

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

EXPRESSION VON INTERLEUKIN-3 UND EXPRESSION DES INTERLEUKIN-3-  
REZEPTORS BEI PATIENTEN MIT RHEUMATOIDER ARTHRITIS

Inaugural–Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Agnes Mager

2022



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

EXPRESSION VON INTERLEUKIN-3 UND EXPRESSION DES INTERLEUKIN-3-  
REZEPTORS BEI PATIENTEN MIT RHEUMATOIDER ARTHRITIS

Inaugural–Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Agnes Mager

2022

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. med. Dirk Hellwig

Prof. Dr. med. Matthias Mack

Prof. Dr. med. Martin Fleck

27.10.2022

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	6
1. Einleitung .....	8
1.1. Rheumatoide Arthritis.....	8
1.1.1. Definition und Epidemiologie .....	8
1.1.2. Pathophysiologie .....	8
1.1.4. Klinik.....	10
1.1.5. Diagnostik .....	11
1.1.6. Therapie.....	15
1.1.7. Prognose .....	17
1.2. Interleukin-3.....	17
1.2.1. Struktur von IL-3 und seinem Rezeptor .....	17
1.2.2. IL-3 Produktion und IL-3-Rezeptor Expression .....	17
1.2.3. Wirkung von IL-3.....	18
1.3. Zielsetzung der Arbeit.....	19
2. Materialien und Methoden.....	20
2.2. Laborgeräte und -materialien .....	20
2.2.1. Geräte .....	20
2.2.2. Glas- und Plastikware.....	21
2.2.3. Chemikalien, Reagenzien, Puffer .....	22
2.2.4. Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze .....	23
2.2.5. Zusammensetzung der Zellkulturmedien .....	24
2.2.6. Antikörper für die extrazelluläre Durchflusszytometrie .....	24
2.2.7. Antikörper für die intrazelluläre Durchflusszytometrie .....	26
2.2.8. Zytokine, Antikörper, Enzyme .....	26

2.2.9	IL-3 ELISA .....	27
2.2.10	ELISA Sets.....	27
2.2.11	ELISA allgemein .....	28
2.2.12	Analyse- und Bearbeitungsprogramme.....	28
2.2	Methoden .....	29
2.2.1	Patientenrekrutierung und Gewinnung des Probenmaterials .....	29
2.2.2	Plasmagewinnung.....	30
2.2.3	Gewinnung von PBMCs aus Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation und anschließendes Einfrieren.....	30
2.2.4	Auftauen der Zellen und Zellzahlbestimmung.....	31
2.2.5	Zellkultur.....	32
2.2.6	Durchflusszytometrie .....	33
2.2.7	Stimulation von Vollblut.....	38
2.2.8	ELISA.....	39
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Basischarakteristika .....	42
3.2	Analyse der Zellpopulationen und exprimierter Oberflächenmarker im nicht-behandelten Vollblut.....	44
3.2.1	Neutrophile Granulozyten .....	45
3.2.2	Klassische Monozyten.....	47
3.2.3	CD16 <sup>+</sup> Monozyten.....	48
3.3	Basale IL-3 Produktion und Sensibilität von Responderzellen auf IL-3 .....	49
3.4	Untersuchung der Quellen von IL-3, IL-2 und IFN- $\gamma$ .....	51
3.4.1	CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	51
3.4.2	CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	54
3.5	IL-3 Produktion in der Zellkultur .....	57

4	Diskussion .....	60
4.1	Höhere Anzahl von Basophilen und Neutrophilen Granulozyten, klassischen und CD16 <sup>+</sup> Monozyten .....	60
4.2	Höhere basale IL-3 Produktion bei gleicher Empfindlichkeit auf IL-3 .....	61
4.3	Untergeordnete Rolle der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen als Ursprung von IL-3 .....	62
4.4	CD8 <sup>+</sup> T-Zellen als Ursprung von Zytokinen .....	63
4.5	Erhöhte Produktion von IL-3 und GM-CSF bei Patienten mit RA .....	63
5	Zusammenfassung und Ausblick .....	66
6	Anhang .....	67
6.1	Tabellenverzeichnis .....	67
6.2	Abbildungsverzeichnis .....	68
7	Literaturverzeichnis .....	69
8	Danksagung .....	80
9	Eidesstattliche Erklärung .....	81

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACPA	Antikörper gegen Citrullinierte Protein-Antigene
ACR	American College of Rheumatology
AML	Akute myeloische Leukämie
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CED	Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CRP	C-reaktives Protein
DAS	disease activity score
DMARDs	Disease modifying anti-rheumatic drugs
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalitis
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EULAR	European League against Rheumatism
FACS	fluorescence activated cell sorter
FSC	Forwardscatter
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HRP	Horseradish Peroxidase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
MTX	Methotrexat



NK-Zellen.....	<i>Natürliche Killer Zellen</i>
NSAR .....	<i>Nicht-steroidale Antirheumatika</i>
PBMC.....	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS.....	<i>Phosphatgepufferte Salzsäure</i>
pDCs.....	<i>Plasmocytäre dendritische Zellen</i>
PMA .....	<i>Phorbol-12-Myristat-13-Acetat</i>
RF.....	<i>Rheumafaktor</i>
SLE.....	<i>Systemischer Lupus Erythematoses</i>
SSC.....	<i>Sidescatter</i>
TMB .....	<i>Tetramethylbenzidin</i>
TNF.....	<i>Tumor-Nekrose-Faktor</i>

# **1. Einleitung**

## **1.1. Rheumatoide Arthritis**

### **1.1.1. Definition und Epidemiologie**

Bei der RA handelt es sich um eine häufige Autoimmunerkrankung, die mit fortschreitender Invalidität, systemischen Komplikationen, frühem Tod und sozioökonomischen Kosten verbunden ist. (1)

Die Inzidenz der RA wird in Bevölkerungsstudien mit insgesamt 0,1-0,5‰ angegeben. Die Inzidenz steigt mit dem Alter an, wobei der Erkrankungsgipfel bei Männern später liegt als bei Frauen. Die Prävalenz der RA wird international und auch in Deutschland mit etwa 0,8% der erwachsenen Bevölkerung angenommen. Frauen sind etwa 3-mal häufiger betroffen als Männer. (2)

Die RA ist eine chronische Erkrankung, die eine erhebliche Belastung für das Individuum und die Gesellschaft darstellt. (3) Es entsteht eine sozioökonomische Last, die, neben den direkten medizinischen Kosten, eine Konsequenz funktioneller Einschränkung, Minderung der Erwerbsfähigkeit und reduzierter gesellschaftlicher Teilnahme ist. (3)

### **1.1.2. Pathophysiologie**

Patienten mit RA weisen zumeist eine Kombination von epigenetischen Markern auf, die als genetischer High-Risk Background gewertet werden können. Durch zufällige Umwelteinflüsse wird zumeist eine Ereignisfolge losgetreten, die Synovitis und im weiteren Verlauf eine chronische, destruktive Arthritis hervorruft. (4)

Dabei ist die RA auch mit Rauchen und anderen Formen von bronchialem Stress in der Anamnese assoziiert, besonders erhöht ist dabei das Risiko, eine seropositive RA zu entwickeln. (5) Andere mögliche Umwelteinflüsse, die zum Entstehen oder nicht Entstehen einer RA beitragen können, sind Alkohol- und Koffeinkonsum, Vitamin-D Status, Gebrauch oraler Kontrazeptiva und niedriger sozioökonomischer Status. Allerdings ist hier die Assoziation deutlich schwächer. (6)

Die exakte Ätiologie der Erkrankung ist noch nicht vollständig bekannt, es scheinen jedoch T-Zellen, B-Zellen und pro-inflammatorische Zytokine eine entscheidende Rolle zu spielen. (7)

### *1.1.3.1 Synovitis*

Synovitis ist ein zentraler Bestandteil der Pathophysiologie der RA. Histologisch zeigen sich deutliche Angiogenese, zelluläre Hyperplasie und Einwanderung inflammatorischer Leukozyten. (8) Die Einwanderung der entzündlichen Zellen wird möglich gemacht durch die Aktivierung der synovialen Mikrogefäße, was wiederum die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen erhöht. (1) Deshalb ist Neoangiogenese ein charakteristisches Merkmal der frühen und etablierten Synovitis. Sie wird durch lokal hypoxische Bedingungen und Zytokine induziert. (9) Diese Veränderungen in Kombination mit einer grundlegenden Reorganisation der synovialen Architektur und lokaler Fibroblasten Aktivierung erlauben die Ausbildung von entzündlicher Synovia. (1) Die Veränderungen in der Synovia variieren je nach Krankheitsfortschritt. (8)

In Studien an Rhesusaffen wurde festgestellt, dass eine asymptomatische Synovitis vor der klinisch manifesten Arthritis vorhanden ist. (10) Deshalb ist die Diagnose der präklinischen RA in den Fokus gerückt, mit dem Ziel, eine präventive Therapie zu ermöglichen. (3)

### *1.1.3.2 Zelluläre Immunantwort*

Die spezifischen genetischen Risikofaktoren der RA und das Vorhandensein von Autoantikörpern legen nahe, dass die adaptive Immunität im Zentrum der Pathogenese der frühen Erkrankung steht. T-Zellen sind zwar in der Synovia reichlich vorhanden, ihre Rolle wird aber noch schlecht verstanden. (1)

Das Synovium bei Patienten mit RA enthält auch viele myeloische Zellen und pDCs, die über verschiedene Mechanismen T-Zellen aktivieren können. Makrophagen und Dendritische Zellen stellen über verschiedene Wachstumsfaktoren und Interleukine ein Milieu her, das die T-Zell Homöostase in Richtung Inflammation verschiebt. B-Zellen finden sich hauptsächlich in T-Zell-B-Zell-Aggregaten. (1) Die pathogene Rolle der B-Zellen wird durch die Wirksamkeit von Rituximab bei Patienten mit RA bestätigt. (11)

Man findet auch Makrophagen, Mastzellen und NK-Zellen in der Synovia, Neutrophile Granulozyten findet man hauptsächlich in der Synovialflüssigkeit. (1)

### 1.1.3.3 Zytokine

Zytokine sind kleine, lösliche Proteine, die als Mediatoren der interzellulären Kommunikation zwischen Zellen, die an Immunreaktion beteiligt sind, dienen. Sie beeinflussen Zellteilung, Zelldifferenzierung und Chemotaxis und können grob in proinflammatorisch und antiinflammatorisch eingeteilt werden. (8)

Das entzündliche Milieu im synovialen Kompartiment wird von einem komplexen Zytokin- und Chemokinnetzwerk reguliert. (3) TNF, IL-6 und GM-CSF scheinen besonders wichtig für den inflammatorischen Prozess zu sein. (12) Außerdem scheint IL-3 eine wichtige Rolle, speziell in der Frühphase der RA zu spielen. Dies konnte anhand des Mausmodells der kollagen-induzierten Arthritis (CIA) gezeigt werden. Die Hochregulation von IL-3 kommt dabei vor der Hochregulation der klassischen proinflammatorischen Zytokine im Synovium. Eine Blockade von IL-3 im Mausmodell reduzierte die Infiltration von Immunzellen, die Expression proinflammatorischer Zytokine, die Bildung von Autoantikörpern, Arthritis und Gelenkzerstörung. (13)

### 1.1.4 Klinik

Die RA zeigt eine große Bandbreite an klinischen Präsentationen. Der Erkrankungsbeginn ist meist heimtückisch und es können mehrere Monate vergehen, bevor die Diagnose gesichert ist. Die Hauptsymptome sind Schmerz, Steifigkeit und Schwellung vor allem der peripheren, kleinen Gelenke. Der Gelenkbefall ist im Verlauf meist symmetrisch ausgeprägt und es kommt über die Zeit zu irreversiblen Gelenkschäden mit entsprechenden Deformitäten. Dazu kommen Allgemeinsymptome wie Schwächegefühl, Fatigue, Fieber, Gewichtsverlust und Depressionen. Der klinische Verlauf ist sehr variabel, von milder, selbst-limitierender Arthritis bis zu rasch progressiver Multisysteminflammation. (8)

Die RA betrifft primär die Gelenke, sollte aber als Syndrom gesehen werden, das extraartikuläre Manifestationen (wie Rheumaknoten, Lungenbeteiligung, Vaskulitis, Augenbeteiligung) und systemische Komorbiditäten beinhaltet. (3)

### 1.1.5 Diagnostik

Eine frühe Diagnose ist der Schlüssel zum idealen therapeutischen Erfolg, speziell bei Patienten mit Risikofaktoren für ein schlechtes Outcome wie hohe Krankheitsaktivität, Vorhandensein von Autoantikörpern und frühem Gelenkschaden. (3)

Die Diagnostik setzt sich grundlegend zusammen aus klinischer Untersuchung, Labordiagnostik (Autoantikörper, Entzündungsparameter) und bildgebender Diagnostik. Letztere dient hauptsächlich der Beurteilung von Gelenkschäden und deren Fortschritt. (14)

#### 1.1.5.1 Labordiagnostik

Patienten mit RA weisen häufig bei bestehender Krankheitsaktivität eine Erhöhung von Akute-Phase-Proteinen wie CRP oder/und eine Erhöhung der BSG auf. Diese sind jedoch unspezifisch und können beispielsweise auch bei akuten Entzündungen erhöht sein. (15)

Deutlich spezifischer ist vielmehr die Bestimmung sogenannter Autoantikörper. So weist etwa die Hälfte der Patienten mit RA bereits einige Jahre vor Symptombeginn spezifische serologische Auffälligkeiten (Autoantikörper) auf. (16)

50-80% der Patienten mit RA sind Rheumafaktor (RF) positiv, haben ACPA oder beides. (14) Die meisten, aber nicht alle, ACPA-positiven Patienten haben auch eine klinisch manifeste RA. ACPA scheint jedoch spezifischer und sensitiver für die Diagnose zu sein als das Vorhandensein von Rheumafaktor, außerdem scheint es schwere Verläufe wie progressive Gelenksdestruktion besser vorherzusagen. (17) Patienten mit Autoantikörpern sind schwerer betroffen, was sich in der radiologischen Bildgebung zeigt. Die Prävalenz von Antikörpern steigt über die Zeit und ist am höchsten im Jahr vor Symptombeginn. (16) Unter effektiver DMARD-Therapie sinken die Konzentrationen von RF und ACPA. Eine Reduktion der Autoantikörper korreliert mit einer Reduktion der Krankheitsaktivität. RF sinkt rascher ab und erreicht sogar teilweise eine Serokonversion zu RF-Negativität, was bei ACPA kaum passiert. (18)

Bei Patienten mit langjähriger Symptombdauer und typischer klinischer Gelenkbeteiligung sind jedoch weder Akute-Phase-Reaktion noch serologische Marker ausschlaggebend für die Diagnose der RA. (15)

### 1.1.5.2 *Klassifikationskriterien*

Es gibt keine diagnostischen Kriterien für die RA. Der typische Patient stellt sich vor mit seit kurzem schmerzhaften und geschwollenen Gelenken, Morgensteifigkeit und Laborwertveränderungen wie erhöhtes CRP oder beschleunigte BSG. Leider ist diese Präsentation nicht spezifisch für die RA. Man muss auch an andere Gründe für Arthritiden denken, wie zum Beispiel eine reaktive Arthritis, Osteoarthritis, Psoriasisarthritis, infektiöse Arthritis (viral/bakteriell, im Speziellen auch Borreliose), oder seltenere Autoimmunerkrankungen wie Kollagenosen. Bei vielen Patienten kann bei der Erstvorstellung noch keine spezifische Diagnose gestellt werden. (3)

Es gibt allerdings Klassifikationskriterien für die RA, wobei die Klassifikation nicht synonym zur Diagnosestellung betrachtet werden kann. Eine Diagnose soll auf dem Level des individuellen Patienten korrekt sein, Klassifikation soll homogene Populationen zu Studienzwecken schaffen, kann aber genutzt werden, um die Diagnose zu unterstützen. Dazu werden die von ACR und EULAR erstellten Klassifikationskriterien von 2010 herangezogen. (3)

Um einen Patienten als mit oder ohne RA zu klassifizieren, braucht es eine fortbestehende Symptombdauer, eine gründliche Gelenksuntersuchung und mindestens einen serologischen Test (RF oder ACPA) und einen Wert für eine Akute-Phase-Reaktion (BSG oder CRP). (15)  
Zielpopulation zur Anwendung der Klassifikationskriterien sind Patienten,

- 1.) die mindestens ein Gelenk mit eindeutiger Synovitis (Schwellung) haben.
- 2.) deren Synovitis nicht von einer anderen Erkrankung besser erklärt wird. (15)

	Score
<b>Gruppe A – geschwollene Gelenke</b>	
1 großes Gelenk	0
2-10 große Gelenke	1
1-3 kleine Gelenke (mit oder ohne betroffene große Gelenke)	2
4-10 kleine Gelenke (mit oder ohne betroffene große Gelenke)	3
>10 Gelenke (mindestens ein kleines Gelenk)	5
<b>Gruppe B - Serologie</b>	
RF <i>und</i> ACPA negativ	0
RF <i>oder</i> ACPA niedrig positiv	2
RF <i>oder</i> ACPA hoch positiv	3
<b>Gruppe C – Akute-Phase-Reaktion</b>	
CRP <i>und</i> BSG normal	0
CRP <i>oder</i> BSG abnormal	1
<b>Gruppe D - Symptombdauer</b>	
Symptombdauer < 6 Wochen	0
Symptombdauer ≥6 Wochen	1

Tabelle 1: Klassifikationskriterien der RA nach ACR/EULAR 2010 (15)

Bei den "kleinen Gelenken" handelt es sich um Zehengrundgelenke II - IV, Fingermittelgelenke, Fingergrundgelenke, Interphalangealgelenk des Daumens und Handgelenk. (15)

Es braucht einen Score von mindestens 6/10, um bei einem Patienten eindeutig eine RA klassifizieren zu können. Obwohl man Patienten mit einem Score von weniger als 6/10 nicht als von RA betroffen klassifizieren kann, kann deren Status reevaluiert werden und die Kriterien können kumulativ über Zeit erfüllt werden. (15)

### 1.1.5.3 Aktivitätsbestimmung

Vom ACR wurden 6 verschiedene Methoden, die Krankheitsaktivität zu bestimmen, vorgeschlagen. Der Clinical Disease Activity Index (CDAI), die Patient Activity Scale (PAS), die Patient Activity Scale II (PAS-II), der Routine Assessment of Patient Index Data 3 (RAPID3), der Simplified Disease Activity Index (SDAI) und der Disease Activity Score in 28 joints (DAS28). (19) Letzterer wird im Folgenden genauer besprochen, weil in dieser Arbeit die Patienten nach diesem Kriterium zugeordnet wurden.

