die Ergebnisse des A-CCP-IgG Antikörpers in der Gruppe der DLCBL-Patienten nach RF-IgM positiv und negativ getrennt dargestellt.

Von den 90 RF-IgM positiven DLCBL-Patienten zeigten 7 Patienten positive A-CCP-AK Titer, während keine der 57 RF-IgM positiven Kontrollen positive A-CCP-Titer aufwiesen (7,8% versus 0,0%, $p = 0,043$). Von den 305 RF-IgM negativen DLCBL-Patienten waren 7 (2,3%) A-CCP-IgG positiv verglichen mit 2 der 192 (1,0%) RF-IgM negativen gesunden Kontrollen [$p = 0,493$] in Tabelle 7.

RF-IgM (+)							
DLCBL-Patienten			Gesunde Kontrollen				
Gesamt-zahl	Anzahl (+) A-CCP-IgG	% A-CCP-IgG (+)	Gesamt-zahl	Anzahl (+) A-CCP-IgG	% A-CCP-IgG (+)	P-Wert	Sig.
90	7	7,8%	57	0	0,0%	0,043	s.2
RF-IgM (-)							
DLCBL-Patienten			Gesunde Kontrollen				
Gesamt-zahl	Anzahl (+) A-CCP-IgG	% A-CCP-IgG (+)	Gesamt-zahl	Anzahl (+) A-CCP-IgG	% A-CCP-IgG (+)	P-Wert	Sig.
305	7	2,3	192	2	1,0	0,493	n.s.1

Tabelle 7. Seroprävalenz A-CCP-IgG nach RF-IgM aufgeschlüsselt

¹n.s. = nicht signifikant, entspricht Signifikanzniveau $p > 0,05$, ²s. = signifikant, entspricht Signifikanzniveau $p \leq 0,05$. χ^2 -Test für 2 unabhängige Stichproben.

DLBCL: diffus-großzelliges B-Non-Hodgkin-Lymphom, RF: Rheumafaktor, A-CCP: Anti-Cyclin-Citrulliniertes Peptid, IgM: Immunglobulin M, Sig.: Signifikanz

4.4. Krankheitsstadium und Gesamtüberleben der DLCBL-Patienten bei Anti-CCP-AK Seropositivität

4.4.1 Subgruppenanalyse der Anti-CCP-positiven DLCBL-Patienten

Des Weiteren erfolgte eine Subgruppenanalyse der Anti-CCP-positiven DLBCL-Patienten im Hinblick auf folgende prognostische Parameter: das Erkrankungsalter, dem Erkrankungsstadium, dem Index zur Lebensqualität der Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG), dem Lactatdehydrogenase-Wert (LDH) und der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG). Im Folgenden erfolgt in Tabelle 8 eine Darstellung der einzelnen Daten für die 14 A-CCP-positiven Lymphompatienten.

Patient	Erkrankungs- alter	Stadium	ECOG	LDH ↑, ↓	BSG	Anti-CCP-Wert
1	58	2	≤ 1	↓	- 01	5,7
2	56	3	≤ 1	↓	03	5,8
3	55	1	≤ 1	↓	-01	5,8
4	54	2	≤ 1	↓	01	7,8
5	72	2	≤ 1	↑	76	8,2
6	61	1	≤ 1	↑	27	8,7
7	55	2	≤ 1	↓	12	9,7
8	57	4	≤ 1	↓	14	11,0
9	57	4	≤ 1	↓	-01	13,3
10	66	4	>1	↓	-01	34,4
11	67	4	≤ 1	↓	-01	59,9
12	72	1	≤ 1	↓	30	65,6
13	37	2	≤ 1	↓	12	88,9
14	64	2	≤ 1	↓	04	153,4

Tabelle 8. Subgruppenanalyse der 14 Lymphompatienten (DLCBL) mit A-CCP-Seropositivität

ECOG: Index zur Lebensqualität der Eastern Cooperative Oncology Group, LDH: Lactatdehydrogenase, BSG: Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit. Anti-CCP: Anti-Cyclin-Citrulliniertes Peptid, DLCBL: diffus-großzelliges B-Non-Hodgkin-Lymphom.

4.4.2 Subgruppenanalyse der A-CCP-positiven im Vergleich zu den A-CCP-negativen DLCBL-Patienten

Im Folgenden erfolgte der Vergleich der Gruppe der A-CCP-positiven DLCBL-Patienten mit der der A-CCP-negativen DLCBL-Patienten im Hinblick auf das Erkrankungsalter (<, > 60 Jahre), dem Erkrankungsstadium, das Geschlecht, der Leistungsfähigkeit mit Hilfe des ECOG-Index, dem BSG-, dem LDH-Wert und des Gesamtüberlebens. Es zeigte sich jedoch im Hinblick auf die einzelnen Charakteristika keinen signifikanten Unterschied zwischen den A-CCP positiven und A-CCP-negativen DLCBL-Patienten.

