

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

***UNTERSUCHUNG DER INTERLEUKIN-3- UND INTERLEUKIN-3-REZEPTOR-
EXPRESSION BEI PATIENTEN MIT RHEUMATOIDER ARTHRITIS.***

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Verena Bortenschlager

2018

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

***UNTERSUCHUNG DER INTERLEUKIN-3- UND INTERLEUKIN-3-REZEPTOR-
EXPRESSION BEI PATIENTEN MIT RHEUMATOIDER ARTHRITIS.***

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Verena Bortenschlager

2018

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Matthias Mack
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Martin Fleck
Tag der mündlichen Prüfung:	09.04.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	i
1 Einleitung.....	1
1.1 Rheumatoide Arthritis.....	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie.....	1
1.1.2 Klinik und Sonderformen der Erkrankung.....	2
1.1.3 Komplikationen der Rheumatoiden Arthritis.....	8
1.1.4 Relevante Laborwerte und deren Aussagekraft.....	10
1.1.5 Beurteilung der Krankheitsaktivität.....	11
1.1.6 Therapiemöglichkeiten.....	12
1.1.7 Zytokine.....	16
1.2 Interleukin - 3.....	18
1.2.1 Struktur.....	19
1.2.2 IL-3 produzierende Zellen.....	19
1.2.3 Effekte von IL-3.....	20
1.2.4 IL-3 Rezeptor.....	23
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	25
2 Material und Methoden.....	26
2.1 Laborgeräte und – materialien.....	26
2.1.1 Geräte.....	26
2.1.2 Glas- und Plastikware.....	27
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Reaktionsmedien.....	28
2.1.4 Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze.....	29
2.1.5 Medien, Lösungen, Puffer.....	29
2.1.6 Zytokine, Antikörper und Enzyme.....	31
2.1.7 Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	31
2.1.8 Analyse- und Bearbeitungsprogramme.....	32
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Patientenrekrutierung und Gewinnung des Probenmaterials.....	33
2.2.2 Plasmagewinnung.....	34
2.2.3 Gewinnung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aus Vollblut.....	34
2.2.4 Kultivierung und Lagerung von eukaryoten Zellen.....	36

2.2.5	Bestimmung der Zellzahlen	36
2.2.6	Zellkulturansätze	37
2.2.7	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	38
2.2.8	Durchflusszytometrie	39
2.2.9	Extrazelluläre FACS-Färbung	40
2.2.10	Intrazelluläre FACS-Färbung.....	43
3	Ergebnisse	45
3.1	IL-3 Produktion gemessen im Zellkultur-Überstand.....	51
3.2	Untersuchung der potentiellen Quellen von IL-3.....	53
3.2.1	CD4 ⁺ T-Zellen als mögliche Quelle von IL-3.....	54
3.2.2	CD8 ⁺ T-Zellen als mögliche Quelle von IL-3.....	56
3.3	Untersuchung der potentiellen Quellen von IL-2.....	58
3.3.1	CD4 ⁺ T-Zellen als mögliche Quelle von IL-2.....	58
3.3.2	CD8 ⁺ T-Zellen als mögliche Quelle von IL-2.....	60
3.4	Untersuchung der potentiellen Quellen von IL-17.....	62
3.4.1	CD4 ⁺ T-Zellen als mögliche Quelle von IL-17.....	62
3.4.2	CD8 ⁺ T-Zellen als mögliche Quelle von IL-17.....	62
3.5	Expression der IL-3-Rezeptor- α -Kette	63
3.5.1	Expression der IL-3-Rezeptor- α -Kette auf Basophilen Granulozyten	63
3.5.2	Expression der IL-3-Rezeptor- α -Kette auf plasmazytoiden Dendritischen Zellen	65
3.6	Expression der IL-3-Rezeptor- β c-Kette	66
3.6.1	Expression der IL-3-Rezeptor- β c-Kette auf Basophilen Granulozyten	67
3.6.2	Expression der IL-3-Rezeptor- β c-Kette auf plasmazytoiden Dendritischen Zellen	68
3.7	Aktivität Basophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der IL-3 Konzentration	69
3.8	Anzahl Basophiler Granulozyten im peripheren Blut	71
3.9	Anzahl der T-Zellen im peripheren Blut	72
3.9.1	Anzahl der CD4 ⁺ T-Zellen im peripheren Blut.....	73
3.9.2	Anzahl der CD8 ⁺ T-Zellen im peripheren Blut.....	74
3.10	Bestimmung der Anzahl weiterer Zellen aus dem peripheren Blut	75
3.11	Anzahl der CD19 ⁺ B-Zellen im peripheren Blut.....	76
3.11.1	Anzahl der CD19 ⁺ B-Zellen bei RA Patienten, die kein <i>Rituximab</i> erhalten haben	76
3.11.2	Anzahl der CD19 ⁺ B-Zellen bei RA Patienten in Abhängigkeit von der <i>Rituximab</i> -Gabe	78

4	Diskussion	80
4.1	Relevante Merkmale von Patienten bei zunehmender Krankheitsaktivität der RA	80
4.2	Gesteigerte IL-3 Produktion bei zunehmender Krankheitsaktivität der RA.....	81
4.3	IL-3 Produktion durch CD8 ⁺ Lymphozyten bei RA Patienten.....	81
4.4	Untergeordnete Rolle von CD4 ⁺ Lymphozyten als IL-3 Quelle bei Patienten mit RA	82
4.5	Abfall der IL-2 ⁺ CD4 ⁺ T-Lymphozyten mit steigender Krankheitsaktivität	83
4.6	Anstieg der IL-2 ⁺ CD8 ⁺ T-Lymphozyten mit steigender Krankheitsaktivität	84
4.7	Geringer Anteil von IL-17 produzierenden T-Lymphozyten.....	85
4.8	Herunterregulation der Expression der IL-3-R- α -Kette auf Basophilen Granulozyten und pDCs bei RA Patienten.....	86
4.9	Herunterregulation der Expression der IL-3-R- β c-Kette auf Basophilen Granulozyten und pDCs unter steigenden IL-3 Konzentrationen	88
4.10	Erhöhte IL-3 Konzentrationen führen zu gesteigerter Aktivität von Basophilen Granulozyten.....	89
4.11	Kontinuierlicher Anstieg der Anzahl Basophiler Granulozyten im peripheren Blut mit steigender Krankheitsaktivität	90
4.12	Veränderung von Zellzahlen im peripheren Blut mit steigender Krankheitsaktivität.....	91
5	Zusammenfassung.....	92
6	Literaturverzeichnis	94
7	Abbildungsverzeichnis	100
8	Tabellenverzeichnis	101
9	Danksagung	102
10	Eidesstattliche Erklärung.....	103

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACPA	Antikörper gegen citrulliniertes Peptid
ACR	American College of Rheumatology
Ak	Antikörper
Anti-CCP-Ak	Antikörper gegen cyclisches citrulliniertes Peptid
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
Basophile	Basophile Granulozyten
bzw.	beziehungsweise
BSA	Bovines Serumalbumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
BWS	Brustwirbelsäule
β c	β -Kette des IL-3-, IL-5- und GM-CSF-Rezeptors („common beta chain“)
ca.	circa
CCP	Cyclisches citrulliniertes Peptid
CD	Oberflächenproteine von Zellen („cluster of differentiation“)
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis („collagen-induced arthritis“)
CLP	Modell polymikrobieller Sepsis bei Mäusen („cecal ligation and puncture“)
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
CTLA4	„cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4“
Cy	Cyanin
DAS	Disease Activity Score
DIP-Gelenk	Distales Interphalangealgelenk
DMARDs	Basistherapie mit krankheitsmodifizierenden Mitteln („Disease Modifying Antirheumatic Drugs“)
durchschn.	durchschnittlich
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzymgebundener Immunabsorptionstest („enzyme-linked immunosorbent assay“)
Eosinophile	Eosinophile Granulozyten
EULAR	European League Against Rheumatism
evtl.	eventuell
FACS	Durchflusszytometrie („fluorescence activated cell sorting“)
Fc-Fragment	kristallisierbares Fragment („crystallizable region“)
Fc ϵ RI	hochaffiner IgE-Rezeptor auf Mastzellen und Basophilen Granulozyten
FCS	fetales Kälberserum („fetal calf serum“)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht im Durchflusszytometer („forward scatter“)
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	„granulocyte macrophage-colony stimulating factor“
gp140	Glycoprotein 140 (Rezeptor)
HLA-DR	„Human Leucoyte Antigen-antigen D Related“
hu IL-3	rekombinantes humanes Interleukin-3
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
JIA	Juvenile idiopathische Arthritis
JRA	Juvenile rheumatoide Arthritis
IL-1	Interleukin-1

IL-2	Interleukin-2
IL-3	Interleukin-3
IL-3R	Interleukin-3-Rezeptor
IL-3R α	Interleukin-3-Rezeptor- α -Kette
IL-3R β c	Interleukin-3-Rezeptor- β c-Kette
IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5
IL-6	Interleukin-6
IL-13	Interleukin-13
IL-17	Interleukin-17
IP	intraperitoneal
i.v.	intravenös
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
l	Liter
Lig.	Ligamentum
LORA	Late onset rheumatoid arthritis
LWS	Lendenwirbelsäule
MAP Kinase	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MCP	Metacarpophalangealgelenk
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität ("mean fluorescence intensity")
MHC	"Major Histocompatibility Complex"
min	Minute
Mio.	Million
μ g	Mikrogramm (= 10^{-6} Gramm)
μ l	Mikroliter (= 10^{-6} Liter)
ml	Milliliter (= 10^{-3} Liter)
MMP	Matrix zerstörende Metalloproteinase
MMP-1	Matrix Metalloproteinase-1
MS	Multiple Sklerose
MTP	Metatarsophalangealgelenk
MTX	Methotrexat
Multi-CSF	"multiple-colony stimulating factor"
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
neg.	negativ/-e/-er/-es
Neutrophile	Neutrophile Granulozyten
ng	Nanogramm (= 10^{-9} Gramm)
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
nl	Nanoliter (= 10^{-9} Liter)
nm	Nanometer (= 10^{-9} Meter)
nmol	Nanomol (= 10^{-9} mol)
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen („peripheral blood mononuclear cells“)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („Phosphate Buffered Saline“)
pDCs	plasmazytoide Dendritische Zellen
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
Pg	Pikogramm (= 10^{-12} Gramm)
PGE2	Prostaglandin E2
PI-3 Kinase	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PIP	Proximales Interphalangealgelenk
pos.	positive/-e/-er/-es
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
rpm	Umdrehungen pro Minute ("revolutions per minute")
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses

SN	Überstand ("supernatant")
sog.	sogenannte/-r/-s
SRV	Systemische Rheumatoide Vaskulitis
SSC	Seitwärtsstreulicht im Durchflusszytometer ("side scatter")
sSS	sekundäres Sjögren-Syndrom
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor ("t-cell receptor")
T _H 2	Subgruppe der T-Helferzellen
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor ("tumor necrosis factor")
TNF- α	Tumornekrosefaktor-Alpha („tumor necrosis factor alpha“)
v.a.	vor allem
VAS	Visuelle Analogskala
VEGF	"vascular endothelial growth factor"
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Bei der Rheumatoiden Arthritis (RA) handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung, die durch Synovialitis zu Arthritis führt. Die Erkrankung geht dementsprechend mit Gelenkschmerzen, Schwellung und Steifigkeit einher. Unbehandelt führt der schubweise progrediente Verlauf zu Knorpelschäden, Knochenerosionen, Gelenkdestruktion und Invalidität. (1)

Im Verlauf der RA kommt es zudem nicht selten zur extraartikulären bzw. systemischen Manifestation. Mit der RA assoziiert sind kardiovaskuläre, pulmonale, psychologische sowie skelettale Veränderungen. (2)

Während die genaue Ätiologie der RA noch nicht gänzlich geklärt ist, konnten Untersuchungen etliche bedeutende Faktoren enthüllen. Hierzu zählen T-Zellen, B-Zellen und Zytokine. Zu den Zytokinen, die eine besonders entscheidende Rolle spielen, gehören TNF, IL-1 und IL-6. (1)

Die Bildung von Autoantikörpern gegen das Fc-Fragment des IgG (= Rheumafaktoren) sowie die Citrullinierung humaner Peptide und Bildung entsprechender Antikörper (Ak gegen cyclisches citrulliniertes Peptid = Anti-CCP-Ak) ist zudem typisch. 50% bis 80% der Patienten mit RA sind für einen oder beide Antikörper positiv.

Rauchen ist einer der wichtigsten umweltbedingten Risikofaktoren für die Entwicklung einer anti-CCP-positiven RA. (1)

Die Autoantikörper wie Rheumafaktor und ACPA sind bei Patienten oft schon vor Krankheitsmanifestation nachweisbar (präartikuläre Phase der RA). (2)

Eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der RA spielt die Hyperplasie des Synovialgewebes. Diese besteht histologisch aus makrophagenähnlichen Typ A-Synoviozyten und den fibroblastenähnlichen Typ B-Synoviozyten. (3) Die Proliferation der fibroblastenähnlichen Typ B-Synoviozyten könnte für diese Hyperplasie

verantwortlich sein. Diese Zellen sind zudem unmittelbar an der lokalen Destruktion des Knorpelgewebes beteiligt. (2)

Die Prävalenz der RA liegt bei Erwachsenen zwischen 0,5% und 1 % und steigt mit dem Lebensalter an. Generell sind Frauen von der RA dreimal häufiger betroffen als Männer. Die höchste Prävalenz zeigen Frauen im Alter von über 65 Jahren. Genetische Faktoren machen bis zu 50% des Risikos aus, eine RA zu entwickeln. (1)

1.1.2 Klinik und Sonderformen der Erkrankung

Die Rheumatoide Arthritis kann sich unterschiedlich klinisch manifestieren. Der Verlauf der Erkrankung ist sehr variabel und reicht von der milden, selbstlimitierenden Arthritis bis zur rasch progredienten, systemischen Inflammation mit hoher Morbidität und Mortalität. (3)

Zur Klinik der Erkrankung zählen unter anderem folgende spezifische bzw. unspezifische Symptome:

1. Unspezifische Allgemeinsymptome:

Dazu gehören Symptome wie Abgeschlagenheit, Schwäche, Krankheitsgefühl, Fieber, Gewichtsverlust und Depression. (3)

2. Artikuläre Manifestationen:

- *Polyarthritis*: Hierzu zählen vor allem Gelenkschwellung, Schmerz, Druckschmerzhaftigkeit und Steifigkeit (vor allem morgens länger als 1 Stunde anhaltend). Als frühe Zeichen gelten Gelenkerguss und Erythem, wohingegen ein verminderter Bewegungsumfang, Ankylosis sowie Subluxation erst später beobachtet werden. Im Verlauf entwickeln sich häufig starke Deformitäten an den betroffenen Gelenken.

Es gibt grobe Regeln, wie sich die Erkrankung auf die Gelenke ausbreitet. So wird die Verteilung als symmetrisch beschrieben, wobei distale Gelenke öfter betroffen sind als proximale. Außerdem wird ein häufigerer Befall der proximalen Interphalangealgelenke (PIP), Metacarpophalangealgelenke

(MCP)/Metatarsophalangealgelenke (MTP) und Handgelenke/Sprunggelenke als der Ellbogen/Knie und Schulter/Hüfte beschrieben. (3)

Der schmerzhafte Händedruck wird als Querdruckschmerz (= Gaenslen-Handgriff) bezeichnet, bei dem Druck auf die MCP-Gelenke ausgeübt wird. Der Handgriff fällt bei Patienten mit aktiver Synovitis üblicherweise positiv aus. (4)

- *Bursitis*: Entzündungen der Bursae sind durchaus bekannt bei Patienten mit RA. Die im Rahmen der RA häufig auftretenden Hüftschmerzen sind oft auf eine Bursitis trochanterica zurückzuführen. Studien haben gezeigt, dass lokale Steroidinjektionen die Schmerzen bei den Patienten lindern konnten. (5)

Weitere Stellen, an denen eine Bursitis lokalisiert sein kann, sind unter anderem an der Schulter die Bursa subcoracoidea, subacromialis und subdeltoidea. Am Ellbogen kann die Bursa olecrani betroffen sein sowie die Bursa poplitea in der Kniekehle oder die Bursa infrapatellaris oder praepatellaris am Kniegelenk. (6)

- *Tenosynovitis*: Sind auch die Sehnenscheiden von der Synovitis befallen, spricht man von einer Tenosynovitis. Diese kann an unterschiedlichen Lokalisationen auftreten: Bizepssehne, Karpaltunnel, Extensoren der Hand, Muskulus tibialis oder Muskulus peroneus. (6)

Die Tenosynovitis fällt bei vielen Patienten mit RA bei der Untersuchung der Gelenke auf. Die meisten der Patienten leiden auch an einer Schwellung in den Sehnenscheiden. Bei nahezu allen RA Patienten in einer Studie konnte eine gleichzeitige Gelenkschwellung nachgewiesen werden. (7)

- *Karpaltunnelsyndrom*: Darunter versteht man die Kompression des N. medianus unter dem Lig. carpi transversum. Es handelt sich dabei um die häufigste Kompression peripherer Nerven und die häufigste neurologische Störung an der Hand. (8) Diese äußert sich durch Parästhesien von Daumen-, Zeige- und Mittelfinger. Insbesondere nachts und bei Dorsalflexion der Hand kommt es zu Schmerzen im Kompressionsbereich. Bei schweren Verläufen kann es zu irreversibler Thenaratrophie und Sensibilitätsverlust im Versorgungsgebiet des N. medianus führen. (9)

Zu den mit Karpaltunnelsyndrom assoziierten Krankheitsbildern gehört neben entzündlichen Gelenkerkrankungen auch Diabetes. (10)

- *Sulcus-ulnaris-Syndrom*: Entzündliche Veränderungen am Ellbogengelenk können zur Kompression des Nervus ulnaris führen. Die Fossa olecrani stellt eine typische Lokalisation der Synovitis dar. (6)

- *Baker-Zyste*: Sie wird auch Poplitealzyste genannt und ist im Bereich der Kniekehle lokalisiert. Es handelt sich dabei genau genommen aber nicht um eine echte Zyste. Intraartikuläre Störungen, wie sie zum Beispiel bei der RA auftreten, spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Baker-Zyste. Ein Kniegelenkerguss sowie Synovitis können zu einem erhöhten Druck im Gelenkspalt führen, wodurch - über längere Zeit bestehend - es dazu kommen kann, dass die Gelenkkapsel am Ort des geringsten Widerstandes nachgibt. (11)

3. Extraartikuläre Organmanifestationen:

Die RA ist nicht nur auf die Gelenke beschränkt, sondern kann sich auch an anderen Organen manifestieren.

- *Haut (Rheumaknoten)*: Bei ca. 25% der Patienten kommt es zum Auftreten von Rheumaknoten. Diese stellen somit die häufigste extraartikuläre Manifestation der RA dar. Hierbei handelt es sich um Verhärtungen, die sich subkutan befinden. Die Häufigkeit dieser Knötchen korreliert direkt mit dem Titer des Rheumafaktors. Außerdem scheinen genetische Faktoren eine Rolle beim Auftreten der Rheumaknoten zu spielen. (12) RA Patienten mit Rheumaknoten haben zudem ein höheres Risiko, eine Vaskulitis zu entwickeln. (13)

Die Knoten entwickeln sich generell als späte Manifestation aktivierter Arthritiden, obwohl manche Knoten auch schon vorher entstehen können. Sie besitzen typischerweise die gleiche Farbe wie die Haut, können einzeln oder multipel auftreten und der Durchmesser reicht von weniger als 5 Millimeter bis mehrere Zentimeter.

Die Rheumaknoten liegen in der Tiefe der Subkutis und können an tiefer liegendes Gewebe, wie Periost, Sehnen oder beispielsweise Bursae anhaften. Es gibt aber auch frei bewegliche Knoten mit epidermaler Lage. Die meisten der Knoten sind fest und schmerzlos, aber diejenigen an Fußsohlen oder Handflächen können Beschwerden hervorrufen. Man findet sie allgemein am häufigsten an den Streckseiten der Gelenke.

Sie können aber auch an anderen Stellen auftreten: an Lunge, Pleura, Perikard, Sehnen, Synovia, Knochen, Stimmbänder, Peritoneum, Dura, Sklera, Nase, Ohren oder am Herz.

Histologisch zeigen die Rheumaknoten diskrete Granulome in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Diese werden wiederum durch Narbengewebe getrennt, welches kleine, vaskularisierte Inseln aus Lymphozyten, Plasmazellen und Histiocyten enthält. Aufkeimende Granulome bestehen aus neuen Kapillaren und es entsteht Granulationsgewebe umgeben von undifferenzierten Monozyten und Fibroblasten.

(12)

- *Nagelveränderungen*: Es kann zu abnormer Brüchigkeit und längsfaserigem Splittern der Nägel kommen (=Onychorrhhexis). Die Nägel von RA Patienten können auch periunguale Erytheme mit Teleangiektasien oder eine Ablösung der Nägel zeigen (=Onycholyse). (12)

- *Herz*: Perikarditis, Myokarditis sowie Veränderungen an den Herzklappen, durch beispielsweise Rheumaknoten, können mit einer RA assoziiert sein. (3)

- *Lunge*: Es findet sich eine leichte Häufung von Lungenfibrose oder Pleuraergüssen. Es kann zudem auch eine Entzündung des Krikoarytenoidknorpels entstehen. (3)

- *Leber*: Gelegentlich kann man eine Erhöhung der Konzentration der Aminotransferase nachweisen. (3)

- *Augen*: Bei den Augen kann es zu einer Keratokonjunktivitis sicca, einer Iritis sowie zu einer Episkleritis kommen. (3)

- *Nerven*: Hier kann es zu einer Mononeuritis, zu Nerveneinklemmungen als auch zu zervikaler Instabilität kommen. (3)

- *Hämatologisch*: Zu diesen Veränderungen zählen Anämie, Thrombozytose, Leukozytose und Lymphadenopathie. (3)

- *Gefäße*: An den Gefäßen können sich Vaskulitiden entwickeln. (3) Die systemische rheumatoide Vaskulitis (SRV) ist eine seltene, aber potentiell schwerwiegende systemische Manifestation der RA. Sie ist charakterisiert durch die Entwicklung einer nekrotisierenden Vaskulitis. Dabei können Blutgefäße jeglicher Größe betroffen sein,

von der Aorta bis zu den Kapillaren. Es kann zu einem ausgedehnten Organbefall kommen. Die Prognose der SRV gilt als schlecht. (14)

Mit RA assoziierte Vaskulitiden können verschiedene klinische Zeichen hervorrufen, wie zum Beispiel digitale Infarkte. Meist handelt es sich um ulzerierte Läsionen am medialen und lateralen Malleolus im Bereich der unteren Extremitäten mit nekrotisierender Vaskulitis der *mittelgroßen* Gefäße. Digitale Ulzera sind eher eine Komplikation des Raynaud-Phänomens, bei dem es zu episodischen Ischämien in den Fingern kommt. Dies ist jedoch bei der RA sehr selten. Allgemein stellt die digitale Vaskulitis eine seltene Manifestation der RA dar. (15)

Die Vaskulitis kann aber auch isoliert das periphere Nervensystem betreffen. In Biopsien findet man entzündliche Veränderungen der Gefäße an peripheren Nerven ohne eine systemische Beteiligung.

In Untersuchungen wurde die endgültige Diagnose einer Vaskulitis gestellt, wenn die endoneuralen oder epineuralen Gefäße Infarkte der Gefäßwand in Verbindung mit perivaskulärer oder transmuraler Infiltration durch Entzündungszellen wie Monozyten oder Leukozyten zeigten. (16)

4. Sicca-Syndrom:

Darunter versteht man eine starke Trockenheit der Augen sowie der Mundschleimhaut. Es handelt sich um eine chronische autoimmune Exokrinopathie und man bezeichnet diese auch als primäres Sjögren-Syndrom. (17)

Treten Xerophthalmie und Xerostomie in Verbindung mit der RA auf, spricht man vom sekundären Sjögren-Syndrom (sSS). Die Prävalenz des sSS bei RA Patienten variiert stark in Abhängigkeit von der geographischen Lage sowie der Dauer der RA. So zeigten Studien, dass sich bei 5% der RA Patienten das sSS klinisch manifestierte und 20% ein subklinisches sSS nachwiesen. (18)

Neben der weit verbreiteten RA mit ihren klassischen Symptomen existieren mehrere Sonderformen der RA, worauf im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird.

1. Caplan-Syndrom:

Dieses Syndrom ist gekennzeichnet durch eine seropositive RA sowie eine spezifische Form der Pneumokoniose. Es kommt hauptsächlich bei Arbeitern in Kohleminen vor, die Siliziumdioxid (Quarz) ausgesetzt sind. (19) Die Pneumokoniosen, zu denen die Silikose zählt, werden als Berufskrankheit anerkannt. (20)

2. Felty-Syndrom:

Das Felty-Syndrom gilt als extraartikuläre Manifestation einer jahrelang bestehenden schweren RA. Diese geht im Rahmen dieses Syndroms mit Splenomegalie, Hepatomegalie, Lymphadenopathie und Leukopenie einher. Mit der Zeit wurde die Leukopenie genauer definiert als Neutropenie. (21)

3. Alters-RA (LORA = late onset rheumatoid arthritis):

Diese Sonderform der RA entwickelt sich per definitionem nach dem 60. Lebensjahr und stellt die häufigste Ursache entzündlicher Synovitis bei älteren Erwachsenen dar. Die Prävalenz der LORA beträgt ca. 2% bei den über 65-Jährigen. Im Gegensatz zur klassischen Form der RA verläuft der Krankheitsbeginn hier akut. Die Patienten leiden unter schwerer Morgensteifigkeit. Betroffen sind vor allem Gelenke der oberen Extremitäten, wie Schultern, Handgelenke, MCPs und PIPs. Durch den gelegentlich polymyalgiformen Beginn mit schweren Myalgien muss differentialdiagnostisch an eine Polymyalgia rheumatica gedacht werden. Darüber hinaus kommt es bei den Patienten mit LORA zu einem extremen Anstieg der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG). (22)

4. Juvenile idiopathische/ rheumatoide Arthritis (JIA/ JRA):

Das Manifestationsalter dieser Sonderform liegt in der Regel bei unter 16 Jahren. Studien in Entwicklungsländern geben eine Prävalenz von 16-150/100.000 Kinder/ Jugendliche an. Die entzündliche Synovitis bei der JIA ist vergleichbar mit derjenigen bei der adulten Form der RA. Dabei entsteht der *Pannus* (Verdickung der Synovialis), welcher den Knorpel überwuchert, infiltriert und schließlich zerstört. (23)

Die JRA kann in drei verschiedene Kategorien unterteilt werden. Beim *systemischen* Verlauf kommt es zu Manifestationen wie hohem intermittierendem Fieber und

rheumatoiden Ausschlag. Beim *polyartikulären* Verlauf sind mehr als vier Gelenke von der Arthritis betroffen und beim *pauciartikulären* Verlauf sind vier oder weniger Gelenke – meistens initial das Knie - betroffen. Die frühe Diagnose der JRA sowie die Erkennung der drei unterschiedlichen Verlaufsformen ist wichtig, um Deformitäten, Erblindung und dem Tod vorzubeugen. (24)

In einer Studie entwickelten ungefähr 10 % der Kinder mit JRA eine Iridozyklitis. Diese Komplikation trat häufiger bei Patienten mit monoartikulärem und pauciartikulärem Verlauf auf als bei Patienten mit polyartikulärer Beteiligung. Die Iridozyklitis ist möglicherweise die Hauptursache für Schädigungen im Rahmen der JRA. Frühzeitige Erkennung und Therapie sind entscheidend, um permanenten Augenschäden bis zur Erblindung vorzubeugen. (25)

1.1.3 Komplikationen der Rheumatoiden Arthritis

Im Rahmen der RA kann es zu zahlreichen Komplikationen kommen, die unterschiedliche Organsysteme betreffen können.

Im Vordergrund stehen Funktionsverlust und Fehlstellung von Gelenken. Hierzu zählt man die sog. "Schwanenhalsdeformität" durch Überstreckung der Finger im PIP-Gelenk und Flexion im DIP-Gelenk. Eine weitere Fehlstellung stellt die sog. "Knopflochdeformität" dar. Hier kommt es zu einer Hyperextensionsfehlstellung des Endglieds bei zunehmender Beugekontraktur im PIP-Gelenk. (26)

Im Rahmen der RA kann sich auch eine ulnare Deviation der Finger entwickeln. Es ist bekannt, dass die Stellung der Schulter und des Ellbogens den Grad dieser Deviation beeinflussen können. (27)

Im Zuge der RA kann sich auch eine rheumatoide Spondylitis ausbilden. Die knöcherne Versteifung (Ankylosierung) von Gelenken bei der RA kann im Endstadium oftmals nicht von der Ankylosierenden Spondylitis unterschieden werden.

Die rheumatoide Spondylitis manifestiert sich hauptsächlich in der Zervikalregion und ist eine häufige Ursache für Instabilität und manchmal auch schwere Dislokationen. (28) So kann es an der Halswirbelsäule zur anterioren atlantoaxialen Subluxation

kommen. Je nach Lokalisation leiden die Patienten an neurologischen Defiziten und Myelopathien. (29)

Durch die atlantoaxiale Instabilität im Rahmen der RA kann es sogar zu einer potentiell lebensbedrohlichen Komplikation, der Invagination der Arteria basilaris mit Hirnstammkompression, kommen. (30)

Häufig können Nebenwirkungen der antirheumatischen Therapie beobachtet werden. Durch den Einsatz von NSAR steigt beispielsweise das Risiko für Magen- oder Duodenalulzera und deren Blutungen bis hin zur Darmperforation. (31) Auch eine Analgetikanephropathie kann hierdurch entstehen. (32)

Unter Einnahme von antiinflammatorisch wirkenden Steroiden kommt es gehäuft zum Auftreten von Infektionen. Andere mögliche Nebenwirkungen sind steroidinduzierter Diabetes und arterielle Hypertonie. (33)

Auffallend ist auch das gehäufte Auftreten maligner Erkrankungen, wie Non-Hodgkin-Lymphom, Hodgkin-Lymphom und Bronchialkarzinom. Diese sind teils durch die RA an sich und teils durch die jahrelange Einnahme von Immunsuppressiva/ Immunmodulatoren bedingt. (34)

Die RA ist die häufigste systemische Autoimmunerkrankung mit kardiovaskulärer Manifestation. Die kardiovaskuläre Erkrankung stellt die führende Todesursache bei RA Patienten dar. Endotheliale Dysfunktion führt zu verminderter Vasodilatation, sowie proliferativen und prothrombotischen Eigenschaften. (35) Herzinfarkt, Herzinsuffizienz und Schlaganfall zählen zu den kardiovaskulären Komplikationen. Neben den klassischen Risikofaktoren scheint hier v.a. die systemische Entzündung ursächlich zu sein. (36)

Generalisierte niedrige Knochendichte gilt als Komplikation der RA. So zeigte eine Studie ein zweifach höheres Auftreten von Osteoporose bei RA Patienten. Schwer davon abzugrenzen ist die Cortison-induzierte Osteoporose. (37)

1.1.4 Relevante Laborwerte und deren Aussagekraft

Im Rahmen der RA spielen unspezifische Entzündungswerte eine wichtige Rolle, da sie als Aktivitätszeichen gewertet werden können. Hierzu zählt man v.a. das CRP sowie die BSG. Zudem können im Blut auch immunologische Befunde erhoben werden: (3)

Ist der Rheumafaktor (RF) positiv, spricht man von einer seropositiven RA. Trotzdem können bis zu 50% der Patienten ein negatives Testergebnis nachweisen. (1)

An dieser Stelle ist anzumerken, dass der RF nicht spezifisch ist für die RA, da er auch bei mehreren anderen Erkrankungen positiv ist:

- Bei Gesunden während einer Immunantwort
- Bei Patienten mit unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen
- Bei chronischen (bakteriellen) Infektionskrankheiten

(12)

In der Serologie bestimmt man als zweiten relevanten Faktor die ACPA. Hier handelt es sich um einen IgG-Ak gegen citrulliniertes Peptid (synonym Anti-CCP-Ak). Dieser ist im Gegensatz zum RF hochspezifisch für die RA und kann interessanterweise schon Jahre vor dem Krankheitsbeginn nachgewiesen werden. Die Anti-CCP-Ak sind zudem über die Zeit stabil und werden mit der Gelenkdestruktion, dem Kennzeichen der RA, assoziiert. ACPA-Positivität geht mit einer schlechteren Prognose einher. (38)

Auf die Notwendigkeit dieser Laborparameter in Bezug auf die Diagnosestellung der RA wird im nächsten Abschnitt eingegangen.