Der DAS28 ist ein Aktivitätsscore (DAS = disease activity score), der den Status von 28 Gelenken (Anzahl der schmerzhaften bzw. geschwollenen Gelenke), die globale Gesundheit des Patienten und entweder BSG (in mm) oder CRP (in mg/dl) in einer komplexen Gleichung verwendet. (20)

Die sich ergebenden Zahlenwerte werden folgendermaßen interpretiert:

<b>Bewertung:</b>	Remission	Niedrige Krankheitsaktivität	Moderate Krankheitsaktivität	Hohe Krankheitsaktivität
<b>Zahlenwert DAS28:</b>	< 2,6	≥ 2,6 bis < 3,2	≥ 3,2 bis < 5,1	≥ 5,1

*Tabelle 2: Interpretation DAS28 – Werte (3)*



### 1.1.6 Therapie

Die Therapie der RA hat zum Ziel, strukturellen Veränderungen vorzubeugen oder sie aufzuhalten und dadurch Invalidität vorzubeugen oder rückgängig zu machen. (3)

Die pharmakologische Herangehensweise bei der Behandlung von RA ist traditionell eine Mischung aus NSAR wie Aspirin und Ibuprofen, Analgetika, Glukokortikoiden und DMARDs. (7) Dabei sind die sogenannten DMARDs die Schlüsseltherapeutika. Sie reduzieren Synovitis und systemische Inflammation und verbessern die Funktion. (14) Es wird zwischen synthetischen und biologischen DMARDs unterschieden. Die synthetischen DMARDs können noch in konventionell-synthetisch (csDMARDs) und targeted-synthetisch (tsDMARD) unterschieden werden. (3)

NSAR reduzieren zwar den Schmerz und die Steifigkeit und verbessern die Funktion, sie verhindern aber nicht den Gelenkschaden und gelten somit nicht als DMARDs. (3) Glukokortikoide führen zu einem schnellen symptomatischen und krankheitsverändernden Effekt, sind aber mit schwerwiegenden Langzeitnebenwirkungen assoziiert. (21)

Seit 2013 wird empfohlen, bei der Therapie nach der sogenannten Treat-to-target Strategie vorzugehen. Dabei ist das Therapieziel eine Remission oder eine niedrige Krankheitsaktivität ( $\text{DAS28} \leq 2,6$ ). Es wird empfohlen, mit einer Kombination aus csDMARD und Glukokortikoiden zu beginnen und die Situation zu reevaluieren, wenn das Therapieziel nach 6 Monaten nicht erreicht wird. (22)

#### 1.1.6.1 csDMARDs

Bei den csDMARDs handelt es sich um MTX, Sulfasalazin, Leflunomid und Hydroxychloroquin oder Chloroquin. (3) Sie entfalten ihre Wirkung langsam, bremsen den inflammatorischen Prozess, verhindern Gelenkschäden und erhalten Gelenkstruktur und -funktion. (23)

MTX bleibt das meist genutzte csDMARD zur Behandlung der RA, wegen seiner niedrigen Kosten, der Langzeit-Effektivität und dem akzeptablen Sicherheitsprofil. (7) Man sollte die Patienten jedoch wegen potenzieller Nebenwirkungen der Therapie mit MTX kontrollieren (z.B.: Erhöhung der Transaminasen, Alopezie, orale Ulzerationen, Zytopenien und interstitielle Pneumonie). (24)

Sulfasalazin kann bei einer Kontraindikation Unverträglichkeit gegen MTX eingesetzt werden. (25) Sulfasalazin ist ähnlich effizient wie MTX (allerdings wurde in der zitierten Studie eine vergleichsweise niedrige Dosis MTX verwendet). (26)

Auch Leflunomid ist eine Therapieoption, die Methotrexat in der RA-Therapie effektiv ersetzt, wenn MTX nicht vertragen wird und die erste Wahl, wenn MTX kontraindiziert ist. (27)

Die Antimalariamittel Hydroxychloroquin und Chloroquin haben nur einen sehr schwachen protektiven Effekt auf die Gelenkstruktur. (28)

Davon abzugrenzen ist Tofacitinib als tsDMARD. Tofacitinib wirkt über Inhibierung der Januskinasen. Inhibierung der JAK stört die Signaltransduktion und dadurch die Zellaktivierung durch IL-6, GM-CSF, Interferone und andere Zytokine. (29) Es ist seit 2017 in der EU zugelassen. (30) In jüngster Zeit wurden mehrere weitere JAK-Inhibitoren entwickelt und für die RA zugelassen.

#### *1.1.6.2 bDMARDs*

Die im Moment zugelassenen bDMARDs lassen sich in vier Gruppen einteilen: Anti-TNF (Adalimumab, Certolizumab, Etanercept, Golimumab, Infliximab), IL-6-Rezeptor-Block (Tocilizumab), T-Zell-Co-Stimulations-Blockade (Abatacept) und B-Zell Depletion (Rituximab). (31) Trotz der unterschiedlichen Wirkmechanismen zeigen alle bDMARDs eine ähnliche Wirksamkeit. Eine Kombinationstherapie von bDMARDs mit csDMARDs ist der Monotherapie mit bDMARDs überlegen. (31) Das suggeriert, dass alle bDMARDs wirken, indem sie mit einer gemeinsamen Endstrecke, der Produktion proinflammatorischer Zytokine, interferieren. (32)

Folgende Therapieansätze wurden versucht ohne eine Verbesserung des Outcomes zu erzielen: IL-1, IL-12, IL-17, IL-20, IL-21, IL-23, anti-CD4, anti-BAFF und Inhibitoren von p38-MAPK und SYK. (3)

Das Hauptproblem bei der Behandlung mit bDMARDs liegt im Infektionsrisiko. (25)

### **1.1.7 Prognose**

Unkontrollierte aktive RA verursacht Gelenkschäden, Invalidität, reduzierte Lebensqualität, und kardiovaskuläre und andere Komorbiditäten. (14) Außerdem führt die RA nach wie vor häufig zu Erwerbsminderung. (33)

Falls die Entzündung unter Therapie rasch zurückgeht, kann Schaden oder die Progression von Schaden verhindert werden, und physische Funktion kann ohne Folgeschäden maximal verbessert werden. Jedoch sprechen viele Patienten über die Zeit schlechter auf die Therapie an. (3) Außerdem versagen die aktuellen konventionellen und biologischen DMARDs manchmal oder führen nur zu teilweisem Ansprechen. Verlässliche Biomarker für Prognose, therapeutisches Ansprechen und Toxizität fehlen. (1)

Ein Großteil der Todesfälle sind auf kardiovaskuläre und pulmonale Komplikationen zurückzuführen. Die höhere Mortalität geht aber nicht nur darauf zurück, sondern auch auf andere Störungen, wie respiratorische, hämatologische/hämatopoietische Störungen, Infektionserkrankungen und urogenitale und gastrointestinale Störungen. (34)

## **1.2 Interleukin-3**

### **1.2.1 Struktur von IL-3 und seinem Rezeptor**

IL-3 wird auch Multi-CSF genannt und ist ein Monomer, das aus 133 Aminosäuren besteht. (35,36)

Die Rezeptoren für GM-CSF, IL-3 und IL-5 haben beim Menschen die gleiche  $\beta$ -Untereinheit (CD131 oder  $\beta_c$ ). Es sind also heterodimere Rezeptoren mit einer gemeinsamen Kette. Die für jedes Zytokin einzigartige  $\alpha$ -Untereinheit (bei IL-3 CD123) bindet an das Zytokin, die  $\beta$ -Untereinheit bindet nicht oder nur schwach, spielt jedoch bei der Signaltransduktion eine wichtige Rolle. (36,37)

### **1.2.2 IL-3 Produktion und IL-3-Rezeptor Expression**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen gelten als Hauptquelle von IL-3 (13,38). IL-3 kann jedoch auch produziert werden von CD-8<sup>+</sup> T-Zellen (39), Thymusepithelzellen (40), B-Zellen (im Sepsismodell) (41) und Basophilen Granulozyten (bei IgE-abhängiger Aktivierung). (42)

CD123 wird von vielen verschiedenen CD34+ hämatopoietischen Stammzellen exprimiert. (43) Unter den peripheren Zellen des menschlichen Blutes findet man unter pDCs und Basophilen Granulozyten eine starke IL-3-Rezeptor Expression und eine niedrigere oder variable Expression auf Monozyten, Eosinophilen Granulozyten und B-Zellen. Außerdem wird der IL-3-Rezeptor stark auf aktivierten CD4+ und CD8+ T-Zellen und B-Zellen exprimiert. (44)

### **1.2.3 Wirkung von IL-3**

IL-3 wirkt sowohl als hämatopoietisches als auch als pro-inflammatorisches Zytokin auf verschiedene Zelltypen.

Es fördert die Proliferation und Differenzierung von Zellen der myeloischen Reihe (Megakaryozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, Monozyten, neutrophile Granulozyten und Erythrozyten-Vorläuferzellen). (45) Jedoch spielt es für die basale Hämatopoiese keine Rolle. So weisen beispielsweise IL-3 knock-out-Mäuse eine ungestörte basale Hämatopoiese auf. (41,46,47)

Jedoch scheint bei einigen Leukämien wie AML und CML IL-3 als Wachstumsfaktor zu fungieren, da es bei diesen Erkrankungen auf den malignen Zellen zu einer massiven Überexpression der alpha-Kette des IL-3-Rezeptors (CD123) kommt. (48)

pDCs können sich unter dem Einfluss von IL-3 aus Monozyten entwickeln. In der Kultur sind ihr Überleben und ihre Proliferation von IL-3 abhängig. (49) Zudem führt die Stimulation mit IL-3 zur Ausschüttung von TNF- $\alpha$  und IFN $\alpha$  aus pDCs (50).

Stimulation mit IL-3 führt bei Basophilen Granulozyten zu einer massiven Freisetzung von Histamin, IL-4, Leukotrien C<sub>4</sub>, IL-6 und IL-13. Zudem verlängert IL-3 auch maßgeblich die Lebensdauer basophiler Granulozyten. (13,51–53)

Bei aktivierten T- und B-Zellen verbessert es Proliferation und Überleben, steigert die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und vermindert die Ausschüttung von antiinflammatorischem IL-10 durch B-Zellen. (44)

In den letzten Jahren konnte zudem gezeigt werden, dass IL-3 als pro-inflammatorisches Zytokin eine Schlüsselrolle in der Entstehung und dem Progress verschiedener Autoimmunerkrankungen spielt. So konnte in verschiedenen Tiermodellen wie beispielsweise

der kollagen-induzierten Arthritis (CIA) (13), der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE) (54) und der MRL/lpr Lupus Nephritis (55) gezeigt werden, dass die Administration von IL-3 zu einem früheren und aggravierten Krankheitsbild führt, während die Hemmung von IL-3 zu einer deutlichen Besserung der Erkrankung führte.

In einem Sepsismodell konnte anhand von IL-3 knock-out Mäusen zudem gezeigt werden, dass IL-3 als frühes Zytokin für die Entstehung der Zytokinkaskade der Sepsis bzw. eines Zytokinsturms notwendig ist. So wiesen die IL-3 knock-out Mäuse nach Induktion der Sepsis deutlich reduzierte pro-inflammatorische Zytokinspiegel auf und überlebten hochsignifikant besser im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. (41)

### **1.3 Zielsetzung der Arbeit**

Obwohl in den letzten Jahren viele neue Behandlungsmöglichkeiten der RA zugelassen wurden, ist die Erkrankung bei einem Teil der Patienten nur ungenügend behandelbar. Volle oder bleibende Remission ist nicht typisch und kann normalerweise nicht ohne kontinuierliche Behandlung erreicht werden. (3)

Im Tiermodell der CIA konnte bereits gezeigt werden, dass IL-3 vor allem in der Frühphase der Erkrankung eine Auswirkung auf die Progression hat, wobei durch die Blockade von IL-3 eine deutliche Minderung der Schwere der Erkrankung erreicht werden konnte. (13)

Zielsetzung dieser Arbeit war es, dies nun translational beim Menschen weiter zu untersuchen. So sollte die Eignung von IL-3 als neuem therapeutischen Ziel bei RA und eventuell auch sein Wert als diagnostischer Marker geklärt werden.

Dabei wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht ob sich die Zellen von Patienten mit RA im Unterschied zu gesunden Kontrollen in ihrer Produktion von IL-3 (im Hinblick auf Quelle und produzierter Menge nach Aktivierung) und/oder der IL-3-Rezeptor Expression unterscheiden. Ein weiteres Ziel war es mit Hilfe von Stimulationsassays herauszufinden, ob RA Patienten gegebenenfalls auch sensibler oder weniger sensibel auf sezerniertes IL-3 reagieren.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.2 Laborgeräte und -materialien

#### 2.2.1 Geräte

<b>Laborgerät</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Brutschränke	Thermo Fisher Scientific, Dreieich; Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
Durchlichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Kryobox „Mr. Frosty“	Thermo Fisher Scientific, Dreieich bzw. Biocision, Kalifornien, USA
Mehrkanalpipetten „Transferpette“ (5-50µl, 2-200µl)	Brand, Wertheim
Microplate Reader „Infinite M200 PRO“	Tecan, Männedorf, Schweiz
Microplate Washer „Wellwash 4 Mk 2“	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Pipetten “Pipetman” (P10, P20, P100, P200, P1000)	Gilson, Limburg-Offheim
Pipette „Multipette plus“	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Pipettierhilfe „Accu-jet pro“	Brand, Wertheim
Pipettierhilfe „Pipetus“	Hirschmann, Eberstadt
Schüttelgerät „REAX 2000“	Heidolph, Schwabach

Schüttelgerät „Vortex Genie 2“	Scientific Industries, New York, USA
Sterilbank Jouan MSC 12	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Stickstofftank	German Cryo, Jüchen
Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn
Wasserbad	GFL, München
Zentrifuge (Centrifuge 5417 R)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (Megafuge 16R)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

*Tabelle 3: Verwendete Geräte*

### 2.2.2 Glas- und Plastikware

<b>Glas- und Plastikware</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Abdeckfolie für Mikrottestplatten	Roth, Karlsruhe
Combitips 0,5ml	Eppendorf, Hamburg
ELISA-Platte F96 Maxisorp	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Kryoröhrchen (1ml)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Kryoröhrchen CryoPure (1ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotester Rundbodenplatte 96-Well	Sarstedt, Nümbrecht
Neubauer Zell-Zählkammer C-Chip	Kisker Biotech, Steinfurt
Pasteurpipetten ohne Wattestopfen	Roth, Karlsruhe

Petrischale	BD Biosciences, Heidelberg
Pipettenspitzen (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettieraufsätze für „Multipette plus“	Eppendorf, Hamburg
Polystyrolröhrchen für Durchflusszytometrie (5ml)	BD Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich
Reaktionsgefäße (0,5ml; 1,5ml; 2,0ml; 5,0ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten „Cellstar“ Rundboden 96-Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht

*Tabelle 4: Glas- und Plastikware*

### 2.2.3 Chemikalien, Reagenzien, Puffer

<b>Chemikalien</b>	<b>Bezugsquelle</b>
AccuCheck Counting Beads für Durchflusszytometrie	Life Technologies, Carlsbad, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen



Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors)	eBioscience, Inc., San Diego, USA
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FACS Lysing Solution, FACS Clean, FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Permash (Intracellular Staining Permash Buffer)	BioLegend, San Diego, USA
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Tetramethylbenzidin (TMB Substrate Set)	BioLegend, San Diego, USA
Trypanblau-Lösung	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Merck Millipore, Darmstadt

*Tabelle 5: Chemikalien, Reagenzien, Puffer*

#### **2.2.4 Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze**

<b>Zellkulturmedien und -zusätze</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Fetales Kälberserum (hitzeinaktiviert 1h bei 56 °C)	PAA, Cölbe

L-Glutamin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Medium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Streptomycin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 6: Zellkulturmedien und -zusätze

### 2.2.5 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

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

Tabelle 7: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

### 2.2.6 Antikörper für die extrazelluläre Durchflusszytometrie

Antikörper	Konjugat	Klon	Bezugsquelle	Eingesetzte Konzentration
CD3	APC-Cy7	SK7	eBioscience, Inc., San Diego, USA	1:100 bzw. 1:40