	Anti-CCP (+)	Anti-CCP (-)	p-Wert
Erkrankungsalter⁽¹⁾	59,4	59,1	0,657
Stadium III/IV⁽¹⁾	35,5%	40,4%	0,724
Geschlecht (weibl.)⁽¹⁾	28,6%	45,1%	0,220
ECOG >1⁽¹⁾	7,1%	11,8%	0,593
BSG erhöht⁽¹⁾	21,4%	38,3%	0,200
LDH erhöht⁽¹⁾	14,3%	24,2%	0,384
Gesamt-Überleben (overall survival)⁽²⁾ (6 Jahre)	66,79%	60,26%	0,837

Tabelle 9. Vergleich der Subgruppenanalyse der A-CCP-AK (+) versus der A-CCP-AK (-) DLCBL-Patienten

⁽¹⁾Mann Whitney U-Test, ⁽²⁾ Log Rank/ Mantel Cox Testung, Anti-CCP: Anti-Cyclin-Citrulliniertes Peptid, ECOG: Index zur Lebensqualität der European Cooperative Oncology Group, BSG: BlutkörperchenSenkungsGeschwindigkeit, LDH: Lactatdehydrogenase

4.4.3 Gesamtüberleben der A-CCP positiven versus der A-CCP negativen

DLCBL-Patienten

Im Hinblick auf das Gesamtüberleben (6 Jahre) zeigte sich wie bereits in 4.4.2 erläutert keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe der A-CCP-positiven und A-CCP-negativen DLCBL-Patienten. Es gab jedoch eine Tendenz zu besseren Gesamtüberlebenszeiten (6 Jahre) bei A-CCP-positiven DLCBL-Patienten (66,79% im Vergleich zu 60,226%). In Abbildung 2 sind die Daten zum Gesamtüberleben graphisch dargestellt.

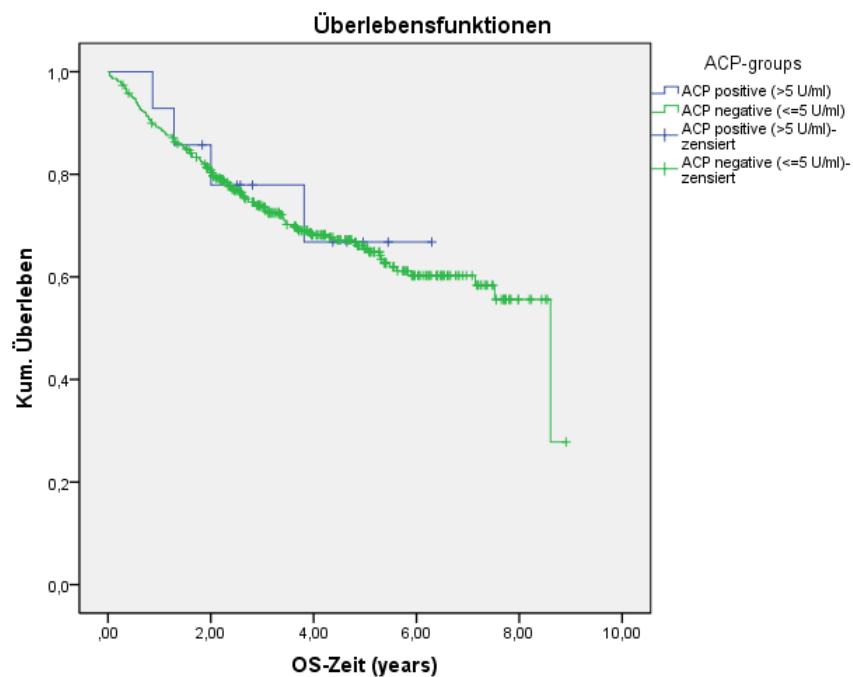


Abbildung 2: Gesamtüberleben A-CCP-positiver versus A-CCP-negativer DLCBL-Patienten

A-CCP-AK= ACP: Anti-Cyclin-Citrulliniertes Peptid. DLCBL: diffus-großzelliges B-Non-Hodgkin-Lymphom.

OS: overall survival

4.5. Seroprävalenz: Multiple Myelom-Patienten versus Kontrollen

Vergleicht man nun die Testergebnisse der Multiple Myelom-Patientenseren mit denen der Kontrollgruppe, so ist festzustellen dass für keinen der drei bestimmten RF-Immunglobulinklassen (RF-IgM, -IgG, -IgA), noch für den A-CCP-IgG AK ein statistisch signifikant höheres Ergebnis als in der jeweiligen Kontrollgruppe ermittelt werden konnte.

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der RF- und A-CCP-AK Seroprävalenzen der Multiple Myelom-Patientengruppe und der jeweiligen Kontrollgruppe gegenübergestellt.

In der Gruppe der Multiple Myelom-Patienten waren 36 von 141 (25,5%) seropositiv für den RF-IgM (Titer ≥ 50 RE/ml) im Vergleich zu 57 der 258 (22,1%) gesunden Kontrollen. Dies ergab mit einem P-Wert von 0,437 [$>0,05$] keine statistische Signifikanz.

Dabei zeigten 17 der 141 (12,1%) Multiple Myelom-Patienten niedrig positive Titer (50-100 RE/ml) im Vergleich zu 16 der 258 (6,2%) gesunden Kontrollen. Hochpositive RF-IgM Titer (>100 -200 RE/ml) ließen sich bei 19 der Patienten (13,5%) im Vergleich zu 41 der gesunden Kontrollen (15,9%) nachweisen. Der p-Wert lag mit 0,118 hier auch oberhalb des Signifikanzniveaus [$\leq 0,05$].

