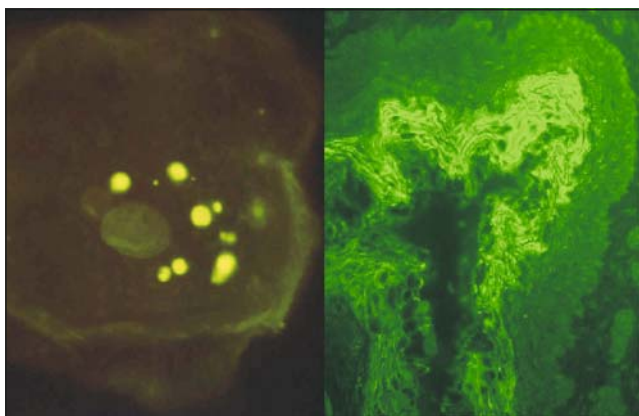


CCP - Autoantikörper

Marker der Rheumatoiden Arthritis

Prof. Dr. med. Hans Peter Seelig



Anti-perinukleärer Faktor
(Wangenschleimhaut)

Anti-Keratin
(Rattenösophagus)

Labor Prof. Seelig
und Kollegen

Kriegsstr. 99 - 76133 Karlsruhe - Tel.: 07 21/85 0000
www.laborseelig.de

Die **Rheumatoide Arthritis (RA)**, eine chronische destruierende und deformierende, autoimmune Gelenkentzündung unbekannter Ätiologie mit einer weltweiten Prävalenz von etwa 1%, manifestiert sich zu zwei Dritteln bei Frauen. Da sich bereits nach kurzer Krankheitsdauer schwere, behindernde Gelenkschäden entwickeln können, die sich durch eine frühzeitige, allerdings kostenintensive und auch risikobehaftete Therapie mit krankheitsmodifizierenden Antirheumatika (DMARDs), verhindern oder verzögern lassen, kommt der Frühdiagnose der RA eine wesentliche Bedeutung zu.

Der bisher einzige, in die ACR-Kriterien aufgenommene, serologische Krankheitsmarker der RA ist der Rheumafaktor (IgM-RF), ein Autoantikörper gegen den Fc-Teil körpereigener Immunglobuline. Der RF-Test, dessen Sensitivität bei 60-80% liegt, wird wegen seiner begrenzten Krankheitspezifität allgemein als nicht optimal für die serologische Frühdiagnose der RA angesehen. IgM-RF treten bei vielen Autoimmunerkrankungen, Infektionserkrankungen und in fortgeschrittenem Lebensalter auch bei Gesunden gehäuft auf. Aus diesem Grunde wurde stets nach anderen serologischen Markern mit besserer diagnostischer Effizienz gesucht.

Von zahlreichen dahingehend überprüften Autoantikörpern haben sich der bereits 1964 entdeckte Anti-perinukleäre Faktor (APF) und die 1979 beschriebenen Keratin-Antikörper (AKA) wegen ihrer nahezu hundertprozentigen Krankheitspezifität als aussichtsreichste serologische Marker profiliert. Anfangs für Antikörper unterschiedlicher Antigenspezifität gehalten, zeigte sich in der Folgezeit, dass sich beide Antikörper gegen citrullinhaltige Filaggrine richteten, was zu der Bezeichnung anti-Filaggrin-Antikörper (AFA) führte. Da nicht das Filaggrin an sich, sondern nur seine Citrullylreste für die Reaktion mit den Antikörpern erforderlich sind, werden heute zu deren Nachweis synthetische cyclische Citrullinpeptide eingesetzt, was die neuerliche Umbenennung der Autoantikörper in **cyclische Citrullinpeptid-Autoantikörper** (anti-CCP) veranlasste.

Indikationen: Verdacht auf RA, insbesondere bei noch unklarer klinischer Symptomatik im Frühstadium und/oder negativem IgM-RF-Test. Prognose von Krankheitsverläufen mit erosiven Gelenkläsionen. Beurteilung der möglichen Entstehung einer RA bei Risikogruppen. Differentialdiagnostische Abgrenzung der RA von erosiven Gelenkmanifestationen bei systemischem Lupus erythematoses (SLE), von anderen entzündlichen Arthritiden und Polymyalgia rheumatica.