CD4	V500	RPA-T4	BD Biosciences, Heidelberg	1:100
CD4	APC	RPA-T4	BioLegend, San Diego, USA	1:20
CD8	PE-Cy7	SK1	eBioscience, Inc., San Diego, USA	1:100
CD8	PerCP Cy5.5	RPA-T8	eBioscience, Inc., San Diego, USA	1:20
CD11b	PE-Cy7	M1/70	BioLegend, San Diego, USA	1:100
CD14	V500	MØPg	BD Biosciences, Heidelberg	1:100
CD16	Pacific Blue	3G8	BioLegend, San Diego, USA	1:100
CD19	eFluor450	HIB19	eBioscience, Inc., San Diego, USA	1:100
CD116	FITC	4H1	BioLegend, San Diego, USA	1:40
CD123	PE-Cy5	9F5	BD Biosciences, Heidelberg	1:20
CD131	PE	1C1	BioLegend, San Diego, USA	1:100
CD193	APC-Cy7	5E8	BioLegend, San Diego, USA	1:40

CD304	APC	12C2	BioLegend, San Diego, USA	1:40
HLA-DR II	APC	G-46-6	BD Biosciences, Heidelberg	1:100

Tabella 8: Antikörper für die extrazelluläre Durchflusszytometrie

### 2.2.7 Antikörper für die intrazelluläre Durchflusszytometrie

Antikörper	Konjugat	Klon	Bezugsquelle	Eingesetzte Konzentration
IFN- $\gamma$	FITC	4S.B3e	eBioscience, Inc., San Diego, USA	1:20
IL-2	PE-Cy7	MQ1-17H12	eBioscience, Inc., San Diego, USA	1:20
IL-3	PE	Anti-IL-3 AK	AG Mack, Regensburg	1:20

Tabella 9: Antikörper für die intrazelluläre Durchflusszytometrie

### 2.2.8 Zytokine, Antikörper, Enzyme

Zytokin/Antikörper/Enzym	Bezugsquelle
Coat Anti-IL-3 Antikörper	AG Mack, Regensburg
Anti- Human CD3 (Klon OKT3)	eBioscience, Inc., San Diego, USA
ChromPure Mouse IgG, whole molecule	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
Detection Anti-IL-3-HRP Antikörper	AG Mack, Regensburg

Mouse IgG1 $\kappa$ isotype control (Klon MOPC-21)	BioXCell, West-Lebanon, USA
Rekombinantes human GM-CSF	Peprotech, Hamburg
Rekombinantes human IL-3	BioLegend, San Diego, USA

*Tabelle 10: Zytokine, Antikörper, Enzyme*

### 2.2.9 IL-3 ELISA

<b>Lösung</b>	<b>Inhaltsstoffe</b>
Block- und Verdünnungspuffer	1 % BSA in PBS
Coating-Puffer	1 x PBS
Entwicklungslösung	TMB Substrate Set
Stopplösung	12,5% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Schwefelsäure)
Waschpuffer	0,05% Tween 20 in PBS
10x PBS (für Waschpuffer 1:10 verdünnt)	11,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 80g NaCl, 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2 g KCl

*Tabelle 11: Materialien für den IL-3 ELISA*

### 2.2.10 ELISA Sets

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Human DuoSet ELISA für IL-6	R&D, Minneapolis, USA
Human DuoSet ELISA für GM-CSF	R&D, Minneapolis, USA

*Tabelle 12: ELISA Sets*

### 2.2.11 ELISA allgemein

<b>Lösung</b>	<b>Inhaltsstoffe</b>
Block- und Verdünnungspuffer	1 % BSA in PBS
Coating-Antikörper	Coat Anti-IL-3 Ak (10µg/ml)
Coating-Puffer	1 x PBS
Detektions-Antikörper	Detection Anti-IL-3-HRP Ak (400ng/ml)
Entwicklungslösung	TMB Substrate Set
Stopplösung	12,5% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Schwefelsäure)
Waschpuffer	0,05% Tween 20 in PBS
10x PBS (für Waschpuffer 1:10 verdünnt)	11,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 80g NaCl, 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2 g KCl

*Tabelle 13: ELISA allgemein*

### 2.2.12 Analyse- und Bearbeitungsprogramme

<b>Programm</b>	<b>Bezugsquelle</b>
FACS Diva Version 8.0.1.	BD Biosciences, Heidelberg
Microplate Reader Software i-control <sup>TM</sup>	Tecan, Männedorf, Schweiz
Microsoft Excel	Microsoft, Redmont, USA
Microsoft Word	Microsoft, Redmont, USA

*Tabelle 14: Analyse- und Bearbeitungsprogramme*

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Patientenrekrutierung und Gewinnung des Probenmaterials**

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte im Zeitraum von November 2017 bis April 2018 in der Klinik und Poliklinik für Rheumatologie/klinische Immunologie des Asklepios Fachkrankenhauses Bad Abbach. Patienten mit der gesicherten Diagnose einer rheumatoiden Arthritis wurden ausführlich über die Studie und die zugehörige Untersuchung (Blutentnahme, Datenzugriff) aufgeklärt, es wurde auch diesbezüglich Informationsmaterial ausgehändigt. Nach Einholung des schriftlichen Einverständnisses wurden im Rahmen der Routine-Blutentnahme je ein Röhrchen EDTA- (6ml) und ein Röhrchen Heparin-Blut (2ml) zu den Studienzwecken abgenommen. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte immer noch am selben Tag und unter einer Sterilbank.

Patienten, die während des Zeitraums der Rekrutierung mehrfach in der Klinik vorstellig wurden, wurden als zwei getrennte Patienten gewertet, weil zu unterschiedlichen Zeitpunkten von einer unterschiedlichen Krankheitsaktivität auszugehen ist.

Ausschlusskriterien waren zusätzliche andere Autoimmunerkrankungen (wie z.B.: CED, SLE, Hashimoto-Thyreoiditis), Störungen des weißen Blutbilds (wie z.B.: Leukämien, Basophilie) oder ein akuter Infekt.

So wurden insgesamt 130 Patienten akquiriert, davon 90 Frauen und 40 Männer mit einem durchschnittlichen Alter von 62 Jahren.

Außerdem wurden im Zeitraum von Januar 2018 bis Mai 2018 Blutproben von insgesamt 42 gesunden Kontrollen gesammelt, davon 24 Frauen und 18 Männer mit einem durchschnittlichen Alter von 45 Jahren.

### **2.2.2 Plasmagewinnung**

Blutplasma erhält man durch Zentrifugieren von ungerinnbar gemachtem Blut. Blutplasma besteht zu 90% aus Wasser und zu 10% aus gelösten Substanzen. Von den festen Substanzen machen die Proteine ca. 2/3 aus, der Rest sind niedermolekulare Stoffe und Elektrolyte. (56) Hier wurden 1,5ml EDTA Blut in Eppendorf-Cups bei 2500rpm bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, auf 4 Cups à 200µl aliquotiert und bei -20°C weggefroren. Dadurch können Laborparameter nachbestimmt werden, wenn dies nötig ist.

### **2.2.3 Gewinnung von PBMCs aus Vollblut mittels**

#### **Dichtegradientenzentrifugation und anschließendes Einfrieren**

Periphere mononukleäre Blutzellen lassen sich durch eine Ficoll-Hypaque®-Zentrifugation aus Vollblut isolieren. Dabei wird verdünntes, gerinnungsunfähig gemachtes Blut über Ficoll-Hypaque® geschichtet und zentrifugiert. Rote Blutkörperchen und polymorphkernige Leukozyten oder Granulozyten besitzen eine höhere Dichte und passieren die Ficoll-Hypaque®-Schicht, während mononukleäre Zellen (Lymphozyten und einige Monozyten) darüber eine Bande bilden. (36)

Hier wurde dem EDTA-Röhrchen erst 1,5ml für die Plasmagewinnung und 2x100µl für die extrazelluläre FACS-Färbung entnommen, und das restliche EDTA-Blut in einem 50ml Falcon mit 10ml sterilem PBS verdünnt.

In einem frischen 50ml Falcon wurden 10ml Ficoll®-Lösung vorgelegt, dann wurde diese vorsichtig mit dem EDTA-Blut-PBS-Gemisch überschichtet. Danach erfolgte eine Zentrifugation 21°C und 1500rpm für 20 min und ohne abrupte Beschleunigung oder Bremsung.



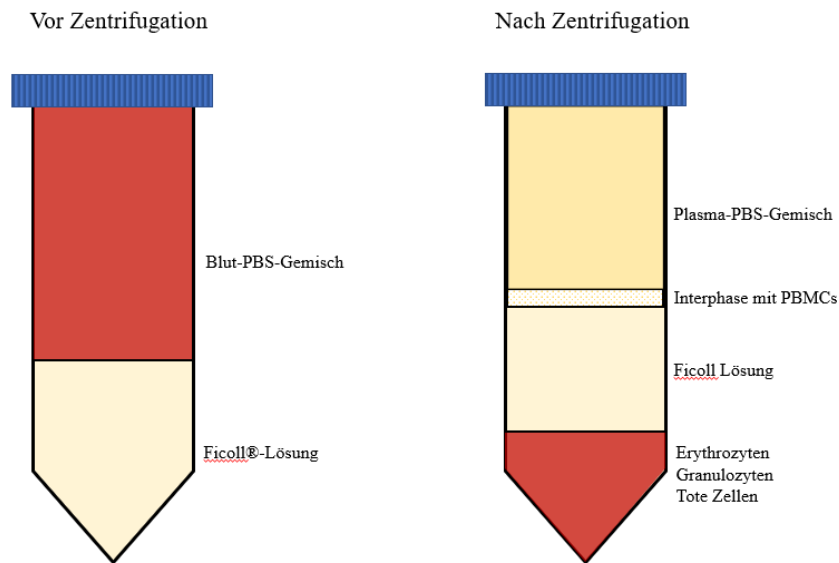


Abbildung 1: Ficoll-Hypaque® Dichtegradientenzentrifugation, Zustand vor und nach Zentrifugation

Das sich obenauf befindliche Gemisch aus Plasma und PBS wurde daraufhin bis auf einen Zentimeter abgesaugt und anschließend wurde der weiße Ring der Interphase abgenommen und in ein neues 50ml Falcon überführt. Dieses wurde nochmal mit PBS aufgefüllt und bei 4°C und 1500rpm für 7 min zentrifugiert, um Reste von Plasma auszuwaschen.

Danach wurde erneut der Überstand abgesaugt und das resultierende Zellpellet in 2,5ml Nährmedium (2,5ml RPMI 1640 Medium + 10%FCS) resuspendiert. Nach Zugabe von 2,5ml Einfriermedium (FCS + 20% DMSO) wurden die Zellen in Aliquots à 1ml auf Kryoröhrchen verteilt und in Kryoboxen mit einer Abkühlrate von 1°/Stunde bei -80°C, um die Bildung von Eiskristallen zu vermeiden, weggefroren. Die Kryoröhrchen wurden innerhalb von 3 Tagen in den Stickstofftank überführt.

#### 2.2.4 Auftauen der Zellen und Zellzahlbestimmung

Die via Ficoll®-Hypaque gewonnenen PBMCs wurden zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgetaut, um damit eine Zellkultur anzusetzen und eine intrazelluläre Färbung für die Durchflusszytometrie durchzuführen. Dazu wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und in einem Wasserbad für 2-4 Minuten aufgetaut. Anschließend wurde der Inhalt der Röhrchen in ein 15ml Falcon mit RPMI 1640 Medium + 10%FCS, das zuvor erwärmt

worden war, überführt. Diese wurden dann bei 4°C und 1800rpm für 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 250µl hMedium (= RPMI 1640 Medium + 10%FCS + Penicillin/Streptomycin + L-Glutamin) resuspendiert.

Im Anschluss wurden 10µl der Zellsuspension zur Zellzahlbestimmung abgenommen und mit 90µl RPMI 1640+10%FCS verdünnt ( $\cong$  1:10 Verdünnung) und das 15ml Falcon anschließend auf Eis gestellt.

Zur Differenzierung zwischen toten und vitalen Zellen wurde Trypanblau verwendet. Tote Zellen färben sich durch ihre gestörte Membranpermeabilität blau, während vitale Zellen hell bleiben. Für die Färbung wurden 10µl der 1:10 verdünnten Zellsuspension mit 10µl einer 0,1%-igen Trypanblaulösung gemischt. Von dieser Mischung wurden 10µl in eine Neubauer Zell-Zählkammer gegeben. Von den vier Quadranten wurden zwei repräsentative ausgewählt und die ungefärbten Zellen darin gezählt. Der erhaltene Wert wurde gemittelt und in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Zellzahl}/250\mu\text{l} = \text{MW Zellzahl} * 10^4 * 20 * 0,25$$

Dabei ist der Kammerfaktor  $10^4$ , 20 der Verdünnungsfaktor und 0,25ml das gesuchte Volumen.

### **2.2.5 Zellkultur**

Nach dem Zählen wurde berechnet, wie viel hMedium man den ursprünglichen 250µl Zellsuspension zusetzen muss, um eine Konzentration von 500.000 Zellen pro 100µl zu erreichen:

- $\text{Zellzahl}/250\mu\text{l} * 100 = \text{Konzentration}/100\mu\text{l}$
- $\text{Konzentration}/100\mu\text{l}: \text{Zielkonzentration}/100 = \text{Verdünnungsfaktor}$
- $\text{Verdünnungsfaktor} * \text{Restvolumen} = \text{Zielvolumen}$
- $\text{Zielvolumen} - \text{Restvolumen} = \text{zuzusetzendes Volumen}$

Zusammenfassend:

$$\frac{\frac{\text{Zellzahl}}{250} * 100}{\frac{500.000}{1}} * 250 - 250 = \text{zuzusetzendes Volumen}$$

Das errechnete Volumen an hMedium wurde zugegeben, danach wurden 2 Mal 500.000 Zellen für die intrazelluläre Färbung der Durchflusszytometrie abgezweigt. Der Rest wurde auf einer 96-Well Platte in Aliquots à 100µl = 500.000 Zellen ausplattiert. Danach wurde zu jedem Aliquot 100µl anti-CD3 (5µg/ml) hinzugefügt. Die äußerste Reihe um die Proben herum wurde mit sterilem PBS befüllt, um ein Austrocknen der Wells zu verhindern. Die Kultivierung erfolgte für 3 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Der Komplex aus T-Zell-Rezeptor (TCR) und CD3 ist wichtig für die Differenzierung, das Überleben und die Funktion von T-Zellen. Zudem führt eine Stimulation des Rezeptors zu einer Aktivierung der T-Zellen. (57)

Nach 3 Tagen wurden 180µl Überstand pro Well abgenommen, in 0,5µl Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C weggefroren, um sie zu einem späteren Zeitpunkt für ELISAs (siehe 2.2.8) zu verwenden.

### 2.2.6 Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Leukozyten wurde eine durchflusszytometrische Untersuchung mit dem FACS-Gerät eingesetzt.

Bei einem Durchflusszytometer werden Fluoreszenzen und Zellencharakteristika gemessen. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass Zelltypen anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und auch intrazellulären Zusammensetzung unterschieden werden können. (58)

Man setzt auch auf die Markierung der Zellen mit Antikörpern, die gegen bestimmte intrazelluläre Strukturen gerichtet sind. Diese Antikörper sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Die Messung der Zellen im Durchflusszytometer beruht darauf, dass die so markierten Zellen von einem Laserstrahl erfasst werden. Dadurch kommt es zu

Lichtstreuungen, sowie zu einer Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, die daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. (58)

Außerdem lässt sich eine Aussage über die Größe (Forwardscatter = FSC) der Zelle und deren Granularität (mittels Sidescatter = SSC) treffen. (58)

### 2.2.6.1 Extrazelluläre Färbung

Am Tag der Probengewinnung wurden pro Patienten je zwei extrazelluläre durchflusszytometrische Färbungen durchgeführt. Dazu wurden je zwei Mal 100µl EDTA-Blut verwendet und mit je 20µl eines Antikörper Mastermix versetzt.

Die erste Färbung sollte hauptsächlich zur Differenzierung von Neutrophilen Granulozyten und Monozyten dienen. Für die erste Färbung wurden folgende Antikörper in folgenden Verdünnungen eingesetzt:

<b>Antikörper + Farbe</b>	<b>Verdünnung</b>
CD116 FITC	1:40
CD123 PerCP	1:20
CD131 PE	1:100
CD304 APC	1:25
CD11b PE-Cy7	1:100
CD193 APC-Cy7	1:40
CD16 Pacific Blue	1:100
CD14 AmCyan	1:100

*Tabelle 15: Extrazelluläre Färbung 1*

Die zweite Färbung sollte hauptsächlich zu Differenzierung von B- und T-Lymphozyten dienen. Für die zweite Färbung wurden folgende Antikörper in folgenden Verdünnungen eingesetzt:

<b>Antikörper + Farbe</b>	<b>Verdünnung</b>
CD116 FITC	1:40
CD123 PerCP	1:20
CD131 PE	1:100
HLA-DR II APC	1:100
CD8 PE-Cy7	1:100
CD3 APC-Cy7	1:100
CD19 Pacific Blue	1:100
CD4 AmCyan	1:100

*Tabelle 16: Extrazelluläre Färbung 2*

Die Verdünnungen beziehen sich jeweils auf das Endvolumen von 120µl. Als Ausgleichsvolumen im Mastermix wurde 0,9%NaCl-Lösung eingesetzt.

