

AUS DER ABTEILUNG FÜR NEPHROLOGIE  
PROF. DR. BERNHARD BANAS, MBA  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Untersuchung der IL-3 Expression bei Patienten mit Systemischem  
Lupus erythematodes, Psoriasis-Arthritis und Vaskulitis**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Janina Constanze Pasierski

2019



AUS DER ABTEILUNG FÜR NEPHROLOGIE  
PROF. DR. BERNHARD BANAS, MBA  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Untersuchung der IL-3 Expression bei Patienten mit Systemischem  
Lupus erythematodes, Psoriasis-Arthritis und Vaskulitis**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Janina Constanze Pasierski

2019

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Mack

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Fleck

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Oktober 2019

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	9
1.1	Systemischer Lupus erythematoses.....	9
1.1.1	Prävalenz und Inzidenz des SLE.....	9
1.1.2	Klinische Präsentation des SLE .....	9
1.1.3	Pathogenese der Erkrankung.....	11
1.1.4	Lupusnephritis.....	12
1.1.5	Erfassung der Krankheitsaktivität .....	14
1.1.6	Therapie des SLE .....	15
1.2	Psoriasis-Arthritis .....	17
1.2.1	Prävalenz und Inzidenz der Psoriasis-Arthritis.....	17
1.2.2	Klinische Präsentation der Erkrankung.....	17
1.2.3	Pathogenese.....	19
1.2.4	Therapie der Psoriasis-Arthritis .....	21
1.3	Granulomatose mit Polyangiitis .....	23
1.3.1	Prävalenz und Inzidenz der GPA .....	23
1.3.2	Ätiologie der Erkrankung .....	24
1.3.3	Klinische Präsentation der GPA .....	25
1.3.4	Therapie der GPA .....	26
2	Theoretischer Hintergrund .....	28
2.1	Interleukin 3 .....	30
2.1.1	Struktur und Funktion.....	30
2.1.2	IL-3 und seine Rolle bei Entzündungen und Autoimmunität .....	31
3	Material und Methoden .....	33
3.1	Laborgeräte und -materialien .....	33
3.1.1	Geräte.....	33
3.1.2	Glas- und Plastikwaren .....	33
3.1.3	Chemikalien, Reagenzien, Puffer .....	34
3.1.4	Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze .....	34

3.1.5	Antikörper für die extrazelluläre Durchflusszytometrie .....	35
3.1.6	Antikörper für die intrazelluläre Durchflusszytometrie .....	35
3.1.7	Zytokine, Antikörper, Enzyme.....	35
3.1.8	ELISA.....	36
3.1.9	Analyse- und Bearbeitungsprogramme .....	36
3.2	Methoden .....	36
3.2.1	Patientenrekrutierung und Gewinnung des Probenmaterials .....	36
3.2.2	Gewinnung humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (hPBMC's) aus Vollblut.....	37
3.2.3	Durchflusszytometrie/FACS-Analyse.....	39
3.2.4	Extrazelluläre Färbung .....	40
3.2.5	Bestimmung der Zellzahlen .....	40
3.2.6	Zellkulturansätze .....	41
3.2.7	Intrazelluläre Färbung .....	41
3.2.8	ELISA.....	43
4	Ergebnisse.....	45
4.1	IL-3-Konzentration.....	48
4.1.1	IL-3 Produktion im Zellkultur-Überstand von SLE-Patienten .....	48
4.1.2	IL-3-Produktion im Zellkultur-Überstand von PsA-Patienten .....	49
4.1.3	IL-3 Produktion im Zellkultur-Überstand von GPA-Patienten .....	50
4.2	Untersuchung potentieller Zytokin-Quellen bei SLE.....	50
4.2.1	Potentielle IL-3-Quellen bei SLE .....	51
4.2.2	Potentielle IL-2-Quellen bei SLE .....	54
4.2.3	Potentielle IL-17-Quellen bei SLE .....	56
4.3	Untersuchung möglicher Zytokin-Produzenten bei PsA.....	58
4.3.1	Potentielle IL-3-Quellen bei PsA.....	58
4.3.2	Potentielle IL-2-Quellen bei PsA.....	61
4.3.3	Potentielle IL-17-Quellen bei PsA.....	63
4.4	Untersuchung möglicher Zytokin-Produzenten bei GPA.....	64

4.4.1	Potentielle IL-3-Quellen bei GPA.....	64
4.4.2	Potentielle IL-2-Quellen bei GPA.....	67
4.4.3	Potentielle IL-17-Quellen bei GPA.....	67
4.5	Analyse der PBMCs bei SLE-Patienten.....	68
4.5.1	Anzahl der T-Zellen im peripheren Blut .....	69
4.5.2	Anzahl der B-Zellen im peripheren Blut .....	70
4.5.3	Expression von CD203c auf Basophilen Granulozyten im peripheren Blut .....	71
4.5.4	Expression der IL-3R- $\beta$ c-Kette auf Neutrophilen Granulozyten .....	71
4.5.5	Expression der IL-3R- $\beta$ c-Kette auf Eosinophilen Granulozyten .....	72
4.6	Analyse der PBMCs bei PsA-Patienten.....	72
4.6.1	Anzahl der T-Zellen im peripheren Blut .....	73
4.6.2	Anzahl der B-Zellen im peripheren Blut .....	74
4.6.3	Expression von CD203c auf Basophilen Granulozyten im peripheren Blut .....	74
4.6.4	Anzahl der IL-3R- $\beta$ c-Kette exprimierenden Neutrophilen Granulozyten.....	75
4.6.5	Expression der IL-3R- $\beta$ c-Kette auf Eosinophilen Granulozyten .....	76
4.7	Analyse der PBMCs bei Patienten mit GPA .....	77
4.7.1	Anzahl der T-Zellen im peripheren Blut .....	77
4.7.2	Anzahl der B-Zellen im peripheren Blut .....	78
4.7.3	Expression von CD203c auf Basophilen Granulozyten im peripheren Blut .....	78
4.7.4	Expression der IL-3R- $\beta$ c-Kette auf Neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut	79
4.7.5	Expression der IL-3R- $\beta$ c-Kette auf Eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut	79
5	Diskussion .....	80
5.1	IL-3 und SLE .....	80
5.1.1	Gesteigerte IL-3 Produktion bei zunehmender Krankheitsaktivität des SLE ....	80
5.1.2	IL-3 Produktion durch T-Zellen .....	81
5.1.3	Weitere Zytokine bei SLE .....	82
5.1.4	Veränderung des Anteils weiterer PBMCs mit steigender Krankheitsaktivität des SLE	83

5.2	IL-3 und PsA .....	84
5.2.1	Gesteigerte IL-3 Produktion mit zunehmender Krankheitsaktivität der PsA .....	84
5.2.2	IL-3 Produktion durch T-Zellen .....	85
5.2.3	Weitere Zytokine bei PsA .....	86
5.2.4	Veränderung des Anteils weiterer PBMCs mit steigender Krankheitsaktivität der PsA	87
5.3	IL-3 und GPA .....	88
5.3.1	Gesteigerte IL-3 Produktion bei Patienten mit GPA .....	88
5.3.2	IL-3 Produktion durch T-Zellen .....	88
5.3.3	Weitere Zytokinproduktion bei GPA .....	88
5.3.4	Veränderung des Anteils weiterer PBMCs bei GPA .....	89
6	Zusammenfassung .....	90
7	Literaturverzeichnis .....	92
8	Danksagung .....	111
9	Lebenslauf .....	112
10	Eidesstattliche Erklärung .....	114



# **1 Einleitung**

## **1.1 Systemischer Lupus erythematoses**

Der Systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine chronische systemische Autoimmunerkrankung. Sie zählt zu den Kollagenosen, ist durch Produktion von nicht-organspezifischen Autoantikörpern gegen Nukleinsäuren, der Ablagerung von Immunkomplexen sowie der Aktivierung und Verbrauch des Komplementsystems gekennzeichnet. Typisch für den SLE ist der Verlauf in Schüben und Remissionen.

Aufgrund der ubiquitär vorhandenen Autoantigene kann der SLE prinzipiell jedes Organ betreffen, jedoch gilt insbesondere die Nierenbeteiligung, im Speziellen als Lupusnephritis (LN) bezeichnet, als wichtigster Prognosefaktor für den Erkrankungsverlauf. (1–3)

### **1.1.1 Prävalenz und Inzidenz des SLE**

Die Prävalenz der Erkrankung beträgt in der Bevölkerung etwa 20-150/100.000 (4, 5). Die geschätzte Inzidenzrate liegt bei ca. 1-25/100.000 in Nord- und Südamerika, Europa und Asien (4, 6). Aufgrund der Tatsache, dass auch bei mildem Verlauf der Erkrankung die Diagnose aufgrund neuester medizinischer und apparativer Möglichkeiten gestellt werden kann, hat sich die Inzidenz in den letzten 40 Jahren beinahe verdreifacht (7).

Der stärkste Risikofaktor für SLE ist das Geschlecht. Frauen sind bis zu zehnmal häufiger betroffen als Männer, wobei die Erkrankung meist bei jungen Frauen im gebärfähigen Alter auftritt. Auch die Abstammung scheint eine große Rolle zu spielen, denn die Prävalenz des Lupus ist sowohl in Europa als auch in den USA unter Personen asiatischen oder afrikanischen Ursprungs höher als bei Kaukasiern. (4)

Noch in den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts lag die Überlebensrate von Lupus-Patienten bei 50 %. Im Vergleich dazu lag die 5-Jahre-Überlebensrate in den 1990er Jahren bei etwa 90%. Dieser Verbesserung der Langzeitprognose liegen einerseits eine schnellere Diagnosestellung, beispielsweise mithilfe neuer Labortests, der Erkennung milder Erkrankungsverläufe sowie bessere Therapiemöglichkeiten zugrunde (1, 7).

### **1.1.2 Klinische Präsentation des SLE**

Kennzeichnend für die Erkrankung ist das Auftreten von Autoantikörpern gegen nukleäre Bestandteile, die sogenannten Anti-nukleären Antikörper (ANA). Sind die ANAs positiv, werden als nächstes die ENAs, die extrahierbaren nukleären Antikörper, bestimmt. Hierzu zählen Autoantikörper gegen doppelsträngige DNA (dsDNA-Ak), Nucleosomen, Histone und die Anti-Sm-Antikörper, welche ebenfalls gegen Bestandteile des Zellkerns gerichtet sind. Autoantikörper bedingen die Entstehung von Immunkomplexen. Diese wiederum aktivieren

und verbrauchen Komplement (8). Eine daraus resultierende Hypokomplementämie präsentiert sich bei mehr als  $\frac{3}{4}$  der unbehandelten Patienten mit Lupus und noch häufiger in Verbindung mit einer vorliegenden Nephritis. Die Konzentrationen der Komplementfaktoren C4 und C1q sind dabei häufiger erniedrigt als die des Faktors C3 (9).

Die zuvor beschriebenen ANA können bei über 90% der Lupus-Patienten vorliegen, sind jedoch unspezifisch und können auch bei 5-20% der gesunden Bevölkerung auftreten. Anti-dsDNA- und Anti-Sm-Antikörper hingegen sind deutlich spezifischer für die Erkrankung und wichtig für die Diagnosestellung (8). Auch die Abklärung des Vorhandenseins eines Antiphospholipid-Syndroms im Rahmen des SLE – dann als sekundäres Antiphospholipid-Syndrom bezeichnet – ist eine wichtige diagnostische Maßnahme. Zu dieser Gruppe zählt man das Lupus-Antikoagulanz, Anti-Cardiolipin-Antikörper und Antikörper gegen  $\beta_2$ -Glykoprotein. Bei diesem Syndrom handelt es sich um eine erworbene Thrombophilie, also eine erhöhte Thromboseneigung. Diese Anti-Phospholipid-Antikörper (aPL) sind mit einem höheren Risiko für venöse und arterielle Thrombosen, Thrombosen kleiner Gefäße sowie wiederholten Aborten assoziiert. (10) Die positive Testung auf Anti-Sjögren-Syndrom-A (Anti-SSA)/La und Anti-SSB/Ro-Antikörper lässt auf das Vorliegen eines sekundären Sjögren-Syndroms schließen. (8) Die Bestimmung dieser Werte hat vor allem bei betroffenen Schwangeren diagnostische Bedeutung, da es hier zu einer Übertragung von mütterlichen Autoantikörpern (Immunglobulin G) über die Plazenta kommen kann, die zur Ausbildung des seltenen Krankheitsbildes des neonatalen Lupus erythematoses führen und sich durch vorübergehende erythematöse Hautveränderungen beim Neugeborenen äußern, aber in schweren Fällen auch zu einem kongenitalen Herzblock führen kann. (11)

Die Bestimmung des Vitamin D-Spiegels sollte ebenso zur standardmäßigen Laborkontrolle gehören, wie die Feststellung der Immunparameter. Zahlreiche Studien haben belegt, dass der Großteil der SLE-Patienten unzureichende Spiegel an 25-Hydroxycholecalciferol aufweisen, trotz der bereits bestehenden Supplementierung mit Vitamin D (12, 13). Dies ist zurückzuführen auf die Tatsache, dass den Patienten geraten wird, übermäßige UV-Exposition zu vermeiden, da dies ein potentieller Trigger eines Krankheitsschubes sein kann. Somit ist die Vitamin D-Defizienz unter Menschen mit SLE häufiger anzutreffen als in der allgemeinen Bevölkerung (14, 15).

Klinisch präsentiert sich der SLE mit Allgemeinsymptomen wie Erschöpfung, Fieber und unbeabsichtigtem Gewichtsverlust. Zu diesen eher unspezifischen Symptomen gesellen sich beim Lupus charakteristische Hautläsionen wie das Schmetterlingserythem, sowie hämatologische Veränderungen, Gelenkmanifestationen und die Schädigung der Nieren, der Lungen, des Herzens und des zentralen Nervensystems. Diese Gewebeschädigung resultiert

aus der direkten Bindung der Autoantikörper, aber auch aus der Aktivierung des Komplementsystems durch Immunkomplexe, die entweder in der Blutzirkulation oder im Gewebe entstehen (16).

Zur Klassifikation des SLE wurden die Kriterien des *American College of Rheumatology* herangezogen, welche im Jahr 1971 (17) erstmals publiziert, 1982 revidiert (18) und 1997 (19) überarbeitet wurden. Um die Diagnose eines Lupus stellen zu können, mussten 4 der 11 Kriterien erfüllt sein. Richtigerweise ist hinzuzufügen, dass die Klassifikationskriterien nicht exakt mit den Diagnosekriterien übereinstimmen, sie dienen vielmehr im Rahmen von Studien zur Einteilung bzw. Klassifikation der SLE-Patienten.

2018 wurden auf der ACR-Tagung in San Diego die neuen Klassifikationskriterien für den SLE vorgestellt, welche eine noch bessere Spezifität und Sensitivität aufweisen sollen als die bisherigen ACR-Kriterien.

### 1.1.3 Pathogenese der Erkrankung

Der SLE ist durch einen Verlust der Selbsttoleranz gekennzeichnet. Dies bedeutet, dass das Immunsystem nicht mehr zwischen körpereigenen und körperfremd unterscheidet und in Folge kommt es zu einem „Angriff“ auf ubiquitäre nukleäre Autoantigene.

Als Ursachen der Krankheitsentstehung werden neben diversen Umweltfaktoren auch gewisse Medikamente, der sozioökonomische Status (4), Infektionen und eine genetische Prädisposition diskutiert. Eine familiäre Häufung des SLE ist beschrieben und Zwillingsstudien zeigen eine hohe Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen (bis zu 25%) (1, 9). Einigen Genen wird eine Rolle bei der Krankheitsentwicklung zugewiesen, darunter im Besonderen HLA Klasse II Genen (1). Manche Lupus-Patienten weisen zudem eine genetische Defizienz der Komplementkomponenten auf (9).

Neueren Erkenntnissen zufolge entsteht der systemische Lupus auf Basis einer Vielzahl unterschiedlicher Kombinationen genetischer Varianten. Diese genetischen Faktoren beeinträchtigen gewisse Mechanismen, die normalerweise verhindern, dass körpereigene nukleäre Partikel dem Immunsystem zugänglich werden. Neben immunregulatorischen Defekten spielen Mutationen eine große Rolle, welche die Apoptose (20, 21), die Opsonierung toter Zellen durch das Komplementsystem, sowie deren Entfernung durch Phagozyten verändern. (22) (23)

UV-Strahlung ist ein weiterer Umweltfaktor, der ein vermehrtes Absterben von Keratinozyten verursacht und damit eine erhöhte Anzahl toter Zellen in der Haut bedingt (24). Bei Patienten mit einem schwer wiegenden Defekt der Apoptose-Clearance führt dieser Vorgang zu erhöhten extrazellulären Konzentrationen nukleären Materials (25).

Zwischen der Krankheitsaktivität des SLE und niedrigen 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegeln scheint ein signifikanter Zusammenhang zu bestehen (26). Bei Patienten mit einem schweren Vitamin D-Mangel war die Krankheitsaktivität signifikant höher als bei jenen mit einem weniger schwerwiegenden Mangel (13). Dies liegt wohl in der immunmodulierenden Funktion von Vitamin D. Calcitriol unterstützt schützende Immunantworten des angeborenen Immunsystems und es hilft durch die Dämpfung überschießender adaptiver Immunantworten, die Selbsttoleranz aufrecht zu erhalten (13).

Interessanterweise konnte bereits in einigen Studien eine Dysregulation bestimmter Zytokine beim SLE nachgewiesen werden. Zu diesen zählen unter anderem IL-2, IL-17 und IL-21, aber auch Interferone und IL-6. Einige der Symptome von SLE-Patienten ähneln einer fieberhaften Symptomatik wie bei einem grippalen Infekt bzw. einer Grippe. So konnten erhöhte Interferon- $\alpha$  Spiegel im Blut nachgewiesen werden, die auch in der frühen Phase einer viralen Immunantwort messbar wären. (27) Auch die IL-17-Spiegel sind bei einer Vielzahl der Patienten erhöht. (28, 29) IL-17 hat unterschiedliche Funktionen, zu denen die Unterstützung der Rekrutierung von Monozyten- und Neutrophilen zählt, sowie die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von B-Zellen (16, 30). Diese Daten stützen die Annahme einer infektionsgetriggerten Krankheitsentstehung.

SLE zeigt zudem eine klare weibliche Prädominanz. Dieser Umstand legt den Verdacht nahe, dass Sexualhormone als entscheidende Modulatoren in der Entstehung der Autoimmunerkrankung eine wichtige Rolle spielen (31).

Zuletzt sei noch erwähnt, dass bestimmte Arzneimittel wie der Vasodilatator Hydralazin und das Antiarrhythmikum Procainamid zum Krankheitsbild des Medikamenteninduzierten Lupus führen können (32).

#### 1.1.4 Lupusnephritis

50-70% der Patienten entwickeln im Verlauf der Erkrankung eine Nierenbeteiligung. Durch die Ablagerung zirkulierender Immunkomplexe im Glomerulus kommt es zu einer Aktivierung unterschiedlicher Mediatoren, Chemokine (33) und des Komplementsystems. Dadurch wird eine Entzündungsreaktion in Gang gesetzt, die in weiterer Folge zur Glomerulonephritis führt.

Es gibt zwei unterschiedliche Theorien, wie die Gewebeschädigung der Niere bei Lupus-Patienten zustande kommt. Die erste besagt, dass pathogene, hoch-affine anti-dsDNA oder anti-Nukleosomen Autoantikörper an die im Blut des Patienten zirkulierenden Nukleosomen bindet. Dadurch kommt es zur Formation von Antikörper-Nukleosomen-Komplexe die sich in der glomerulären Basalmembran ablagern. (34)

Ein alternatives Krankheitsmodell wiederum postuliert, dass die hoch-affinen anti-dsDNA und/oder anti-Nukleosomen Antikörper mit in der Niere vorkommenden Proteinen wie  $\alpha$ -Actinin

kreuzreagieren. Dies wiederum soll einen direkten pathogenen Effekt auf die renalen Zellen haben. (35)

Auch eine Reihe unterschiedlicher Leukozytenpopulationen, darunter zytotoxische T-Zellen, TH17-Zellen, sowie B-Zellen infiltrieren Chemokin-gesteuert die Niere und tragen dort zur Gewebsentzündung bei (30, 36).

Die Nierenbeteiligung äußert sich durch folgende Symptome:

**Tabelle 1: Klinik der Lupusnephritis (9)**

<b>Klinik der Lupusnephritis</b>	<b>%</b>
<b>Proteinurie</b>	100
<b>Nephrotisches Syndrom</b>	45-65
<b>Erythrozytenzylinder</b>	10
<b>Mikrohämaturie</b>	80
<b>Makrohämaturie</b>	1-2
<b>Eingeschränkte Nierenfunktion</b>	40-80
<b>Rapid progrediente Glomerulonephritis</b>	30
<b>Hypertonie</b>	15-50
<b>Hyperkaliämie</b>	15

Zum Ausschluss einer Lupusnephritis sollten als basisdiagnostische Maßnahmen die mikroskopische Untersuchung des Urinsediments, Urin-Teststreifen, Messung der 24-Stunden-Proteinurie, sowie die Bestimmung der Kreatininclearance erfolgen (9). Die Konzentration von Anti-C1q-Antikörpern im Serum korreliert gut mit der Aktivität der Lupusnephritis. Anti-C1q-Antikörper scheinen darüber hinaus eine stärkere Assoziation mit der renalen Erkrankung des SLE aufzuweisen als anti-dsDNA-Antikörper oder erniedrigte Komplementfaktorkonzentrationen und werden deshalb als wertvoller serologischer Marker für die Bestimmung der Erkrankungsaktivität und von Erkrankungsschüben diskutiert (37, 38). Bei einem pathologischen Befund sollte eine Nierenbiopsie durchgeführt werden, da durch das histologische Ergebnis eine Einteilung der Lupusnephritis in die von der WHO (World Health Organization) festgelegten Klassen erfolgen kann (39).

Die WHO teilt die Lupusnephritis anhand der Präsenz Licht-, Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopischer Charakteristika in sechs verschiedene Klassen ein. Mittlerweile wurde das WHO Klassifizierungsschema von der ISN/RPS (International Society of Nephrology/Renal Pathology Society) Klassifikation ersetzt (8, 40). Bei der Lupusnephritis handelt es sich um eine Immunkomplexglomerulonephritis, die zu folgenden Veränderungen führen kann (40):

1. Tubulointerstitielle Nephritis mit oder ohne Immunkomplexablagerungen in der tubulären Basalmembran.
2. Vaskuläre Veränderungen mit Immunkomplexablagerungen in den Gefäßen, mikrovaskuläre Zylinder oder thrombotische Mikroangiopathie.
3. Sehr selten wird eine „pauci-immune“ Glomerulonephritis mit wenigen oder keinen Immunkomplexablagerungen bei der Lupusnephritis beobachtet.

**Tabelle 2: Abgekürzte Version der ISN/RPS Klassifizierung der Lupusnephritis (40)**

<b>Klasse</b>	<b>Bezeichnung</b>
<b>I</b>	Minimale mesangiale Lupusnephritis
<b>II</b>	Mesangiale proliferative LN
<b>III</b>	Fokale LN <sup>a</sup>
<b>IV</b>	Diffuse segmentale (IV-S) oder globale (IV-G) LN <sup>b</sup>
<b>V</b>	Membranöse LN
<b>VI</b>	Fortgeschrittene sklerosierte LN

<sup>a</sup>Bezeichnet den Anteil der Glomeruli mit aktiven und sklerosierenden Läsionen

<sup>b</sup>Bezeichnet den Anteil der Glomeruli mit fibrinoiden Nekrosen und zellulären Halbmonden

### 1.1.5 Erfassung der Krankheitsaktivität

Eine genaue klinische Bewertung der Krankheitsaktivität ist wünschenswert, da diese Erkrankung einen komplexen Phänotyp, sehr variablen Krankheitsverlauf und eine kumulative Morbidität über die Zeit hinweg aufweist, da immer neue Organsysteme betroffen sein können – selbst 5-10 Jahre nach der Diagnosestellung. Aus diesen Gründen sind die genaue Anamneseerhebung, eine gründliche körperliche Untersuchung und Laboranalysen erforderlich, um die Krankheitsaktivität, die Gewebeschädigung und die individuellen Auswirkungen der Erkrankung auf den Patienten zu erfassen.

Da die erhobenen Befunde für sich allein den Status des Patienten nur unzureichend beschreiben, wurden standardisierte Bewertungsbögen entwickelt, die die Krankheitsaktivität des SLE erfassen sollen.

Die Tabelle listet die gängigen Messverfahren auf:

**Tabelle 3: standardisierte Messverfahren der Krankheitsaktivität bei SLE**

<b>SLEDAI</b>	SLE Disease Activity Index, SLE Krankheitsaktivität-Index
<b>BILAG</b>	British Isles Lupus Assessment Group
<b>SLAM</b>	Systemic Lupus Activity Measure

<b>LAI</b>	Lupus Activity Index
<b>ECLAM</b>	European Consensus Lupus Activity Measurement

Der SLEDAI ist wahrscheinlich das am einfachsten zu verwendende Tool. Insgesamt sind 24 für den Lupus charakteristische Symptome aufgeführt, die je nach betroffenem Organ und der damit einhergehenden gesundheitlichen Beeinträchtigung mit unterschiedlicher Gewichtung gewertet werden. Renale, neurologische und vaskulitische Manifestationen werden höher gewertet als beispielsweise kutane. Die maximal zu erreichende Punktezahl beträgt 105 (8). Der SLEDAI ist ein validiertes Modell zur Erfassung der Krankheitsaktivität des SLE und spiegelt die übereinstimmende Meinung einer Experten-Gruppe im Gebiet der Lupus-Forschung wider (41).

### 1.1.6 Therapie des SLE

Das Ziel beim SLE ist es, im Rahmen der Therapie eine dauerhafte Remission der Erkrankung zu erzielen, um vor allem eine irreversible Nierenschädigung abzuwenden. Die konventionellen Behandlungsschemata setzen sich je nach Schwere der Erkrankungsaktivität aus unterschiedlichen Medikamenten zusammen. Zu diesen gehören nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente (NSAIDs = non steroidal anti-inflammatory drugs), Glukokortikoide, Antimalaria-Mittel wie Hydroxychloroquin und Chloroquin, und zytotoxische Medikamente.

Die eben genannten Medikamente wirken nicht spezifisch immunsuppressiv. Aufgrund des mittlerweile besseren Verständnisses der Pathogenese des SLE, sollen zukünftige Therapieansätze gezielter in das Immunsystem des Patienten eingreifen. Neue Behandlungsstrategien fokussieren auf die B-Zell-Depletion, die Verminderung der T-Zellen, Blockade co-stimulatorischer Signalwege, Zytokin-Inhibition sowie die Modulation des Komplementsystems. (42)

Die Antimalariamittel (AMs) Hydroxychloroquin und Chloroquin haben einen bedeutsamen Einfluss auf die Langzeitprognose des SLE gezeigt (43). Die Wirkweise der AMs ist noch nicht völlig verstanden, aber man nimmt an, dass sie eine pH-Erhöhung in den intrazellulären Vakuolen bewirken und damit in die Antigen-Präsentation der Makrophagen und anderer Antigen-präsentierender Zellen eingreifen und die Antigen-präsentierende Funktion vermindern, und darüber hinaus auch noch die Aktivierung der Toll-like Rezeptoren beeinträchtigen (16). Laut der bisherigen Empfehlungen waren die AMs auf Patienten ohne schwerwiegende Organbeteiligung beschränkt (2, 43). Neueren Erkenntnissen zufolge sollten die AMs aufgrund des breiten Spektrums an positiven Effekten jedoch allen Patienten mit SLE verabreicht werden (16). Zu diesen gehören neben der immunmodulatorischen und

entzündungshemmenden Komponente die anti-hyperglykämische, anti-thrombotische sowie anti-hyperlipidämische Wirkung, wodurch sich auch ein potentieller Einfluss auf die Entstehung von Atherosklerose, die bei Patienten mit SLE erhöht ist, ergibt. (16, 43, 44).

Grundstein in der Behandlung des systemischen Lupus sind nach wie vor Glukokortikoide, die zur schnellen Kontrolle von Krankheitsschüben, schweren als auch milden Verläufen eingesetzt werden (45). Allerdings müssen bei einer Langzeittherapie die massiven Nebenwirkungen in Betracht gezogen werden. Dazu gehören die erhöhte Anfälligkeit für Infektionen, Osteoporose, Diabetes, Bluthochdruck und das Risiko einer frühen Atherosklerose (16). Um einer Steroid-induzierten Osteoporose entgegen zu wirken, ist die Einnahme von Calcium und Vitamin D empfehlenswert. (13, 46).

Laut Empfehlungen der *European League against Rheumatology* (EULAR) von 2008 soll bei unzureichendem Ansprechen auf AMs, Steroide und NSAIDs auf zytotoxische Medikamente wie Azathioprin, Cyclophosphamid, Mycophenolat Mofetil oder Methotrexat umgestiegen werden (2).

Durch das immer bessere Verständnis der Pathogenese des SLE ergeben sich neue Angriffspunkte in der Therapie der Erkrankung. Neueren Erkenntnissen zufolge liegt der Schlüssel für eine effektive Therapie eben genau in der Entstehung der Krankheit, bei der bekanntlich B- und T-Zellen, co-stimulatorische Moleküle, Zytokine und andere Faktoren involviert sind. (42)

Das erste Biologikum, das seine Effektivität in zwei großen randomisierten Studien bewies und speziell zur Therapie des Systemischen Lupus erythematoses zugelassen wurde, ist Belimumab (47, 48). Bei Belimumab handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der spezifisch ein bestimmtes Zytokin bindet. Bei diesem handelt es sich um den B-Lymphozyten-Stimulator (BLyS = B lymphocyte stimulator) oder auch B-Zell aktivierender Faktor (BAFF = B-cell activating factor) genannt, ein löslicher Ligand der zur Tumornekrosefaktor(TNF)-Familie gehört (49). Dieses Zytokin hat die Aufgabe, das Überleben und die Reifung von B-Zellen zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen zu unterstützen (50). Laut einer Studie von *Iaccarino et al.* vermindert die Anwendung von Belimumab die Anzahl der Krankheitsschübe und verhindert die Progression der Organschädigung (51).

Weitere Biologika zielen auf die Beeinflussung der co-stimulatorischen Signale von T- und B-Zellen, während sich ein anderer Ansatz auf die Inhibition bestimmter Zytokine stützt wie TNF- $\alpha$ , Interleukin (IL)-1 und IL-6.

Durch die Einführung der Janus Kinase Inhibitoren, mit denen bereits Erfolge in der Therapie hämato-onkologischer Erkrankungen erzielt werden konnten, erhofft man sich auch bei



rheumatologischen Krankheitsbildern wie dem SLE eine Verbesserung der Krankheitsaktivität. (52, 53)

## **1.2 Psoriasis-Arthritis**

Die Psoriasis-Arthritis (PsA) ist eine entzündliche Gelenkerkrankung die mit Psoriasis in Zusammenhang steht, und gehört zum Formenkreis der Spondyloarthritiden. Zu diesen zählen neben der PsA die ankylosierende Spondylitis (M. Bechterew), die reaktive Arthritis (Reiter Syndrom), die enteropathische Arthritis sowie die undifferenzierte Spondyloarthritis. Bei den Spondyloarthritiden handelt es sich um chronisch-entzündliche Gelenkerkrankungen, die bevorzugt das Achsenskelett befallen, sowie mit einer genetischen Disposition und dem Fehlen von Rheumafaktoren assoziiert sind (54). Rheumafaktoren sind Antikörper, die gegen körpereigenes Immunglobulin G gerichtet sind und den Immunglobulinklassen IgM, IgG, IgA und IgD angehören können. (16)

### 1.2.1 Prävalenz und Inzidenz der Psoriasis-Arthritis

Die Datenlage im Bereich der Epidemiologie dieses Krankheitsbildes ist relativ schwach und die Daten hierzu variieren erheblich (55). Der Grund hierfür liegt unter anderem daran, dass es keine allgemein anerkannten Kriterien zur Diagnose der PsA gibt und sich damit die Abgrenzung von anderen chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen, wie zum Beispiel der rheumatoiden Arthritis, schwierig gestaltet (54, 56).

Die Prävalenz liegt bei 1-2/1000 in der allgemeinen Bevölkerung und die Inzidenz bei annähernd 6/100.000 im Jahr, wobei Männer und Frauen etwa gleich häufig betroffen sind (57–60). Das Auftreten der entzündlichen Arthritis bei Patienten mit Psoriasis schwankt zwischen 6 – 42% (54). Die durch zwei große Studien in Deutschland ermittelte Prävalenz liegt zwischen 19 und 20,6 %, was der tatsächlichen Prävalenz in Zentraleuropa wohl sehr nahekommt (*Radtko et al. 2009, Reich et al. 2009*). Typischerweise tritt die Erkrankung zwischen dem 40 – 50. Lebensjahr auf, kann aber auch bei Kindern und älteren Patienten vorkommen (56). Etwa 20% der Patienten entwickeln die Arthritis vor dem Auftreten von Hautläsionen, was zu einer falschen Diagnosestellung führen kann (16, 61).

### 1.2.2 Klinische Präsentation der Erkrankung

Die ersten Klassifikationskriterien für die PsA stammen aus dem Jahre 1973 von *Moll und Wright*. Entsprechend dieser Kriterien kann die Diagnose einer PsA gestellt werden, wenn beim Patienten eine Psoriasis sowie eine entzündliche Arthritis vorliegen und keine Rheumafaktoren nachweisbar sind, man also von einem „seronegativen“ Verlauf spricht (62). Dies ist für die Diagnosestellung richtungsweisend, da der Rheumafaktor bei über 80% der rheumatoiden Arthritis-Patienten positiv ist, bei PsA-Patienten hingegen bei 5 – 13 % (63).

2006 wurde von einer Studiengruppe ein neues Klassifikationsschema erarbeitet, die sogenannten CASPAR (CIASsification criteria for Psoriatic ARthritis) Kriterien.

**Tabelle 4: CASPAR Kriterien für Psoriasis Arthritis:** Voraussetzung ist das Vorhandensein einer entzündlichen muskuloskelettalen Erkrankung (Gelenke, Wirbelsäule, Entesen) plus  $\geq 3$  Punkte folgender Erscheinungen (64):

• <b>Aktuelle Psoriasis</b>	2
- Psoriasis in der Anamnese	1
- Psoriasis in der Familienanamnese	1
• <b>Nagelpsoriasis</b>	1
• <b>Negativer Rheumafaktor</b>	1
• <b>Aktuelle Daktylitis</b> oder Anamnese einer Daktylitis wenn aktuell keine vorliegt	1
• <b>Radiologisch</b> erkennbare juxtaartikuläre Knochenneubildungen an Händen oder Füßen	1

Bei etwa 20% der Patienten kann die Manifestation der Arthritis den Hautläsionen vorausgehen, man spricht in diesem Fall von „PsA sine psoriase“ (61). Dieser Fall macht eine korrekte Diagnosestellung oftmals zu einem schwierigen Unterfangen. Für gewöhnlich präsentiert sich die PsA als oligoartikuläre Erkrankung, bei der oft nur ein bis zwei Gelenke stark geschwollen erscheinen, kann aber auch als symmetrische Polyarthritiden imponieren, die manchmal als rheumatoide Arthritis (RA) missinterpretiert wird (16, 65). In einigen Fällen sind die führenden klinischen Symptome Spondylitis, entzündliche Nackenschmerzen, axiale Symptome wie tiefsitzender Rückenschmerz (56). Darüber hinaus ist eine Haut- und Nagelbeteiligung sowie eine Entzündung der Sehnen, als Enthesitis bezeichnet, richtungsweisend für die PsA (16). Häufig betroffen sind die Fußnägel, wobei die Nagelmanifestation leicht mit einer Pilzinfektion verwechselt werden kann (66). Enthesitiden äußern sich als Entzündung an den Ansatzstellen der Sehnen, von Bändern oder den Gelenkkapseln und betreffen meist die untere Extremität, hier vor allem die Plantarfaszie und die Achillessehne (1, 56, 67).

Daktylitis bezeichnet die Entzündung des gesamten Fingerstrahls, wobei man umgangssprachlich häufig von sogenannten „Wurstfingern“ oder „Wurstzehen“ spricht (67, 68). Dies ist ein weiteres klinisches Kennzeichen der PsA und tritt in etwa der Hälfte aller Fälle auf (59, 65). Häufig sind die distalen Interphalangealgelenke befallen, was meist mit einer Nagelpsoriasis einhergeht (65). Radiographisch imponiert das Bild einer gleichzeitigen Knochenresorption sowie Knochenproliferation, welches zum sogenannten „pencil in cup“ Phänomen führt, und ein weiteres wichtiges Kennzeichen der PsA repräsentiert (1, 56, 59, 65,

67).

Gravierende Krankheitsverläufe können beim Patienten zu irreversiblen Gelenkschäden führen mit dem Auftreten des „Teleskop“-Phänomens oder auch als „Opernglas-Finger“ bezeichnet. Hervorgerufen wird dies durch die Resorption des distalen Phalangen (1, 54, 69). Man spricht in diesem besonderen Fall von Arthritis mutilans (70).

Unspezifische Entzündungsparameter wie die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und das C-reaktive Protein sind häufig normal oder nur leicht erhöht. Obwohl zu den ursprünglichen Klassifikationskriterien von *Moll und Wright* die Seronegativität zählt, findet man bei bis zu 13% der PsA-Patienten einen positiven Rheumafaktor (59, 71). In den Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis findet man ihn hingegen in 70 – 90 % der Fälle (72). Die geschätzte Prävalenz der Antikörper gegen citrullinierte Peptidantigene (anti-CCP-Antikörper oder ACPA) schwankt zwischen 6 – 16% (16, 63, 73, 74). Das Vorliegen von anti-CCP-Antikörper bei PsA-Patienten ist signifikant mit einem erosiven Krankheitsverlauf assoziiert (75).