Zur Diagnosestellung der RA dienen die neuen ACR-/EULAR-Klassifikationskriterien von 2010. Deren Ziel ist es, den Patienten eine frühzeitige Behandlung zu ermöglichen. (1)

Zuerst stellt sich die Frage, wer getestet werden soll: Patienten,

- 1) die an mindestens einem Gelenk eine klinische Synovitis (Schwellung) aufweisen
- 2) deren Synovitis durch keine andere Erkrankung erklärt werden kann

Die Klassifikationskriterien für die RA werden in vier Kategorien eingeteilt, in jeder Kategorie werden Punkte vergeben und zum Schluss die Summe der Punkte aller vier Kategorien gebildet. Hat der Patient ≥ 6 von maximal 10 erreichbaren Punkten, wird die Diagnose RA gestellt. (1)

Gelenkbeteiligung	Serologie	Akute Phase	Symptombdauer	Punkte
1 großes Gelenk	Neg. RF <i>und</i> neg. ACPA	Normales CRP <i>und</i> normale BSG	<6 Wochen	0
2-10 große Gelenke		Erhöhtes CRP <i>oder</i> erhöhte BSG	≥ 6 Wochen	1
1-3 kleine Gelenke	Niedertitrig pos. RF <i>oder</i> niedertitrig pos. ACPA			2
4-10 kleine Gelenke	Hochtitrig pos. RF <i>oder</i> hochtitrig pos. ACPA			3
>10 Gelenke (mit mindestens 1 kleinen Gelenk)				5

Tabelle 1: Klassifikationskriterien der Rheumatoiden Arthritis nach ACR/EULAR von 2010. (39)

1.1.5 Beurteilung der Krankheitsaktivität

Der Disease Activity Score (DAS28) ist der gebräuchlichste praxisrelevante Index zur Beurteilung der Krankheitsaktivität bei RA. Mit seiner Hilfe wird die Krankheitsaktivität von 28 Gelenken erhoben. Er beinhaltet:

- Anzahl druckschmerzhafter Gelenke
- Anzahl geschwollener Gelenke
- Entzündungsparameter (BSG oder CRP)
- Selbsteinschätzung des Patienten (VAS)

Anschließend wird der DAS28-Wert mithilfe folgender Formel berechnet: (1)

$$\begin{aligned}
 & \text{DAS28(BSG; CRP)} \\
 & = 0,56x\sqrt{\text{druckschmerzhaft e Gelenke}} + 0,28x\sqrt{\text{geschwollene Gelenke}} \\
 & + 0,70x \ln(\text{BSG; CRP}) + 0,014x \text{ Krankheitszustand (VAS)}
 \end{aligned}$$

und das Ergebnis wie folgt interpretiert:

DAS28 < 2,6	DAS28 ≥ 2,6 bis < 3,2	DAS28 ≥ 3,2 bis < 5,1	DAS28 ≥ 5,1
Klinische Remission	Niedrige Krankheitsaktivität	Moderate Krankheitsaktivität	Hohe Krankheitsaktivität

Tabelle 2: Interpretation der Krankheitsaktivität der Rheumatoiden Arthritis anhand des DAS28. (40)

1.1.6 Therapiemöglichkeiten

1. Allgemeinmaßnahmen

Die physikalische Therapie der RA enthält sowohl Hydro-, Elektro- und Bewegungstherapie als auch Krankengymnastik, Massagen und Ergotherapie. Der Vorteil dieser Methoden besteht darin, dass sie bei fachgerechter Anwendung keine Nebenwirkungen verursachen. (41)

Darüber hinaus findet bei RA Patienten auch die analgetisch wirkende Kryotherapie Anwendung. Nach fünf- bis zehninütiger Behandlung mit Eisbeuteln auf den schmerzhaften Gelenken, erfuhren die Patienten aus einer Studie eine unmittelbare Schmerzlinderung. (42)

2. Glucocorticoide

Bei aktiver RA werden diese temporär bis zum Wirkungseintritt der Basistherapeutika (DMARDs) verabreicht, was als sog. „bridging“ bezeichnet wird. (43) Viele Ärzte bevorzugen die Anwendung hoch dosierter Glucocorticoide (z.B. 200 mg i.v.) zu

Beginn der Erkrankung, um eine Remission herbeizuführen. Moderate bis hohe Dosierungen werden vor allem beim akuten Schub der RA eingesetzt. Im Gegensatz dazu bekommen Patienten längerfristig eine sog. „low-dose“ - Steroidtherapie. In der Regel gilt, dass Steroide Basistherapeutika nicht ersetzen können und längerfristig nicht höher als mit 7,5 mg Prednisolon/ Tag dosiert werden sollten. (44)

3. Basistherapie mit krankheitsmodifizierenden Mitteln (= DMARDs)

Der Wirkungseintritt der Basistherapeutika erfolgt erst verzögert nach Wochen bis Monaten. In diese Gruppe fallen einige Immunsuppressiva wie z.B. Methotrexat (MTX). Hierbei handelt es sich um einen relativ gut verträglichen und gut wirksamen Folsäureantagonist mit immunsuppressiver Wirkung. MTX gilt als Mittel der Wahl in der Primärtherapie. Um Nebenwirkungen wie Alopezie und Stomatitis vorzubeugen, wird die gleichzeitige Zufuhr von Folsäure empfohlen. Unter MTX-Einnahme empfiehlt sich außerdem die regelmäßige Kontrolle von Blutbild, Kreatinin und hepatischer Aminotransferase. (3)

Auch andere Immunsuppressiva finden Anwendung als DMARDs in der Therapie der RA: z.B. Azathioprin, Ciclosporin und Leflunomid. Die Kombination von MTX und Ciclosporin/ Leflunomid zeigt einen klaren Nutzen und weniger Nebenwirkungen als die Einnahme von MTX alleine. (3) Leflunomid kann als Reservemittel bei Versagen oder bei Kontraindikation von MTX eingesetzt werden. (1)

Neben den Immunsuppressiva werden noch weitere Medikamente in der Basistherapie angewandt. So ist Sulfasalazin indiziert bei leichtem, nicht erosiven Verlauf oder in Kombination mit anderen DMARDs. Dieselbe Indikation gilt auch für das Antimalariamittel Hydroxychloroquin. (1)

Zur symptomatischen Therapie der RA werden Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) wie zum Beispiel Aspirin und Ibuprofen eingesetzt, die jedoch keinen Effekt auf den Krankheitsverlauf haben. (1)

4. Biologika

Unter den zum Teil sehr kostspieligen Biologika versteht man rekombinant hergestellte Antikörper, Antikörperfragmente oder Konstrukte löslicher Rezeptoren,

durch die eine zielgerichtete Blockade entzündlicher immunologischer Vorgänge erreicht werden soll. (45)

Zu den Biologika zählen beispielsweise fünf TNF- α -Hemmer, ein Interleukin-1-Rezeptorantagonist (Anakinra), ein Interleukin-6-Rezeptorinhibitor (Tocilizumab), ein selektiver Hemmer der T-Zell-Kostimulation (Abatacept) und ein auf B-Zellen gerichteter Antikörper (*Rituximab*). (46)

Der orale JAK-Inhibitor Tofacitinib gehört ebenso zu den Biologika und findet Anwendung bei Patienten mit mittlerer bis schwerer Aktivität der RA. (1) Da die Signaltransduktion von IL-3 auch zum Teil über den JAK-STAT-Signalweg abläuft, führen JAK-Inhibitoren möglicherweise zu einer Hemmung des IL-3 Signalings. (47)

Durch den Einsatz von neuen Biologika hat sich die Therapie der RA deutlich erweitert, wobei hierunter jedoch zum Teil ausgeprägte Nebenwirkungen beobachtet werden können. Eine derartige Therapie ist in der Regel schweren Verlaufsformen vorbehalten. Sie stellen eine wirksame therapeutische Option bei Unverträglichkeit der konventionellen DMARDs dar. Zudem sind die Langzeiterfahrungen von Biologika noch deutlich begrenzt. Sorgfältige Patientenaufklärung und regelmäßige Kontrolluntersuchungen zur Überwachung während und nach der Therapie sind Voraussetzung. (46)

Eine häufige Nebenwirkung aller Biologika stellen Infektionen dar: Unter der Einnahme von TNF- α -Hemmern besteht ein erhöhtes Risiko für die Reaktivierung einer latenten Tuberkulose und opportunistische Infektionen, welches durch die Kombination mit Anakinra steigt. Bei Patienten, welche Tocilizumab einnehmen, kommt es gehäuft zu Pneumonien. Unter der Einnahme von Abatacept kann es zu schweren Infektionen, wie Pneumonie oder Sepsis mit letalem Verlauf kommen. Während der Einnahme von *Rituximab* können virale Infektionen reaktiviert werden, schwere Infektionen sind jedoch selten. (46)

Wirkstoff	Wirkprinzip
Abatacept	CTLA4-Ig-Fusionsprotein, Hemmung der T-Zell-Aktivierung
Adalimumab	TNF- α -Inhibitor
Anakinra	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
Certolizumab	TNF- α -Inhibitor
Etanercept	Fusionsmolekül aus löslichem TNF-Rezeptor, TNF- α -Inhibitor
Golimumab	TNF- α -Inhibitor
Infliximab	TNF- α -Inhibitor
Rituximab	Monoklonaler anti-CD20-Ak
Tocilizumab	Monoklonaler humanisierter Ak, der an löslichen und membrangebundenen IL-6-Rezeptor bindet und diesen blockiert
Tofacitinib	Januskinase-Inhibitor

Tabelle 3: Die gängigsten Biologika mit ihren Wirkungen. Aus Ruderman EM, Nola KM, Ferrell S, Sapir T, Cameron. Incorporating the treat-to-target concept in rheumatoid arthritis. *Journal of managed care pharmacy* : JMCP 2012; 18(9):1–18. (1)

5. Operative Verfahren

Vor allem für ältere Patienten kann eine Therapie durch aggressive Immunsuppression ein Problem sein. In diesen Fällen stellen operative Verfahren eine wichtige Therapieoption bei Gelenkschmerzen und -deformitäten dar. Zu den operativen Methoden der Therapie der RA zählen die Synovektomie, die rekonstruktive Chirurgie, die Arthroplastik, die Arthrodese und der rechtzeitige prothetische Gelenkersatz. Da bisher keine Heilung der RA möglich ist, werden diese Verfahren oftmals als ultima ratio in Betracht gezogen. (48)

6. Patientenbetreuung

Aufgrund der zum Teil ausgeprägten Schmerzsymptomatik und der zunehmenden Einschränkung der Mobilität aufgrund der Gelenkdestruktion spielen auch Rehabilitationsmaßnahmen, Patientenschulung, Psychoedukation sowie Selbsthilfegruppen eine wichtige Rolle in der Behandlung der RA. (49)

1.1.7 Zytokine

Die Ätiologie der RA ist noch nicht vollständig geklärt. Zentrale Bestandteile stellen jedoch proinflammatorische und somit erkrankungsfördernde Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF dar. (1) Ein möglicher therapeutischer Ansatz liegt in der Blockade dieser Zytokine (siehe Tab. 3).

Unter Zytokinen versteht man kleine lösliche Proteine, welche die interzelluläre Kommunikation zwischen Immunzellen vermitteln. Sie beeinflussen die Zellteilung, die Zelldifferenzierung und die Chemotaxis und besitzen darüber hinaus proinflammatorische oder anti-inflammatorische Wirkungen. (3)

TNF- α und IL-1 kommen in großen Mengen in der entzündeten Synovia und im entzündeten Synovialgewebe vor. Diese beiden scheinen synergistisch zu arbeiten, indem sie die Proliferation und die Produktion von Prostaglandinen fördern. Tierversuche deuten auf eine zentrale Rolle von TNF- α und IL-1 bezüglich Synovitis und Gelenkdestruktion hin. (3)

Die im Zuge der RA stattfindende Gelenkentzündung führt außerdem zur Produktion von IL-6 und dessen Rezeptor. Der IL-6 Rezeptor wird auf Effektorzellen exprimiert, welche die Inflammation verursachen und verlängern. (1)

Neben den bereits genannten Zytokinen wird auch IL-2 eine Rolle in der RA zugesprochen. IL-2 wird von aktivierten T-Helferzellen produziert und gilt als Wachstumsfaktor für T-Zellen. Eine verminderte Produktion von IL-2 durch Lymphozyten im Rahmen der RA konnte im peripheren Blut sowie in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden. (50)

Neben der T-Zell-Proliferation erhöht IL-2 auch die Aktivität von NK-Zellen und stimuliert das Wachstum sowie die Differenzierung von B-Zellen durch den IL-2 Rezeptor auf deren Oberfläche. IL-2 wird zudem eine Verstärkung der Zytotoxizität humaner Monozyten zugesprochen. (51)

In der Synovialflüssigkeit von Patienten wurden erhöhte Werte des löslichen IL-2 Rezeptors gemessen. Verlaufsuntersuchungen wiesen eine hohe Korrelation der Krankheitsaktivität mit der Höhe der gemessenen Werte für den IL-2 Rezeptor im

Serum nach. Diese Beobachtung könnte die Messung des IL-2 Rezeptors als zukünftigen klinischen Marker hervorheben.

Im Serum von Patienten mit seropositiver RA waren die durchschnittlichen Werte des IL-2 Rezeptors signifikant höher als in der gesunden Kontrollgruppe. Eine klinische Verbesserung wurde beim ausgeprägten Fall der Werte des IL-2 Rezeptors gemessen, während diese Werte wiederum vor klinischen Exazerbationen anstiegen.

In der Synovialflüssigkeit von Patienten mit aktiver RA wurde zudem eine hoch signifikante Korrelation des löslichen IL-2 Rezeptors mit IL-1 festgestellt. (51)

Auch IL-17 ist in der RA von zentraler Bedeutung. Es wird von aktivierten CD4⁺ T-Gedächtniszellen sezerniert. Die durch IL-17 induzierten Zellantworten gleichen denen von IL-1, weshalb IL-17 ein Beitrag zur Gelenkdestruktion zugesprochen wird. Die Wirkung von IL-17 auf das Knorpelgewebe wird mit Destruktion und mangelnder Reparatur sowie Abfall der Chondrozytenproliferation assoziiert. Darüber hinaus wird IL-17 als starker Stimulator der Knochenresorption durch Osteoklasten aufgrund der Synthese von PGE₂ beschrieben. (52)

Fibroblasten in der entzündlich veränderten Synovia von RA Patienten sezernieren eine große Menge Matrix zerstörender Metalloproteinasen (MMPs), welche Gewebeschäden hervorrufen. Die Konzentration von MMP-1 (Kollagenase) in der Synovialflüssigkeit von Patienten korreliert mit der Inflammation der Synovia.

Untersuchungen der Produktion von MMP-1 durch Synoviozyten zeigten eine 5-fache Erhöhung der spontanen MMP-1 Produktion in der Anwesenheit von IL-17. Eine Kombination von IL-17 mit IL-1 führte sogar zu einer 11,6-fachen Erhöhung der MMP-1 Produktion. (52)

Versuche am Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) an Mäusen zeigten 2009, dass auch IL-3 an der Entstehung der RA beteiligt ist.

Eine Gruppe von Mäusen bekam täglich anti-IL-3-Antikörper intraperitoneal (IP) injiziert. Diese IL-3 Blockade während des Erkrankungsbeginns senkte sowohl die Inzidenz der CIA als auch die klinische Schwere der Arthritis. In den Gelenken der behandelten Mäuse fand man deutlich weniger Monozyten, Basophile Granulozyten und CD11b⁺ Zellen (Monozyten und Neutrophile). Histologisch konnte eine erniedrigte

Proliferation der Synovia sowie geringere Knochendestruktion nachgewiesen werden. Zudem fand sich eine Reduktion der Antikollagen-Antikörper im Plasma und der Basophilen Granulozyten im peripheren Blut.

Im Gegensatz dazu beeinflussten IP-Injektionen von IL-3 in der Anfangsphase der RA den Krankheitsverlauf negativ. Die Inzidenz war deutlich erhöht und die Arthritis nahm einen schwereren Verlauf. Bei den behandelten Mäusen fanden sich vermehrt Antikollagen-Antikörper im Plasma, vermehrt Basophile Granulozyten im peripheren Blut sowie deutlich erhöhte IL-6 Plasmaspiegel. (53)

In diesem Modell wurde IL-3 systemisch von CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit kostimulatorischer CD11b⁺ Zellen in der Milz produziert sowie lokal von Zellen im Synovialgewebe. IL-3 wirkt aber nicht nur auf Monozyten und Neutrophile, die zusammen die Mehrheit der infiltrierenden Zellen in den entzündeten Gelenken darstellen, sondern auch auf Basophile Granulozyten. (53) Die Aktivierung dieser Zellpopulation durch Antikörper gegen IgE führte zu einer ausgeprägten Verschlechterung der CIA. (54) Durch IL-3 stimulierte Basophile Granulozyten und Monozyten setzen arthritsfördernde Zytokine wie IL-6 oder IL-1 frei. (53)

1.2 Interleukin - 3

Interleukin-3 (IL-3) ist ein von T-Zellen entstammendes Zytokin mit einem breiten Wirkspektrum auf Differenzierung und Wachstum hämatopoetischer Vorläuferzellen. (55) So ist IL-3 an der Produktion und an der Proliferation sowie am Überleben von Leukozyten beteiligt. Das Zytokin kann dadurch unter anderem die Inflammation im Rahmen einer Sepsis verstärken, was die Rolle des IL-3 im Rahmen entzündlicher Vorgänge unterstreicht. (56) IL-3 entfaltet seine Wirkung durch Beeinflussung verschiedener Zellarten. Dazu gehören Basophile Granulozyten, Mastzellen, Monozyten/Makrophagen (53), Neutrophile Granulozyten (56) und Lymphozyten. (57) Seine Wirkung entfaltet IL-3 jeweils durch die Bindung an den aus zwei Untereinheiten bestehenden IL-3 Rezeptor. (53)

1.2.1 Struktur

Interleukin-3 ist ein 20 - 26 kDa großes Zytokin. (47) Genauer handelt es sich dabei um ein Glykoprotein-Zytokin, welches eine Rolle bei der hämatopoetischen Reaktion auf infektiöse, immunologische und inflammatorische Stimuli spielt. (58) IL-3 gehört, wie IL-5 und GM-CSF, zu den an der Hämatopoese beteiligten Zytokinen, bestehend aus vier α -Helices. (53)

1.2.2 IL-3 produzierende Zellen

Es gibt einige verschiedene Zellpopulationen, denen die Fähigkeit zur IL-3 Produktion zugeschrieben wird. Überwiegend wird dieses Zytokin jedoch von aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten gebildet. (47) Allerdings ist noch nicht viel über die Regulation der IL-3 Sekretion in T-Zellen bekannt. (53)

Darüber hinaus gehören auch aktivierte Mastzellen zu den IL-3 produzierenden Zellen. Die Bindung von IgE an den hochaffinen IgE-Rezeptor auf Mastzellen und Basophilen Granulozyten befähigt diese Zellen zu einer spezifischen Reaktion auf Allergene. Ein derartiger Kontakt führt zur Aktivierung der Mastzellen, was in der Sekretion von IL-3 resultiert. (59)

Basophile Granulozyten besitzen bedeutende immunregulatorische Funktionen, die sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort beeinflussen. Basophile Granulozyten leisten durch die Produktion verschiedener Zytokine auch einen Beitrag zur Hämatopoese. Zu den von ihnen sezernierten Zytokinen zählen IL-3, IL-4, IL-13, VEGF, GM-CSF sowie IL-6. (60)

Ebenso sollen aktivierte NK-Zellen zur IL-3 Produktion fähig sein. (55) Darüber hinaus konnten auch bereits B-Zellen als Quelle von IL-3 identifiziert werden. Diese scheinen eine besondere Rolle im Rahmen der Sepsis zu spielen, was in einem Mausmodell gezeigt werden konnte. (56)

1.2.3 Effekte von IL-3

Interleukin-3 hat neben hämatopoetischen Wirkungen auch immunmodulatorische Effekte. (61) Es wirkt proliferationsfördernd auf CD34⁺ hämatopoetische Vorläuferzellen im Knochenmark. (53) Darüber hinaus bedingt es das Wachstum und die Differenzierung vieler Blutzellen. Dazu gehören Neutrophile Granulozyten, Eosinophile Granulozyten, Basophile Granulozyten (62), Megakaryozyten, Makrophagen, lymphoide und erythroide Zellen. Aufgrund seiner Wirkungen auf mehrere unterschiedliche Zelllinien wird IL-3 auch als Multi-CSF bezeichnet. (47)

1.2.3.1 Wirkung auf Basophile Granulozyten und Mastzellen

Basophile Granulozyten und Mastzellen leiten sich von CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen ab. (63) Obwohl sich diese beiden Zellpopulationen aus unterschiedlichen Zelllinien innerhalb des hämatopoetischen Systems entwickeln, (64), teilen sie auch bestimmte Eigenschaften. Beide Zellarten exprimieren den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI, produzieren T_H2-Zytokine und setzen Histamin frei. (63) Basophile Granulozyten stellen mit weniger als 1% den geringsten Anteil der Leukozyten im peripheren Blut dar. (60)

Während sich Basophile Granulozyten bereits im Knochenmark differenzieren und anschließend als reife Zellen im peripheren Blut zirkulieren, kommen reife Mastzellen nur im Gewebe vor. (63)

Die Antigen-induzierte Vernetzung zweier IgE-Moleküle aktiviert Basophile Granulozyten und Mastzellen gleichermaßen und führt zur Freisetzung der zellspezifischen Mediatoren. So setzen Mastzellen vorwiegend Histamin frei, aber auch Leukotriene, Chemokine und Zytokine wie TNF-α, IL-4, IL-3, GM-CSF, IL-5 und IL-6. Zu den von Basophilen Granulozyten produzierten Mediatoren gehören neben Histamin und Leukotrienen auch verschiedene Zytokine, wie IL-4, IL-13 (63), sowie IL-3, IL-6 und GM-CSF. (60)

Die beiden Zellpopulationen unterscheiden sich in der Expression charakteristischer Oberflächenmarker. Reife Basophile Granulozyten exprimieren bedeutende Mengen an CD123, der α -Untereinheit des IL-3 Rezeptors. Dies ist bei den Mastzellen nicht der Fall. (64)

CD203c gilt als Aktivitätsmarker humaner Basophiler Granulozyten (65) und Mastzellen. (66) Eine Aktivierung führt zur Hochregulation dieses Markers auf der Zelloberfläche und erreicht wieder den Normbereich während Remission. (60)

Mit IL-3 inkubierte murine Basophile Granulozyten haben das Potential, als Antigenpräsentierende Zellen (APCs) zu fungieren. Sie exprimierten in geringem Maße MHC II und waren dadurch fähig, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und anschließend an der Oberfläche den CD4⁺ T-Zellen zu präsentieren. Die murinen Basophilen Granulozyten im IL-3-haltigen Medium produzierten außerdem reichlich IL-4, IL-6 und IL-13. (67) Bei humanen Basophilen Granulozyten führte rekombinantes IL-3 zur Freisetzung von Histamin. (68)

In IL-3 Knockoutmäusen zeigte sich die basale Hämatopoese nicht gestört. Allerdings war die Infektabwehr gegenüber Parasiten reduziert. Dies ist auf eine signifikant erniedrigte Zahl an Basophilen Granulozyten und Mastzellen zurückzuführen. (69)

1.2.3.2 Wirkung auf Monozyten/Makrophagen und Neutrophile Granulozyten

Makrophagen und Neutrophile Granulozyten stammen von gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen ab. Die im Blut zirkulierenden Monozyten können ins Gewebe einwandern, wo sie sich zu Makrophagen ausdifferenzieren. Sie sind Bindeglieder zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. So präsentieren sie anschließend an die Phagozytose die Antigenpartikel auf ihrer Oberfläche, setzen Zytokine und Chemokine frei und aktivieren so T-Effektorzellen.

Bei den Neutrophilen Granulozyten handelt es sich um Phagozyten. Sie stellen die Hauptgruppe der Leukozyten im humanen peripheren Blut dar. (70)

Durch Versuche an Mäusen fand man 2015 heraus, dass IL-3 eine wichtige Rolle bei der Sepsis spielt. Monozyten und Neutrophile produzieren IL-1 β , IL-6 und TNF- α , welche den Zytokinsturm während des septischen Schocks auslösen.

Wildtypmäuse entwickelten nach der CLP (ein Modell polymikrobieller Sepsis) eine Neutrophilie sowie inflammatorische Monozytose, während diese Zellzahlen bei IL-3 Knockoutmäusen relativ unverändert blieben. Da die intrazellulären Reservoirs der drei Zytokine bei beiden Mäusen gleich groß waren, ist die niedrigere Mortalitätsrate durch Sepsis bei den IL-3 Knockoutmäusen auf die geringere Anzahl an Monozyten und Neutrophilen zurückzuführen sowie auf den ausbleibenden Zytokinsturm.

Beim Menschen mit Sepsis wirkte sich die Konzentration von IL-3 im Plasma auf das Überleben aus. Eine IL-3 Konzentration von > 89,4 pg/ml wirkte sich im Vergleich zu niedrigeren Werten signifikant schlechter auf die Prognose der Patienten aus. (56)

IL-3 verursacht bei Monozyten/Makrophagen eine hochregulierte Expression von MHC II und verstärkt die Lipopolysaccharid-induzierte Sekretion von IL-1. Zusammen mit IL-4 oder Interferon- β fördert IL-3 die Differenzierung von Monozyten in Dendritische Zellen, eine weitere Gruppe von APCs. (53)

Mitunter wurde die Differenzierung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (71) und Monozyten zu Zellen, die in Morphologie und Funktion Osteoklasten gleichen, unter dem Einfluss von IL-3 beschrieben. (72)

1.2.3.3 Wirkung auf Lymphozyten (B- und T-Zellen)

Lymphozyten sind Zellen des adaptiven Immunsystems und vermitteln humorale sowie zelluläre Immunantworten. Sie werden unterteilt in B-, T- und NK-Zellen. B-Zellen sind nach ihrer Differenzierung in Plasmazellen zur Antikörperproduktion fähig. Man unterscheidet mehrere Typen von T-Effektorzellen. CD8⁺ zytotoxische T-Zellen erkennen Antigene, die auf MHC I -Molekülen präsentiert werden und töten Zellen, die mit Viren oder anderen Krankheitserregern infiziert sind. Über MHC II-Moleküle präsentierte Antigene werden von CD4⁺ T-Helferzellen erkannt, welche B-Zellen aktivieren sich zu differenzieren und Immunglobuline zu bilden. Die CD4⁺

regulatorischen T-Zellen hemmen T-Zell-Reaktionen und unterstützen somit die Kontrolle der Immunantwort.

NK-Zellen gelten als Teil des angeborenen Immunsystems. Sie erkennen anormale Zellen, wie Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen, und töten diese. (70)

CD4⁺ T-Lymphozyten gelten als die Hauptquelle von IL-3. (47) *In vitro* wird eine chemotaktische Wirkung von IL-3 auf humane Lymphozyten beschrieben (57) und es fördert die Differenzierung unreifer B-Vorläuferzellen in reife, Antikörper produzierende B-Zellen. (73)

1.2.4 IL-3 Rezeptor

Der IL-3 Rezeptor ist Teil der gp140-Familie der Zytokinrezeptoren, zu der auch der IL-5 Rezeptor und der GM-CSF Rezeptor gehören. Bei den Rezeptoren dieser Gruppe handelt es sich um Heterodimere. So ergibt sich die Zusammensetzung des IL-3 Rezeptors aus einer 60-70 kDa umfassenden α -Untereinheit und einer β -Untereinheit von 130-140 kDa. (47)

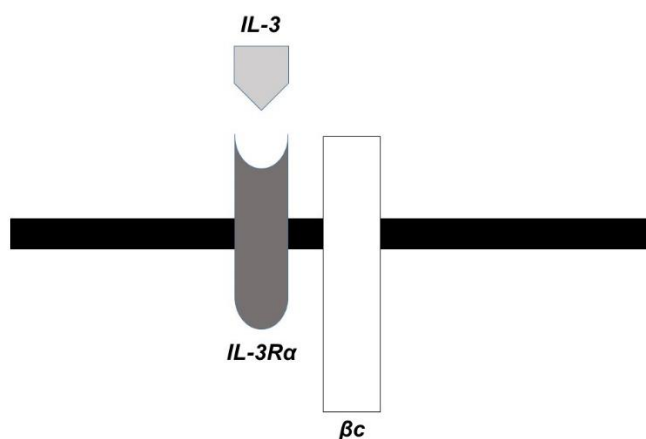


Abbildung 1: Struktur des IL-3 Rezeptors adaptiert an Adachi et al. 1998 (74)

Interleukin-3 bindet an eine spezifische α -Untereinheit des Rezeptors (IL-3 Rezeptor α [IL-3R α]), während die Signaltransduktion über die β -Untereinheit, β_c , des Rezeptors erfolgt. Die β -Untereinheit ist alleine nicht fähig, Zytokine zu binden. (75)

Die IL-3 Wirkung wird über mehrere Signaltransduktionsmoleküle wie JAK2-STAT, MAP Kinasen oder PI-3 Kinasen vermittelt. (47)

Während die α -Kette des IL-3 Rezeptors (IL-3R) spezifisch für IL-3 ist, binden an die β -Kette auch IL-5 und GM-CSF (55), da diese für alle Rezeptoren dieser Familie identisch ist. (47)

Dieser aus α - und β -Kette zusammengesetzte, hochaffine Rezeptor findet sich vorwiegend auf myeloischen Zellen und einigen CD19⁺ B-Lymphozyten, nicht jedoch auf T-Lymphozyten. (76) Da offensichtlich die von myeloischen Stammzellen abgeleiteten Zellen aus dem peripheren Blut beide Rezeptor-Untereinheiten exprimieren, wurden auch die frühen Vorläuferzellen auf die IL-3 Rezeptor-Expression untersucht. Hierzu wurden CD34⁺ hämatopoetische Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut und dem Knochenmark isoliert. Die CD34⁺ Zellen exprimierten ebenso die α -Kette und die β -Kette des IL-3 Rezeptors. Wie in den anderen hämatopoetischen Zellen wurde auch hier die α -Untereinheit stärker exprimiert als die β_c -Untereinheit. (76)

Die Bindungsaffinität von humanem IL-3 an die α -Untereinheit des humanen IL-3 Rezeptors ist mit einer Dissoziationskonstante von rund 100 nmol/l äußerst schwach. Jedoch führt die Formation eines Heterodimers aus den beiden Untereinheiten, α und β , zur Ausbildung eines hochaffinen Rezeptors. (76)

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Am Tiermodell wurde gezeigt, dass sich IL-3 in der Frühphase der Rheumatoiden Arthritis negativ auf die Erkrankung auswirkt. Eine IL-3 Blockade mithilfe monoklonaler Antikörper zu diesem Zeitpunkt milderte die Schwere der Krankheit und senkte die Inzidenz. (53)

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob Patienten mit Rheumatoider Arthritis im Vergleich zu gesunden Probanden unterschiedliche IL-3 Konzentrationen im peripheren Blut aufweisen sowie gegebenenfalls dessen Effekte nachzuweisen. Begleitend wurde die Korrelation der IL-3 Rezeptor-Expression auf verschiedenen Zelltypen mit der Stärke der Krankheitsaktivität untersucht. IL-3 sollte als möglicher Angriffspunkt neuer therapeutischer Mittel dargestellt werden.