Nach Hinzufügen des Mastermixes wurden die Proben für 20 Minuten im Kühlschrank inkubiert (dunkel, 4°C). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Färbung mit 4ml kalter 0,9%NaCl gestoppt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C und 1600rpm für 7 Minuten. Durch diesen Waschschrift werden ungebundene Antikörper entfernt. Der resultierende Überstand wurde abgesaugt, die Zellen gründlich geschüttelt und anschließend mit 1ml FACS-Lysing-Solution versetzt und damit für 10 Minuten inkubiert. FACS-Lysing-Solution wird bei Vollblutproben eingesetzt, um die enthaltenen Erythrozyten zu lysieren und damit eine bessere Analyse der diversen Leukozyten zu ermöglichen. Nach Ablauf der 10 Minuten wird die Probe nochmals mit 3ml kalter 0,9%NaCl-Lösung gewaschen und zentrifugiert (4°C, 1600rpm, 7 Minuten). Anschließend wurde der Überstand so abgesaugt, dass ein annähernd gleiches Restvolumen in den FACS-Röhrchen verblieb.

Um genaue Zellzahlbestimmungen zu ermöglichen, wurden noch 20µl Counting Beads hinzugefügt. Dadurch, dass die Konzentration und das eingesetzte Volumen der Counting Beads und das ursprüngliche Probenvolumen bekannt sind, können aus den aufgenommenen Beads Rückschlüsse über die tatsächliche Zellkonzentration in der Probe gemacht werden. (59)

#### 2.2.6.2 *Intrazelluläre Färbung*

Gefärbt wurden pro Probanden die 2 Mal 500.000 aufgetauten PBMCs, die vor der Zellkultur abgezweigt wurden. Diese wurden in einer 96-Loch Rundbodenplatte ausplattiert. Die Zellkonzentration betrug 500.000/100µl, entsprechend wurden 100µl der Zellsuspension eingesetzt und danach 100µl hMedium plus Cell Stimulation Cocktail hinzugefügt. Der Cell Stimulation Cocktail wurde in einer Konzentration von 1:500 im Endvolumen, das heißt auf 200µl eingesetzt.

Der Cell Stimulation Cocktail ist eine Mischung von Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), Ionomycin, Brefeldin A und Monesin. PMA und Ionomycin induzieren die Aktivierung verschiedener Zellen, damit diese Zytokine produzieren. Brefeldin A und Monesin resultieren in der Akkumulation der sekretierten Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat. (60) Dies erleichtert die Detektion der produzierten Zytokine.

Es folgte eine Inkubation im Brutschrank für 3 Stunden bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte bei 4°C und 2500rpm für 4 Minuten zentrifugiert und die Platte ausgeschüttet. Es folgte ein Waschschrift mit 200µl PBS und eine neuerliche Zentrifugation unter den oben angegebenen Spezifikationen. Danach wurden 10µl mouse IgG in PBS (100µg/ml) hinzugefügt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Das mouse IgG dient der Blockade unspezifischer Fc-Bindungsstellen. Daraufhin wurden die Zellen erst extrazellulär gefärbt, um später eine Differenzierung der Zelltypen zu ermöglichen. Dafür wurden 10µl des folgenden Mastermix hinzugegeben, die Verdünnungen beziehen sich auf das Endvolumen im Well, 20µl. Ausgleichsvolumen war wieder 0,9%NaCl-Lösung.

<b>Antikörper + Farbe</b>	<b>Verdünnung</b>
CD3 APC-Cy7	1:40
CD8 PerCP Cy5.5	1:20
CD4 APC	1:20

*Tabelle 17: Extrazelluläre Färbung PBMCs*

Nach 20 Minuten Inkubationszeit im Kühlschrank (4°C, dunkel) folgte ein Waschschrift mit 200µl PBS und Zentrifugation wie oben angegeben. Anschließend werden die Zellen für 20min im Kühlschrank mit 150µl/Well Cytotfix/Cytoperm inkubiert. Das sorgt für die Permeabilisation der Zellmembran, damit die Antikörper für die intrazelluläre Färbung ins Zellinnere gelangen können. Es erfolgten zwei Waschschriffe mit kaltem Permwash, einmal mit 50µl, dann mit 200µl. Permash sorgt dafür, dass die Permeabilität der Zellwand erhalten bleibt. Das Permash wurde im Voraus 1:10 mit deionisiertem Wasser verdünnt.

Es folgte ein neuerlicher Fc-Block mit 10µl mouse IgG (100µg/ml) in Permash, für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Dann wurden zwei Mastermixe für die intrazelluläre Färbung angesetzt und zugegeben (die Verdünnung bezieht sich auf das Endvolumen von 20µl/Well), als Ausgleichsvolumen wurde dafür Permash verwendet. Die beiden Mastermixe unterscheiden sich nur darin, ob Anti-IL-3 oder mouse IgG1κ verwendet wurde.

<b>Antikörper + Farbe</b>	<b>Verdünnung</b>
IL-2 PE	1:20
IFN-γ FITC	1:20
Anti-IL-3 PE beziehungsweise	5µg/ml
Isotyp mouse IgG1κ PE	1:40

*Tabelle 18: Intrazelluläre Färbung PBMCs*

Anti-IL-3 PE dient der Färbung von IL-3, mouse IgG1κ der Isotypen-Kontrollfärbung.

Es folgten zwei weitere Waschstapen mit Permwash, einmal mit 150µl, einmal mit 200µl, dann wurde alles in 70µl Permwash resuspendiert, in Polystyrolröhrchen überführt und durchflusszytometrisch aufgenommen.

### 2.2.7 Stimulation von Vollblut

Die Auswirkung unterschiedlicher Stimulanzen auf die Produktion und Expression von IL-3 und seinem Rezeptor (und anderen Zytokinen) sollte auch untersucht werden. Dafür wurden je 100µl Heparin-Vollblut mit 200µl RPMI-1640-Medium + dem jeweiligen Stimulans versetzt.

Es wurden pro Patient 6 Mal 100µl nach folgendem Schema eingesetzt:

<b>Stimulans</b>	<b>Konzentration in RPMI-1640 Medium</b>
Negativkontrolle, angesetzt als Doppelwert	Kein Stimulans
hIL-3	3ng/ml
hGM-CSF	3ng/ml
Anti-CD3 coat	Coat mit 300µl, 5µg/ml

*Tabelle 19: Stimulanzen mit Konzentration*

Der Anti-CD3 Coat wurde mit 5µg/ml Anti-CD3 in PBS für 4 Stunden bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub> im Brutschrank durchgeführt. Dem RPMI-Medium war entsprechend einmal nichts Weiteres zugesetzt, als Negativkontrolle für die IL-3 Produktion.

Die Proben wurden mit Parafilm abgedeckt und für 24 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 130µl Überstand abgenommen, auf eine 96-Loch Rundbodenplatte überführt und bei -20°C weggefroren, um zu einem späteren Zeitpunkt damit Zytokin-ELISAs durchzuführen.

Die restliche Probe wurde anschließend extrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dafür wurden 35µl Mastermix zugegeben. Die Verdünnungen beziehen sich auf das Endvolumen von 205µl, als Ausgleichsvolumen wurde wieder 0,9% NaCl-Lösung eingesetzt. Der Mastermix war eine leicht modifizierte Variante von Färbung 1.



<b>Antikörper + Farbe</b>	<b>Verdünnung</b>
CD116 FITC	1:40
CD123 PerCP	1:20
CD131 PE	1:100
CD304 APC	1:40
CD11b PE-Cy7	1:100
CD193 APC-Cy7	1:40
CD16 Pacific Blue	1:100
CD14 AmCyan	1:100

*Tabelle 20: modifizierte extrazelluläre Färbung 1*

Für die restliche Färbung wurde genauso verfahren wie bei der extrazellulären Färbung der nicht stimulierten Vollblut Proben (siehe 2.2.6.1).

### **2.2.8 ELISA**

Mittels ELISA kann man Antigene nachweisen und quantifizieren. Hier wurde ein sogenannter Sandwich-Assay durchgeführt.

Für einen Sandwich-ELISA benötigt man einen Fänger, der das Antigen aus der Probe herausfischt. Dieser Antikörper ist an einer festen Phase adsorbiert. Dann erfolgt die Zugabe des Antigens. Die Markierung des Antigens erreicht man durch Zugabe des Detektionsantikörpers. Man erhält einen Komplex aus Antikörper-Antigen-Antikörper → Sandwich-Assay. Der Detektionsantikörper ist entweder direkt mit einem Enzym versehen, oder wird in einem Zwischenschritt mit dem Enzym versehen. Dieses Enzym setzt anschließend ein Substrat um und anhand des Substratumsatzes kann die Antigenkonzentration bestimmt werden. Die Messung erfolgt fotometrisch. (58)

Folgende ELISAs wurden durchgeführt:

<b>Probenursprung</b>	<b>ELISA</b>
Zellkultur (siehe 2.2.5)	IL-3, IL-6, GM-CSF
Stimulation mit Anti-CD3	IL-3, IL-6, GM-CSF

*Tabelle 21: eingesetzte ELISAs*

Hier wurden am Vortag 96-well ELISA-Platten über Nacht mit dem Capture Antibody laut Product data sheet für die ELISA-Sets oder mit Capture Anti-IL-3 (10µg/ml), beides in PBS verdünnt, ge-coated. Am nächsten Morgen folgten 3 Waschgänge mit Waschpuffer (1\* PBS + 0,05% Tween), nach dem dritten Mal wurden die Platten gründlich trocken geklopft, um Verdünnungsfehler zu vermeiden. Jeder folgende Waschgang wurde in 3 Schritten und mit Trockenklopfen durchgeführt. Danach wurden die Wells mit 1%BSA in PBS mit 200µl/Well für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Das Abblocken freier, unspezifischer Proteinbindestellen ist ein essenzieller Schritt beim ELISA. (58)

Während dieser Zeit wurden die Proben verdünnt und eine doppelte Standard-Verdünnungsreihe angelegt. Die Standards mit bekannter Konzentration dienen der späteren Quantifikation der Antigenkonzentration in den Proben.

Nach Ablauf des Blockens werden die Platten erneut 3-mal gewaschen und trocken geklopft. Danach folgt die Inkubation der Proben und der Standards mit 60µl/Well für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach einem weiterem Waschschrift erfolgt die Zugabe des Detection Antibodys mit 60µl/Well und einer Inkubationszeit von 1 Stunde. Weil der Detection-Antikörper des IL-3 ELISAs bereits mit HRP gekoppelt ist, findet die Inkubation für den IL-3 ELISA bei Raumtemperatur im Dunkeln statt und beträgt 1,5 Stunden.

Bei den kommerziellen ELISAs erfolgte nach ein Stunde Probeninkubation ein erneuter Waschgang und die anschließende Zugabe von 60µl/Well Streptavidin-HRP B (1:40 verdünnt). Die Inkubation erfolgte für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Anschließend wurden alle Platten erneut 3 Mal gewaschen, trocken geklopft und es wurden 100µl/Well TMB Substrate Solution zugesetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dabei wird das TMB durch die HRP umgesetzt, was sich an einem

Farbumschlag auf blau bemerkbar macht, der mit der vorhandenen Menge des gebundenen HRP korreliert.

Nach 20 Minuten wurde die Reaktion mit 12,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100µl/Well abgestoppt. Das Blau färbte sich dadurch gelb. Es folgte ein Ablesen bei 450nm, Referenzwellenlänge 540nm.

Alle Verdünnungen außer der der Capture-Antibodys erfolgte in Reagent Diluent (1% BSA in PBS).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Basischarakteristika

An der Studie waren insgesamt 130 Patienten mit einer diagnostizierten RA und 42 gesunde Kontrollen beteiligt. Die Patienten wurden nach ihrem DAS28-CRP Wert nochmals in zwei Gruppen eingeteilt. DAS28-CRP < 2,6 entspricht dabei niedriger bis keiner Krankheitsaktivität, DAS28-CRP ≥ 2,6 entspricht einer aktiven Erkrankung. Die Basischarakteristika der Patienten sind in Tabelle 22 dargestellt.

	<b>Gesunde Kontrollen (n=42)</b>	<b>RA DAS28-CRP &lt; 2.6 (n=78)</b>	<b>RA DAS28-CRP ≥ 2.6 (n=52)</b>
<b>Demografische Daten:</b>			
Mittleres Alter (Jahre)	45	62	62
Frauen n (%)	24 (57 %)	56 (72 %)	34 (65 %)
Mittlere Erkrankungsdauer (Monate)	-	158.8	136.1
<b>Symptome:</b>			
Mittlere Anzahl schmerzhafter Gelenke	-	0.0	5.4 ***
Mittlere Anzahl geschwollener Gelenke	-	0.1	3.4 ***
<b>Laborwerte:</b>			
CRP mg/l		4.1	13.7 ***
BSG 1 h / 2 h		10.8 / 22.9	24.8 / 43.3 ***

<b>Steroide:</b>			
Steroide (%)	-	29.5 %	59.6 % ***
Steroide mg/Tag	-	1.2	7.5 ***
<b>Biologicals:</b>			
TNF Inhibitoren (%)		14.1 %	15.4 %
IL-6 Antagonisten (%)	-	10.3 %	0 % **
JAK Inhibitoren	-	0 %	1.9 % *
Rituximab	-	23.1 %	11.5 % *
Abatacept	-	3.8 %	7.7 %
<b>DMARDs:</b>			
MTX	-	69.2 %	78.8 %
Sulfasalazin	-	7.7 %	5.8 %

*Tabelle 22: Demografische und klinische Basischarakteristika.* Es wurde zwischen gesunden Kontrollen, sowie inaktiven und aktiven RA Patienten unterschieden. Die beiden Untergruppen von Patienten mit RA wurden mittels DAS28-CRP <2,6 bzw. DAS28-CRP ≥2,6 festgelegt. Zur statistischen Berechnung wurde ein One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Test eingesetzt, mit folgenden Signifikanzwerten: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001

Passend zu den bekannten demografischen Daten war ein Großteil der RA-Patienten Frauen (2). Ein statistisch hoch-signifikanter Unterschied zeigte sich in den beiden Gruppen der Patienten bei der Anzahl der schmerzhaften und geschwollenen Gelenke (0 bzw. 0,1 gegenüber 5,4 bzw. 3,4), bei den Entzündungsparametern CRP und BSG und bei der Frequenz und Dosis an täglichen Steroidhormonen (beides bei der aktiven Gruppe deutlich höher). Ebenfalls ein signifikanter Unterschied zeigte sich bei den Biologika: JAK-Inhibitoren wurden von Patienten mit aktiver RA häufiger eingenommen, IL-6 Antagonisten und RTX kam hingegen bei ihnen seltener zum Einsatz.

### 3.2 Analyse der Zellpopulationen und exprimierter Oberflächenmarker im nicht-behandelten Vollblut

Es wurde durchflusszytometrisch die Expressionsstärke von CD131 (entspricht der gemeinsamen  $\beta$ -Kette des IL-3-Rezeptors) auf basophilen Granulozyten im frischen Vollblut untersucht. CD131 wird in Anwesenheit von IL-3 herunterreguliert.

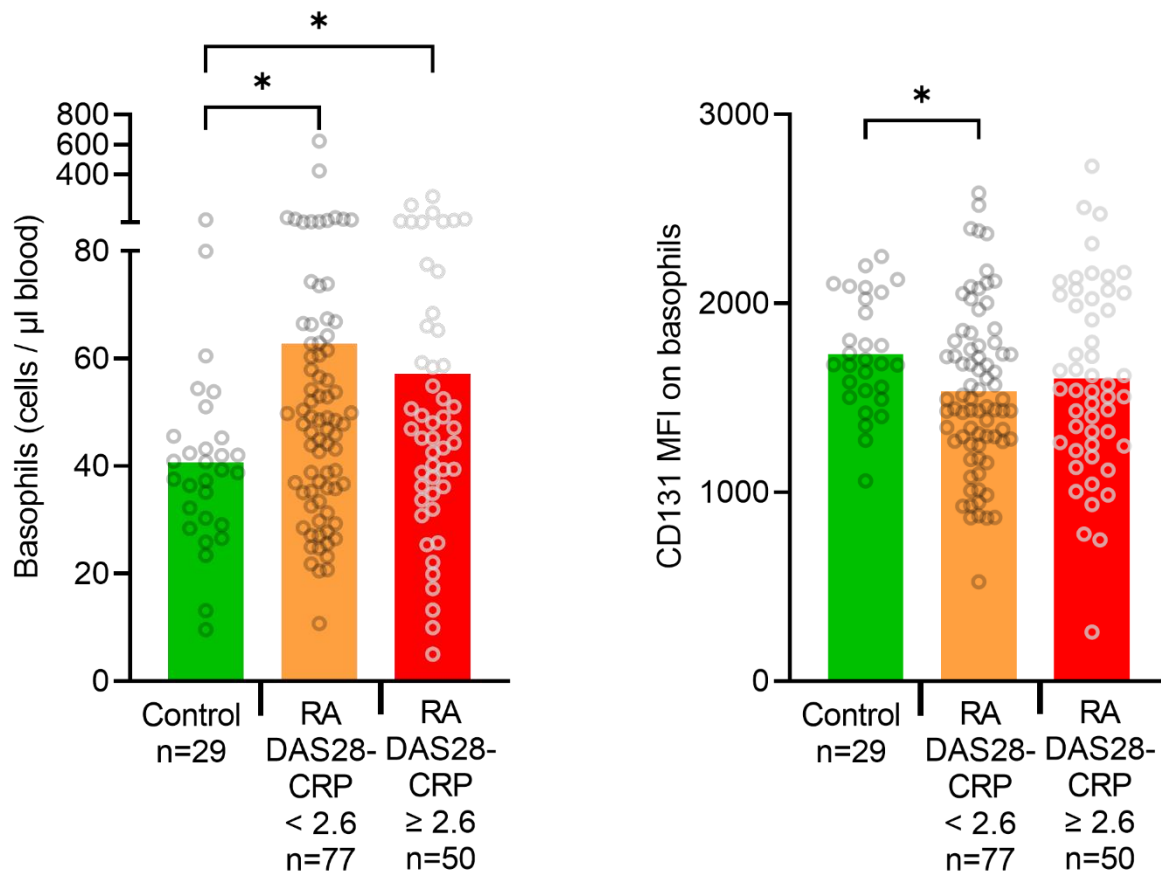


Abbildung 2: a.) Absolute Anzahl Basophiler Granulozyten im Vollblut; b.) CD131 Expression auf Basophilen Granulozyten im Vollblut. Es wurde zwischen gesunden Kontrollen, Patienten mit inaktiver und aktiver RA unterschieden. Die Einteilung der RA Patienten in aktiv und inaktiv erfolgte mittels DAS28-CRP <2,6 bzw. DAS28-CRP  $\geq$ 2,6. Jeder Punkt steht für eine Probe, Balken repräsentiert den Mittelwert. Zur statistischen Berechnung wurde ein Brown-Forsythe and Welch ANOVA Test eingesetzt, mit folgenden Signifikanzwerten: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001

In Abb. 2a.) zeigt sich, dass die mittlere Anzahl der basophilen Granulozyten bei den Kontrollen signifikant niedriger ist als bei den beiden Gruppen der Patienten mit diagnostizierter RA. Es zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen RA Patienten mit inaktiver bzw. aktiver Erkrankung.