Obwohl man die PsA viele Jahre für eine milde Form einer entzündlichen Arthritis hielt, klagen die Patienten über chronische Gelenkschmerzen, Erschöpfung, eingeschränkte Mobilität und eine allgemein verringerte Lebensqualität im Vergleich zur gesunden Bevölkerung (76, 77). Darüber hinaus findet sich bei manchen der PsA-Patienten ein vermehrtes Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen (78–80). Dieses erhöhte Risiko ist womöglich zurück zu führen auf die systemische Entzündung, die zu atherogenen Prozessen beiträgt (67).

### 1.2.3 Pathogenese

Wie bei vielen Autoimmunerkrankungen ist der exakte Mechanismus der Pathogenese nicht völlig geklärt. Als potentielle Ursachen werden genetische, immunologische und Umweltfaktoren diskutiert, die auf unterschiedliche Art und Weise zur Krankheitsentstehung beitragen können (81, 82).

Psoriasis und PsA haben eine starke genetische Komponente, wie in Familien- und Zwillingsstudien nachgewiesen werden konnte (71). Etwa 40 % der PsA-Patienten haben eine positive Familienanamnese für diese Erkrankung bei Verwandten ersten Grades (83). Zu den bereits identifizierten Genen, die zur Pathogenese beitragen, zählen die Humanen Leukozyten Antigene (HLA) im Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC = major histocompatibility complex) (84). Den höchsten positiven Vorhersagewert hat HLA-B27 (85).

Eines der Krankheitsmodelle besagt, dass durch einen auslösenden Umweltfaktor ein Schaden verursacht wird, welcher wiederum bei genetisch anfälligen Personen zu einer angeborenen Immunantwort führt (67). In einer Fall-Kontroll-Studie wurden einige Umweltfaktoren identifiziert, die zur Krankheitsentstehung der PsA beitragen können (86). Dazu zählen Röteln-Impfungen, Umzug, rezidivierende orale Ulzerationen, Knochenbrüche,

das Heben schwerer Gewichte, Infektionen, die einer antibiotischen Behandlung bedürfen und Verletzungen (67, 86, 87). Die Rolle eines Traumas scheint bisher sehr überzeugend. Fallstudien zeigen, dass in 8 – 9% der Patienten ein kürzlich geschehenes Trauma dem Auftreten der Erkrankung vorausgeht (67, 88, 89). Im Zusammenhang mit der Pathogenese wird auch das sogenannte „Koebner“ Phänomen besprochen, welches ein Trauma auf intakter Haut bezeichnet, das im weiteren Verlauf zu einer Entzündung der Synovialmembran und des Sehnenapparates sowie einer peripheren Arthritis führen kann (67, 90). Auch Übergewicht soll ein erhöhtes Risiko für die Entstehung der PsA darstellen, insbesondere wenn es bereits im Alter von 18 Jahren besteht. Zudem ist Adipositas mit höheren Spiegeln an proinflammatorischen Zytokinen assoziiert, was bei der Psoriasis bereits bekannt ist (91).

Die Beteiligung des Gewebes umfasst bei der PsA die Synovialis, also jene Schleimhaut, die für die Produktion der Gelenksflüssigkeit zuständig ist, die Haut, die Entesen, die die Anheftungsstellen der Bänder und Sehnen am Knochen bezeichnen, sowie die Gelenkkapsel. Wichtige Merkmale der PsA sind außerdem die Angiogenese, also die Neubildung von Blutgefäßen, endotheliale Aktivierung und die Infiltration von Neutrophilen Granulozyten ins synoviale Gewebe (84).

Untersuchungen von Gelenken, Synovia und Haut zeigen, dass in diesen Geweben eine starke lymphozytäre Infiltration an aktivierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen vorliegt. CD4<sup>+</sup> Zellen findet man in erster Linie in den unteren Hautschichten, vor allem in den dermalen Anteilen, während die CD8<sup>+</sup> Zellen eher in die Epidermis und die Entesen einwandern und dort die Entzündungsreaktion vorantreiben (67, 92). T-Zellen in der Synovialflüssigkeit gehören vorwiegend zum CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subset (93, 94). Interessanterweise korreliert die erhöhte Anzahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit erhöhten Werten der BSG und des CRP.

Das Synovialgewebe von PsA-Patienten weist überdies eine übermäßige Expression an proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-15, IL-17 und IL-18 auf (84, 95, 96). Diese Zytokine haben unterschiedliche Eigenschaften, die u. a. die Hochregulation von Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen betrifft und so die Infiltration proinflammatorischer Zellen an die Entzündungsherde begünstigt (67).

Neben T-Zellen haben auch Dendritische Zellen, als professionelle Antigen-präsentierende Zellen, eine wichtige Funktion in der Psoriasis. Plasmazytoide CD123<sup>+</sup> Dendritische Zellen bspw. fungieren als wesentliche Produzenten von INF- $\alpha$  (16).

Eine weitere Subgruppe der T-Zellen, die 2005 entdeckt wurde, sind die Th17-Zellen (97, 98). Diese können im Blutkreislauf und der Synovialflüssigkeit von PsA-Patienten in erhöhtem Maße nachgewiesen werden, in Arthrose-Patienten jedoch nicht (99, 100). Darüber hinaus korreliert die IL-17A Expression in den Hautläsionen mit der Krankheitsaktivität der Patienten

(67, 101). Die Tatsache, dass neue Therapieansätze durch die Beeinflussung des IL-23/Th17-Signalweges gute Erfolge erzielen konnten, unterstützt die Annahme, dass Th17 Zellen eine wichtige Funktion in der Pathogenese der PsA einnehmen (102). IL-23 wiederum, welches von Dendritischen Zellen und Keratinozyten in psoriatischer Haut produziert wird, bedingt die Proliferation von Th17 Zellen, die ihrerseits wieder IL-17 sezernieren (16). In psoriatischen Hautläsionen findet man signifikant erhöhte Werte von IL-23 im Vergleich zu nicht befallenen Hautarealen und normaler Haut (103, 104).

Zytokine wie TNF- $\alpha$  findet man in großen Mengen in der Synovia, aber auch in psoriatischen Hautläsionen sowie entzündlichen Arthropathien (1). Zudem fördert TNF- $\alpha$  gemeinsam mit IL-1 $\beta$  die Produktion von Matrix Metalloproteinasen durch Makrophagen (105), die bei der PsA erhöht sind und zur Zerstörung des Gelenkknorpels beitragen (106, 107). TNF- $\alpha$  unterstützt darüber hinaus die Differenzierung von Vorläuferzellen der Osteoklasten, deren physiologische Aufgabe der Abbau von Knochengewebe ist. Ihre Einwanderung in entzündete Gelenkstrukturen wie der Synovialis verursacht den charakteristischen fortschreitenden Knochenabbau/bzw.-schaden (108).

#### 1.2.4 Therapie der Psoriasis-Arthritis

Die Behandlung der PsA umfasst die Applikation von NSAIDs bei milden Gelenksymptomen. Bei mittleren bis schweren Verläufen folgt der Einsatz von DMARDs, während neuere Medikamente, spezielle Biologika wie die TNF-Inhibitoren, bei ausbleibendem Therapieerfolg zur Anwendung kommen (109–112). Je komplexer sich ein PsA-Patient präsentiert, desto eher ist eine duale Behandlung sowohl durch einen Rheumatologen als auch durch einen Dermatologen erforderlich, um eine optimale Versorgung des Patienten gewährleisten zu können (16). Die Behandlungsziele umfassen neben der Verbesserung der Lebensqualität auch die Verhinderung der weiteren Progression der Gelenkzerstörung sowie die Senkung der Mortalität (56, 112–115). Das bessere Verständnis der Pathogenese stellt somit eine wichtige Voraussetzung zur Etablierung neuer, effektiver und hochspezifischer Behandlungsstrategien dar (1, 116).

Zu den unspezifischen DMARDs, die bei der PsA zur Anwendung kommen, zählen MTX, Sulfasalazin, Leflunomid und Ciclosporin A (1, 67, 117). Diese Medikamente werden häufig in der systemischen Basistherapie der PsA eingesetzt. Ihre Effizienz ist in klinischen Studien jedoch relativ schwach, da bspw. keine Beweise vorliegen, dass MTX strukturelle Gewebsschäden aufzuhalten vermag (117, 117–120). Trotz alledem wird MTX als DMARD der ersten Wahl eingesetzt, entweder als Monotherapie oder in Kombination, bspw. mit NSAIDs (56, 111, 112).

Abatacept ist ein Fusionsprotein, das aus dem humanen zytotoxischen T-Lymphozyten-assoziierten Protein-4 (CTLA-4) und einem humanen IgG1-Anteil besteht. Die Zielstruktur dieses Medikamentes ist die T-Zelle. Das Fusionsprotein verhindert die co-stimulatorische Wechselwirkung zwischen CD80/86 auf der Antigen-präsentierenden Zelle und CD28 auf T-Lymphozyten, wodurch es zu einer verminderten T-Zell-Aktivierung kommt. Abatacept ist indiziert bei einem nicht ausreichenden Ansprechen auf TNF-Inhibitoren. (109, 121)

2015 erfolgte die Zulassung von Apremilast, eines oral verfügbaren, selektiven Phosphodiesterase (PDE4)-Inhibitors. Das Enzym PDE4 ist beim Abbau von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) beteiligt, seine Blockade erhöht die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Dies führt dazu, dass Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-23 vermindert produziert und sezerniert werden und im Allgemeinen die Entzündung herunterreguliert wird. Gleichzeitig kommt es zu einer erhöhten Produktion anti-inflammatorischer Zytokine, zu denen das IL-10 gehört. Im Gegensatz zu den vorher genannten Therapeutika zielt Apremilast nicht auf einen spezifischen Mediator ab, sondern versucht das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Signalen wieder her zu stellen, was in Phase 2 Studien durch eine signifikante Reduktion klinischer Symptome auch erreicht werden konnte. (109, 122, 123)

Von der amerikanischen Behörde für Lebens- und Arzneimittel (US Food and Drug Administration = FDA) und Gesundheitsadministrationsen anderer Länder sind bereits fünf TNF-Inhibitoren zur Behandlung der PsA zugelassen. Zu diesen zählen Adalimumab, Infliximab, Golimumab, Certolizumab pegol und Etanercept. Jedes dieser Medikamente inhibiert auf unterschiedliche Art und Weise das TNF- $\alpha$ , das als proinflammatorisches Zytokin auch bei vielen weiteren Autoimmunerkrankungen eine Schlüsselfunktion besitzt. (121) Die TNF-Inhibitoren vermindern neben der T-Zell Infiltration in die Haut und Gelenke auch noch die Einwanderung von Makrophagen in die Synovia und verzögern oder verhindern sogar den radiologischen Erkrankungsfortschritt und vermindern Knochenerosionen (67, 124, 125).

IL-23 spielt in der Regulation und Aktivierung von T<sub>H</sub>17-Lymphozyten eine wichtige Rolle und folglich auch in der Produktion von IL-17 und anderer proinflammatorischer Zytokine. IL-12 wiederum spielt eine Rolle im Th1-Entzündungsweg. (126) Ustekinumab, ein humaner monoklonaler IgG1-Antikörper, greift in den IL-12/IL-23 Signalweg ein und erzielt dadurch eine indirekte Hemmung des IL-17 (121). Ustekinumab zeigte im Vergleich zu Placebokontrollen eine signifikante Verringerung der Zeichen und Symptome der PsA sowie eine bessere Effektivität gegen Hautmanifestationen, Enthesitiden und Daktylitiden (67, 127).

Eine weitere Möglichkeit der Therapie besteht in der direkten Hemmung von IL-17 durch neue, derzeit noch in der Erprobung befindliche IL-17-Antagonisten zu denen Secukinumab, Ixekizumab und Brodalumab gehören (67). Bei den ersten beiden Biologika handelt es sich

um monoklonale anti-IL-17 Antikörper, Brodalumab hingegen ist ein humaner monoklonaler Antikörper gegen den IL-17-Rezeptor (128). Die nachgewiesene Effektivität dieser Medikamente im Vergleich zu Placebo unterstreicht auch die Rolle des IL-17 und seinen Rezeptoren in der Pathogenese der PsA. Die Risikofaktoren der IL-17-Antagonisten entsprechen denen der TNF-Inhibitoren mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von ernsten Infektionen und malignen Entartungen aufgrund der unterdrückten T-Zell Antwort. (67, 129)

### **1.3 Granulomatose mit Polyangiitis**

Nach den überarbeiteten Chapel-Hill-Consensus Conference Kriterien von 2012 zählt die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA), vormals Morbus Wegener oder Wegener'sche Granulomatose, gemeinsam mit der Mikroskopischen Polyangiitis (MPA) und der Eosinophilen Granulomatose mit Polyangiitis, ehemals als Churg-Strauss-Syndrom bezeichnet, zu den ANCA-assoziierten Vaskulitiden der kleinen Gefäße (130). Die Erkrankungen sind charakterisiert durch das Vorhandensein von Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA) und ähnliche histologische Merkmale (131). Bei der GPA handelt es sich um eine nekrotisierende Vaskulitis der kleinen bis mittelgroßen Gefäße, die im lokalen Anfangsstadium am häufigsten den respiratorischen Trakt und im systemischen Stadium über die vaskulitische Komponente eine renale Mitbeteiligung in Form einer nekrotisierenden Glomerulonephritis bedingen kann (132).

#### **1.3.1 Prävalenz und Inzidenz der GPA**

Die ANCA-assoziierten Vaskulitiden sind seltene Erkrankungen, daher ist eine große Population nötig, um die exakte Inzidenz und Prävalenz zu eruieren (133).

Die höchste Inzidenzrate mit geschätzten 10-20 Fällen/Million wird im Alter von 64 – 75 Jahren beobachtet, wobei Männer und Frauen gleich häufig betroffen sind (132, 133). Im Allgemeinen tritt die GPA häufiger bei älteren und weißen Menschen auf, kann aber auch bei Kindern und Jugendlichen sowie Menschen dunkler Hautfarbe zu Tage treten (131). Die Inzidenz der GPA hat seit dem Jahr 1980 zugenommen, was wohl einerseits auf ein vermehrtes Bewusstsein der Ärzte und andererseits auf die Einführung der ANCA-Testung zurückzuführen ist (134). Die Prävalenz der Erkrankung liegt abhängig von der geographischen Lokalisation bei 8 – 10 pro Million. So ist laut *Watts et al.* die Granulomatose in nördlichen Regionen Europas wie Großbritannien, Norwegen aber auch Deutschland häufiger zu beobachten, die MPA hingegen im Süden Europas (134–136). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass sowohl die GPA als auch die MPA auf unterschiedlichen genetischen Anomalien beruhen, die mit unterschiedlichen ethnischen Hintergründen in Verbindung stehen (16).

### 1.3.2 Ätiologie der Erkrankung

Als Auslöser der Erkrankung werden Infektionen, genetische Disposition und Umweltfaktoren diskutiert, auch eine Kombination der drei Faktoren erscheint möglich (137). Die genauen Gründe sind aber derzeit noch nicht bekannt.

Es handelt sich bei der GPA um eine komplexe Autoimmunerkrankung, wobei die Gewebsdestruktion aus dem Zusammenspiel einer zu Beginn entzündlichen Reaktion und einer spezifischen Immunantwort darauf entsteht. Partiiell ist diese Antwort gegen vormals abgeschirmte, kryptische Epitope auf Neutrophilen Granulozyten gerichtet, die zur Bildung der sogenannten Antineutrophile zytoplasmatische Antikörper führt (138). Dies ist eines der wichtigsten Kennzeichen der GPA und anderer Vaskulitis-Formen, eben der ANCA-assoziierten Vaskulitiden. Bei etwa 85 % der GPA-Patienten sind ANCAs nachweisbar, die in 70-80% der Fälle gegen Proteinase-3 gerichtet sind (139). Das zweithäufigste untersuchte Antigen bei der GPA ist die Myeloperoxidase (MPO), die bei etwa 10 % der Patienten vorzufinden ist, allerdings in höheren Maße mit den Phänotypen der MPA und EGPA assoziiert ist (140, 141). Oftmals sind sowohl anti-PR3 und anti-MPO Antikörper vorzufinden (144).

In Fall-Kontroll-Studien konnte ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Erkrankung und der Exposition mit Silikonstaub hergestellt werden (145–148). Als weiterer prädisponierender Faktor wird *Staphylococcus aureus* angesehen (149). Nasale Träger dieses gram-positiven Bakteriums weisen zudem eine höhere Rückfallrate auf (150).

Neben den im Abschnitt 1.3.1 erwähnten geographischen und damit auch klimatisch unterschiedlichen Bedingungen, sowie die soeben angesprochenen bakteriellen Infektionen des Respirationstraktes und die Exposition zu Silikonstaub, zählen auch einige Medikamente als Risikofaktoren (137). Hierzu gehören das Thyreostatikum Propylthiouracil sowie das Antihypertensivum Hydralazin (151). Durch Administration dieser Medikamente kommt es offenbar bei genetischer Prädisposition zu einer Induktion von ANCAs und klinischen Symptomen einer Vaskulitis (151, 152).

Der Mechanismus der ANCA-Produktion basiert womöglich auf der zuvor angesprochenen Antwort des Immunsystems auf sogenannte kryptische Epitope des Zielantigens, die erst nach einer vorausgehenden Gewebsverletzung vom Immunsystem erkannt werden und dieses dann aktivieren können (138). Eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Erkrankung wird den T-Zellen zugesprochen. Diese Vermutung beruht darauf, dass Patienten mit aktiver GPA viel höhere Werte an CD4<sup>+</sup> T-Zellen und aktivierten Monozyten aufweisen als gesunde Kontrollen oder Patienten, die sich in Remission befinden (16). CD4<sup>+</sup> T-Zellen vom Th1-Typ, welche für zellvermittelte Immunantworten verantwortlich sind, scheinen bei der GPA vermehrt



zu sein und durch die Produktion der für sie charakteristischen Zytokine wie TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  die Erkrankung negativ zu beeinflussen (139).

Neben den bereits erwähnten CD4<sup>+</sup> T-Zellen spielen auch B-Zellen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der ANCA-assoziierten Vaskulitiden (153). In großen, randomisierten Studien konnte durch B-Zell-Depletion mittels anti-CD20 Therapie bei den GPA und MPA Patienten eine Remission erzielt werden. Zudem korreliert die Anzahl aktivierter, im Kreislauf zirkulierender B-Zellen mit der Krankheitsaktivität (154).

### 1.3.3 Klinische Präsentation der GPA

Das Krankheitsbild der GPA ist einerseits charakterisiert durch eine granulomatöse Entzündung, die vorrangig in den oberen und unteren Atemwegen anzutreffen ist, sowie eine nekrotisierende vaskulitische Komponente, die vorzugsweise die Nieren und Lungen betrifft (16). Das Vorkommen von Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper mit dem Zielantigen Proteinase 3 und einem zytoplasmatischen Fluoreszenzmuster ist ein sehr nützlicher Parameter zur Diagnosestellung der GPA. Bei Patienten mit hoher Erkrankungsaktivität weist die positive c-ANCA Serologie eine Sensitivität von 91% und eine Spezifität von 99% auf. (155)

Die ACR Kriterien aus dem Jahre 1990 für die GPA beinhalten folgende Punkte:

- Nasale oder orale Entzündung (schmerzhafte oder schmerzlose orale Ulzerationen, eitriger oder blutiger Nasenausfluss)
- Pathologisches Thorax-Röntgen, welches durch Gewebsdestruktion (Infiltrate, knotige Veränderungen, Kavitationen) gekennzeichnet ist
- Abnormales Urinsediment (Mikrohämaturie, Erythrozytenzylinder)
- Granulomatöse Entzündung einer Arterie oder der perivaskulären Zone (durch Biopsie gesichert)

Mithilfe dieser Klassifikation gelingt die Diagnosestellung mit einer Sensitivität von 88,2% und einer Spezifität von 92,0%. Dafür müssen zwei der vier Kriterien zutreffend sein (156).

Die Granulomatose mit Polyangiitis weist ein Initialstadium mit lokal begrenzten pathologischen Veränderungen auf. Im weiteren Verlauf greift die Erkrankung auf andere Organsysteme über und kann auch zu einer komplikationsreichen Nierenbeteiligung führen. In etwa 90% der Patienten sind initial Ohren, Nase und Kehle betroffen. Die Beteiligung der oberen Atemwege ist am häufigsten anzutreffen. Sie zeigt sich vor allem durch eine chronische Rhinosinusitis, die zu eitrigem oder blutigem Nasenausfluss führen kann. Die granulomatöse Entzündung im Kopf-Hals-Bereich äußert sich unter anderem durch eine Schädigung von Schleimhäuten, Knorpel und Knochen, was wiederum zu orbitonasaler Fistelbildung, Nasenseptumperforation und zur sogenannten „Sattelnasen“-Deformität führt, die klinisch

sichtbar ist. Orbitale Granulome werden bei 7 – 45% der GPA-Patienten beschrieben und führen zu Proptosis und eingeschränkter Bulbusmotilität (16, 157). Darüber hinaus verursachen orbitale Granulome starke Schmerzen und können im schlimmsten Fall zur Erblindung führen, die durch die dauerhafte Kompression des Nervus opticus oder direkte Penetration des Nervs durch einwandernde Entzündungszellen zu erklären ist (158).

Die Beteiligung der Atemwege und des Lungenparenchyms, bei 60 – 85 % der Patienten zu finden, führen zu Husten, Atemnot, Stridor, Hämoptysen und Pleuraschmerzen. Dazu gesellen sich oftmals eine subglottische Stenose, Lungenfibrose, pulmonale Hypertonie und eine diffuse alveoläre Hämorrhagie. Zu den gewöhnlichen radiologischen Manifestationen zählen knotige Veränderungen, diffuse Verschattungen und pulmonale Infiltrate. (16, 131, 159, 160) Differentialdiagnostisch müssen die pulmonale Manifestation einer Sarkoidose oder Tuberkulose ausgeschlossen werden.

Renale Manifestationen können üblicherweise auftreten, wobei im Verlauf der Erkrankung bis zu 80% der Patienten eine nekrotisierende Glomerulonephritis entwickeln (16, 161). Die Klinik reicht von asymptomatischer Erythrozyturie bis hin zu rapid progressiver Glomerulonephritis mit Oligo- oder Anurie (16). Das Risiko eines Nierenversagens ist bei ANCA-positiven Verläufen als beträchtlich höher einzustufen. Die Beobachtung des Serum-Kreatinins gehört zur Basis-Laboruntersuchung bei GPA-Patienten, genauso wie die Kontrolle einer womöglich existenten Hämaturie.

Häufig (bis zu 80 %) sind im systemischen Stadium muskuloskelettale Symptome wie Arthralgien, Myalgien und Arthritiden anzutreffen (16, 162). Zu den das ZNS betreffende Manifestationen gehören die sensorische Neuropathie, Hirnnervenlähmungen, starke Kopfschmerzen und Enzephalopathie (163, 164). Seltener betroffen sind der Gastrointestinaltrakt und das Herz (165, 166).

#### 1.3.4 Therapie der GPA

Die Ziele der Therapie sind das Erreichen einer Krankheitsremission, Reduktion von Schüben und Minimierung der Medikamententoxizität.

Die Therapie der GPA richtet sich nach der Schwere der aktuellen Erkrankung und den betroffenen Organsystemen. Zudem besteht ein nach der EULAR gültiges Behandlungsschema, welches eine stufenweise Herangehensweise vorsieht und die Therapie in die Phase der Remissionsinduktion und in die Remissionserhaltung einteilt (167).

Als Standard bei Patienten mit neu diagnostizierter GPA gilt die Kombination aus Cyclophosphamid und Hochdosis-Glukokortikoiden (168, 169), wobei Cyclophosphamid sowohl bei täglicher Anwendung als auch bei intravenöser Stoßtherapie dieselbe Effizienz

aufweist (170). Hierbei ist zu beachten, dass Leukopenien, welche ein nicht zu vernachlässigendes Risiko für schwere Infektionen darstellen, bei täglicher Administration häufiger zu beobachten sind (170–172). Bei Anwendung von Cyclophosphamid wird zur Remissionserhaltung nach drei bis sechs Monaten auf MTX oder Azathioprin umgestellt.

Da man den ANCA eine wichtige Rolle in der Pathogenese der GPA und MPA zuschreibt (173), wurden Strategien entwickelt, um die Anzahl Antikörper-produzierenden B-Zellen zu verringern. Zudem sind die diversen Nebenwirkungen der Cyclophosphamid-Therapie nicht zu vernachlässigen. Neben dem vorhin schon genannten erhöhten Risiko schwerer Infektionen, bedingt durch die Leukopenie (174), kam es bei 57% der Patienten zu Infertilität und 43% entwickelten eine hämorrhagische Zystitis (175). Zudem erhöhen Immunsuppressiva wie Cyclophosphamid die Wahrscheinlichkeit, ein Urothelkarzinom, ein Lymphom oder eine Leukämie zu entwickeln (161).

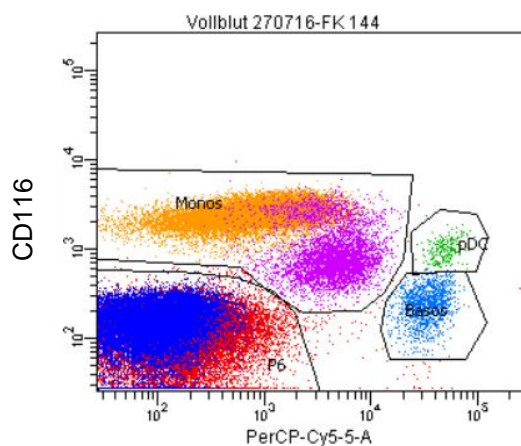
In zwei randomisierten kontrollierten Studien konnte gezeigt werden, dass Rituximab, ein monoklonaler CD20-Antikörper (176), die gleiche Effizienz wie Cyclophosphamid in der Remissionsinduktion besitzt (177–179). Darüber hinaus ist Rituximab das Medikament der Wahl bei Patienten mit therapierefraktärem Erkrankungsverlauf und Patienten mit persistierender PR3-ANCA Positivität (175). Das Therapeutikum wird zudem bevorzugt eingesetzt bei bestehender Kontraindikation gegen Cyclophosphamid, wenn also eine Infektion, Leukopenie, Intoleranz oder ein malignes Geschehen vorliegen oder um die Fertilität junger Patienten zu erhalten (175, 180). Da es sich bei Rituximab um ein potentes Immunsuppressivum handelt, kann es unter der Therapie zu erhöhter Infektneigung kommen, die allerdings nicht mit einem erhöhten Risiko für opportunistische Infektionen einhergeht. Aufgrund der intravenösen Applikationsform kann es zu Infusionsassoziierten Reaktionen kommen, meist bei der ersten Gabe. (175) Trotz der genannten Nebenwirkungen stellt Rituximab, welches im Gegensatz zum Standardmedikament Cyclophosphamid von der amerikanischen Behörde für Lebens- und Arzneimittel (FDA) für diese Indikation zugelassen wurde, eine alternative Behandlungsoption für die Remissionsinduktion ANCA-assoziiierter Vaskulitiden dar (175). Ferner ermöglicht das wachsende Verständnis für die Entstehung dieser Erkrankungen und die potentiellen Faktoren, die darin eine Rolle spielen könnten, einen wichtigen Schritt in die Richtung einer zukünftig selektiveren immunmodulatorischen Therapie (173).

## 2 Theoretischer Hintergrund

Die komplexe und bisher noch nicht vollständig geklärte Pathogenese der Autoimmunerkrankungen, die in dieser Arbeit behandelt werden, stellt eine große Herausforderung für deren Therapie dar.

Es konnten zwar schon einige Zellpopulationen, genetische Faktoren, Chemokine und Zytokine identifiziert werden, die in der Krankheitsentstehung und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle spielen. Die derzeit gängigen Therapieschemata beruhen jedoch nach wie vor auf einer relativ unspezifischen Immunsuppression, die mit einem erhöhten Risiko für Infektionen und anderen Komplikationen, wie auch der Bildung maligner Erkrankungen, einhergehen kann. Die Entwicklung neuerer Medikamente, den sogenannten Biologika, meist monoklonale Antikörper, sollen gezieltere therapeutische Maßnahmen ermöglichen, die sich spezifisch gegen Zytokine oder Rezeptorstrukturen richten und so das Voranschreiten der Autoimmunerkrankung hemmen. Vor allem in den letzten Jahren stieg die Zahl der entwickelten und zugelassenen Biologika, darunter fallen unter anderem Rituximab und Belimumab. Diese neuartigen Medikamente konnten bereits wesentliche Erfolge in der Therapie diverser Autoimmunerkrankungen erzielen, darunter der RA und dem SLE.

In Mausmodellen der Collagen-induzierten Arthritis und des SLE konnte bereits der Einfluss von IL-3 auf die Entstehung und die Krankheitsaktivität gezeigt werden (181). Die vorliegende

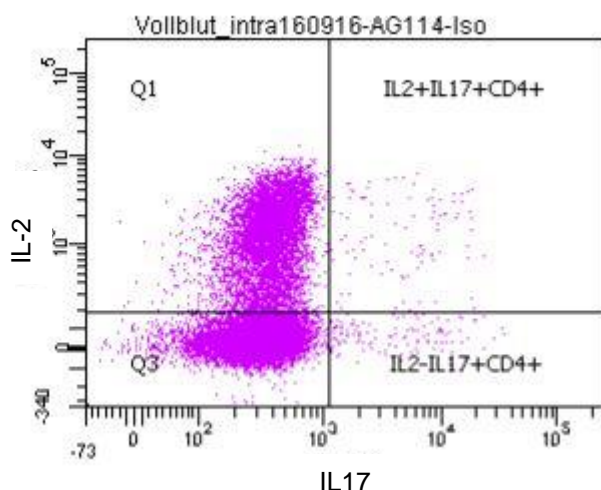


**2.1 Extrazelluläre Färbung 2:**  
*Durchflusszytometrische Identifikation unterschiedlicher mononukleärer Zellen in EDTA-Vollblut. Hier abgebildet Monozyten, periphere dendritische*

Arbeit soll klären, inwieweit dieses Zytokin bei Patienten mit SLE, PsA und GPA mit der Erkrankungsaktivität zusammenhängt.

Die Bedeutung bestimmter Leukozytenpopulationen und deren Expression bei den eben genannten Erkrankungen wurde mittels FACS-Analyse erfasst. Das Hauptaugenmerk liegt hierbei bei CD19<sup>+</sup> B-Zellen, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, plasmazytoiden Dendritischen Zellen, CD123<sup>+</sup>/ Monozyten sowie Basophilen Granulozyten. Im Rahmen dieser Arbeit soll versucht werden, die Rolle dieser Zellen im Zusammenhang mit den Autoimmunerkrankungen besser zu verstehen. Es gilt zudem herauszufinden, ob die Anzahl und Aktivität mit der Erkrankungsaktivität der Patienten korreliert.

Neben dem IL-3 scheint auch ein anderes Zytokin in der Ätiologie eine entscheidende Rolle zu spielen, und zwar IL-17. In der Arbeit von *Apostolidis et al.* befassten sich die Forscher mit den IL-17 produzierenden Zellen in der Lupusnephritis. Es stellte sich heraus, dass die IL-17 Produktion sowie die Zellen, die dieses Zytokin produzieren – CD4<sup>+</sup> sowie TZR (T-Zell-Rezeptor) doppelt negative CD3<sup>+</sup> T-Zellen – bei SLE-Patienten vermehrt nachgewiesen werden können. Darüber hinaus wurden die IL-17-produzierenden Zellen auch im entzündeten



**2.2 Intrazelluläre Färbung von IL-17:**  
Durchflusszytometrische Identifikation  
IL-17 produzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen im  
ELISA-Überstand.

Nierenparenchym bei Lupusnephritis gefunden. Ein weiterer wichtiger Hinweis, der die IL-17 Hypothese stützt, ist die Tatsache, dass Lupus-anfällige Mäuse, zu denen unter anderem MRL/*lpr* Mäuse zählen, nach Ablation der IL-17 Produktion eine klinisch sichtbare Milderung der Autoimmunprozesse sowie der Lupus-bezogenen Pathologie aufweisen (182). Zudem konnten erhöhte IL-17 Spiegel im Blut von SLE-Patienten nachgewiesen werden (29). Anti-IL-17-Antikörper könnten somit in der Behandlung des Lupus von Bedeutung sein und sollten bei der Entwicklung zukünftiger Medikamente berücksichtigt werden. (30)

Die vorliegende Arbeit soll aufklären, ob auch das IL-3 ein potenter pathologischer Faktor bei

den untersuchten Erkrankungen ist und somit einen potentiellen Angriffspunkt für zukünftige Therapieformen darstellen kann.

## 2.1 Interleukin 3

### 2.1.1 Struktur und Funktion

Zusammen mit Interleukin-5 (IL-5) und dem Granulozyten-Makrophagen Koloniestimulierenden Faktor (granulocyte-macrophage colony stimulin factor = GM-CSF) gehört IL-3 zu einer Gruppe hämatopoietischer Zytokine mit 4 kurzen  $\alpha$ -Helices (181). Diese Zytokinfamilie reguliert das Wachstum, die Differenzierung, Migration und Effektorfunktionen vieler hämatopoietischer Zellen und Immunzellen (183). IL-3 induziert eine Signaltransduktion durch Bindung an den IL-3-Rezeptor. Dieser besteht aus einer IL-3-spezifischen  $\alpha$ -Kette (CD123), an die das Zytokin bindet, und einer gemeinsamen  $\beta$ -Kette (CD131), die für die Signaltransduktion verantwortlich ist (184).

Die IL-3 Produktion erfolgt vorwiegend durch aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen (185) und Basophile Granulozyten. Aber auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Mastzellen und B-Zellen können IL-3 produzieren (186). IL-3 unterstützt das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben von CD34<sup>+</sup> hämatopoietischen Vorläuferzellen (181), sowie die Differenzierung Basophiler Granulozyten und Mastzellen im Knochenmark (187, 188). Zusammen mit Interferon- $\beta$  oder IL-4 unterstützt IL-3 die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen (189, 190). Darüber hinaus induziert das Zytokin die Aktivierung von Basophilen Granulozyten und trägt zu deren Überleben bei (181, 191, 192). IL-3 hat überdies einen Einfluss auf B-Zellen und bewirkt deren Expansion und stimuliert sie zu einer vermehrten Sekretion an Immunglobulinen (193, 194). Außerdem besitzt IL-3 einen stark anti-apoptotischen Effekt auf zahlreiche Leukozytenpopulationen (184).

Ein weiterer erwähnenswerter Effekt von IL-3 ist jener auf Endothelzellen. Diese werden durch das Zytokin aktiviert und erhöhen die Expression von E- und P-Selektin, welche zur Familie der Zelladhäsionsmoleküle gehören (195). Beide Selektine spielen eine wesentliche Rolle bei der transendothelialen Migration von Leukozyten. P-Selektin wird exprimiert auf aktivierten Endothel- und Blutzellen und bedingt das Rollen von Leukozyten entlang des stimulierten Endothels und deren anschließende Adhäsion. IL-3 trägt somit indirekt zur Infiltration potentieller inflammatorischer Zellen ins Gewebe bei. (196)

Somit hat IL-3 neben seiner hämatopoietischen Funktion auch noch einen wesentlichen Anteil an der Induktion und Aufrechterhaltung von autoimmunologischen Entzündungsreaktionen. Als proinflammatorisches Zytokin spielt es eine wichtige Rolle bei entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunität. (185)

### 2.1.2 IL-3 und seine Rolle bei Entzündungen und Autoimmunität

Wie unter Punkt 2.1.1 bereits beschrieben, kommt dem Zytokin IL-3 neben seiner hämatopoietischen Funktion auch eine Rolle in der Pathogenese von Entzündungs- sowie Autoimmunprozessen zu.

In einer Studie von *Weber et al.* konnte nachgewiesen werden, dass IL-3-knock-out-Mäuse nach Induktion einer Sepsis eine deutlich verminderte Zytokinfreisetzung sowie eine hoch signifikant verbesserte Überlebensrate aufweisen als Kontrolltiere (184). *Fishman et al.* fanden bei einer Gruppe von 16 SLE-Patienten erhöhte IL-3 Serumspiegel im Vergleich zu gesunden Kontrollen (197). Auch bei Untersuchung der Gehirne von Patienten mit Multipler Sklerose, einer Erkrankung, die durch Demyelinisierung von Neuronen im ZNS gekennzeichnet ist, zeigte sich im Vergleich mit gesunden Kontrollen eine Hochregulation der IL-3 Expression in den MS-Läsionen sowie eine verstärkte Anwesenheit aktivierter T-Helferzellen im Gehirnparenchym der Patienten (198).

Im Mausmodell konnte bei unterschiedlichen Autoimmunkrankheiten aufgedeckt werden, welche wichtige Rolle IL-3 bei der Krankheitsaggravation und Aufrechterhaltung besitzt (181, 185).