Für den RF-IgA wiesen 12 von 141 (8,5%) Multiple Myelom-Patienten im Vergleich zu 28 der 223 gesunden Kontrollen (12,6%) positive Titer (≥ 20 RE/ml) auf. Der P-Wert betrug 0,229. Positive RF-IgG Werte (≥ 20 RE/ml) ließen sich bei 3 von 141 (2,1%) Multiple Myelom-Patienten im Vergleich zu 4 der 223 (1,8%) gesunden Kontrollen nachweisen. [Exakter Wert nach Fischer = 1,000].

Von den 141 Multiple Myelom-Patienten wiesen desweiteren 2 (1,4%) Patienten positive A-CCP-AK Titer (> 5 -200 RE/ml) auf, wohingegen auch 2 der 249 (0,8%) gesunden Kontrollen positiv waren. Das Ergebnis war mit einem exakten Wert nach Fischer gleich 0,622 nicht signifikant [$>0,05$].

	MM-Patienten			Kontrollen			P-Wert	Sig.
	Gesamt - zahl	Anzahl Pos.	(%)	Gesamt - zahl	Anzahl Pos.	(%)		
RF-IgM-pos. (≥ 50 RE/ml)	141	36	25,5	258	57	22,1	0,437	n.s. ¹
RF-IgM-niedrig-pos. (50-100 RE/ml)	141	17	12,1	258	16	6,2	0,118	n.s. ¹
RF-IgM-hoch-pos. ($>100-200$ RE/ml)	141	19	13,5	258	41	15,9		
RF-IgA-pos. (≥ 20 RE/ml)	141	12	8,5	223	28	12,6	0,229	n.s. ¹
RF-IgG-pos. (≥ 20 RE/ml)	141	3	2,1	223	4	1,8	1,000	n.s. ¹
A-CCP-IgG-pos. ($>5-200$ RE/ml)	141	2	1,4	249	2	0,8	0,622	n.s. ¹

Tabelle 10. Gegenüberstellung der RF- und A-CCP-AK Seroprävalenzen der Multiple Myelom-Patienten mit derjenigen der gesunden Kontrollgruppe

¹n.s. = nicht signifikant, entspricht Signifikanzniveau $p > 0,05$. χ^2 -Test für 2 unabhängige Stichproben. MM: Multiples Myelom, RF: Rheumafaktor, A-CCP: Anti-Cyclin-Citrulliniertes Peptid, IgG: Immunglobulin G, IgM: Immunglobulin M, IgA: Immunglobulin A, pos.: positive, Sig.: Signifikanz

5. Diskussion

5.1 Interpretation und Bewertung der in dieser Studie ermittelten

Ergebnisse

5.1.1 Seroprävalenz: DLCBL-Patienten versus Kontrollen

Beim Vergleich der Seroprävalenzen der DLCBL-Patienten mit den gesunden Kontrollen dieser Studie stellte sich, wie in Kapitel 4.1 dargestellt, heraus, dass für keinen der drei bestimmten RF-Immunglobulinklassen, RF-IgM niedrig- als auch hoch-titrig, RF-IgG und RF-IgA, ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden konnte. Brickmann et al. berichteten hingegen positive RF-Titer in 50% der Seren von 107 Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (B-CLL), die klinisch keine Arthritis aufwiesen, getestet zu haben [26]. Bilici et al. fanden signifikant-positive RF-Titer in 56,7% der Seren von 105 NHL-Patienten ($p=0,046$) [46].

Für den A-CCP-IgG AK zeigten sich jedoch signifikant höhere Seroprävalenzen in der Gruppe der DLCBL-Patienten im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv. Dabei war das Erkrankungsstadium und das Gesamtüberleben bei DLCBL-Patienten jedoch unabhängig von der Seropositivität des A-CCP-AK.

Das Ergebnis der A-CCP-AK untermauert zunächst die Hypothese einer Assoziation mit vermehrter Auto-AK-Bildung bei Lymphomen. Bisher erfolgten verschiedene Studien, die Autoantikörper, unter anderem den RF und die ANA, mit einer erhöhten Seroprävalenz in Seren von Lymphompatienten getestet haben. So fanden Guyomard et al., Chloraki et al. und Altintas et al. signifikant erhöhte ANA-Titer in Seren von Lymphompatienten [6, 12,13]. Da die A-CCP-AK im Gegensatz zum unspezifischen ANA-Titer aber hochspezifische Marker für die RA sind und zum Teil schon viele Jahre vor Krankheitsbeginn nachgewiesen werden

können [16], könnte der in dieser Studie erbrachte Nachweis einer erhöhten A-CCP-IgG AK Konzentration in den Seren der DLCBL-Patienten für ein erhöhtes Risiko der Entwicklung einer RA bei Lymphom-Patienten sprechen. Dies wäre ein Hinweis dafür, dass die Assoziation zwischen dem Auftreten chronisch entzündlicher Autoimmunerkrankungen und lymphoproliferativer Erkrankungen bidirektional ist.