In Abb. 2b.) zeigt sich ein signifikanter Unterschied bei der Expression von CD131 zwischen den gesunden Kontrollen und den Patienten mit inaktiver RA. Bei Letzteren zeigt sich eine leicht reduzierte Rezeptorexpression.

### 3.2.1 Neutrophile Granulozyten

Zudem wurde die Expression von CD11b auf Neutrophilen Granulozyten und auf Monozyten untersucht. CD11b ist ein Aktivierungsmarker von Neutrophilen Granulozyten und Monozyten, der bei Aktivierung der Zellen durch verschiedene Zytokine wie beispielsweise IL-3 hochreguliert wird. (61)

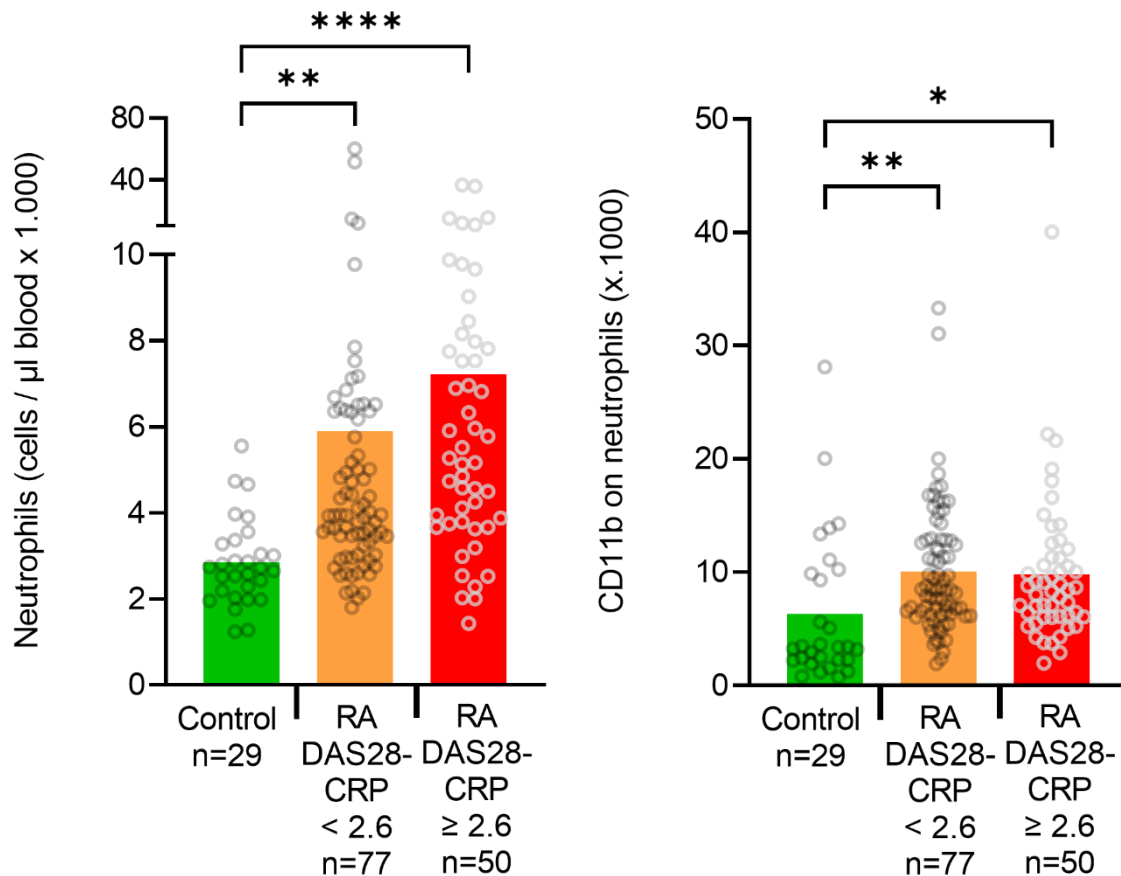


Abbildung 3: a.) Absolute Anzahl neutrophiler Granulozyten in Vollblut. b.) CD11b Expression auf neutrophilen Granulozyten im Vollblut. Es wurde zwischen gesunden Kontrollen, Patienten mit inaktiver und aktiver RA unterschieden. Die Einteilung der RA Patienten in aktiv und inaktiv erfolgte mittels DAS28-CRP  $< 2,6$  bzw. DAS28-CRP  $\geq 2,6$ . Jeder Punkt steht für eine Probe, Balken repräsentiert den Mittelwert. Zur statistischen Berechnung wurde ein Brown-Forsythe and Welch ANOVA Test eingesetzt, mit folgenden Signifikanzwerten: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

In Abb. 3a.) zeigt sich ein hoch signifikanter Unterschied bei der Anzahl der Neutrophilen Granulozyten zwischen den gesunden Kontrollen und den Patienten mit inaktiver RA. Es kommt in etwa zu einer Verdopplung der Zellzahl. Zwischen gesunden Kontrollen und Patienten mit aktiver RA besteht sogar ein höchst signifikanter Unterschied ( $p < 0,0001$ ) bei mehr als einer Verdopplung der mittleren Zellzahl.

In Abb. 3b.) zeigt sich von gesunden Kontrollen zu nicht-aktiven RA-Patienten ein hoch-signifikanter und zu aktiven RA-Patienten ein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenzintensität von CD11b. Diese ist bei beiden Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen erhöht.



### 3.2.2 Klassische Monozyten

Ähnlich wie bei den Neutrophilen Granulozyten wurde auch die Expression von CD11b auf klassischen Monozyten untersucht.

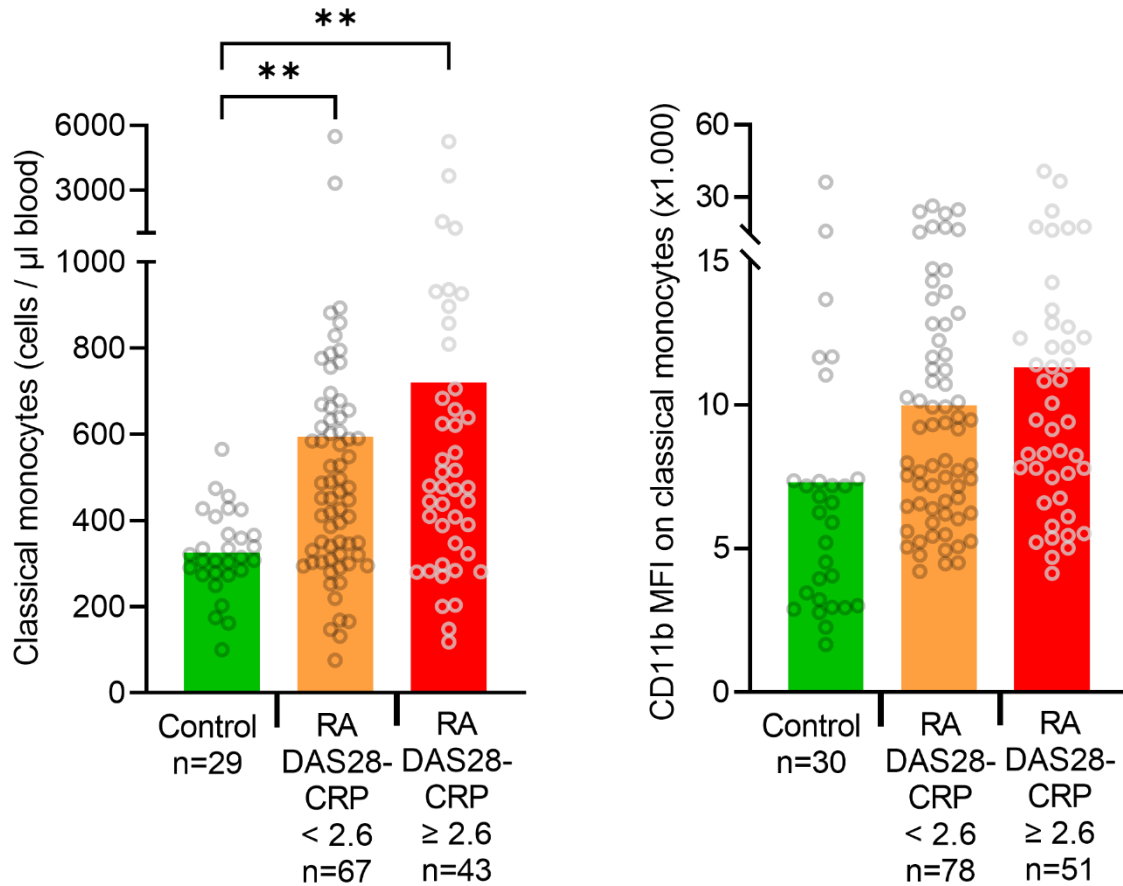


Abbildung 4: a.) Absolute Anzahl Klassischer Monozyten im Vollblut; b.) CD11b Expression auf klassischen Monozyten im Vollblut. Es wurde zwischen gesunden Kontrollen, Patienten mit inaktiver und aktiver RA unterschieden. Die Einteilung der RA Patienten in aktiv und inaktiv erfolgte mittels DAS28-CRP <2,6 bzw. DAS28-CRP ≥2,6. Jeder Punkt steht für eine Probe, Balken repräsentiert den Mittelwert. Zur statistischen Berechnung wurde ein Brown-Forsythe and Welch ANOVA Test eingesetzt, mit folgenden Signifikanzwerten: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001

Abb. 4a.) zeigt, dass die Monozytenzahlen bei beiden Patientengruppen hoch signifikant gegenüber den gesunden Kontrollen erhöht sind.

Abb. 4b.) zeigt einen leichten Trend zu einer erhöhten CD11b Expression auf klassischen Monozyten bei RA Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen.

### 3.2.3 CD16<sup>+</sup> Monozyten

Neben den klassischen Monozyten, denen vor allem eine wichtige Rolle in der Inflammation zugeschrieben wird, wurden auch die Gesamtzahl der CD16<sup>+</sup> Monozyten und deren CD11b Expression untersucht.

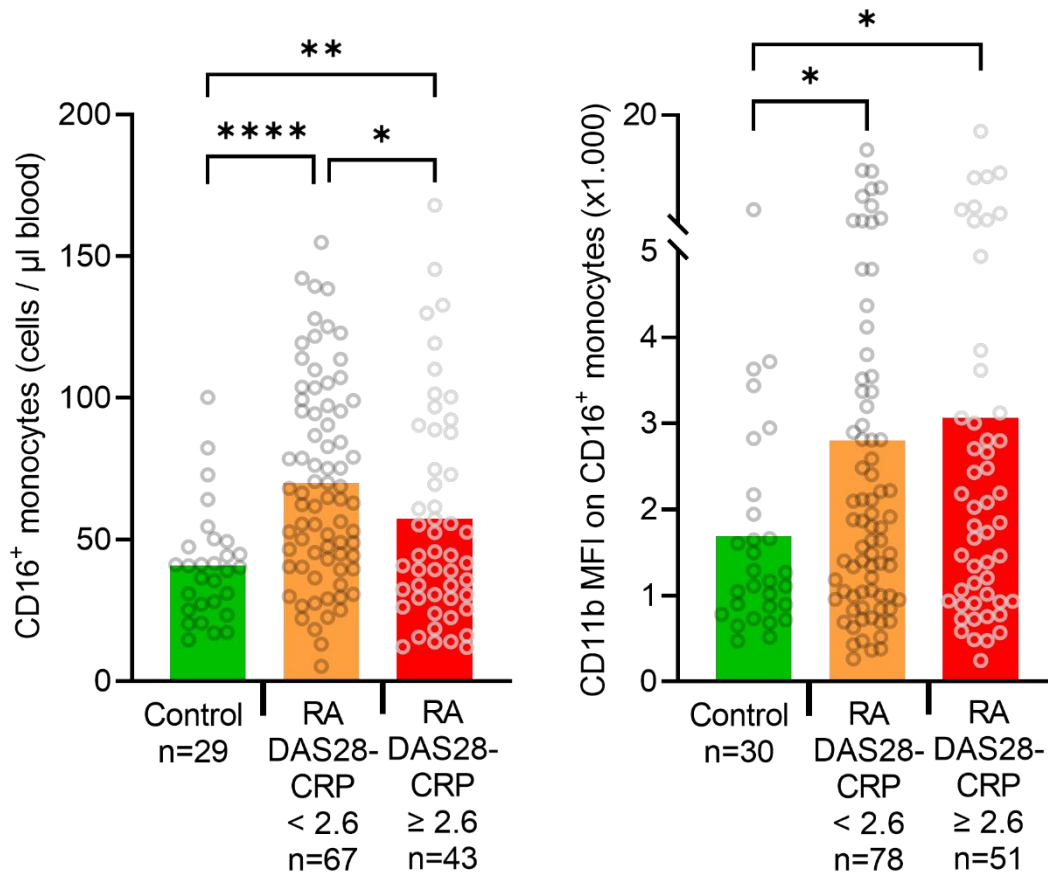


Abbildung 5: a.) Absolute Anzahl CD16<sup>+</sup> Monozyten im Vollblut. b.) CD11b Expression auf CD16<sup>+</sup> Monozyten im Vollblut. Es wurde zwischen gesunden Kontrollen, Patienten mit inaktiver und aktiver RA unterschieden. Die Einteilung der RA Patienten in aktiv und inaktiv erfolgte mittels DAS28-CRP <2,6 bzw. DAS28-CRP ≥2,6. Jeder Punkt steht für eine Probe, Balken repräsentiert den Mittelwert. Zur statistischen Berechnung wurde ein One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Test eingesetzt, mit folgenden Signifikanzwerten: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001

Abb. 5a.) zeigt, dass die Anzahl der CD16<sup>+</sup> Monozyten bei den nicht-aktiven RA-Patienten am höchsten ist. Hierbei ist der Unterschied zwischen den gesunden Kontrollen und den Patienten mit inaktiver und aktiver RA signifikant.

Wie in Abb. 5b.) dargestellt, fand sich eine signifikant erhöhte Expression von CD11b bei den RA Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen.

### 3.3 Basale IL-3 Produktion und Sensibilität von Responderzellen auf IL-3

Um herauszufinden, ob RA Patienten eine erhöhte basale IL-3 Produktion aufweisen, wurde heparinisiertes Vollblut für 24 Stunden mit Medium inkubiert.

Da IL-3 konzentrationsabhängig zu einer Downregulation von CD131 auf Basophilen Granulozyten und pDCs führt, wurde die Expression von CD131 auf diesen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Zudem wurde das Vollblut auch mit anti-CD3 für 24 Stunden inkubiert. CD-3 ist ein Antigen auf der Oberfläche von T-Zellen. (36) Eine Inkubation mit Anti-CD3 führt zu einer maximalen Aktivierung der T-Zellen mit Ausschüttung aller damit verbundenen Zytokine.