*Brühl et al.* wiesen in ihrer experimentellen Arbeit den Einfluss von IL-3 im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis nach. Hierbei entdeckten die Forscher, dass das Zytokin in der frühen Phase der Erkrankung die Entstehung der Arthritis beschleunigt. Die Verabreichung von IL-3 im frühen Krankheitsstadium erhöhte das Auftreten und den Schweregrad der Arthritis, während die Blockade desselben Zytokins zu einer merklichen Verbesserung der Krankheit führte. Damit einher gingen verminderte synoviale Leukozyten- und Zytokinpiegel. Als Hauptproduzenten des IL-3 wurden aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen identifiziert. (181) *Renner et al.* zeigten wiederum, welchen nicht zu vernachlässigenden Einfluss IL-3 in der Entwicklung der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE) hat. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen den größten Anteil an der IL-3 Produktion und Sekretion haben, ohne die IL-3 und IL-17 nicht mehr ausgeschüttet werden. CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielten in diesem Fall keine besondere Rolle. Die Blockade von IL-3 reduzierte maßgeblich die Einwanderung von T- und B-Zellen sowie Monozyten in das ZNS und führte zu einer signifikanten Reduktion von EAE-Symptomen. Die Forschungsgruppe konnte zeigen, dass IL-3 eine wichtige Rolle in der Entstehung klinischer Symptome der EAE spielt und für die Leukozytenmigration in das Gehirn sowie für die zerebrale Expression von Adhäsionsmolekülen und anderen Signalmolekülen verantwortlich ist. (199)

In einer weiteren Studie befassten sich *Renner et al.* mit der Frage, ob und welche Wirkung das Zytokin in der Entstehung der Lupusnephritis besitzt. Dabei zeigte sich bei Zugabe von IL-

3 in der Zellkultur eine hochsignifikante Steigerung der B-Zell-Zahl. Die Auswirkungen von IL-3 konnte man auch bei den T-Zellen beobachten, jedoch nicht ganz so ausgeprägt. Interessanterweise verminderte die Zugabe von anti-IL-3 das Überleben der T-Zellen signifikant, während die Zugabe des Zytokins das T-Zell-Überleben signifikant steigerte. Die IL-3 Blockade zeigte Effekte in verschiedenen Bereichen des Mausmodells. Einerseits wurde die Lupusnephritis gemildert, es kam zu einer Verbesserung der Albuminurie und des Serum-Kreatinins und die Antinucleosomen Antikörper waren signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die Lupus-ähnlichen Hautläsionen wie Haarverlust, Ulzerationen und Hautindurationen traten kaum mehr auf. Weitere positive Effekte durch die Blockade von IL-3 zeigten sich in der merklich verminderten glomerulären Infiltration von T-Zellen und Monozyten, einer verminderten Nierenfibrose und milderem histologischen Zeichen einer akuten wie chronischen Nierenschädigung. (185)

Die bisherigen Ergebnisse der diversen Forschungsgruppen zeigen die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen hinsichtlich der Rolle von IL-3 bei Autoimmunprozessen. Der Mittelpunkt der Untersuchung soll darin bestehen, die Bedeutung des Zytokins in der Pathogenese und Aufrechterhaltung bestimmter Autoimmunerkrankungen zu klären. Im Rahmen dieser Studie wird die Funktion des Zytokins IL-3 bei drei unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen untersucht, um dadurch die Hypothese der oben genannten Arbeiten zu prüfen. Dies geschieht einerseits indirekt über die Analyse der Zellzahlen der IL-3 produzierenden Zellpopulationen und andererseits direkt über die Messung der IL-3-Konzentration aus dem Überstand der Zellkultur. Als Vergleich dient eine Kontrollgruppe gesunder Probanden.

Diese Arbeit kann zudem als Grundlage nachfolgender experimenteller Studien dienen, welche IL-3 als potentielles Ziel für eine medikamentöse Therapie von Autoimmunerkrankungen prüfen.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Laborgeräte und -materialien

##### 3.1.1 Geräte

**Tabelle 5: Geräte**

<b>Laborgeräte</b>	<b>Hersteller/Bezugsquellen</b>
Brutschrank	Thermo Scientific, Dreieich
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
Durchlichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Kryobox	Nalgene, Rochester, USA
Multipette plus Pipette („Klicker“)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Pipettierhilfe „accu-jet pro“	Brand GMBH, Wertheim
Pipetten 10/20/100/200/1000 µl „pipetman“	Gilson International, Limburg
Sterilbank Jouan MSC 12	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
„Vortex Genie“ 2 Schüttelgerät	Scientific Industries, New York, USA
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn
Wasserbad	GFL, München
Zentrifuge (Centrifuge 5417 R)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (Megafuge 16R)	Thermo Scientific, Hanau

##### 3.1.2 Glas- und Plastikwaren

**Tabelle 6: Glas- und Plastikwaren**

<b>Glas- und Plastikwaren</b>	<b>Hersteller</b>
Butterfly (Kanülen)	Sarstedt, Nürnberg
Combitips 0,5ml	Eppendorf, Hamburg
EDTA-Plasmaröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Kryoröhrchen (1ml)	Nalgene, Rochester, USA
Kryoröhrchen (2ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Nunc MicroWell 96-Well Platten MaxiSorp	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Pasteurpipetten ohne Wattestopfen	Carl Roth GMBH, Karlsruhe
Pipettenspitzen (10µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen mit Filter (100µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Polystyrolröhrchen für FACS (5ml)	BD Falcon, Le Pont de Claix, France
Reaktionsgefäße (1ml)	Sarstedt, Nürnberg

Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt, Nürnberg
Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt, Nürnberg
V-Platte 96 Well	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zell-Zählkammer C-Chip	Biochrom AG, Berlin
Zellkulturplatten Rundboden 96-Well	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zentrifugenröhren (50ml)	Sarstedt, Nürnberg

### 3.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Puffer

**Tabelle 7: Chemikalien, Reagenzien, Puffer**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Cell stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors)	eBioscience, Frankfurt
Counting beads für FACS	Life technologies, Frederick, USA
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, TMB Substrat A+B	BioLegend, San Diego, CA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FACSLysing Solution, FACS Clean, FACS Flow,	BD Biosciences, Heidelberg
Ficoll-Paque	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Permwash	BD Biosciences, Heidelberg
Trypanblaulösung	Sigma Aldrich, Taufkirchen
TMB Puffer (A+B Substrat)	BioLegend, San Diego, CA

### 3.1.4 Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze

**Tabelle 8: Zellkulturmedien und -zusätze**

<b>Zellkulturmedien und -zusätze</b>	<b>Hersteller</b>
Einfriermedium	iFCS, 20% DMSO
Fetales Kälberserum (hitzeinaktiviert 1h bei 56 °C)	PAA, Cölbe

RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Medium, L-Glutamin, Penicillin, Streptomycin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Standard Nährmedium	500ml RPMI 1640, 50ml iFCS, 5ml Penicillin-Streptomycin-Stammlösung, 5ml L-Glutamin

### 3.1.5 Antikörper für die extrazelluläre Durchflusszytometrie

**Tabelle 9: Antikörper für die extrazelluläre Durchflusszytometrie**

Spezifität	Konjugat	Klon	Hersteller
CD 11b	FITC	M1/70	BioLegend, San Diego, CA
CD 203c	PE	NP4D6	BioLegend, San Diego, CA
CD3	APC-eFluor780	SK7	eBioscience Inc., San Diego, CA
CD8a	PE-Cyanine7	SK1	eBioscience Inc., San Diego, CA
CD19	Pacificblue	HIB19	BioLegend, San Diego, CA
CD4	V500	RPA-T4	BD Biosciences, San Jose, USA
CD123	PE-Cy5	9F5	BD Biosciences, San Jose, USA
CD116	FITC	4H1	BioLegend, San Diego, CA
CD131	PE	1C1	eBioscience, San Diego, CA
CD16	APC	3G8	BioLegend, San Diego, CA
CD193	APC/Cy7	5E8	BioLegend, San Diego, CA
CD14	eFluor450	61D3	eBiosciences, San Diego, CA

### 3.1.6 Antikörper für die intrazelluläre Durchflusszytometrie

**Tabelle 10: Antikörper für die intrazelluläre Durchflusszytometrie**

Spezifität	Konjugat	Klon	Hersteller
IL-17A	FITC	eBio64DEC17	eBiosciences, San Diego, CA
IL-2	PE-Cy7	MQ1-17H12	eBiosciences, San Diego, CA

### 3.1.7 Zytokine, Antikörper, Enzyme

**Tabelle 11: Zytokine, Antikörper, Enzyme**

Zytokin/Antikörper	Hersteller
ChromPure Mouse IgG, whole molecule	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
IL-3 Ak, Klon P8C11	AG Mack, Regensburg

IL-3 Ak, Klon13-HRP	AG Mack, Regensburg
Mouse IgG1k isotype control (MOPC-21)	BioXCell, West-Lebanon, USA

### 3.1.8 ELISA

**Tabelle 12: Medien, Puffer für ELISA**

hIL-3 ELISA	Medien, Lösungen, Puffer
Coating-Puffer	PBS
Blocklösung/Verdünnungsmedium	1 % BSA in PBS
Entwicklungspuffer	TMB-Puffer
Stopplösung	12,5% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Schwefelsäure)
Waschlösung	0,05% Tween in PBS

### 3.1.9 Analyse- und Bearbeitungsprogramme

**Tabelle 13: Analyse- und Bearbeitungsprogramme**

Programm	Firma
FACS Diva Version 6.1.3	BD Bioscience, Heidelberg
Microsoft Excel	Microsoft, Redmont, USA
SoftMax 2.31	MDS Analytical Technologies, Ismaning

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Patientenrekrutierung und Gewinnung des Probenmaterials

Die Patientenrekrutierung erfolgte in der Asklepios Klinik Bad Abbach. Einschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie waren die sicher gestellte Diagnose eines SLE, einer PsA oder einer GPA. Bezüglich des Patientenalters oder der Erkrankungsdauer gab es keine Beschränkungen. Kamen die Patienten während der Rekrutierungsdauer mehrmals beziehungsweise zu verschiedenen Zeitpunkten in die Klinik, so wurden sie als unterschiedliche Patienten gewertet. Der Grund hierfür war die Annahme, dass die Krankheitsaktivität zu unterschiedlichen Zeiten oder nach initiiertes Therapie eine andere ist, und man deshalb bei der Untersuchung des Blutes nicht dieselben Ergebnisse erwartete.

Der endgültige Stand der Patientenrekrutierung beträgt somit 141 Patienten, davon 74 mit der Diagnose SLE, 53 mit PsA und 14 Patienten mit GPA. Davon sind 68 der SLE-Patienten Frauen und 6 Männer im Alter von 27 bis 77 Jahren und einem Durchschnittsalter von 43,2 +/- 11,5 Jahren. Von den 53 PsA-Patienten im Alter von 21 bis 81 Jahre sind 36 männlich und 17

weiblich. Das Durchschnittsalter in der PsA-Gruppe beträgt 55,8 +/- 11,9 Jahre. Unter den GPA-Patienten befinden sich 10 Frauen und 4 Männer im Alter von 49 bis 78 Jahre. Das Durchschnittsalter der Personen mit der Diagnose GPA beläuft sich auf 58, 9 +/- 9,05 Jahre. Ausschlusskriterien aus der Studie waren andere chronisch-entzündliche Erkrankungen wie beispielsweise Multiple Sklerose, die Spondylosis ankylosans aus dem Bereich der axialen Spondyloarthritis, CED wie die Colitis ulcerosa oder das Fibromyalgie-Syndrom.

Parallel zur Patientenrekrutierung wurden Proben gesunder Probanden akquiriert. Die Vergleichsgruppe zählt 34 gesunde Kontrollen, davon 23 Frauen und 11 Männer im Alter von 21 bis 52 Jahren. Das Durchschnittsalter der Kontrollen lag daher bei 30,03 +/- 9,5 Jahre. Analog zu den Ausschlusskriterien der Patienten ergaben sich in der Kontrollgruppe folgende: chronisch-entzündliche Krankheiten sowie Erkrankungen der Atemwege wie Asthma bronchiale, hämatologische Erkrankungen mit damit verbundenen Blutbildveränderungen und inflammatorische neurologische Erkrankungen wie die Multiple Sklerose.

Alle Personen, die sich freiwillig bereit erklärt hatten, an der Studie teilzunehmen, erhielten nach ausführlicher Aufklärung über den Studienablauf eine schriftliche Einverständniserklärung. Das ausgehändigte und unterschriebene Dokument war die Voraussetzung für die spätere Blutentnahme, welche im Rahmen des ambulanten Aufenthaltes der Patienten stattfand.

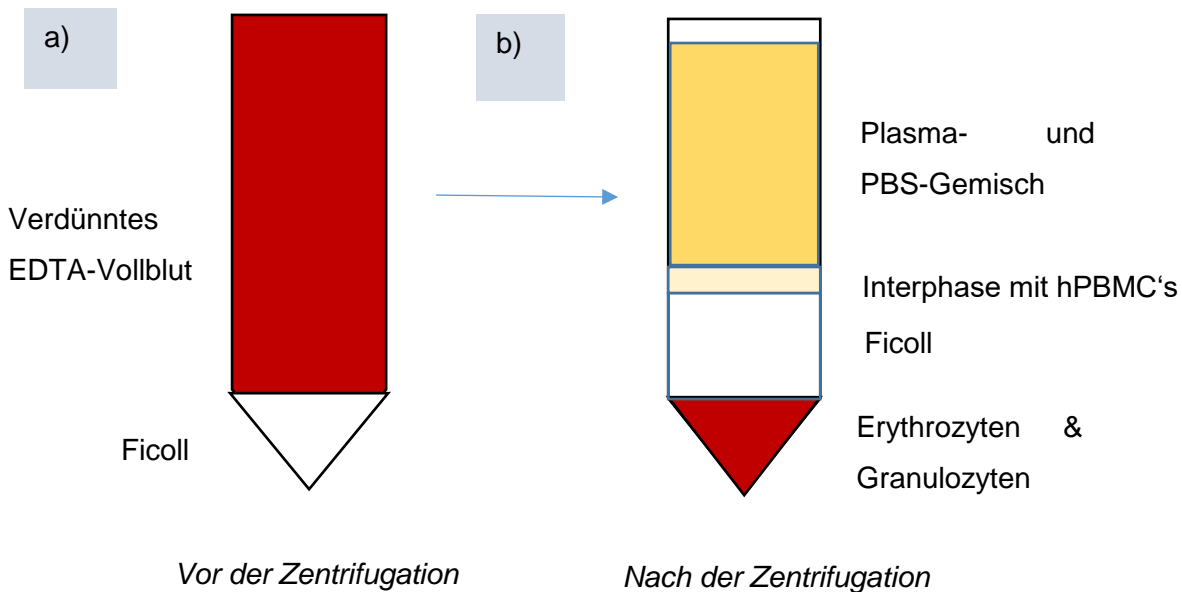
Den Patienten wurde 6 ml peripheres Vollblut in EDTA-Röhrchen entnommen. Dieses wurde immer noch am selben Tag in das Forschungsgebäude transportiert, wo die weitere Bearbeitung der Proben vorgenommen wurde.

Alle Arbeiten mit humanen Blutproben wurden unter sterilen Bedingungen sowie unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

### 3.2.2 Gewinnung humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (hPBMC's) aus Vollblut

Als hPBMC's bezeichnet man die mononukleären Zellen des peripheren Blutes. Dazu zählt man einkernige Blutzellen, die einen runden Kern besitzen. Hierzu gehören die Lymphozyten (B- und T-Zellen), Monozyten, Basophile Granulozyten, dendritische Zellen und NK-Zellen (Natürliche Killer Zellen). Eine Möglichkeit, die PBMC's zu isolieren, besteht in der Durchführung einer Ficoll-Dichtezentrifugation. Bei Ficoll handelt es sich um ein ungeladenes Saccharose-Polymer mit einer spezifischen Dichte, die so eingestellt ist, dass Erythrozyten, Granulozyten und abgestorbene Zellen die Ficoll-Schicht passieren. Lymphozyten und Monozyten sammeln sich hingegen oberhalb des Ficolls in einer Interphase an (200).

Das humane EDTA-Blut wurde zunächst etwa im Verhältnis 1:2 mit sterilem PBS verdünnt. In einem 50ml-Falcon wurden 10ml Ficoll vorgelegt und vorsichtig mit der verdünnten Probe überschichtet. Die Falcons wurden mit 1500 U/min für 20 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Die mononukleären Zellen, die sich nach der Zentrifugation (wie bereits oben kurz beschrieben) in der Interphase gesammelt hatten, wurden mittels Transferpipette abgenommen und in ein neues 50ml Falcon überführt und anschließend einmal mit sterilem PBS gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte mit 1500 U/min für 7 Minuten bei 4°C.

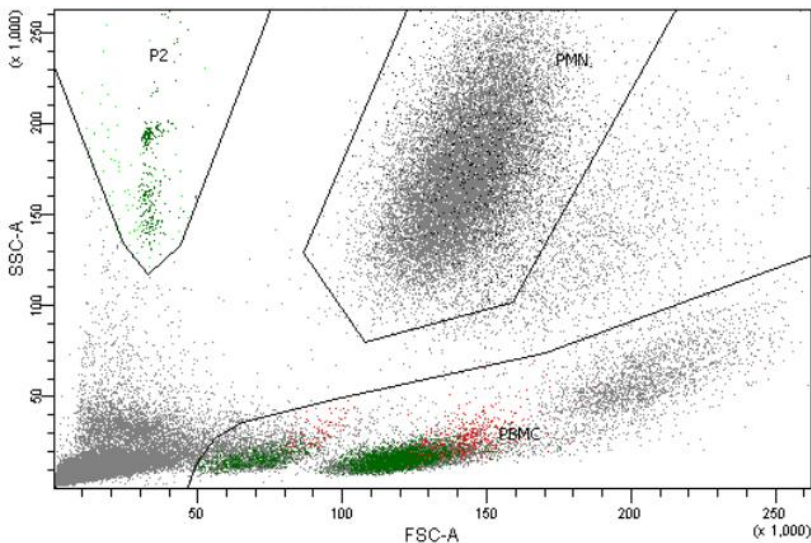


**3.1: Schematische Darstellung eines Ficoll:** a) Links vor der Zentrifugation b) rechts nach der Zentrifugation. Durch die spezifische Dichte des Ficoll-Polymers wandern Erythrozyten und Granulozyten während der Zentrifugation nach unten und sammeln sich am Boden des Falcons, während sich Lymphozyten und Monozyten in der Interphase oberhalb des Ficoll-Plaques befinden.

Der Überstand wurde mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt und das Zellpellet in 2,5 ml Nährmedium resuspendiert. Nach Zugabe von 2,5ml Einfriermedium (20%DMSO in FCS) wurden die Zellen in Kryoröhrchen aliquotiert und in Kryoboxen bei -80°C eingefroren. Pro Patient wurden somit fünf Kryoröhrchen mit jeweils 1ml Zellsuspension befüllt. Nach 24 Stunden erfolgte die Umlagerung der Zellen in flüssigen Stickstoff mit einer Temperatur von etwa -200°C. Zusätzlich erfolgte die Abnahme von 1ml EDTA-Blut zur Plasmagewinnung, um etwaige Laborparameter zu einem späteren Zeitpunkt bestimmen zu können. Dazu wurde das Blut bei 4°C und 2500 U/min 15 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand (300-400 µl) abgenommen und bei -20°C eingefroren.

### 3.2.3 Durchflusszytometrie/FACS-Analyse

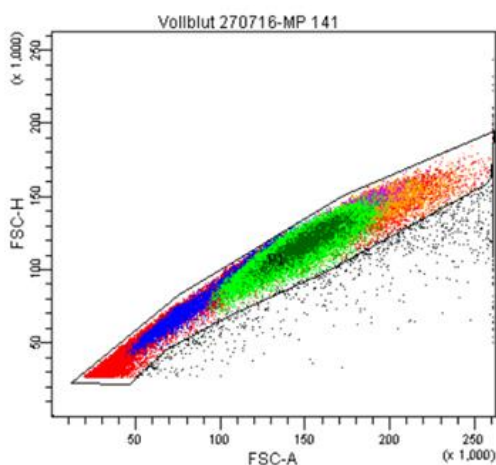
Ein Durchflusszytometer eignet sich zum Zählen und Sortieren von Lymphozyten. Die Durchflusszytometrie basiert auf der Messung von Streulichteigenschaften. Die Zellen



**3.2. Extrazelluläre Färbung 2:** Im FSC und SSC werden die Zellen nach Größe und Granularität sortiert. In P2 sind die Counting Beads zu sehen, die der Genauigkeit der FACS-Analyse dienen. Im Fenster PBMC kommen die Monozyten, T-Zellen, B-Zellen und Basophilen Granulozyten zu liegen, während im Gate PMN die Neutrophilen und Eosinophilen zu finden sind.

passieren einzeln einen Laserstrahl und erzeugen dabei charakteristische Streu- und Fluoreszenzsignale. Photodetektoren messen sowohl das gestreute als auch das emittierte Licht und wandeln die erhaltenen Signale in elektrische Signale um. Der Forward Scatter (FSC) liefert Informationen über die Größe der Zellen, der Sideward Scatter (SSC) über deren Granularität. (201)

FACS steht für „fluorescence-activated cell sorter“, also Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer. Durch Zugabe spezifischer Antikörper, an die Fluoreszenzfarbstoffe bzw. Fluorochrome gekoppelt sind, können Aussagen über deren Bindung an bestimmte Zellen und damit über die Expression der Oberflächenproteine auf der jeweiligen Zelle getroffen werden. Dadurch kann man auf den vorliegenden Zelltyp rückschließen.



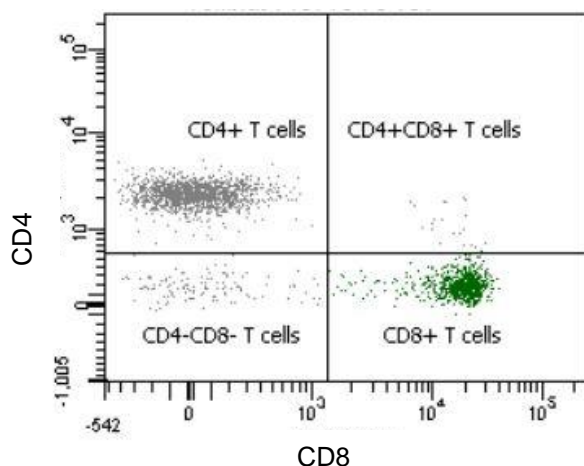
**3.3 Extrazelluläre Färbung 2 im FSC:** Je kleiner die Zellen, desto weiter links kommen sie zu liegen. Blau dargestellt sind die CD4<sup>+</sup> T-Zellen, relativ mittig gelegen findet man die Neutrophilen und Eosinophilen. Rechts davon sind in lila bzw. orange die Monozyten abgebildet.

Die Fluorochrome werden durch den Laserstrahl angeregt und emittieren je nach Fluorochrom Licht einer bestimmten Wellenlänge. Die Lichtintensität ist proportional zur Anzahl der markierten Antigene. (202)

### 3.2.4 Extrazelluläre Färbung

Für die extrazelluläre Färbung wurden jeweils 100µl EDTA-Vollblut verwendet. Um die zu bestimmenden Zellen bei der FACS-Analyse voneinander trennen zu können, wurden die Oberflächenproteine der Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Es wurden für die humanen PBMC's folgende Fluoreszenz-markierte Antikörper in den jeweiligen Verdünnungen zugesetzt:

- CD123 Phycoerythrin-Cyanin (PE-Cy)5 → 1:20
- Färbung 1: CD11b-Fluoresceinisothiocyanat (FITC), CD203c-PE, HLA-DR-Allophycocyanin (APC), CD3-APC-Cy7, CD8-PE-Cy7, CD19-Pacificblue, CD4-V500 → 1:100
- Färbung 2: CD116-FITC, CD131-PE, CD16-APC, CD193-APC-Cy7, CD4-V400, CD14-Pacificblue → 1:100



**3.4 Extrazelluläre Färbung 1:**  
*AmCyan-A und PE-Cy7-A gegeneinander aufgetragen. Dargestellt sind hier die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die bekanntlich eine wesentliche Rolle in der Pathologie von Autoimmunerkrankungen haben.*

Es wurde für Färbung 1 und 2 jeweils ein Mastermix angesetzt. Pro Probe wurden 20µl Mastermix zugegeben. Nach der Antikörper-Färbung wurden durch Zugabe der FACS lysingsolution die Erythrozyten lysiert. Dadurch wurde eine effiziente Detektion der Lymphozyten ermöglicht. (203)

### 3.2.5 Bestimmung der Zellzahlen

Um die Anzahl lebender Zellen in einer Zellsuspension bestimmen zu können, werden diese mit Trypanblau versetzt. Tote Zellen werden aufgrund deren gestörter Membrandurchlässigkeit blau gefärbt, während lebende Zellen hingegen hell erscheinen.



Die Zellsuspension wurde zunächst 1:10 mit PBS verdünnt, um dann 10 µl der Verdünnung mit 10 µl der Trypanblaulösung zu vermischen. Die Auszählung der Zellen erfolgte mittels der Neubauer-Zählkammer unter dem Durchlichtmikroskop. Es wurden insgesamt 4 Großquadrate ausgezählt. Um auf die tatsächliche Zellkonzentration in der Ausgangssuspension rückschließen zu können, wurde die Zellzahl pro Großquadrat mit den Verdünnungsfaktoren und dem Kammerfaktor  $10^4$  multipliziert. Hieraus ergab sich folgende Rechnung: Zellzahl/Anzahl der ausgezählten Großquadrate  $\times 20 \times 10^4 =$  Zellzahl/ml der Ausgangssuspension.

Der Faktor 20 ergibt sich aus der 1:10 Verdünnung der Zellsuspension mit PBS und der anschließenden 1:2 Verdünnung mit Trypanblau.

### 3.2.6 Zellkulturansätze

Zur Gewinnung des Überstandes für die nachfolgenden ELISA, wurden die in Stickstoff gelagerten hPBMCs für die Zellkultur verwendet. Hierfür wurden in 50ml Falcons jeweils 15ml steriles Nährmedium (RPMI 1640 10% FCS) vorgelegt und im Wasserbad bei 37°C warmgestellt. Dann erst wurden die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff geholt und innerhalb von etwa 3 Minuten im Wasserbad aufgetaut. Unter der sterilen Werkbank wurde dann die aufgetaute Zellsuspension in das erwärmte, sterile Medium überführt. Um Rückstände des zelltoxischen Einfriermediums zu entfernen, wurden die Falcons anschließend bei 1500 rpm 7 Minuten lang zentrifugiert, die Überstände abgesaugt und das Zellpellet in warmen Nährmedium resuspendiert.

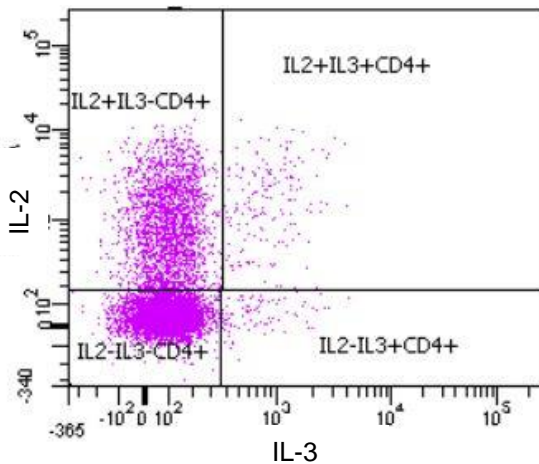
Für die PBMC Zellkultur wurden 500.000 Zellen pro Well in 200 µl Nährmedium angesetzt. Die Stimulation der T-Zellen erfolgte mit 1 µl anti-CD3 (5µg/ml) pro Well. CD3 ist mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion und der Aktivierung von T-Zellen. Alle Werte wurden in Triplikaten geführt. Nach 3 Tagen Kultivierung der Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden 180 µl des Überstands abgenommen und in eine neue 96-Well-Platte überführt und die Überstände bei -20 °C eingefroren.

### 3.2.7 Intrazelluläre Färbung

Die intrazelluläre Färbung hat den Vorteil, dass die produzierten Zytokine durch Zugabe bestimmter Medien in der Zelle verbleiben. Somit ist eine direkte Zuordnung des Zytokins zu der jeweiligen Zelle möglich.

Für die intrazelluläre Färbung wurden 1 Million Zellen in 200 µl Nährmedium pro Well in einer 96-Well Rundbodenplatte ausplattiert. Zusätzlich wurde in die äußeren Wells PBS pipettiert, um ein Verdunsten der Probe zu verhindern. Die Zugabe eines Zell-stimulierenden Cocktails (mit Protein Transport-Inhibitoren) stimulierte die Zellen einerseits zur Zytokin-Produktion,

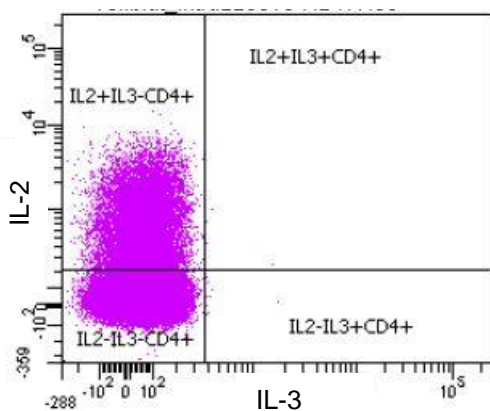
andererseits wurde der Proteinexport aus der Zelle über den Golgi-Apparat gehemmt, sodass sich das Zytokin im endoplasmatischen Reticulum ansammeln konnte (204). Die Zellen wurden für drei Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.



**3.5 Klon-13:** Die Abbildung zeigt die Färbung mit dem Klon-13, der hochsensitiv intrazellulär produziertes IL-3 detektiert. Des Weiteren wurde hier mit PE-Cy7 gefärbt, um IL-2 nachweisen zu können. Im abgebildeten Gate wird ausschließlich die Interleukin-Produktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt.

Anschließend an die dreistündige Inkubationszeit wurden die Zellen mit unmarkiertem mouse-IgG (100 µg/ml) in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen (F<sub>c</sub>-Rezeptoren) zu blockieren. Um in der Durchflusszytometrie unterscheiden zu können, welche T-Zell-Subpopulation für die jeweilige Zytokinproduktion verantwortlich ist, wurden CD3<sup>+</sup> mittels CD3 APC-Cy7 mit einer 1:80 Verdünnung, CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit CD 8 PerCP-Cy5.5 bzw. CD 4 APC jeweils 1:20 verdünnt gefärbt und 20 Minuten lang bei 4°C inkubiert.

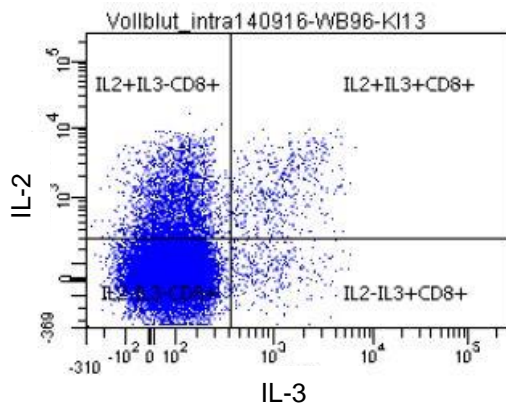
Die Zytifix/Zytoperm Lösung permeabilisierte die Zellmembran, während der Perm/Wash Puffer die Aufgabe hatte, die entstandenen Poren offen zu halten. Durch die Permeabilisation der Zellwand konnten so im nächsten Schritt die fluoreszenzmarkierten Antikörper in die Zelle eindringen und die dort „fixierten“ Zytokine binden (205). Vor Durchführung der intrazellulären Färbung wurden durch Inkubation mit unmarkiertem mouse IgG für 10 Minuten bei



**3.6. Fluorescence minus one:** Dargestellt ist die intrazelluläre „Negativ-Kontrolle“.

Raumtemperatur etwaige unspezifische Bindungsstellen blockiert. Für die intrazelluläre Färbung wurden IL-2 PE-Cy7 und IL-17 FITC in der Verdünnung 1:20, sowie für die IL-3 Detektion Klon-13 PE in einer 1:300 Verdünnung zugegeben. Die Zellen wurden 20 Minuten

lang bei 4°C inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgten die Waschvorgänge entweder mit PBS beziehungsweise nach der Zugabe der Zytifix/Zytoperm Lösung mit Perm/Wash Puffer.



**3.7 IL-3-Detektion:** Dargestellt sind die IL-3 produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen. PE-Cy7-A diente der Detektion von IL-2, IL-3 wurde mittels Klon-13 PE dargestellt.

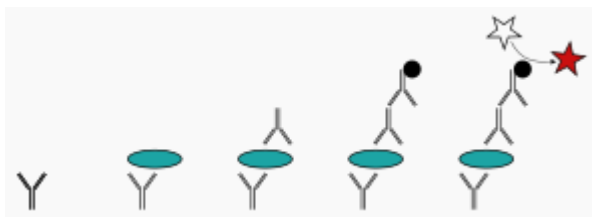
Um die IL-3 Sekretion als gesichert darstellen zu können, wurde eine sogenannte Isotyp-Kontrolle in einer separaten Probe mitgefärbt. In der vorliegenden Arbeit wurde bei der durchflusszytometrischen Messung mit „fluorescence minus one“ gearbeitet. Das heißt, dass ein Mastermix mit allen drei Zytokinen angesetzt wurde, im zweiten Mastermix jedoch nur IL-2 und IL-17 zugegeben wurde.

### 3.2.8 ELISA

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest („enzyme-linked immunosorbent assay“, ELISA) ist ein direkter Bindungstest für Antikörper oder Antigene. Er dient der qualitativen und quantitativen Bestimmung von Proteinen und Antikörpern.

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zur quantitativen Bestimmung der IL-3 Konzentration im Zellkultur-Überstand wurde der Sandwich- oder Capture-ELISA durchgeführt.



**3.8:** Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA nach Jeffrey M. Vincour

Beim Sandwich-ELISA wird ein antigenspezifischer Antikörper, der sogenannte coat- oder capture-Antikörper, an den Träger (Mikrotiterplatte mit 96 Wells) gebunden. Der coat-Antikörper hat die Aufgabe, das zu bestimmende Antigen zu binden. Die Zugabe des sogenannten Detektions-Antikörpers, der das Antigen an einem anderen Epitop erkennt, führt zur Bildung eines Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes (daher der Name Sandwich-

ELISA). (205) Um unspezifische Bindungen zu verhindern ist das Abblocken freier Proteinbindestellen ein sehr wichtiger Schritt beim ELISA (202). Das Markerenzym hat die Aufgabe, die Antikörperbindung mittels einer enzymatischen Reaktion nachzuweisen. Dabei wird ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umgewandelt. (205)

Mit dieser ELISA-Technik wurden quantitativ die IL-3-Konzentrationen im Überstand bestimmt. Hierzu wurden 96-Well-Platten mit jeweils 60 µl des in PBS verdünnten Primärantikörpers über Nacht gecoatet. Die folgenden Inkubationsschritte erfolgten jeweils nach einem dreimaligen Waschvorgang mit dem Waschpuffer PBS/Tween 0,05%. Um freie Bindungsstellen abzusättigen, wurde eine Stunde mit einprozentigem BSA in PBS geblockt. Gleichzeitig wurde die Präinkubation der Proben mit 20µg/ml mouse IgG1k isotype control (MOPC-21) vorgenommen. Nach dem Blockschritt wurden die Platten für 2h mit 60 µl der Proben sowie der dazugehörigen 1:2 Standardverdünnungsreihe inkubiert. Anschließend wurden 60 µl des HRP-gelabelten Detektionsantikörpers in die Wells pipettiert. Nach zwei weiteren Stunden Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 100 µl TMB-Substratlösung, um einen Farbumschlag hervorzurufen. Nach 20 Minuten Inkubation im Dunkeln wurde die Farbreaktion mit 12,5 % Schwefelsäure gestoppt. Mittels eines ELISA-Readers wurde die Optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 450 nm abgelesen.

Folgende Antikörper wurden eingesetzt:

- Primärantikörper: zum Coaten wurden 5 µg/ml des Klon P8C11 verwendet
- Detektionsantikörper: der HRP-gelabelte Klon 13 wurde mit 400 ng/ml zugesetzt

Im vorliegenden Versuch wurde als Markerenzym HRP („horse-radish peroxidase“, Meerrettich-Peroxidase) eingesetzt, welches an den Klon 13 gebunden wird, sodass dieser als Detektions-Antikörper im ELISA verwendet werden kann. Ebendieses Enzym katalysiert die Chromogenumwandlung des TMB-Substrats, erkennbar durch einen Farbumschlag von farblos zu blaufarben. Sowohl Klon 13 als auch der Klon P8C11 sind Antikörper, die spezifisch und hochsensitiv das Interleukin-3 detektieren. Beide Antikörper wurden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe entwickelt.

## 4 Ergebnisse

An dieser Studie sind insgesamt 175 Personen involviert, davon 141 Patienten sowie 34 gesunde Probanden. Unter den Patienten befinden sich 95 Frauen und 46 Männer, die gesunden Probanden setzen sich zusammen aus 23 Frauen und 11 Männern.

Das durchschnittliche Erkrankungsalter der Patienten ist dem Methodenteil unter Punkt 3.2.1. bzw. den folgenden Tabellen zu entnehmen.

Die Basischarakteristika der drei Erkrankungen sind in Tabelle 16-18 dargestellt. Die Gruppeneinteilung erfolgte beim SLE anhand der vorhandenen bzw. nicht vorhandenen klinischen Erkrankungsaktivität. Bei der PsA wurde die Einteilung anhand der DAS CRP Werte vorgenommen, während bei der GPA aufgrund der kleinen Patientenzahl auf eine Unterteilung verzichtet wurde.