Auf der anderen Seite zeigten die A-CCP-Marker einen relativ niedrigen Titer verglichen zu A-CCP-positiver RA-Patienten. Der Mittelwert der A-CCP-AK Titer bei DLCBL-Patienten betrug 34,2 U/ml. Laut Abolghasemi et al. ließen sich bei RA-Patienten hohe Titer von durchschnittlich 144 U/ml nachweisen [32]. Die deutlich niedrigeren Titer von A-CCP-AK bei DLCBL im Vergleich zur RA sprechen wieder eher für eine unspezifische Begleitreaktion als für eine pathogenetisch relevante Auto-AK-Bildung. Zur weiteren ätiologischen Zuordnung der Seropositivität wäre die Verlaufsbeobachtung der A-CCP-positiven Lymphompatienten hinsichtlich der Entwicklung einer RA sinnvoll, diese war jedoch mit dieser Fragestellung nicht möglich.

Weiter bleibt in diesem Zusammenhang unklar, inwiefern die Chemotherapie, die alle Patienten mit DLCBL erhalten haben, eine eventuelle zukünftige RA-Entstehung beeinflusst. Zu weiteren begünstigender Faktoren für die Entstehung von Auto-AK unabhängig von lymphoproliferativer Erkrankungen zählt auch der Vitamin D-Mangel, wie in weiteren Studien bereits nachgewiesen wurde [28]. In diesem Zuge kann postuliert werden, dass der bei Lymphompatienten häufig erniedrigte Vitamin D-Spiegel, wie kürzlich nachgewiesen [28], die Autoantigenität unabhängig von der lymphoproliferativen Erkrankung beeinflussen könnte. Eine Verlaufsbeobachtung über die vorliegenden 6 Jahren, bei einer Gesamtzahl von nur 14 Anti-CCP-positiven Lymphompatienten liefert für die Beantwortung dieser Fragestellung aber nur unzureichende Daten.

Die Analyse der RF- und A-CCP-AK-Seroprävalenzen erfolgte bei DLCBL-Patienten getrennt nach männlichem und weiblichem Geschlecht, da die Verteilung männlich/weiblich knapp signifikant unterschiedlich ($p=0.038$) zwischen Patienten und gesunden Kontrollen war. Sie ergab sowohl für die Gruppe der männlichen als auch für die Gruppe der weiblichen Patienten für keinen der drei RF-Immunglobulinklassen, RF-IgM niedrig- als auch hoch-titrig, RF-IgG und RF-IgA, eine signifikant höhere Prävalenz als in der jeweiligen Kontrollgruppe. Bezüglich des A-CCP-IgG Titers zeigte sich eine signifikant höhere Seroprävalenz in der Gruppe der männlichen jedoch nicht in derjenigen der weiblichen DLCBL-Patienten verglichen mit dem jeweiligen Kontrollkollektiv. Bei 65 DLCBL-Patienten war das Geschlecht nicht bekannt, diese konnten in der Statistik leider nicht berücksichtigt werden. Die Fallzahl erlaubt jedoch trotzdem eine aussagekräftige Statistik. In wie fern die weiteren 65 Proben, diese Statistik beeinflussen ist ohne weitere Analysen nicht eruierbar.

Ob die signifikanten Unterschiede des A-CCP-IgG AK-Titers in der Gruppe des Gesamtkollektives auf die Seroprävalenzen in der Gruppe der männlichen DLCBL-Patienten zurückzuführen sind, kann aufgrund der kleinen Fallzahlen nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Betrachtet man die Prävalenz der RA in der Gesamtbevölkerung, so erkrankten Frauen um ein ca. 2- bis 3-faches häufiger als Männer [33]. Der in dieser Studie ermittelte Unterschied in der geschlechtsbezogenen Verteilung der A-CCP IgG-Seroprävalenz in der Gruppe DLCBL-Patienten kann somit nicht auf dem geschlechtsabhängigen Risiko einer RA-Entwicklung in der Gesamtbevölkerung zurückgeführt werden. Auch die kürzlich publizierte Studie von Rubtsov wies bei weiblichen mehr als männlichen Probanden über Toll-like Receptor 7 vermittelte Akkumulation von CD11c+ B-Lymphozyten nach, die für die Entwicklung von Autoimmunität bei weiblichen Individuen verantwortlich sein können [27].

Die genannten vorangegangenen Untersuchungen können das Überwiegen der Anti-CCP-Seropositivität bei männlichen DLCBL-Patienten zusätzlich nicht erklären; für eine

geschlechter-getrennte Betrachtung der A-CCP-Seropositivität im Hinblick auf die jeweiligen Subgruppen, ist die untersuchte Fallzahl zu gering.

Die DLCBL-Patienten waren nicht signifikant älter ($p=0.192$) als die gesunden Kontrollen. Für die Rheumafaktoren ist eine erhöhte Serumprävalenz mit zunehmendem Lebensalter bekannt, nicht jedoch für den A-CCP-AK [11, 29, 41]. Da aber für die Prävalenz der RF-IgM Positivität keine Unterschiede zwischen den Lymphompatienten und Kontrollen vorlagen und die DLCBL-Patienten auch nicht signifikant älter als die Kontrollen waren, ist eine altersbezogene Adjustierung in der Statistik nicht indiziert.

Kritisch anzumerken, ist nur der geschlechtsbezogene Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen, dieser wurde jedoch durch eine nach Geschlecht getrennte Statistik ausgeglichen.

5.1.2 Korrelation: RF-IgM und A-CCP-IgG AK bei DLCBL-Patienten versus Kontrollen

Um einen fraglichen Zusammenhang zwischen den Häufigkeiten des Auftretens beider Antikörper, des A-CCP-IgG und des RF-IgM, zu untersuchen, wurden, wie im Kapitel 3.3 beschrieben, die A-CCP-positiven DLCBL-Patienten nach dem Vorkommen von RF-IgM stratifiziert.