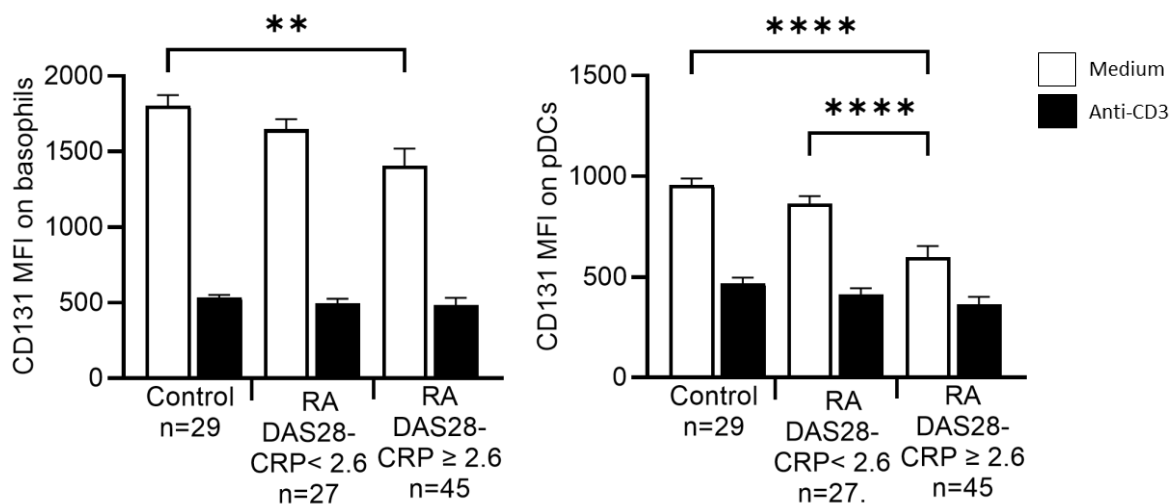


Abbildung 6: a.) CD131 Expression auf basophilen Granulozyten nach 24 Stunden Inkubation mit Medium und Anti-CD3. b.) CD131 Expression auf pDCs nach 24 Stunden Inkubation mit Medium und Anti-CD3. Es wurde zwischen gesunden Kontrollen, Patienten mit inaktiver und aktiver RA unterschieden. Die Einteilung der RA Patienten in aktiv und inaktiv erfolgte mittels DAS28-CRP <2,6 bzw. DAS28-CRP ≥2,6. Jeder Punkt steht für eine Probe, Balken repräsentiert den Mittelwert. Zur statistischen Berechnung wurde ein One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Test eingesetzt, mit folgenden Signifikanzwerten: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001

In Abb. 6a.) zeigt sich, dass es bei einer Zugabe von reinem Medium, also ohne Stimulation, nach 24 Stunden zu einer statistisch hoch signifikanten Runterregulation von CD131 auf basophilen Granulozyten bei Patienten mit aktiver RA gegenüber gesunden Kontrollen kam. Weiters zeigt sich, dass es nach maximaler T-Zell-Stimulierung mit Anti-CD3 keinen Unterschied in der Expression von CD131 auf basophilen Granulozyten zwischen den drei Gruppen gab.

In Abb. 6b.) zeigt sich nach Zugabe von reinem Medium in der Fluoreszenzaktivität von CD131 auf pDCs ein statistisch höchst signifikanter Unterschied jeweils von den gesunden Kontrollen und den Patienten mit inaktiver RA zu den Patienten mit aktiver RA. Auch hier zeigt sich nach T-Zell-Stimulierung mit Anti-CD3 kein Unterschied in der Expression von CD131 auf pDCs zwischen den drei Gruppen.

In einem weiteren Ansatz wurde das Blut zusätzlich mit rekombinanten humanen IL-3 bzw. rekombinanten humanen GM-CSF inkubiert. Hiermit sollte untersucht werden, ob die Responderzellen (z.B. basophile Granulozyten, pDCs) von RA Patienten anders auf eine Stimulation reagieren als Zellen von gesunden Probanden.

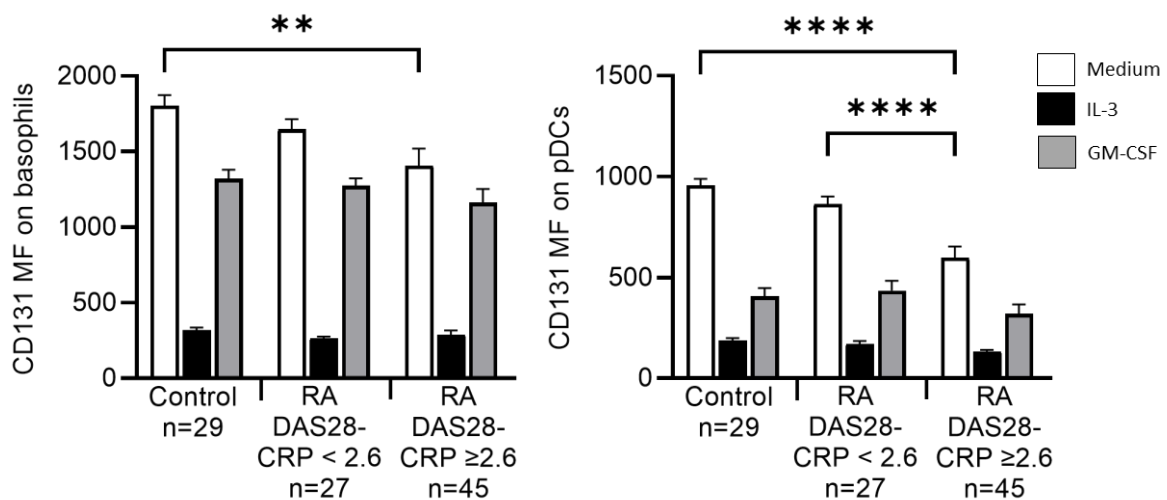


Abbildung 7: a.) CD131 Expression auf basophilen Granulozyten nach 24 Stunden Inkubation mit Medium, IL-3 und GM-CSF. b.) CD131 Expression auf pDCs nach 24 Stunden Inkubation mit Medium, IL-3 und GM-CSF. Es wurde zwischen gesunden Kontrollen, Patienten mit inaktiver und aktiver RA unterschieden. Die Einteilung der RA Patienten in aktiv und inaktiv erfolgte mittels DAS28-CRP <2,6 bzw. DAS28-CRP ≥2,6. Jeder Punkt steht für eine Probe, Balken repräsentiert den Mittelwert. Zur statistischen Berechnung wurde ein One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Test eingesetzt, mit folgenden Signifikanzwerten: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001

Abb. 7a.) zeigt wie Abb. 6a.), dass es bei einer Zugabe von reinem Medium, also ohne Stimulation, nach 24 Stunden zu einer statistisch hoch signifikanten Runterregulation von CD131 auf basophilen Granulozyten bei Patienten mit aktiver RA gegenüber gesunden Kontrollen kam. Es zeigt sich kein Unterschied in der Expression von CD131 auf basophilen Granulozyten als Reaktion auf IL-3 und GM-CSF zwischen den drei Gruppen.

Abb. 7b.) zeigt wie Abb. 6b.) nach Zugabe von reinem Medium in der Fluoreszenzaktivität von CD131 auf pDCs einen statistisch höchst signifikanter Unterschied, jeweils von den gesunden

Kontrollen und den Patienten mit inaktiver RA zu den Patienten mit aktiver RA. Auch hier zeigt sich kein Unterschied zwischen den drei Gruppen bei der Expression von CD131 auf pDCs in der Reaktion auf IL-3 oder GM-CSF.

### 3.4 Untersuchung der Quellen von IL-3, IL-2 und IFN- $\gamma$

CD4<sup>+</sup> T-Zellen gelten normalerweise als die Hauptquelle von IL-3. (36) Um herauszufinden, ob dies auch bei Patienten mit RA der Fall ist, wurden PBMCs intrazellulär für IL-3 und weitere Zytokine gefärbt.

#### 3.4.1 CD4<sup>+</sup> T-Zellen

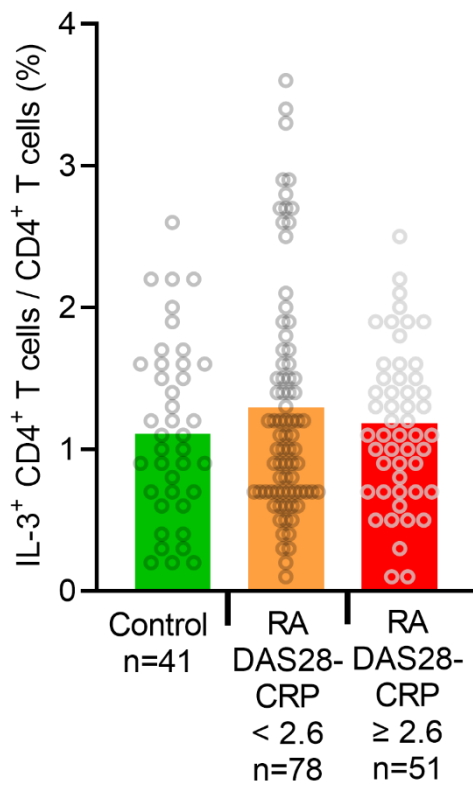


Abbildung 8: IL-3 positive CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Prozent der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Es wurde zwischen gesunden Kontrollen, Patienten mit inaktiver und aktiver RA unterschieden. Die Einteilung der RA Patienten in aktiv und inaktiv erfolgte mittels DAS28-CRP <2,6 bzw. DAS28-CRP ≥2,6. Jeder Punkt steht für eine Probe, Balken repräsentiert den Mittelwert. Zur statistischen Berechnung wurde ein One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Test eingesetzt, mit folgenden Signifikanzwerten: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001

Wie in Abb. 8 dargestellt finden sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von IL-3 bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen von RA Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen.

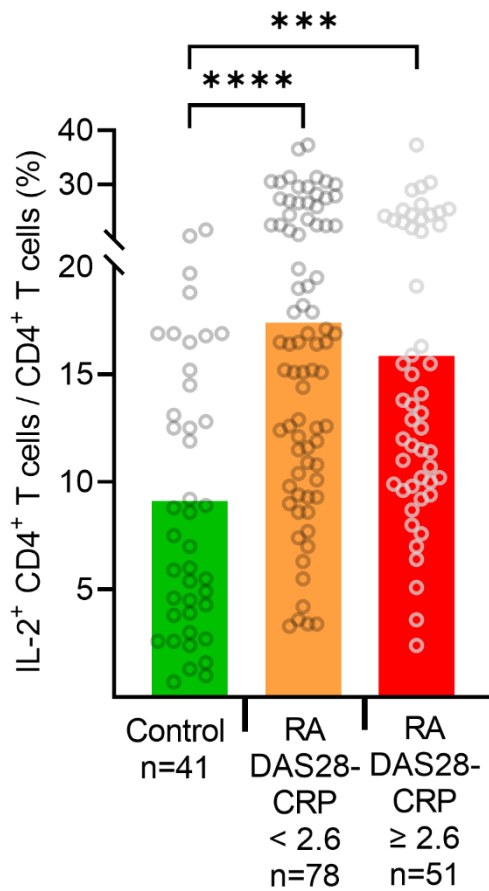


Abbildung 9: IL-2 positive CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Prozent der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Es wurde zwischen gesunden Kontrollen, Patienten mit inaktiver und aktiver RA unterschieden. Die Einteilung der RA Patienten in aktiv und inaktiv erfolgte mittels DAS28-CRP <2,6 bzw. DAS28-CRP ≥2,6. Jeder Punkt steht für eine Probe, Balken repräsentiert den Mittelwert. Zur statistischen Berechnung wurde ein One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Test eingesetzt, mit folgenden Signifikanzwerten: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001

Abb. 9 zeigt, dass IL-2 bei RA Patienten von einem deutlich höheren Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen produziert wird als bei den gesunden Kontrollen. Zwischen inaktiven und aktiven RA Patienten fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

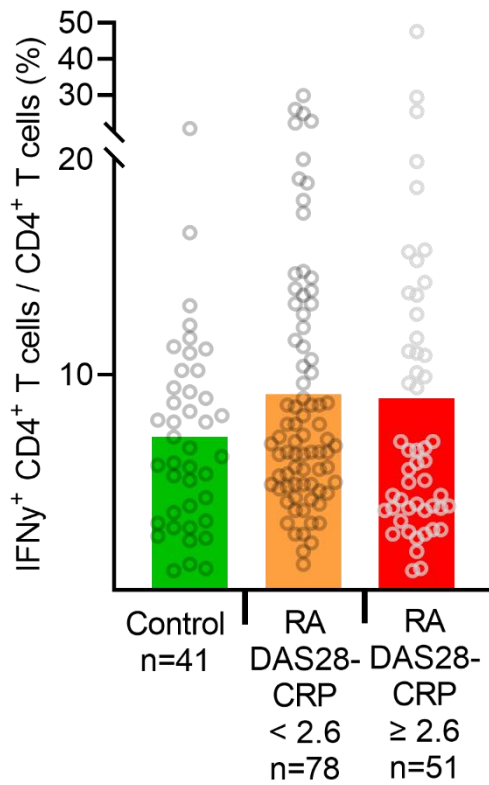


Abbildung 10: IFN $\gamma$  positive CD4 $^+$  T-Zellen in Prozent der CD4 $^+$  T-Zellen. Es wurde zwischen gesunden Kontrollen, Patienten mit inaktiver und aktiver RA unterschieden. Die Einteilung der RA Patienten in aktiv und inaktiv erfolgte mittels DAS28-CRP <2,6 bzw. DAS28-CRP  $\geq$ 2,6. Jeder Punkt steht für eine Probe, Balken repräsentiert den Mittelwert. Zur statistischen Berechnung wurde ein One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Test eingesetzt, mit folgenden Signifikanzwerten: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001

Wie in Abb. 10 dargestellt, findet sich kein Unterschied in der Expression von IFN- $\gamma$  durch CD4 $^+$  T-Zellen zwischen den drei untersuchten Gruppen.

### 3.4.2 CD8<sup>+</sup> T-Zellen

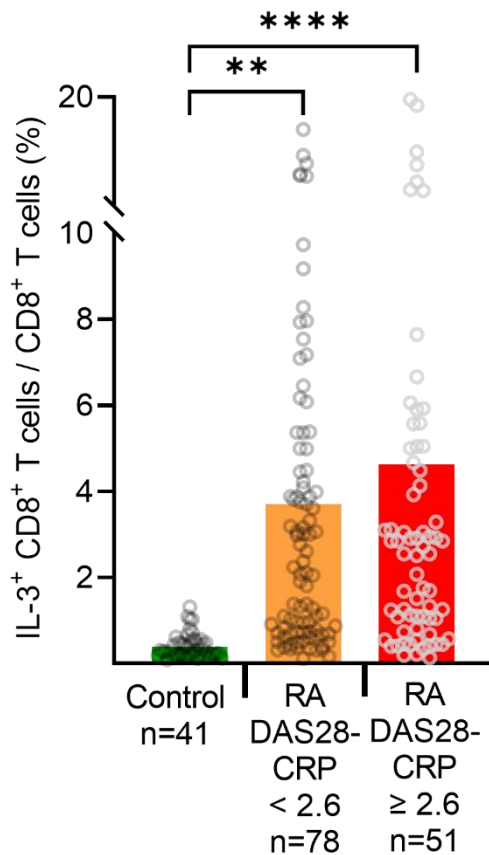


Abbildung 11: IL-3 positive CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Prozent der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Es wurde zwischen gesunden Kontrollen, Patienten mit inaktiver und aktiver RA unterschieden. Die Einteilung der RA Patienten in aktiv und inaktiv erfolgte mittels DAS28-CRP <2,6 bzw. DAS28-CRP ≥2,6. Jeder Punkt steht für eine Probe, Balken repräsentiert den Mittelwert. Zur statistischen Berechnung wurde ein One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Test eingesetzt, mit folgenden Signifikanzwerten: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001

Abb. 11 zeigt eine höchst signifikante Zunahme der IL-3 Expression von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei RA Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. So kommt es bei den aktiven RA Patienten zu einer ca. 10fach höheren IL-3 Expression als bei den gesunden Kontrollen. Aber auch zwischen den inaktiven und aktiven RA Patienten findet sich eine signifikante Zunahme der IL-3 Expression bei höherer Krankheitsaktivität.



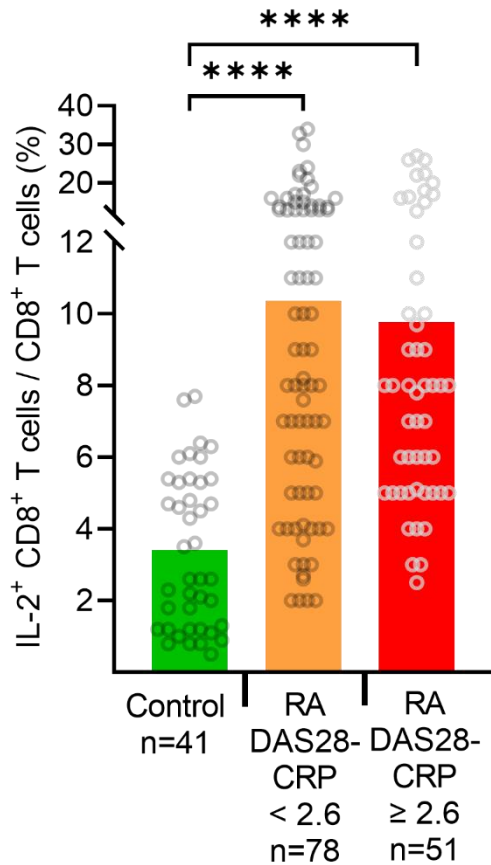


Abbildung 12: IL-2 positive CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Prozent der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Es wurde zwischen gesunden Kontrollen, Patienten mit inaktiver und aktiver RA unterschieden. Die Einteilung der RA Patienten in aktiv und inaktiv erfolgte mittels DAS28-CRP <2,6 bzw. DAS28-CRP ≥2,6. Jeder Punkt steht für eine Probe, Balken repräsentiert den Mittelwert. Zur statistischen Berechnung wurde ein One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Test eingesetzt, mit folgenden Signifikanzwerten: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001

Wie in Abb. 12 dargestellt, kommt es annähernd zu einer Verdreifachung des Anteils der IL-2 exprimierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei RA Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen. Allerdings findet sich kein Unterschied in der IL-2 Expression zwischen inaktiven und aktiven RA Patienten.