**Tabelle 14: Basischarakteristika der SLE Patienten und Kontrollen (klinische Aktivität)**

SLE	Kontrollen (n=34)	SLE, klinisch aktiv (n=26)	SLE, klinisch nicht aktiv (n=48)
Weiblich (%)	67,6	84,6	95,8
Männlich (%)	32,4	15,4	4,2
Kaukasier (%)	100,0	100,0	100,0
Alter (Jahre)	30,0 +/- 9,5	49,7 +/- 11,9	39,8 +/- 9,4
Durchschnittliche Erkrankungsdauer nach ED (Jahre)		10,9 +/- 8,5	9,9 +/- 7,2
ANA-Titer		1:560	1:303
dsDNA-Ak (IU/ml)		91,3	70,0
Vorangegangene Behandlung (%)		100,0	100,0
Glukokortikoide (%)		80,8	58,3
Glukokortikoide (mg)		7,3	6,3
Chloroquin (%)		0,0	6,3
Chloroquin (mg)		0,0	250,0
Hydroxychloroquin (%)		73,1	56,3
Hydroxychloroquin (mg)		297,4	281,5
Azathioprin (%)		26,9	29,2

Azathioprin (mg)		135,7	123,3
Mycophenolatmofetil (%)		23,1	10,4
Mycophenolatmofetil (mg)		2110,0	2126,7
Ciclosporin (%)		7,7	4,2
Ciclosporin (mg)		175,0	200,0
Belimumab (%)		38,5	8,3
Belimumab (mg)		656,0	800,0

**Tabelle 15: Basischarakteristika der PsA Patienten und Kontrollen (DAS CRP)**

PsA	Kontrollen (n=34)	DAS < 2,6 (n=38)	DAS > 2,6 (n=15)
Weiblich (%)	67,6	50,9	60,0
Männlich (%)	32,4	20,8	40,0
Kaukasier (%)	100,0	100,0	100,0
Alter (Jahre)	30,0 +/- 9,5	55,9 +/- 11,6	55,5 +/- 11,9
Durchschnittliche Erkrankungsdauer nach ED (Jahre)		16,5 +/- 12,9	10,3 +/- 6,6
BSG 1h (mm/h)		6,3	15,8
BSG 2h (mm/h)		18,9	31,5
CRP (mg/l)		2,8	11,4
Vorangegangene Behandlung (%)		100,0	100,0
MTX (%)		60,5	66,7
MTX (mg)		14,8	11,0
Glukokortikoide (%)		10,5	40,0
Glukokortikoide (mg)		4,5	13,3
Ciclosporin (%)		0,0	0,0
Ciclosporin (mg)		0,0	0,0
Anti-TNF (%)		50,0	73,3
Anti-TNF (mg)		197,1	90,0

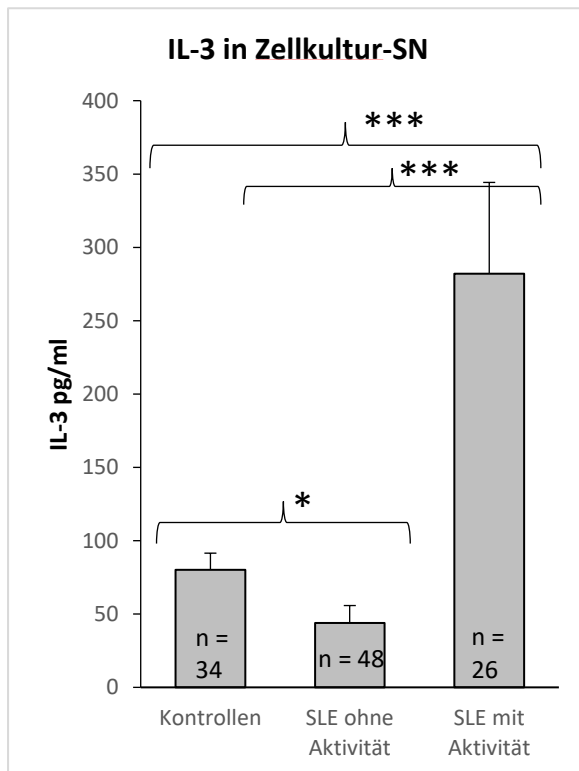
**Tabelle 16: Basischarakteristika der GPA Patienten und Kontrollen**

<b>GPA</b>	<b>Kontrollen (n=34)</b>	<b>Patienten (n=14)</b>
Weiblich (%)	67,6	71,4
Männlich (%)	32,4	28,6
Kaukasier (%)	100,0	100,0
Alter (Jahre)	30,0 +/- 9,5	58,9 +/- 9,0
Durchschnittliche Erkrankungsdauer nach ED (Jahre)		7,8 +/- 2,5
cANCA (U/ml)		167,1
Kreatinin (mg/dl)		1,0
Vorangegangene Behandlung (%)		100,0
Glukokortikoide (%)		71,4
Glukokortikoide (mg)		15,7
Cyclophosphamid (%)		14,3
Cyclophosphamid (mg)		1000,0
RTX (%)		42,9
RTX (mg)		650,0

## 4.1 IL-3-Konzentration

Wie oben im Abschnitt 3.2.8. beschrieben, wurden die Zellkulturüberstände nach dreitägiger Aktivierung mit anti-CD3 mithilfe des ELISA auf die IL-3 Produktion untersucht. Das Ziel dieser Untersuchung war es, die Krankheitsaktivität der an SLE, PsA und GPA erkrankten Patienten mit der gesunder Probanden, sowie die Krankheitsaktivitäten untereinander zu vergleichen.

### 4.1.1 IL-3 Produktion im Zellkultur-Überstand von SLE-Patienten



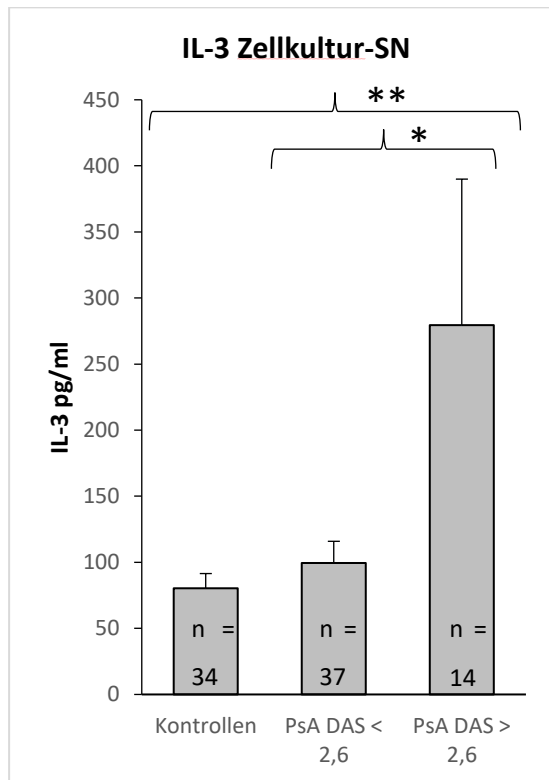
**Abbildung 4.1:** Darstellung der IL-3-Konzentration in pg/ml gemessen im Zellkultur-Überstand (engl. SN = supernatant = Überstand). Zur Einteilung der Patienten wurde hier die klinische Aktivität verwendet. Neben den gesunden Probanden (= Kontrollen) sind hier die Lupus-Patienten ohne und mit klinischer Aktivität abgebildet.

In Abbildung 4.1 erkennt man, dass die produzierte Menge an IL-3 bei Patienten, deren klinische Aktivität gleich Null ist, signifikant niedriger ist als die der gesunden Kontrollen ( $p=0,02$ ). Ein höchst signifikanter Unterschied ist zwischen den Kontrollen und den Patienten mit klinischer Aktivität ( $p=0,0004$ ) sowie den Patienten mit und ohne Aktivität zu beobachten ( $p=0,000003$ ).

Aus der Abbildung 4.1 geht hervor, dass die IL-3-Produktion abhängig von der aktuellen Krankheitsaktivität ist. Diese steigt bei den Patienten ohne Aktivität von  $43,9 \pm 11,8$  pg/ml auf  $282,1 \pm 62,2$  pg/ml bei den Patienten mit klinisch vorhandener Aktivität. Die Kontrollen weisen mit einer IL-3 Konzentration von  $80,2 \pm 11,3$  pg/ml beinahe die doppelte Menge an produzierten IL-3 auf im Vergleich zu den SLE-Patienten ohne Aktivität.



#### 4.1.2 IL-3-Produktion im Zellkultur-Überstand von PsA-Patienten



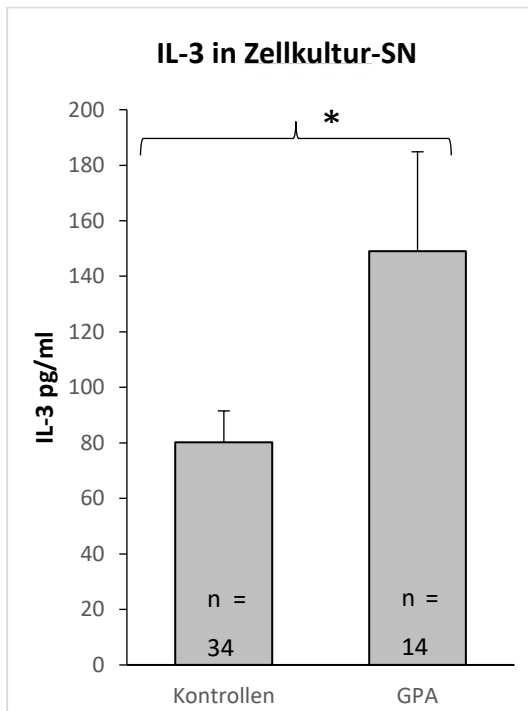
**Abbildung 4.2: Darstellung der IL-3-Konzentration in pg/ml im Zellkultur-Überstand.**

Zur Bestimmung der DAS28-Werte wurde das CRP als Entzündungsparameter verwendet. Neben den gesunden Probanden wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) und in niedrige bis hohe Krankheitsaktivität (DAS > 2,6) dargestellt.

In Abbildung 4.2 zeigt sich ein hoch signifikanter Unterschied der IL-3-Produktion zwischen Patienten mit niedrigen/moderaten bis höheren DAS28 CRP Werten (DAS > 2,6) und gesunden Probanden ( $p=0,005$ ). Ebenso ist die IL-3 Produktion der Patienten in Remission (DAS < 2,6) signifikant niedriger als die der Patienten mit höheren DAS Werten ( $p=0,01$ ).

Aus der Abbildung 4.2 wird ersichtlich, dass die IL-3-Konzentration mit zunehmender, klinisch messbarer Entzündungsaktivität steigt. So nimmt die IL-3-Konzentration der Kontrollen von  $80,2 \pm 11,3$  pg/ml auf  $279,4 \pm 110,5$  pg/ml bei Patienten mit DAS-Werten > 2,6 zu. Dies entspricht mehr als der dreifachen IL-3-Konzentration bei den PsA-Patienten mit höherer Krankheitsaktivität. Darüber hinaus erkennt man, dass die IL-3-Konzentration der Patienten mit niedriger Krankheitsaktivität (DAS < 2,6) von  $99,6 \pm 16,3$  pg/ml auf  $279,4 \pm 110,5$  pg/ml bei Patienten mit hohen DAS-Werten ansteigt.

#### 4.1.3 IL-3 Produktion im Zellkultur-Überstand von GPA-Patienten



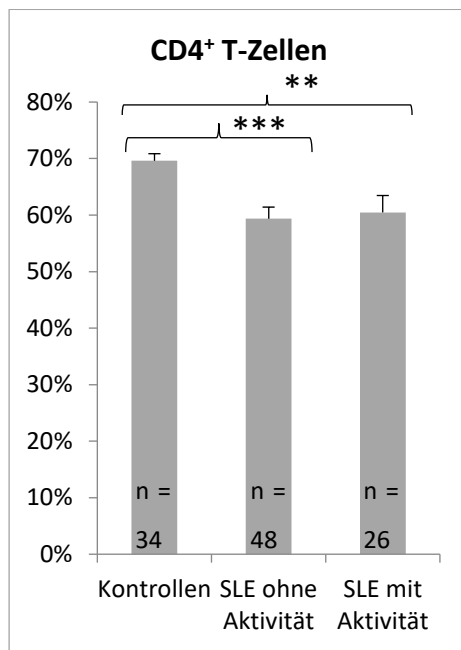
**Abbildung 4.3: Darstellung der IL-3-Konzentration in pg/ml gemessen im Zellkultur-Überstand.** Aufgrund der kleinen Patientenzahl wurde auf eine Unterteilung der GPA-Patienten in Untergruppen verzichtet.

Abbildung 4.3 zeigt, dass die produzierte Menge an IL-3 bei Patienten mit GPA signifikant höher ist als bei gesunden Probanden ( $p=0,01$ ). So sieht man, dass die gemessene IL-3-Konzentration von  $80,2 \pm 11,3$  pg/ml bei den Kontrollen auf  $149,0 \pm 35,8$  pg/ml ansteigt.

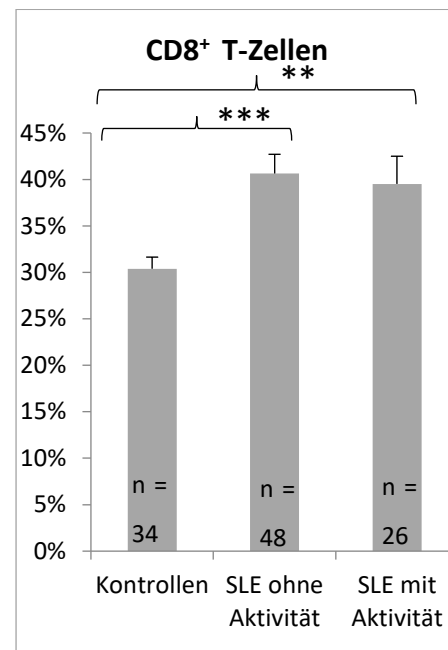
## 4.2 Untersuchung potentieller Zytokin-Quellen bei SLE

Die intrazelluläre Färbung diente in erster Linie der Identifikation jener T-Zellen, die für die IL-3-Produktion verantwortlich sind. Hierzu wurden die Zellen wie in Punkt 3.2.7 bearbeitet und zu allererst mittels Zugabe extrazellulärer Marker als  $CD3^+$  bzw.  $CD4^+/CD8^+$  T-Zellen identifiziert. Im Anschluss an diesen Schritt erfolgte die Färbung mit intrazellulären Antikörpern zur Detektion von IL-2, IL-3 und IL-17. Im Folgenden soll das Hauptaugenmerk auf dem Zytokin IL-3 liegen, dem diese Arbeit gewidmet ist. Untersucht wird hierbei ein potentieller Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität der drei vorgestellten rheumatischen Erkrankungen sowie Unterschiede zwischen den Erkrankten und gesunden Probanden.

#### 4.2.1 Potentielle IL-3-Quellen bei SLE



**Abbildung 4.4: Prozentualer Anteil CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD3<sup>+</sup> T-Zellen nach extrazellulärer Färbung:** Zur Einteilung in die Gruppen wurde die klinische Aktivität herangezogen. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) werden hier die Patienten in klinischer Remission (SLE ohne Aktivität) und Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher/klinischer Aktivität (SLE mit

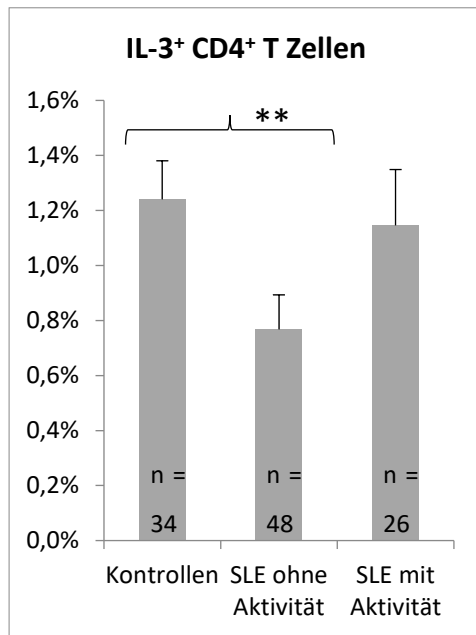


**Abbildung 4.5: Prozentualer Anteil CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD3<sup>+</sup> T-Zellen nach extrazellulärer Färbung:** Zur Einteilung in die Gruppen wurde die klinische Aktivität herangezogen. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) werden hier die Patienten in klinischer Remission (SLE ohne Aktivität) und Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher/klinischer Aktivität (SLE

Abbildung 4.4 zeigt den Anteil CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei gesunden Kontrollen sowie Patienten mit der Diagnose SLE. Man erkennt, dass der Anteil CD4<sup>+</sup>-Zellen von 69,6 +/- 1,3 % bei den Kontrollen auf 59,4 +/- 2,1 % bei SLE-Patienten ohne klinische Aktivität fällt (p=0,0002). Hingegen liegt der Anteil CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei klinisch aktiven Patienten, im Vergleich zu den gesunden Probanden, bei 60,5 +/- 2,9 % (p=0,002).

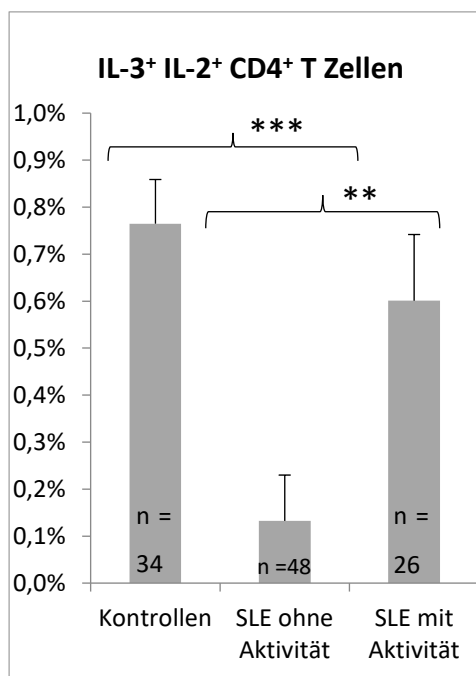
In Abbildung 4.5 wird deutlich, dass der Anteil CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der T-Zellen bei den Kontrollen geringer ist als bei den an systemischen Lupus erkrankten Patienten. Der Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen steigt von 30,4 +/- 1,3 % bei den gesunden Probanden auf 40,6 +/- 2,1 % bei den Patienten ohne klinischer Aktivität (p=0,0002) bzw. auf 39,5 +/- 2,9 % bei klinisch

aktiven Patienten ( $p=0,002$ ). Zwischen den beiden SLE-Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied.



**Abbildung 4.6: Prozentualer Anteil IL-3+ CD4+ T-Zellen an der Gesamtanzahl der CD4+ T-Zellen nach intrazellulärer Färbung für IL-3.** Zur Einteilung in die Gruppen wurde die klinische Aktivität herangezogen. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) werden hier die Patienten in klinischer Remission (SLE ohne Aktivität) und Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher/klinischer Aktivität (SLE mit Aktivität) gezeigt.

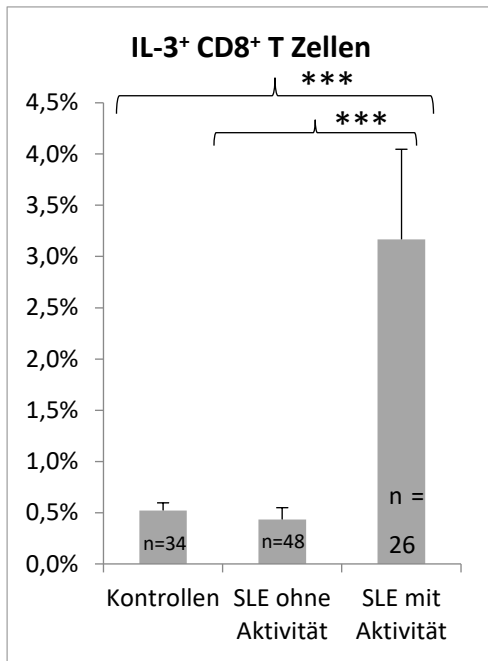
Auf der Abbildung 4.6 ist zu sehen, dass der Anteil IL-3+ CD4+ T-Zellen von 1,2 +/- 0,1 % bei gesunden Kontrollen auf 0,8 +/- 0,1 % bei SLE-Patienten in klinischer Remission sinkt ( $p=0,008$ ). Zwischen den Kontrollen und den Patienten mit Aktivität besteht kein signifikanter Unterschied, wenn auch der Anteil der IL-3+ CD4+ T-Zellen bei den klinisch aktiven Patienten mit 1,1 +/- 0,2 % niedriger ist.



**Abbildung 4.7: Prozentualer IL-3+ IL-2+ CD4+ T-Zellen an der Gesamtanzahl der CD4+ T-Zellen nach intrazellulärer Färbung für IL-3 sowie IL-2.** Zur Einteilung in die Gruppen wurde die klinische Aktivität herangezogen. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) werden hier die Patienten in klinischer Remission (SLE ohne Aktivität) und Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher/klinischer Aktivität (SLE mit Aktivität) gezeigt.

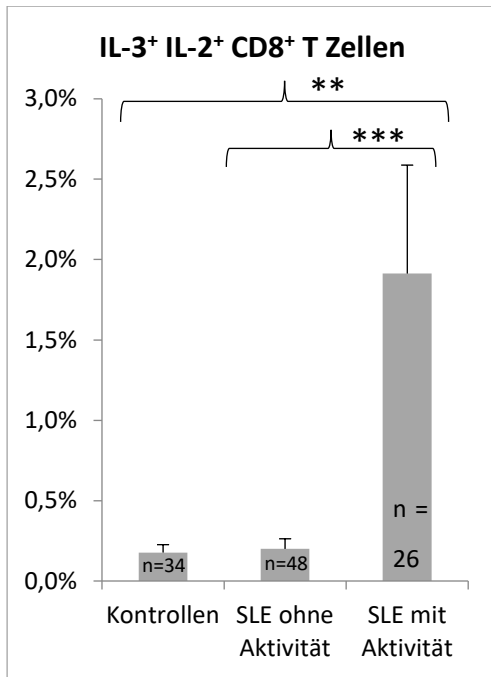
Im Vergleich mit der prozentualen Darstellung der IL-3+ CD4+ T-Zellen an der Gesamtanzahl der CD4+ T-Zellen in Abbildung 4.6 erkennt man in Abbildung 4.7 eine ähnliche Verteilung. Hier fällt der Anteil der IL-3+ IL-2+ CD4+ T-Zellen gesunder Kontrollen von 0,8 +/- 0,1 % auf 0,13 +/- 0,1 % bei Patienten ohne Aktivität

( $p=0,00002$ ). Zwischen den gesunden Probanden und Patienten mit klinischer Aktivität besteht kein signifikanter Unterschied, jedoch erkennt man eine Erhöhung des Anteils der IL-3<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 0,13 +/- 0,1 % bei klinisch nicht aktiven Patienten auf 0,6 +/- 0,1 % bei Lupus-Patienten mit klinischer Aktivität ( $p=0,004$ ).



**Abbildung 4.8: Prozentualer Anteil IL-3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach intrazellulärer Färbung für IL-3.** Zur Einteilung in die Gruppen wurde die klinische Aktivität herangezogen. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) werden hier die Patienten in klinischer Remission (SLE ohne Aktivität) und Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher/klinischer Aktivität (SLE mit Aktivität) gezeigt.

Die Abbildung 4.8 zeigt einen höchst signifikanten Unterschied zwischen den gesunden Kontrollen und Patienten mit klinischer Aktivität. Dabei steigt der Anteil IL-3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen gesunder Kontrollen von 0,5 +/- 0,1 % auf 3,2 +/- 0,9 % bei klinisch aktiven SLE-Patienten ( $p=0,00008$ ). Des Weiteren ist zu erkennen, dass der Anteil IL-3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht aktiver Lupus-Patienten von 0,4 +/- 0,1 % auf 3,17 +/- 0,9 % bei klinisch aktiven Patienten steigt ( $p=0,00006$ ). Zwischen gesunden Probanden und Patienten ohne klinischer Aktivität besteht kein signifikanter Unterschied.

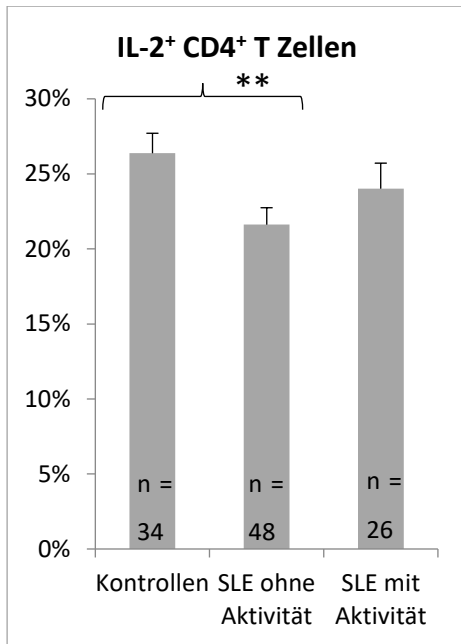


**Abbildung 4.9: Prozentualer Anteil der IL-3<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach intrazellulärer Färbung für IL-3 sowie IL-2.** Zur Einteilung in die Gruppen wurde die klinische Aktivität herangezogen. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) werden hier die Patienten in klinischer Remission (SLE ohne Aktivität) und Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher/klinischer Aktivität (SLE mit Aktivität) gezeigt.

In Abbildung 4.9 erkennt man einen ähnlichen Anstieg des Anteils der doppelt positiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der T-Zellen wie in Abb. 4.8. Hier steigt der Anteil der IL-3<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 0,2 +/- 0,05 % bei den gesunden Kontrollen auf 1,9 +/- 0,7 % bei den Patienten mit klinischer Aktivität (p=0,003). Im Vergleich zu den Patienten ohne klinische Aktivität steigt hier der Anteil der IL-3<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 0,2 +/- 0,06 % auf 1,9 +/- 0,7 % bei klinisch aktiven Patienten (p=0,0006). Zwischen den Kontrollen und den Lupus-Patienten in Remission zeigt sich keine signifikante Zunahme der IL-3<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

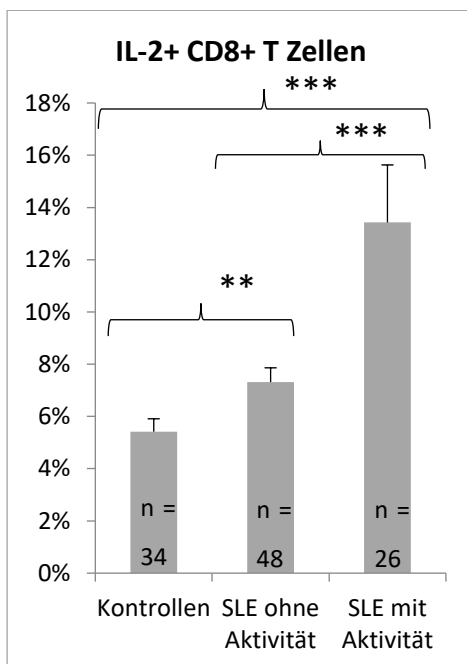
#### 4.2.2 Potentielle IL-2-Quellen bei SLE

Neben dem IL-3 spielt auch das Zytokin IL-2 eine wichtige Rolle in dieser Arbeit. Nach der extrazellulären Färbung, die der Differenzierung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen diente, erfolgte die Detektion der IL-2-Produktion mittels intrazellulärer Färbetechnik, die bereits im Methodenteil angesprochen wurde. Im Folgenden soll IL-2 in Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität des SLE untersucht werden.



**Abbildung 4.10: Prozentualer Anteil der IL-2+ CD4+ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4+ T-Zellen nach intrazellulärer Färbung für IL-2.** Zur Einteilung in die Gruppen wurde die klinische Aktivität herangezogen. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) werden hier die Patienten in klinischer Remission (SLE ohne Aktivität) und Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher/klinischer Aktivität (SLE mit Aktivität) gezeigt.

Abbildung 4.10 zeigt, dass der Anteil IL-2+ CD4+ T-Zellen bei den gesunden Kontrollen mit 26,4 +/- 1,3 % höher ist als bei den SLE-Patienten ohne klinischer Aktivität, die eine IL-2-Produktion von 21,6 +/- 1,1 % aufweisen (p=0,004). Auch der Anteil bei den klinisch aktiven Patienten ist mit 24,0 +/- 1,7 % niedriger, aber hier besteht kein signifikanter Unterschied zwischen gesunden Probanden und Patienten.



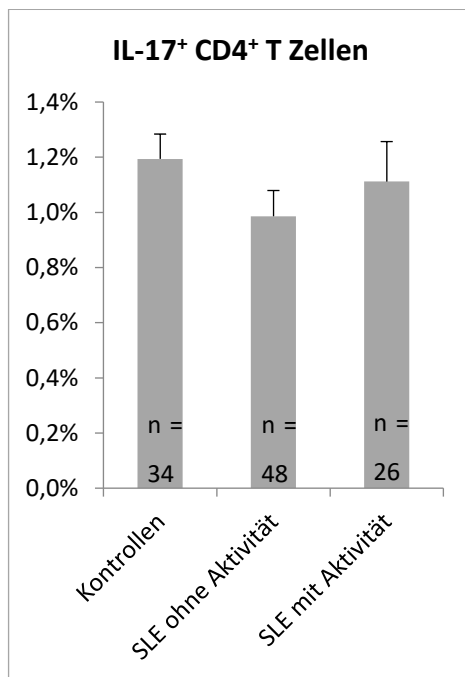
**Abbildung 4.11: Prozentualer Anteil IL-2+ CD8+ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8+ T-Zellen nach intrazellulärer Färbung für IL-2.** Zur Einteilung in die Gruppen wurde die klinische Aktivität herangezogen. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) werden hier die Patienten in klinischer Remission (SLE ohne Aktivität) und Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher/klinischer Aktivität (SLE mit Aktivität) gezeigt.

Aus Abbildung 4.11 wird ersichtlich, dass mit Vorhandensein einer klinischen Krankheitsaktivität die IL-2-Produktion zunimmt. Der Anteil der IL-2+ CD8+ T-Zellen nimmt von 5,4 +/- 0,5 % bei den Kontrollen auf 7,3 +/- 0,5 % bei den SLE-Patienten ohne klinische Aktivität zu (p=0,009). Noch deutlicher ist der Unterschied zwischen den gesunden Probanden und den unter hoher Krankheitsaktivität leidenden Patienten (mit klinischer Aktivität). Hier nimmt der Anteil IL-2+ CD8+ T-Zellen von 5,4 +/- 0,5 % bei den Kontrollen auf 13,4 +/- 2,2 % der klinisch aktiven Lupus-Patienten zu (p=0,0001). Auch

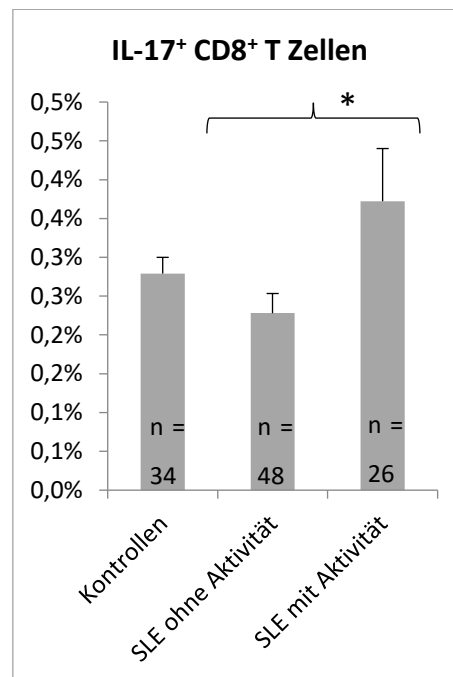
zwischen den Patienten ohne und mit Entzündungsaktivität findet man einen höchst signifikanten Unterschied. So steigt der Anteil an IL-2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 7,3 +/- 0,5 % bei Patienten in Remission auf 13,4 +/- 2,2 % bei klinisch aktiven Erkrankten (p=0,0006).

#### 4.2.3 Potentielle IL-17-Quellen bei SLE

Neben IL-3 und IL-2 gehört auch IL-17 zu den in dieser Arbeit untersuchten Zytokinen. Es galt herauszufinden, in welchem Ausmaß CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen zur Produktion von IL-17 fähig sind und in welchem Zusammenhang die IL-17-Sekretion mit der Schwere der Erkrankung steht.



**Abbildung 4.12: Prozentualer Anteil IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach intrazellulärer Färbung für IL-17.** Zur Einteilung in die Gruppen wurde die klinische Aktivität herangezogen. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) werden hier die Patienten in klinischer Remission (SLE ohne Aktivität) und Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher/klinischer Aktivität (SLE mit Aktivität) gezeigt.



**Abbildung 4.13: Prozentualer Anteil IL-17<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach intrazellulärer Färbung für IL-17.** Zur Einteilung in die Gruppen wurde die klinische Aktivität herangezogen. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) werden hier die Patienten in klinischer Remission (SLE ohne Aktivität) und Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher/klinischer Aktivität (SLE mit Aktivität) gezeigt.

Aus der Auswertung des prozentualen Anteils der IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen lässt sich der Schluss ziehen, dass kein wesentlicher Unterschied zwischen den Gruppen besteht. Der Anteil der IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei den klinisch nicht aktiven



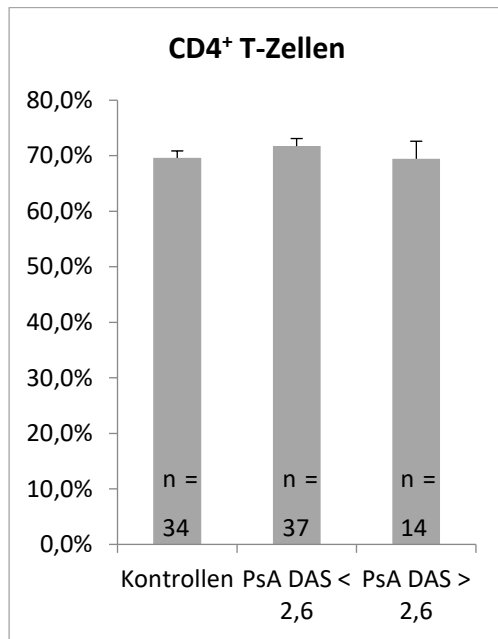
Patienten ist zwar mit 0,99 +/- 0,09 % niedriger als derjenige der Kontrollen, allerdings ist der Unterschied nicht signifikant ( $p=0,07$ ).

In der Abbildung 4.13 erkennt man hingegen, dass der Anteil der IL-17<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten mit hoher Erkrankungsaktivität signifikant höher ist, als jener der in Remission befindlichen Patienten. So steigt der Anteil IL-17<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 0,23 +/- 0,03 % bei den klinisch nicht Aktiven auf 0,37 +/- 0,07 % bei den Patienten mit klinischer Aktivität ( $p=0,01$ ). Zwischen den Kontrollen und klinisch Aktiven sowie den Kontrollen und in Remission befindlichen Erkrankten besteht kein signifikanter Unterschied.

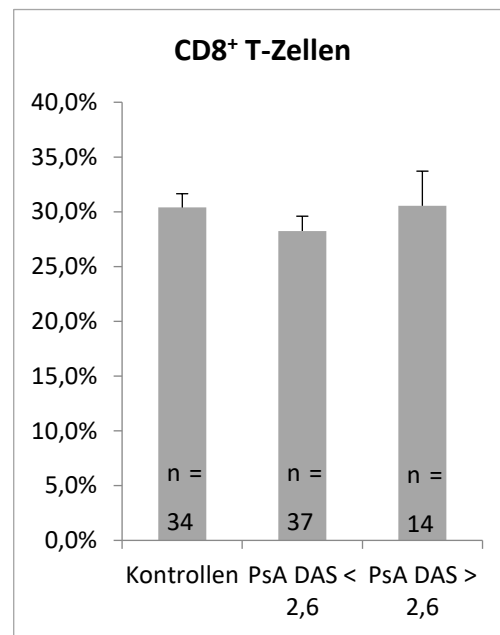
## 4.3 Untersuchung möglicher Zytokin-Produzenten bei PsA

### 4.3.1 Potentielle IL-3-Quellen bei PsA

Bei den PsA-Patienten erfolgte mittels extrazellulärer Färbung die Differenzierung zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und nachfolgend die Detektion der IL-3-Produktion mittels intrazellulärer Färbetechnik. Es wurde untersucht, ob ein möglicher Zusammenhang zwischen der Höhe der IL-3-Produktion und der Erkrankungsaktivität besteht und ob ein Unterschied zwischen gesunden Probanden und an PsA erkrankten Personen zu erkennen ist.

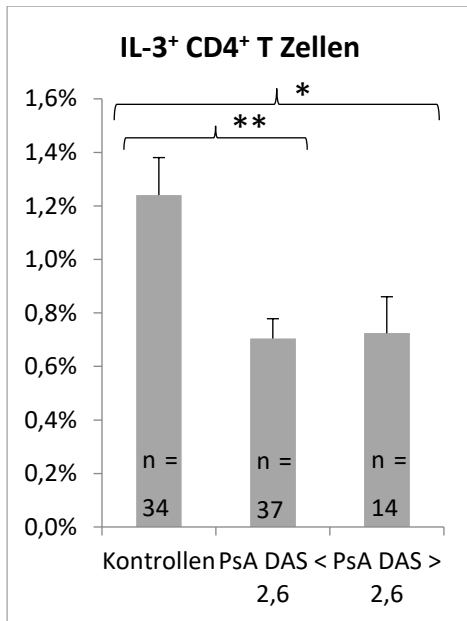


**Abbildung 4.14: Prozentualer Anteil CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD3<sup>+</sup> T-Zellen nach extrazellulärer Färbung.** Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird hier die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) sowie jene von Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher Aktivität (DAS > 2,6)



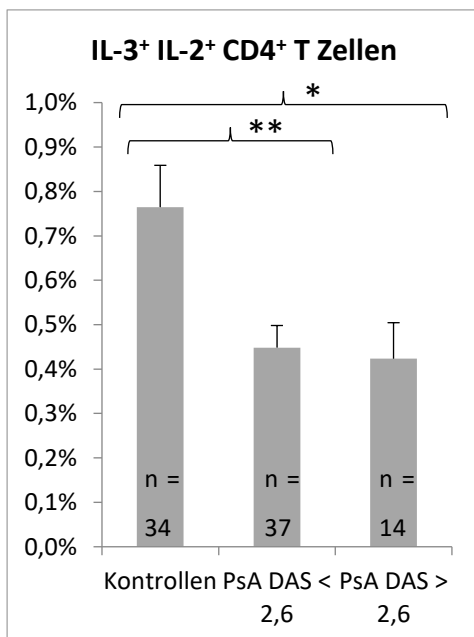
**Abbildung 4.15: Prozentualer Anteil CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD3<sup>+</sup> T-Zellen nach extrazellulärer Färbung.** Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird hier die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) sowie jene von Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher Aktivität (DAS > 2,6) gezeigt.