Das CCP - Autoantikörpersystem

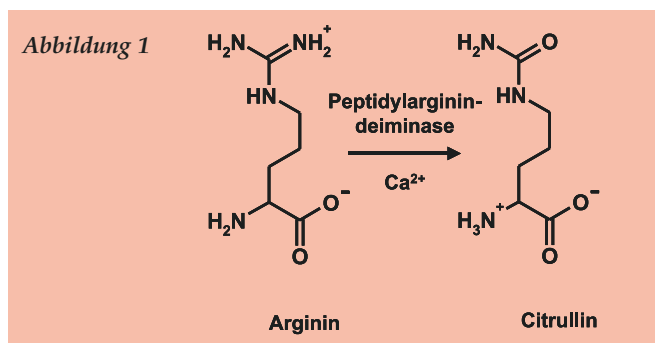
Als **perinukleärer Faktor** wurden perinukleäre 0.5-5 µm große Keratohyalin granula in den nicht verhornenden Epithelien der Wangenschleimhaut (Titelbild) bezeichnet. Mit dem indirekten

Immunfluoreszenztest (IIFT) ließen sich Antikörper gegen den perinukleären Faktor (APF) bei 72% (48-90%) der RA-Patienten nachweisen. Sie zeichneten sich durch eine hohe Spezifität von 92% (72-99%) aus, welche deutlich über der des IgM-RF lag.

Keratin-Autoantikörper (AKA) wurden mit dem IIFT im Stratum corneum des Rattenösophagus nachgewiesen (Titelbild). Sie reagierten schwächer auch mit dem Stratum corneum der menschlichen Epidermis. Die Sensitivität des AKA-Tests lag mit 36-59% unter der des APF-Tests, seine Krankheitsspezifität war mit 88-99% ebenfalls auffallend hoch.

Beide Antikörper (AFP und AKA) waren bereits in den Frühstadien der RA nachweisbar, fanden sich auch bei über einem Drittel der Patienten mit seronegativer (IgM-RF-negativer) RA und waren mit erosiven Verlaufsformen assoziiert.

Beide Antikörper reagieren mit deiminierten (citrullinierten), in den Keratohyalin granula der Wangenschleimhaut und in der Epidermis vorkommenden Filaggrinen, deren Vorstufe, das Profilaggrin, als hochmolekulares, stark phosphoryliertes Polyprotein in den Keratinozyten des Stratum granulosum der Epidermis exprimiert und in Keratohyalin granula gespeichert wird. Bei der Cornifizierung der Keratinozyten, einem der Apoptose vergleichbaren Prozess, wird Profilaggrin partiell dephosphoryliert und durch Peptidylarginindeiminase deiminiert. Hierdurch werden etwa 20% seiner Arginylreste in Citrullylreste umgewandelt (Abbildung 1). Anschließend wird es in Filaggrinuntereinheiten aus je 324 Aminosäuren hydrolysiert, die an der Aggregation intermediärer Zytokeratinfilamente (Filaggrin = Filament-Aggregation) beteiligt sind.



Ihre Spezifität für citrullinierte Filaggrine erklärt die auf den ersten Blick ungewöhnliche Immunreaktion dieser Autoantikörper mit Keratohyalin granula in der Wangenschleimhaut und mit verhornenden Plattenepithelien im Rattenösophagus. Für den Nachweis der Antikörper wurden diese Gewebepreparate durch rekombinante und native citrullinierte Filaggrine ersetzt. Die damit bestimmten **Filaggrin-Autoantikörper (AFA)** waren ebenso sensitiv (64%) und spezifisch (bis 99%) für die RA wie APF und AKA und gleichermaßen mit erosiven Läsionen assoziiert.