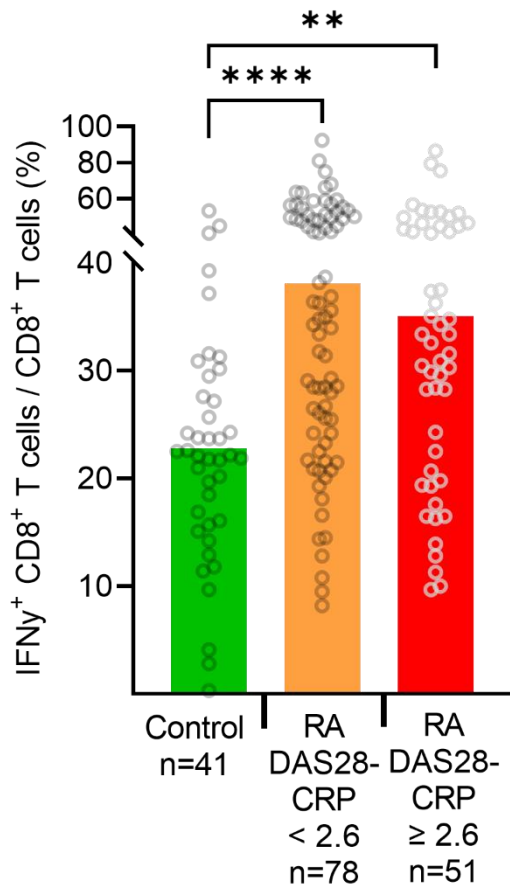


Abbildung 13: IFN $\gamma$  positive CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Prozent der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Es wurde zwischen gesunden Kontrollen, Patienten mit inaktiver und aktiver RA unterschieden. Die Einteilung der RA Patienten in aktiv und inaktiv erfolgte mittels DAS28-CRP <2,6 bzw. DAS28-CRP  $\geq$ 2,6. Jeder Punkt steht für eine Probe, Balken repräsentiert den Mittelwert. Zur statistischen Berechnung wurde ein One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Test eingesetzt, mit folgenden Signifikanzwerten: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001

Abb. 13 zeigt eine deutliche Zunahme des Anteils IFN- $\gamma$  produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten mit diagnostizierter RA gegenüber den gesunden Kontrollen. Allerdings findet sich auch hier kein signifikanter Unterschied in der IFN- $\gamma$  Expression zwischen inaktiven und aktiven RA Patienten.

### 3.5 IL-3 Produktion in der Zellkultur

Nachdem mittels intrazellulärer Färbung vor allem die CD8<sup>+</sup> T-Zellen als Hauptquelle der IL-3 Produktion bei RA Patienten identifiziert werden konnte, sollte nun auch die Höhe der IL-3 Produktion näher untersucht werden. Hierfür wurden 500.000 PBMCs/well für 3 Tage mit löslichem anti-CD3 bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Durch die Stimulation mit anti-CD3 wurde, ähnlich wie in den vorher beschriebenen Vollblutassays, eine Stimulation der vorhandenen T-Zellen durchgeführt, woraufhin es zu einer Ausschüttung einer Vielzahl von Zytokinen kommt. (36) Anschließend wurden im Überstand die Konzentrationen von IL-3, GM-CSF und IL-6 mittels ELISA bestimmt.

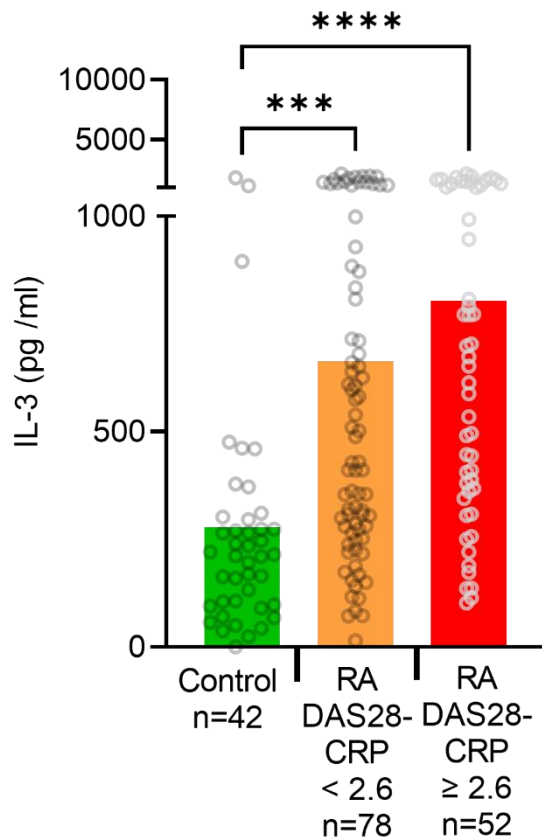


Abbildung 14: IL-3 Produktion von anti-CD3 stimulierten PBMCs. Es wurde zwischen gesunden Kontrollen, Patienten mit inaktiver und aktiver RA unterschieden. Die Einteilung der RA Patienten in aktiv und inaktiv erfolgte mittels DAS28-CRP <2,6 bzw. DAS28-CRP ≥2,6. Jeder Punkt steht für eine Probe, Balken repräsentiert den Mittelwert. Zur statistischen Berechnung wurde ein One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Test eingesetzt, mit folgenden Signifikanzwerten: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001

Abb. 14 zeigt, dass aktive RA Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine 3fach höhere IL-3 Freisetzung aufweisen. Aber auch inaktive RA Patienten weisen bereits eine signifikant

höhere IL-3 Freisetzung auf als die gesunden Kontrollen. Zwischen den inaktiven und aktiven RA Patienten fand sich lediglich ein Trend zu einer erhöhten IL-3 Freisetzung bei erhöhter Krankheitsaktivität.

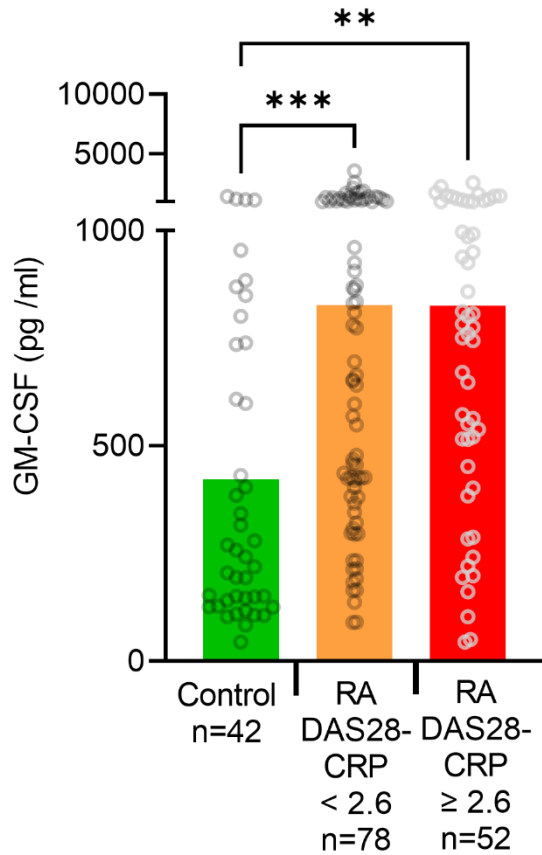


Abbildung 15: GM-CSF Produktion von anti-CD3 stimulierten PBMCs. Es wurde zwischen gesunden Kontrollen, Patienten mit inaktiver und aktiver RA unterschieden. Die Einteilung der RA Patienten in aktiv und inaktiv erfolgte mittels DAS28-CRP <2,6 bzw. DAS28-CRP ≥2,6. Jeder Punkt steht für eine Probe, Balken repräsentiert den Mittelwert. Zur statistischen Berechnung wurde ein One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Test eingesetzt, mit folgenden Signifikanzwerten: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001

In Abb. 15 zeigt sich, dass die stimulierten PBMCs der Patienten mit diagnostizierter RA knapp doppelt so viel GM-CSF produzierten wie die der gesunden Kontrollen. Die beiden Patientengruppen liegen in etwa gleich auf. Der Unterschied der gesunden Kontrollen zu den Patienten mit inaktiver RA ist höchst signifikant, der zu den Patienten mit aktiver RA signifikant.

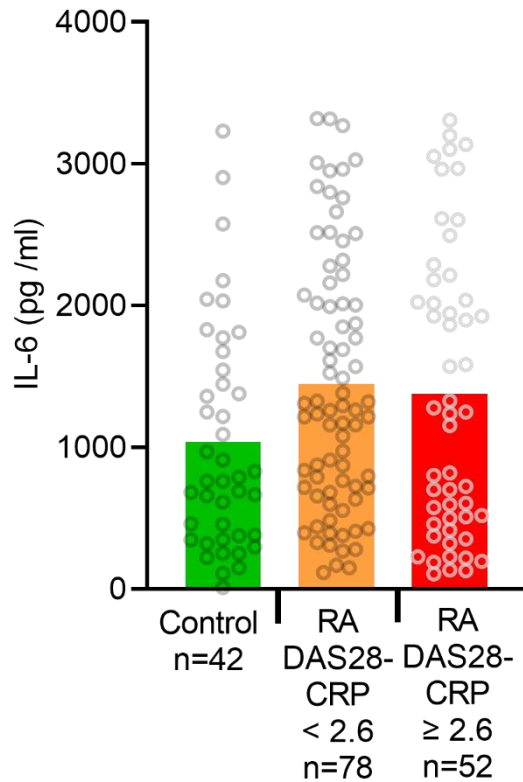


Abbildung 16: IL-6 Produktion von anti-CD3 stimulierten PBMCs. Es wurde zwischen gesunden Kontrollen, Patienten mit inaktiver und aktiver RA unterschieden. Die Einteilung der RA Patienten in aktiv und inaktiv erfolgte mittels DAS28-CRP <2,6 bzw. DAS28-CRP ≥2,6. Jeder Punkt steht für eine Probe, Balken repräsentiert den Mittelwert. Zur statistischen Berechnung wurde ein One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Test eingesetzt, mit folgenden Signifikanzwerten: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001

Es findet sich kein signifikanten Unterschied in der Produktion von IL-6 zwischen allen drei Gruppen, wie in Abb. 16 dargestellt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Höhere Anzahl von Basophilen und Neutrophilen Granulozyten, klassischen und CD16<sup>+</sup> Monozyten

IL-3 verstärkt die proinflammatorischen Eigenschaften basophiler Granulozyten und sorgt für ihre Differenzierung und Proliferation. Außerdem wird es von diesen auch selbst produziert und sogleich im Sinne einer autokrinen Aktivität wieder gebunden. (13,42) Basophile Granulozyten exprimieren den IL-3-Rezeptor stark, aber nur geringe Mengen des GM-CSF- und IL-5-Rezeptors, die auch CD131 zur Signaltransduktion nutzen. (62) Deshalb ist IL-3 hauptverantwortlich dafür, dass CD131 auf Basophilen Granulozyten herunterreguliert wird. (61) Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Anzahl basophiler Granulozyten erhöht ist als auch, dass sie bei Patienten mit RA weniger CD131 als die der gesunden Kontrollen exprimieren. Das ist ein indirekter Hinweis darauf, dass mehr IL-3 vorhanden sein muss. Die Herunterregulation des Rezeptors kann in diesem Zusammenhang als gegenregulatorische Maßnahme gedeutet werden.

Neutrophile Granulozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Initiierung einer inflammatorischen Reaktion und bei der Progression der rheumatoiden Arthritis. Inflammatorische Neutrophile Granulozyten produzieren mehrere Zytokine und beeinflussen andere Immunzellen und halten damit die inflammatorischen Bedingungen der RA aufrecht. (63) Sie reagieren auf eine Vielzahl von T-Zell-Zytokinen (unter anderem IL-3, GM-CSF, TNF- $\alpha$ ) mit einer Hochregulierung von CD11b. (61) In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Patienten mit RA eine höhere Zahl an zirkulierenden Neutrophilen Granulozyten aufweisen, auf denen außerdem CD11b im Vergleich zu den gesunden Kontrollen hochreguliert ist. Die erhöhte Zellzahl ist ein Hinweis auf die allgemeine entzündliche Lage im Organismus, wobei die erhöhte Expression von CD11b zudem ein indirekter Hinweis auf erhöhte T-Zell Aktivität sein kann.

Monozyten werden unterteilt in die zwei Hauptgruppen CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>. CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten gelten als „klassische Monozyten“ und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten werden als homöostatisch beschrieben. (64) Bei Patienten mit RA wurden deutlich erhöhte Zahlen von CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten und klassischen Monozyten im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden. (65,66) Monozyten von Patienten mit RA zeigten außerdem in Studien erhöhte Aktivitätsmarker, die in Verbindung zur Zelladhäsion stehen, vor allem CD11b. (67)

In dieser Arbeit konnten die höheren Zellzahlen beider Monozytenpopulationen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen bestätigt werden. Es fand sich zudem eine signifikant erhöhte Expression von CD11b auf den CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten von RA Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen. Bei den klassischen Monozyten fand sich ebenfalls ein Trend zu einer vermehrten CD11b Expression bei RA Patienten, der allerdings nicht statistisch signifikant war. Beide Erkenntnisse sind Hinweise auf die inflammatorische Lage bei Patienten mit RA.

#### **4.2 Höhere basale IL-3 Produktion bei gleicher Empfindlichkeit auf IL-3**

IL-3 wird hochspezifisch über den IL-3-Rezeptor gebunden. Dieser besteht aus einer alpha-Kette (CD123), die spezifisch für IL-3 ist, sowie einer beta-Kette (CD131), über die die Signaltransduktion erfolgt. Diese beta-Kette teilt der IL-3-Rezeptor sowohl mit dem IL-5- als auch dem GM-CSF-Rezeptor. (36) Bei Aktivierung der alpha-Kette des jeweiligen Rezeptors erfolgt eine Herunterregulation seiner Beta-Kette auf verschiedenen Zellpopulationen. Je nachdem ob eine bestimmte Zellpopulation neben dem IL-3-Rezeptor auch den IL-5-Rezeptor oder GM-CSF-Rezeptor aufweist, ist diese Downregulation der CD131 Expression somit mehr oder weniger spezifisch für das Vorhandensein von IL-3.

pDCs exprimieren beispielsweise sowohl IL-3- als auch GM-CSF-Rezeptoren. Deshalb tragen beide Zytokine dazu bei, dass die Expression von CD131 auf pDCs herunterreguliert wird. (61) Auch GM-CSF wird unter anderem von aktivierten T-Zellen produziert. (36)

Basophile Granulozyten hingegen weisen hauptsächlich den IL-3-Rezeptor auf (62) und reagieren somit auf das Vorhandensein von IL-3 spezifischer mit einer Downregulation der CD131 Expression.

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass CD131 auf Basophilen Granulozyten und auf pDCs nach 24 Stunden Inkubation ohne Zusatz weiterer Stimulanzen herunterreguliert wird. Bei pDCs ist der Unterschied auch zwischen den beiden Patientengruppen signifikant. Das spricht für eine erhöhte basale Freisetzung von IL-3 und im Fall der pDCs eventuell auch von GM-CSF. Die Quelle des IL-3 sind wahrscheinlich autoproliferierte oder basal stärker aktivierte T-Zellen. Bei maximaler T-Zell Stimulation durch anti-CD3 zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen, weil dabei in allen Proben von den T-Zellen maximal viel IL-3 freigesetzt wird. Im Folgenden wurden noch Vollblutproben mit definierten Mengen an IL-3 und GM-CSF versetzt, um zu klären, ob die Basophilen Granulozyten und die pDCs von

Patienten mit RA empfindlicher auf diese Zytokine reagieren. Das Ergebnis zeigte, dass sich die Reaktion der beiden Zellarten zwischen den gesunden Kontrollen und den Patienten nicht unterscheidet.

### **4.3 Untergeordnete Rolle der CD4<sup>+</sup> T-Zellen als Ursprung von IL-3**

Traditionell gelten CD4<sup>+</sup> T-Zellen als Hauptquelle von IL-3. (13,38) In der Studie zur Rolle von IL-3 in der frühen CIA konnte festgestellt werden, dass die Expression von IL-3 durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter anderem abhängt von den gleichzeitig in der Kultur vorhandenen Zellen. So war die Produktion von IL-3 mit B-Zellen als akzessorischen Zellen niedrig, während diese deutlich höher ausfiel, wenn CD11b<sup>+</sup> Monozyten als akzessorische Zellen eingesetzt wurden. Die Aktivierung der T-Zellen erfolgte, wie in dieser Studie, mit anti-CD3. (13)

In unserer Studie wurden humane PBMCs verwendet, das heißt, in der Probe waren sowohl B-Zellen als auch Monozyten vorhanden. Es konnte jedoch keine erhöhte Expression von IL-3 durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten mit RA gegenüber gesunden Kontrollen festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der Produktion von IL-3 bei Patienten mit RA eine untergeordnete Rolle spielen.

CD4<sup>+</sup> T-Zellen gelten zudem auch als Hauptproduzenten von IL-2. Dies ist ein autokriner Wachstumsfaktor, der T-Zell Aktivierung und Proliferation fördert. (68) IL-2 aktiviert auch regulatorische T-Helferzellen. Diese verhindern und kontrollieren in einem gesunden Organismus Inflammation. In einer klinischen Studie wurde gezeigt, dass die IL-2 Spiegel im Serum mit dem radiologischen Schädigungsgrad korrelieren. In der gleichen Studie zeigte sich auch, dass die IL-2 Spiegel bei Patienten mit aktiver RA, wenn auch nicht signifikant, etwas niedriger sind als bei Patienten mit inaktiver RA. (69) Diese Ergebnisse konnten indirekt in dieser Arbeit belegt werden: CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit RA exprimieren mehr IL-2 als von gesunden Kontrollen, der Anteil IL-2 positiver Zellen sinkt jedoch leicht mit höherer Krankheitsaktivität.

Bei IFN- $\gamma$  zeigte sich kein Unterschied im Anteil der exprimierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen zwischen den Gruppen.