In Abbildung 4.14 und 4.15 ist der Anteil CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu erkennen. Es ist zu sehen, dass zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied besteht.



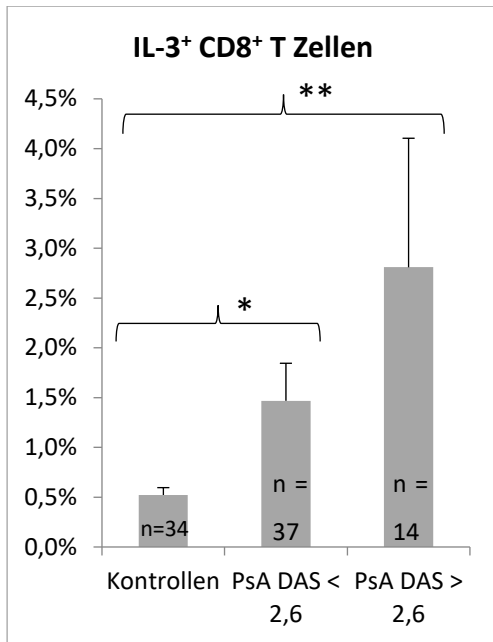
**Abbildung 4.16: Prozentualer Anteil der IL-3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach intrazellulärer Färbung für IL-3.** Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird hier die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) sowie jene von Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher Aktivität (DAS > 2,6) gezeigt.

Abbildung 4.16 zeigt, dass der Anteil der IL-3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 1,2 +/- 0,1 % bei den Kontrollen auf 0,7 +/- 0,07 % bei den Patienten in Remission (DAS < 2,6) fällt (p=0,0005). Ähnlich ausgeprägt ist das Verhältnis zwischen den Kontrollen und den Patienten mit moderater bis hoher Krankheitsaktivität (DAS > 2,6), wo der Anteil der IL-3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 1,2 +/- 0,1 % bei gesunden Probanden auf 0,7 +/- 0,14 % bei Patienten mit DAS-Werten > 2,6 sinkt (p=0,02).



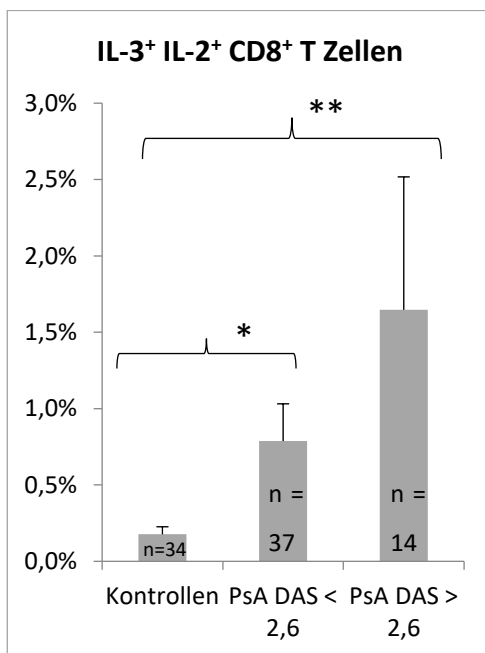
**Abbildung 4.17: Prozentualer Anteil der IL-3<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach intrazellulärer Färbung für IL-3 und IL-2.** Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird hier die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) sowie jene von Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher Aktivität (DAS > 2,6) gezeigt.

Die Ergebnisse in Abbildung 4.17 ähneln jenen in Abb.x. Man erkennt hier ebenso signifikante bzw. hoch signifikante Abnahme der IL-3 und IL-2-Produktion zwischen den Kontrollen und den an PsA leidenden Patienten. So sinkt der Anteil der IL-3<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 0,8 +/- 0,09 % bei den Kontrollen auf 0,5 +/- 0,05 % bei den in Remission befindlichen Patienten (p=0,002). Bei den Patienten mit höheren DAS28 CRP Werten ist der Anteil IL-3<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit 0,4 +/- 0,08 % niedriger als bei den gesunden Probanden (p=0,02).



**Abbildung 4.18: Prozentualer Anteil IL-3+ CD8+ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8+ T-Zellen nach intrazellulärer Färbung für IL-3.** Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird hier die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) sowie jene von Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher Aktivität (DAS > 2,6) gezeigt.

Aus Abbildung 4.18 wird ersichtlich, dass der Anteil IL-3+ CD8+ T-Zellen von 0,5 +/- 0,07 % in der Kontrollgruppe auf einen mit 1,5 +/- 0,4 % etwa dreifach so hohen Wert in der Gruppe der in Remission (DAS < 2,6) befindlichen Patienten steigt (p=0,01). Vergleicht man die gesunden Probanden mit der Gruppe der Patienten mit niedriger bis hoher Krankheitsaktivität (DAS > 2,6) zeigt sich ein hoch signifikanter Anstieg (p=0,006) von 0,5 +/- 0,07 % auf 2,8 +/- 1,3 %. Bei den Patienten mit DAS28-Werten > 2,6 ist ein, verglichen mit der Kontrollgruppe, auf mehr als das Fünffache erhöhte Wert messbar.



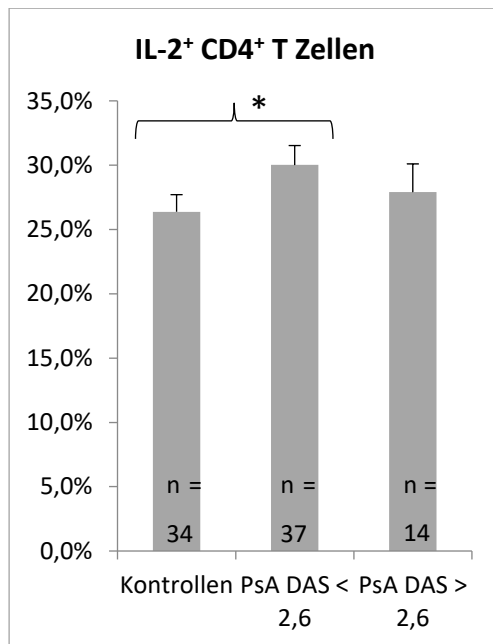
**Abbildung 4.19: Prozentualer Anteil der IL-3+ IL-2+ CD8+ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8+ T-Zellen nach intrazellulärer Färbung für IL-2 und IL-2.** Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird hier die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) sowie jene von Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher Aktivität (DAS > 2,6) gezeigt.

Vergleicht man die Resultate in Abbildung 4.18 und 4.19, so erkennt man, dass diese sich ähneln. Auch hier beobachtet man ein kontinuierliches Ansteigen der IL-3+ IL-2+ CD8+ T-Zellen in Abhängigkeit der Krankheitsaktivität.

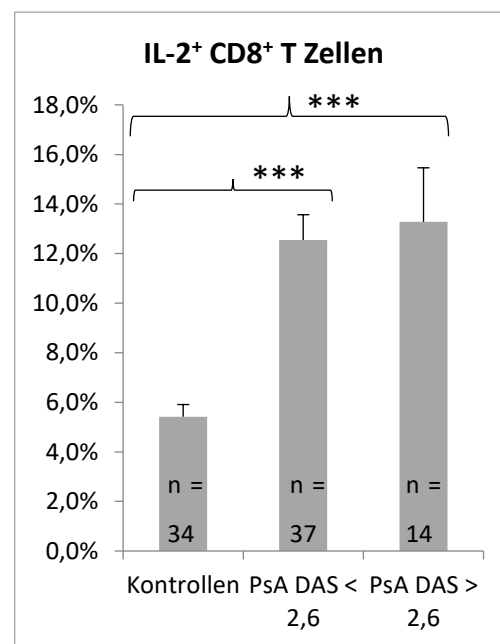
Der Anteil der IL-3<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen steigt von 0,2 +/- 0,05 % in der Kontrollgruppe auf 0,8 +/- 0,2 % bei den in Remission (DAS < 2,6) befindlichen Patienten (p=0,01), was etwa dem Vierfachen Wert entspricht. Vergleicht man nun die Gruppe der Kontrollen mit jener der klinisch aktiven PsA-Patienten (DAS > 2,6), kann man einen Anstieg um etwa das Neunfache von 0,2 +/- 0,05 % auf 1,7 +/- 0,9 % beobachten (p=0,008).

#### 4.3.2 Potentielle IL-2-Quellen bei PsA

Nach extrazellulärer Färbung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte auch die intrazelluläre Detektion von IL-2. Neben IL-3 sollen auch die Auswirkungen dieses Zytokins bei PsA-Patienten untersucht werden, vor allem im Hinblick auf die Schwere der Erkrankung und der dabei vorliegenden IL-2-Produktion. Zudem soll der Unterschied zwischen gesunden Probanden und den erkrankten Personen betrachtet werden.



**Abbildung 4.20: Prozentualer Anteil der IL-2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach intrazellulärer Färbung für IL-2.** Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird hier die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) sowie jene von Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher Aktivität (DAS > 2,6) gezeigt.



**Abbildung 4.21: Prozentualer Anteil der IL-2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach intrazellulärer Färbung für IL-2.** Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird hier die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) sowie jene von Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher Aktivität (DAS > 2,6) gezeigt.

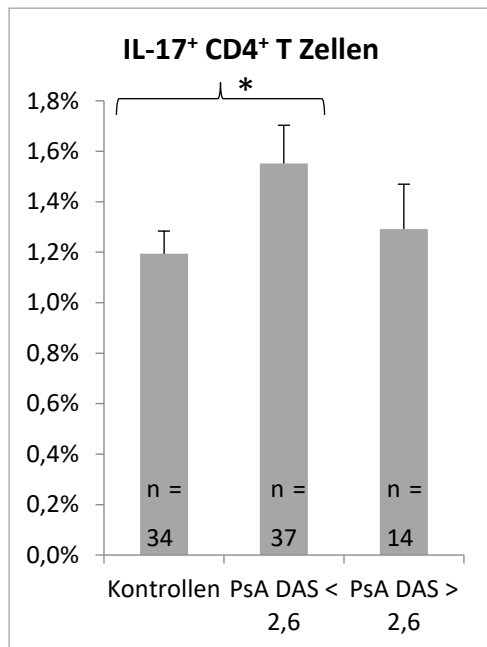
Auf Abbildung 4.20 erkennt man, dass der Anteil IL-2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 26,4 +/- 1,3 % in der Kontrollgruppe auf 30,0 +/- 1,5 % bei der PsA-Gruppe mit DAS-Werten < 2,6 steigt (p=0,04).

Zwischen den Kontrollen und den PsA-Patienten mit höheren bzw. hohen DAS-Werten besteht kein signifikanter Unterschied.

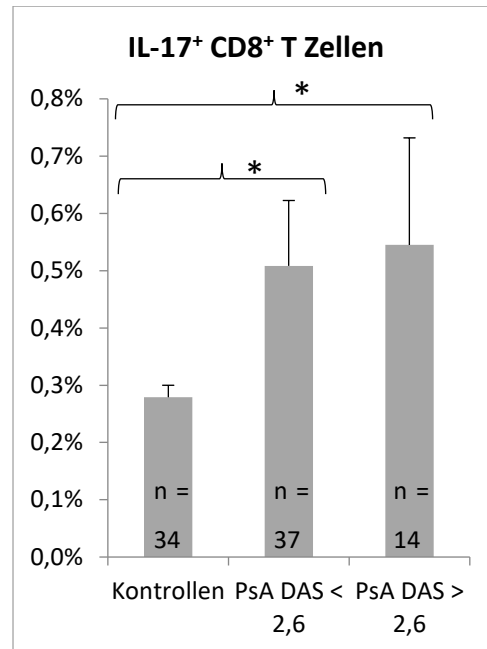
Im Unterschied dazu kann man der Abbildung 4.21 entnehmen, dass der Anteil IL-2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit zunehmender Krankheitsaktivität steigt. Die Abb. 4.21 zeigt höchst signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. So kann man der Abbildung entnehmen, dass der Anteil IL-2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 5,4 +/- 0,5 % bei den gesunden Probanden auf 12,6 +/- 1,0 % in der Gruppe der in Remission (DAS < 2,6) befindlichen Patienten ansteigt (p=0,00000004), was einer Verdopplung der IL-2-Produktion entspricht. Beim Vergleich der Kontrollgruppe mit derjenigen der Patienten mit moderater bis hoher Krankheitsaktivität (DAS > 2,6) zeigt sich ebenfalls eine Verdopplung des IL-2-Anteils von 5,4 +/- 0,5 % auf 13,3 +/- 2,2 % bei den Patienten (p=0,000009).

### 4.3.3 Potentielle IL-17-Quellen bei PsA

IL-17 wurde ebenso wie die zuvor besprochenen Zytokine IL-3 und IL-2 nach intrazellulärer Färbung detektiert. Auch hier soll erfasst werden, ob CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen als mögliche Quellen von IL-17 in Betracht kommen und ob die Produktion von IL-17 mit der Erkrankungsschwere der PsA assoziiert ist.



**Abbildung 4.22: Prozentualer Anteil IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach intrazellulärer Färbung für IL-17.** Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird hier die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) sowie jene von Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher Aktivität (DAS > 2,6) gezeigt.



**Abbildung 4.23: Prozentualer Anteil IL-17<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach intrazellulärer Färbung für IL-17.** Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird hier die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) sowie jene von Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher Aktivität (DAS > 2,6) gezeigt.

Auf Abbildung 4.22 sieht man, dass der Anteil IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 1,2 +/- 0,1 % bei den Kontrollen auf 1,6 +/- 0,2 % bei der Gruppe der niedrig aktiven Patienten (DAS < 2,6) zunimmt ( $p=0,03$ ). Zwischen den Kontrollen und den Patienten mit moderater bis hoher Krankheitsaktivität lässt sich kein signifikanter Unterschied erkennen.

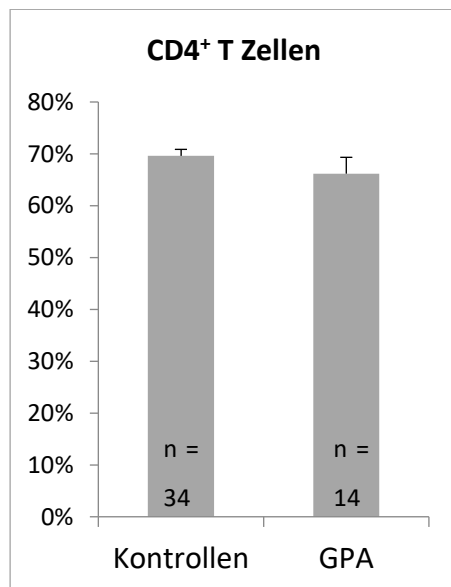
Die Resultate in Abbildung 4.23 hingegen zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen und lassen erkennen, dass der Anteil IL-17<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit der Erkrankungsschwere zunimmt. So zeigt sich, dass die Menge IL-17<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 0,28

+/- 0,02 % bei den gesunden Probanden (Kontrollen) auf 0,5 +/- 0,1 % in der Gruppe der Patienten mit DAS-Werten < 2,6 steigt (p=0,03). Bei Betrachtung der Kontrollen sowie der PsA-Patienten mit moderater bis hoher Krankheitsaktivität (DAS > 2,6) kann man erkennen, dass der Anteil IL-17<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 0,5 +/- 0,1 % auf 0,5 +/- 0,2 % zunimmt (p=0,02).

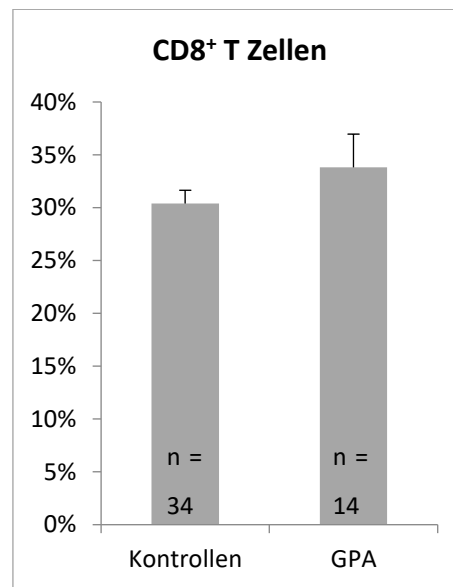
## 4.4 Untersuchung möglicher Zytokin-Produzenten bei GPA

### 4.4.1 Potentielle IL-3-Quellen bei GPA

Auch bei der GPA wurde die Produktion von IL-3 nach extrazellulärer Färbung zur Identifikation CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht und im Kontext der Krankheitsaktivität ausgewertet. Es erfolgte eine Gegenüberstellung gesunder Probanden mit Personen, die die Diagnose GPA erhalten hatten. Dabei wurde die Menge der IL-3-Produktion zwischen diesen beiden Gruppen verglichen.



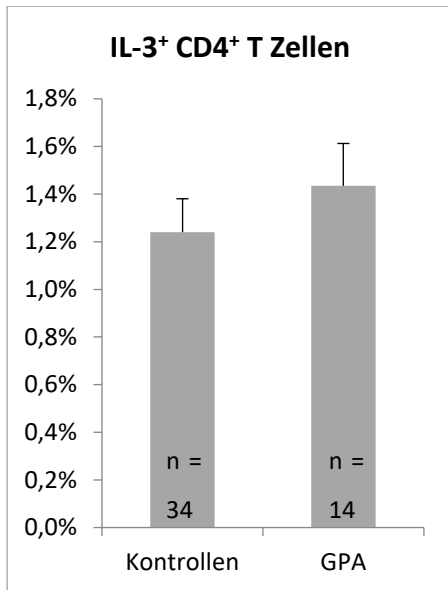
**Abbildung 4.24: Prozentualer Anteil CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD3<sup>+</sup> T-Zellen.** Dargestellt sind die gesunden Probanden (Kontrollen) im Vergleich mit Patienten mit der klinisch und laborchemisch gesicherten Diagnose GPA.



**Abbildung 4.25: Prozentualer Anteil CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD3<sup>+</sup> T-Zellen.** Dargestellt sind die gesunden Probanden (Kontrollen) im Vergleich mit Patienten mit der klinisch und laborchemisch gesicherten Diagnose GPA.

Abbildungen 4.24 und 4.25 zeigen, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Anteilen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der T-Zellen bei Kontrollen und Patienten vorliegen.

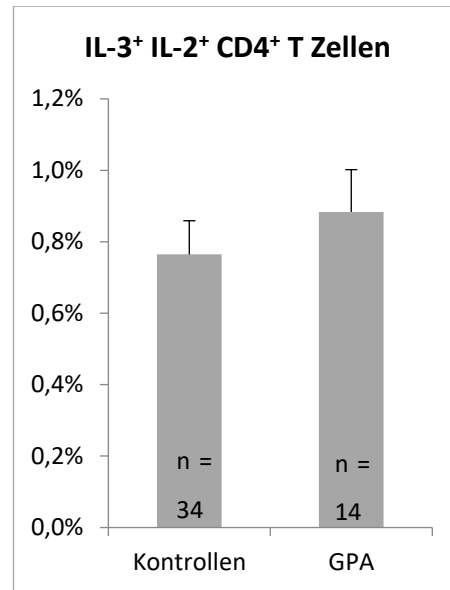




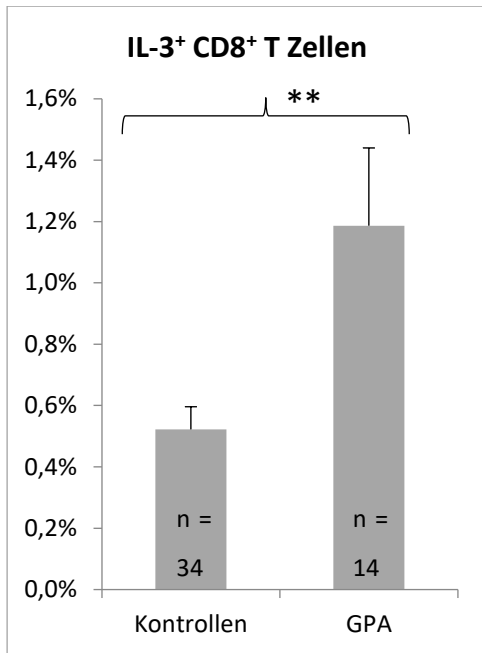
**Abbildung 4.26: Prozentualer Anteil IL-3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen.** Dargestellt sind die gesunden Probanden (Kontrollen) im Vergleich mit Patienten mit der klinisch und laborchemisch gesicherten Diagnose GPA.

Auf Abbildung 4.26 erkennt man, dass der Anteil IL-3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei den GPA-Patienten mit 1,4 +/- 0,2 % etwas höher ist als bei den gesunden Probanden (Kontrollen), die einen Anteil von 1,2 +/- 0,1 % aufweisen (p=0,2).

Ähnliche Resultate kann man der Abbildung 4.27 entnehmen. Hier steigt der Anteil IL-3<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 0,76 +/- 0,09 % bei den Kontrollen auf 0,88 +/- 0,1 % bei den an GPA erkrankten Patienten (p=0,2).

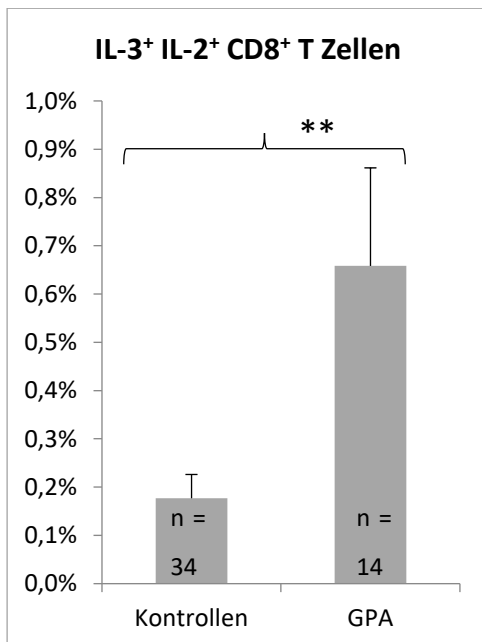


**Abbildung 4.27: Prozentualer Anteil IL-3<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (doppelt positive) T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen.** Dargestellt sind die gesunden Probanden (Kontrollen) im Vergleich mit Patienten mit der klinisch und laborchemisch gesicherten Diagnose GPA.



**Abbildung 4.28: Prozentualer Anteil IL-3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen.** Dargestellt sind die gesunden Probanden (Kontrollen) im Vergleich mit Patienten mit der klinisch und laborchemisch gesicherten Diagnose GPA.

Die Abbildung 4.28 macht deutlich, dass ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und den erkrankten Personen besteht. So steigt der Anteil IL-3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 0,5 +/- 0,1 % in der Kontrollgruppe auf 1,3 +/- 0,2 % bei den GPA-Patienten an. Dies entspricht etwas mehr als einer Verdopplung des Anteils IL-3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei der Gruppe der an GPA erkrankten Personen (p=0,001).

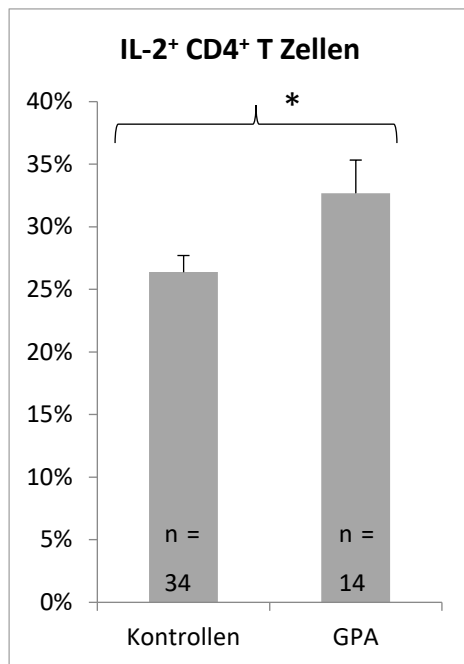


**Abbildung 4.29: Prozentualer Anteil IL-3<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen.** Dargestellt sind die gesunden Probanden (Kontrollen) im Vergleich mit Patienten mit der klinisch und laborchemisch gesicherten Diagnose GPA.

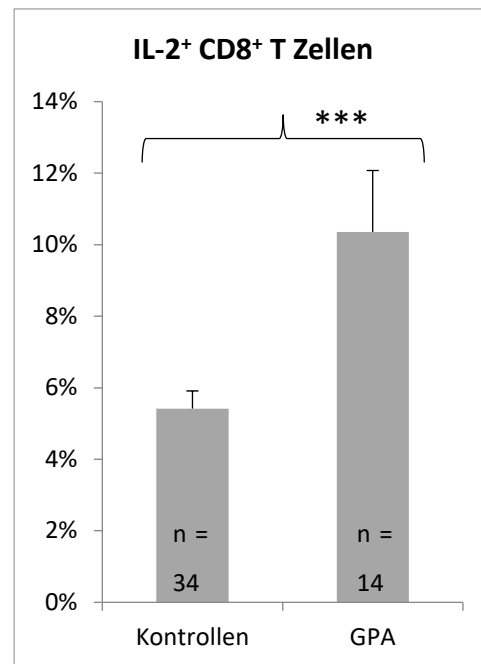
Vergleicht man Abbildung 4.28 und 4.29, so sieht man, dass hier sehr ähnliche Ergebnisse vorliegen. Es liegt ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und der Patientengruppe vor. Der Anteil IL-3<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen steigt von 0,2 +/- 0,05 % bei den Kontrollen auf 0,7 +/- 0,2 % in der Gruppe der Patienten, was in etwa dem Dreifachen im Vergleich zur Kontrollgruppe entspricht (p=0,002).

#### 4.4.2 Potentielle IL-2-Quellen bei GPA

Wie beim SLE und der PsA wurde bei der GPA das IL-2 im Hinblick auf Unterschiede zwischen gesunden Probanden und Erkrankten untersucht.



**Abbildung 4.30: Prozentualer Anteil IL-2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen.** Dargestellt sind die gesunden Probanden (Kontrollen) im Vergleich mit Patienten mit der klinisch und laborchemisch gesicherten Diagnose GPA.



**Abbildung 4.31: Prozentualer Anteil IL-2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen.** Dargestellt sind die gesunden Probanden (Kontrollen) im Vergleich mit Patienten mit der klinisch und laborchemisch gesicherten Diagnose GPA.

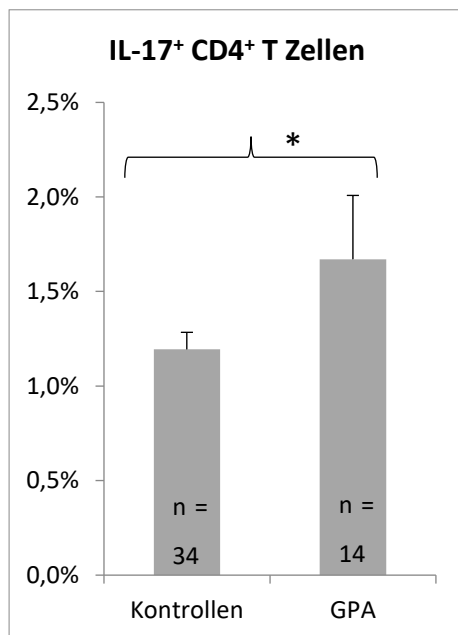
Abbildung 4.30 zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe der Kontrollen und jener der GPA-Patienten. Man kann erkennen, dass der Anteil der IL-2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 26,4 +/- 1,3 % in der Kontrollgruppe auf 32,7 +/- 2,7 % bei den Patienten ansteigt (p=0,01).

Die Abbildung 4.31 zeigt einen noch deutlicheren Anstieg des Anteils IL-2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 5,4 +/- 0,5 % bei den Kontrollen auf 10,4 +/- 1,7 % bei den an GPA erkrankten Personen. Dies entspricht in etwa einer Verdoppelung des Anteils IL-2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei GPA-Patienten und stellt somit einen höchst signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen dar (p=0,0004).

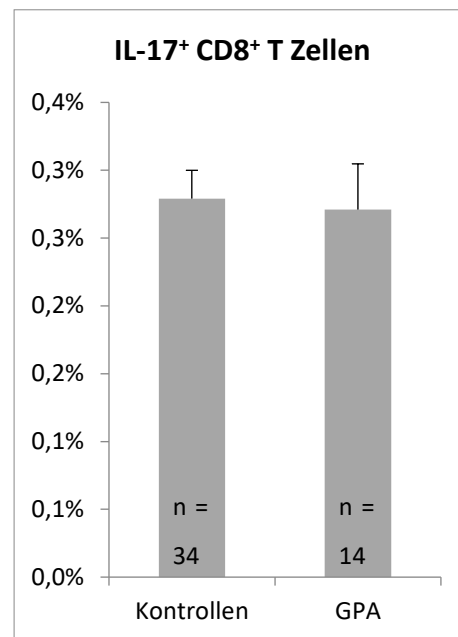
#### 4.4.3 Potentielle IL-17-Quellen bei GPA

Neben IL-3 und IL-2 soll auch der IL-17-Anteil zwischen gesunden Probanden und GPA-Patienten verglichen werden. Hierbei wird untersucht, ob der Anteil bei den erkrankten Personen höher ist, als bei der gesunden Bevölkerung. Hierzu wurde nach der extrazellulären

Färbung für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen die intrazelluläre Detektion des IL-17 durchgeführt. Die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.



**Abbildung 4.32: Prozentualer Anteil IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen.** Dargestellt sind die gesunden Probanden (Kontrollen) im Vergleich mit Patienten mit der klinisch und laborchemisch gesicherten Diagnose GPA.



**Abbildung 4.33: Prozentualer Anteil IL-17<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen.** Dargestellt sind die gesunden Probanden (Kontrollen) im Vergleich mit Patienten mit der klinisch und laborchemisch gesicherten Diagnose GPA.

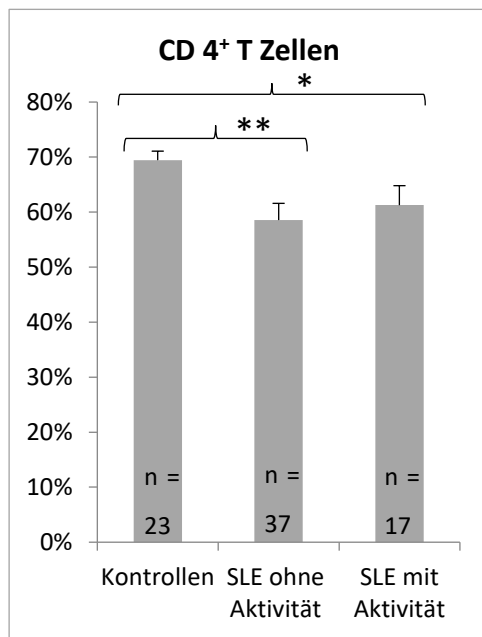
Aus Abbildung 4.32 wird ersichtlich, dass ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der an GPA leidenden Patienten besteht. Man kann ablesen, dass der Anteil IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 1,2 +/- 0,1 % bei den Kontrollen auf 1,7 +/- 0,3 % bei den GPA-Patienten ansteigt (p=0,04).

Auf Abbildung 4.33 erkennt man hingegen, dass kein wesentlicher Unterschied zwischen dem Anteil IL-17<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten und Kontrollen vorliegt (p=0,4).

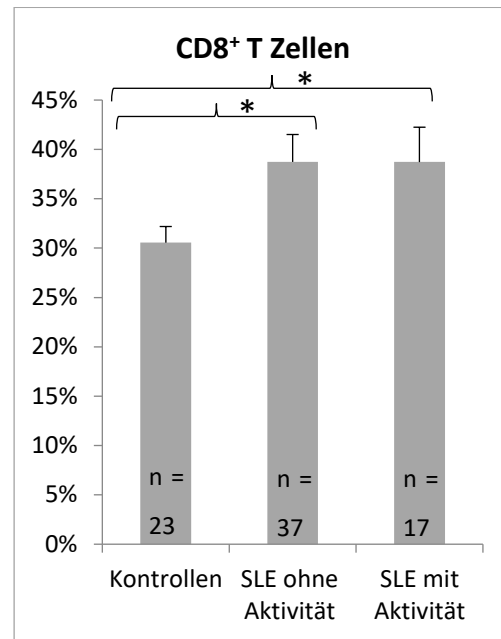
## 4.5 Analyse der PBMCs bei SLE-Patienten

Um die mononucleären Zellen des peripheren Blutes zu untersuchen, wurden 100 µl Vollblut entnommen und wie unter 3.2.4 beschrieben mit Fluoreszenz markierten Antikörpern gefärbt, um eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Zellen und deren Expression des IL-3-Rezeptors sowie anderen Oberflächenmerkmalen zu ermöglichen. Dasselbe Vorgehen gilt auch für die Blutproben der PsA- und GPA-Patienten.

#### 4.5.1 Anzahl der T-Zellen im peripheren Blut



**Abbildung 4.34: Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der T-Zellen im peripheren Vollblut.** Zur Einteilung in die Gruppen wurde die klinische Aktivität herangezogen. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) werden hier die Patienten in klinischer Remission (SLE ohne Aktivität) und Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher/klinischer Aktivität (SLE mit Aktivität) gezeigt.



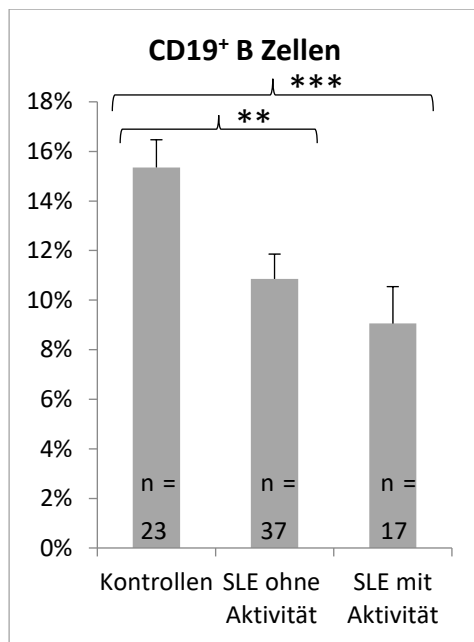
**Abbildung 4.35: Anzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der T-Zellen im peripheren Vollblut.** Zur Einteilung in die Gruppen wurde die klinische Aktivität herangezogen. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) werden hier die Patienten in klinischer Remission (SLE ohne Aktivität) und Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher/klinischer Aktivität (SLE mit Aktivität) gezeigt.

Aus Abbildung 4.34 geht hervor, dass ein hoch bzw. höchst signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe sowie der Gruppe der Patienten mit keiner bis niedriger (SLE ohne klinische Aktivität) und jener mit hoher (SLE mit klinischer Aktivität) Krankheitsaktivität besteht. Man kann erkennen, dass der Anteil CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 69,0 +/- 2 % in der Kontrollgruppe auf 59,0 +/- 3 % (p=0,005) bei den Patienten in Remission (SLE ohne Aktivität) bzw. auf 61,0 +/- 4 % in der Gruppe der SLE-Patienten mit klinischer Aktivität (p=0,02). Zwischen den beiden Patientengruppen besteht kein signifikanter Unterschied (p=0,3). Dieses Ergebnis stimmt mit jenem aus 4.2.1 (Abb. 4.4) überein. Auch in Abb. 4.34 ist der Anteil CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei den Kontrollen höher als jener in der Patientengruppe.

Ebenso erkennt man beim Vergleich von Abb. 4.5 aus 4.2.1 und Abb. 4.35 aus 4.5.1, dass die Resultate übereinstimmen und der Anteil CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der T-Zellen in der Gruppe der an SLE erkrankten Personen signifikant höher ist. Man kann der Abb. 4.35 entnehmen, dass der Anteil CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Gruppe der gesunden Probanden

(Kontrollen) mit 31,0 +/- 2 % signifikant niedriger ( $p=0,02$ ) ist als der Anteil CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Patientengruppe ohne klinische Aktivität, der hier 39,0 +/- 3 % beträgt. Auch die Patienten mit klinischer Aktivität weisen mit einem Anteil CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 39,0 +/- 4 % eine im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant höheren Anteil auf ( $p=0,02$ ).

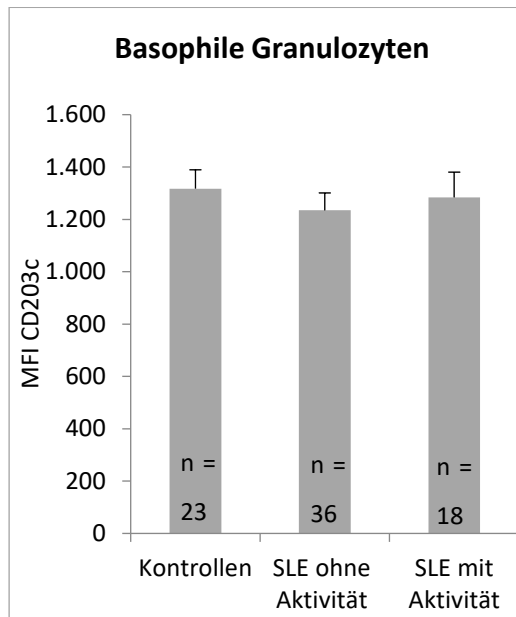
#### 4.5.2 Anzahl der B-Zellen im peripheren Blut



**Abbildung 4.36: Anzahl der CD19<sup>+</sup> B-Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der T-Zellen im peripheren Vollblut.** Zur Einteilung in die Gruppen wurde die klinische Aktivität herangezogen. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) werden hier die Patienten in klinischer Remission (SLE ohne Aktivität) und Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher/klinischer Aktivität (SLE mit Aktivität) gezeigt.