Da das Zytokin IL-2 einen starken Zusammenhang mit der Aktivierung von Immunzellen sowie der Steigerung der Zytotoxizität von Immunzellen zu haben scheint (51) bzw. das Zytokin IL-17 mit der Gelenkdestruktion und Knochenresorption in Verbindung gebracht wird (52), wird auf diese beiden zudem ein besonderes Augenmerk gelegt.

Ziel der Arbeit sollte es sein, die mögliche Quelle dieser Zytokine ausfindig zu machen und zu sehen, ob die Menge der IL-2, IL-3 bzw. IL-17 produzierenden Zellen mit der Krankheitsaktivität der Rheumatoiden Arthritis korreliert. Da sowohl IL-2 (50), IL-3 (47) als auch IL-17 (52) von aktivierten T-Zellen produziert werden, sollte auch auf die Differenzierung von CD4⁺ und CD8⁺ IL-2, IL-3 bzw. IL-17 produzierenden T-Zellen abgezielt werden. So sollte auch die Anzahl aktivierter CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut gemessen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Laborgeräte und – materialien

2.1.1 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Brutschränke BBD 6220	Thermo Scientific, Heidelberg
Durchflusszytometer FACSCanto II	BD Biosciences, Heidelberg
Durchlichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Infinite M200 PRO multimode microplate reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
Kryobox	Nalgene, Rochester, USA
Pipetten (P10, P20, P100, P200, P1000)	Gilson, Bad Camberg
Pipetten (Mehrkanalpipette: P25, P100, P200, P300)	Brand, Wertheim
Pipetten (Multipette plus)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy acu	ISB Integra Biosciences, Chur, Schweiz
Pipettierhilfe Pipetus Akku	Hirschmann, Eberstadt
Schüttelgerät Heidolph REAX 2000	Heidolph, Schwabach
Schüttelgerät "Vortex-Genie 2"	Scientific Industries, San Diego, USA
Sterilbank Jouan MSC 12	Thermo Scientific, Hanau
Vortexzentrifuge Combi-Spin	A. Hartenstein, Würzburg
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn
Wasserbad	GFL, München
Zentrifuge (Centrifuge 5417 R)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (Megafuge 16 R)	Thermo Scientific, Hanau

Tabelle 4: Geräte

2.1.2 Glas- und Plastikware

Glas – und Plastikware	Bezugsquelle
Abdeckfolien für Mikrottestplatten	Roth, Karlsruhe
ELISA- Platte F96 Maxisorp	Thermo Scientific, Heidelberg
Flüssigkeitsreservoir (55 ml)	Roth, Karlsruhe
Kryoröhrchen (1 ml)	Nalgene, Rochester, USA
Neubauer Zell-Zählkammer (Einmalnutzung)	Brand, Wertheim
Neubauer Zell-Zählkammer (wiederverwendbar)	Brand, Wertheim
Parafilm	Sigma Aldrich, Steinheim
Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (mit Filter: 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml)	Biozym, Oldendorf
Pipettieraufsätze für Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Polystyrolröhrchen für Durchflusszytometer (5 ml)	BD Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten Rundboden 96-Well	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht; BD Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich

Tabelle 5: Glas- und Plastikware

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Reaktionsmedien

Chemikalie	Bezugsquelle
AccuCheck Counting Beads für Durchflusszytometrie (Zählpartikel)	Invitrogen, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA) (Fraktion V)	Sigma Aldrich, Steinheim
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS)	Sigma Aldrich, Steinheim
FACSLysing Solution, FACSClean, FACSFlow, FACSRinse	BD Biosciences, Heidelberg
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Natriumchloridlösung (NaCl-Lösung)	Roth, Karlsruhe
Permeabilization Wash Buffer (10x)	BioLegend, Fell
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Roth, Karlsruhe
Tetramethylbenzidin (TMB Substrate Set)	BioLegend, Fell
Trypanblaulösung	Sigma Aldrich, Steinheim
Tween 20	Sigma Aldrich, Taufkirchen

Tabelle 6: Chemikalien

2.1.4 Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze

Zellkulturmedien und -zusätze	Bezugsquelle
Fetales Kälberserum (FCS Gold, hitzeinaktiviert ½ h, 56 °C)	PAA, Cölbe
RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Medium 1640	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Streptomycin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 7: Zellkulturmedien und -zusätze

2.1.5 Medien, Lösungen, Puffer

2.1.5.1 ELISA

IL-3 ELISA:

Lösung	Inhaltsstoffe
Block- und Verdünnungspuffer	1 % BSA in D-PBS
Coating-Puffer	5 µg/ml Klon 13.4.4 in D-PBS
Entwicklungslösung	TMB Substrate Set (BioLegend, Fell)
Stopplösung	12,5 % H ₂ SO ₄ (Schwefelsäure)
Waschpuffer	0,05 Vol.- % Tween 20 in 1x PBS
10x PBS (wurde für Waschpuffer 1:10 verdünnt)	11,5 g Na ₂ HPO ₄ , 80g NaCl, 2 g KH ₂ PO ₄ , 2 g KCl

Tabelle 8: Lösungen und deren Inhaltsstoffe für den IL-3 ELISA

Kontroll ELISA:

Lösung	Inhaltsstoffe
Block- und Verdünnungspuffer	1 % BSA in D-PBS
Coating-Puffer	5 µg/ml Klon11.14.6 in D-PBS
Entwicklungslösung	TMB Substrate Set (BioLegend, Fell)
Stopplösung	12,5 % H ₂ SO ₄ (Schwefelsäure)
Waschpuffer	0,05 Vol.- % Tween 20 in 1x PBS
10x PBS (wurde für Waschpuffer 1:10 verdünnt)	11,5 g Na ₂ HPO ₄ , 80g NaCl, 2 g KH ₂ PO ₄ , 2 g KCl

Tabelle 9: Lösungen und deren Inhaltsstoffe für den Kontroll ELISA

2.1.5.2 Zellkulturmedien

Kulturmedium für PBMCs	500 ml RPMI Medium 1640, 10 % FCS (50 ml)
Einfriermedium für PBMCs	50 ml FCS, 20 % DMSO (10 ml)
Standardmedium für PBMCs	500 ml RPMI Medium 1640, 10 % FCS (50 ml), 5 ml Penicillin/Streptomycin-Stammlösung, 5 ml L-Glutamin

Tabelle 10: Zellkulturmedien

2.1.6 Zytokine, Antikörper und Enzyme

Zytokin/Antikörper/Enzym	Bezugsquelle
Anti-Human CD3 (Klon OKT3)	eBioscience, San Diego, USA
Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors) (500x)	eBioscience, San Diego, USA
Coat Klon 11.14.6	AG Mack
Coat Klon 13.4.4	AG Mack
Detection Klon 11.14.6-HRP	AG Mack
Mouse IgG1kappa isotype control (Klon MOPC-21)	BioXCell, West Lebanon, USA
Rekombinantes human IL-3 (carrier-free)	BioLegend, Fell

Tabelle 11: Zytokine, Antikörper und Enzyme

2.1.7 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Konjugat	Klon	Bezugsquelle
CD3	APC-Cy7	SK7	eBioscience, San Diego, USA
CD4	APC	RPA-T4	BioLegend, Fell
CD4	V500	RPA-T4	BD Biosciences, Heidelberg
CD8	PE-Cy7	SK1	eBioscience, San Diego, USA
CD8	PerCP-Cy5.5	RPA-T8	eBioscience, San Diego, USA
CD11b	FITC	M1/70	BioLegend, Fell
CD14	eFluor450	61D3	eBioscience, San Diego, USA

CD16	APC	3G8	BioLegend, Fell
CD19	eFluor450	HIB19	eBioscience, San Diego, USA
CD116	FITC	4H1	eBioscience, San Diego, USA
CD123	PE-Cy5	9F5	BD Biosciences, Heidelberg
CD131	PE	1C1	eBioscience, San Diego, USA
CD193 (CCR3)	APC-Cy7	5E8	BioLegend, Fell
CD203c	PE	NP4D6	BioLegend, Fell
HLA-DR	APC	G46-6	BD Biosciences, Heidelberg
IL-2	PE-Cy7	MQ1-17H12	eBioscience, San Diego, USA
IL-17	FITC	eBio64DEC17	eBioscience, San Diego, USA
IL-3	PE	Klon-13	AG Mack

Tabelle 12: Humane Antikörper für die Durchflusszytometrie

2.1.8 Analyse- und Bearbeitungsprogramme

Programm	Bezugsquelle
BD FACSDiva v6.1.3	BD Biosciences, Heidelberg
i-control™	Tecan, Männedorf, Schweiz
Microsoft Excel	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Word	Microsoft, Redmond, USA

Tabelle 13: Analyse- und Bearbeitungsprogramme

2.2 Methoden

2.2.1 Patientenrekrutierung und Gewinnung des Probenmaterials

Im Zeitraum von April 2014 bis April 2015 wurden Patienten rekrutiert. Zu den Einschlusskriterien zählte die sicher gestellte Diagnose einer RA. Es gab keine Beschränkung bezüglich des Patientenalters bzw. der Erkrankungsdauer. Patienten, welche im Zeitraum der Rekrutierung mehrmals bzw. zu unterschiedlichen Zeitpunkten erschienen, wurden als verschiedene Patienten gewertet. Grund war, dass die Krankheitsaktivität des gleichen Patienten zu einem anderen Zeitpunkt oder nach inzwischen stattgefundener Therapie eine andere sein kann und man dadurch auch andere Ergebnisse im Blut erwartete. In der Studie befinden sich somit insgesamt 154 Patienten, davon 112 Frauen und 42 Männer im Alter zwischen 21,8 und 83,8 Jahren. Das durchschnittliche Alter der Patienten beträgt 56,1 Jahre.

Ausschlusskriterien der Studie waren andere zusätzliche chronisch-entzündliche Erkrankungen wie z.B. CEDs (M.Crohn, Colitis ulcerosa), Psoriasis vulgaris, Systemischer Lupus erythematodes (SLE), Spondylitis ankylosans, Autoimmunvaskulitis, Gichtarthritis, mikroskopische Polyangiitis oder Polymyalgia rheumatica. Außerdem ausgeschlossen wurden Patienten, die an einer Monozytose, Leukopenie oder an einem akuten Infekt litten.

Zusätzlich zu den RA Patienten wurden im selben Zeitraum auch Proben von gesunden Kontrollen gesammelt. Hiervon befinden sich insgesamt 44 Probanden in der Studie, darunter 31 Frauen und 13 Männer im Alter von 19,6 bis 78,3 Jahren. Das durchschnittliche Alter der Probanden beträgt hier 47,8 Jahre. Ausschlusskriterien für die Probanden dieser Gruppe waren ebenso chronisch-entzündliche Erkrankungen wie z.B. Multiple Sklerose (MS), Psoriasis vulgaris, Colitis ulcerosa oder Polycythaemia vera.

Von allen Probanden, die sich dazu bereit erklärt haben, an der Studie teilzunehmen, wurde nach ausführlicher Aufklärung über die Untersuchung (Blutentnahme) sowie den Studienablauf eine Einverständniserklärung gefordert.

Im Rahmen des ambulanten Aufenthaltes wurden den Probanden circa 15 – 20 ml peripheres Vollblut in ein EDTA-Röhrchen entnommen, welches noch am selben Tag in das Forschungslabor transportiert und dort verarbeitet wurde. Gekühlt wurden die Proben bei 4°C im Kühlschrank.

2.2.2 Plasmagewinnung

Plasma ist der flüssige Bestandteil des Blutes. Es besteht aus Wasser, Elektrolyten und den Plasmaproteinen. (70)

Man erhält es am einfachsten durch die Zentrifugation von Vollblut. Dazu wurden 2 ml Vollblut aus den EDTA-Röhrchen entnommen und anschließend bei 2500 rpm bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde danach abgenommen und in Cups à circa 250 µl aliquotiert, um anschließend bei – 20°C weggefroren zu werden.

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

2.2.3 Gewinnung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aus Vollblut

Als PBMCs bezeichnet man periphere mononukleäre Blutzellen. Hierzu gehören sowohl Lymphozyten als auch Monozyten. Es handelt sich um einkernige Zellen mit einem rundlichen, im Fall der Monozyten nierenförmigen, Zellkern. (70) Zu den Lymphozyten werden die B-Lymphozyten, die T-Lymphozyten sowie die Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) gezählt. (70)

Lymphozyten des menschlichen Blutes kann man am leichtesten mithilfe der sogenannten Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation isolieren. Hierbei nutzt man die Tatsache, dass die Dichte mancher Zellpopulationen größer ist als die des Mediums, was zum Ausfallen eines Zellpellets am Boden des Behälters führt. Dieses Pellet enthält in der Regel die Erythrozyten, die meisten Granulozyten sowie abgestorbene Zellen.

Die zu isolierenden PBMCs reichern sich an der Phasengrenze in einer Interphase an und liegen somit zwischen dem Plasma-Phosphatpuffer-Gemisch und dem Ficoll-Paque. (77)

Das humane EDTA-Blut wurde zunächst im Verhältnis 1:2 mit sterilem PBS verdünnt. In ein neues 50 ml Falcon wurden dann 10 ml der gebrauchsfertigen Ficoll-Lösung vorgelegt und danach vorsichtig mit je 20 ml der Probe überschichtet. Im nächsten Schritt wurden die Falcons bei 1500 rpm bei 21°C für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert.

Nach der Dichtezentrifugation konnte man das Plasma-Phosphatpuffer-Gemisch bis auf 1 cm absaugen und dann den weißlichen Ring der Interphase, in der sich die mononukleären Zellen angesammelt haben, vorsichtig mit einer Pipette abnehmen und in ein neues 50 ml Falcon überführen. Die Zellen wurden danach einmal mit sterilem PBS gewaschen und bei 1500 rpm bei 4°C für 7 Minuten zentrifugiert.

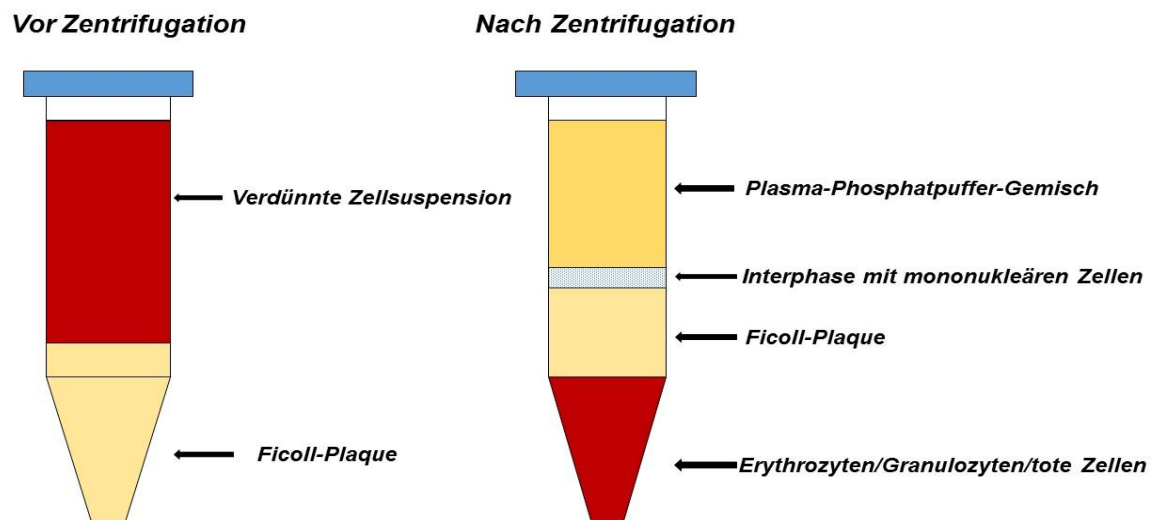


Abbildung 2: Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation

2.2.4 Kultivierung und Lagerung von eukaryoten Zellen

- Einfrieren der Zellen: Nach dem Waschschrift und der Zentrifugation bei 1500 rpm bei 4°C für 7 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen im darauffolgenden Schritt in 2,5 ml RPMI 1640 Medium + 10% FCS resuspendiert. Als nächstes wurden noch 2,5 ml des Einfriermediums hinzugegeben und die Suspension je Probe auf insgesamt 5 Kryoröhrchen à 1 ml aliquotiert.

Um die Entstehung von Eiskristallen während des Einfriervorganges zu vermeiden, wurden die Kryoröhrchen mit den Zellen zunächst in Kryoboxen mit einer Abkühlrate von 1°C pro Stunde auf – 80°C gelagert. 24 Stunden später wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff mit einer Temperatur von circa – 200°C überführt.

- Auftauen der Zellen: Um eine Zellkultur anzusetzen wurden die benötigten Zellen aus flüssigem Stickstoff entnommen und für circa 2 – 4 Minuten im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Pro Probe wurde jeweils ein 15 ml Falcon mit warmem RPMI 1640 Medium + 10 % FCS befüllt und der aufgetaute Inhalt der Kryoröhrchen darin überführt. Die Proben wurden dann bei 1500 rpm bei 4°C für 7 Minuten zentrifugiert und der Überstand anschließend abgesaugt. Das Zellpellet wurde im nächsten Schritt in 500 µl warmem RPMI 1640 Medium + 10% FCS + Pen/Strep + L-Glutamin resuspendiert.

2.2.5 Bestimmung der Zellzahlen

Trypanblau wurde zur Differenzierung lebender Zellen in der Zellsuspension verwendet. Während lebende Zellen die Substanz nicht aufnehmen, gilt dies nicht für abgestorbene oder perforierte Zellen. Sie nehmen die Farbe aufgrund der gestörten Membranintegrität auf und sind nicht mehr in der Lage, diese aus dem Zellinneren zu transportieren. Sie erscheinen somit dunkelblau, was zu einer in der Regel gut möglichen Unterscheidung der Zellen im Lichtmikroskop führt.

Pro Probe wurde jeweils ein 1,5 ml Cup mit 90 µl sterilem PBS befüllt, wozu man im Anschluss 10 µl der Zellsuspension hinzufügte und gut resuspendierte, was nun einer

1:10 Verdünnung entsprach. Für die Färbung selbst wurden dann wiederum 10 µl aus der im Verhältnis 1:10 verdünnten Zellsuspension entnommen und mit 10 µl einer 0,1% - igen Trypanblaulösung gemischt.

Von dieser Mischung, die einer 1:2 Verdünnung entspricht, wurden anschließend 10 µl in eine Neubauer Zell-Zählkammer pipettiert und in zwei Quadranten die ungefärbten Zellen gezählt, wovon am Ende der Mittelwert berechnet wurde.

Die Zellzahl pro 500 µl ergibt sich aus folgender Formel:

$$\text{Zellen / 0,5 ml} = \frac{(\text{Summe aller gezählten Zellen})}{(\text{Anzahl der ausgezählten Quadranten})} * (10^4) * \text{Verdünnungsfaktor} * 0,5$$

... der Kammerfaktor beträgt 10^4

... der Verdünnungsfaktor beträgt 20

2.2.6 Zellkulturansätze

Nachdem die benötigten PBMCs unter sterilen Bedingungen aufgetaut, in 500 µl warmem Medium resuspendiert und danach gezählt wurden, wurde mit der Zellkultur begonnen. Ziel war es, 500.000 Zellen/Well in 200 µl Medium als Tripplikat anzusetzen. Die Stimulation der PBMCs erfolgte mit 5 µg/ml anti-CD3. Der Ansatz wurde in eine 96 Well-Platte pipettiert, wobei die angrenzenden Wells mit je 200 µl sterilem PBS gefüllt wurden, um ein Verdampfen der Proben zu verhindern. Anschließend wurden die Platten für 3 Tage bei 37°C bei 5% CO₂ bebrütet.

CD3 wird vorwiegend von T-Zellen exprimiert und ist mit deren Antigenrezeptor (TCR) assoziiert. Es wird für die Zelloberflächenexpression sowie Signalübertragung des TCR benötigt und stellt einen Teil des T-Zell-Rezeptor-Komplexes dar. (70) Unter diesen Voraussetzungen geht man davon aus, dass eine Inkubation mit anti-CD3 zur Aktivierung von T-Zellen führt.

Nach 3 Tagen wurden die Platten wieder aus dem Brutschrank entnommen und von den Überständen der Proben je 180 µl in eine neue 96 Well-Platte überführt. Nachdem

die Platten mit dem abgenommenen Überstand mit Klebefolie abgedeckt waren, wurden sie bei – 20°C weggefroren.

2.2.7 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Der Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) dient der Quantifizierung von Molekülen in Körperflüssigkeiten wie zum Beispiel Blutplasma, Serum oder auch Überständen aus Zellkulturen. Mithilfe dieses Verfahrens lassen sich quantitative Aussagen über die Konzentration oder die Menge der zu untersuchenden Substanz treffen. (78)

Es gibt verschiedene Techniken des ELISA, im Rahmen dieser Arbeit wurde der sogenannte Sandwich-ELISA durchgeführt. Hierfür wurden spezielle 96-Loch-ELISA-Platten verwendet, die vor dem Auftragen der Proben mit einem sogenannten Fang-Antikörper beschichtet worden waren. Nach dem Überführen der Proben auf die Platte sorgte dieser Fang-Antikörper dafür, dass das zu untersuchende Molekül an die Platte gebunden wird.

Zur Quantifizierung wurde zusätzlich zu den Proben eine Standard-Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration des Zielmoleküls, in diesem Fall humanes IL–3, aufgetragen. Diese Standardreihe dient der quantitativen Bestimmung des zu untersuchenden Moleküls in den Proben.

Zusätzlich zu dem IL–3 ELISA wurde ein Kontroll-ELISA durchgeführt, wobei sich diese in der Beschichtung mit dem sogenannten Fang–Antikörper unterschieden. So wurde einen Tag vor der Durchführung des ELISA pro Probe eine Platte mit 5 µg/ml Klon 13.4.4 in PBS für den IL–3 ELISA beschichtet und eine Platte mit 5 µg/ml Klon 11.14.6 in PBS für den Kontroll-ELISA. Von hier an wurden die Platten gleichbehandelt.

Am nächsten Tag wurden die beschichteten Platten dreimal mit 300 µl/well Waschpuffer (= 1x PBS + 0,05% Tween) gewaschen und anschließend die freien Bindungsstellen mit 200 µl/well 1% BSA in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt und nach abgelaufener Zeit wieder dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

Am selben Tag wurden die Platten, die den Überstand der PBMCs enthielten, bei Raumtemperatur aufgetaut und danach bei 2400 rpm bei 4°C für 4 Minuten zentrifugiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Präinkubation der Proben mit 20 µg/ml mouse IgG1kappa Isotype control (MOPC – 21, BioXCell) für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Verdünnungsplatte. Anschließend folgte die Inkubation von 60 µl/well der Proben bzw. 60 µl/well der Standard - Verdünnungsreihe auf den geblockten Platten für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach wiederholtem dreifachen Waschvorgang fand der Detektionsschritt mit Klon 11.14.6 – HRP 400 ng/ml mit 60 µl/well für zwei Stunden bei Raumtemperatur in 1% BSA in PBS statt.

Anschließend wurde wieder dreimal gewaschen und die Proben mit Substrate Solution 100 µl/well entwickelt, um eine Farbreaktion hervorzurufen. Die Substrate Solution enthielt Tetramethylbenzidin (TMB). Nach 20 Minuten abgedunkelter Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde der Farbumschlag mit 50 µl/well 12,5% H₂SO₄ (Schwefelsäure) gestoppt.

Zu guter Letzt wurde die optische Dichte der Proben mittels eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 540 nm abgelesen.

2.2.8 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, Zellen unterschiedlicher Populationen anhand ihrer Streulichteigenschaften und Oberflächenmoleküle zu analysieren. Mithilfe der sog. FACS-Analyse („fluorescence activated cell sorting“) werden die Zellen gleichzeitig noch aufgetrennt.

Dabei werden die zu untersuchenden Zellen in einem laminaren Strom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet, wodurch für sie charakteristische Streu- und Fluoreszenzsignale erzeugt werden. Sog. Lichtsensoren registrieren wiederum diese Signale und wandeln sie in ein elektrisches Signal um. Dabei liefert das Vorwärtsstreulicht oder Forward Scatter (FSC) Informationen über die Größe der gemessenen Zellen und das in einem Winkel von 90° abgestrahlte Seitwärtsstreulicht oder Side Scatter (SSC) ist ein Maß für die Zellgranularität.

Färbt man die Zellen vor der Messung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern, kann man Aussagen über die auf den Zellen repräsentierten Oberflächenantigene treffen. Hierdurch lassen sich schließlich Rückschlüsse auf den Zelltyp ziehen. Das von den Lasern ausgesandte monochromatische Licht führt zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe, wodurch diese - je nach Fluorochrom - Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren. (77)

Die Lichtintensität ist dabei zur Anzahl der auf der Zelle markierten Antigene direkt proportional. Somit nimmt also die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) zu, je mehr Antikörper an die Zelloberfläche gebunden sind.

In dieser Arbeit wurde ein FACSCanto II der Firma BD Biosciences verwendet. Die Analyse der gemessenen Daten erfolgte mit der Software BD FACSDiva v6.1.3.

2.2.9 Extrazelluläre FACS-Färbung

2.2.9.1 Extrazelluläre FACS – Färbung von Vollblut

Für die extrazelluläre Färbung wurden aus den EDTA – Röhren pro Probe zweimal je 100 µl Vollblut entnommen, da pro Probe zwei unterschiedliche FACS-Färbungen durchgeführt wurden. Dabei wurden für die *erste Färbung* folgende Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt: CD11b-FITC (Fluoresceinisothiocyanat), CD 203c-PE (Phycoerythrin), HLA-DR-APC (Allophycocyanin), CD3-APC-Cy7 (Allophycocyanin-Cyanin 7), CD8-PE-Cy7 (Phycoerythrin-Cyanin 7), CD19 eFluor450 und CD4-V500. Außerdem in der Färbung enthalten war CD123-PE-Cy5 (Phycoerythrin-Cyanin 5) in einer Verdünnung von 1:20.

In der *zweiten Färbung* wurde ebenfalls der Antikörper CD123-PE-Cy5 (Phycoerythrin-Cyanin 5) in einer Verdünnung von 1:20 eingesetzt, sowie einige weitere Antikörper in einer Verdünnung von 1:100: CD116-FITC (Fluoresceinisothiocyanat), CD131-PE (Phycoerythrin), CD16-APC (Allophycocyanin), CD193-APC-Cy7 (Allophycocyanin -Cyanin 7), CD14 eFluor450 und CD4-V500.

Für die beiden FACS-Färbungen wurde je ein sog. Mastermix angesetzt, wobei pro 100 µl Probe immer 20 µl des Antikörper-Mixes hinzugegeben wurden. Anschließend wurden die Proben geschüttelt und für 20 Minuten im Kühlschrank inkubiert und nach abgelaufener Zeit mit 5 ml kalter 0,9% NaCl-Lösung abgestoppt und bei 1500 rpm bei 4°C für 7 Minuten zentrifugiert. Dieser Waschschrift diente dazu, nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und auf die Zellen im Polystyrolröhrchen wurde je 1 ml der BD FACS Lysing Solution pipettiert. Nach gutem durchschütteln der Proben wurden diese für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Diese Lysing Solution sollte vorhandene Erythrozyten aus der Vollblut-Probe lysieren und die Zellen darin fixieren. Nach stattgefundenener Erythrozyten-Lyse wurden die Polystyrolröhrchen mit 4 ml 0,9% NaCl-Lösung aufgefüllt und erneut bei 1500 rpm bei 4°C für 7 Minuten zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden die Proben abgegossen um somit eine annähernd gleiche Flüssigkeitsmenge in den Röhrchen vorzufinden.

Anschließend wurden zu jeder Probe 10 µl der AccuCheck Counting Beads hinzugegeben. Sie dient der genauen Berechnung der Zellzahl in der gefärbten Blutprobe. So wird eine bestimmte Menge an Counting Beads mit bekannter Konzentration zu einem bekannten Volumen an gefärbter Probe hinzugegeben. Das Durchflusszytometer misst sowohl die Zellen als auch die Beads und somit lässt sich am Ende die Zellzahl/µl berechnen. (79)

2.2.9.2 Extrazelluläre FACS – Färbung von Vollblut nach Vorbehandlung mit humanem rekombinantem IL-3

Für den Ansatz dieser Färbung wurden von gesunden Probanden ca. 3 ml Vollblut in ein EDTA-Röhrchen abgenommen und anschließend jeweils 100 µl in ein Polystyrolröhrchen für das Durchflusszytometer überführt. Insgesamt waren es 20 Röhrchen, da zwei FACS-Färbungen (wie in 2.2.9.1) durchgeführt wurden und man Doppelwerte gemessen hatte.

Als Kontrollwert für die Messung diente 1% BSA in D-PBS und das humane IL-3 wurde als Lösung mit einer Höchstkonzentration von 30 ng/ml hu IL-3 auf ein Endvolumen

von 110 µl verdünnt. Anschließend führte man eine 1:5-Verdünnungsreihe durch, um unterschiedlich hohe hu IL-3-Konzentrationen im Vollblut der Probanden nachzustellen (siehe. Tab.14).

Färbung 1 (jeweils Doppelwerte)		Färbung 2 (jeweils Doppelwerte)	
100 µl Vollblut	+ 10 µl 1% BSA in D-PBS	100 µl Vollblut	+ 10 µl 1% BSA in D-PBS
100 µl Vollblut	+ 10 µl 1% BSA in D-PBS mit 30 ng/ml hu IL-3	100 µl Vollblut	+ 10 µl 1% BSA in D-PBS mit 30 ng/ml hu IL-3
100 µl Vollblut	+ 10 µl 1% BSA in D-PBS mit 30 ng/ml hu IL-3 1/5 verdünnt	100 µl Vollblut	+ 10 µl 1% BSA in D-PBS mit 30 ng/ml hu IL-3 1/5 verdünnt
100 µl Vollblut	+ 10 µl 1% BSA in D-PBS mit 30 ng/ml hu IL-3 1/25 verdünnt	100 µl Vollblut	+ 10 µl 1% BSA in D-PBS mit 30 ng/ml hu IL-3 1/25 verdünnt
100 µl Vollblut	+ 10 µl 1% BSA in D-PBS mit 30 ng/ml hu IL-3 1/125 verdünnt	100 µl Vollblut	+ 10 µl 1% BSA in D-PBS mit 30 ng/ml hu IL-3 1/125 verdünnt

Tabelle 14: Extrazelluläre FACS-Färbung von Vollblut nach Vorbehandlung mit humanem rekombinantem IL-3

Nachdem die in 1,5 ml großen Reaktionsgefäßen angesetzten Konzentrationen an hu IL-3 jeweils auf die 100 µl frisches Vollblut in den Polystyrolröhrchen pipettiert worden waren und diese gut gemischt waren, wurden diese für zwei Stunden in den Brutschrank gestellt (37°C, 5% CO₂). Wichtig war an dieser Stelle, dass man die einzelnen Röhrchen vor der Inkubation mit Parafilm abdeckte, um ein Verdampfen der darin enthaltenen Proben zu verhindern.