Hierbei zeigte die Gruppe der RF-IgM-positiven DLCBL-Patienten signifikant höhere A-CCP-IgG AK-Seroprävalenzen im Vergleich zu den RF-IgM-positiven gesunden Kontrollen. In der Gruppe der RF-IgM-negativen Patienten war das jedoch nicht der Fall.

Die gemeinsame Betrachtung von RF-IgM wie A-CCP-AK bei DLCBL-Patienten lässt zunächst vermuten, dass positive A-CCP-AK Titer eher „rheumatologisch bedingt“ sind.

Grundsätzlich ist zwar das DLCBL eine klonale Erkrankung von B-Lymphozyten, die typischerweise aberrante Paraproteine mit konsekutiver Autoantikörperbildung erzeugen können [6, 12, 13]. Dass aber solche Paraproteine eine Kreuzreaktion von RF-IgM und Anti-

CCP haben, ist zwar möglich, aber die unterschiedliche Antigenität von RF und A-CCP-AK ist bereits mehrfach untersucht worden [11, 16, 17, 18]. Zudem liegen eine Vielzahl von Studien an Patienten mit RA vor, die das unterschiedliche Markerprofil von RF-positiven und negativen sowie A-CCP-AK-positiven und -negativen Patienten unabhängig voneinander mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen charakterisieren konnten [11].

Inwiefern die Seropositivität von DLCBL-Patienten für A-CCP-AK in Abhängigkeit des RF eine unspezifische Begleitreaktion im Serum darstellt oder ein spezifischer Risikomarker für RA bei DLCBL-Patienten darstellt, kann anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend beurteilt werden. Hierzu müssten die Untersuchung auf Monoklonalität und eventuell nachweisbar kreuzreagierende AK im Serum der A-CCP-positiven DLCBL-Patienten komplettiert werden.

Die vorgelegten Studienergebnisse zeigen zwar ein signifikant vermehrtes Auftreten von Anti-CCP-Autoantikörper im Serum von DLCBL-Patienten, eine klinische Relevanz als Verlaufs- bzw- Risikomarker der Lymphomerkrankung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Hierzu wurden die vorliegenden Daten nach den für DLCBL anerkannten Prognoseparametern des IPI (international prognostic index) aufgeschlüsselt und Kaplan Meyer Überlebenskurven für A-CCP-positive und -negative verglichen.

Aus dem Blickwinkel der Therapieeffizienz gibt es bei der RA und dem diffus-großzelligem Lymphom Überschneidungen nicht nur mit Cyclophosphamid sondern auch für das für beide Krankheitsentitäten zugelassene Rituximab [34, 35, 36, 37, 38]. Letzteres soll besonders antirheumatisch effektiv bei Patienten mit Nachweis von A-CCP-AK-Positivität wirken [34]. Das untersuchte DLCBL-Kollektiv entstammte allerdings vorzugsweise aus der B-NHL 98 Studie vor der Zulassung von Rituximab in der Lymphomtherapie und die Seren wurden definitiv vor Therapiebeginn gewonnen.

5.1.3 Seroprävalenz: Multiple Myelom-Patienten versus Kontrollen

Beim Vergleich der Testergebnisse der Multiple Myelom-Patientenseren mit denen der Kontrollgruppe, konnte für keinen der drei bestimmten RF-Immunglobulinklassen, RF-IgM, RF-IgG, und RF-IgA, noch für den A-CCP-IgG AK ein statistisch signifikant höheres Ergebnis als in der jeweiligen Kontrollgruppe ermittelt werden.

Diese Ergebnisse waren somit mit der von Hardiman et al. beschriebenen nicht erhöhten Inzidenz der RF-Titer in Seren von Patienten mit Multiple Myelom oder MGUS im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektive übereinstimmend [14]. Abu-Shakra et al. berichteten hingegen über eine erhöhte RF-Aktivität in Seren von Multiple Myelom-Patienten [2]. Erstmals konnten wir hier mit unseren Daten zeigen, dass Anti-CCP AK nicht vermehrt beim Multiplen Myelom auftraten.

Im Gegensatz zu DLCBL sind beim Multiplen Myelom pathogenetisch das Vorkommen von Paraproteinen im Serum beschrieben. Kreuzreagierende AK mit Antigenstrukturen wie RF-IgM oder A-CCP konnten vermutet werden. Umso erstaunlicher ist es, dass in dem bei uns untersuchten Kollektiv keine gehäuften Serum-Reaktionen für die drei verschiedenen RF und für A-CCP-AK im Vergleich zu gesunden auftraten.

5.2 Ausblick

Der für die RA hochspezifische A-CCP-AK ist unter anderem bei Multiplem Myelom-Patienten und gesunden Kontrollen negativ, jedoch bei einem Teil der DLCBL-Patienten ebenfalls positiv, jedoch mit niedrigeren Serumtitern als bei der RA. Die Frage in wie fern der A-CCP-AK bei DLCBL-Patienten eine eigenständige pathogenetische Relevanz in der Entstehung der RA haben könnte, bleibt hier jedoch offen und muss als Gegenstand weiterer Studien untersucht werden.