Zur Identifikation der B-Zellen verwendete man in der vorliegenden Arbeit das Oberflächenantigen CD19, welches von allen B-Zellen exprimiert wird. Auf Abbildung 4.36 erkennt man, dass der Anteil CD19<sup>+</sup> B-Zellen in der Gruppe der Patienten hoch bis höchst signifikant niedriger ist im Vergleich zu den gesunden Probanden. So sinkt der Anteil der B-Zellen von 15,0 +/- 1 % bei den Kontrollen auf 11,0 +/- 1 % in der Patientengruppe ohne Aktivität ( $p=0,003$ ). Die Patienten mit Aktivität weisen mit 9,0 +/- 1 % einen höchst signifikant niedrigeren Anteil CD19<sup>+</sup> B-Zellen auf als die Kontrollgruppe ( $p=0,0009$ ). Zwischen den beiden Patientengruppen findet sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0,2$ ).

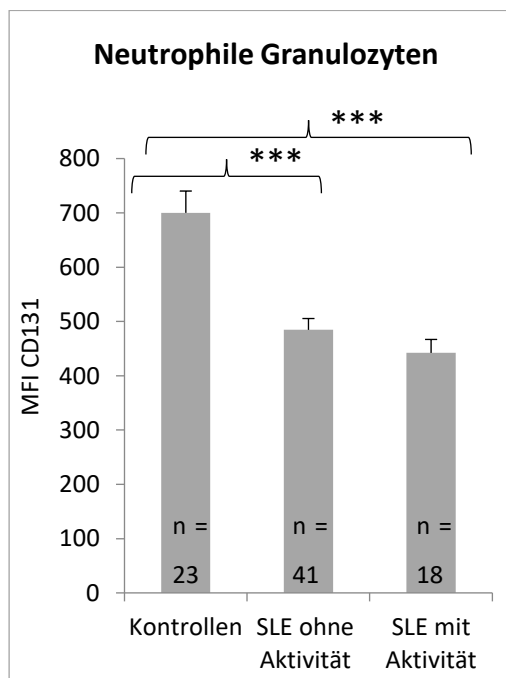
#### 4.5.3 Expression von CD203c auf Basophilen Granulozyten im peripheren Blut



**Abbildung 4.37: Expression von CD203c auf Basophilen Granulozyten.** Zur Einteilung in die Gruppen wurde die klinische Aktivität herangezogen. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) werden hier die Patienten in klinischer Remission (SLE ohne Aktivität) und Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher/klinischer Aktivität (SLE mit Aktivität) gezeigt.

CD203c ist ein Aktivitätsmarker auf Basophilen Granulozyten. Die Abbildung 4.37 zeigt, dass die Expression von CD203c zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede aufweist.

#### 4.5.4 Expression der IL-3R- $\beta$ -Kette auf Neutrophilen Granulozyten

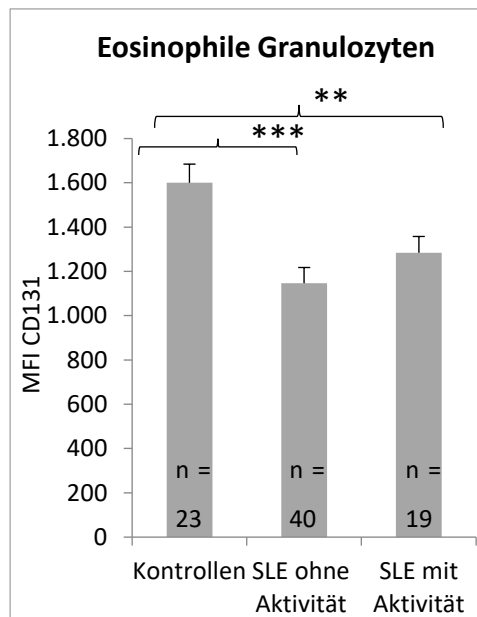


**Abbildung 4.38: Mean Fluorescence Index (MFI) der IL-3R- $\beta$ -Kette auf Neutrophilen Granulozyten.** Zur Einteilung in die Gruppen wurde die klinische Aktivität herangezogen. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) werden hier die Patienten in klinischer Remission (SLE ohne Aktivität) und Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher/klinischer Aktivität (SLE mit Aktivität) gezeigt.

In der Abbildung 4.38 ist zu erkennen, dass der MFI der IL-3-Rezeptor- $\beta$ -Kette auf Neutrophilen Granulozyten bei den gesunden Kontrollen höchst signifikant höher ist als bei den an SLE erkrankten Personen. So fällt der MFI von 700,0 +/- 40,3 in der Kontrollgruppe auf 484,5 +/- 20,9 in der Gruppe der nicht aktiven Patienten (SLE ohne Aktivität) ( $p=0,000001$ ). Ebenso zeigt der Vergleich der Kontrollgruppe mit den aktiven

Lupus-Patienten einen Abfall von 700,0 +/- 40,3 bei den Kontrollen auf 424,0 +/- 24,8 in der Patientengruppe mit Aktivität ( $p=0,000003$ ).

#### 4.5.5 Expression der IL-3R- $\beta$ -Kette auf Eosinophilen Granulozyten



**Abbildung 4.39: Expression der IL-3R- $\beta$ -Kette auf Eosinophilen Granulozyten.** Zur Einteilung in die Gruppen wurde die klinische Aktivität herangezogen. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) werden hier die Patienten in klinischer Remission (SLE ohne Aktivität) und Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher/klinischer Aktivität (SLE mit Aktivität) gezeigt.

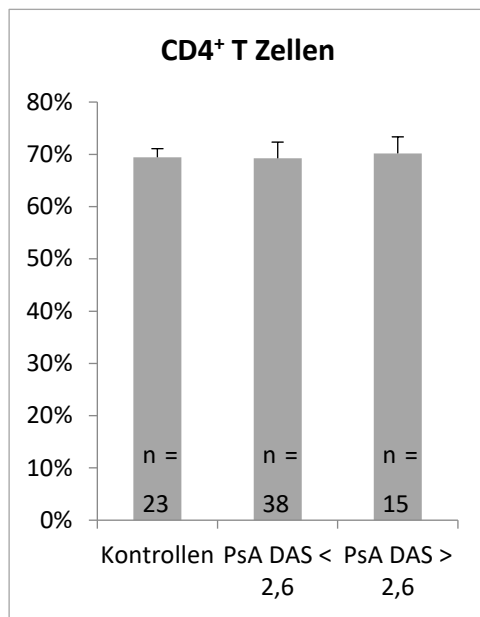
In der Abbildung 4.39 sieht man, dass der MFI von CD131 auf Eosinophilen Granulozyten in der Gruppe der SLE-Patienten höchst bzw. hoch signifikant niedriger ist im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Vergleicht man die Gruppe der klinisch aktiven Lupus-Patienten mit der Kontrollgruppe, so sieht man, dass der MFI von 1600 +/- 85 bei den Kontrollen auf 1284 +/- 74 in der Patientengruppe sinkt ( $p=0,004$ ). Noch deutlicher ist der Unterschied zwischen den gesunden Probanden (Kontrollen) und den Patienten ohne klinischer Aktivität. Hier sinkt die Anzahl von 1284 +/- 74 auf 1147 +/- 71 ( $p=0,0001$ ). Bei Vergleich der beiden Patientengruppen findet sich kein signifikanter Unterschied.

## 4.6 Analyse der PBMCs bei PsA-Patienten

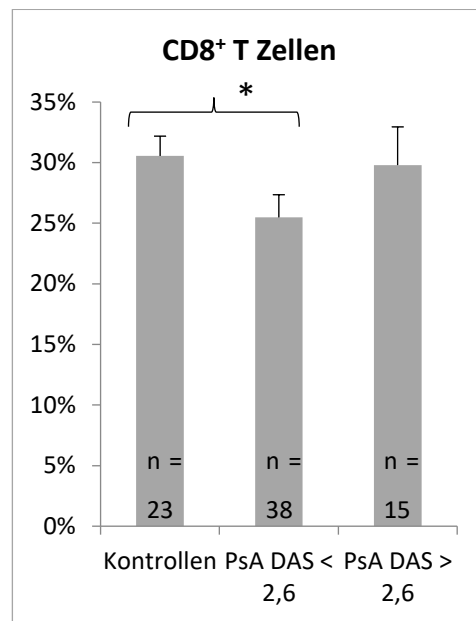
Mittels extrazellulärer Färbung erfolgte die Identifikation CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und anderer Zellen des peripheren Blutes, denen eine Rolle in der Entwicklung der PsA zugeschrieben oder vermutet wird. Hierzu gehören auch die B-Zellen, Basophilen Granulozyten und peripheren dendritischen Zellen. Zudem wurden auch die Neutrophilen und Eosinophilen Granulozyten sowie deren Expression der IL-3R- $\beta$ -Kette betrachtet. Die Ergebnisse werden in den folgenden Punkten dargestellt.



#### 4.6.1 Anzahl der T-Zellen im peripheren Blut



**Abbildung 4.40: Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der T-Zellen im peripheren Vollblut.** Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird hier die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) sowie jene von Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher Aktivität (DAS > 2,6) gezeigt.

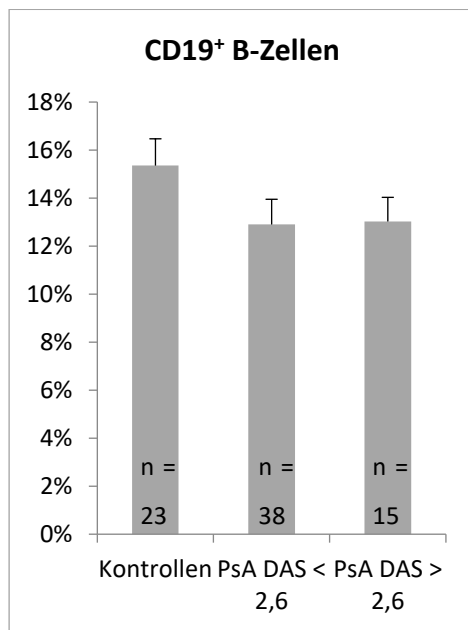


**Abbildung 4.41: Anzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der T-Zellen im peripheren Vollblut.** Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird hier die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) sowie jene von Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher Aktivität (DAS > 2,6) gezeigt.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von 4.3.1 erkennt man, dass kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen besteht. Die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der T-Zellen beträgt in allen Gruppen ca. 70 %, signifikante Unterschiede finden sich somit nicht.

Die Anzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der T-Zellen ist hingegen nur in der Gruppe der PsA-Patienten in klinischer Remission (DAS < 2,6) mit 25,5 +/- 1,9 % im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 30,6 +/- 1,6 % signifikant niedriger (p=0,04). Bei Betrachtung der Kontrollen und den PsA-Patienten mit moderater bis hoher Entzündungsaktivität lässt sich kein Unterschied feststellen.

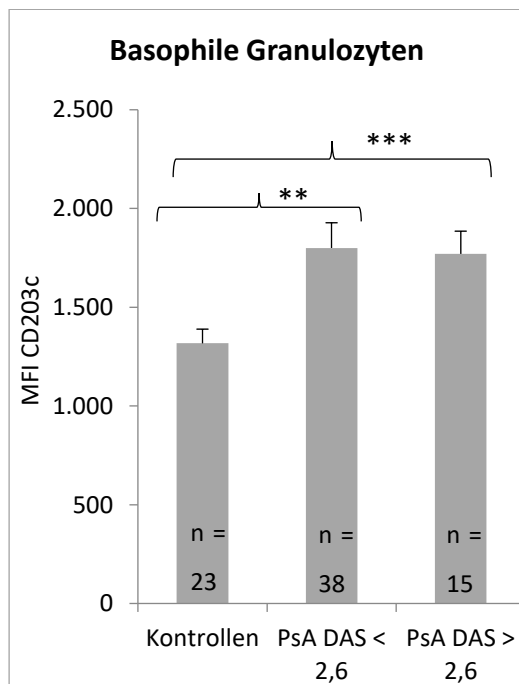
#### 4.6.2 Anzahl der B-Zellen im peripheren Blut



**Abbildung 4.42: Anzahl der CD19<sup>+</sup> B-Zellen an der Gesamtzahl der T-Zellen im peripheren Vollblut.** Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird hier die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) sowie jene von Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher Aktivität (DAS > 2,6) gezeigt.

Abbildung 4.42 zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl CD19<sup>+</sup> B-Zellen in den verschiedenen Gruppen. Man erkennt jedoch, dass der Anteil der B-Zellen von 15,4 +/- 1,1 % in der Kontrollgruppe auf 12,9 +/- 1,0 % in der PsA-Gruppe mit DAS-Werten < 2,6 (p=0,07) bzw. auf 13,0 +/- 1,0 % in der Gruppe der PsA-Patienten mit DAS-Werten > 2,6 fällt (p=0,09). Zwischen den beiden Patientengruppen bestehen keine Unterschiede.

#### 4.6.3 Expression von CD203c auf Basophilen Granulozyten im peripheren Blut

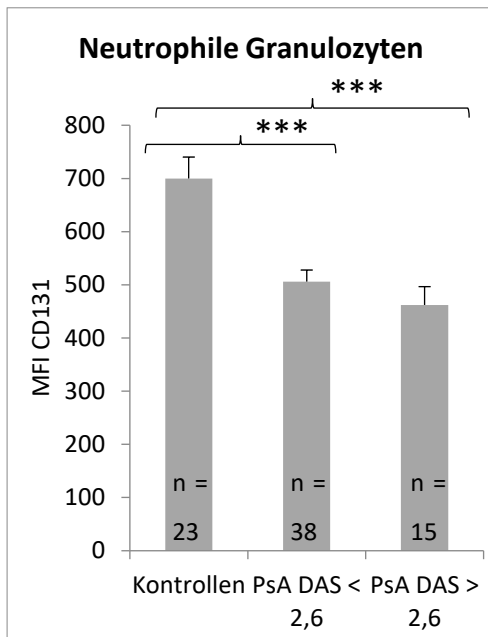


**Abbildung 4.43: Expression von CD203c auf Basophilen Granulozyten.** Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird hier die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) sowie jene von Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher Aktivität (DAS > 2,6) gezeigt.

CD203c ist ein Aktivitätsmarker auf Basophilen Granulozyten und findet daher bei der Auswertung Beachtung. Auf Abbildung 4.43 wird deutlich, dass die Expression von CD203 bei den an PsA erkrankten Personen hoch bzw.

höchst signifikant erhöht ist. Vergleicht man die Kontrollgruppe mit den PsA-Patienten in klinischer Remission (DAS < 2,6), so sieht man, dass der MFI von 1317 +/- 72 auf 1800 +/- 128 ansteigt (p=0,004). Ebenso zeigt sich in der Gegenüberstellung der Kontrollen mit den klinisch aktiven PsA-Patienten (DAS > 2,6) ein Anstieg des MFI von 1317 +/- 72 auf 1770 +/- 115 (p=0,0009).

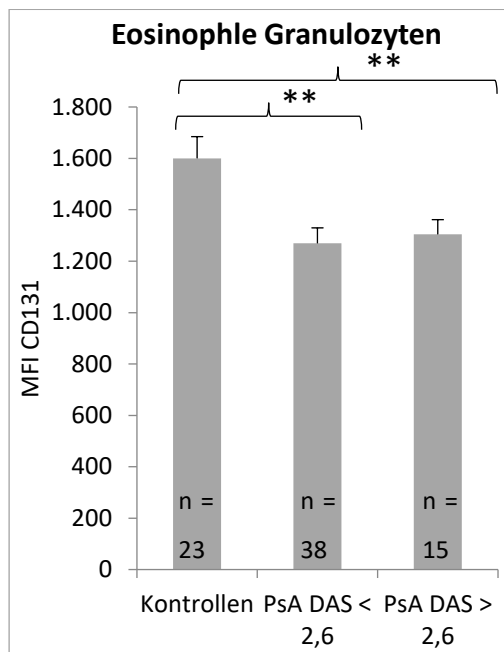
#### 4.6.4 Anzahl der IL-3R-βc-Kette exprimierenden Neutrophilen Granulozyten



**Abbildung 4.44: Anteil der IL-3R-βc-Kette exprimierenden Neutrophilen Granulozyten an der Gesamtzahl der T-Zellen im peripheren Vollblut.** Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird hier die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) sowie jene von Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher Aktivität (DAS > 2,6) gezeigt.

Ähnlich wie Abb. 4.38 zeigt auch Abbildung 4.44 eine Abnahme der Expression von CD131 auf Neutrophilen Granulozyten bei den PsA-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. So sinkt der MFI von 700 +/- 40 in der Kontrollgruppe auf 462 +/- 34 in der Gruppe der PsA-Patienten mit DAS-Werten > 2,6 (p=0,0001), was einer höchst signifikanten Abnahme der Neutrophilen-Menge entspricht. Ähnlich ist die Situation bei Vergleich der Kontrollgruppe mit den in klinischer Remission befindlichen Patienten (DAS < 2,6), wo der MFI von 700 +/- 40 bei den Kontrollen auf 506 +/- 22 abnimmt (p=0,00001).

#### 4.6.5 Expression der IL-3R- $\beta$ -Kette auf Eosinophilen Granulozyten



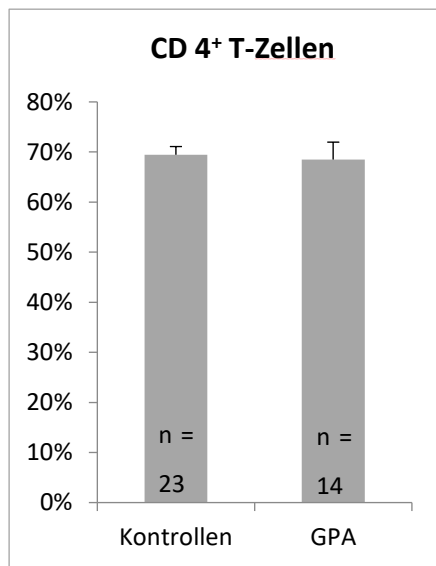
**Abbildung 4.45: Expression der IL-3R- $\beta$ -Kette auf Eosinophilen Granulozyten.** Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird hier die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) sowie jene von Patienten mit moderater bis hoher entzündlicher Aktivität (DAS > 2,6) gezeigt.

Bei Betrachtung der Abbildung 4.45 erkennt man, dass die Expression von CD131 auf Eosinophilen Granulozyten von den Kontrollen zu den beiden Patientengruppen hin stark abnimmt. Dieses Resultat ist kongruent mit Abbildung 4.39, welches ein ähnliches Ergebnis zeigt. Der MFI von CD131 auf Eosinophilen Granulozyten nimmt von 1600 +/- 85 bei den gesunden Probanden auf 1269 +/- 60 bei den PsA-Patienten mit DAS-Werten < 2,6 ( $p=0,001$ ) bzw. auf 1304 +/- 57 in der Gruppe der PsA-Patienten mit DAS-Werten > 2,6 ( $p=0,009$ ) ab. Es zeigen sich somit hoch signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und den beiden Patientengruppen.

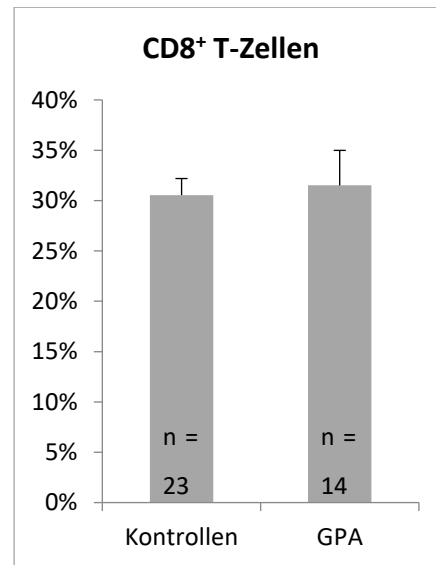
## 4.7 Analyse der PBMCs bei Patienten mit GPA

Bei der Analyse der peripheren Zellen der GPA-Patienten wurden ebenso die T- und B-Zellen betrachtet. Diese wurden nach Inkubation mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern der FACS-Analyse zugeführt, welche die Differenzierung der Zellen ermöglicht. Neben den oben genannten T- und B-Zellen fanden auch die Basophilen, Neutrophilen und Eosinophilen Granulozyten und deren spezielle Oberflächenmerkmale Beachtung in der Auswertung.

### 4.7.1 Anzahl der T-Zellen im peripheren Blut



**Abbildung 4.46: Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der T-Zellen im peripheren Vollblut.** Dargestellt sind die gesunden Probanden (Kontrollen) im Vergleich mit Patienten mit der klinisch und laborchemisch gesicherten Diagnose GPA.

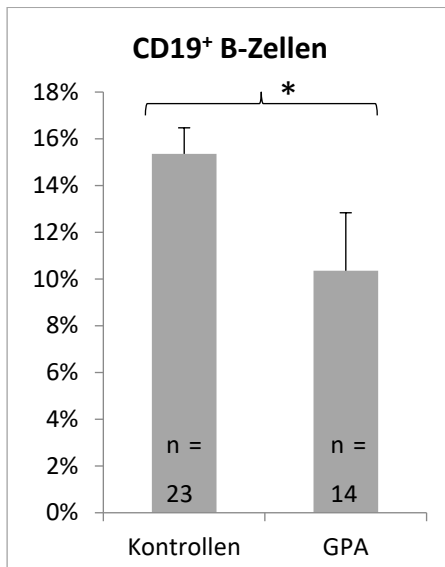


**Abbildung 4.47: Anzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der T-Zellen im peripheren Vollblut.** Dargestellt sind die gesunden Probanden (Kontrollen) im Vergleich mit Patienten mit der klinisch und laborchemisch gesicherten Diagnose GPA.

Abbildung 4.46 und 4.47 zeigen die Anzahl CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der T-Zellen im peripheren Blut. Man kann unschwer erkennen, dass keine merklichen Unterschiede zwischen den Kontrollen und der Patientengruppe vorliegen. So liegt die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei 69 ± 2 % in der Kontrollgruppe und bei den GPA-Patienten bei 68 ± 3 % (p=0,4). Ähnlich gestaltet sich die Verteilung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Hier liegt der Anteil der CD8<sup>+</sup> bei 31 ± 2 % bei den gesunden Probanden (Kontrollen) und bei 32 ± 3 % in der GPA-Gruppe (p=0,4).

Diese Ergebnisse stimmen gut überein mit jenen der intrazellulären Färbung, die in Abb. 4.24 und 4.25 dargestellt sind.

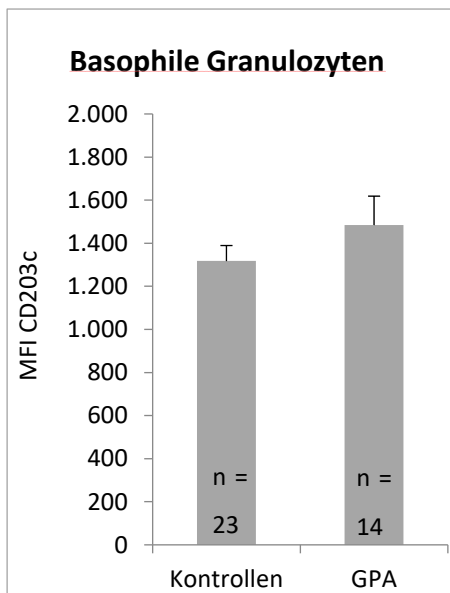
#### 4.7.2 Anzahl der B-Zellen im peripheren Blut



**Abbildung 4.48: Anzahl der CD19<sup>+</sup> B-Zellen an der Gesamtzahl der T-Zellen im peripheren Vollblut.** Dargestellt sind die gesunden Probanden (Kontrollen) im Vergleich mit Patienten mit der klinisch und laborchemisch gesicherten Diagnose GPA.

Bei Betrachtung von Abbildung 4.48 fällt auf, dass der Anteil CD19<sup>+</sup> B-Zellen bei den GPA-Patienten signifikant niedriger ist als bei den gesunden Kontrollen. Vergleicht man die beiden Gruppen, erkennt man einen Abfall von 15,4 +/- 1 % in der Kontrollgruppe auf 10,4 +/- 2 % in der Gruppe der an GPA erkrankten Personen (p=0,01).

#### 4.7.3 Expression von CD203c auf Basophilen Granulozyten im peripheren Blut

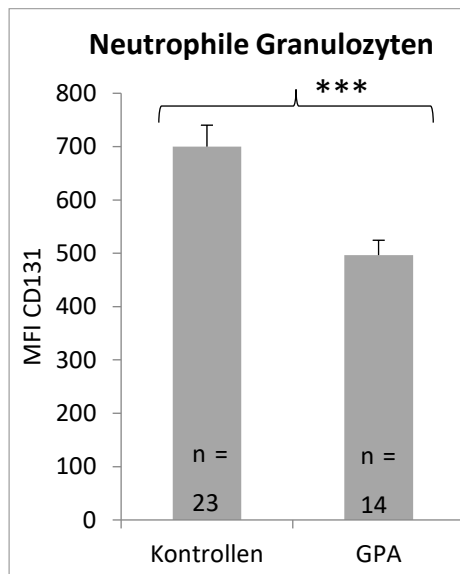


**Abbildung 4.49: Expression von CD203c auf Basophilen Granulozyten.** Dargestellt sind die gesunden Probanden (Kontrollen) im Vergleich mit Patienten mit der klinisch und laborchemisch gesicherten Diagnose GPA.

Die nebenstehende Abbildung zeigt, dass der Mean Fluorescence Index zwischen den gesunden Probanden und GPA-Patienten keine signifikanten Unterschiede aufweist. So liegt der MFI der Kontrollen bei 1317 +/- 72 während er bei den erkrankten Personen bei 1484 +/- 134 liegt (p=0,13).

#### 4.7.4 Expression der IL-3R- $\beta$ -Kette auf Neutrophilen Granulozyten im peripheren

##### Blut



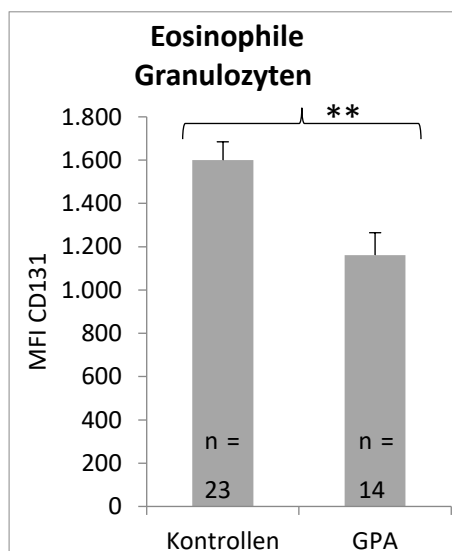
##### **Abbildung 4.50: Expression der IL-3R- $\beta$ -Kette auf Neutrophilen Granulozyten.**

Dargestellt sind die gesunden Probanden (Kontrollen) im Vergleich mit Patienten mit der klinisch und laborchemisch gesicherten Diagnose GPA.

Abbildung 4.50 zeigt, dass die Patientengruppe (GPA) im Vergleich mit den gesunden Probanden (Kontrollen) eine höchst signifikant niedrigere Expression CD131<sup>+</sup> Neutrophiler Granulozyten aufweist. So sieht man, dass der MFI der IL-3R- $\beta$ -Kette auf Neutrophilen in der Gruppe der an GPA erkrankten Patienten bei 497 +/- 28 liegt. Vergleicht man dies mit den Kontrollen, so erkennt man, dass der MFI mit 700 +/- 40 höchst signifikant höher ist als bei den erkrankten Personen (p=0,0006).

#### 4.7.5 Expression der IL-3R- $\beta$ -Kette auf Eosinophilen Granulozyten im peripheren

##### Blut



##### **Abbildung 4.51: Anzahl der IL-3R- $\beta$ -Kette auf Eosinophilen Granulozyten.**

Dargestellt sind die gesunden Probanden (Kontrollen) im Vergleich mit Patienten mit der klinisch und laborchemisch gesicherten Diagnose GPA.

Obige Abbildung zeigt den deutlichen sowie hoch signifikanten Unterschied zwischen der Patientengruppe (GPA) sowie den gesunden Kontrollen. Der MFI von CD131 auf Eosinophilen Granulozyten liegt in der Kontrollgruppe bei 1600 +/- 85 und sinkt bei den an GPA erkrankten Personen auf 1162 +/- 103 (p=0,002).

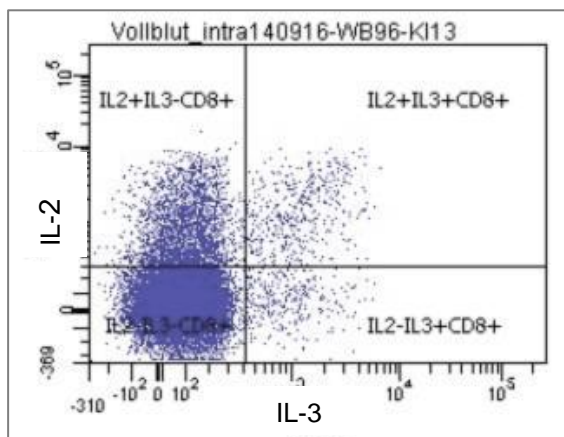
## 5 Diskussion

### 5.1 IL-3 und SLE

#### 5.1.1 Gesteigerte IL-3 Produktion bei zunehmender Krankheitsaktivität des SLE

Im Rahmen dieser Arbeit beobachtete man eine höchst signifikante Zunahme der in den Zellkulturüberständen gemessenen IL-3 Werte mit steigender Krankheitsaktivität des SLE. Aus dieser Beobachtung könnte man den Schluss ziehen, dass höhere IL-3 Konzentrationen zu einem gravierenderen Verlauf des SLE führen bzw. die Aktivität des SLE bei stärkerer Expression von IL-3 ansteigt. So sieht man einen Anstieg der IL-3 Titer von 80,2 +/- 11,3 pg/ml bei den Kontrollen auf 282,1 +/- 62,2 pg/ml bei den Lupus-Patienten mit klinischer Aktivität ( $p=0,0008$ ). Dies entspricht in etwa der dreieinhalbfachen IL-3 Konzentration im Vergleich zu gesunden Probanden.

In dieser Arbeit wurden die CD8<sup>+</sup> T-Zellen als Hauptproduzenten von IL-3 identifiziert.



**Abbildung 5.1:** Die nebenstehende Abbildung zeigt die intrazelluläre Färbung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Von besonderem Interesse sind die CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die beim SLE hauptverantwortlich für die IL-3 und IL-2 Produktion sind.

Bereits *Renner K et al.* konnten im Mausmodell der Lupusnephritis zeigen, welchen starken Einfluss IL-3 auf den Verlaufsschwere der Nephritis sowie anderer Lupus-typischer Organläsionen hat. So kam es unter der Applikation von IL-3 zu einem aggressiveren Krankheitsverlauf und einer vermehrten Progression der Erkrankung. Blockierte man das Zytokin, verbesserte sich hingegen das klinische Bild und die Lupusnephritis verlief weniger schwer. Neben den nephrologischen Symptomen wurden durch die IL-3-Blockade auch dermatologische Komplikationen abgemildert. (185)

Zudem konnten *Renner K et al.* im Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE) einen Zusammenhang zwischen der zerebralen IL-3 Expression und der Einwanderung von T-Zellen in das Gehirn nachweisen. Wurde zusätzlich rekombinantes IL-3 injiziert, konnte sogar eine Exazerbation der EAE Symptome und der zerebralen Inflammationsreaktion hervorgerufen werden. Darüber hinaus fand man bei Patienten mit akutem Schub einer Multiplen Sklerose eine durch T-Zellen bedingte Hochregulation der IL-3 Expression (199).



Die Arbeitsgruppe um *Weber GF et al.* fand einen Zusammenhang zwischen der IL-3 Konzentration in humanen Plasmaproben von Sepsis-Patienten und deren Prognose, wobei in dieser Studie hohe IL-3 Werte mit einer erhöhten Mortalität vergesellschaftet waren und somit mit einer schlechteren Prognose einhergingen. Die Wissenschaftler beschrieben das IL-3 hier sogar als potentiellen Angriffspunkt in der Therapie der Sepsis. Im Mausmodell zeigte sich überdies, dass eine IL-3 Defizienz die Mäuse vor Sepsis schützt. Die genannten Studienergebnisse untermauern die Vermutung eines Zusammenhangs zwischen IL-3 und inflammatorischen Prozessen. (184)

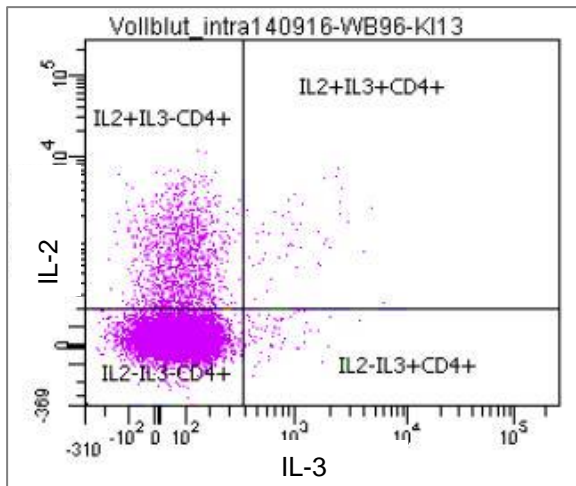
In Einklang mit den Daten der soeben angesprochenen Arbeitsgruppen kann man aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit darauf schließen, dass IL-3 eine wichtige Rolle bei Autoimmunprozessen zu spielen scheint.

### 5.1.2 IL-3 Produktion durch T-Zellen

Einigen Studien zufolge sollen die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten die wichtigste Rolle bei der IL-3 Produktion spielen und werden demzufolge als die Hauptproduzenten dieses Zytokins gesehen. Neben den T-Helferzellen scheinen auch noch in geringerem Maße die zytotoxischen T-Zellen (199), Basophilen Granulozyten (186), Mastzellen (206) und B-Zellen (184, 199) bei der IL-3 Produktion beteiligt zu sein.

Angesichts dieser Tatsache überrascht es, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit die CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten als IL-3 Hauptproduzenten identifiziert wurden und darüber hinaus zu erkennen war, dass die IL-3 Konzentrationen mit der klinischen Aktivität der Lupus-Patienten korreliert. Bisher beschrieben auch *Stoeckle C. et al.* eine nicht zu vernachlässigende IL-3 Produktion durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen, allerdings beziehen sich diese Ergebnisse auf die Untersuchung des Plasmas von Patienten mit nicht-IgE-vermittelter Eosinophilie. (207)

Im Folgenden gilt es die Frage zu klären, ob die SLE Patienten mehr CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten besitzen, sodass hierdurch die vermehrte IL-3 Konzentration resultiert, oder ob die im peripheren Blut vorhanden CD8<sup>+</sup> T-Zellen mehr IL-3 produzieren. Betrachtet man die Resultate des Ergebnisteils, so erkennt man, dass die SLE-Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden zwar insgesamt mehr CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten aufweisen, aber zwischen den Gruppen der klinisch aktiven bzw. nicht aktiven Patienten keine wesentlichen Unterschiede in der Anzahl vorliegen. Weiterhin kann man ablesen, dass die IL-3 Produktion bei den klinisch aktiven Lupus-Patienten signifikant höher ist. Dies korreliert wiederum mit der im Überstand gemessenen IL-3 Konzentration der aktiven Patienten.



**Abbildung 5.2:** Die Abbildung 5.2 zeigt die intrazelluläre Färbung für CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Es handelt sich um die gleiche Probe wie bei Abbildung 5.1. Man sieht eine deutlich geringere Fluoreszenz der IL-2<sup>+</sup> IL-3<sup>+</sup> sowie IL-2<sup>-</sup> IL-3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Hier wurde ebenfalls IL-3 PE-A (x-Achse) gegen IL-2 PE-Cy7-A (y-Achse) aufgetragen.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Annahme, dass es sich bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen um die Hauptproduzenten des IL-3 handelt, nicht bestätigt werden. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und der IL-3 Produktion war bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht feststellbar. Eher scheint es, als käme es zu einer leichten Herabregulierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei erkrankten Personen.

### 5.1.3 Weitere Zytokine bei SLE

In dieser Arbeit wurde neben IL-3 als potentiell proinflammatorischem Zytokin die Konzentrationen von zwei weiteren Entzündungsmediatoren untersucht, nämlich IL-2 und IL-17. Auch hier konnte gezeigt werden, dass insbesondere die CD8<sup>+</sup> T-Zellen als Quelle dieser Zytokine infrage kommen.

Bei Betrachtung der IL-2 Dynamik fällt auf, dass die Menge des Zytokins mit der Krankheitsschwere korreliert. Liegt der prozentuale Anteil der IL2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei den gesunden Probanden noch bei 5,4 +/- 0,5 %, so steigt er bei Lupus-Patienten ohne klinische Aktivität auf 7,3 +/- 0,5 % an (p=0,009). Patienten mit klinischer Aktivität ihrer Erkrankung weisen einen Anteil von 13,4 +/- 2,2 % auf. Dies bedeutet einen höchst signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen sowie den klinisch nicht aktiven Patienten.

Auch der Anteil IL-17<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen weist einen Anstieg bei den klinisch aktiven Patienten auf, hier allerdings ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu gesunden Probanden. Zwischen den beiden Patientengruppen jedoch erkennt man eine signifikante Zunahme des prozentualen Anteils IL-17<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 0,23 +/- 0,03 % bei klinisch nicht-aktiven auf 0,37 +/- 0,04 % bei Patienten mit erhöhter entzündlicher Aktivität (p=0,01).

Die vorliegenden Ergebnisse korrelieren mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen. In der Literatur werden unterschiedliche Quellen für IL-17 angegeben, unter anderem T-Helferzellen aber auch zytotoxischen T-Zellen – also CD8<sup>+</sup> T-Zellen – sowie doppelt-negative T-Zellen und Neutrophile Granulozyten (27). Zudem konnten in einigen Studien erhöhte IL-17

Konzentrationen im Serum als auch in Gewebeläsionen von Lupus-Patienten nachgewiesen werden (27, 208, 209). Weitere Studien befassen sich mit IL-17 und stellen dieses Zytokin als zukünftigen wichtigen Angriffspunkt in der gezielten Therapie dar (209, 210).