Für die Reaktion mit den Antikörpern ist nicht das citrullinierte Filaggrinprotein an sich, sondern nur ein Citrullylrest notwendig. Bei der Deiminierung des Arginins wird der positiv geladene Guanidinrest hydrolysiert und die protonenhaltige Iminogruppe durch ein neutrales Sauerstoffatom ersetzt. Im Verbund eines Peptids oder Proteins bestimmt das sauerstofftragende Citrullylepitop die Reaktion mit den Antikörpern, d.h. Antikörper von RA-Patienten können grundsätzlich mit allen möglichen im Körper vorkommenden citrullinierten Peptiden oder Proteinen reagieren, wobei die Reaktionsstärke durch die benachbarten Aminosäurereste moduliert wird. Die Antikörper sind nicht für Filaggrin spezifisch, sondern für Citrullin im Kontext einer Peptidkette, was insofern von Bedeutung ist, als im Entstehungsort dieser Antikörper, dem entzündlichen Pannus der Synovialmembran, Filaggrine nicht vorkommen. Hier wurden als mögliche Autoantigene citrullinierte α - und β -Ketten von Fibrin identifiziert, die ebenfalls von den Antikörpern erkannt werden. So könnten im Verlauf eines rheumatischen Entzündungsprozesses Arginylreste von Proteinen der Synovialmembran möglicherweise durch die in Monozyten und Makrophagen vorkommenden Peptidylarginindeiminasen zu Citrullylresten deiminiert werden, die dann als neugeformte B-Zellepitope immunkompetenten Zellen präsentiert, bei einer entsprechenden genetischen Disposition, eine Autoimmunantwort auslösen.

Cyclische Citrullinpeptid-Autoantikörper

Sensitivität und Spezifität: Für einen kommerziellen Elisa der ersten Generation (CCP1) wurden zyklisierte Citrullinpeptide verwendet, die noch von einem Sequenzmotiv aus dem C-Terminus des humanen Filaggrins abgeleitet waren. Die Sensitivität dieses CCP1-Assays lag bei 40-68%, die Spezifität erreichte 97%. Mit einem Assay der zweiten Generation (CCP2), das cyclische Citrullinpeptide unbekannter Sequenz enthält, ließ sich die Sensitivität auf 80%, die Spezifität auf über 98% steigern (Tabelle 1). Damit entspricht die Sensitivität des CCP2-Assays in etwa der des IgM-RF. Die Angaben über die Sensitivität der Assays sind von den untersuchten Patientenkollektiven und von dem Zeitpunkt der Untersuchung abhängig. Die Sensitivität kann nach zweijähriger Krankheitsdauer um 5-17% höher liegen als in der für die Diagnose wichtigen Frühphase der ersten klinischen Symptome (<6 Monate).

Bei etwa 85% der anti-CCP-positiven Patienten finden sich auch IgM-RF, wobei allerdings keine nennenswerten Korrelationen zwischen der anti-CCP- und der IgM-RF-Konzentration bestehen. Dass bei bis zu einem Drittel der RF-IgM-negativen RA-Patienten ebenfalls anti-CCP vorkommen, ist von diagnostischer Bedeutung. Die Mehrzahl der Untersucher favorisiert derzeit noch bei dem Verdacht auf eine RA die simultane Bestimmung von anti-CCP und IgM-RF zur Verbesserung der diagnostischen und prognostischen Effizienz.

Tabelle 1

Sensitivität und Spezifität von anti-CCP-Testen der ersten (CCP1) und zweiten (CCP2) Generation.

anti- CCP		RF		Test	Autoren
Sens. %	Spez. %	Sens. %	Spez. %		
84	89	70	82	CCP2	Suzuki et al. (2003)
76	92	69	76	CCP2	Hayashi und Kumagai (2004)
65	96	60	70	CCP2	Dubucquoi et al. (2004)
70*	98	73	93	CCP2	Rantapää-Dahlquist et a. (2003)
66	90	72	80	CCP2	Lee und Schur (2003)
77		90		CCP2	Bombardieri et al. (2004)
80	>98			CCP2	Vossenar et al. (2002)
68	98			CCP1	Schellekens et al. (2000)
48*	96	54	91	CCP1	Schellekens et al. (2000)
79	97	78	62	CCP1	Vasishata (2002)**

* Patienten mit Krankheitsdauer < 6 Monate.