Dabei empfiehlt sich die Berücksichtigung verschiedener citrullinierter Proteine als mögliches Antigen wie zum Beispiel citrulliniertes (mutiertes) Vimentin, citrulliniertes Fibrinogen, citrulliniertes Typ-II Kollagen und citrullinierter α -Enolase [18, 16]. Der Anti-CCP-Test ist zwar hoch spezifisch für die RA, erlaubt jedoch keinerlei Aussagen hinsichtlich der Identität der erfassten citrullinierten Proteinen [18]. Die Untersuchung der bei Lymphompatienten vorkommenden A-CCP-AK Subtypen ist ein weiterer Ausblick.

Vor allem das mutierte citrullinierte Vimentin wäre hier von großem Interesse, da ihm eine Rolle als relevantes Autoantigen in der Pathogenese der RA zugeschrieben wird. Hinweisend dafür ist sein vermehrtes Auftreten in Fibroblasten und in der Synovialflüssigkeit unter oxidativem Stress [20].

Hingegen scheinen A-CCP-AK keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf und die Prognose von DLCBL-Patienten zu haben.

Abkürzungsverzeichnis

A-CCP	Anti-Cyclin-Citrunlliniertes Peptid
ACR	American College of Rheumatology
Ag	Antigen
AK	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
BAFF	B-Zell aktivierender Faktor aus der TNF-Familie
BSG	BlutkörperchenSenkungsGeschwindigkeit
DLCBL	Diffuse-goßzelliges B-Non-Hodgkin Lymphom
CI	Konfidenzintervall
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
LDH	Lactatdehydrogenase
M	Männlich
MCV	Mutiertes Citrulliniertes Vimentin
MGUS	Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
OR	Odds-Ratio
P	Asymptotische Signifikanz
RE	Relative Einheiten
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheuma Faktor
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
TNF	Tumor Nekrose Faktor
W	Weiblich

Literaturverzeichnis

1. Goldin LR, Landgren O. Autoimmunity and Lymphomagenesis. *Int. J. Cancer* 2009;124:1497-1502
2. Abu-Shakra M, Buskila D, Ehrenfeld M, Conrad K, Schoenfeld Y. Cancer and Autoimmunity: autoimmune and rheumatic features in patients with malignancies. *Ann Rheum Dis* 2001;60:433-440
3. Ehrenfeld M, Abu-Shakra M, Buskila D, Schönfeld Y. The Dual Association between Lymphoma and autoimmunity. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2001;27:750-756
4. Whelan P. Der Zusammenhang zwischen rheumatoider Arthritis und Krebs. *Z.Rheumatol* 2006;65:497-504
5. Smedby KE, Askling J, Miettinen X, Baecklund E. Autoimmune and inflammatory disorders and risk of malignant lymphomas- an update. *Journal of internal Medicine* 2008;10.1111/j: 1365-2796
6. Chloraki-Bobota A, Megalaki C, Repousis P, Chalkipoulou I, Lalaki I, Trafalis DT, Athanassiou AE, Mitsouli-Mentzikof C. Prevalence of autoantibodies (ANA, anti ds-DNA, ENA, IMF) and rheumatic syndroms in patients with lymphoproliferative diseases. *J BUON.*, 2006; 11(4):485-9
7. Anderson LA, Gadalla S, Morton LM, Landgren O, Pfeiffer R, Warren JL, Berndt SI, Ricker W, Parsons R, Engels EA. Population based study of autoimmune conditions and the risk of specific lymphoid malignancies. *Int. J. Cancer*, 2009;125:398-405
8. Brown LM, Gridley G, Check D, Landgren O. Risk of multiple Myeloma and monoclonal Gammopathy of undetermined significance among white and black male United States veterans with prior autoimmune, infectious, inflammatory and allergic disorders. *Blood*, 2008;111:3388-94

9. Baecklund E, Iliadou A, Askeling J. Associations of chronic inflammation, not its treatment, with increased lymphoma risk in rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, 2006;54:692-701
10. Sjöberg K, Roth EB, Gustavsson L, Jönsson C, Simàn H, Henriksson G, Stenberg P, Lindblom A, Svensson P. Autoimmune Markers in Lymphoid Malignancies. *Clinical Immunology*, 2008;10.1111/j:1365-3083
11. Song YW, Kang EH. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. *QJ Med*, 2010; 103: 139-146
12. Guyomard S, Salles G, Coudurier M, Rousset H, Coiffier B, Bienvenu J, Fabian N. Prevalence and pattern of antinuclear autoantibodies in 347 patients with non-Hodgkin`s lymphoma. *Br J Haematol*, 2003;123(1):90-9
13. Altintas A, Cil T, Pasa s, Danis R, Klinik I, Ayyildiz O, Muftuoglu E. Clinicl Significance of elevated antinuclear antibody Test in patients with Hodkin`s and Non-Hodgkin`s Lymphoma: a single center experience. *Minerva Med*, 2008;99(1):7-14
14. Hardiman KL, Horn S, Manoharan A, Phadke K, Gibson J, McGuigan L, Sturgess A. Rheumatic autoantibodies in sera of patients with paraproteins. *Clin Exp Rheumatol*, 1994; 12(4);363-8
15. Jerdin F, Lèvesque H, Tilly H. Auto-immun manifestations in Non-Hodgkin`s Lymphoma. *Rev Med Interne*, 2005;26(7):557-71
16. Enegelmann R, Müller-Hilke B. Antikörper gegen citrullinierte Peptidantigene in Klinik und Forschung. *Z Rheumatol*, 2009;68:485-490
17. Van Venrooij WJ, Zendman AJW. Anti-CCP2 Antibodies: An Overview and Perspective of the Diagnostik Abilities of this Serological Marker for Early Rheumatoid Arthritis. *Clinic Rev Allerg Immunol*, 2008;34:36-39
18. Snir O, Widhe M, von Spee C, Lindberg J, Padyukov L, Lundberg K, Engström A, Venables PJ, Lundberg J, Holmdahl R, Klareskog L, Malmström V. Multiple antibody