Nach Ablauf der zwei Stunden wurden die Proben zum Abstoppen der Reaktion auf Eis gestellt. Anschließend wurde die extrazelluläre Färbung des Vollblutes genau wie in 2.2.9.1 beschrieben auf Eis durchgeführt. Es wurden die gleichen beiden Färbungen mit den gleichen Antikörpern in den gleichen Verdünnungen eingesetzt. 20 µl des Antikörper-Mixes wurden nun auf ein Volumen von 110 µl pipettiert.

2.2.10 Intrazelluläre FACS-Färbung

Gefärbt wurden humane PBMCs, welche man im Rahmen der Zellkultur auftaute und am gleichen Tag verarbeitete. Hierfür wurden pro Probe eine Million Zellen für die intrazelluläre Färbung verwendet.

Die Zellen wurden zunächst in den 1,5 ml großen Reaktionsgefäßen bei 1500 rpm bei 4°C für 7 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen im Stimulationsmedium gut resuspendiert. Verwendet wurde in dieser Arbeit der Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors) von eBioscience.

Dieser enthält Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Ionomycin, Brefeldin A und Monensin. PMA führt über die Aktivierung der Proteinkinase C gemeinsam mit Ionomycin zu einer erhöhten Zytokinproduktion in der Zelle. Ionomycin gehört zur Gruppe der sog. Ionophore und bedient sich der Möglichkeit, Calciumionen durch biologische Membranen zu transportieren, wodurch die intrazelluläre Konzentration an Calcium gesteigert wird. Durch seine Funktion als sog. „second messenger“ führt es in der Zelle sowohl zu einer verstärkten Transkription als auch Translation. Aus der Zugabe von Brefeldin A und Monensin zu den Zellen resultiert eine Akkumulation der sezernierten Proteine innerhalb der Zellen, da diese beiden Substanzen den Transport vom Endoplasmatischen Retikulum in den Golgi-Apparat verhindern. Somit reichern sich die Zytokine in der Zelle an und können hierdurch besser im Durchflusszytometer nachgewiesen werden.

Verdünnt wurde der 500-fach konzentrierte Cell Stimulation Cocktail in RPMI 1640 Medium + 10% FCS + Pen/Strep + L-Glutamin. Eine Million Zellen/well wurden in 200 µl Stimulationsmedium in eine 96-Loch-Rundbodenplatte ausplattiert und für drei Stunden im Brutschrank bei 37°C bei 5% CO₂ inkubiert.

Nach dreistündiger Inkubationszeit wurden die Platten bei 2400 rpm bei 4°C für 4 Minuten zentrifugiert und danach ausgeschüttet. Danach wurden die Proben mit 200 µl/well PBS gewaschen und erneut bei 2400 rpm bei 4°C für 4 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 µl FC-Block mouse IgG (100 µg/ml) für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und danach nicht gewaschen. Dieser in PBS angesetzte FC-Block verhindert die unspezifische Bindung von

Antikörpern an FC-Rezeptoren unterschiedlicher Zellen. Im nächsten Schritt wurden die Proben *extrazellulär* gefärbt. Verwendet wurde CD3 APC-Cy7 (Allophycocyanin-Cyanin 7) in einer Verdünnung von 1:80 sowie die Antikörper CD8 PerCP-Cy5.5 (Peridinin-Chlorophyll-Protein Cyanin 5.5) und CD4 APC (Allophycocyanin) in einer Verdünnung von 1:20. Verdünnt wurden die Antikörper in PBS, gefärbt wurde in einem Endvolumen von 20 µl/well. Die Proben wurden gut mit den Antikörpern vermischt und anschließend für 20 Minuten im Dunkeln im Kühlschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten erneut mit PBS gewaschen. Die darauffolgende Permeabilisierung der Zellen erfolgte mit BD Cytfix/Cytoperm (Fixation and Permeabilization Solution) mit 150 µl/well für 20 Minuten im Kühlschrank. Nach zweimaligem Waschschrift mit 1 x Permeabilization Wash Buffer (10x, BioLegend) wurden 10 µl FC-Block mouse IgG (100 µg/ml), in Permeabilization Wash Buffer angesetzt, auf die Proben gegeben. Die Platten wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und im Anschluss daran nicht gewaschen. Der 10-fach konzentrierte Permeabilization Wash Buffer wurde vor seinem Einsatz an den Zellen in deionisiertem Wasser verdünnt.

Als nächstes fand die eigentliche *intrazelluläre* Färbung statt. Pro Probe wurden zwei Färbungen durchgeführt: eine Färbung mit IL-3 und eine Isotyp-Kontrollfärbung. Für die Isotypfärbung wurden IL-2 PE-Cy7 (Phycoerythrin-Cyanin 7) und IL-17 FITC (Fluoresceinisothiocyanat) in einer Verdünnung von 1:20 eingesetzt sowie der Isotyp von anti-IL-3 mit 5 µg/ml. Für die IL-3-Färbung wurden die beiden gleichen Antikörper in der gleichen Verdünnung verwendet und zusätzlich Klon-13-PE (Phycoerythrin) 5 µg/ml. Die Verdünnung der Antikörper fand in Permeabilization Wash Buffer statt, um das Verschließen der Zellen zu verhindern. Vom jeweiligen Antikörper-Mix wurden schließlich 10 µl zu jeder Probe hinzugegeben, es wurde in einem Endvolumen von 20 µl/Well gefärbt. Die Platten wurden für 20 Minuten im Kühlschrank inkubiert und nach abgelaufener Inkubationszeit zweimal mit Permeabilization Wash Buffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Bis zur Analyse im Durchflusszytometer wurden die Proben im Kühlschrank aufbewahrt.

3 Ergebnisse

In diese Studie sind insgesamt 198 Probanden involviert, davon 154 Patienten, die an Rheumatoider Arthritis leiden und 44 gesunde Personen. Unter den Patienten befinden sich 112 Frauen und 42 Männer, unter den gesunden Probanden sind 31 Frauen und 13 Männer.

Das durchschnittliche Alter der an RA erkrankten Frauen beträgt 55,2 Jahre und bei den Männern 58,6 Jahre. Die weiblichen gesunden Probanden sind durchschnittlich 49,1 Jahre alt, die Männer 44,5 Jahre.

Die Basischarakteristika der Patienten sind in Tabelle 15 bzw. Tabelle 16 dargestellt. Die Gruppeneinteilung erfolgte anhand der Höhe ihrer DAS28 Werte. Beim DAS28 wurde zwischen den Entzündungsparametern BSG (DAS BSG) und CRP (DAS CRP) unterschieden (siehe 1.1.5).

DAS28 BSG (N=154 RA Patienten):

	Kontrollen (N=44)	DAS < 2,6 (Remission) (N=91)	DAS ≥ 2,6 (N=63)	DAS ≥ 4 (N=15)	DAS ≥ 5,1 (N=5)
Weiblich (%)	70,5	71,4	74,6	86,7	80,0
Männlich (%)	29,5	28,6	25,4	13,3	20,0
Kaukasier (%)	100,0	96,7	100,0	100,0	100,0
Alter (Jahre)	47,8 ± 3,0	54,0 ± 1,6	59,2 ± 1,4	59,0 ± 3,0	55,1 ± 3,0
Durchschn. Dauer der RA nach ED (Monate)		102,4 ± 10,0	111,4 ± 11,9	87,9 ± 17,6	49,6 ± 28,9
Bereich (Monate)		3 – 489	1 – 483	2 - 220	10 - 178
Druckschmerzhaft & geschwollene Gelenke (%)		2,2	44,4	80,0	100,0
Druckschmerzhaft (Anzahl)		0,2	3,4	7,8	8,8

Geschwollen (Anzahl)		0,2	1,6	3,7	6,0
BSG 1 (mm/h)		8	20	35	64
BSG 2 (mm/h)		19	36	52	81
CRP (mg/l)		3,0	12,9	23,4	32,1
Positiv für Rheumafaktor, cyclische citrullinierte Peptid-Antikörper, oder beide (%)		75,8	73,0	60,0	100,0
Vorangegangene Behandlung (%)		100,0	98,4	100,0	100,0
TNF – Inhibitor (%)		18,7	12,7	26,7	0,0
Andere Biologika (%)		6,6	7,9	6,7	20,0
Methotrexat (%)		68,1	68,3	53,3	60,0
Nichtbiologische, krankheitsmodifizierende Medikamente außer Methotrexat (%)		35,2	38,1	26,7	20,0
Antimalariamittel (Hydroxychloroquin) in %		5,5	6,4	6,7	0,0
Steroide (%)		68,1	79,4	73,3	80,0
Steroide (mg/Tag)		3,5	5,0	5,3	8,9
RTX (%)		4,4	14,3	20,0	40,0
RTX in den letzten 12 Monaten (%)		3,3	12,7	13,3	40,0
RTX in den letzten 6 Monaten (%)		3,3	11,1	13,3	40,0
NSAR (%)		49,5	57,1	46,7	60,0

Table 15: Basischarakteristika der RA Patienten und Kontrollen (DAS BSG). Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde hier die BSG als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) und in aufsteigender Reihenfolge von niedriger (DAS ≥ 2,6) über moderate (DAS ≥ 4) bis hohe Krankheitsaktivität (DAS ≥ 5,1) gezeigt.

Aus Tab. 15 geht ein kontinuierlicher Anstieg des prozentualen Anteils an RA Patienten mit druckschmerzhaften und geschwollenen Gelenken hervor. Er steigt von 2,2% bei den in Remission (DAS < 2,6) befindlichen Patienten auf 44,4% bei den Patienten mit niedriger (DAS ≥ 2,6) Aktivität der RA und weiter auf 80,0% bei den Patienten mit moderater (DAS ≥ 4) Krankheitsaktivität bis auf schließlich 100,0% bei hoher (DAS ≥ 5,1) Aktivität der RA. Auch bei den absoluten Anzahlen der druckschmerzhaften bzw. geschwollenen Gelenke zeigt sich ein kontinuierlicher Anstieg mit höchst signifikanten Unterschieden zwischen RA Patienten in Remission und zunehmender Krankheitsaktivität ($p < 0,001$).

Laborchemisch werden als Entzündungsparameter die BSG und das CRP dargestellt. Es zeigt sich ein zunehmender Anstieg der BSG in der ersten sowie zweiten Stunde von 8/19 mm/h bei Patienten in Remission (DAS < 2,6) über 20/36 mm/h bei niedriger (DAS ≥ 2,6) Krankheitsaktivität auf 35/52 mm/h bei moderater (DAS ≥ 4) Aktivität der RA bis auf schließlich 64/81 mm/h bei hoher (DAS ≥ 5,1) Aktivität der RA.

Einen ähnlichen Trend kann man beim CRP beobachten: Das CRP steigt zunehmend von 3,0 mg/l bei Patienten in Remission (DAS < 2,6) auf 12,9 mg/l bei niedriger (DAS ≥ 2,6) Krankheitsaktivität und weiter auf 23,4 mg/l bei moderater (DAS ≥ 4) Aktivität der RA bis auf 32,1 mg/l bei hoher (DAS ≥ 5,1) Krankheitsaktivität.

Die Unterschiede bezüglich der Entzündungsparameter zwischen den in Remission befindlichen Patienten und denen unter niedriger, moderater oder hoher Krankheitsaktivität leidenden Patienten stellen sich als höchst signifikant dar ($p < 0,001$).

Zusätzlich zeigen sich signifikante Unterschiede bezüglich der täglichen Steroideinnahme zwischen den einzelnen Gruppen. Auch diese steigt kontinuierlich mit zunehmender Aktivität der RA an. Es kommt zu einem Anstieg von 3,5 mg/Tag bei Patienten in Remission (DAS < 2,6) auf 5,0 mg/Tag bei niedriger (DAS ≥ 2,6) Krankheitsaktivität und weiter auf 5,3 mg/Tag bei moderater (DAS ≥ 4) Aktivität der RA bis auf schließlich 8,9 mg/Tag bei hoher (DAS ≥ 5,1) Krankheitsaktivität. Der

Anstieg zwischen in Remission befindlichen Patienten (DAS < 2,6) und niedriger Aktivität der RA (DAS ≥ 2,6) stellt sich signifikant dar (p=0,02), der Unterschied zwischen Remission (DAS < 2,6) und hoher Krankheitsaktivität (DAS ≥5,1) sogar hoch signifikant (p=0,006).

DAS28 CRP (N=144 RA Patienten):

	Kontrollen (N=44)	DAS < 2,6 (Remission) (N=96)	DAS ≥ 2,6 (N=48)	DAS ≥ 4 (N=10)	DAS ≥ 5,1 (N=3)
Weiblich (%)	70,5	68,8	78,7	80,0	66,7
Männlich (%)	29,5	31,2	21,3	20,0	33,3
Kaukasier (%)	100,0	96,9	100,0	100,0	100,0
Alter (Jahre)	47,8 ± 3,0	54,7 ± 1,6	58,2 ± 1,5	54,7 ± 3,8	53,8 ± 2,2
Durchschn. Dauer der RA nach ED (Monate)		102,0 ± 9,6	117,3 ± 14,4	66,9 ± 16,8	16,7 ± 2,1
Bereich (Monate)		3 – 489	1 – 483	12 – 163	12 – 21
Druckschmerzhaft & geschwollene Gelenke (%)		1,0	50,0	90,0	100,0
Druckschmerzhaft (Anzahl)		0,1	3,6	8,0	17,3
Geschwollen (Anzahl)		0,2	1,4	3,2	6,0
BSG 1 (mm/h)		10	17	28	33
BSG 2 (mm/h)		22	31	48	44
CRP (mg/l)		3,2	14,6	37,8	23,0
Positiv für Rheumafaktor, cyclische citrullinierte Peptid-Antikörper, oder beide (%)		75,0	83,3	80,0	66,7

Vorangegangene Behandlung (%)		100,0	97,9	100,0	100,0
TNF – Inhibitor (%)		18,8	10,4	20,0	0,0
Andere Biologika (%)		5,2	10,4	0,0	0,0
Methotrexat (%)		66,7	72,9	50,0	33,3
Nichtbiologische, krankheitsmodifizierende Medikamente außer Methotrexat (%)		37,5	39,6	30,0	33,3
Antimalariamittel (Hydroxychloroquin) in %		5,2	8,3	0,0	0,0
Steroide (%)		67,7	85,4	80,0	100,0
Steroide (mg/Tag)		3,4	5,9	7,7	12,0
RTX (%)		4,2	16,7	20,0	33,3
RTX in den letzten 12 Monaten (%)		3,1	16,7	20,0	33,3
RTX in den letzten 6 Monaten (%)		3,1	14,6	20,0	33,3
NSAR (%)		50,0	64,6	80,0	66,7

Tabella 16: Basischarakteristika der RA Patienten und Kontrollen (DAS CRP). Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde hier das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) und in aufsteigender Reihenfolge von niedriger (DAS ≥ 2,6) über moderate (DAS ≥ 4) bis hohe Krankheitsaktivität (DAS ≥ 5,1) gezeigt.

Aus Tab. 16 geht ein kontinuierlicher Anstieg des prozentualen Anteils an RA Patienten mit druckschmerzhaften und geschwollenen Gelenken hervor. Er steigt von 1,0% bei den in Remission (DAS < 2,6) befindlichen Patienten auf 50,0% bei den Patienten mit niedriger (DAS ≥ 2,6) Aktivität der RA und weiter auf 90,0% bei den Patienten mit moderater (DAS ≥ 4) Krankheitsaktivität bis auf schließlich 100,0% bei hoher (DAS ≥ 5,1) Aktivität der RA. Auch bei den absoluten Anzahlen der druckschmerzhaften bzw. geschwollenen Gelenke zeigt sich ein kontinuierlicher

Anstieg mit höchst signifikanten Unterschieden zwischen RA Patienten in Remission und zunehmender Krankheitsaktivität ($p < 0,001$).

Laborchemisch werden als Entzündungsparameter die BSG und das CRP dargestellt. Es zeigt sich ein zunehmender Anstieg der BSG in der ersten sowie zweiten Stunde von 10/22 mm/h bei Patienten in Remission ($DAS < 2,6$) über 17/31 mm/h bei niedriger ($DAS \geq 2,6$) Krankheitsaktivität auf 28/48 mm/h bei moderater ($DAS \geq 4$) Aktivität der RA bis auf schließlich 33 mm/h in der ersten Stunde und einem geringen Abfall auf 44 mm/h in der zweiten Stunde bei hoher ($DAS \geq 5,1$) Aktivität der RA.

Einen ähnlichen Trend kann man beim CRP beobachten: Das CRP steigt zunehmend von 3,2 mg/l bei Patienten in Remission ($DAS < 2,6$) auf 14,6 mg/l bei niedriger ($DAS \geq 2,6$) Krankheitsaktivität und weiter auf 37,8 mg/l bei moderater ($DAS \geq 4$) Aktivität der RA und fällt auf 23,0 mg/l bei hoher ($DAS \geq 5,1$) Krankheitsaktivität ab.

Insgesamt steigen die Entzündungsparameter zwischen den in Remission befindlichen Patienten und denen unter niedriger, moderater oder hoher Krankheitsaktivität leidenden Patienten und die Unterschiede stellen sich als signifikant dar ($p < 0,02$).

Zusätzlich zeigen sich signifikante Unterschiede bezüglich der täglichen Steroideinnahme zwischen den einzelnen Gruppen. Auch diese steigt kontinuierlich mit zunehmender Aktivität der RA an. Es kommt zu einem Anstieg von 3,4 mg/Tag bei Patienten in Remission ($DAS < 2,6$) auf 5,9 mg/Tag bei niedriger ($DAS \geq 2,6$) Krankheitsaktivität und weiter auf 7,7 mg/Tag bei moderater ($DAS \geq 4$) Aktivität der RA bis auf schließlich 12,0 mg/Tag bei hoher ($DAS \geq 5,1$) Krankheitsaktivität. Der Anstieg zwischen in Remission befindlichen Patienten und niedriger bzw. moderater oder hoher Krankheitsaktivität stellt sich hoch signifikant dar ($p < 0,01$).

3.1 IL-3 Produktion gemessen im Zellkultur-Überstand

Mithilfe des ELISA wurden Zellkulturüberstände von PBMCs nach Aktivierung mit anti-CD3 auf die Produktion von IL-3 untersucht. Ziel war es, an RA leidende Patienten mit gesunden Probanden, als auch die verschiedenen Krankheitsaktivitäten untereinander zu vergleichen.

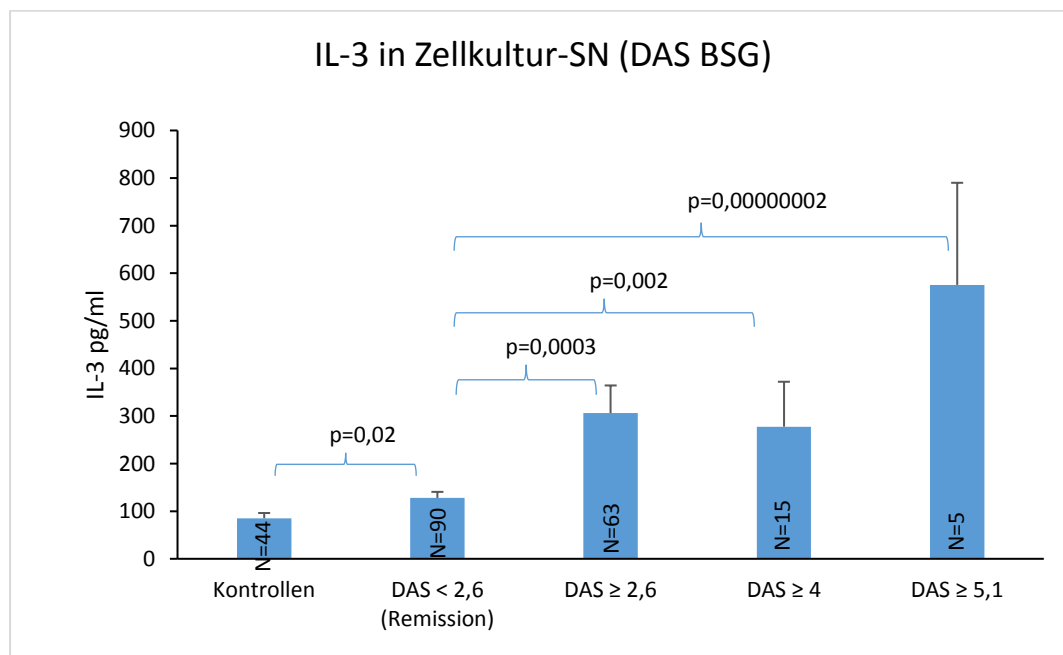


Abbildung 3: Darstellung der IL-3 Konzentration in pg/ml gemessen im Zellkultur-Überstand (BSG). Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde hier die BSG als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) und in aufsteigender Reihenfolge von niedriger (DAS ≥ 2,6) über moderate (DAS ≥ 4) bis hohe Krankheitsaktivität (DAS ≥ 5,1) gezeigt.

Aus Abb. 3 (DAS BSG) wird ersichtlich, dass die produzierte Menge an IL-3 bei Patienten, deren Erkrankung sich zurzeit in Remission befindet (DAS < 2,6), signifikant höher ist als bei den gesunden Probanden ($p=0,02$). Ein höchst signifikanter Unterschied wird zwischen Patienten in Remission und Patienten mit niedriger (DAS ≥ 2,6) Krankheitsaktivität ($p=0,0003$) sowie hoher Krankheitsaktivität (DAS ≥ 5,1) beobachtet ($p=0,0000002$). Auch zwischen moderater Aktivität der RA (DAS ≥ 4) und den Patienten in Remission (DAS < 2,6) unterscheidet sich die Menge an produziertem IL-3 hoch signifikant ($p=0,002$).

Man kann in Abb.3 einen kontinuierlichen Anstieg der IL-3 Konzentration in Zusammenhang mit steigender Krankheitsaktivität feststellen. So steigt die Konzentration von $85,2 \pm 11,1$ pg/ml bei den Kontrollen auf $128,0 \pm 12,6$ pg/ml bei den Patienten in Remission (DAS < 2,6), anschließend erhöht sie sich auf $306,1 \pm 58,1$ pg/ml bei niedriger Krankheitsaktivität (DAS $\geq 2,6$) und steigt auf $575,5 \pm 214,6$ pg/ml bei hoher Krankheitsaktivität (DAS $\geq 5,1$).

Lediglich zwischen niedriger (DAS $\geq 2,6$) und moderater (DAS ≥ 4) Aktivität der RA fällt die IL-3 Konzentration von $306,1 \pm 58,1$ pg/ml auf $277,7 \pm 94,4$ pg/ml, diese Differenz ist jedoch nicht signifikant (p=0,41).

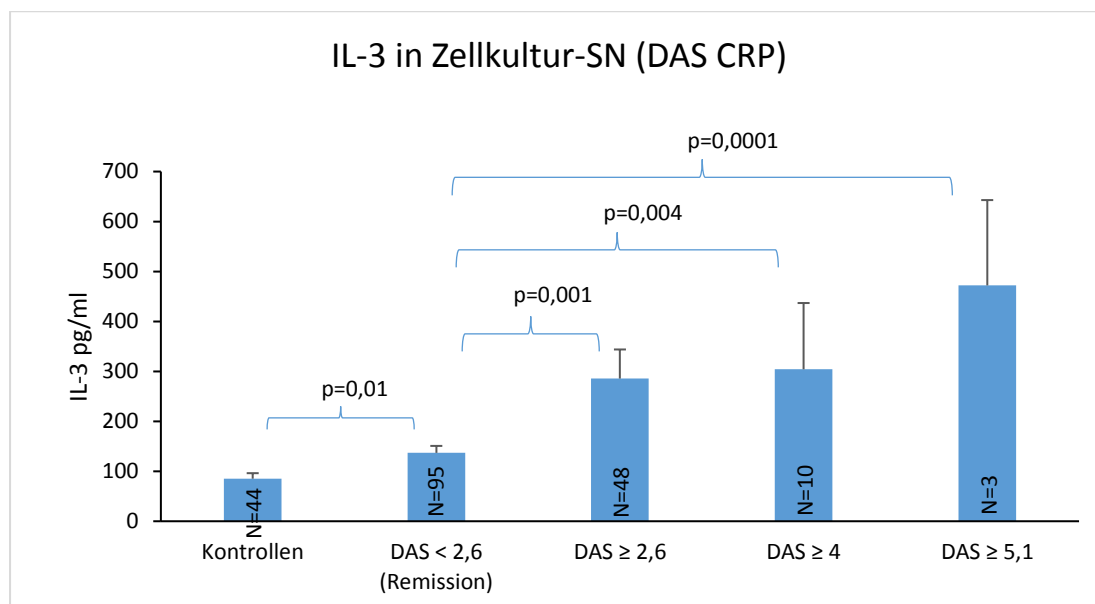


Abbildung 4: Darstellung der IL-3 Konzentration in pg/ml gemessen im Zellkultur-Überstand (CRP). Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde hier das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) und in aufsteigender Reihenfolge von niedriger (DAS $\geq 2,6$) über moderate (DAS ≥ 4) bis hohe Krankheitsaktivität (DAS $\geq 5,1$) gezeigt.

Abb.4 (DAS CRP) zeigt, ähnlich wie Abb.3 (DAS BSG), eine hoch signifikante Erhöhung der IL-3 Konzentration bei den Patienten in Remission (DAS < 2,6) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (p=0,01). Darüber hinaus zeigt Abb.4 einen höchst signifikanten Unterschied zwischen Patienten in Remission (DAS < 2,6) und Patienten mit niedriger (DAS $\geq 2,6$) Krankheitsaktivität (p=0,001) sowie einen höchst signifikanten (p=0,0001) Anstieg der IL-3 Konzentration zwischen Patienten in Remission (DAS < 2,6) und den an hoher Aktivität der RA (DAS $\geq 5,1$) leidenden

Patienten. Die gemessene Konzentration an IL-3 ist auch bei Patienten mit moderater Aktivität der RA ($DAS \geq 4$) hoch signifikant größer als bei den Patienten, die sich zu dem Zeitpunkt in Remission ($DAS < 2,6$) befinden ($p=0,004$).

Aus dieser Abbildung geht eine kontinuierliche Steigerung der IL-3 Konzentration in Abhängigkeit der Aktivität der RA hervor. So steigt die Menge an gemessenem IL-3 von $85,2 \pm 11,1$ pg/ml bei den Kontrollen auf $136,9 \pm 14,0$ pg/ml bei den Patienten in Remission ($DAS < 2,6$). Bei den Patienten mit niedriger Krankheitsaktivität ($DAS \geq 2,6$) beträgt die Konzentration an IL-3 bereits $285,6 \pm 58,2$ pg/ml und erhöht sich auf $304,2 \pm 132,6$ pg/ml bei Patienten mit moderater Krankheitsaktivität ($DAS \geq 4$). Schließlich steigt die IL-3 Konzentration auf $472,1 \pm 170,8$ pg/ml bei Patienten, die an hoher Aktivität der RA ($DAS \geq 5,1$) leiden.

3.2 Untersuchung der potentiellen Quellen von IL-3

PBMCs wurden zuerst extrazellulär gefärbt, um unter den $CD3^+$ Zellen zwischen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen differenzieren zu können. Im Anschluss erfolgte die intrazelluläre Färbung mit Antikörpern gegen IL-2, IL-3 bzw. IL-17. Da IL-3 das Hauptziel der Untersuchungen dieser Arbeit ist, soll in erster Linie diesem Zytokin die Aufmerksamkeit gelten. Untersucht wird vor allem ein möglicher Zusammenhang zwischen IL-3 Produktion und der Aktivität der RA bzw. Unterschiede zwischen gesunden Probanden und an RA leidenden Patienten.

3.2.1 CD4⁺ T-Zellen als mögliche Quelle von IL-3

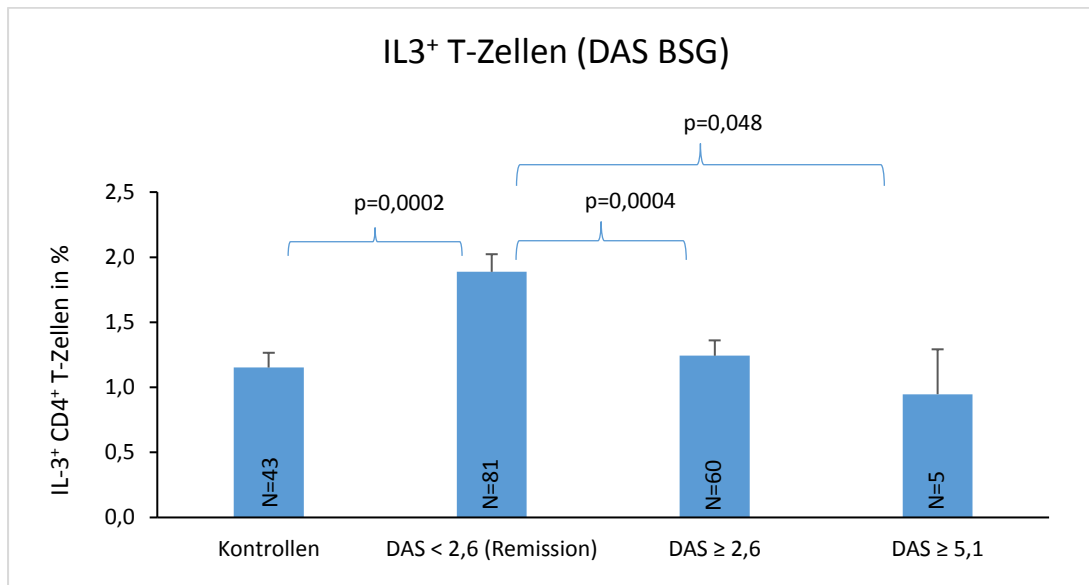


Abbildung 5: Prozentualer Anteil der IL-3⁺ CD4⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4⁺ T-Zellen nach intrazellulärer FACS-Färbung für IL-3 (BSG). Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde hier die BSG als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) und in aufsteigender Reihenfolge von niedriger (DAS ≥ 2,6) bis hohe Krankheitsaktivität (DAS ≥ 5,1) gezeigt.

Aus Abb. 5 (DAS BSG) geht hervor, dass es zwar signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gibt, aber die IL-3 Produktion durch CD4⁺ T-Zellen nicht direkt in Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität der Rheumatoiden Arthritis zu stehen scheint.

So steigt der prozentuale Anteil der IL-3⁺ CD4⁺ T-Zellen von 1,2 ± 0,1% bei den gesunden Kontrollen auf 1,9 ± 0,1% bei den in Remission befindlichen Patienten (DAS < 2,6) höchst signifikant an (p=0,0002). Jedoch zeigt sich eine höchst signifikante Reduktion der IL-3⁺ CD4⁺ T-Zellen im Vergleich der Patienten in Remission (DAS < 2,6) von 1,9 ± 0,1% auf 1,2 ± 0,1% bei niedriger Krankheitsaktivität (DAS ≥ 2,6) der RA (p=0,0004). Anschließend sinkt der Teil der IL-3⁺ CD4⁺ T-Zellen weiter auf 0,9 ± 0,3% bei den Patienten mit hoher Aktivität der RA (DAS ≥ 5,1), was signifikant niedriger ist als bei den Patienten in Remission (DAS < 2,6) (p=0,048).