** Shield Diagnostics Ltd, Dundee

Krankheitsassoziationen: Aufgrund ihrer hohen Spezifität für die RA finden sich anti-CCP selten bei anderen Erkrankungen. Ihre Prävalenz liegt deutlich unter 1-3% bei gesunden Personen, bei systemischen Autoimmunerkrankungen wie SLE (hier jedoch 20% bei der Assoziation mit erosiven Arthritiden), systemischer Sklerose, Sjögren Syndrom und Vaskulitiden, ebenso bei anderen Erkrankungen wie reaktiver Arthritis, Fibromyalgie, Pseudogicht, Sarkoidose, M. Crohn, Colitis ulcerosa und bakteriellen, viralen oder parasitären Infektionen. In kleinen Studienkollektiven wurden bei Polymyalgia rheumatica, Spondylarthritis und anti-HCV-positiven Arthropathien keine Antikörper gefunden, höhere Prävalenzen fanden sich bei Patienten mit palindromischem Rheumatismus (11-56%), Psoriasis-Arthritis (9-11%), nicht näher definierten entzündlichen Arthritiden (11.5%) und bei der juvenilen idiopathischen Arthritis (2-15%), dort vor allem bei der polyartikulären Form, meist assoziiert mit IgM-RF und radiographisch darstellbaren Gelenkläsionen.

Prognostische Bedeutung: Anti-CCP können nach bisherigen Daten als vielversprechende Marker der Frühphase einer RA angesehen werden, da sie sehr frühzeitig, nicht selten schon vor der Manifestation klinischer Symptome auftreten. Sie waren bei 30-40% der späteren RA-Patienten schon bis zu 9 Jahre vor der Manifestation klinischer Symptome vorhanden. Das Risiko, unter diesen Umständen innerhalb von 5 Jahren an einer RA zu erkranken (positiver prädiktiver Wert) liegt bezogen auf die Gesamtbevölkerung bei 5%, steigt bei Risiko

patienten jedoch auf 60-70% an, was auch mögliche therapeutische Überlegungen impliziert. Bei unklaren arthritischen Symptomen und positivem anti-CCP-Test besteht ein Risikofaktor von nahezu 40 für die Entwicklung einer RA in den nächsten drei Jahren. Von anti-CCP-positiven Patienten mit unklarer Anfangssymptomatik, die als noch undifferenzierte Arthritis eingestuft wurde, entwickelten 93% innerhalb von 3 Jahren eine RA, von anti-CCP-negativen Patienten aber nur 25%.

Anti-CCP scheinen auch eine Prognose bezüglich erosiver und nicht erosiver Verlaufsformen der RA zu erlauben, die sich durch die Einbeziehung des IgM-RF in die Berechnungen noch verbessern lässt. Verlaufsstudien über Zeitintervalle von bis zu mehreren Jahren bestätigten die signifikante Korrelation von anti-CCP und ausgeprägteren, radiographisch nachweisbaren erosiven Gelenkläsionen.

Anti-CCP - diagnostische Relevanz

Ein negativer anti-CCP-Test und noch weniger ein negativer IgM-RF-Test schließen eine RA nicht aus. Ein positiver anti-CCP-Test spricht wegen seiner hohen Krankheitsspezifität mit großer Wahrscheinlichkeit für die Existenz oder für die absehbare Entwicklung einer RA. Der anti-CCP-Test kann nach allen vorliegenden Daten die serologische Diagnostik der RA effizienter gestalten.

Eigenschaften

- Höchste serologische Krankheitsspezifität
- Hohe Sensitivität, dem IgM-RF-Test ebenbürtig

Vorkommen

- 30% der RF-IgM-negativen RA-Patienten
- Jahre vor der Krankheitsmanifestation
- Frühstadium der RA (bei oft uncharakteristischer Symptomatologie)

Relevanz

- Serologische Frühdiagnose der RA
- Prognose erosiver Verlaufsformen

Diagnostik:

Anti-CCP-Elisa der 2. Generation (CCP2) mit festphasengebundenen Citrullinpeptiden zum Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG. Messbereich 0-1600 U (<25 U negativ, 25-50 U Grenzwertbereich, >50 U positiv). Intraassay-VK: 4.8; Interassay-VK: 6.5.

Für wissenschaftliche Untersuchungen stehen weiterhin auch AFP-, AKA- und AFA-Assays und verschiedene Assays mit zyklisierten Citrullinpeptiden zur Verfügung.

Material:

Serum, 1.0 mL; alternativ Vollblut, EDTA-, Heparin-, Citrat-Plasma oder -Blut.