- reactivities to citrullinated antigens in sera from patients with rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1 alleles. *Ann Rheum Dis*, 2009;68:736-743
19. Klareskog L, Wedrèn S, Alfredsson L. On the origins of complex immune-mediated disease: the example of rheumatoid arthritis. *J Mol Med*, 2009; 87:357-362
 20. Bang H, Egerer K, Gaudiard A, Lühke K, Rudolph PE, Fredenhagen G, Berg W, Feist E, Burmester GR. Mutation and Citrullination Modifies Vimentin to a Novel Autoantigen for Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, 2007;56:2503-2511
 21. Department of Biology, Davidson College. ELISA (Enzyme- Linked ImmunoSorbant Assay). 2002. Davidson. <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/ELISA.html>
 22. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG. Anti-Rheumafaktor-ELISA (IgM) Arbeitsanleitung. 2006. Lübeck. EUROIMMUN
 23. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG. Anti-Rheumafaktor-ELISA (IgA) Arbeitsanleitung. 2006. Lübeck. EUROIMMUN
 24. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG. Anti-Rheumafaktor-ELISA (IgG) Arbeitsanleitung. 2006. Lübeck. EUROIMMUN
 25. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG. Anti-CCP-ELISA (IgG) Arbeitsanleitung. 2009. Lübeck. EUROIMMUN
 26. Brickmann K, Brezinschek RI, Yazdani-Biuki B, Graninger WB, Brezinschek HP. Superior specificity of anti-citrullinated peptide antibodies in patients with chronic lymphocytic leukemia and arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 2010;28(6):888-91
 27. V. Rubtsov A, Rubtsova K, Fischer A, Meehan RT, Gillis JZ, Kappler JW, Marrack P. Toll-like receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a novel CD11c+ B-Cell population is important for the development of autoimmunity. *Blood*, 2011; 118: 1305-1315
 28. Ritterhouse LL, Crowe SR, Niewold TB, Kamen DL, Macwana SR, Roberts VC, Dedeke AB, Harley JB, Scofield RH, Guthridge JM, James JA. Vitamin D deficiency is

- associated with an increased autoimmune response in healthy individuals and in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 2011; 70: 1569-1574
29. Suurmond J, Schuerwegh AJM, Toes REM. Anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a functional role for mast cells and basophils?. *Ann Rheum Dis*, 2011; 70(1): i55-i58
30. Nishimura S, Nishiya K, Hiskawa N, Chikazawa H, Ookubo S, Nakatani K, Hashimoto K. Positivity for antinuclear antibody in patients with advanced rheumatoid arthritis. *Acta Med Okayama*, 1996; 50(5):261-5.
31. Yukawa N, Fujii T, Kondo-Ishikawa S, Yoshifuji H, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Usui T, Mimori T. Correlation of antinuclear antibody and antidouble-strand DNA antibody with clinical response to infliximab in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective clinical study. *Arthritis Research and Therapie* 2011; 13: R213
32. Abolghasemi S, Gitipor A, Morteza A. The sensitivity, specificity and accuracy of anti-citrulline antibody test in diagnosis of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, 2012
33. De Vries RRP, Van der Woude D, Houwing JJ, Toes REM. Genetics of ACPA-positive rheumatoid arthritis: the beginning of the end? *Ann Rheum Dis*, 2011; 70: 51-54
34. Chatzidionysiou K, Lie E, Nasonov E, Lukina G, Hetland ML, Tarp U, Gabay C, van Riel PL, Nordström DC, Gomez-Reino J, Pavelka K, Tomsic M, Kvien TK, van Vollenhoven RF. Highest clinical effectiveness of rituximab in autoantibody-positive patients with rheumatoid arthritis and in those for whom no more than one previous TNF antagonist has failed: pooled data from 10 European registries. *Ann Rheum Dis*, 2011; 70(9): 1575-80
35. Fu K, Weisenburger DD, Choi WW, Perry KD, Smith LM, Shi X, Hans CP, Greiner TC, Bierman PJ, Bociek RG, Armatge JO, Chan WC, Vose JM. Addition of rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal center B-cell-like and