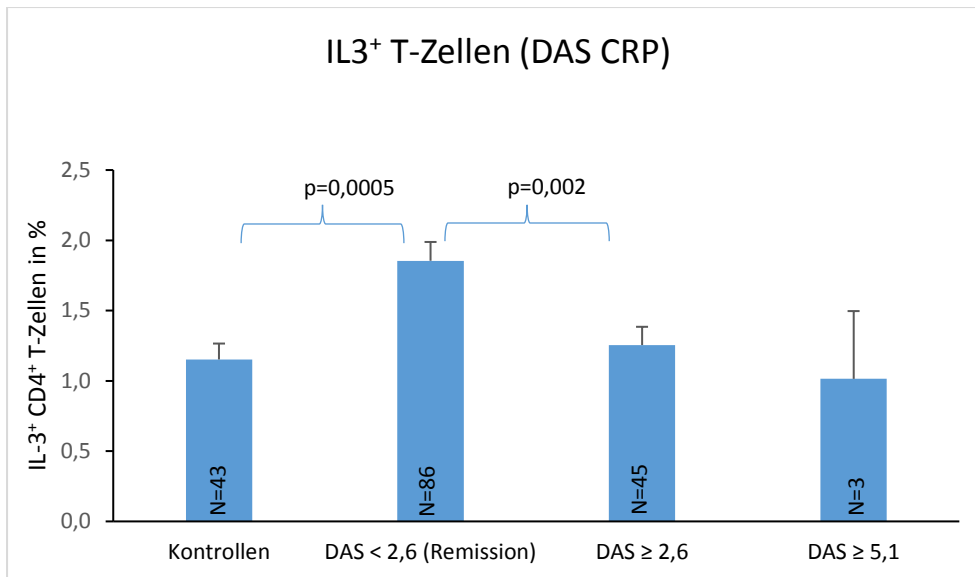


Abbildung 6: Prozentualer Anteil der IL-3⁺ CD4⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4⁺ T-Zellen nach intrazellulärer FACS-Färbung für IL-3 (CRP). Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde hier das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) und in aufsteigender Reihenfolge von niedriger (DAS ≥ 2,6) bis hohe Krankheitsaktivität (DAS ≥ 5,1) gezeigt.

Verglichen mit der Darstellung des prozentualen Anteils der IL-3⁺ CD4⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4⁺ T-Zellen in Abb. 5 (DAS BSG) zeigt Abb.6 (DAS CRP) ähnliche Resultate. Hier steigt der Anteil der IL-3⁺ CD4⁺ T-Zellen von 1,2 ± 0,1% bei den gesunden Kontrollen auf 1,9 ± 0,1% bei den Patienten in Remission (DAS < 2,6) mit höchst signifikantem Unterschied (p=0,0005). Der prozentuale Anteil der IL-3⁺ CD4⁺ T-Zellen fällt unter den RA Patienten bei steigender Krankheitsaktivität kontinuierlich von 1,9 ± 0,1% bei den in Remission befindlichen Patienten (DAS < 2,6) auf 1,3 ± 0,1% bei den Patienten mit niedriger Krankheitsaktivität (DAS ≥ 2,6) mit einem hoch signifikanten Unterschied (p=0,002) und weiter auf 1,0 ± 0,5% bei den an hoher Aktivität der RA leidenden Patienten (DAS ≥ 5,1).

An dieser Stelle lässt sich ebenso kein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl IL-3⁺ CD4⁺ T-Zellen und der Aktivität der RA finden.

3.2.2 CD8⁺ T-Zellen als mögliche Quelle von IL-3

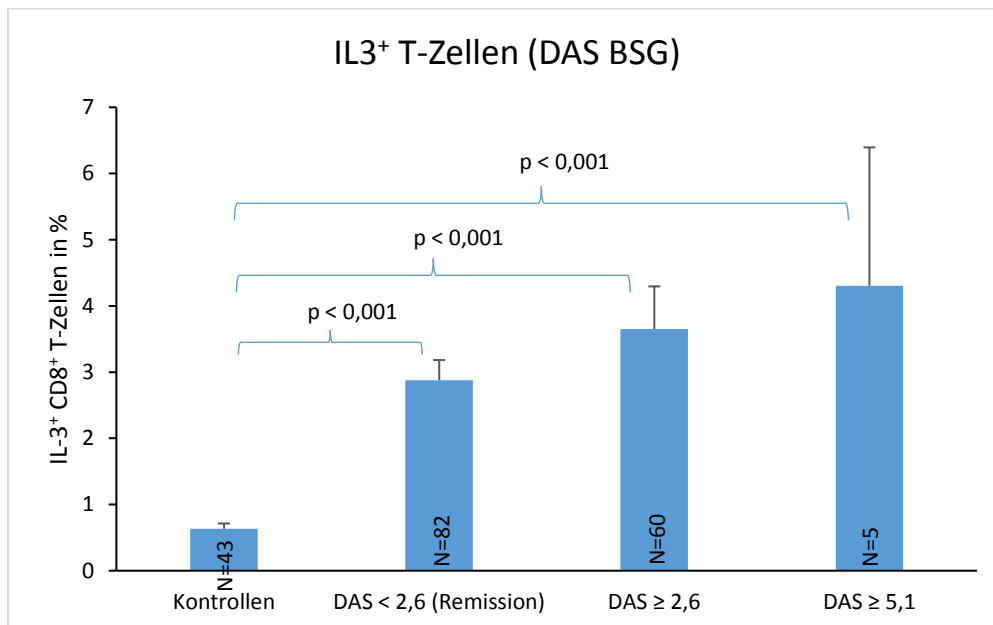


Abbildung 7: Prozentualer Anteil der IL-3⁺ CD8⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen nach intrazellulärer FACS-Färbung für IL-3 (BSG). Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde hier die BSG als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) und in aufsteigender Reihenfolge von niedriger (DAS ≥ 2,6) bis hohe Krankheitsaktivität (DAS ≥ 5,1) gezeigt.

Abb. 7 (DAS BSG) zeigt einen kontinuierlichen Anstieg der IL-3⁺ CD8⁺ T-Zellen mit stärker werdender Aktivität der RA. So ließen sich bei den Untersuchungen höchst signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachweisen.

Der prozentuale Anteil der IL-3⁺ CD8⁺ T-Zellen steigt von $0,6 \pm 0,1\%$ bei den gesunden Kontrollen auf $2,9 \pm 0,3\%$ bei den in Remission (DAS < 2,6) befindlichen Patienten ($p < 0,001$), was mehr als dem Vierfachen entspricht. Darüber hinaus steigt deren Anteil auf $3,6 \pm 0,6\%$ bei den Patienten mit niedriger Krankheitsaktivität (DAS ≥ 2,6) im Vergleich zu den Kontrollen ($p < 0,001$). Der Vergleich der gesunden Kontrollgruppe mit den Patienten mit hoher Aktivität der RA (DAS ≥ 5,1) zeigt ebenso einen höchst signifikanten Unterschied. Hier steigt der Anteil der IL-3⁺ CD8⁺ T-Zellen von $0,6 \pm 0,1\%$ bei den Kontrollen auf $4,3 \pm 2,1\%$, und somit mehr als das Siebenfache, bei den unter hoher Krankheitsaktivität (DAS ≥ 5,1) leidenden Patienten ($p < 0,001$).

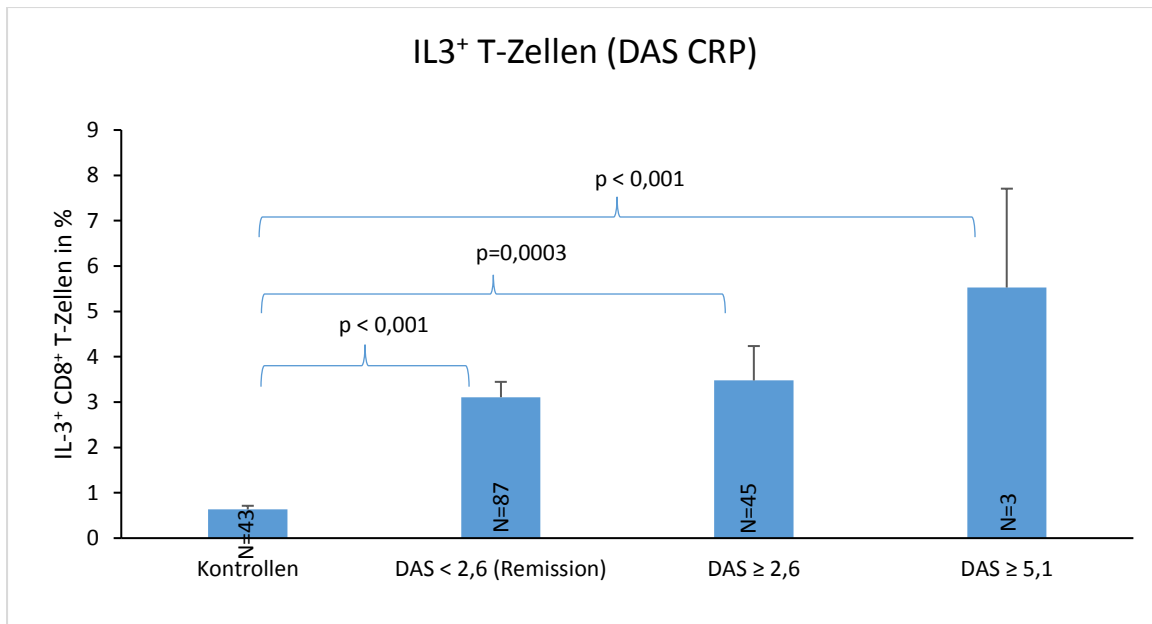


Abbildung 8: Prozentualer Anteil der IL-3⁺ CD8⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen nach intrazellulärer FACS-Färbung für IL-3 (CRP). Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde hier das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) und in aufsteigender Reihenfolge von niedriger (DAS ≥ 2,6) bis hohe Krankheitsaktivität (DAS ≥ 5,1) gezeigt.

Die Resultate in Abb. 8 (DAS CRP) ähneln denen in Abb. 7 (DAS BSG). Ebenso wird hier ein kontinuierliches Ansteigen des prozentualen Anteils der IL-3⁺ CD8⁺ T-Zellen in Abhängigkeit der Krankheitsaktivität beobachtet. Abb. 8 zeigt höchst signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Der Anteil der IL-3⁺ CD8⁺ T-Zellen steigt von $0,6 \pm 0,1\%$ in der Kontrollgruppe auf, mit $3,1 \pm 0,3\%$, mehr als das Fünffache bei den in Remission (DAS < 2,6) befindlichen Patienten ($p < 0,001$). Vergleicht man die gesunden Kontrollen mit der Patientengruppe niedriger Krankheitsaktivität (DAS ≥ 2,6) zeigt sich ein höchst signifikanter ($p = 0,0003$) Anstieg von $0,6 \pm 0,1\%$ auf $3,5 \pm 0,8\%$. Bei den Patienten mit hoher Aktivität der RA (DAS ≥ 5,1) ist ein, verglichen mit der Kontrollgruppe, mit $5,5 \pm 2,2\%$ auf mehr als das Neunfache angestiegener Wert messbar ($p < 0,001$).

3.3 Untersuchung der potentiellen Quellen von IL-2

Neben IL-3 war auch das Zytokin IL-2 im Rahmen dieser Arbeit von Bedeutung. So wurde es in der intrazellulären FACS-Färbung auch analysiert und in Zusammenhang mit den aktivierten T-Zellen betrachtet. Die zuvor stattgefundenene extrazelluläre Färbung der PBMCs ermöglicht eine Differenzierung zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Die IL-2 Produktion wurde auch auf einen möglichen Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität der RA untersucht.

3.3.1 CD4⁺ T-Zellen als mögliche Quelle von IL-2

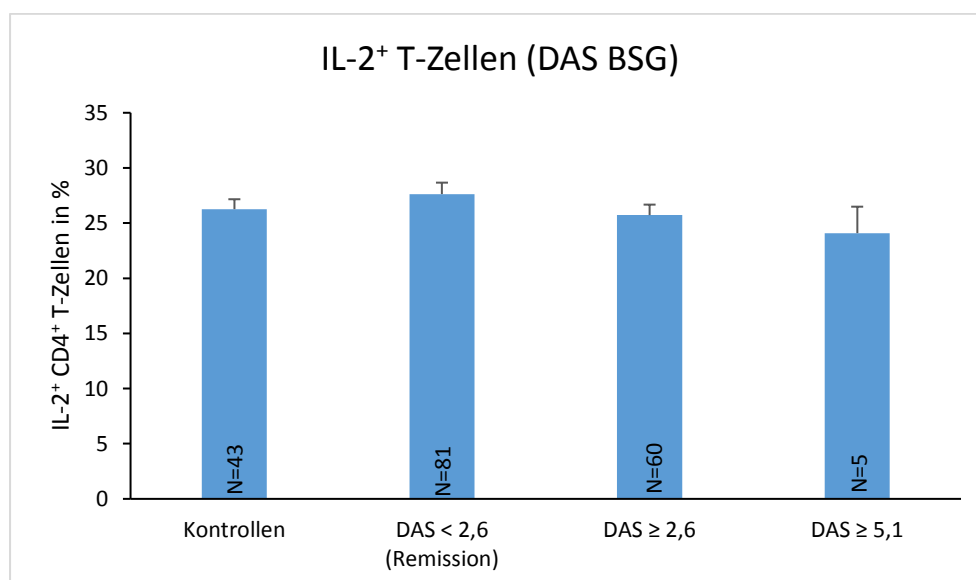


Abbildung 9: Prozentualer Anteil der IL-2⁺ CD4⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4⁺ T-Zellen nach intrazellulärer FACS-Färbung für IL-2 (BSG). Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde hier die BSG als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) und in aufsteigender Reihenfolge von niedriger (DAS ≥ 2,6) bis hohe Krankheitsaktivität (DAS ≥ 5,1) gezeigt.

Aus Abb. 9 (DAS BSG) wird eine kontinuierliche Senkung der IL-2⁺ CD4⁺ T-Zellen mit steigender Krankheitsaktivität der RA ersichtlich. Nach einem Anstieg des prozentualen Anteils der IL-2⁺ CD4⁺ T-Zellen von 26,3 ± 0,9% in der Kontrollgruppe auf 27,6 ± 1,0% bei den in Remission befindlichen RA Patienten (DAS < 2,6) kommt es zu einem kontinuierlichen Abfall unter den Patienten mit steigender Krankheitsaktivität der RA. So sinkt der prozentuale Anteil der IL-2⁺ CD4⁺ T-Zellen von

27,6 ± 1,0% bei den Patienten in Remission (DAS < 2,6) auf 25,7 ± 1,0% in der Patientengruppe mit niedriger Krankheitsaktivität (DAS ≥ 2,6) bis auf schließlich 24,1 ± 2,4% bei den unter hoher Aktivität der RA leidenden Patienten (DAS ≥ 5,1).

Signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen sind jedoch nicht erkennbar.

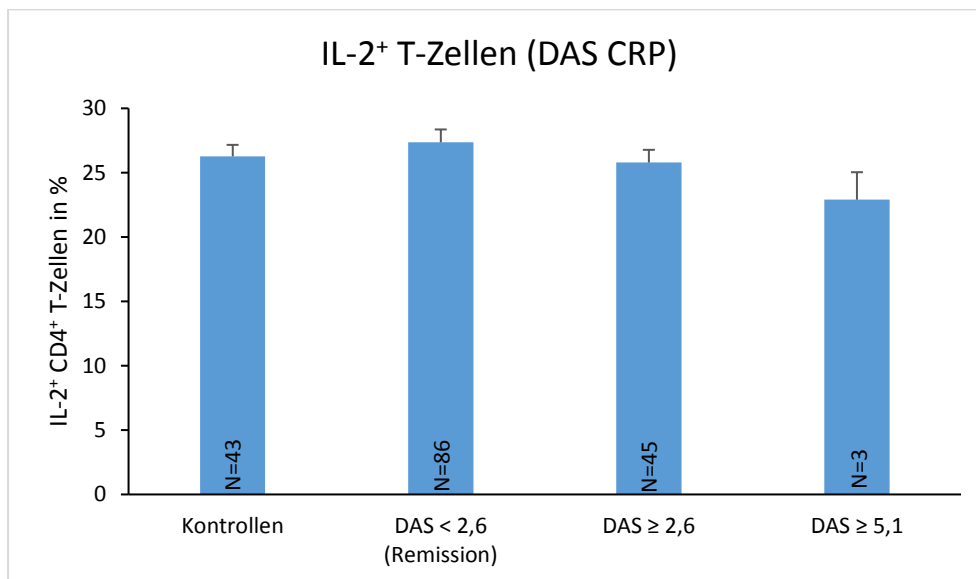


Abbildung 10: Prozentualer Anteil der IL-2⁺ CD4⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4⁺ T-Zellen nach intrazellulärer FACS-Färbung für IL-2 (CRP). Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde hier das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) und in aufsteigender Reihenfolge von niedriger (DAS ≥ 2,6) bis hohe Krankheitsaktivität (DAS ≥ 5,1) gezeigt.

Ähnlich wie Abb. 9 (DAS BSG) zeigt auch Abb. 10 (DAS CRP) eine kontinuierliche Reduktion des prozentualen Anteils der IL-2⁺ CD4⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4⁺ T-Zellen mit steigender Aktivität der RA. Der Prozentsatz der IL-2⁺ CD4⁺ T-Zellen steigt zunächst von 26,3 ± 0,9% in der gesunden Kontrollgruppe auf 27,4 ± 1,0% bei den in Remission befindlichen Patienten (DAS < 2,6). Vergleicht man die RA Patienten untereinander, kommt es zu einem kontinuierlichen Abfall des prozentualen Anteils der IL-2⁺ CD4⁺ T-Zellen mit steigender Krankheitsaktivität. So sinkt der prozentuale Anteil der IL-2⁺ CD4⁺ T-Zellen von 27,4 ± 1,0% bei den Patienten in Remission (DAS < 2,6) auf 25,8 ± 1,0% in der Patientengruppe mit niedriger Krankheitsaktivität (DAS ≥ 2,6) bis auf schließlich 22,9 ± 2,1% bei den unter hoher Aktivität der RA leidenden Patienten (DAS ≥ 5,1).

Wie beim DAS BSG sind auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erkennbar.

3.3.2 CD8⁺ T-Zellen als mögliche Quelle von IL-2

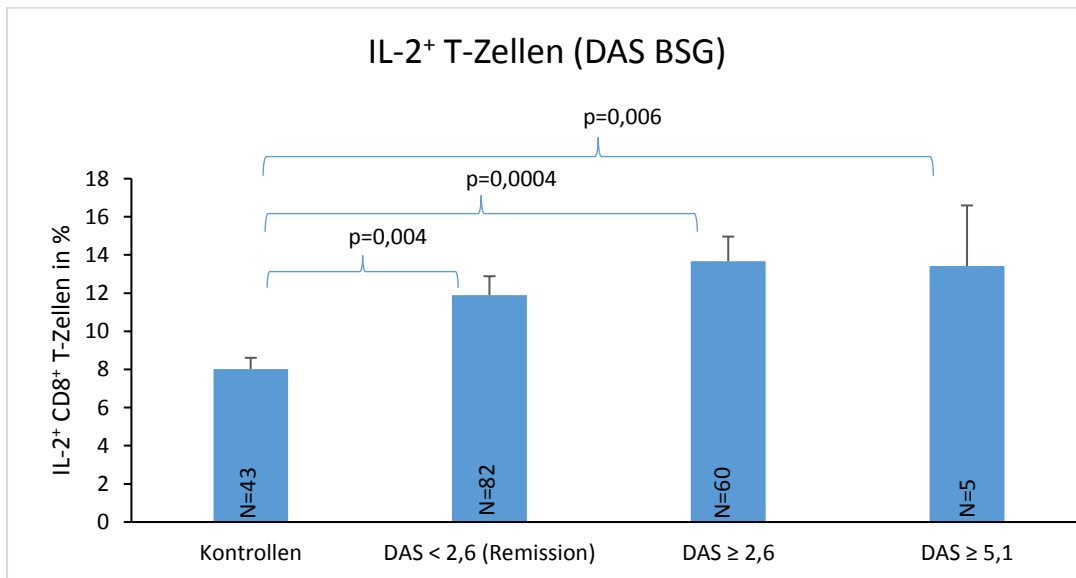


Abbildung 11: Prozentualer Anteil der IL-2⁺ CD8⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen nach intrazellulärer FACS-Färbung für IL-2 (BSG). Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde hier die BSG als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) und in aufsteigender Reihenfolge von niedriger (DAS ≥ 2,6) bis hohe Krankheitsaktivität (DAS ≥ 5,1) gezeigt.

Abb. 11 (DAS BSG) zeigt eine kontinuierliche Zunahme des prozentualen Anteils der IL-2⁺ CD8⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen und einen möglichen Zusammenhang mit steigender Krankheitsaktivität der RA. Lediglich zwischen den Patienten mit niedriger Aktivität der RA (DAS ≥ 2,6) und den an hoher Krankheitsaktivität leidenden Patienten (DAS ≥ 5,1) kommt es zu einem geringen Abfall von 13,7 ± 1,3% auf 13,4 ± 3,2%, der jedoch nicht signifikant ist (p=0,48).

Der Anteil der IL-2⁺ CD8⁺ T-Zellen erhöht sich von 8,0 ± 0,6% bei den gesunden Kontrollen hoch signifikant (p=0,004) auf 11,9 ± 1,0% bei den Patienten in Remission (DAS < 2,6) und steigt weiter auf 13,7 ± 1,3% bei den Patienten mit niedriger Aktivität der RA (DAS ≥ 2,6). Der Anstieg zwischen der Kontrollgruppe und der Patientengruppe mit niedriger Krankheitsaktivität (DAS ≥ 2,6) stellt sich höchst signifikant (p=0,0004) dar. Ebenso ist der prozentuale Anteil an IL-2⁺ CD8⁺ T-Zellen

der unter hoher Krankheitsaktivität leidenden Patienten (DAS $\geq 5,1$) mit $13,4 \pm 3,2\%$ im Vergleich zu den gesunden Kontrollen hoch signifikant ($p=0,006$) größer.

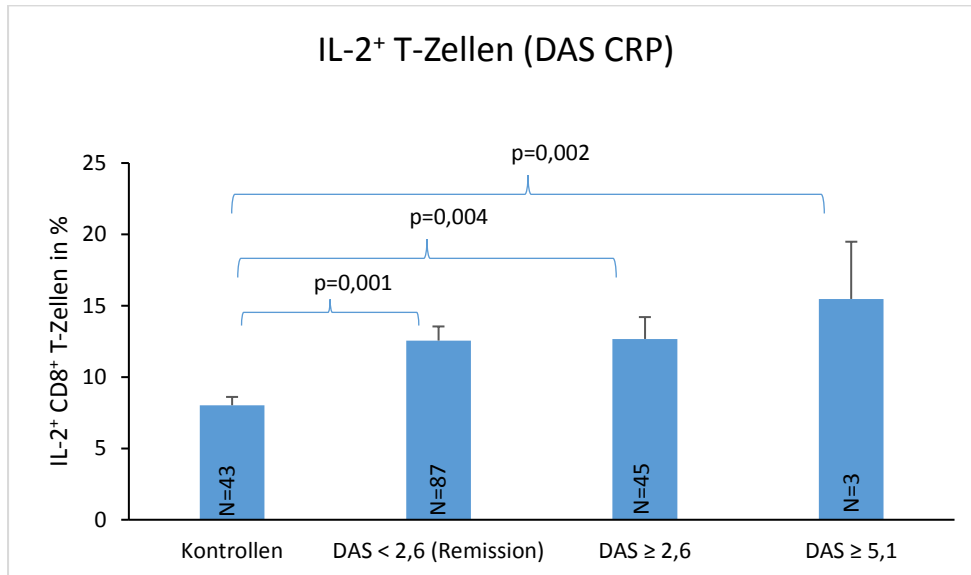


Abbildung 12: Prozentualer Anteil der IL-2+ CD8+ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8+ T-Zellen nach intrazellulärer FACS-Färbung für IL-2 (CRP). Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde hier das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) und in aufsteigender Reihenfolge von niedriger (DAS $\geq 2,6$) bis hohe Krankheitsaktivität (DAS $\geq 5,1$) gezeigt.

Aus Abb. 12 (DAS CRP) geht, ähnlich wie aus Abb. 11 (DAS BSG), ein möglicher Zusammenhang zwischen steigendem Anteil IL-2+ CD8+ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8+ T-Zellen und zunehmender Aktivität der RA hervor. Es sind signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erkennbar.

Wie Abb. 11 (DAS BSG) zeigt auch Abb. 12 (DAS CRP) einen kontinuierlichen Anstieg des prozentualen Anteils der IL-2+ CD8+ T-Zellen von $8,0 \pm 0,6\%$ bei den gesunden Kontrollen auf $12,6 \pm 1,0\%$ bei den in Remission befindlichen Patienten (DAS < 2,6) und weiter auf $12,7 \pm 1,5\%$ bei den Patienten mit niedriger Aktivität der RA (DAS $\geq 2,6$) bis auf $15,5 \pm 4,0\%$ bei den unter hoher Krankheitsaktivität leidenden Patienten (DAS $\geq 5,1$).

Der Anstieg zwischen den gesunden Kontrollen und den in Remission befindlichen Patienten (DAS < 2,6) stellt sich höchst signifikant dar ($p=0,001$). Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt sich der prozentuale Anteil der IL-2+ CD8+ T-Zellen bei Patienten mit niedriger Krankheitsaktivität (DAS $\geq 2,6$) hoch signifikant erhöht ($p=0,004$).

Der prozentuale Anteil der IL-2⁺ CD8⁺ T-Zellen bei den Patienten mit hoher Aktivität der RA (DAS \geq 5,1) ist hoch signifikant größer als bei den gesunden Probanden (p=0,002).

3.4 Untersuchung der potentiellen Quellen von IL-17

IL-17 war ebenso wie IL-3 und IL-2 Ziel der intrazellulären FACS-Analyse der zuvor aktivierten T-Zellen. Auch hier soll die untersucht werden, ob CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen mögliche Quellen dieses Zytokins darstellen und ob die IL-17-Produktion in Kontext mit der Schwere der RA steht.

3.4.1 CD4⁺ T-Zellen als mögliche Quelle von IL-17

Die Auswertung des prozentualen Anteils der IL-17⁺ CD4⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4⁺ T-Zellen zeigt sowohl beim DAS BSG als auch beim DAS CRP keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Es waren lediglich sehr wenige Zellen überhaupt IL-17⁺.

3.4.2 CD8⁺ T-Zellen als mögliche Quelle von IL-17

Bei der Untersuchung des prozentualen Anteils der IL-17⁺ CD8⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen beim DAS CRP waren keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erkennbar. Aus dem DAS BSG gehen ähnliche Ergebnisse hervor.

3.5 Expression der IL-3-Rezeptor- α -Kette

Die Untersuchung der Expression der IL-3-Rezeptor- α -Kette auf der Zelloberfläche von Basophilen Granulozyten und plasmazytoiden Dendritischen Zellen ist ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit. Ermittelt wurde die Expressionsstärke der IL-3-Rezeptor- α -Kette mittels extrazellulärer FACS-Färbung des Oberflächenantigens CD123 auf den unterschiedlichen Zelltypen, wobei die mittlere Fluoreszenzintensität ausschlaggebend war.

Es stellt sich die Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen der IL-3-Rezeptor-Expression und dem Schweregrad der RA.

3.5.1 Expression der IL-3-Rezeptor- α -Kette auf Basophilen Granulozyten

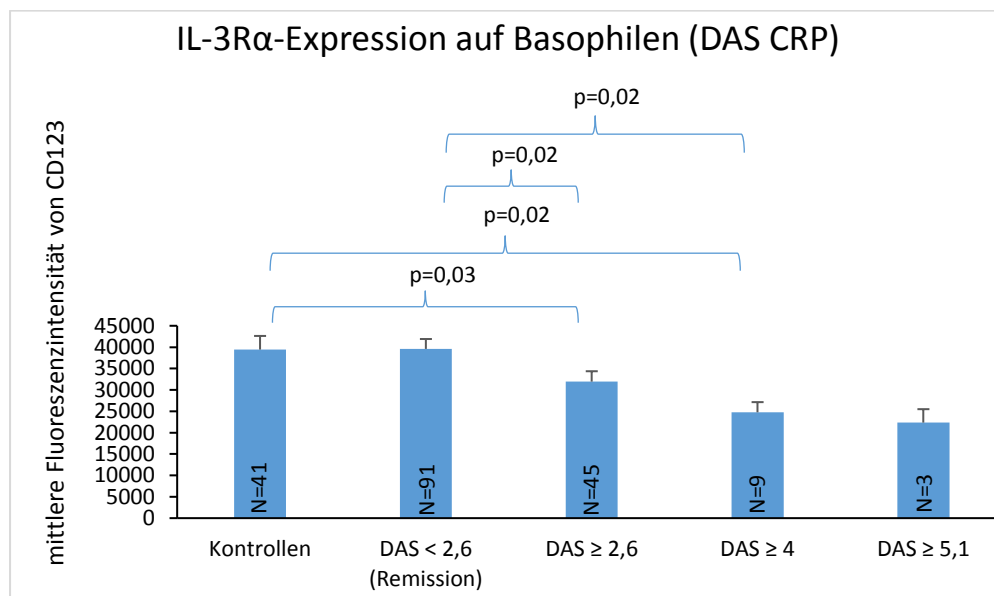


Abbildung 13: Expression der IL-3-Rezeptor- α -Kette auf der Zelloberfläche Basophiler Granulozyten nach extrazellulärer FACS-Färbung (CRP). Die Stärke der Expression wird als MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) von CD123 angegeben. Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde hier das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) und in aufsteigender Reihenfolge von niedriger (DAS ≥ 2,6) über moderate (DAS ≥ 4) bis hohe Krankheitsaktivität (DAS ≥ 5,1) gezeigt.

Abb. 13 zeigt einen Abfall der mittleren Fluoreszenzintensität von CD123 auf der Zelloberfläche Basophiler Granulozyten, und somit der Expressionsstärke der IL-3-Rezeptor- α -Kette, in Zusammenhang mit der immer stärker werdenden

Krankheitsaktivität. In Abb. 13 sind signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erkennbar.

Nach einem nicht signifikanten Anstieg ($p=0,48$) der MFI von 39.437 ± 3.189 bei den gesunden Kontrollen auf 39.592 ± 2.312 bei den Patienten in Remission ($DAS < 2,6$) zeigt sich ein stetiger Abfall der MFI auf 31.940 ± 2.426 bei den Patienten mit niedriger Krankheitsaktivität ($DAS \geq 2,6$), weiter auf 24.758 ± 2.381 bei Patienten mit moderater Aktivität der RA ($DAS \geq 4$) bis auf schließlich 22.348 ± 3.144 bei Patienten mit hoher Krankheitsaktivität ($DAS \geq 5,1$).

Der Abfall der MFI zwischen der Kontrollgruppe und den Patienten mit niedriger Krankheitsaktivität ($DAS \geq 2,6$) zeigt sich signifikant ($p=0,03$). Zwischen den gesunden Probanden und den Patienten mit moderater Aktivität der RA ($DAS \geq 4$) sinkt die MFI auch signifikant ab ($p=0,02$). Die Expressionsstärke der IL-3-Rezeptor- α -Kette ändert sich außerdem zwischen den sich in Remission befindenden Patienten ($DAS < 2,6$) und den Patienten mit niedriger ($DAS \geq 2,6$) bzw. moderater ($DAS \geq 4$) Aktivität der RA signifikant ($p=0,02$).