IL-2 wiederum hat neben seiner proliferierenden und aktivierenden Funktion auf B- und T-Zellen, und damit Stimulation einer Immunantwort, einen großen Einfluss auf die regulatorischen T-Zellen (Treg), welche maßgeblich zur Erhaltung der Selbsttoleranz benötigt werden (211, 212). Bei den Tregs handelt es sich um eine Subgruppe der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (213). In der Pathogenese des SLE scheint auch eine IL-2-Defizienz eine Rolle zu spielen, welche zu einer verminderten Funktion der Treg's führt und somit eine geringere Kontrolle autoreaktiver Lymphozyten bedingt. So gibt es Daten, dass verminderte IL-2 Spiegel bei Lupus-Patienten vorliegen und mittels einer niedrig dosierten IL-2 Therapie eine Expansion der Treg's erzielt werden kann, um somit die Autoimmunität zu bekämpfen. (213, 214) Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit, da hier zumindest ein Anstieg der IL-2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu erkennen war. Eine Untersuchung der Tregs wurde allerdings nicht durchgeführt. Bei Betrachtung der IL-2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkennt man jedoch, dass der Anteil bei den an Lupus erkrankten Personen niedriger ist im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe. Würde man nun eine Subgruppenanalyse durchführen, könnte man vielleicht eine Erniedrigung der Tregs sehen. Möglicherweise spiegelt die erniedrigte Anzahl CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wie in Abb. 4.34 anschaulich zu sehen, teilweise die verminderte Treg-Fraktion wider.

*Salazar-Camarena et al.* konnten zeigen, dass Patienten mit erhöhten Serumlevel an B-Zell aktivierendem Faktor, welcher ja der Angriffspunkt des ersten für den Lupus zugelassenen Biologikums Belimumab ist, auch erhöhte IL-2-Level im Serum aufweisen (215, 216). Diese Ergebnisse decken sich wiederum mit den Werten der vorliegenden Arbeit.

#### 5.1.4 Veränderung des Anteils weiterer PBMCs mit steigender Krankheitsaktivität des SLE

Auch die B-Lymphozyten sind von großem Interesse in der Pathogenese und Therapie beim SLE und sollen deshalb weitere Beachtung finden. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der Anteil CD19<sup>+</sup> B-Zellen von 15,0 +/- 1,0 % bei den gesunden Probanden auf 9,0 +/- 1,0 % bei den klinisch aktiven SLE-Patienten fällt. Dies entspricht einer höchst signifikanten Abnahme der B-Zellen bei den erkrankten Personen. Bei der Interpretation dieser Befunde gilt es die Medikation der Patienten zum Zeitpunkt der Studienteilnahme zu beachten. 38,5 % der klinisch aktiven SLE-Patienten und immerhin 8,3 % der klinisch nicht Aktiven erhielt eine Therapie mit Belimumab, einem monoklonalen Antikörper gegen das B-Lymphozyten stimulierende Protein (217). Weiters ursächlich für die verminderte Anzahl an B-Lymphozyten ist die Einnahme von Azathioprin, einem Purinanalogon, welches ebenfalls die Vermehrung der B-Zellen verhindert

(135). Hiervon betroffen waren 26,9 % der aktiven Patienten und 29,2 % der klinisch nicht Aktiven. Zuletzt erhielten immerhin 23,1 % der klinisch aktiven Lupus-Patienten und 10,4 % der nicht aktiven Patienten eine Therapie mit MMF, einem reversiblen Inosinmonophosphat-Dehydrogenase-Hemmer, der die Proliferation der B-Zellen ebenfalls einschränkt.

Die Basophilen Granulozyten sind einerseits Quelle von IL-3, andererseits bedingt IL-3 auch die Differenzierung der Basophilen im Knochenmark und stellt einen wichtigen Aktivierungs- und Überlebensfaktor dar (185–187). Es wäre somit möglich, dass die Basophilen Granulozyten zu einem gewissen Teil zur IL-3 Produktion im Rahmen der Krankheitsaktivität des SLE beitragen. Eine vermehrte Aktivierung der Basophilen Granulozyten konnte nicht gezeigt werden. Abbildung 4.37 verdeutlicht, dass zwischen gesunden Probanden und Lupus-Patienten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der CD203c Expression bestehen. Im Hinblick auf die Neutrophilen fungiert IL-3 als Freisetzungsfaktor aus dem Knochenmark (199). In der Literatur sind vermehrt Aggregationen von Neutrophilen im Serum von SLE-Patienten beschrieben, aber auch eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu gesunden Kontrollen (219).

Interessanterweise zeigte sich sowohl bei den Neutrophilen als auch Eosinophilen Granulozyten eine Herabregulation der IL-3R- $\beta$ c-Kette mit steigender Krankheitsaktivität bzw. mit steigenden IL-3 Konzentrationen. Möglicherweise beruht dies auf einem negativen Rückkopplungsmechanismus. Dies lässt darauf schließen, dass mit steigender IL-3 Konzentration die Expression der  $\beta$ c-Kette des IL-3 Rezeptors auf der Zelloberfläche der Granulozyten abnimmt, um so die proinflammatorische Wirkung von IL-3 durch eine verminderte Signaltransduktion abzumildern. Somit würde es sich am ehesten um einen indirekt proportionalen Zusammenhang zwischen den IL-3 Spiegel und der Expression der IL-3R- $\beta$ c-Kette handeln.

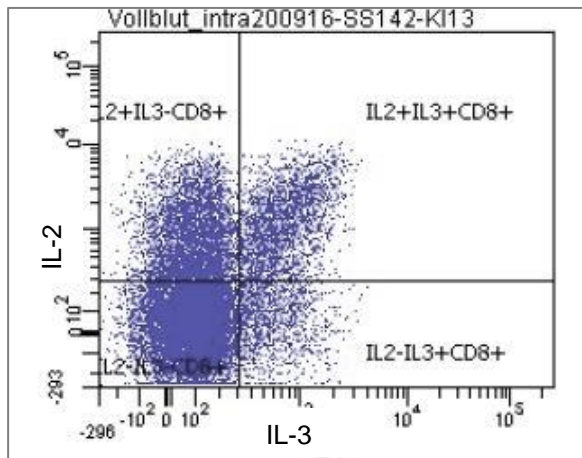
## 5.2 IL-3 und PsA

### 5.2.1 Gesteigerte IL-3 Produktion mit zunehmender Krankheitsaktivität der PsA

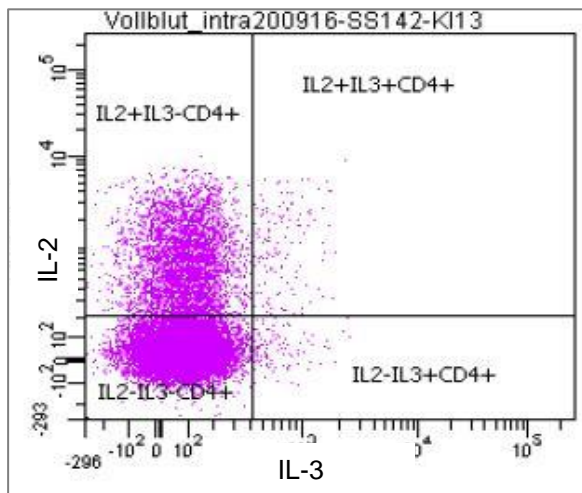
Die Konzentrationsbestimmung von IL-3 bei an PsA erkrankten Patienten zeigt eindrücklich, dass mit zunehmender Krankheitsschwere – gemessen anhand des DAS28 CRP Wertes – die IL-3 Werte zunehmen. Patienten in Remission und einem DAS < 2,6 weisen im Vergleich mit den gesunden Kontrollen keinen signifikanten Unterschied auf. Hingegen dazu steigt die IL-3 Konzentration bei Patienten mit klinischer Aktivität auf 279,4 +/- 110,5 mg/ml an, was in etwa dem dreieinhalbfachen der Konzentration bei gesunden Probanden entspricht (p=0,006). Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass IL-3 bei autoimmun bedingten Erkrankungen wie der PsA eine proinflammatorische Rolle zu spielen scheint.

### 5.2.2 IL-3 Produktion durch T-Zellen

Auch in der intrazellulären Färbung konnten in der vorliegenden Arbeit die CD8<sup>+</sup> T-Zellen als die hauptverantwortlichen IL-3 Produzenten ausgemacht werden.



**Abbildung 5.3:** Die nebenstehende Abbildung zeigt die intrazelluläre Färbung CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Im Vergleich zur Abbildung 5.4 sieht man eine deutlich stärkere Fluoreszenz der IL-2<sup>+</sup> IL-3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> sowie rein IL-3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen.



**Abbildung 5.4:** Die Abbildung zeigt die intrazelluläre Färbung für CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Man erkennt, dass die Fluoreszenz der IL-2<sup>+</sup> IL-3<sup>+</sup> und rein IL-3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen weit weniger ausgeprägt ist wie die der CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Die beiden obenstehenden Abbildungen veranschaulichen die Rolle von CD8<sup>+</sup> T-Zellen als IL-3 Quelle. In der Literatur finden sich Angaben zu vielen weiteren IL-3 produzierenden Zellen wie Monozyten, B-Zellen, dendritischen Zellen, Mastzellen oder, wie bereits unter Punkt 5.1.4 beschrieben, die Basophilen Granulozyten (199).

Costello *et al.* untersuchten die Gelenkflüssigkeit von Patienten mit aktiver PsA und fanden dabei eine klonale Vermehrung CD8<sup>+</sup> sowie CD4<sup>+</sup> T-Zellen (93, 220). In einer älteren Studie derselben Arbeitsgruppe verglichen die Forscher die in der Synovialflüssigkeit vorkommenden T-Zell Populationen von PsA und RA Patienten. Das Ergebnis zeigte eine signifikant erhöhte Population an CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Synovialflüssigkeit bei den an PsA erkrankten Personen. (93)

Die eben beschriebenen Studien unterstützen die Annahme, dass die CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine nicht zu vernachlässigende Rolle in der Pathogenese der PsA spielen und eine wichtige Position in der Produktion von IL-3 einnehmen.

### 5.2.3 Weitere Zytokine bei PsA

Neben IL-3 wurden in der intrazellulären Färbung noch zwei weitere Zytokine untersucht: IL-2 und IL-17. Dem zuletzt genannten Zytokin wird bereits seit einiger Zeit große Aufmerksamkeit geschenkt. Durch IL-17-Antagonisten wie Secukinumab oder Ixekizumab konnten in der Therapie der Psoriasis aber auch der PsA große Erfolge erzielt werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass für die Unterschiede in der IL-2 und IL-17 Produktion vor allem die CD8<sup>+</sup> T-Zellen verantwortlich sind. Zwar fand sich ein signifikanter Unterschied IL-2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen beim Vergleich der Patienten mit DAS-Werten < 2,6 und den gesunden Kontrollen, diese Signifikanz konnte aber bei den Patienten mit höheren DAS-Werten nicht nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu fand man bei den IL-2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen höchst signifikante Unterschiede zwischen der gesunden Vergleichsgruppe und den an PsA erkrankten Personen. So stieg beispielsweise der Anteil IL-2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 5,4 +/- 0,5 % bei den gesunden Probanden auf 13,3 +/- 2,2 % in der Gruppe der Patienten mit moderater bis hoher Krankheitsaktivität (DAS > 2,6).

Ähnliche Ergebnisse zeigt die Auswertung der IL-17 produzierenden Zellen. Betrachtet man die Abb. 4.23, erkennt man einen deutlichen Anstieg der IL-17<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Der Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, der für die Produktion von IL-17 verantwortlich zeichnet, liegt bei 0,5 +/- 0,2 % während dieser bei der gesunden Kontrollgruppe 0,28 +/- 0,02 % beträgt (p=0,03). Bei den IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden keine signifikanten Unterschiede bei Patienten mit DAS-Werten > 2,6 erreicht. Lediglich die Gruppe der PsA-Patienten in Remission zeigte einen signifikanten Anstieg der IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Rolle von IL-17 in der Pathogenese der Psoriasis und PsA ist seit einigen Jahren anerkannt und wird mittlerweile erfolgreich als Angriffspunkt in der gezielten Therapie genutzt (81, 128, 221–223). Die Frage, welche Zellen nun hauptsächlich für die IL-17 Produktion verantwortlich sind, wird auch in der Literatur kontrovers diskutiert. So beschrieben *Costello et al.* eine Dominanz CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Synovialflüssigkeit bei Patienten mit PsA und auch *Lubberts et al.* bezeichneten die zytotoxischen T-Zellen als wichtige IL-17 Quelle (93, 221). In anderen Veröffentlichungen werden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen als Produzenten von IL-17 dargestellt (97, 224). Meist werden allerdings die Th17-Zellen genannt, eine Untergruppe der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche vorrangig IL-17 produzieren und somit zu einer Inflammationsreaktion führen (81, 221).

Daten zur IL-2 Funktion in der Pathogenese der PsA sind im Vergleich zu jenen von IL-17 eher dürftig. Eine Studie von *Bos et al.* befasste sich mit der Frage, in welcher Art und Weise sich

Patienten mit PsA und rein kutaner Psoriasis unterscheiden. Hierzu untersuchten die Forscher das Zytokinprofil zirkulierender T-Zellen von an PsA und Psoriasis erkrankten Personen und einer Vergleichsgruppe. Einer der wichtigsten Unterschiede zur Differenzierung zwischen Psoriasis mit Gelenkmanifestation und rein kutaner Form war die IL-2 Sekretion durch anti-CD3-stimulierte PBMCs. (225) Diese Daten unterstützen das Ergebnis der vorliegenden Arbeit.

#### 5.2.4 Veränderung des Anteils weiterer PBMCs mit steigender Krankheitsaktivität der PsA

Neben den T-Zellen wurden mittels der extrazellulären Färbung noch weitere periphere mononukleäre Zellen untersucht. Der Anteil CD19<sup>+</sup> B-Zellen im peripheren Blut war im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe erniedrigt, allerdings ohne signifikanten Unterschied. Hierbei ist anzumerken, dass 66,7 % der Patienten mit moderater bis höherer Krankheitsaktivität und 60,5 % der Patienten in Remission zum Zeitpunkt der Studienteilnahme eine Therapie mit MTX erhielten. Da MTX als Folsäure-Antagonist in die Zellproliferation eingreift und diese hemmt, könnte diese milde Verminderung des B-Zell-Anteils bei einem Teil der Patienten womöglich auf die Medikamenteneinnahme zurückzuführen sein.

Bei Betrachtung der Basophilen Granulozyten fällt auf, dass der Anteil bei Patienten mit Erkrankung und vermehrter Krankheitsaktivität erhöht ist. Interessanterweise zeigte sich eine Erhöhung des Aktivitätsmarkers CD203c auf der Oberfläche Basophiler Granulozyten unter steigenden IL-3 Spiegel (226, 227). Bisher ist eine Involvierung Basophiler in der Pathogenese der Psoriasis oder PsA nicht bekannt. Auch die Studienergebnisse von *Mashiko et al.* sprechen den Basophilen Granulozyten und weiteren Zellen eine Rolle in der atopischen Dermatitis zu, scheinen aber bei der Psoriasis laut dieser Studie nicht beteiligt zu sein (228). Demgegenüber stehen die Ergebnisse dieser Arbeit, in denen eine signifikant vermehrte Expression des Aktivitätsmarkers CD203c auf Basophilen Granulozyten zu sehen war. Zudem konnte in dieser Arbeit eine erhöhte IL-3 Konzentration mit vermehrter Krankheitsaktivität nachgewiesen werden.

Wie auch schon bei den Lupus-Patienten zu sehen war, kam es unter steigenden IL-3 Konzentrationen zu einer Herabregulation der IL-3R- $\beta$ c-Kette auf Neutrophilen und Eosinophilen Granulozyten. Analog zum Erklärungsansatz beim SLE würde man am ehesten von einer reaktiven Verminderung der Expression der  $\beta$ c-Kette bei erhöhten IL-3 Spiegeln, welche bei PsA-Patienten nachweislich vorliegen, ausgehen, um somit die potentiell entzündliche Wirkung des IL-3 zu mindern.

## 5.3 IL-3 und GPA

### 5.3.1 Gesteigerte IL-3 Produktion bei Patienten mit GPA

Auch bei Patienten mit der Diagnose GPA sieht man in dieser Arbeit eine signifikante Zunahme der IL-3 Expression im Vergleich zu gesunden Kontrollen. So steigt die Konzentration von 80,2 +/- 11,3 pg/ml bei den Kontrollen auf 149,0 +/- 35,8 pg/ml bei den Patienten an. Die intrazelluläre Färbung zeigt einen hoch signifikanten Anstieg des prozentualen Anteils IL-3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 0,5 +/- 0,1 % auf 1,3 +/- 0,2 % bei GPA-Patienten (p=0,001).

Auch hier scheint die Annahme bestätigt, dass bei chronisch entzündlichen Erkrankungen, zu der die GPA zählt, die IL-3 Spiegel erhöht sind. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer experimenteller Studien, die entzündliche Autoimmunerkrankungen wie die MS, die Lupusnephritis oder RA untersucht haben und die ebenfalls erhöhte IL-3 Konzentrationen bei diesen Krankheitsbildern nachweisen konnten. (181, 199)

### 5.3.2 IL-3 Produktion durch T-Zellen

Wie auf den Abbildungen 4.26 und 4.28 anschaulich zu sehen, erfolgt die IL-3 Produktion in geringerem Maße durch CD4<sup>+</sup> sowie hauptsächlich durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Der Unterschied IL-3 produzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist nur minimal zwischen den Kontrollen und den GPA-Patienten. Im Vergleich dazu steigt der Anteil der IL-3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 0,5 +/- 0,1 % in der Vergleichsgruppe auf 1,3 +/- 0,2 % bei den erkrankten Personen an, was in etwa der Verdopplung des T-Zell-Anteils entspricht.

Ein vermehrter Anteil aktivierter CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte bei Patienten mit aktiver GPA, aber auch bei in Remission befindlichen Personen, nachgewiesen werden (154). Darüber hinaus ist ein Vorhandensein von T-Zellen in granulomatösen Entzündungsherden gezeigt worden, welches auf eine T-Zell-Hyperaktivität schließen lässt (139). Diese Daten sowie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen die Annahme, dass den T-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese und Aufrechterhaltung der Krankheitsaktivität zukommt.

### 5.3.3 Weitere Zytokinproduktion bei GPA

Wie schon bei den Lupus- und PsA-Patienten beschrieben, erfolgte neben der IL-3 Detektion mittels intrazellulärer Färbung und nachfolgender FACS-Analyse die Untersuchung von IL-2 und IL-17. Während die IL-2 Produktion zum Großteil auf die CD8<sup>+</sup> T-Zellen zurück zu führen ist, zeigte sich für IL-17 eine Dominanz der CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Sowohl die CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen als auch die zytotoxischen Zellen produzieren mehr IL-2 als die gesunde Vergleichsgruppe. So zeigte sich ein signifikanter Anstieg der IL-2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 26,4 +/- 1,3 % auf 32,7 +/- 2,7 % bei den erkrankten Personen (p=0,01). Noch



eindrücklicher ist der Unterschied bei den IL-2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wo ein Anstieg von 5,4 +/- 0,5 % bei den Kontrollen auf 10,4 +/- 1,7 % bei den GPA-Patienten zu sehen war (p=0,0004).

Wie oben bereits beschrieben, konnten in dieser Arbeit die CD4<sup>+</sup> T-Zellen als die Hauptproduzenten von IL-17 identifiziert werden. Abbildung 4.32 zeigt eindrücklich den signifikanten Anstieg der IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 1,2 +/- 0,2 % in der Vergleichsgruppe auf 1,7 +/- 0,3 % bei den erkrankten Personen (p=0,04). Im Vergleich dazu zeigt sich kein Unterschied zwischen Kontrollen und GPA-Patienten bei den IL-17<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen, sodass man davon ausgehen kann, dass die CD4<sup>+</sup> T-Zellen als Hauptquelle von IL-17 dienen. Dies steht im Einklang zu der bereits in der Einleitung beschriebenen Rolle der T-Helferzellen in der Pathogenese der GPA. Allerdings konnte kein erhöhter Anteil CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen werden, was im Gegensatz zu anderen Studienergebnissen steht. Da aber alle der in dieser Studie eingeschlossenen Patienten medikamentös vorbehandelt waren (s. Basischarakteristika der GPA, Tab. 18), ist es möglicherweise durch die immunsuppressive bzw. immunmodulierende Therapie zu einem Rückgang der T-Helferzellen gekommen. (16, 139)

#### 5.3.4 Veränderung des Anteils weiterer PBMCs bei GPA

Bei den CD19<sup>+</sup> B-Zellen zeigte sich eine signifikante Verminderung des Anteils bei erkrankten Personen von 15,4 +/- 1,0 % in der Kontrollgruppe versus 10,4 +/- 2,0 % bei GPA-Patienten (p=0,01). Dies ist auf den ersten Blick überraschend, da den B-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese zugeschrieben wird und man sich daher eher eine Erhöhung ihres Anteils bei erkrankten Personen erwarten würde. Wichtig bei Interpretation dieser Ergebnisse ist die Betrachtung der Medikamenteneinnahme der Patienten. So erhielten 42,9 % der GPA-Patienten zum Zeitpunkt ihrer Studienteilnahme eine Therapie mit Rituximab, einem B-Zell-depletierenden CD-20-Antikörper (176). 14,3 % der Patienten wurde mit Cyclophosphamid therapiert, einem alkylierenden Agens, welches auch als Zytostatikum bei malignen Erkrankungen eingesetzt wird, um eine Reduktion der Zellzahlen zu erzielen.

## **6 Zusammenfassung**

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der IL-3 Expression von Patienten mit SLE, PsA und GPA im Vergleich mit gesunden Probanden, sowie die Beantwortung der Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der IL-3 Expression und der Krankheitsaktivität der Patienten gibt. Zusätzlich zum Nachweis der IL-3 Konzentration erfolgte die Untersuchung der IL-3-Rezeptor-Expression auf verschiedenen Zellen.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden von 74 Patienten mit SLE, 53 Patienten mit PsA, 14 Patienten mit GPA sowie 34 gesunden Probanden Blutproben gewonnen. Diese wurden direkt mittels FACS-Analyse untersucht. Zudem wurden PBMCs gewonnen und mittels ELISA und intrazellulärer FACS-Analyse auf Expression von IL-3 untersucht. Zur Klärung der Frage, ob die erkrankten Personen im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr IL-3 produzieren und/oder mehr IL-3 sezernierende T-Zellen besitzen, erfolgte nach Stimulation mit PMA/Ionomycin/Brefeldin die intrazelluläre Färbung für IL-3 sowie die durchflusszytometrische Beurteilung. Bei Patienten mit aktivem SLE, aktiver PsA und GPA konnte im Vergleich mit gesunden Probanden ein signifikant erhöhter Prozentsatz an IL-3 exprimierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen gefunden werden. Für CD4<sup>+</sup> T-Zellen ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede in der IL-3 Expression zwischen Patienten und Kontrollen.

Mittels ELISA erfolgte die Bestimmung der IL-3 Konzentration im Zellkultur-Überstand von anti-CD3-aktivierten PBMCs von erkrankten Personen und gesunden Probanden. Hierbei zeigte sich bei Patienten mit aktivem SLE, aktiver PsA und GPA im Vergleich mit gesunden Probanden eine signifikant erhöhte IL-3 Freisetzung im Zellkultur-Überstand. Somit bestand eine gute Korrelation zwischen den IL-3 Konzentrationen im ELISA und den mittels intrazellulärer FACS-Analyse gemessenen IL-3 exprimierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Zum Nachweis des IL-3-Einflusses auf seinen Rezeptor erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung der Expression der  $\beta$ -Untereinheit (CD131), welche für die Signaltransduktion verantwortlich zeichnet. Hierbei zeigte sich eine Herabregulation von CD131 auf Eosinophilen und Neutrophilen Granulozyten bei SLE, PsA sowie GPA in Korrelation mit steigender IL-3 Expression bzw. erhöhter Krankheitsaktivität.

Neben der IL-3 Expression erfolgte die Untersuchung von IL-2 und IL-17. Sowohl bei SLE und PsA-Patienten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen bei den IL-2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen bzw. sogar verminderte Werte bei den erkrankten Personen. Ausnahme bildeten hier die CD4<sup>+</sup> T-Zellen der GPA-Patienten, welche ebenfalls einen signifikant erhöhten Anteil IL-2 positiver Zellen aufwiesen. Im Vergleich dazu zeigten die CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei den Patienten aller drei Erkrankungsgruppen einen kontinuierlichen Anstieg der IL-2 Expression mit steigender Krankheitsaktivität.

Für IL-17 zeigte sich nur bei PsA, nicht aber bei GPA oder SLE, eine erhöhte Frequenz von IL-17-exprimierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Zudem sah man bei PsA-Patienten eine positive Korrelation der IL-17 Expression mit steigender Krankheitsaktivität. In Bezug auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich nur bei Patienten mit GPA eine signifikante Zunahme des Anteils IL-17 produzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Neben den T-Zellen wurden in dieser Arbeit mittels extrazellulärer FACS-Färbung auch die B-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich bei allen drei Erkrankungen ein kontinuierlicher Abfall der B-Zellen mit steigender Krankheitsaktivität, wobei nicht überall eine Signifikanz erreicht wurde. Besonders deutlich zu sehen war der Unterschied beim SLE. Bei den Patienten mit klinischer Aktivität erhielten 38,5 % eine Therapie mit Belimumab, einem B-Zell-modulierenden monoklonalen Antikörper, weitere 26,9 % bekamen Azathioprin und 23,1 % wurden mit MMF behandelt. Die klinisch nicht-aktiven SLE-Patienten erhielten im Durchschnitt weniger Therapie und wiesen in der durchflusszytometrischen Untersuchung einen höheren B-Zell-Anteil auf als die klinisch aktiven SLE-Patienten.

Während die Verminderung der B-Zellen bei den PsA-Patienten weit weniger ausgeprägt war als bei den Lupus-Patienten, sieht man bei der GPA einen signifikanten Abfall der CD19<sup>+</sup> B-Zellen. Dieser ist am wahrscheinlichsten auf die medikamentöse Therapie zurück zu führen. So erhielten 42,9 % der GPA-Patienten Rituximab, einen monoklonalen CD20-Antikörper, welcher auch CD19<sup>+</sup> B-Zellen mit erfasst und so zu einer Verminderung der B-Zellzahl führt. Weitere 14,3 % wurden mit Cyclophosphamid behandelt, welches als zytostatisch wirkendes Medikament eine Hemmung der Proliferation von Zellen bewirkt.

In dieser Arbeit konnte somit die Relevanz von IL-3 im Hinblick auf drei verschiedene Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises nachgewiesen werden. Die Hemmung dieses Zytokins könnte somit einen neuen potentiellen Angriffspunkt in der Therapie dieser Erkrankungen darstellen.

## **7 Literaturverzeichnis**

1. Shoenfeld Y, Cervera R, Gershwin ME. Diagnostic Criteria in Autoimmune Diseases. Totowa, NJ: Humana Press; 2008.
2. Bertsias G, Ioannidis JPA, Boletis J, Bombardieri S, Cervera R, Dostal C et al. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics. *Ann Rheum Dis* 2008; 67(2):195–205.
3. D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GRV. Systemic lupus erythematosus. *The Lancet* 2007; 369(9561):587–96.
4. Pons-Estel GJ, Alarcon GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 2010; 39(4):257–68.
5. Chakravarty EF, Bush TM, Manzi S, Clarke AE, Ward MM. Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: estimates obtained using hospitalization data. *Arthritis Rheum* 2007; 56(6):2092–4.
6. Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: A comparison of worldwide disease burden. *lupus* 2006; 15(5):308–18.
7. Uramoto KM, Michet CJ, JR, Thumboo J, Sunku J, O'Fallon WM, Gabriel SE. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis Rheum* 1999; 42(1):46–50.
8. Lam GKW, Petri M. Assessment of systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23(5 Suppl 39):S120-32.
9. Cameron JS. Lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(2):413–24.
10. Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet* 2010; 376(9751):1498–509.
11. Muller-Ladner U, Benning K, Rother E, Lang B. Neonatal lupus erythematosus as an example of passively acquired autoimmunity. *Immun Infekt* 1992; 20(4):117–21.
12. Toloza SMA, Cole DEC, Gladman DD, Ibanez D, Urowitz MB. Vitamin D insufficiency in a large female SLE cohort. *Lupus* 2010; 19(1):13–9.
13. Kamen DL. Vitamin D in lupus - new kid on the block? *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2010; 68(3):218–22.

14. Damanhour L. Vitamin D deficiency in Saudi patients with systemic lupus erythematosus. *Saudi Med J* 2009; 30(10):1291–5.
15. Kamen DL, Aranow C. The link between vitamin D deficiency and systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* 2008; 10(4):273–80.
16. Watts RA, Conaghan PG, Denton C. *Oxford Textbook of Rheumatology*. 4th ed. Oxford: OUP Oxford; 2013. (Oxford Textbook). Available from: URL: <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=1630596>.
17. Cohen, A.S., Reynolds, W.E., Franklin, E.C. et al. Preliminary criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Bull Rheum Dis*. 1971; (21):643–8.
18. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25(11):1271–7.
19. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40(9):1725.
20. Saxena R, Mahajan T, Mohan C. Lupus nephritis: current update. *Arthritis Res Ther* 2011; 13(5):240.
21. Migliorini A, Anders H-J. A novel pathogenetic concept-antiviral immunity in lupus nephritis. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8(3):183–9.
22. Munoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA, Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6(5):280–9.
23. Lech M, Anders H-J. The pathogenesis of lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24(9):1357–66.
24. Caricchio R, McPhie L, Cohen PL. Ultraviolet B radiation-induced cell death: critical role of ultraviolet dose in inflammation and lupus autoantigen redistribution. *J Immunol* 2003; 171(11):5778–86.
25. Liu Z, Davidson A. Taming lupus-a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nat Med* 2012; 18(6):871–82.
26. Amital H, Szekanecz Z, Szucs G, Danko K, Nagy E, Csepány T et al. Serum concentrations of 25-OH vitamin D in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) are inversely related to disease activity: is it time to routinely supplement patients with SLE with vitamin D? *Ann Rheum Dis* 2010; 69(6):1155–7.
27. Ohl K, Tenbrock K. Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:432595.

28. Crispin JC, Kyttaris VC, Terhorst C, Tsokos GC. T cells as therapeutic targets in SLE. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6(6):317–25.
29. Poole BD, Niewold TB, Tsokos GC, Via CS. Cytokines in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010:735169.
30. Apostolidis SA, Crispin JC, Tsokos GC. IL-17-producing T cells in lupus nephritis. *Lupus* 2011; 20(2):120–4.
31. Hughes GC. Progesterone and autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 2012; 11(6-7):A502-14.
32. Stratton MA. Drug-induced systemic lupus erythematosus. *Clin Pharm* 1985; 4(6):657–63.
33. Kulkarni O, Anders H-J. Chemokines in lupus nephritis. *Front Biosci* 2008; 13:3312–20.
34. van der Vlag J, Berden JHM. Lupus nephritis: role of antinucleosome autoantibodies. *Semin Nephrol* 2011; 31(4):376–89.
35. Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2008; 358(9):929–39.
36. Teichmann LL, Ols ML, Kashgarian M, Reizis B, Kaplan DH, Shlomchik MJ. Dendritic cells in lupus are not required for activation of T and B cells but promote their expansion, resulting in tissue damage. *Immunity* 2010; 33(6):967–78.
37. Chi S, Yu Y, Shi J, Zhang Y, Yang J, Yang L et al. Antibodies against C1q Are a Valuable Serological Marker for Identification of Systemic Lupus Erythematosus Patients with Active Lupus Nephritis. *Dis Markers* 2015; 2015:450351.
38. Zivkovic V, Stankovic A, Cvetkovic T, Mitic B, Kostic S, Nedovic J et al. Anti-dsDNA, anti-nucleosome and anti-C1q antibodies as disease activity markers in patients with systemic lupus erythematosus. *Srp Arh Celok Lek* 2014; 142(7-8):431–6.
39. Ponticelli C, Moroni G. Renal biopsy in lupus nephritis--what for, when and how often? *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13(10):2452–4.
40. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(2):241–50.
41. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992; 35(6):630–40.

42. Haubitz M. New and emerging treatment approaches to lupus. *Biologics* 2010; 4:263–71.
43. Ruiz-Irastorza G, Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Khamashta MA. Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Ann Rheum Dis* 2010; 69(1):20–8.
44. Kuhn A, Bonsmann G, Anders H-J, Herzer P, Tenbrock K, Schneider M. The Diagnosis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Dtsch Arztebl Int* 2015; 112(25):423–32.
45. Mosca M, Tani C, Carli L, Bombardieri S. Glucocorticoids in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29(5 Suppl 68):S126-9.
46. Rassow J. *Biochemie: Mit 67 Tabellen ; [mit Stoffwechselweg-Animationen]. 3., vollst. überarb. u. erw. Aufl.* Stuttgart: Thieme; 2012. (Duale Reihe). Available from: URL: <http://dx.doi.org/10.1055/b-002-6235>.
47. Dubey AK, Handu SS, Dubey S, Sharma P, Sharma KK, Ahmed QM. Belimumab: First targeted biological treatment for systemic lupus erythematosus. *J Pharmacol Pharmacother* 2011; 2(4):317–9.
48. van Vollenhoven RF, Parodis I, Levitsky A. Biologics in SLE: towards new approaches. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2013; 27(3):341–9.
49. Cancro MP, D'Cruz DP, Khamashta MA. The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 2009; 119(5):1066–73.
50. Shakoory B, Clatham W. Efficacy and safety data of belimumab in patients with systemic lupus erythematosus. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2011; 3(3):159–64.
51. Iaccarino L, Bettio S, Reggia R, Zen M, Frassi M, Andreoli L et al. Belimumab decreases flare rate and hinders the expected damage progression in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2016.
52. Furumoto Y, Smith CK, Blanco L, Zhao W, Brooks SR, Thacker SG et al. Tofacitinib Ameliorates Murine Lupus and Its Associated Vascular Dysfunction. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 2017; 69(1):148–60.
53. O'Shea JJ, Kontzias A, Yamaoka K, Tanaka Y, Laurence A. Janus kinase inhibitors in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 2013; 72 Suppl 2:ii111-5.
54. Gladman DD, Antoni C, Mease P, Clegg DO, Nash P. Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. *Ann Rheum Dis* 2005; 64 Suppl 2:ii14-7.
55. Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of psoriatic arthritis: a systematic review. *J Rheumatol* 2008; 35(7):1354–8.

56. Liu J-T, Yeh H-M, Liu S-Y, Chen K-T. Psoriatic arthritis: Epidemiology, diagnosis, and treatment. *World J Orthop* 2014; 5(4):537–43.
57. Brockbank J, Gladman D. Diagnosis and management of psoriatic arthritis. *Drugs* 2002; 62(17):2447–57.
58. Madland TM, Apalset EM, Johannessen AE, Rossebo B, Brun JG. Prevalence, disease manifestations, and treatment of psoriatic arthritis in Western Norway. *J Rheumatol* 2005; 32(10):1918–22.
59. Gladman DD, Shuckett R, Russell ML, Thorne JC, Schachter RK. Psoriatic arthritis (PSA)--an analysis of 220 patients. *Q J Med* 1987; 62(238):127–41.
60. Salvarani C, Olivieri I, Cantini F, Macchioni L, Boiardi L. Psoriatic arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1998; 10(4):299–305.
61. Olivieri I, Padula A, D'Angelo S, Cutro MS. Psoriatic arthritis sine psoriasis. *J Rheumatol Suppl* 2009; 83:28–9.
62. Moll JM, Wright V. Psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1973; 3(1):55–78.
63. Punzi L, Podswiadek M, Oliviero F, Lonigro A, Modesti V, Ramonda R et al. Laboratory findings in psoriatic arthritis. *Reumatismo* 2007; 59 Suppl 1:52–5.
64. Taylor W, Gladman D, Helliwell P, Marchesoni A, Mease P, Mielants H. Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. *Arthritis Rheum* 2006; 54(8):2665–73.
65. Helliwell P, Marchesoni A, Peters M, Barker M, Wright V. A re-evaluation of the osteoarticular manifestations of psoriasis. *Br J Rheumatol* 1991; 30(5):339–45.
66. Hyslop E, McInnes IB, Woodburn J, Turner DE. Foot problems in psoriatic arthritis: high burden and low care provision. *Ann Rheum Dis* 2010; 69(5):928.
67. Vlam K de, Gottlieb AB, Mease PJ. Current concepts in psoriatic arthritis: pathogenesis and management. *Acta Derm Venereol* 2014; 94(6):627–34.
68. Brockbank JE, Stein M, Schentag CT, Gladman DD. Dactylitis in psoriatic arthritis: a marker for disease severity? *Ann Rheum Dis* 2005; 64(2):188–90.
69. Sudol-Szopinska I, Matuszewska G, Kwiatkowska B, Pracon G. Diagnostic imaging of psoriatic arthritis. Part I: etiopathogenesis, classifications and radiographic features. *J Ultrason* 2016; 16(64):65–77.
70. Pomerantz RG, Mody E, Husni ME, Qureshi AA. Follow-up of psoriatic arthritis mutilans patients treated with anti-TNF-alpha therapy. *J Drugs Dermatol* 2009; 8(4):406–12.