- non-germinal center B-Cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 2008; 26 (28): 4587-94
36. Pfreundschuh M, Trümper L, Kloess M, Schmits R, Feller AC, Rudolph C, Reiser M, Hossfeld DK, Metzner B, Hasenclever D, Schmitz N, Glass B, Rube C, Löffler M. Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of young patients with good-prognosis (normal LDH) aggressive lymphomas: results of the NHL-B1 trial of the DSHNHL. *Blood*, 2004; 104: 626-633
37. Pfreundschuh M, Trümper L, Kloess M, Schmits R, Feller AC, Rube C, Rudolph C, Reiser M, Hossfeld DK, Eimermacher H, Hasenclever D, Schmitz N, Löffler M, German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group. Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of elderly patients with aggressive lymphomas: results of the NHL-B2 trial of the DSHNHL. *Blood*, 2004; 104: 634-641
38. Suarez-Almazor ME, Belseck E, Shea B, Wells G, Tugwell P. Cyclophosphamide for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst. Rev*, 2000; (4):CD001157
39. Rifkin IR, Channavajhala PL, Kiefer HL, Carmack AJ, Landesman-Bollag E, Beaudette BC, Jersky B, Salant DJ, Ju ST, Marshak-Rothstein A, Seldin DC. Acceleration of lpr lymphoproliferative and autoimmune disease by transgenic protein kinase CK2 alpha. *J Immunol*, 1998;161(10):5164-70.
40. Mackay F, Tangye SG. The role of the BAFF/APRIL system in B cell homeostasis and lymphoid cancer. *Curr Opin Pharmacol*, 2004; 4(4):347-54
41. Schellekens GA, Visser H, De Jong BAW, van den Hoogen FHJ, Hazes JMW, Breedveld FC, van Venrooij WJ. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis and Rheumatism*, 2000; 43(1):155-163

42. Schellekens GA, De Jong BAW, van den Hoogen FHJ, van de Putte LBA, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest*, 1998; 101(1): 273-281
43. De Rycke L, Peene I, Hoffman IEA, Kruithof E, Union A, Meheus L, Lebeer K, Wyns B, Vincent C, Mielants H, Boullart L, Serre G, Veys EM, De Keyser F. Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. *Ann Rheum. Dis*, 2004; 63: 1587-1593.
44. Bongartz T, Cantaert T, Atkins SR, Harle P, Myers JL, Turesson C, Ryu JH, Baeten D, Matteson EL. Citrullination in extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 2007; 46:70-75
45. Kidd BA, Ho PP, Scharpe O, Zhao X, Tomooka BH, Kanter JL, Steinman L, Robinson WH. Epitope spreading to citrullinated antigens in mouse models of autoimmune arthritis and demyelination. *Arthritis Res Ther.*, 2008; 10(5):R119
46. Bilici A, Yapici HS, Ercan S, Seker M, Ustaalioglu BB, Salman T, Orcun A, Gumus M. The prevalence and significance of autoantibodies in patients with non-Hodgkin's lymphoma: are they correlated with clinicopathological features?. *J Boun*, 2012; 17(3):502-7
47. Hansen A, Lipsky PE, Dorner T. B-cell lymphoproliferation in chronic inflammatory rheumatic disease. *Nat Clin Pract. Rheumatol*, 2007; 3:561-9

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht im:

- Abstract-Buch und als Poster-Präsentation auf der gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie (DGHO), 02.-06.10.2009 Heidelberg/Mannheim. Abstract-Titel: „RHEUMATOID FACTOR AND ANTI-CYCLIC CITRULLINATED PEPTIDE (A-CCP) IN PATIENTS WITH DIFFUSE-LARGE-CELL-B-NON-HODGKIN-LYMPHOMA (DLCL) AND MULTIPLE MYELOMA (MM)“.
- Kongress-Abstract-Buch des vom EULAR organisierten jährlichen Europäischen Kongress für Rheumatologie, 2009 in Kopenhagen Dänemark. Nur Titel und Autoren unter der Abstract Nummer: AB0052 und dem Thema: "03. Humoral aspects – autoantibodies". Abstract-Titel: “RHEUMATOID FACTOR AND ANTI-CYCLIC CITRULLINATED PEPTIDE (A-CCP) IN PATIENTS WITH DIFFUSE-LARGE-CELL-B-NON-HODGKIN-LYMPHOMA (DLCL)”.
- EULAR Kongress 06/2012.
Abstract Titel: “HIGHER PREVALENCE OF ANTI-CITRULLINATED PROTEIN ANTIBODIES (APCA) WITHOUT IMPACT ON PROGNOSIS IN PATIENTS WITH AGGRESSIVE B-NON-HODGKIN LYMPHOMA (DLBCL)”.

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Gunther Aßmann danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas und der jederzeit hilfsbereiten und sehr engagierten Betreuung und Motivation. Vor allem danke ich ihm auch für die Beantwortung all meiner Fragen und der Unterstützung bei der Vorbereitung des Abstracts und der Posterpräsentation dieser Arbeit auf der gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie (DGHO) in Heidelberg/Mannheim im Oktober 2009.

Herrn Professor Dr. Michael Pfreundschuh danke ich auch herzlich für die Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit. Auch für das ständige Feedback im Rahmen des Laborseminars des José Carreras Zentrums.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Sandra Graß, Frau Jutta Conigliaro und all den Mitarbeitern des José Carreras Zentrums, der Medizinischen Klinik I und der Orthopädischen Klinik des Universitätsklinikums des Saarlandes, die mich auch hilfreich und freundlich bei der Probensammlung und der Durchführung der Arbeit unterstützt haben.

Herzlich danke ich auch Frau Dr. Mei Fang Ong für die freundliche Beratung und Hilfe bei der Durchführung der Statistik.

Nicht zuletzt danke ich auch meinen Freunden und meiner Familie für die große Motivation vor allem während der Fertigstellung dieser Arbeit.