3.5.2 Expression der IL-3-Rezeptor- α -Kette auf plasmazytoiden Dendritischen Zellen

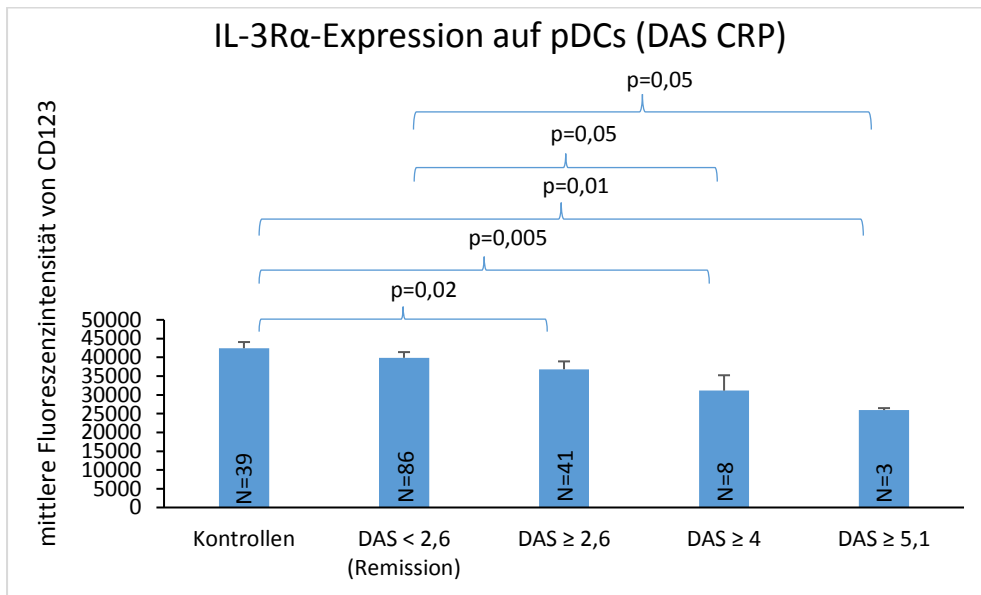


Abbildung 14: Expression der IL-3-Rezeptor- α -Kette auf der Zelloberfläche plasmazytoider Dendritischer Zellen nach extrazellulärer FACS-Färbung (CRP). Die Stärke der Expression wird als MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) von CD123 angegeben. Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde hier das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) und in aufsteigender Reihenfolge von niedriger (DAS ≥ 2,6) über moderate (DAS ≥ 4) bis hohe Krankheitsaktivität (DAS ≥ 5,1) gezeigt.

Abb. 14 zeigt einen stetigen Abfall der mittleren Fluoreszenzintensität von CD123 auf der Zelloberfläche plasmazytoider Dendritischer Zellen, und somit der Expressionsstärke der IL-3-Rezeptor- α -Kette, in Zusammenhang mit der immer stärker werdenden Krankheitsaktivität. In Abb. 14 sind signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erkennbar.

Die MFI sinkt von 42.436 ± 1.653 bei den gesunden Kontrollen auf 39.888 ± 1.522 bei den Patienten in Remission (DAS < 2,6), weiter auf 36.838 ± 2.098 bei den Patienten mit niedriger Krankheitsaktivität (DAS ≥ 2,6), anschließend auf 31.132 ± 4.105 bei Patienten mit moderater Aktivität der RA (DAS ≥ 4) bis auf schließlich 25.953 ± 530 bei Patienten mit hoher Krankheitsaktivität (DAS ≥ 5,1).

Die MFI von CD123 fällt zwischen den gesunden Kontrollen und den Patienten mit niedriger Krankheitsaktivität (DAS ≥ 2,6) signifikant ($p=0,02$) ab. Der Abfall der MFI

zwischen der Kontrollgruppe und den Patienten mit moderater Aktivität der RA (DAS ≥ 4) ist sogar hoch signifikant ($p=0,005$). Darüber hinaus ist ein ebenso hoch signifikanter ($p=0,01$) Unterschied zwischen den gesunden Kontrollen und den an hoher Krankheitsaktivität leidenden Patienten (DAS $\geq 5,1$) erkennbar. Auch der Abfall der Expressionsstärke der IL-3-Rezeptor- α -Kette zwischen den in Remission befindlichen Patienten (DAS $< 2,6$) und den Patienten mit moderater (DAS ≥ 4) bzw. hoher Krankheitsaktivität (DAS $\geq 5,1$) stellt sich als signifikant dar ($p=0,05$).

3.6 Expression der IL-3-Rezeptor- β_c -Kette

Die Expressionsstärke der β_c -Kette des IL-3-Rezeptors auf der Zelloberfläche von Basophilen Granulozyten und plasmazytoiden Dendritischen Zellen wurde, ebenso wie die der α -Kette, mithilfe einer extrazellulären FACS-Färbung untersucht. Die Aufmerksamkeit gilt hier dem Oberflächenantigen CD131, dessen mittlere Fluoreszenzintensität ermittelt wurde.

An dieser Stelle wurde aber kein Vollblut von RA-Patienten verwendet, sondern das Vollblut von gesunden Probanden. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression der IL-3-Rezeptor- β_c -Kette und der Konzentration von IL-3 zu entdecken, wurde die Blutprobe mit unterschiedlichen Konzentrationen von humanem rekombinantem IL-3 versetzt.

3.6.1 Expression der IL-3-Rezeptor- β c-Kette auf Basophilen Granulozyten

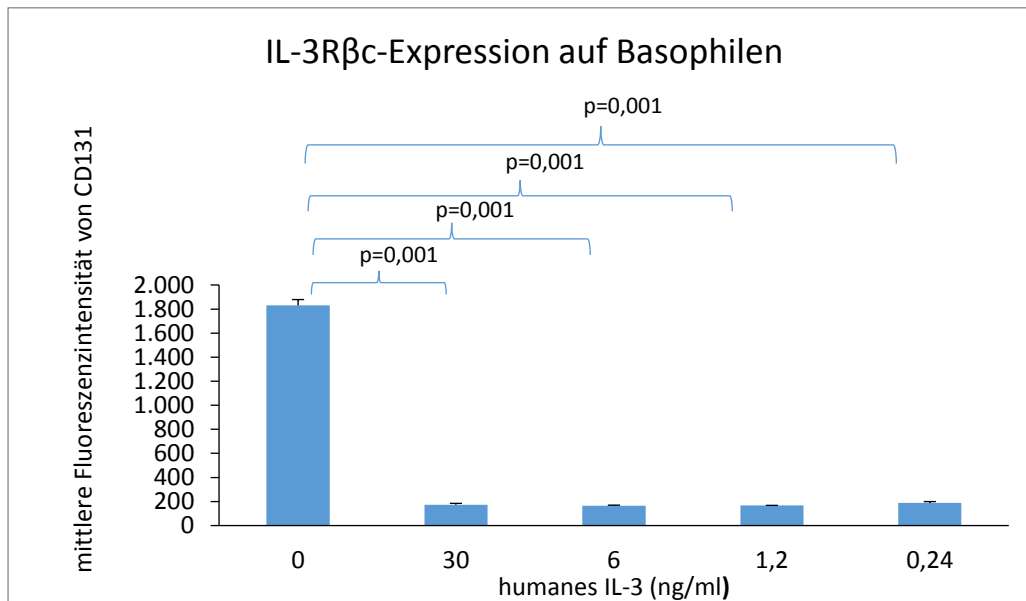


Abbildung 15: Expression der IL-3-Rezeptor- β c-Kette auf der Zelloberfläche Basophiler Granulozyten nach extrazellulärer FACS-Färbung. Die Stärke der Expression wird als MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) von CD131 angegeben. Die Proben wurden mit oben genannten Konzentrationen von humanem rekombinantem IL-3 vorab inkubiert.

Abb. 15 zeigt einen starken Abfall der mittleren Fluoreszenzintensität von CD131 auf der Zelloberfläche Basophiler Granulozyten, und somit der Expressionsstärke der IL-3-Rezeptor- β c-Kette, in Zusammenhang mit unterschiedlichen IL-3 Konzentrationen. In Abb. 15 sind höchst signifikante Unterschiede zwischen dem Kontrollwert und der 1:5-Verdünnungsreihe (Höchstkonzentration 30 ng/ml bis 0,24 ng/ml) erkennbar.

Die MFI sinkt von 1.830 ± 49 beim Kontrollwert auf 174 ± 11 bei der eingesetzten Höchstkonzentration des humanen rekombinanten IL-3 (30 ng/ml), weiter auf 165 ± 5 bei einer IL-3 Konzentration von 6 ng/ml. Anschließend beginnt die MFI der IL-3-Rezeptor- β c-Kette auf 168 ± 0 bei der 1,2 ng/ml Konzentration zu steigen und erhöht sich bis auf schließlich 189 ± 11 bei 0,24 ng/ml humanes IL-3. Somit fällt die MFI von CD131 bei den mit IL-3 versetzten Proben auf ca. 1/10 verglichen mit dem Kontrollwert ab.

Je stärker verdünnt das humane rekombinante IL-3 im Vollblut vorliegt, umso stärker beginnt die MFI der IL-3-Rezeptor- β c-Kette wieder zu steigen.

Der Abfall der MFI von CD131 zwischen dem Kontrollwert und der Höchstkonzentration des eingesetzten IL-3 (30 ng/ml) bzw. der gesamten 1:5-Verdünnungsreihe stellt sich als höchst signifikant ($p=0,001$) dar.

3.6.2 Expression der IL-3-Rezeptor- β -Kette auf plasmazytoiden Dendritischen Zellen

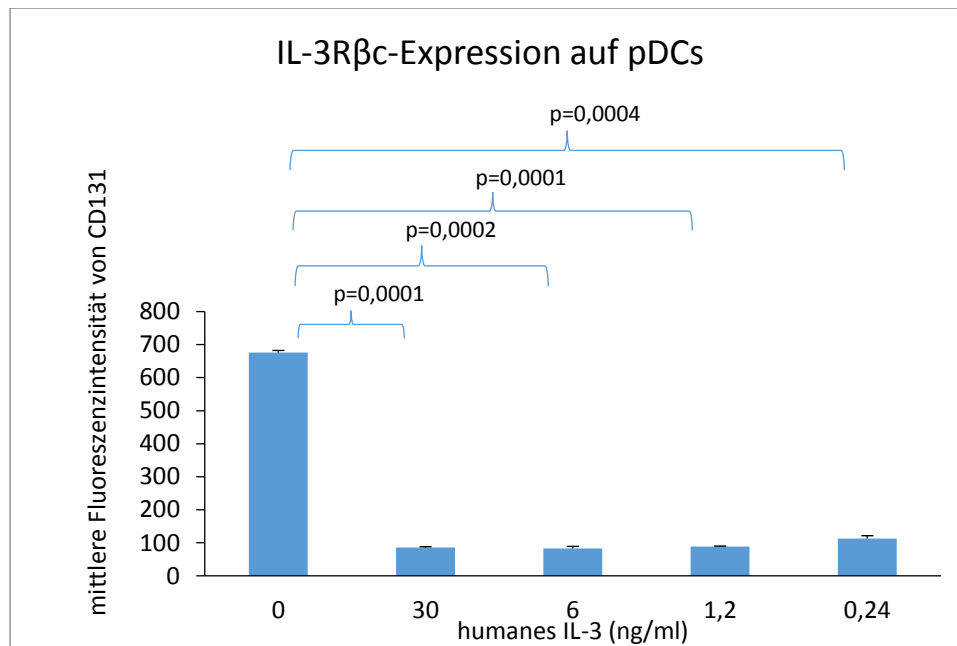


Abbildung 16: Expression der IL-3-Rezeptor- β -Kette auf der Zelloberfläche plasmazytoider Dendritischer Zellen nach extrazellulärer FACS-Färbung. Die Stärke der Expression wird als MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) von CD131 angegeben. Die Proben wurden mit oben genannten Konzentrationen von humanem rekombinantem IL-3 vorab inkubiert.

Abb. 16 zeigt einen starken Abfall der mittleren Fluoreszenzintensität von CD131 auf der Zelloberfläche plasmazytoider Dendritischer Zellen, und somit der Expressionsstärke der IL-3-Rezeptor- β -Kette, in Zusammenhang mit unterschiedlichen IL-3 Konzentrationen. In Abb. 16 sind höchst signifikante Unterschiede zwischen dem Kontrollwert und der 1:5-Verdünnungsreihe (Höchstkonzentration 30 ng/ml bis 0,24 ng/ml) erkennbar.

Die MFI sinkt von 676 ± 6 beim Kontrollwert auf 86 ± 2 bei der eingesetzten Höchstkonzentration des humanen rekombinanten IL-3 (30 ng/ml), weiter auf 83 ± 7 bei einer IL-3 Konzentration von 6 ng/ml. Anschließend beginnt die MFI der IL-3-Rezeptor- β -Kette auf 89 ± 2 bei der 1,2 ng/ml Konzentration zu steigen und erhöht

sich bis auf schließlich 113 ± 8 bei 0,24 ng/ml humanes IL-3. Somit fällt die MFI von CD131 bei den mit IL-3 versetzten Proben auf überwiegend weniger als 1/6 verglichen mit dem Kontrollwert ab.

Je stärker verdünnt das humane rekombinante IL-3 im Vollblut vorliegt, umso stärker beginnt die MFI der IL-3-Rezeptor- β c-Kette wieder zu steigen.

Der Abfall der MFI von CD131 zwischen dem Kontrollwert und der Höchstkonzentration des eingesetzten IL-3 (30 ng/ml) bzw. der 1,2 ng/ml Konzentration an humanem IL-3 stellt sich als höchst signifikant ($p=0,0001$) dar. Die Expressionsstärke der IL-3-Rezeptor- β c-Kette sinkt auch zwischen dem Kontrollwert und der IL-3 Konzentration von 6 ng/ml bzw. 0,24 ng/ml höchst signifikant ($p=0,0002$ bzw. $p=0,0004$).

3.7 Aktivität Basophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der IL-3 Konzentration

Da den Basophilen Granulozyten die Wirkung des IL-3 bei der Rheumatoiden Arthritis zugesprochen wird, wurde deren Aktivität in Zusammenhang mit unterschiedlich hohen IL-3 Konzentrationen untersucht. Mittels extrazellulärer Färbung von Vollblut wurde die Expression des Aktivitätsmarkers CD203c auf der Oberfläche von Basophilen Granulozyten ermittelt.

An dieser Stelle wurde, wie bei der Untersuchung der IL-3-Rezeptor- β c-Kette, kein Vollblut von RA Patienten verwendet, sondern das Vollblut von gesunden Probanden. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression des Aktivitätsmarkers CD203c humaner Basophiler Granulozyten und der Konzentration von IL-3 zu entdecken, wurden die Blutproben mit unterschiedlichen Konzentrationen an humanem rekombinantem IL-3 versetzt.

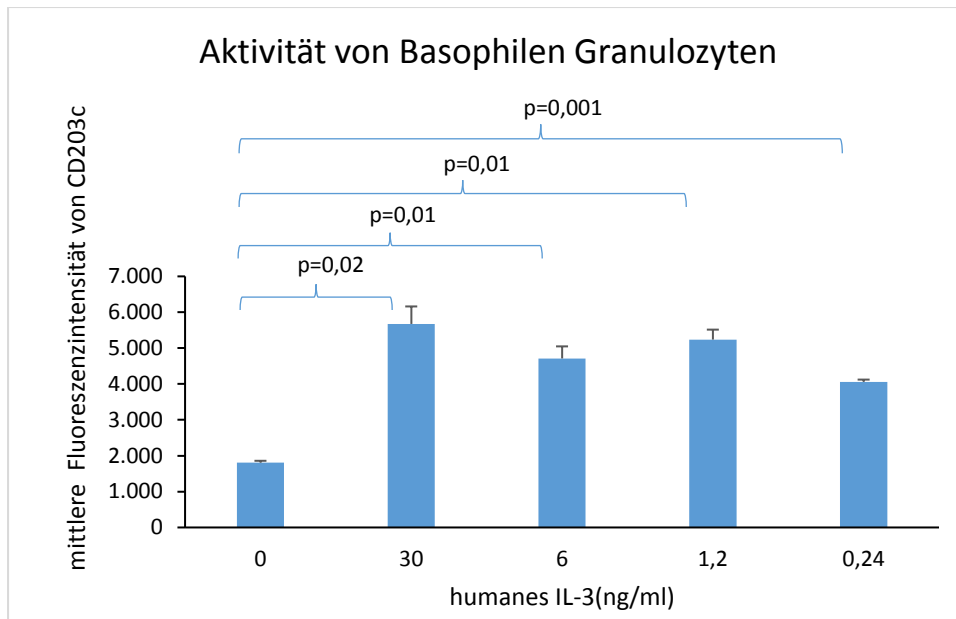


Abbildung 17: Expression des Aktivitätsmarkers CD203c von Basophilen Granulozyten auf deren Zelloberfläche nach extrazellulärer FACS-Färbung. Die Stärke der Expression wird als MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) von CD203c angegeben. Die Proben wurden mit oben genannten Konzentrationen von humanem rekombinanten IL-3 vorab inkubiert.

Abb. 17 zeigt einen starken Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität von CD203c auf der Zelloberfläche Basophiler Granulozyten, und somit der Aktivität der Basophilen Granulozyten, in Zusammenhang mit unterschiedlichen IL-3 Konzentrationen. In Abb. 17 sind signifikante Unterschiede zwischen dem Kontrollwert und der 1:5-Verdünnungsreihe erkennbar.

Die MFI erhöht sich von 1.805 ± 54 beim Kontrollwert auf 5.674 ± 488 bei der eingesetzten Höchstkonzentration des humanen rekombinanten IL-3 von 30 ng/ml und sinkt anschließend auf 4.712 ± 337 bei einer IL-3 Konzentration von 6 ng/ml. Von hier steigt die MFI von CD203c erneut an auf 5.238 ± 278 bei der 1,2 ng/ml Konzentration. Im Anschluss daran fällt die Aktivität der Basophilen Granulozyten jedoch wieder ab auf 4.058 ± 65 bei 0,24 ng/ml humanes IL-3.

Somit steigt die MFI von CD203c bei den mit IL-3 versetzten Proben auf mehr als das 2- bis 3-Fache verglichen mit dem Kontrollwert an.

Der Anstieg der MFI zwischen dem Kontrollwert und der Höchstkonzentration des eingesetzten IL-3 (30 ng/ml) stellt sich als signifikant ($p=0,02$) dar. Die Expressionsstärke der Aktivität humaner Basophiler Granulozyten erhöht sich zwischen dem Kontrollwert und der 6 ng/ml Konzentration bzw. 1,2 ng/ml

Konzentration hoch signifikant ($p=0,01$). Der zwischen dem Kontrollwert und 0,24 ng/ml humanes IL-3 gemessene Unterschied ist sogar höchst signifikant ($p=0,001$).

3.8 Anzahl Basophiler Granulozyten im peripheren Blut

Da die Basophilen Granulozyten stark in Verbindung mit der Wirkung des IL-3 bei der Rheumatoiden Arthritis stehen sollen, wurde mittels extrazellulärer FACS-Färbung die Anzahl dieser Zellen / μl im peripheren Blut ermittelt. Das Interesse gilt hier einem möglichen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Basophilen Granulozyten im Vollblut und der Krankheitsaktivität der RA.

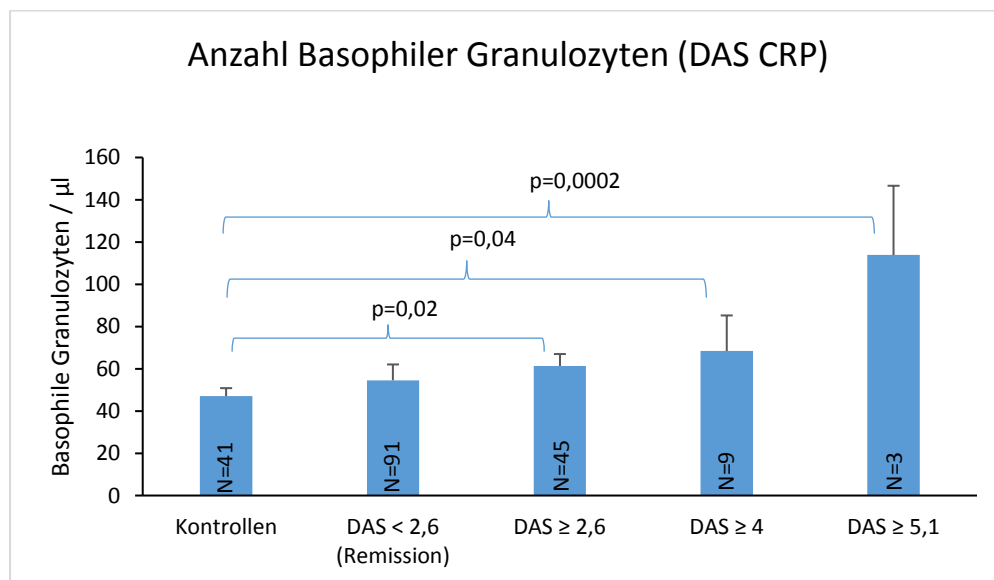


Abbildung 18: Anzahl von Basophilen Granulozyten / μl im peripheren Vollblut nach extrazellulärer FACS-Färbung (CRP). Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde hier das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) und in aufsteigender Reihenfolge von niedriger (DAS ≥ 2,6) über moderate (DAS ≥ 4) bis hohe Krankheitsaktivität (DAS ≥ 5,1) gezeigt.

Man kann in Abb. 18 einen kontinuierlichen Anstieg der Anzahl Basophiler Granulozyten in Zusammenhang mit steigender Krankheitsaktivität der RA feststellen. So steigt die Anzahl an Basophilen Granulozyten von 47 ± 4 Zellen/ μl bei den Kontrollen auf 55 ± 7 Zellen/ μl bei den Patienten in Remission ($\text{DAS} < 2,6$), anschließend erhöht sie sich auf 61 ± 6 Zellen/ μl bei niedriger Krankheitsaktivität ($\text{DAS} \geq 2,6$) und steigt weiter auf 68 ± 17 Zellen/ μl bei moderater Krankheitsaktivität ($\text{DAS} \geq 4$). Schließlich steigt die Anzahl der Basophilen Granulozyten auf 114 ± 33 Zellen/ μl bei Patienten, die an hoher Aktivität der RA leiden ($\text{DAS} \geq 5,1$).

Der Anstieg der Basophilen Granulozyten zwischen den gesunden Kontrollen und den Patienten mit niedriger Krankheitsaktivität ($\text{DAS} \geq 2,6$) stellt sich als signifikant ($p=0,02$) dar. Ein weiterer signifikanter ($p=0,04$) Unterschied besteht zwischen der Anzahl Basophiler Granulozyten in der Kontrollgruppe und dem Anstieg bei Patienten mit moderater Aktivität der RA ($\text{DAS} \geq 4$). Die Erhöhung der Zellzahl Basophiler Granulozyten zwischen den Kontrollen und den an hoher Aktivität der RA leidenden Patienten ($\text{DAS} \geq 5,1$) ist sogar höchst signifikant ($p=0,0002$).

Beim DAS BSG (hier nicht dargestellt) steigt die Anzahl der Basophilen Granulozyten im peripheren Blut ähnlich wie in der oben gezeigten Abbildung.

3.9 Anzahl der T-Zellen im peripheren Blut

Da die CD4^+ T-Zellen sowie die CD8^+ T-Zellen bereits im Rahmen der intrazellulären FACS-Färbung auf ihre Zytokinproduktion erforscht worden sind, steht nun die Anzahl der T-Zellen im peripheren Vollblut von RA Patienten im Fokus weiterer Untersuchungen. Es wurde jeweils die Anzahl der CD4^+ T-Zellen und der CD8^+ T-Zellen im Rahmen einer extrazellulären Färbung untersucht. Es galt einen möglichen Zusammenhang zwischen der Zellzahl/ μl im peripheren Vollblut und der Krankheitsaktivität der RA zu entdecken.

3.9.1 Anzahl der CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut

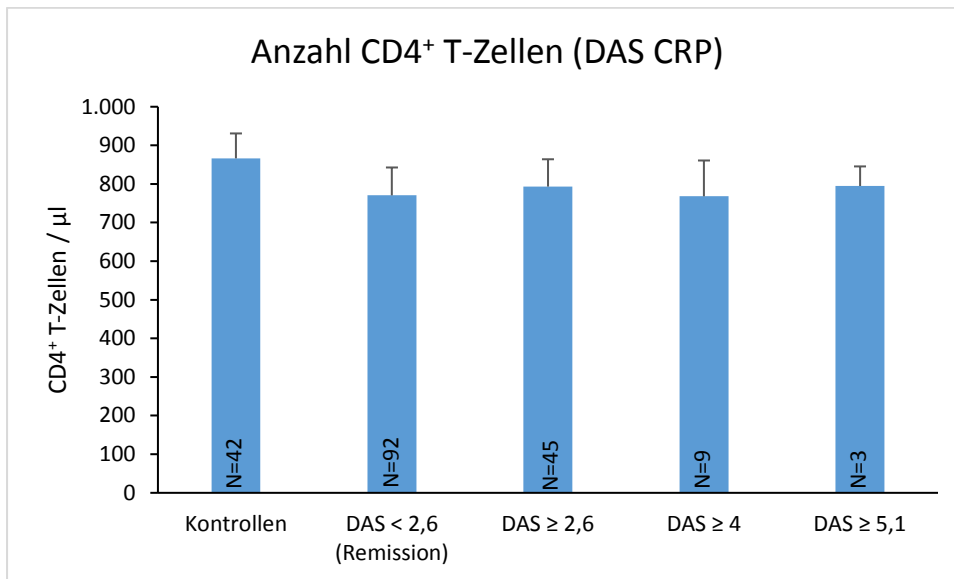


Abbildung 19: Anzahl CD4⁺ T-Zellen / μ l im peripheren Vollblut nach extrazellulärer FACS-Färbung (CRP). Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde hier das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) und in aufsteigender Reihenfolge von niedriger (DAS \geq 2,6) über moderate (DAS \geq 4) bis hohe Krankheitsaktivität (DAS \geq 5,1) gezeigt.

Aus Abb. 19 gehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen hervor. Weder zwischen den gesunden Kontrollen und den RA Patienten mit unterschiedlich starker Krankheitsaktivität noch zwischen den unterschiedlich stark ausgeprägten Aktivitäten der RA untereinander unterscheidet sich die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen signifikant.

3.9.2 Anzahl der CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut

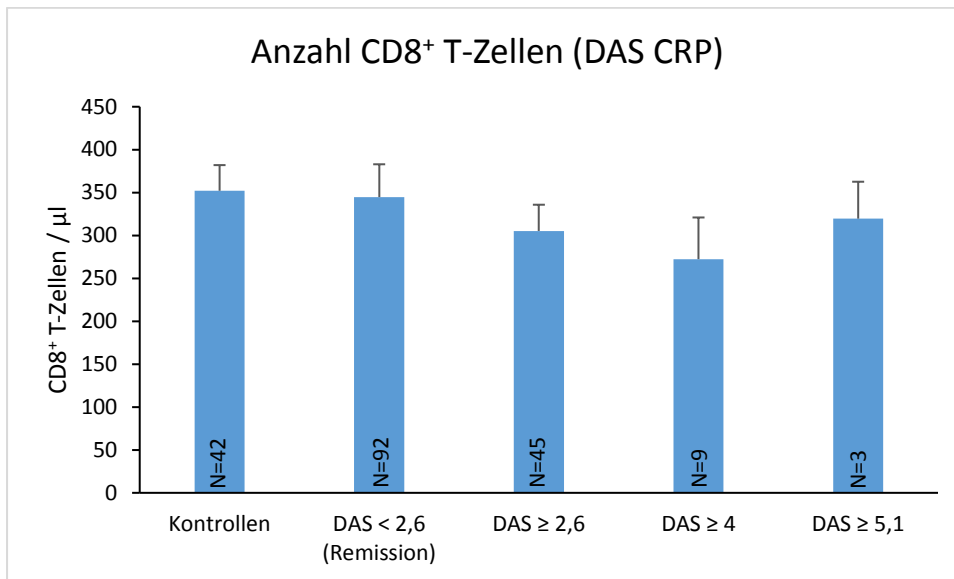


Abbildung 20: Anzahl CD8⁺ T-Zellen / μ l im peripheren Vollblut nach extrazellulärer FACS-Färbung (CRP). Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde hier das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) und in aufsteigender Reihenfolge von niedriger (DAS \geq 2,6) über moderate (DAS \geq 4) bis hohe Krankheitsaktivität (DAS \geq 5,1) gezeigt.

Aus Abb. 20 gehen, ebenso wie bei der Anzahl an CD4⁺ T-Zellen in Abb. 19, keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen hervor. Weder zwischen den gesunden Kontrollen und den RA Patienten mit unterschiedlich starker Krankheitsaktivität noch zwischen den unterschiedlich stark ausgeprägten Aktivitäten der RA untereinander unterscheidet sich die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen signifikant.

3.10 Bestimmung der Anzahl weiterer Zellen aus dem peripheren Blut

Mittels extrazellulärer FACS-Färbung wurden noch weitere Zellpopulationen quantifiziert, die möglicherweise in Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität der RA stehen.

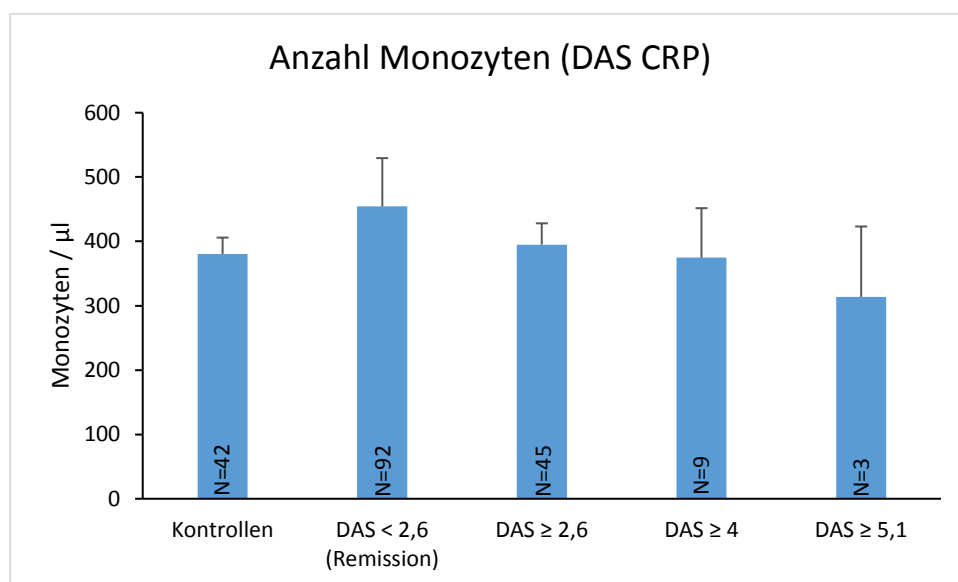


Abbildung 21: Anzahl von Monozyten / µl im peripheren Vollblut nach extrazellulärer FACS-Färbung (CRP). Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde hier das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6) und in aufsteigender Reihenfolge von niedriger (DAS ≥ 2,6) über moderate (DAS ≥ 4) bis hohe Krankheitsaktivität (DAS ≥ 5,1) gezeigt.

Aus Abb. 21 gehen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl der Monozyten zwischen den einzelnen Gruppen hervor. Weder zwischen den gesunden Kontrollen und den RA Patienten mit unterschiedlich starker Krankheitsaktivität noch zwischen den unterschiedlich stark ausgeprägten Aktivitäten der RA untereinander unterscheidet sich die Anzahl der Monozyten signifikant.

Das Ergebnis für die DAS BSG ist ähnlich (Daten hier nicht dargestellt).

Ebenso wurde im Rahmen der extrazellulären Färbung die Zellzahl der plasmazytoiden Dendritischen Zellen sowie der Eosinophilen Granulozyten pro 1 µl bestimmt. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bzw. Zusammenhänge mit der Krankheitsaktivität sowohl beim DAS BSG als auch beim DAS CRP beobachtet werden (Daten nicht dargestellt).