71. Chandran V. Genetics of psoriasis and psoriatic arthritis. *Indian J Dermatol* 2010; 55(2):151–6.
72. Engelmann R, Muller-Hilke B. Antibodies against citrullinated peptides in clinical practice and research. *Z Rheumatol* 2009; 68(6):485–90.
73. Bogliolo L, Alpini C, Caporali R, Scire CA, Moratti R, Montecucco C. Antibodies to cyclic citrullinated peptides in psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 2005; 32(3):511–5.
74. Alenius GM, Berglin E, Rantapaa Dahlqvist S. Antibodies against cyclic citrullinated peptide (CCP) in psoriatic patients with or without joint inflammation. *Ann Rheum Dis* 2006; 65(3):398–400.
75. Chou C, Liao H, Chen C, Chen W, Wang H, Su K. The Clinical Application of Anti-CCP in Rheumatoid Arthritis and Other Rheumatic Diseases. *Biomark Insights* 2007; 2:165–71.
76. Zachariae H, Zachariae R, Blomqvist K, Davidsson S, Molin L, Mork C et al. Quality of life and prevalence of arthritis reported by 5,795 members of the Nordic Psoriasis Associations. Data from the Nordic Quality of Life Study. *Acta Derm Venereol* 2002; 82(2):108–13.
77. Husted JA, Gladman DD, Farewell VT, Cook RJ. Health-related quality of life of patients with psoriatic arthritis: a comparison with patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 45(2):151–8.
78. Tam L-S, Tomlinson B, Chu TT-W, Li M, Leung Y-Y, Kwok L-W et al. Cardiovascular risk profile of patients with psoriatic arthritis compared to controls--the role of inflammation. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47(5):718–23.
79. Han C, Robinson DW, JR, Hackett MV, Paramore LC, Fraeman KH, Bala MV. Cardiovascular disease and risk factors in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 2006; 33(11):2167–72.
80. Kimhi O, Caspi D, Bornstein NM, Maharshak N, Gur A, Arbel Y et al. Prevalence and risk factors of atherosclerosis in patients with psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2007; 36(4):203–9.
81. Barnas JL, Ritchlin CT. Etiology and Pathogenesis of Psoriatic Arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2015; 41(4):643–63.
82. Veale DJ. Psoriatic arthritis: recent progress in pathophysiology and drug development. *Arthritis Res Ther* 2013; 15(6):224.
83. Gladman DD, Anhorn KA, Schachter RK, Mervart H. HLA antigens in psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 1986; 13(3):586–92.

84. Fitzgerald O, Winchester R. Psoriatic arthritis: from pathogenesis to therapy. *Arthritis Res Ther* 2009; 11(1):214.
85. Eder L, Chandran V, Pellet F, Shanmugarajah S, Rosen CF, Bull SB et al. Human leucocyte antigen risk alleles for psoriatic arthritis among patients with psoriasis. *Ann Rheum Dis* 2012; 71(1):50–5.
86. Pattison E, Harrison BJ, Griffiths CEM, Silman AJ, Bruce IN. Environmental risk factors for the development of psoriatic arthritis: results from a case-control study. *Ann Rheum Dis* 2008; 67(5):672–6.
87. Eder L, Law T, Chandran V, Shanmugarajah S, Shen H, Rosen CF et al. Association between environmental factors and onset of psoriatic arthritis in patients with psoriasis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2011; 63(8):1091–7.
88. Punzi L, Pianon M, Bertazzolo N, Fagiolo U, Rizzi E, Rossini P et al. Clinical, laboratory and immunogenetic aspects of post-traumatic psoriatic arthritis: a study of 25 patients. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16(3):277–81.
89. Scarpa R, Del Puente A, Di Girolamo C, Della Valle G, Lubrano E, Oriente P. Interplay between environmental factors, articular involvement, and HLA-B27 in patients with psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 1992; 51(1):78–9.
90. Yamamoto T. Psoriatic arthritis: from a dermatological perspective. *Eur J Dermatol* 2011; 21(5):660–6.
91. Soltani-Arabshahi R, Wong B, Feng B-J, Goldgar DE, Duffin KC, Krueger GG. Obesity in early adulthood as a risk factor for psoriatic arthritis. *Arch Dermatol* 2010; 146(7):721–6.
92. Kruithof E, Baeten D, Rycke L de, Vandooren B, Foell D, Roth J et al. Synovial histopathology of psoriatic arthritis, both oligo- and polyarticular, resembles spondyloarthritis more than it does rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(3):R569-80.
93. Costello P, Bresnihan B, O'Farrelly C, FitzGerald O. Predominance of CD8+ T lymphocytes in psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26(5):1117–24.
94. Tassioulas I, Duncan SR, Centola M, Theofilopoulos AN, Boumpas DT. Clonal characteristics of T cell infiltrates in skin and synovium of patients with psoriatic arthritis. *Hum Immunol* 1999; 60(6):479–91.
95. Pene J, Chevalier S, Preisser L, Venereau E, Guilleux M-H, Ghannam S et al. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol* 2008; 180(11):7423–30.

96. van Kuijk, A W R, Reinders-Blankert P, Smeets TJM, Dijkmans BAC, Tak PP. Detailed analysis of the cell infiltrate and the expression of mediators of synovial inflammation and joint destruction in the synovium of patients with psoriatic arthritis: implications for treatment. *Ann Rheum Dis* 2006; 65(12):1551–7.
97. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; 6(11):1123–32.
98. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y-H et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6(11):1133–41.
99. Jandus C, Bioley G, Rivals J-P, Dudler J, Speiser D, Romero P. Increased numbers of circulating polyfunctional Th17 memory cells in patients with seronegative spondylarthritides. *Arthritis Rheum* 2008; 58(8):2307–17.
100. Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2010; 130(5):1373–83.
101. Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Zaba LC, Haider AS et al. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol* 2008; 128(5):1207–11.
102. Schett G, Elewaut D, McInnes IB, Dayer J-M, Neurath MF. How cytokine networks fuel inflammation: Toward a cytokine-based disease taxonomy. *Nat Med* 2013; 19(7):822–4.
103. Piskin G, Sylva-Steenland RMR, Bos JD, Teunissen MBM. In vitro and in situ expression of IL-23 by keratinocytes in healthy skin and psoriasis lesions: enhanced expression in psoriatic skin. *J Immunol* 2006; 176(3):1908–15.
104. Lee E, Trepicchio WL, Oestreicher JL, Pittman D, Wang F, Chamian F et al. Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med* 2004; 199(1):125–30.
105. Gladman DD. Psoriatic arthritis. *Dermatol Ther* 2009; 22(1):40–55.
106. Myers A, Lakey R, Cawston TE, Kay LJ, Walker DJ. Serum MMP-1 and TIMP-1 levels are increased in patients with psoriatic arthritis and their siblings. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43(3):272–6.
107. Hitchon CA, Danning CL, Illei GG, El-Gabalawy HS, Boumpas DT. Gelatinase expression and activity in the synovium and skin of patients with erosive psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 2002; 29(1):107–17.

108. Ritchlin CT, Haas-Smith SA, Li P, Hicks DG, Schwarz EM. Mechanisms of TNF-alpha and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *J Clin Invest* 2003; 111(6):821–31.
109. Kang EJ, Kavanaugh A. Psoriatic arthritis: latest treatments and their place in therapy. *Ther Adv Chronic Dis* 2015; 6(4):194–203.
110. Gottlieb A, Korman NJ, Gordon KB, Feldman SR, Lebwohl M, Koo JYM et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 2. Psoriatic arthritis: overview and guidelines of care for treatment with an emphasis on the biologics. *J Am Acad Dermatol* 2008; 58(5):851–64.
111. Ritchlin CT, Kavanaugh A, Gladman DD, Mease PJ, Helliwell P, Boehncke W-H et al. Treatment recommendations for psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009; 68(9):1387–94.
112. Gossec L, Smolen JS, Ramiro S, Wit M de, Cutolo M, Dougados M et al. European League Against Rheumatism (EULAR) recommendations for the management of psoriatic arthritis with pharmacological therapies: 2015 update. *Ann Rheum Dis* 2016; 75(3):499–510.
113. Veale D. Psoriatic arthritis: Recent progress in pathophysiology and drug development. *Arthritis Res Ther* 2013; 15(6):224.
114. Olivieri I, D'Angelo S, Palazzi C, Padula A. Advances in the management of psoriatic arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2014; 10(9):531–42.
115. Huynh D, Kavanaugh A. Psoriatic arthritis: current therapy and future approaches. *Rheumatology (Oxford)* 2015; 54(1):20–8.
116. Weger W. Current status and new developments in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis with biological agents. *Br J Pharmacol* 2010; 160(4):810–20.
117. Nash P, Clegg DO. Psoriatic arthritis therapy: NSAIDs and traditional DMARDs. *Ann Rheum Dis* 2005; 64 Suppl 2:ii74-7.
118. Mease PJ. Psoriatic arthritis: update on pathophysiology, assessment and management. *Ann Rheum Dis* 2011; 70 Suppl 1:i77-84.
119. Kingsley GH, Kowalczyk A, Taylor H, Ibrahim F, Packham JC, McHugh NJ et al. A randomized placebo-controlled trial of methotrexate in psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51(8):1368–77.
120. Carneiro S, Azevedo VF, Bonfiglioli R, Ranza R, Goncalves CR, Keiserman M et al. Recommendations for the management and treatment of psoriatic arthritis. *Rev Bras Reumatol* 2013; 53(3):227–41.

121. Karow T, Lang-Roth R. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis [24. Auflage]; 2016.
122. Schafer P. Apremilast mechanism of action and application to psoriasis and psoriatic arthritis. *Biochem Pharmacol* 2012; 83(12):1583–90.
123. Deeks ED. Apremilast: A Review in Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *Drugs* 2015; 75(12):1393–403.
124. van der Heijde D, Kavanaugh A, Gladman DD, Antoni C, Krueger GG, Guzzo C et al. Infliximab inhibits progression of radiographic damage in patients with active psoriatic arthritis through one year of treatment: Results from the induction and maintenance psoriatic arthritis clinical trial 2. *Arthritis Rheum* 2007; 56(8):2698–707.
125. Mease PJ, Kivitz AJ, Burch FX, Siegel EL, Cohen SB, Ory P et al. Etanercept treatment of psoriatic arthritis: safety, efficacy, and effect on disease progression. *Arthritis Rheum* 2004; 50(7):2264–72.
126. Gottlieb A, Narang K. Ustekinumab in the treatment of psoriatic arthritis: latest findings and clinical potential. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2013; 5(5):277–85.
127. Gottlieb A, Menter A, Mendelsohn A, Shen Y-K, Li S, Guzzo C et al. Ustekinumab, a human interleukin 12/23 monoclonal antibody, for psoriatic arthritis: randomised, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Lancet* 2009; 373(9664):633–40.
128. Mease PJ, Genovese MC, Greenwald MW, Ritchlin CT, Beaulieu AD, Deodhar A et al. Brodalumab, an anti-IL17RA monoclonal antibody, in psoriatic arthritis. *N Engl J Med* 2014; 370(24):2295–306.
129. Papp KA, Leonardi C, Menter A, Ortonne J-P, Krueger JG, Kricorian G et al. Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N Engl J Med* 2012; 366(13):1181–9.
130. Herold G, editor. Innere Medizin 2016: Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Selbstverl.; 2016.
131. Seo P, Stone JH. The antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides. *Am J Med* 2004; 117(1):39–50.
132. Kubaisi B, Abu Samra K, Foster CS. Granulomatosis with polyangiitis (Wegener's disease): An updated review of ocular disease manifestations. *Intractable Rare Dis Res* 2016; 5(2):61–9.

133. Ntatsaki E, Watts RA, Scott DGI. Epidemiology of ANCA-associated vasculitis. *Rheum Dis Clin North Am* 2010; 36(3):447–61.
134. Watts RA, Mahr A, Mohammad AJ, Gatenby P, Basu N, Flores-Suarez LF. Classification, epidemiology and clinical subgrouping of antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 2015; 30 Suppl 1:i14-22.
135. Abu-Shakra M, Shoenfeld Y. Azathioprine therapy for patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001; 10(3):152–3.
136. Watts RA, Lane SE, Scott DG, Koldingsnes W, Nossent H, Gonzalez-Gay MA et al. Epidemiology of vasculitis in Europe. *Ann Rheum Dis* 2001; 60(12):1156–7.
137. de Lind van Wijngaarden, Robert A F, van Rijn L, Hagen EC, Watts RA, Gregorini G, Tervaert JWC et al. Hypotheses on the etiology of antineutrophil cytoplasmic autoantibody associated vasculitis: the cause is hidden, but the result is known. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3(1):237–52.
138. Richard J. Johnson. The mystery of the antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Am J Kidney Dis* 1995; (Volume 26):57–61.
139. Gross WL, Trabandt A, Csernok E. Pathogenesis of Wegener's granulomatosis. *Ann Med Interne (Paris)* 1998; 149(5):280–6.
140. Sable-Fourtassou R, Cohen P, Mahr A, Pagnoux C, Mouthon L, Jayne D et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies and the Churg-Strauss syndrome. *Ann Intern Med* 2005; 143(9):632–8.
141. Guillevin L, Durand-Gasselien B, Cevallos R, Gayraud M, Lhote F, Callard P et al. Microscopic polyangiitis: clinical and laboratory findings in eighty-five patients. *Arthritis Rheum* 1999; 42(3):421–30.
142. Jennette JC, Falk RJ, Gasim AH. Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody vasculitis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011; 20(3):263–70.
143. Kain R, Exner M, Brandes R, Ziehermayr R, Cunningham D, Alderson CA et al. Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nat Med* 2008; 14(10):1088–96.
144. Salama AD, Pusey CD. Shining a LAMP on pauci-immune focal segmental glomerulonephritis. *Kidney Int* 2009; 76(1):15–7.
145. Gomez-Puerta JA, Gedmintas L, Costenbader KH. The association between silica exposure and development of ANCA-associated vasculitis: systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* 2013; 12(12):1129–35.

146. Beaudreuil S, Lasfargues G, Laueriere L, El Ghoul Z, Fourquet F, Longuet C et al. Occupational exposure in ANCA-positive patients: a case-control study. *Kidney Int* 2005; 67(5):1961–6.
147. Hogan SL, Cooper GS, Savitz DA, Nylander-French LA, Parks CG, Chin H et al. Association of silica exposure with anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody small-vessel vasculitis: a population-based, case-control study. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2(2):290–9.
148. Bartunkova J, Pelclova D, Fenclova Z, Sediva A, Lebedova J, Tesar V et al. Exposure to silica and risk of ANCA-associated vasculitis. *Am J Ind Med* 2006; 49(7):569–76.
149. Popa ER, Tervaert JWC. The relation between *Staphylococcus aureus* and Wegener's granulomatosis: current knowledge and future directions. *Intern Med* 2003; 42(9):771–80.
150. Stegeman CA, Tervaert JW, Sluiter WJ, Manson WL, Jong PE de, Kallenberg CG. Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse rates in Wegener granulomatosis. *Ann Intern Med* 1994; 120(1):12–7.
151. Gao Y, Zhao M-H. Review article: Drug-induced anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Nephrology (Carlton)* 2009; 14(1):33–41.
152. Gao Y, Chen M, Ye H, Guo X-H, Zhao M-H, Wang H-Y. The target antigens of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) induced by propylthiouracil. *Int Immunopharmacol* 2007; 7(1):55–60.
153. Pallan L, Savage CO, Harper L. ANCA-associated vasculitis: from bench research to novel treatments. *Nat Rev Nephrol* 2009; 5(5):278–86.
154. Popa ER, Stegeman CA, Bos NA, Kallenberg CG, Tervaert JW. Differential B- and T-cell activation in Wegener's granulomatosis. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(5 Pt 1):885–94.
155. Muller K, Lin JH. Orbital granulomatosis with polyangiitis (Wegener granulomatosis): clinical and pathologic findings. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138(8):1110–4.
156. Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DA, Michel BA, Hunder GG, Arend WP et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 1990; 33(8):1101–7.
157. Holle JU, Voigt C, Both M, Holl-Ulrich K, Nolle B, Laudien M et al. Orbital masses in granulomatosis with polyangiitis are associated with a refractory course and a high burden of local damage. *Rheumatology (Oxford)* 2013; 52(5):875–82.
158. Pakrou N, Selva D, Leibovitch I. Wegener's granulomatosis: ophthalmic manifestations and management. *Semin Arthritis Rheum* 2006; 35(5):284–92.

159. Gomez-Puerta JA, Hernandez-Rodriguez J, Lopez-Soto A, Bosch X. Antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides and respiratory disease. *Chest* 2009; 136(4):1101–11.
160. Solans-Laque R, Bosch-Gil J, Canela M, Lorente J, Pallisa E, Vilardell-Tarres M. Clinical features and therapeutic management of subglottic stenosis in patients with Wegener's granulomatosis. *Lupus* 2008; 17(9):832–6.
161. Hoffman GS, Kerr GS, Leavitt RY, Hallahan CW, Lebovics RS, Travis WD et al. Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients. *Ann Intern Med* 1992; 116(6):488–98.
162. Holle JU, Gross WL, Latza U, Nolle B, Ambrosch P, Heller M et al. Improved outcome in 445 patients with Wegener's granulomatosis in a German vasculitis center over four decades. *Arthritis Rheum* 2011; 63(1):257–66.
163. Garovic VD, Clarke BL, Chilson TS, Specks U. Diabetes insipidus and anterior pituitary insufficiency as presenting features of Wegener's granulomatosis. *Am J Kidney Dis* 2001; 37(1):E5.
164. Czarnecki EJ, Spickler EM. MR demonstration of Wegener granulomatosis of the infundibulum, a cause of diabetes insipidus. *AJNR Am J Neuroradiol* 1995; 16(4 Suppl):968–70.
165. Pagnoux C, Mahr A, Cohen P, Guillevin L. Presentation and outcome of gastrointestinal involvement in systemic necrotizing vasculitides: analysis of 62 patients with polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis, Wegener granulomatosis, Churg-Strauss syndrome, or rheumatoid arthritis-associated vasculitis. *Medicine (Baltimore)* 2005; 84(2):115–28.
166. Ravanan R, Weale AR, Lear PA, Thornton MJ, Kamel D, Tomson CRV. Hemoperitoneum in a patient with ANCA-associated polyangiitis syndrome. *Am J Kidney Dis* 2004; 44(5):908–11.
167. Hellmich B, Flossmann O, Gross WL, Bacon P, Cohen-Tervaert JW, Guillevin L et al. EULAR recommendations for conducting clinical studies and/or clinical trials in systemic vasculitis: focus on anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66(5):605–17.
168. Fauci AS, Haynes BF, Katz P, Wolff SM. Wegener's granulomatosis: prospective clinical and therapeutic experience with 85 patients for 21 years. *Ann Intern Med* 1983; 98(1):76–85.
169. Mukhtyar C, Guillevin L, Cid MC, Dasgupta B, Groot K de, Gross W et al. EULAR recommendations for the management of primary small and medium vessel vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2009; 68(3):310–7.



170. Groot K de, Harper L, Jayne DRW, Flores Suarez LF, Gregorini G, Gross WL et al. Pulse versus daily oral cyclophosphamide for induction of remission in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2009; 150(10):670–80.
171. Guillevin L, Cordier JF, Lhote F, Cohen P, Jarrousse B, Royer I et al. A prospective, multicenter, randomized trial comparing steroids and pulse cyclophosphamide versus steroids and oral cyclophosphamide in the treatment of generalized Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 1997; 40(12):2187–98.
172. Little MA, Nightingale P, Verburch CA, Hauser T, Groot K de, Savage C et al. Early mortality in systemic vasculitis: relative contribution of adverse events and active vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69(6):1036–43.
173. Harper L, Savage CO. Pathogenesis of ANCA-associated systemic vasculitis. *J Pathol* 2000; 190(3):349–59.
174. Booth AD, Almond MK, Burns A, Ellis P, Gaskin G, Neild GH et al. Outcome of ANCA-associated renal vasculitis: a 5-year retrospective study. *Am J Kidney Dis* 2003; 41(4):776–84.
175. Geetha D, Kallenberg C, Stone JH, Salama AD, Appel GB, Duna G et al. Current therapy of granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis: the role of rituximab. *J Nephrol* 2015; 28(1):17–27.
176. Pescovitz MD. Rituximab, an anti-cd20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *Am J Transplant* 2006; 6(5 Pt 1):859–66.
177. Cartin-Ceba R, Golbin JM, Keogh KA, Peikert T, Sanchez-Menendez M, Ytterberg SR et al. Rituximab for remission induction and maintenance in refractory granulomatosis with polyangiitis (Wegener's): ten-year experience at a single center. *Arthritis Rheum* 2012; 64(11):3770–8.
178. Jones RB, Tervaert JWC, Hauser T, Luqmani R, Morgan MD, Peh CA et al. Rituximab versus cyclophosphamide in ANCA-associated renal vasculitis. *N Engl J Med* 2010; 363(3):211–20.
179. Stone JH, Merkel PA, Spiera R, Seo P, Langford CA, Hoffman GS et al. Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med* 2010; 363(3):221–32.
180. Guerry M-JCJ, Brogan P, Bruce IN, D'Cruz DP, Harper L, Luqmani R et al. Recommendations for the use of rituximab in anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51(4):634–43.

181. Bruhl H, Cihak J, Niedermeier M, Denzel A, Rodriguez Gomez M, Talke Y et al. Important role of interleukin-3 in the early phase of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; 60(5):1352–61.
182. Cohen PL, Eisenberg RA. Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:243–69.
183. Broughton SE, Dhagat U, Hercus TR, Nero TL, Grimbaldston MA, Bonder CS et al. The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: from ligand recognition to initiation of signaling. *Immunol Rev* 2012; 250(1):277–302.
184. Weber GF, Chousterman BG, He S, Fenn AM, Nairz M, Anzai A et al. Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis. *Science* 2015; 347(6227):1260–5.
185. Renner K, Hermann FJ, Schmidbauer K, Talke Y, Rodriguez Gomez M, Schiechl G et al. IL-3 contributes to development of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Kidney Int* 2015; 88(5):1088–98.
186. Schroeder JT, Chichester KL, Bieneman AP. Human basophils secrete IL-3: evidence of autocrine priming for phenotypic and functional responses in allergic disease. *J Immunol* 2009; 182(4):2432–8.
187. Valent P, Schmidt G, Besemer J, Mayer P, Zenke G, Liehl E et al. Interleukin-3 is a differentiation factor for human basophils. *Blood* 1989; 73(7):1763–9.
188. Kirshenbaum AS, Goff JP, Dreskin SC, Irani AM, Schwartz LB, Metcalfe DD. IL-3-dependent growth of basophil-like cells and mastlike cells from human bone marrow. *J Immunol* 1989; 142(7):2424–9.
189. Buelens C, Bartholome EJ, Amraoui Z, Boutriaux M, Salmon I, Thielemans K et al. Interleukin-3 and interferon beta cooperate to induce differentiation of monocytes into dendritic cells with potent helper T-cell stimulatory properties. *Blood* 2002; 99(3):993–8.
190. Ebner S, Hofer S, van Nguyen A, Furhapter C, Herold M, Fritsch P et al. A novel role for IL-3: human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern. *J Immunol* 2002; 168(12):6199–207.
191. Haak-Frendscho M, Arai N, Arai K, Baeza ML, Finn A, Kaplan AP. Human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 cause basophil histamine release. *J Clin Invest* 1988; 82(1):17–20.

192. Kurimoto Y, Weck AL de, Dahinden CA. Interleukin 3-dependent mediator release in basophils triggered by C5a. *J Exp Med* 1989; 170(2):467–79.
193. Snapper CM, Moorman MA, Rosas FR, Kehry MR, Maliszewski CR, Mond JJ. IL-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor strongly induce Ig secretion by sort-purified murine B cell activated through the membrane Ig, but not the CD40, signaling pathway. *J Immunol* 1995; 154(11):5842–50.
194. Tadmori W, Feingersh D, Clark SC, Choi YS. Human recombinant IL-3 stimulates B cell differentiation. *J Immunol* 1989; 142(6):1950–5.
195. Geng J-G, Chen M, Chou K-C. P-selectin cell adhesion molecule in inflammation, thrombosis, cancer growth and metastasis. *Curr Med Chem* 2004; 11(16):2153–60.
196. Khew-Goodall Y, Butcher CM, Litwin MS, Newlands S, Korpelainen EI, Noack LM et al. Chronic expression of P-selectin on endothelial cells stimulated by the T-cell cytokine, interleukin-3. *Blood* 1996; 87(4):1432–8.
197. Fishman P, Kamashta M, Ehrenfeld M, Vianna J, Hughes GR, Sredni D et al. Interleukin-3 immunoassay in systemic lupus erythematosus patients: preliminary data. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 100(3):215–8.
198. Sergio E. Baranzini, Carita Elfstrom, Sheng-Yung Chang, Catalin Butunoi, Ronald Murray, Russell Higuchi and Jorge R. Oksenberg. Transcriptional analysis of multiple sclerosis brain lesions reveals a complex pattern of cytokine expression. *The Journal of Immunology* 2000; (1):6576–82.
199. Renner K, Hellerbrand S, Hermann F, Riedhammer C, Talke Y, Schiechl G et al. IL-3 promotes the development of experimental autoimmune encephalitis. *JCI Insight* 2016; 1(16):e87157.
200. Jaatinen T, Laine J. Isolation of mononuclear cells from human cord blood by Ficoll-Paque density gradient. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2007; Chapter 2:Unit 2A.1.
201. Givan AL. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol* 2011; 699:1–29.
202. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
203. Ashmore LM, Shopp GM, Edwards BS. Lymphocyte subset analysis by flow cytometry. Comparison of three different staining techniques and effects of blood storage. *J Immunol Methods* 1989; 118(2):209–15.
204. Freer G. Intracellular staining and detection of cytokines by fluorescence-activated flow cytometry. *Methods Mol Biol* 2014; 1172:221–34.

205. Murphy KM, Travers P, Walport M, Janeway CA, Seidler L, Ehrenstein M. Janeway Immunologie. 7. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.; 2009.
206. Wodnar-Filipowicz A, Heusser CH, Moroni C. Production of the haemopoietic growth factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE receptor-mediated activation. *Nature* 1989; 339(6220):150–2.
207. Stoeckle C, Simon H-U. CD8(+) T cells producing IL-3 and IL-5 in non-IgE-mediated eosinophilic diseases. *Allergy* 2013; 68(12):1622–5.
208. Jin L, Bai R, Zhou J, Shi W, Xu L, Sheng J et al. Association of Serum T cell Immunoglobulin Domain and Mucin-3 and Interleukin-17 with Systemic Lupus Erythematosus. *Med Sci Monit Basic Res* 2018; 24:168–76.
209. Martin JC, Baeten DL, Josien R. Emerging role of IL-17 and Th17 cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 2014; 154(1):1–12.
210. Li D, Guo B, Wu H, Tan L, Chang C, Lu Q. Interleukin-17 in systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *Autoimmunity* 2015; 48(6):353–61.
211. Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 2008; 26:453–79.
212. Heiler S, Lötscher J, Kreuzaler M, Rolink J, Rolink A. Prophylactic and Therapeutic Effects of Interleukin-2 (IL-2)/Anti-IL-2 Complexes in Systemic Lupus Erythematosus-Like Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Front Immunol* 2018; 9:656.
213. Ohl K, Tenbrock K. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol* 2015; 45(2):344–55.
214. Humrich JY, Riemekasten G. Restoring regulation - IL-2 therapy in systemic lupus erythematosus. *Expert Rev Clin Immunol* 2016; 12(11):1153–60.
215. Salazar-Camarena DC, Ortíz-Lazareno P, Marín-Rosales M, Cruz A, Muñoz-Valle F, Tapia-Llanos R et al. BAFF-R and TACI expression on CD3+ T cells: Interplay among BAFF, APRIL and T helper cytokines profile in systemic lupus erythematosus. *Cytokine* 2018.
216. Navarra SV, Guzman RM, Gallacher AE, Hall S, Levy RA, Jimenez RE et al. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2011; 377(9767):721–31.
217. Boyce EG, Fusco BE. Belimumab: Review of use in systemic lupus erythematosus. *Clin Ther* 2012; 34(5):1006–22.
218. Wu Z, Zhang S, Zhao L, Fei Y, Wang L, Li J et al. Upregulation of CD16- monocyte subsets in systemic lupus erythematosus patients. *Clin Rheumatol* 2017; 36(10):2281–7.

219. Kaplan MJ. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7(12):691–9.
220. Costello PJ, Winchester RJ, Curran SA, Peterson KS, Kane DJ, Bresnihan B et al. Psoriatic Arthritis Joint Fluids Are Characterized by CD8 and CD4 T Cell Clonal Expansions that Appear Antigen Driven. *J Immunol* 2001; 166(4):2878–86.
221. Lubberts E. The IL-23-IL-17 axis in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2015; 11(7):415–29.
222. Chiricozzi A. Pathogenic role of IL-17 in psoriasis and psoriatic arthritis. *Actas Dermo-Sifiliográficas* 2014; 105:9–20.
223. Mease PJ. Inhibition of interleukin-17, interleukin-23 and the TH17 cell pathway in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis. *Curr Opin Rheumatol* 2015; 27(2):127–33.
224. Raychaudhuri SP. Role of IL-17 in psoriasis and psoriatic arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2013; 44(2):183–93.
225. Bos F, Capsoni F, Molteni S, Raeli L, Diani M, Altomare A et al. Differential expression of interleukin-2 by anti-CD3-stimulated peripheral blood mononuclear cells in patients with psoriatic arthritis and patients with cutaneous psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 2014; 39(3):385–90.
226. Kim Z, Choi BS, Kim JK, Won DI. Basophil markers for identification and activation in the indirect basophil activation test by flow cytometry for diagnosis of autoimmune urticaria. *Ann Lab Med* 2016; 36(1):28–35.
227. Löttsch B, Dölle S, Vieths S, Worm M. Exploratory analysis of CD63 and CD203c expression in basophils from hazelnut sensitized and allergic individuals. *Clin Transl Allergy* 2016; 6:45.
228. Mashiko S, Mehta H, Bissonnette R, Sarfati M. Increased frequencies of basophils, type 2 innate lymphoid cells and Th2 cells in skin of patients with atopic dermatitis but not psoriasis. *J Dermatol Sci* 2017; 88(2):167–74.
229. Schneider E, Thieblemont N, Moraes ML de, Dy M. Basophils: New players in the cytokine network. *Eur Cytokine Netw* 2010; 21(3):142–53.
230. Mukae H, Matsumoto N, Ashitani J, Mashimoto H, Kadota J, Nakazato M et al. Neutrophil-related cytokines and neutrophil products in bronchoalveolar lavage fluid of a patient with ANCA negative Wegener's granulomatosis. *Eur Respir J* 1996; 9(9):1950–4.

231. Richter AG, Perkins GD, Chavda A, Sapey E, Harper L, Thickett DR. Neutrophil chemotaxis in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's) and idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2011; 38(5):1081–8.
232. Schreiber A, Choi M. The role of neutrophils in causing antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *Curr Opin Hematol* 2015; 22(1):60–6.
233. Jennette JC, Falk RJ. B cell-mediated pathogenesis of ANCA-mediated vasculitis. *Semin Immunopathol* 2014; 36(3):327–38.
234. Granzin M, Soltenborn S, Müller S, Kollet J, Berg M, Cerwenka A et al. Fully automated expansion and activation of clinical-grade natural killer cells for adoptive immunotherapy. *Cytotherapy* 2015; 17(5):621–32.
235. Becker PSA, Suck G, Nowakowska P, Ullrich E, Seifried E, Bader P et al. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2016; 65(4):477–84.

## **8 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank an folgende Personen richten, ohne deren Mithilfe die Durchführung und Anfertigung dieser Dissertationsschrift nicht zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Mack, meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit und freundliche Hilfestellung.

Besonders bedanke ich mich bei Frau Dr. Renner für den kritischen Diskurs und Ideenaustausch, sowie die Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Fleck möchte ich für die hervorragende Kooperation während der Zeit der Patientenrekrutierung an seiner Abteilung in der Asklepios Klinik Bad Abbach danken. Ohne die reibungslose Zusammenarbeit wäre das Zustandekommen dieser Promotionsschrift nicht möglich gewesen.

Ferner danke ich meinen Laborkollegen der AG Mack. Mein besonderer Dank gilt hierbei Frau Yvonne Talke und Frau Dagmar Halbritter für ihre fachlich kompetente sowie menschliche Unterstützung im Labor. Herrn Dr. Rodriguez-Gomez danke ich für seine konstruktive Unterstützung hinsichtlich wissenschaftlicher Fragen sowie die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Sehr verbunden bin ich meinem Studienkollegen Clemens Memmel, ohne dessen hilfreiche Unterstützung und moralischen Beistand die Durchführung dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt jedoch meinen Großeltern, Helga und Josef Pingl, sowie meinen Eltern, Eva-Maria und Stanisław Pasierski, die mir meinen bisherigen Lebensweg in dieser Form ermöglicht haben und denen ich diese Arbeit widmen möchte.

## 9 Lebenslauf

### *Persönliche Daten*

---

Name: Janina Constanze Pasierski  
Geb. am: 11. Juni 1993 in Linz, Österreich  
Staatsangehörigkeit: Österreich

### *Akademische Ausbildung*

---

Oktober 2012 – Mai 2019 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg  
Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 05/2019, Note 1,5  
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 04/2018, Note: 2,0  
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 09/2014, Note: 1,5

März 2016 – Mai 2019 Dissertationsschrift: „Untersuchung der IL-3 Expression bei Patienten mit Systemischem Lupus erythematoses, Psoriasis-Arthritis und Vaskulitis“

### *Schulische Ausbildung*

---

Juli 2011 Abschluss des sozialpraktischen wirtschaftlichen Realgymnasiums mit ausgezeichnetem Erfolg (Note: 1,4)

### *Klinische Erfahrung*

---

18.09. – 20.09.2019 Hospitation in der 1. Medizinischen Abteilung im Hanusch-Krankenhaus  
Heinrich-Collin-Straße 30, A-1140 Wien

12.09. – 13.09.2019 Hospitation in der Rheumatologie am Uniklinikum Innsbruck  
Anichstraße 35, A-6020 Innsbruck

PJ Tertian Neurologie Klinikum Traunstein  
PJ Tertian Innere Medizin Landeskrankenhaus Bludenz, Vorarlberg  
UKR und Rheumatologische Abteilung der Asklepios Klinik Bad Abbach

PJ Tertian Chirurgie AUVA Unfallkrankenhaus Linz

06.08. – 07.08.2018 Hospitation in der Rheumatologie im Krankenhaus Bruneck  
Spitalstraße 11, I-39031 Bruneck

04.12. – 10.12. 2017 Hospitation in der Dermatologie am Uniklinikum Regensburg  
Franz-Josef-Strauß-Allee 11, D-93053 Regensburg

13.11 – 18.11. 2017 Hospitation in der Rheumatologie in der Asklepios Klinik Bad Abbach (Lehrkrankenhaus des Uniklinikums Regensburg)  
Kaiser-Karl-V-Allee 3, D-93077 Bad Abbach

23. 10 – 29.10. 2017 Hospitation in der Pathologie am Uniklinikum Regensburg  
Franz-Josef-Strauß-Allee 11, D-93053 Regensburg

21.08 – 17.09. 2017 Famulatur in der Neurologie im Krankenhaus „Franz Tappeiner“  
Rossinistr. 7, I-39012 Meran



23.03. – 21.04. 2017	Famulatur am gerichtsmedizinischen Institut der LMU München Nußbaumstraße 26, D-80336 München
15.02. – 15.03. 2016	Famulatur in der Inneren Medizin im Landeskrankenhaus Bludenz Spitalgasse 13, A-6700 Bludenz
01.08. – 31.08. 2015	Famulatur in der Orthopädie und Unfallchirurgie im Krankenhaus „Franz Tappeiner“ Rossinistr. 7, I-39012 Meran
02.02. – 03.03. 2015	Famulatur in der allgemeinmedizinischen Praxis Gudrun Arzt Dr.-Theobald-Schrems-Str. 18, D-93055 Regensburg
01.08. – 29.09. 2013	Pflegepraktikum auf der Urologischen Station B3.1 im AKH Linz Krankenhausstraße 9, A-4021 Linz

### *Berufliche Erfahrung im sozialen und medizinischen Bereich*

---

01. 11. 2013 – 01.01.2017	Arzthelferin in der Praxis von Fr. Gudrun Arzt, Ärztin für Allgemeinmedizin Dr.-Theobald-Schrems-Straße 18, D-93055 Regensburg
14.03. – 14.04. 2013	Abteilungshelferin auf Station 44 (Interne) im Konventhospital der Barmherzigen Brüder Linz Seilerstätte 2, A-4021 Linz
26. 07. – 13. 08. 2010	Ferialarbeiterin in der Pflege im Altenheim „Rudigier“, Stockhofstraße 6, A-4020 Linz

### *Außeruniversitäre Fortbildungen*

---

18.09.2019	Teilnahme an der Summer School im Hanusch-Krankenhaus (Schwerpunkt Bewegungsapparat, Rheumatologie und Pulmologie) Heinrich-Collin-Straße 30, A-1140 Wien
26.01.2019	Teilnahme am 34. Bad Abbacher Winter-Symposium – Rheumatologie aktuell Kaiser-Karl V-Allee 3, D-93077 Bad Abbach
29.11. – 01.12.2018	Teilnahme an der Jahrestagung der ÖGR in Wien (Studentenprogramm)
19. 09. – 22.09.2018	Teilnahme am DGRh-Kongress in Mannheim (Studentenprogramm)
08.07. – 11.07.2018	Teilnahme an der Rheuma Summer School in Saalfelden (Veranstalter: Österreichische Gesellschaft für Rheumatologie)
13.08 – 18.08.2017	Teilnahme an der Rheuma Summer School in Düsseldorf (Veranstalter: Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie)

## **10 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, Janina Constanze Pasierski, geboren am 11.06.1993 in Linz, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit

### **Untersuchung der IL-3 Expression bei Patienten mit Systemischem Lupus erythematodes, Psoriasis-Arthritis und Vaskulitis**

selbstständig angefertigt habe, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Diese Doktorarbeit wurde in der jetzigen oder in ähnlicher Form bei keiner anderen Universität eingereicht und hat noch keinem anderen Prüfungszweck gedient.

Regensburg, den

(Janina Pasierski)