3.11 Anzahl der CD19⁺ B-Zellen im peripheren Blut

Mittels extrazellulärer FACS-Färbung wurde auch die Zahl der B-Zellen/ μ l im peripheren Blut ermittelt. Zur Identifikation der B-Lymphozyten bediente man sich des Oberflächenantigens CD19, welches von allen B-Zellen exprimiert wird. (80) Berücksichtigt wurde bei diesen Untersuchungen die Einnahme des monoklonalen anti-CD20-Antikörpers *Rituximab*, welcher eine Depletion der CD20⁺ B-Zellen sowie auch der CD19⁺ B-Zellen herbeiführt. (80)

3.11.1 Anzahl der CD19⁺ B-Zellen bei RA Patienten, die kein *Rituximab* erhalten haben

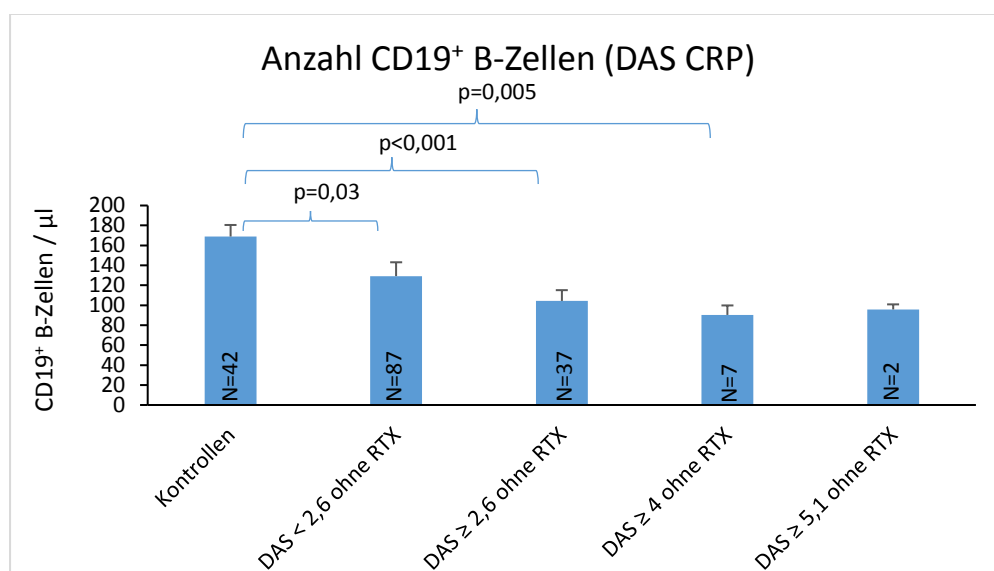


Abbildung 22: Anzahl von CD19⁺ B-Zellen / μ l nach extrazellulärer FACS-Färbung im peripheren Vollblut von Patienten, die kein *Rituximab* erhalten haben (CRP). Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde hier das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Neben den gesunden Probanden (Kontrollen) wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6 ohne RTX) und in aufsteigender Reihenfolge von niedriger (DAS \geq 2,6 ohne RTX) über moderate (DAS \geq 4 ohne RTX) bis hohe Krankheitsaktivität (DAS \geq 5,1 ohne RTX) gezeigt. Es werden Patienten unterschiedlicher Krankheitsaktivität der RA aufgeführt, die den anti-CD20-Antikörper *Rituximab* (RTX) nicht erhalten haben.

Abb. 22 zeigt signifikante Unterschiede bezüglich der Anzahl CD19⁺ B-Zellen in Abhängigkeit von der Aktivität der RA bei Patienten, welche *kein Rituximab* erhalten haben. Mit steigender Krankheitsaktivität geht hier ein zunehmender Abfall der Zahl CD19⁺ B-Zellen einher.

So sinkt die Anzahl an CD19⁺ B-Lymphozyten von 169 ± 12 Zellen/ μ l bei den Kontrollen auf 129 ± 14 Zellen/ μ l bei den Patienten in Remission (DAS < 2,6 ohne RTX), anschließend fällt sie auf 104 ± 11 Zellen/ μ l bei niedriger Krankheitsaktivität (DAS \geq 2,6 ohne RTX) und fällt weiter auf 90 ± 10 Zellen/ μ l bei moderater Krankheitsaktivität (DAS \geq 4 ohne RTX). Der Anstieg der Anzahl CD19⁺ B-Zellen von 90 ± 10 Zellen/ μ l bei moderater Aktivität der RA (DAS \geq 4 ohne RTX) auf 96 ± 5 Zellen/ μ l bei hoher Krankheitsaktivität (DAS \geq 5,1 ohne RTX) stellt sich nicht signifikant dar ($p=0,40$).

Der Abfall der Zahl der CD19⁺ B-Zellen zwischen den Kontrollen und der in Remission befindlichen Patienten (DAS < 2,6 ohne RTX) ist signifikant ($p=0,03$). Als höchst signifikant ($p<0,001$) stellt sich der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Patienten mit niedriger Krankheitsaktivität (DAS \geq 2,6 ohne RTX) dar. Zwischen den gesunden Kontrollen und den Patienten mit moderater Aktivität der RA (DAS \geq 4 ohne RTX) sinkt die Zahl der CD19⁺ B-Lymphozyten hoch signifikant ($p=0,005$).

3.11.2 Anzahl der CD19⁺ B-Zellen bei RA Patienten in Abhängigkeit von der *Rituximab*-Gabe

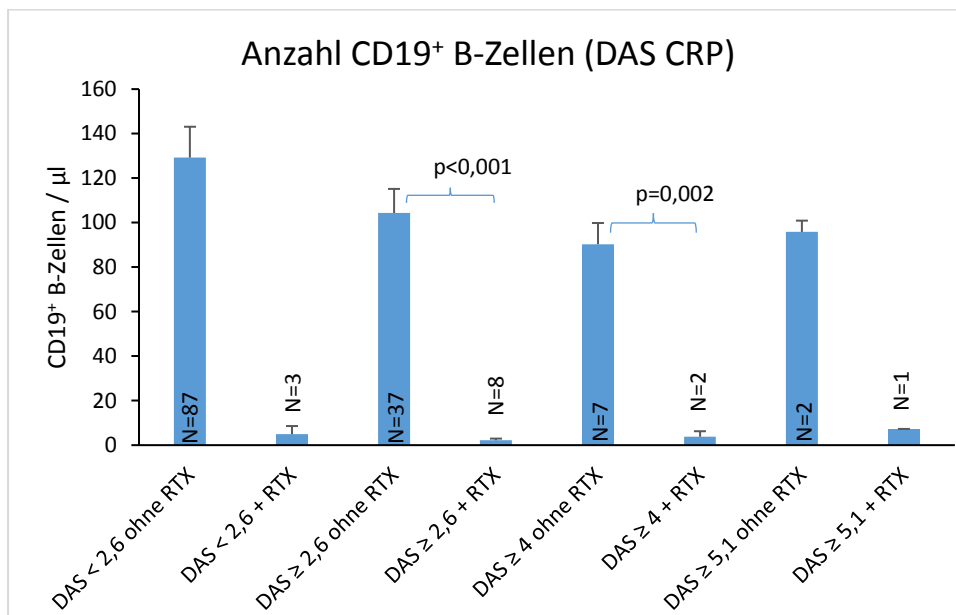


Abbildung 23: Anzahl von CD19⁺ B-Zellen / μl nach extrazellulärer FACS-Färbung im peripheren Vollblut von Patienten, die kein Rituximab oder innerhalb der letzten 12 Monate Rituximab erhalten haben (CRP). Zur Berechnung der DAS28-Werte wurde hier das CRP als Entzündungsparameter bestimmt. Es wird die Krankheitsaktivität in Remission (DAS < 2,6 ohne RTX bzw. + RTX) und in aufsteigender Reihenfolge von niedriger (DAS ≥ 2,6 ohne RTX bzw. + RTX) über moderate (DAS ≥ 4 ohne RTX bzw. + RTX) bis hohe Krankheitsaktivität (DAS ≥ 5,1 ohne RTX bzw. + RTX) gezeigt. Es werden Patienten unterschiedlicher Krankheitsaktivität der RA aufgeführt, wobei jeweils ein paar der Patienten den anti-CD20-Antikörper Rituximab (RTX) in den letzten 12 Monaten erhalten haben (+ RTX), der Großteil nicht (ohne RTX).

Abb. 23 zeigt signifikante Unterschiede bezüglich der Anzahl CD19⁺ B-Zellen in Abhängigkeit von der Aktivität der RA. Verglichen werden hier Patienten gleicher Krankheitsaktivität, von denen ein paar den anti-CD20-Antikörper *Rituximab* innerhalb der letzten 12 Monate erhalten haben. So beträgt die Anzahl CD19⁺ B-Zellen bei den Patienten mit niedriger Aktivität der RA ohne *Rituximab*-Gabe (DAS ≥ 2,6 ohne RTX) 104 ± 11 Zellen/μl und ist, verglichen mit einem Wert von 2 ± 1 Zellen/μl bei den Patienten mit niedriger Krankheitsaktivität und *Rituximab*-Gabe in den letzten 12 Monaten (DAS ≥ 2,6 + RTX), höchst signifikant größer (p < 0,001).

Bei den unter moderater Aktivität der RA leidenden Patienten, welche kein *Rituximab* erhalten haben (DAS ≥ 4 ohne RTX) beträgt die Anzahl der CD19⁺ B-Zellen 90 ± 10 Zellen/μl. Vergleichsweise dazu sinkt die Zahl auf 4 ± 2 Zellen/μl bei den RA Patienten mit moderater Krankheitsaktivität, welche innerhalb der vergangenen 12 Monate

Rituximab bekommen haben ($\text{DAS} \geq 4 + \text{RTX}$). Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen stellt sich hoch signifikant dar ($p=0,002$).

4 Diskussion

4.1 Relevante Merkmale von Patienten bei zunehmender Krankheitsaktivität der RA

Wie LEE D.M. et al. beschreiben, kommt es durch eine Leukozyteninfiltration zur Synovitis. Es entsteht das für die Rheumatoide Arthritis typische inflammatorische Gewebe. (3)

Klinisch zeigte sich in dieser Arbeit sowohl beim DAS BSG als auch beim DAS CRP ein kontinuierlicher Anstieg des prozentualen Anteils der RA Patienten mit druckschmerzhaften und geschwollenen Gelenken mit zunehmender Krankheitsaktivität. Auch in absoluten Zahlen litten die Patienten mit niedriger, moderater oder hoher Aktivität der RA verglichen mit den in Remission befindlichen Patienten an höchst signifikant mehr druckschmerzhaften und geschwollenen Gelenken. Dies könnte auf eine zunehmende Inflammation vor allem der Synovia bei höherer Krankheitsaktivität hinweisen.

Parallel zu den verstärkten Gelenkbeschwerden zeigte sich laborchemisch ein kontinuierlicher Anstieg der Entzündungsparameter BSG und CRP mit ebenso signifikanten Unterschieden zwischen den RA Patienten in Remission und denen an unterschiedlicher Krankheitsaktivität leidenden Patienten. Dies wiederum scheint die Schwere der klinischen Manifestation und des intraartikulären Infektgeschehens zu unterstreichen.

Da es sich bei der Rheumatoiden Arthritis um eine häufig auftretende Autoimmunerkrankung handelt, wird sie oft mit antiinflammatorisch wirkenden Steroiden therapiert. (3) Bezüglich der täglichen Therapie mit Steroiden zeigte sich in dieser Arbeit eine Dosissteigerung mit zunehmender Krankheitsaktivität. Hier wurden auch signifikante Unterschiede zwischen den Patienten im Stadium der Remission und denen mit unterschiedlich starken Aktivitäten der RA verzeichnet. Dies stellt die Notwendigkeit einer stärkeren immunsuppressiven, antiinflammatorischen Therapie bei zunehmender Krankheitsaktivität in den Vordergrund.

4.2 Gesteigerte IL-3 Produktion bei zunehmender Krankheitsaktivität der RA

Im Mausmodell der CIA konnte Brühl H et al. bereits zeigen, dass IL-3 einen starken Einfluss auf die Inzidenz bzw. die Schwere des Verlaufes der RA hat. So kam es unter Gabe von IL-3 zu einer erhöhten Inzidenz der RA verbunden mit einem schwereren Krankheitsverlauf. Im Gegensatz dazu senkte die Blockade des Zytokins die Inzidenz und die CIA verlief weniger schwer. (53)

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich in den Überständen von Zellkulturen der PBMCs eine signifikante Zunahme der IL-3 Konzentration mit der Krankheitsaktivität der RA zeigte. Hieraus könnte man schließen, dass höhere IL-3 Konzentrationen zu einem schwereren Verlauf der RA führen bzw. die Aktivität der RA darunter steigt.

Weber GF et al. konnten einen Zusammenhang zwischen der IL-3 Konzentration im Plasma von Patienten mit einer Sepsis und deren Prognose feststellen. Eine höhere Konzentration wirkte sich, verglichen mit niedrigeren Werten, signifikant schlechter auf die Prognose aus. IL-3 wurde hier sogar als möglicher therapeutischer Angriffspunkt in der Sepsis beschrieben. (56) Diese Kenntnis würde wiederum die These des Zusammenhangs von IL-3 mit entzündlichen Vorgängen unterstreichen.

4.3 IL-3 Produktion durch CD8⁺ Lymphozyten bei RA Patienten

CD4⁺ T-Lymphozyten werden als Hauptquelle von IL-3 beschrieben. (53) Daneben scheinen auch einige weitere Zellen (Mastzellen (59), Basophile Granulozyten (60), B-Zellen (56), aktivierte NK-Zellen (55)) in geringem Maße zur IL-3 Sekretion befähigt zu sein. Jedoch spielte deren Produktion bislang eher eine untergeordnete Rolle.

Der Prozentsatz der IL-3 exprimierenden CD8⁺ T-Zellen stieg mit der Krankheitsaktivität signifikant an. Bislang konnte zwar von Stoeckle C et al. eine erhöhte IL-3 Produktion durch CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden, doch diese Untersuchungen beschränkten sich auf Patienten mit nicht IgE-vermittelter persistierender Eosinophilie im Blut. (81)

Die Tatsache, dass CD8⁺ T-Zellen die wichtigste Quelle der IL-3 Produktion in der RA darzustellen scheinen, wirft die Frage auf, ob RA Patienten *mehr IL-3 produzierende CD8⁺ T-Zellen* im peripheren Blut aufweisen oder ob die im peripheren Blut vorhandenen CD8⁺ T-Zellen *mehr IL-3 produzieren*. Bei der RA gibt es mehr IL-3 produzierende CD8⁺ T-Zellen, da der Prozentsatz der CD8⁺ T-Zellen, die IL-3⁺ sind, bei den RA Patienten höher ist und die Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen gleich ist. Dies korreliert im Übrigen mit den steigenden IL-3 Konzentrationen in den Zellkulturüberständen.

4.4 Untergeordnete Rolle von CD4⁺ Lymphozyten als IL-3 Quelle bei Patienten mit RA

Die CD4⁺ T-Lymphozyten wurden in dieser Arbeit als eher unwahrscheinliche Quelle von IL-3 im Rahmen der RA dargestellt. Es konnte kein eindeutiger Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität gezeigt werden, da es zu keinem Anstieg des Prozentsatzes der IL-3 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen mit steigender Aktivität der RA kam. Vielmehr zeigte sich ein Abfall des prozentualen Anteils der IL-3⁺ CD4⁺ T-Zellen mit zunehmender Krankheitsaktivität unter den RA Patienten.

Brühl H et al. konnten unter anderem zeigen, dass die IL-3 Produktion durch CD4⁺ T-Lymphozyten von der jeweiligen Stimulationsart bzw. Kostimulation abhängig ist. So resultierte in dieser Studie die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen mit anti-CD3 in Anwesenheit von Monozyten oder B-Zellen und Monozyten in einer deutlich hochregulierten IL-3 Produktion durch CD4⁺ T-Zellen. (53)

In dieser Arbeit wurde jedoch die Anwesenheit von Monozyten und B-Zellen in Zusammenhang mit der IL-3 Produktion durch T-Zellen nicht untersucht. Allerdings zeigten sich bei den Monozyten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei den B-Zellen kam es eher zu einem Abfall der Zellzahlen bei steigender Krankheitsaktivität der RA. Iwata Y et al. zeigten, dass B-Zellen auch regulatorisch aktiv sein können. In einigen Tiermodellen führte die Depletion von B-Zellen zu einer Verschlechterung der Autoimmunität – unter anderem im Mausmodell der Kollagen-induzierten Arthritis. (82) Da die IL-3 Produktion mit der Krankheitsaktivität ansteigt,

lässt sich hier am ehesten ein negativer Einfluss der B-Zellen auf die IL-3 Expression postulieren.

Bei der Anzahl der CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut von RA Patienten verglichen mit gesunden Probanden war kein Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität ersichtlich.

4.5 Abfall der IL-2⁺ CD4⁺ T-Lymphozyten mit steigender Krankheitsaktivität

Die intrazelluläre Färbung zeigte einen kontinuierlichen Abfall der IL-2 produzierenden CD4⁺ T-Lymphozyten mit ansteigender Krankheitsaktivität der RA. Es ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachweisen.

Vergleichbar damit zeigten Untersuchungen von Combe B et al. eine verminderte Produktion von IL-2 durch T-Helferzellen im peripheren Blut von RA Patienten. Daraus konnte geschlossen werden, dass möglicherweise eine Funktionsstörung von T-Zellen einen Beitrag zur Immunpathogenese der RA leiste.

Von Combe B et al. wurden unter anderem mehrere mögliche Erklärungen für eine beeinträchtigte Produktion von IL-2 durch Lymphozyten bei der RA beschrieben, wengleich auch die ursächlichen Mechanismen für die abnorme T-Lymphozyten-Funktion noch nicht vollständig erforscht waren.

Mögliche Ursachen laut der Untersuchungen von Combe B et al. für eine mangelhafte IL-2 Produktion enthielten: Hemmung durch Suppressorzellen oder durch hemmende Faktoren, Defekte von Bindung oder Antwort auf IL-1 durch rheumatoide Lymphozyten oder intrinsische Abnormalitäten der IL-2 produzierenden T-Zell-Population. Den Forschungen von Combe B et al. zufolge schien eine beeinträchtigte Produktion von IL-1 durch rheumatoide Monozyten als unwahrscheinlich, da die Aktivität von IL-1 in der Synovialflüssigkeit von RA Patienten bereits von einigen Autoren beschrieben wurde. Diese meinten IL-1 könnte eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Gelenkzerstörung spielen. (50)

In dieser Arbeit wurde auf die Interaktion mit IL-1 jedoch nicht eingegangen. Möglicherweise hätte man im Rahmen dahingehender Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen IL-1 und IL-2 Produktion festgestellt.

Symons J.A. et al. beschrieben signifikant höhere Durchschnittswerte des IL-2 Rezeptors im Serum von Patienten mit seropositiver RA verglichen mit gesunden Probanden. Zudem konnte im Zuge dieser Untersuchungen eine hoch signifikante Korrelation des löslichen IL-2 Rezeptors mit IL-1 in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit aktiver RA festgestellt werden. (51) Dies würde wiederum die defekte Bindung von IL-1 durch Lymphozyten bei RA Patienten als mögliche Ursache der reduzierten IL-2 Produktion erklären, da hier IL-1 in großen Mengen vorhanden war, es jedoch zu keiner vermehrten IL-2 Produktion durch T-Zellen kam.

4.6 Anstieg der IL-2⁺ CD8⁺ T-Lymphozyten mit steigender Krankheitsaktivität

Die Untersuchungen der IL-2 Produktion durch T-Zellen in dieser Arbeit ergab einen kontinuierlichen Anstieg der IL-2 produzierenden CD8⁺ T-Lymphozyten mit steigender Krankheitsaktivität, welche sich sogar signifikant zwischen den Gruppen unterschieden.

Hosokawa K et al beschreiben eine abnormale Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Autoimmunerkrankungen und gehen von einer Dysregulation der T-Gedächtnisstammzellen aus. Die Ergebnisse weisen auf einen Beitrag dieser Zellen zur Pathophysiologie von Autoimmunkrankheiten hin. Besonders die CD8⁺ T-Gedächtnisstammzellen stellen möglicherweise einen Biomarker und einen therapeutischen Angriffspunkt vor allem bei der Aplastischen Anämie dar. In den Untersuchungen konnte im Vergleich zu den gesunden Probanden eine gesteigerte IL-2 Produktion sowohl durch CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Lymphozyten nach Stimulation mit anti-CD3 gemessen werden. Diesen beiden Zellpopulationen wird in der Arbeit von Hosokawa K et al die Fähigkeit zur verstärkten IL-2 Produktion zugesprochen. (83)

Die Ergebnisse zeigen einen dem Abfall der IL-2 produzierenden CD4⁺ T-Zellen entgegen gesetzten Anstieg der IL-2 Produktion durch CD8⁺ T-Zellen mit

zunehmender Aktivität der RA. Wie von Combe B et al (51) beschrieben, kämen verschiedene Mechanismen als Ursache für die verminderte IL-2 Produktion durch CD4⁺ T-Zellen infrage, so auch intrinsische Schädigungen dieser Zellpopulation. Möglicherweise reagieren die CD8⁺ T-Zellen mit einer gesteigerten IL-2 Produktion, um den Mangel auszugleichen. Je nach Ursache gäbe es vielleicht verschiedene Kommunikationsmöglichkeiten zwischen den unterschiedlichen T-Zell-Populationen, um die verminderte IL-2 Produktion reaktiv zu kompensieren.

4.7 Geringer Anteil von IL-17 produzierenden T-Lymphozyten

Die Auswertung dieser Untersuchung gestaltete sich schwierig, da insgesamt lediglich sehr wenige der CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten überhaupt positiv für IL-17 waren. Man konnte keinen Trend aus den Ergebnissen schließen, es gab auch keine signifikanten Unterschiede, um auf einen Zusammenhang zwischen der IL-17 Produktion und der Aktivität der RA zu schließen.

Chabaud M et al. zufolge werde das proinflammatorische Zytokin IL-17 von CD4⁺ T-Lymphozyten sezerniert sowie durch die Synovia von RA Patienten produziert. Das Muster der durch IL-17 induzierten zellulären Antworten wäre ähnlich wie jenes der durch IL-1 induzierten, was einen Beitrag von IL-17 zur Gelenkzerstörung nahelegte.

Dies wurde durch die erhöhte Produktion von MMP-1 (Metalloproteinase 1, Kollagenase) durch Synoviozyten in Anwesenheit beider Zytokine, IL-1 und IL-17, bestätigt. IL-17 *alleine* führte auch zu einer Steigerung der MMP-1 Produktion, jedoch in geringerem Ausmaß.

Laut der Untersuchungen von Chabaud M et al. korrelierte die Konzentration von MMP-1 in der Synovialflüssigkeit der RA Patienten mit der Inflammation der Synovia. (52)

Daraus könnte man schließen, dass IL-17, am stärksten in Zusammenarbeit mit IL-1, an den Entzündungsvorgängen der Synovia beteiligt ist. Möglicherweise korrelieren IL-1 bzw. IL-17 Konzentrationen im Überstand von Zellkulturen auch mit der Aktivität der RA.

Außerdem konnten Chabaud M et al. zeigen, dass IL-17 die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Makrophagen stimulierte sowie die Expression von IL-6 und G-CSF durch Stromazellen induzierte. (52)

Brühl H et al. beschrieben 2009 bereits deutlich erhöhte IL-6 Plasmaspiegel der mit IL-3 behandelten Mäuse im Rahmen der CIA. (53) Möglicherweise hat neben IL-3 auch IL-17 einen Einfluss auf die IL-6 Konzentrationen bei RA Patienten.

Sato N et al. beschrieben eine Beeinflussung der IL-3 Rezeptor-Expression durch G-CSF. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression der α -Kette und in diesem Zusammenhang eine möglicherweise durch diesen Faktor induzierte Expression der α -Untereinheit des IL-3 Rezeptors. (76) Durch die verstärkte Rezeptor-Expression könnte eine damit verbundene zunehmende Bindung von IL-3 an die α -Kette zu einer schwereren Inflammation und zu einem schwereren Verlauf der RA beitragen. In Anbetracht dieser Erkenntnisse könnte IL-17 durch eine erhöhte Expression von IL-6 und G-CSF durch Stromazellen (53) den Verlauf der RA negativ beeinflussen.

Durch die proinflammatorische und somit erkrankungsfördernde Wirkung von IL-1 und IL-6 (1) kommt es vermutlich auch indirekt durch die gesteigerte Produktion von IL-17 und dadurch gesteigerter IL-6 Expression zu einer verstärkten Inflammation im Rahmen der RA. Diese These konnte in dieser Arbeit leider nicht bestätigt werden, da sich wie bereits oben erwähnt im Rahmen der intrazellulären Färbung lediglich sehr wenige Zellen überhaupt positiv für IL-17 zeigten.

Erwähnenswert ist an dieser Stelle, dass die IL-17 Blockade bei RA Patienten in klinischen Studien hinsichtlich Reduktion der klinischen Anzeichen sowie Linderung der Symptome keinen Erfolg gebracht hat. (84)

4.8 Herunterregulation der Expression der IL-3-R- α -Kette auf Basophilen Granulozyten und pDCs bei RA Patienten

Reddy EP et al. zufolge handelt es sich bei dem IL-3 Rezeptor um einen heterodimeren Zytokinrezeptor. Er besteht aus einer α -Untereinheit und einer β -Untereinheit. (47) Laut Miyajima et al. bindet IL-3 an die spezifische α -Untereinheit des IL-3 Rezeptors, während die β -Untereinheit jedoch nicht zur Zytokinbindung

befähigt ist. Jedoch soll über die β -Untereinheit, β_c , die Signaltransduktion erfolgen. (75)

Sato N et al. beschrieben das Vorkommen des hochaffinen IL-3 Rezeptors vorwiegend auf myeloischen Zellen. Im Gegensatz zur myeloiden Zellreihe lag die Expression sowohl der α - als auch der β -Untereinheit bei den T-Zellen unterhalb der Nachweisgrenze. Offensichtlich exprimierten die von myeloischen Stammzellen abgeleiteten Zellen im peripheren Blut beide Rezeptor-Untereinheiten. In diesen Untersuchungen stellte sich aber insgesamt eine stärkere Expression der α -Untereinheit im Vergleich zur β -Untereinheit heraus. (76)

Die beiden Untereinheiten des IL-3 Rezeptors wurden in dieser Arbeit mittels der Oberflächenantigene CD123 bzw. CD131 identifiziert. Untersucht wurde die Expression der IL-3-R- α -Kette auf Basophilen Granulozyten und plasmazytoiden Dendritischen Zellen. Bereits Buhring et al. beschrieben eine Expression bedeutender Mengen CD123, der α -Untereinheit des IL-3 Rezeptors, auf der Oberfläche reifer Basophiler Granulozyten. (64)

Smolewska E et al widmeten sich in ihrer Arbeit der Expression von CD123 auf der Oberfläche Dendritischer Zellen. Sowohl die plasmazytoiden als auch die myeloiden Dendritischen Zellen exprimieren die α -Kette des IL-3 Rezeptors. (85)

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine deutliche Herunterregulation der Expression der IL-3-R- α -Kette sowohl auf Basophilen Granulozyten als auch auf plasmazytoiden Dendritischen Zellen mit steigender Krankheitsaktivität nachgewiesen werden. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen stellten sich signifikant dar.

Aus den in 4.2 beschriebenen IL-3 Konzentrationen im Zellkultur-Überstand geht hervor, dass bei stärkerer Aktivität der RA höhere IL-3 Konzentrationen im peripheren Blut gemessen wurden. Gegensätzlich dazu sank die Expression der α -Untereinheit des IL-3 Rezeptors sowohl auf Basophilen Granulozyten als auch auf plasmazytoiden Dendritischen Zellen signifikant mit zunehmender Krankheitsaktivität ab. Hieraus könnte man auf eine reaktive Minderung der IL-3 Rezeptor-Expression schließen, um die potentiell proinflammatorische Wirkung von IL-3 zu mindern.

Da die plasmazytoiden Dendritischen Zellen zudem proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 sezernieren können (85), könnte man auf eine verminderte

Aktivierung dieser Zellpopulation durch IL-3 bei herunterregulierter α -Untereinheit des IL-3 Rezeptors und folglich geringerer Sekretion proinflammatorischer Zytokine schließen.

Schließlich wurden reife Basophile Granulozyten durch Prussin C et al. als im peripheren Blut zirkulierende Zellen beschrieben (63), was wiederum Bedeutung für eine systemische Reaktion/Inflammation hat. Zudem konnten Yashimoto T et al. eine reichliche Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel IL-6, durch murine Basophile Granulozyten in IL-3 haltigem Medium nachweisen. (67) Dies würde die These der Herunterregulation der IL-R- α -Kette im Sinne einer körpereigenen Reaktion auf potentielle Inflammation unterstreichen. Denn somit käme es möglicherweise zu einer verminderten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch Basophile Granulozyten.

4.9 Herunterregulation der Expression der IL-3-R- β c-Kette auf Basophilen Granulozyten und pDCs unter steigenden IL-3 Konzentrationen

Sato N et al. zufolge bindet die β c-Untereinheit des IL-3 Rezeptors keine Zytokine, sie spielt jedoch eine essentielle Rolle für die Signaltransduktion. Diesen Untersuchungen zufolge erwies sich die Bindungsaffinität von humanem IL-3 an die α -Untereinheit des humanen IL-3 Rezeptors als äußerst schwach. Die Formation eines Heterodimers mit der β c-Untereinheit hatte schließlich die Ausbildung eines hochaffinen Rezeptors zur Folge. (76)

Panousis C et al bezeichnen die gemeinsame β c-Untereinheit des IL-3 Rezeptors (CD131) der Zytokine IL-3, IL-5 und GM-CSF als notwendig für das Überleben von Basophilen Granulozyten. (86) Hierzu würden die steigenden IL-3 Konzentrationen und die steigende Anzahl Basophiler Granulozyten im peripheren Blut mit zunehmender Aktivität der RA passen. Zudem zeigt sich in dieser Arbeit auch eine gesteigerte Aktivität der Basophilen Granulozyten mit erhöhter Krankheitsaktivität.

Saas P et al zufolge wird die β c-Kette des IL-3 Rezeptors auch äußerst stark auf der Oberfläche plasmazytoider Dendritischer Zellen exprimiert. Darüber hinaus stellt IL-3

einen entscheidenden Faktor für die Entwicklung und das Überleben der plasmazytoiden Dendritischen Zellen dar. (87) In dieser Arbeit konnte jedoch kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl plasmazytoider Dendritischer Zellen im Blut festgestellt werden.

Wiederum ähnlich wie in 4.8 beschrieben sank die Expression der β c-Untereinheit des IL-3-Rezeptors im *in vitro* Versuch bei steigenden IL-3 Konzentrationen sowohl auf Basophilen Granulozyten als auch auf plasmazytoiden Dendritischen Zellen signifikant. Im peripheren Blut wurde auf Basophilen Granulozyten und auf plasmazytoiden Dendritischen Zellen bei niedrigeren IL-3 Konzentrationen eine stärkere Expression der IL-3-Rezeptor- β c-Untereinheit gemessen als bei höheren IL-3 Konzentrationen, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die Expression der IL-3-Rezeptor- β c-Kette ohne Anwesenheit von IL-3 war jedoch bei Basophilen Granulozyten und plasmazytoiden Dendritischen Zellen hoch signifikant stärker verglichen mit jener bei verschiedenen IL-3 Konzentrationen.

Hieraus könnte man wiederum auf eine reaktive Minderung der IL-3 Rezeptor-Expression schließen, um die potentiell proinflammatorische Wirkung von IL-3 durch Veränderungen bzw. Verminderungen der Signaltransduktion zu senken. Allerdings lassen sich aus dem *in vitro* Versuch mit zweistündiger Inkubation von Vollblut eines gesunden Probanden mit humanem IL-3 keine Rückschlüsse auf die Effekte einer längeren IL-3 Exposition, wie beispielsweise bei RA Patienten, ziehen. Möglicherweise ist jedoch hinsichtlich der von Sato N et al. beschriebenen Affinität des heterodimeren Rezeptors (77) eine Herunterregulation *beider* Untereinheiten des IL-3-Rezeptors notwendig, um einen wirksamen Effekt zu erzielen.

4.10 Erhöhte IL-3 Konzentrationen führen zu gesteigerter Aktivität von Basophilen Granulozyten

Kahlert H et al. beschreiben in ihrer Arbeit CD203c als Aktivitätsmarker auf der Oberfläche Basophiler Granulozyten. Den Ergebnissen zufolge führt eine Zellaktivierung zur Hochregulation dieses Markers. (65) Laut Schneider E et al. erreicht diese Hochregulation des Aktivitätsmarkers CD203c bei einer

Asthmaexazerbation während der Remission des Asthmas wieder den Normbereich.
(60)

In dieser Arbeit konnte eine verstärkte Expression des Aktivitätsmarkers CD203c auf der Oberfläche Basophiler Granulozyten bei erhöhten IL-3 Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Unterschiede zwischen der Kontrollprobe und den mit humanem rekombinantem IL-3 versetzten Proben zeigten sich signifikant. Diese Ergebnisse lassen auf eine gesteigerte Aktivität Basophiler Granulozyten bei erhöhten IL-3 Konzentrationen schließen. Da diese Arbeit erhöhte IL-3 Konzentrationen bei zunehmender Krankheitsaktivität der RA zeigt (siehe 4.2), könnte man von einer vermehrten Aktivität Basophiler Granulozyten bei steigender Krankheitsaktivität ausgehen.

4.11 Kontinuierlicher Anstieg der Anzahl Basophiler Granulozyten im peripheren Blut mit steigender Krankheitsaktivität

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte extrazelluläre Färbung zeigte einen kontinuierlichen Anstieg der Anzahl Basophiler Granulozyten / μl im peripheren Blut mit steigender Aktivität der RA. Durch das von Valent P et al. berichtete durch IL-3 bedingte Wachstum sowie die Differenzierung von Basophilen Granulozyten (62) könnte man auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem in 4.2 erläuterten Anstieg der IL-3 Konzentration mit steigender Krankheitsaktivität und der hier beschriebenen Zunahme Basophiler Granulozyten mit erhöhter Aktivität der RA schließen. Schneider E et al. zufolge besitzen Basophile Granulozyten wiederum bedeutende immunmodulatorische Funktionen, zu denen unter anderem die Produktion von IL-3 gehört. (60) Basophile Granulozyten werden somit einerseits durch IL-3 zum Wachstum angeregt (64) und sind andererseits auch selbst zur IL-3 Produktion befähigt (62). Möglicherweise tragen die Basophilen Granulozyten in einem bestimmten Ausmaß auch zur IL-3 Produktion im Rahmen der RA bei.

4.12 Veränderung von Zellzahlen im peripheren Blut mit steigender Krankheitsaktivität

In dieser Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bezüglich der Zellzahlen nachgewiesen werden. Untersucht wurden die Zellzahlen von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, Monozyten, plasmazytoiden Dendritischen Zellen und Eosinophilen Granulozyten.

Lediglich bei den CD19⁺ B-Lymphozyten wurde ein kontinuierlicher Abfall der Zellzahl mit steigender Krankheitsaktivität gemessen, wobei diese Patienten kein *Rituximab* erhalten hatten. Die Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten sich zum Teil auch signifikant (Abb. 22). Durch Weber GF et al. konnten B-Zellen zumindest im Mausmodell als Quelle von IL-3 identifiziert werden. (56) Ein in dieser Arbeit jedoch nachgewiesener Abfall der Anzahl CD19⁺ B-Zellen mit steigender Aktivität der RA bei ansteigenden IL-3 Konzentrationen würde einer starken B-Zell-abhängigen IL-3 Produktion jedoch widersprechen.

Im Zuge dieser Arbeit wurde auch die Anzahl von B-Zellen bei Patienten mit unterschiedlich starker Aktivität der RA unter Gabe von *Rituximab* mit denen ohne *Rituximab*-Gabe verglichen (Abb. 23). Trouvin AP et al. beschrieben *Rituximab* als monoklonalen anti-CD20-Antikörper, welcher eine Depletion der CD20⁺ B-Zellen sowie auch der CD19⁺ B-Zellen herbeiführt. (80) Davon ausgehend konnte im Rahmen der extrazellulären Färbung (Abb. 23) bei RA Patienten unter Gabe von *Rituximab* innerhalb der vergangenen 12 Monate eine niedrigere Anzahl CD19⁺ B-Zellen verglichen mit Patienten ohne *Rituximab*-Gabe gemessen werden. Die Unterschiede zwischen den Patienten mit niedriger bzw. moderater Aktivität der RA ohne *Rituximab*-Gabe und den an niedriger bzw. moderater Krankheitsaktivität leidenden Patienten, die *Rituximab* erhalten hatten, zeigten sich sogar signifikant.

5 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob Patienten mit Rheumatoider Arthritis im Vergleich zu gesunden Probanden unterschiedliche IL-3 Konzentrationen im peripheren Blut aufweisen sowie gegebenenfalls dessen Effekte nachzuweisen. Begleitend wurde die Korrelation der IL-3 Rezeptor-Expression auf verschiedenen Zelltypen mit der Stärke der Krankheitsaktivität untersucht.

Um herauszufinden, ob RA Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen mehr IL-3 produzieren und/oder mehr IL-3 produzierende Zellen in ihrem Blut aufweisen, wurden PBMCs aus dem Vollblut aufgereinigt und mittels intrazellulärer Färbung für IL-3 die IL-3 produzierenden Zellen durchflusszytometrisch beurteilt und quantifiziert.

Zudem wurden PBMCs von RA Patienten und Kontrollen mit anti-CD3 Antikörpern für drei Tage aktiviert und im Zellkulturüberstand mittels ELISA die IL-3 Freisetzung gemessen. Hierbei zeigte sich eine signifikante Zunahme der IL-3 Freisetzung mit der Krankheitsaktivität. Dies korrelierte positiv mit der Zunahme der IL-3 positiven Zellen mit steigender Krankheitsaktivität. Überraschenderweise konnte bei zunehmender Krankheitsaktivität vor allem eine IL-3 Produktion durch CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden.

Um den Einfluss von IL-3 auf seinen Rezeptor nachzuweisen, wurde sowohl die Expression der α -Kette des IL-3 Rezeptors (CD123) sowie die Expression der β -Untereinheit (CD131) durchflusszytometrisch untersucht. Hierzu wurde in einem Vorexperiment humanes Vollblut mit unterschiedlichen Konzentrationen von humanem IL-3 vorbehandelt und anschließend extrazellulär gefärbt. Hier konnte eine Herunterregulation von CD131 bei Basophilen Granulozyten und plasmazytoiden Dendritischen Zellen unter steigenden IL-3 Konzentrationen beobachtet werden.

Bei den RA Patienten konnte man eine Herunterregulation von CD123 ebenso bei Basophilen Granulozyten sowie plasmazytoiden Dendritischen Zellen unter steigenden IL-3 Konzentrationen und damit korrelierender zunehmender Krankheitsaktivität beobachten.

Zudem wurde neben IL-3 auch die Expression der Zytokine IL-2 sowie IL-17 bei RA Patienten untersucht. Hier kam es unter den CD4⁺ T-Zellen zu einem kontinuierlichen

Abfall der IL-2⁺ Zellen bei steigender Krankheitsaktivität. Im Gegensatz dazu wurde unter den CD8⁺ T-Zellen ein kontinuierlicher Anstieg der IL-2⁺ Zellen mit zunehmender Krankheitsaktivität beobachtet.

Lediglich sehr wenige der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen waren insgesamt überhaupt positiv für IL-17.

Darüber hinaus stehen einige weitere Zellpopulationen mit der Rheumatoiden Arthritis in Verbindung. Im Zuge dieser Arbeit wurde die Anzahl von Monozyten, plasmazytoiden Dendritischen Zellen, Eosinophilen Granulozyten sowie B-Zellen im peripheren Blut mithilfe der extrazellulären FACS-Färbung bestimmt.

Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zellzahlen im peripheren Vollblut. Lediglich bei den CD19⁺ B-Zellen kam es zu einem zunehmenden Abfall der Zellzahl mit steigender Krankheitsaktivität. Bei der Patientengruppe, die kein *Rituximab* erhalten hatte, konnte eine höhere Anzahl an CD19⁺ B-Zellen beobachtet werden, verglichen mit RA Patienten gleicher Krankheitsaktivität, welche innerhalb der vergangenen 12 Monate *Rituximab* erhalten hatten.

Mit dieser Arbeit konnte somit die wichtige Rolle von IL-3 im Krankheitsprozess der RA nachgewiesen werden. Möglicherweise stellt die Hemmung von IL-3 somit einen neuen therapeutischen Ansatz zur zukünftigen Behandlung der RA dar.

6 Literaturverzeichnis

1. **Ruderman EM, Nola KM, Ferrell S, Sapir T, Cameron.** Incorporating the treat-to-target concept in rheumatoid arthritis. *J Manag Care Pharm* 2012; 18(9):1–18.
2. **McInnes IB, Schett G.** The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2011; 365(23):2205–19.
3. **Lee DM, Weinblatt ME.** Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2001; 358(9285):903–11.
4. **Vega-Morales D, Esquivel-Valerio JA, Garza-Elizondo MA.** Do rheumatologists know how to squeeze? Evaluations of Gaenslen s maneuver. *Rheumatol Int* 2015; 35(12):2037–40.
5. **Raman D, Haslock I.** Trochanteric bursitis--a frequent cause of 'hip' pain in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1982; 41(6):602–3.
6. **Backhaus M, Burmester G-R, Gerber T, Grassi W, Machold KP, Swen WA et al.** Guidelines for musculoskeletal ultrasound in rheumatology. *Ann Rheum Dis* 2001; 60(7):641–9.
7. **Pinals RS, Masi AT, Larsen RA.** Preliminary criteria for clinical remission in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 1981; 24(10):1308–15.
8. **Mosier BA, Hughes TB.** Recurrent carpal tunnel syndrome. *Hand Clin* 2013; 29(3):427–34.
9. **Bland JD.** Carpal tunnel syndrome. *BMJ* 2007; 335(7615):343–6.
10. **Atroshi I, Englund M, Turkiewicz A, Tägil M, Petersson IF.** Incidence of Physician-Diagnosed Carpal Tunnel Syndrome in the General Population. *Arch Intern Med* 2011; 171(10):941–54.
11. **Torreggiani WC, Al-Ismael K, Munk PL, Roche C, Keogh C, Nicolaou S et al.** The imaging spectrum of Baker's (Popliteal) cysts. *Clin Radiol* 2002; 57(8):681–91.
12. **Sayah A, English J3.** Rheumatoid arthritis: a review of the cutaneous manifestations. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53(2):191-209; quiz 210-2.
13. **Tureson C, McClelland RL, Christianson T, Matteson E.** Clustering of extraarticular manifestations in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2008; 35(1):179–80.
14. **Ntatsaki E, Mooney J, Scott DG, Watts RA.** Systemic rheumatoid vasculitis in the era of modern immunosuppressive therapy. *Rheumatology (Oxford)* 2014; 53(1):145–52.
15. **Kobak S, Yilmaz H, Yalcin M, Karaarslan A.** Digital Vasculitis in a Patient with Rheumatoid Arthritis Responded Well to Adalimumab. *Case Rep Rheumatol* 2014; 2014.
16. **Davies L, Spies JM, Pollard JD, McLeod JG.** Vasculitis confined to peripheral nerves. *Brain* 1996; 119 (Pt 5):1441–8.
17. **Pertovaara M, Korpela M, Uusitalo H, Pukander J, Miettinen A, Helin H et al.** Clinical follow up study of 87 patients with sicca symptoms (dryness of eyes or mouth, or both). *Ann Rheum Dis* 1999; 58(7):423–7.

18. **Romanowska-Prochnicka K, Olesinska M, Paradowska-Gorycka A, Manczak M, Felis-Giemza A, Wojdasiewicz P et al.** Discrepancies in assessment of patients with rheumatoid arthritis and secondary Sjogren's syndrome by DAS28-ESR and DAS28-CRP. *Cent Eur J Immunol* 2016; 41(2):188–94.
19. **Ondrasik M.** Caplan's syndrome. *Baillieres Clin Rheumatol* 1989; 3(1):205–10.
20. **Ross MH, Murray J.** Occupational respiratory disease in mining. *Occup Med (Lond)* 2004; 54(5):304–10.
21. **Burks EJ, Loughran TP, JR.** Pathogenesis of neutropenia in large granular lymphocyte leukemia and Felty syndrome. *Blood Rev* 2006; 20(5):245–66.
22. **Shanmuganandan K, Arunachalam R.** Late onset rheumatoid arthritis. *Indian Journal of Rheumatology* 2009; 4(2):56–60.
23. **Ravelli A, Martini A.** Juvenile idiopathic arthritis. *The Lancet* 3; 369(9563):767–78.
24. **Calabro JJ.** Juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Podiatr Med Surg* 1988; 5(1):57–75.
25. **Schaller J, Kupfer C, Wedgwood RJ.** IRIDOCYCLITIS IN JUVENILE RHEUMATOID ARTHRITIS. *Pediatrics* 1969; 44(1):92–100.
26. **Rehart S, Braune C, Hilker A, Effenberger H.** Die Schwanenhals- und die Knopflochdeformität an den rheumatischen Langfingern. *Orthopäde*; 34(1):39–46.
27. **Hastings DE, Evans JA.** Rheumatoid wrist deformities and their relation to ulnar drift. *J Bone Joint Surg Am* 1975; 57(7):930–4.
28. **Ball J.** Enthesopathy of rheumatoid and ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1971; 30(3):213–23.
29. **Yoshida K, Hanyu T, Takahashi HE.** Progression of rheumatoid arthritis of the cervical spine: radiographic and clinical evaluation. *J Orthop Sci* 1999; 4(6):399–406.
30. **Bonic EE, Stockwell CA, Kettner NW.** Brain stem compression and atlantoaxial instability secondary to chronic rheumatoid arthritis in a 67-year-old female. *J Manipulative Physiol Ther* 2010; 33(4):315–20.
31. **Tacheci I, Bradna P, Douda T, Bastecka D, Kopacova M, Rejchrt S et al.** Small intestinal injury in NSAID users suffering from rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Rheumatol Int* 2016; 36(11):1557–61.
32. **Müller M, Pippi-Ludwig W.** Perioperatives Management von Patienten mit rheumatoider Arthritis. *Anaesthesist*; 63(11):883–96.
33. **Moreland LW, O'Dell, JR.** Glucocorticoids and rheumatoid arthritis: back to the future? *Arthritis Rheum* 2002; 46(10):2553–63.
34. **Smitten AL, Simon TA, Hochberg MC, Suissa S.** A meta-analysis of the incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008; 10(2):R45.
35. **Verhoeven F, Prati C, Maguin-Gate K, Wendling D, Demougeot C.** Glucocorticoids and endothelial function in inflammatory diseases: focus on rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2016; 18(1):258.
36. **Jurcut C, Jurcut R, Tanasescu C.** Cardiovascular risk and rheumatoid arthritis: from mechanisms of atherosclerosis to therapeutic approach. *Rom J Intern Med* 2004; 42(4):659–69.

- 37. Lodder MC, Haugeberg G, Lems WF, Uhlig T, Orstavik RE, Kostense PJ et al.** Radiographic damage associated with low bone mineral density and vertebral deformities in rheumatoid arthritis: the Oslo-Truro-Amsterdam (OSTRA) collaborative study. *Arthritis Rheum* 2003; 49(2):209–15.
- 38. Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van MAH, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D et al.** Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum* 2005; 52(11):3433–8.
- 39. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO et al.** 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010; 62(9):2569–81.
- 40. Rheumatoide Arthritis: Krankheitsaktivität | AbbVie.** Available from: URL: <http://www.chronisch-entzuendliche-erkrankungen.de/rheumatoide-arthritis-beurteilung-von-krankheitsaktivitaet-und-therapieansprechen/>.
- 41. E E.** [Physical therapy of rheumatoid arthritis]. *Fortschr Med* 1990; 108(7):117–20.
- 42. Ernst E, Fialka V.** Ice freezes pain? A review of the clinical effectiveness of analgesic cold therapy. *J Pain Symptom Manage* 1994; 9(1):56–9.
- 43. Jong PHd, Hazes JM, Han HK, Huisman M, van Zeben D, Lubbe, P A van der et al.** Randomised comparison of initial triple DMARD therapy with methotrexate monotherapy in combination with low-dose glucocorticoid bridging therapy; 1-year data of the tREACH trial. *Ann Rheum Dis* 2014; 73(7):1331–9.
- 44. Saag KG, Kirwan JR.** *Glucocorticoid Therapy in Rheumatoid Arthritis*: Humana Press; 2002.
- 45. Dorner T, Strand V, Castaneda-Hernandez G, Ferraccioli G, Isaacs JD, Kvien TK et al.** The role of biosimilars in the treatment of rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2013; 72(3):322–8.
- 46. Rubbert-Roth A.** Assessing the safety of biologic agents in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51 Suppl 5:v38-47.
- 47. Reddy EP, Korapati A, Chaturvedi P, Rane S.** IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene* 2000; 19(21):2532–47.
- 48. Waljee J, Zhong L, Baser O, Yuce H, Fox DA, Chung KC.** The Incidence of Upper and Lower Extremity Surgery for Rheumatoid Arthritis Among Medicare Beneficiaries. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 2015; 97(5):403–10.
- 49. Hawley DJ.** Psycho-educational interventions in the treatment of arthritis. *Baillieres Clin Rheumatol* 1995; 9(4):803–23.
- 50. Combe B, Pope RM, Fischbach M, Darnell B, Baron S, Talal N.** Interleukin-2 in rheumatoid arthritis: production of and response to interleukin-2 in rheumatoid synovial fluid, synovial tissue and peripheral blood. *Clin Exp Immunol* 1985; 59(3):520–8.
- 51. Symons JA, Wood NC, Di Giovine FS, Duff GW.** Soluble IL-2 receptor in rheumatoid arthritis. Correlation with disease activity, IL-1 and IL-2 inhibition. *J Immunol* 1988; 141(8):2612–8.

- 52. Chabaud M, Garnero P, Dayer J-M, Guerne P-A, Fossiez F, Miossec P.** CONTRIBUTION OF INTERLEUKIN 17 TO SYNOVIUM MATRIX DESTRUCTION IN RHEUMATOID ARTHRITIS. *Cytokine* 2000; 12(7):1092–9.
- 53. Brühl 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.
- 54. Brühl H, Cihak J, Plachý J, Kunz-Schughart L, Niedermeier M, Denzel A et al.** Targeting of Gr-1+,CCR2+ monocytes in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56(9):2975–85.
- 55. Macardle PJ, Chen Z, Shih CY, Huang CM, Weedon H, Sun Q et al.** Characterization of human leucocytes bearing the IL-3 receptor. *Cell Immunol* 1996; 168(1):59–68.
- 56. 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.
- 57. Bacon K, Gearing A, Camp R.** Induction of in vitro human lymphocyte migration by interleukin 3, interleukin 4, and interleukin 6. *Cytokine* 1990; 2(2):100–5.
- 58. Kaushansky K, Shoemaker SG, Broudy VC, Lin NL, Matous JV, Alderman EM et al.** Structure-function relationships of interleukin-3. An analysis based on the function and binding characteristics of a series of interspecies chimera of gibbon and murine interleukin-3. *J Clin Invest* 1992; 90(5):1879–88.
- 59. 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.
- 60. Schneider E, Thieblemont N, Moraes ML de, Dy M.** Basophils: new players in the cytokine network. *Eur Cytokine Netw* 2010; 21(3):142–53.
- 61. Ihle JN, Keller J, Oroszlan S, Henderson LE, Copeland TD, Fitch F et al.** Biologic properties of homogeneous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, p cell-stimulating factor activity, colony-stimulating factor activity, and histamine-producing cell-stimulating factor activity. *J Immunol* 1983; 131(1):282–7.
- 62. Valent P, Besemer J, Muhm M, Majdic O, Lechner K, Bettelheim P.** Interleukin 3 activates human blood basophils via high-affinity binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(14):5542–6.
- 63. Prussin C, Metcalfe DD.** 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(2 Suppl Mini-Primer):6.
- 64. Buhning HJ, Simmons PJ, Pudney M, Muller R, Jarrossay D, van Agthoven A et al.** The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood* 1999; 94(7):2343–56.
- 65. Kahlert H, Cromwell O, Fiebig H.** Measurement of basophil-activating capacity of grass pollen allergens, allergoids and hypoallergenic recombinant derivatives by flow cytometry using anti-CD203c. *Clinical & Experimental Allergy* 2003; 33(9):1266–72.
- 66. Schäfer T, Starkl P, Allard C, Wolf RM, Schweighoffer T.** A granular variant of CD63 is a regulator of repeated human mast cell degranulation. *Allergy* 2010; 65.

- 67. Yoshimoto T, Yasuda K, Tanaka H, Nakahira M, Imai Y, Fujimori Y et al.** Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2009; 10(7):706–12.
- 68. MacDonald SM, Schleimer RP, Kagey-Sobotka A, Gillis S, Lichtenstein LM.** Recombinant IL-3 induces histamine release from human basophils. *J Immunol* 1989; 142(10):3527–32.
- 69. Lantz CS, Boesiger J, Song CH, Mach N, Kobayashi T, Mulligan RC et al.** Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 1998; 392(6671):90–3.
- 70. Murphy KM, Travers P, Walport M, Janeway CA, Seidler L, Ehrenstein M.** *Janeway Immunologie*. 7. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.; 2009.
- 71. Barton BE, Mayer R.** IL-3 induces differentiation of bone marrow precursor cells to osteoclast-like cells. *J Immunol* 1989; 143(10):3211–6.
- 72. Tomoko Toyosaki-Maeda, Hiroshi Takano, Tetsuya Tomita, Yuji Tsuruta, Miki Maeda-Tanimura, Yasunori Shimaoka, Tetsu Takahashi, Tsunetoshi Itoh, Ryuji Suzuki, Takahiro Ochi.** Differentiation of monocytes into multinucleated giant bone-resorbing cells: two-step differentiation induced by nurse-like cells and cytokines. *Arthritis Research* 2001; 3(5):306.
- 73. Kinashi T, Inaba K, Tsubata T, Tashiro K, Palacios R, Honjo T.** Differentiation of an interleukin 3-dependent precursor B-cell clone into immunoglobulin-producing cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(12):4473–7.
- 74. Adachi T, Alam R.** The mechanism of IL-5 signal transduction. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 1998; 275(3):C623-C633.
- 75. Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K.** Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:295–331.
- 76. Sato N, Caux C, Kitamura T, Watanabe Y, Arai K, Banchereau J et al.** Expression and factor-dependent modulation of the interleukin-3 receptor subunits on human hematopoietic cells. *Blood* 1993; 82(3):752–61.
- 77. Luttmann W.** *Der Experimentator: Immunologie*. 4., vollst. überarb. und korrigierte Aufl. Berlin: Springer Spektrum; 2014. (Der Experimentator).
- 78. Keren DF.** Enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin G and immunoglobulin A antibodies to *Shigella flexneri* antigens. *Infect Immun* 1979; 24(2):441–8.
- 79. AccuCheck Counting Beads - Thermo Fisher Scientific.** Available from: URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/PCB100?ICID=search-product>.
- 80. Trouvin AP, Jacquot S, Grigioni S, Curis E, Dedreux I, Roucheux A et al.** Usefulness of monitoring of B cell depletion in rituximab-treated rheumatoid arthritis patients in order to predict clinical relapse: a prospective observational study. *Clin Exp Immunol* 2015; 180(1):11–8.
- 81. 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.
- 82. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM et al.** Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 2011; 117(2):530–41.

- 83. Hosokawa K, Muranski P, Feng X, Townsley DM, Liu B, Knickelbein J et al.** Memory Stem T Cells in Autoimmune Disease: High Frequency of Circulating CD8+ Memory Stem Cells in Acquired Aplastic Anemia. *J Immunol* 2016; 196(4):1568–78.
- 84. Mease PJ, Jeka S, Jaller JJ, Kitumnuaypong T, Louthrenoo W, Mann H et al.** CNTO6785, a Fully Human Antiinterleukin 17 Monoclonal Antibody, in Patients with Rheumatoid Arthritis with Inadequate Response to Methotrexate: A Randomized, Placebo-controlled, Phase II, Dose-ranging Study. *J Rheumatol* 2018; 45(1):22–31.
- 85. Smolewska E, Stanczyk J, Brozik H, Biernacka-Zielinska M, Cebula B, Robak T et al.** Distribution and clinical significance of blood dendritic cells in children with juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67(6):762–8.
- 86. Panousis C, Dhagat U, Edwards KM, Rayzman V, Hardy MP, Braley H et al.** **CSL311**, a novel, potent, therapeutic monoclonal antibody for the treatment of diseases mediated by the common β chain of the IL-3, GM-CSF and IL-5 receptors. *MAbs* 2016; 8(3):436–53.
- 87. Saas P, Varin A, Perruche S, Ceroi A.** Recent insights into the implications of metabolism in plasmacytoid dendritic cell innate functions: Potential ways to control these functions. *F1000Res* 2017; 6:456.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des IL-3 Rezeptors	23
Abbildung 2: Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation	35
Abbildung 3: Darstellung der IL-3 Konzentration in pg/ml gemessen im Zellkultur-Überstand (BSG).	51
Abbildung 4: Darstellung der IL-3 Konzentration in pg/ml gemessen im Zellkultur-Überstand (CRP).	52
Abbildung 5: Prozentualer Anteil der IL-3 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4 ⁺ T-Zellen nach intrazellulärer FACS-Färbung für IL-3 (BSG).	54
Abbildung 6: Prozentualer Anteil der IL-3 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4 ⁺ T-Zellen nach intrazellulärer FACS-Färbung für IL-3 (CRP).	55
Abbildung 7: Prozentualer Anteil der IL-3 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8 ⁺ T-Zellen nach intrazellulärer FACS-Färbung für IL-3 (BSG).	56
Abbildung 8: Prozentualer Anteil der IL-3 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8 ⁺ T-Zellen nach intrazellulärer FACS-Färbung für IL-3 (CRP).	57
Abbildung 9: Prozentualer Anteil der IL-2 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4 ⁺ T-Zellen nach intrazellulärer FACS-Färbung für IL-2 (BSG).	58
Abbildung 10: Prozentualer Anteil der IL-2 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4 ⁺ T-Zellen nach intrazellulärer FACS-Färbung für IL-2 (CRP).	59
Abbildung 11: Prozentualer Anteil der IL-2 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8 ⁺ T-Zellen nach intrazellulärer FACS-Färbung für IL-2 (BSG).	60
Abbildung 12: Prozentualer Anteil der IL-2 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8 ⁺ T-Zellen nach intrazellulärer FACS-Färbung für IL-2 (CRP).	61
Abbildung 13: Expression der IL-3-Rezeptor- α -Kette auf der Zelloberfläche Basophiler Granulozyten nach extrazellulärer FACS-Färbung (CRP).	63
Abbildung 14: Expression der IL-3-Rezeptor- α -Kette auf der Zelloberfläche plasmazytoider Dendritischer Zellen nach extrazellulärer FACS-Färbung (CRP).	65
Abbildung 15: Expression der IL-3-Rezeptor- β c-Kette auf der Zelloberfläche Basophiler Granulozyten nach extrazellulärer FACS-Färbung.	67
Abbildung 16: Expression der IL-3-Rezeptor- β c-Kette auf der Zelloberfläche plasmazytoider Dendritischer Zellen nach extrazellulärer FACS-Färbung.	68
Abbildung 17: Expression des Aktivitätsmarkers CD203c von Basophilen Granulozyten auf deren Zelloberfläche nach extrazellulärer FACS-Färbung.	70
Abbildung 18: Anzahl von Basophilen Granulozyten / μ l im peripheren Vollblut nach extrazellulärer FACS-Färbung (CRP).	71
Abbildung 19: Anzahl CD4 ⁺ T-Zellen / μ l im peripheren Vollblut nach extrazellulärer FACS-Färbung (CRP).	73
Abbildung 20: Anzahl CD8 ⁺ T-Zellen / μ l im peripheren Vollblut nach extrazellulärer FACS-Färbung (CRP).	74
Abbildung 21: Anzahl von Monozyten / μ l im peripheren Vollblut nach extrazellulärer FACS-Färbung (CRP).	75
Abbildung 22: Anzahl von CD19 ⁺ B-Zellen / μ l nach extrazellulärer FACS-Färbung im peripheren Vollblut von Patienten, die kein <i>Rituximab</i> erhalten haben (CRP).	76
Abbildung 23: Anzahl von CD19 ⁺ B-Zellen / μ l nach extrazellulärer FACS-Färbung im peripheren Vollblut von Patienten, die kein <i>Rituximab</i> oder innerhalb der letzten 12 Monate <i>Rituximab</i> erhalten haben (CRP).	78

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikationskriterien der Rheumatoiden Arthritis nach ACR/EULAR von 2010.	11
Tabelle 2: Interpretation der Krankheitsaktivität der Rheumatoiden Arthritis anhand des DAS28.	12
Tabelle 3: Die gängigsten Biologika mit ihren Wirkungen.	15
Tabelle 4: Geräte	26
Tabelle 5: Glas- und Plastikware	27
Tabelle 6: Chemikalien	28
Tabelle 7: Zellkulturmedien und -zusätze	29
Tabelle 8: Lösungen und deren Inhaltsstoffe für den IL-3 ELISA	29
Tabelle 9: Lösungen und deren Inhaltsstoffe für den Kontroll ELISA	30
Tabelle 10: Zellkulturmedien	30
Tabelle 11: Zytokine, Antikörper und Enzyme	31
Tabelle 12: Humane Antikörper für die Durchflusszytometrie	32
Tabelle 13: Analyse- und Bearbeitungsprogramme	32
Tabelle 14: Extrazelluläre FACS-Färbung von Vollblut nach Vorbehandlung mit humanem rekombinatem IL-3	42
Tabelle 15: Basischarakteristika der RA Patienten und Kontrollen (DAS BSG).	47
Tabelle 16: Basischarakteristika der RA Patienten und Kontrollen (DAS CRP).	49

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die an der Entstehung dieser Arbeit mitgewirkt haben.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Matthias Mack für die Aufgabenstellung und Möglichkeit, diese Doktorarbeit in der Abteilung für Innere Medizin II am Universitätsklinikum Regensburg durchzuführen.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Kerstin Renner für die Betreuung dieser Arbeit. Sie hat mich von Anfang an begleitet und mich überaus freundlich eingearbeitet und ist mir jederzeit tatkräftig zur Seite gestanden. Ihre wertvollen Anregungen und ihre großartige Unterstützung haben diese Arbeit erst ermöglicht.

Ein großes Dankeschön für all die großen und kleinen Hilfestellungen bei der Durchführung der einzelnen Versuche schulde ich auch den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Mack: Fabian Hermann, Nicole Göbel und Yvonne Talke.

Abschließend möchte ich noch meiner Familie für das fleißige Korrekturlesen danken.

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Verena Bortenschlager, geboren am 24.01.1993 in Ried im Innkreis (Österreich), an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit

Untersuchung der Interleukin-3- und Interleukin-3-Rezeptor-Expression bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

von mir selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

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

Regensburg, den

(Verena Bortenschlager)