#### **4.4 CD8<sup>+</sup> T-Zellen als Ursprung von Zytokinen**

Bisher wurden in nur einer Studie mit Patienten mit nicht-IgE-vermittelter Hypereosinophilie CD8<sup>+</sup> T-Zellen als Quelle von IL-3 beschrieben, wobei auch in dieser Studie CD4<sup>+</sup> T-Zellen als Hauptquelle von IL-3 galten. Die eingesetzte Methode war auch hier eine intrazelluläre Färbung mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse. (39)

Unsere Ergebnisse zeigen, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen die Hauptquelle von IL-3 bei Patienten mit RA sind. Der Anteil IL-3 positiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen steigt, wenn auch nicht statistisch signifikant, mit der Krankheitsaktivität. Nachdem in der PBMC Kultur bei Patienten mit RA mehr IL-3 produziert wurde (siehe 4.5), ist davon auszugehen, dass dieses IL-3 größtenteils von CD8<sup>+</sup> T-Zellen produziert wurde.

Die Ergebnisse zu IL-2 waren analog zu denen bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen: Die Zellen von Patienten mit RA sind zu einem höheren Anteil IL-2 positiv als die gesunder Kontrollen. Der Anteil sinkt wieder, jedoch nicht signifikant, mit zunehmender Krankheitsaktivität. Beides spricht für eine Dysregulation der T-Zellen bei RA.

IFN- $\gamma$  ist ein Zytokin aus der Interferonfamilie, das von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen produziert wird. (36) IFN- $\gamma$  aktiviert Monozyten und Makrophagen und steigert die Proliferation von Osteoklasten, was zu Gelenkschaden bei RA führt. (70) IFN- $\gamma$  spielt viele Rollen bei der Pathogenese der RA, unter anderem bei der Inflammation der Synovia, der Autoimmunität gegen citrullinierte Proteine und periartikulärem und systemischem Knochenverlust. (71) Im Synovium von Patienten mit RA sind CD8<sup>+</sup> T-Zellen die dominante Quelle von IFN- $\gamma$ . (72) Auch in dieser Arbeit sind die CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit RA häufiger IFN- $\gamma$  positiv. Dieser Zusammenhang konnte bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht nachgewiesen werden.

#### **4.5 Erhöhte Produktion von IL-3 und GM-CSF bei Patienten mit RA**

Im Mausmodell der CIA wurde gezeigt, dass IL-3 in der Frühphase der Erkrankung ein wichtiger Verlaufs-beschleunigender Faktor ist. Eine Blockade in dieser Phase reduzierte die klinischen und histologischen Zeichen von Arthritis. Hier wurde die These aufgestellt, dass IL-3 die frühe Arthritis verschlimmert, indem es große Mengen an basophilen Granulozyten generiert und für deren Aktivierung sorgt. (13)

Bei Patienten mit Sepsis konnte zudem beobachtet werden, dass Patienten, die in den ersten 24 Stunden erhöhte IL-3 Spiegel aufweisen eine schlechtere Prognose haben. Es wurde in dem Zusammenhang die These aufgestellt, dass IL-3 indirekt den Zytokinsturm auslöst, indem es große Zellpools generiert, die bei Kontakt mit bakteriellen Antigenen große Mengen Zytokine freisetzen. (41)

Im Rahmen meiner Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass die PBMCs von Patienten mit RA mehr IL-3 produzieren als die von gesunden Kontrollen. Die Zellen von Patienten mit aktiver RA produzieren, wenn auch nicht signifikant, mehr IL-3 als die von Patienten mit inaktiver RA. Die Aktivität der RA korreliert also mit einer höheren IL-3 Produktion im Fall der T-Zell Aktivierung. Daraus kann man schließen, dass IL-3 wahrscheinlich eine Rolle in der Pathogenese der RA spielt. In Zusammenschau mit den anderen Ergebnissen unterstreicht diese Arbeit die These, dass IL-3 über eine Vermehrung und Aktivierung bestimmter Zellpopulationen zum Krankheitsgeschehen beiträgt.

GM-CSF gehört mit IL-3 und IL-5 zu einer Zytokinfamilie, die sich auch den gleichen  $\beta$ -Anteil ihres Rezeptor (CD131) teilen. (36) Es handelt sich um einen hämatopoietischen Wachstumsfaktor, der vor allem von T-Zellen und Stromazellen produziert wird. (73) Im Plasma und in der Synovia von Patienten mit RA wurden erhöhte Werte von GM-CSF festgestellt. (70,74–76) In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass von den PBMCs unter maximaler T-Zell Aktivierung bei Proben von Patienten mit RA mehr GM-CSF produziert wird als bei gesunden Probanden. Wie unter 4.2 beschrieben, kann eine erhöhte Produktion von GM-CSF auf pDCs CD131 herunterregulieren. Somit ist die Herunterregulation von CD131 auf pDCs kein spezifischer Marker für ein erhöhtes Vorhandensein von IL-3.

IL-6 ist an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt wie beispielsweise der Immunantwort, Inflammation und Knochenstoffwechsel und es spielt auch eine Rolle bei der Pathogenese der RA (70) Ein therapeutischer anti-IL-6-Rezeptor Antikörper wurde für die Behandlung der RA 2008 erstmals zugelassen. Diese Behandlung zeigt eine hohe Effektivität. (70,77) Verschiedene Zellarten können IL-6 produzieren, darunter Monozyten, T-Lymphozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. In der Synovia von Patienten mit RA wird IL-6 von synovialen Fibroblasten und B-Zellen in der Synovia sezerniert. (72) In dieser Studie wurde interessanterweise kein Unterschied in der T-Zell Produktion von IL-6 bei Patienten mit RA gegenüber den gesunden Kontrollen festgestellt. Das ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Hauptquelle von IL-6 bei Patienten mit RA synoviale Fibroblasten

und B-Zellen sind, die Zellkultur in dieser Studie aber unter T-Zell Aktivierung durchgeführt wurde.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war, zu untersuchen, ob sich Leukozyten im peripheren Blut von Patienten mit RA im Unterschied zu gesunden Probanden in ihrer Produktion von IL-3 und der Expression des IL-3-Rezeptors unterscheiden.

Dafür wurden die verschiedenen Zellpopulationen im frischen Vollblut sowie in Vollblutkulturen durchflusszytometrisch sowohl quantitativ als auch hinsichtlich der Stärke der Expression verschiedener Aktivierungsmarker untersucht. Zudem wurden PBMCs isoliert und mittels intrazellulärer Färbung auf die Expression verschiedener Zytokine durchflusszytometrisch untersucht. Neben dem intrazellulärem Zytokinnachweis erfolgte auch eine Kultivierung der PBMCs und die Analyse der Überstände auf produzierte Zytokine.

In der Immunphänotypisierung des frischen Vollblutes zeigte sich, dass bei Patienten mit RA mehr basophile und neutrophile Granulozyten, klassische und CD16<sup>+</sup> Monozyten vorhanden waren als bei gesunden Probanden. Die basophilen Granulozyten exprimierten bei den Patienten mit RA deutlich weniger CD131, was möglicherweise auf das Vorhandensein einer erhöhten IL-3 Konzentration hinweist. Auch wiesen die RA Patienten eine signifikant höhere Expression des Aktivierungsmarkers CD11b sowohl auf den neutrophilen Granulozyten als auch den CD16<sup>+</sup> Monozyten auf.

In der Vollblutkultur zeigte sich nach 24 Stunden bereits ohne Stimulation eine signifikante Herunterregulierung der CD131 Expression auf Basophilen Granulozyten und pDCs. Dies spricht möglicherweise ebenfalls für eine erhöhte basale IL-3 Produktion bei RA Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen.

In den Überständen der Zellkultur aus PBMCs zeigte sich eine erhöhte Produktion von IL-3 bei den Proben von RA Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Aus der durchflusszytometrischen Untersuchung mit intrazellulärer Färbung konnten zudem die CD8<sup>+</sup> T-Zellen als Hauptquelle der IL-3 Produktion bei RA Patienten identifiziert werden.

Auch die Expression von IL-2 und IFN- $\gamma$  und die Produktion von GM-CSF und IL-6 wurden untersucht, wobei größtenteils bereits bestehende Erkenntnisse bestätigt werden konnten.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IL-3 eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der RA spielt und einen interessanten Angriffspunkt für neue Therapien darstellen könnte. Zudem könnte IL-3 auch als potenzieller prognostischer Marker bei der RA eingesetzt werden.

## 6 Anhang

### 6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikationskriterien der RA nach ACR/EULAR 2010 .....	13
Tabelle 2: Interpretation DAS28 – Werte .....	14
Tabelle 3: Verwendete Geräte .....	21
Tabelle 4: Glas- und Plastikware .....	22
Tabelle 5: Chemikalien, Reagenzien, Puffer .....	23
Tabelle 6: Zellkulturmedien und -zusätze .....	24
Tabelle 7: Zusammensetzung der Zellkulturmedien .....	24
Tabelle 8: Antikörper für die extrazelluläre Durchflusszytometrie .....	26
Tabelle 9: Antikörper für die intrazelluläre Durchflusszytometrie .....	26
Tabelle 10: Zytokine, Antikörper, Enzyme .....	27
Tabelle 11: Materialien für den IL-3 ELISA .....	27
Tabelle 12: ELISA Sets .....	27
Tabelle 13: ELISA allgemein .....	28
Tabelle 14: Analyse- und Bearbeitungsprogramme .....	28
Tabelle 15: Extrazelluläre Färbung 1 .....	34
Tabelle 16: Extrazelluläre Färbung 2 .....	35
Tabelle 17: Extrazelluläre Färbung PBMCs .....	37
Tabelle 18: Intrazelluläre Färbung PBMCs .....	37
Tabelle 19: Stimulanzien mit Konzentration .....	38
Tabelle 20: modifizierte extrazelluläre Färbung 1 .....	39
Tabelle 21: eingesetzte ELISAs .....	40
Tabelle 22: Demografische und klinische Basischarakteristika .....	43

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ficoll-Hypaque® Dichtegradientenzentrifugation, Zustand vor und nach Zentrifugation.....	31
Abbildung 2: a.) Absolute Anzahl Basophiler Granulozyten im Vollblut; b.) CD131 Expression auf Basophilen Granulozyten im Vollblut .....	44
Abbildung 3: a.) Absolute Anzahl neutrophiler Granulozyten in Vollblut. b.) CD11b Expression auf neutrophilen Granulozyten im Vollblut .....	45
Abbildung 4: a.) Absolute Anzahl Klassischer Monozyten im Vollblut; b.) CD11b Expression auf klassischen Monozyten im Vollblut.....	47
Abbildung 5: a.) Absolute Anzahl CD16+Monozyten im Vollblut. b.) CD11b Expression auf CD16 <sup>+</sup> Monozyten im Vollblut.....	48
Abbildung 6: a.) CD131 Expression auf basophilen Granulozyten nach 24 Stunden Inkubation mit Medium und Anti-CD3. b.) CD131 Expression auf pDCs nach 24 Stunden Inkubation mit Medium und Anti-CD3. ....	49
Abbildung 7: a.) CD131 Expression auf basophilen Granulozyten nach 24 Stunden Inkubation mit Medium, IL-3 und GM-CSF. b.) CD131 Expression auf pDCs nach 24 Stunden Inkubation mit Medium, IL-3 und GM-CSF.....	50
Abbildung 8: IL-3 positive CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in Prozent der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	51
Abbildung 9: IL-2 positive CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in Prozent der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	52
Abbildung 10: IFN- $\gamma$ positive CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in Prozent der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	53
Abbildung 11: IL-3 positive CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in Prozent der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	54
Abbildung 12: IL-2 positive CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in Prozent der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	55
Abbildung 13: IFN- $\gamma$ positive CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in Prozent der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	56
Abbildung 14: IL-3 Produktion von anti-CD3 stimulierten PBMCs. ....	57
Abbildung 15: GM-CSF Produktion von anti-CD3 stimulierten PBMCs. ....	58
Abbildung 16: IL-6 Produktion von anti-CD3 stimulierten PBMCs. ....	59

## 7 Literaturverzeichnis

1. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*. 2011;365(23). doi:10.1056/NEJMra1004965 Cited in: PubMed; PMID 22150039.
2. Zink A, Albrecht K. Wie häufig sind muskuloskeletale Erkrankungen in Deutschland? [How frequent are musculoskeletal diseases in Germany?]. *Z Rheumatol*. 2016;75(4):346–53. ger. doi:10.1007/s00393-016-0094-2 Cited in: PubMed; PMID 27142379.
3. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016;388(10055):2023–38. doi:10.1016/S0140-6736(16)30173-8 Cited in: PubMed; PMID 27156434.
4. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity*. 2017;46(2):183–96. doi:10.1016/j.immuni.2017.02.006 Cited in: PubMed; PMID 28228278.
5. Symmons DP, Bankhead CR, Harrison BJ, Brennan P, Barrett EM, Scott DG, Silman AJ. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum*. 1997;40(11):1955–61. doi:10.1002/art.1780401106 Cited in: PubMed; PMID 9365083.
6. Liao KP, Alfredsson L, Karlson EW. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2009;21(3):279–83. doi:10.1097/BOR.0b013e32832a2e16 Cited in: PubMed; PMID 19318947.
7. Ruderman EM, Nola KM, Ferrell S, Sapir T, Cameron DR. Incorporating the treat-to-target concept in rheumatoid arthritis. *J Manag Care Pharm*. 2012;18(9):1–18. doi:10.18553/jmcp.2012.18.S9-A.1 Cited in: PubMed; PMID 23206239.
8. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2001;358(9285):903–11. doi:10.1016/S0140-6736(01)06075-5 Cited in: PubMed; PMID 11567728.

9. Szekanecz Z, Pakozdi A, Szentpetery A, Besenyei T, Koch AE. Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2009;144–51. doi:10.2741/E5 Cited in: PubMed; PMID 19482623.
10. Kraan MC, Versendaal H, Jonker M, Bresnihan B, Post WJ, t Hart BA, Breedveld FC, Tak PP. Asymptomatic synovitis precedes clinically manifest arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 1998;41(8):1481–8. doi:10.1002/1529-0131(199808)41:8<1481:AID-ART19>3.0.CO;2-O Cited in: PubMed; PMID 9704648.
11. Edwards JCW, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RM, Shaw T. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*. 2004;350(25):2572–81. doi:10.1056/NEJMoa032534 Cited in: PubMed; PMID 15201414.
12. Feldmann M, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. *Immunol Rev*. 2008;2237–19. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00626.x Cited in: PubMed; PMID 18613827.
13. Brühl H, Cihak J, Niedermeier M, Denzel A, Rodriguez Gomez M, Talke Y, Goebel N, Plachý J, Stangassinger M, Mack M. Important role of interleukin-3 in the early phase of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;60(5):1352–61. doi:10.1002/art.24441 Cited in: PubMed; PMID 19404955.
14. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2010;376(9746):1094–108. doi:10.1016/S0140-6736(10)60826-4 Cited in: PubMed; PMID 20870100.
15. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JMW, Hobbs K, Huizinga TWJ, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(9):1580–8. doi:10.1136/ard.2010.138461 Cited in: PubMed; PMID 20699241.



16. Nielen MMJ, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, Koning MHMT de, Habibuw MR, Vandenbroucke JP, Dijkmans BAC. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis & Rheumatism*. 2004;50(2):380–6. doi:10.1002/art.20018 Cited in: PubMed; PMID 14872479.
17. van der Linden MPM, van der Woude D, Ioan-Facsinay A, Levarht EWN, Stoeken-Rijsbergen G, Huizinga TWJ, Toes REM, van der Helm-van Mil AHM. Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2009;60(8):2232–41. doi:10.1002/art.24716 Cited in: PubMed; PMID 19644872.
18. Böhler C, Radner H, Smolen JS, Aletaha D. Serological changes in the course of traditional and biological disease modifying therapy of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(2):241–4. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202297 Cited in: PubMed; PMID 23087181.
19. England BR, Tiong BK, Bergman MJ, Curtis JR, Kazi S, Mikuls TR, O'Dell JR, Ranganath VK, Limanni A, Suter LG, Michaud K. 2019 Update of the American College of Rheumatology Recommended Rheumatoid Arthritis Disease Activity Measures. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2019;71(12):1540–55. doi:10.1002/acr.24042 Cited in: PubMed; PMID 31709779.
20. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 1995;38(1):44–8. doi:10.1002/art.1780380107 Cited in: PubMed; PMID 7818570.
21. Kirwan JR. The effect of glucocorticoids on joint destruction in rheumatoid arthritis. The Arthritis and Rheumatism Council Low-Dose Glucocorticoid Study Group. *The New England journal of medicine*. 1995;333(3):142–6. doi:10.1056/NEJM199507203330302 Cited in: PubMed; PMID 7791815.

22. Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, Buch M, Burmester G, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, Gossec L, Nam J, Ramiro S, Winthrop K, Wit M de, Aletaha D, Betteridge N, Bijlsma JWJ, Boers M, Buttgerit F, Combe B, Cutolo M, Damjanov N, Hazes JMW, Kouloumas M, Kvien TK, Mariette X, Pavelka K, van Riel PLCM, Rubbert-Roth A, Scholte-Voshaar M, Scott DL, Sokka-Isler T, Wong JB, van der Heijde D. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(3):492–509. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204573 Cited in: PubMed; PMID 24161836.
23. Sizova L. Approaches to the treatment of early rheumatoid arthritis with disease-modifying antirheumatic drugs. *Br J Clin Pharmacol*. 2008;66(2):173–8. doi:10.1111/j.1365-2125.2008.03222.x Cited in: PubMed; PMID 18537958.
24. Curtis JR, Singh JA. Use of biologics in rheumatoid arthritis: current and emerging paradigms of care. *Clin Ther*. 2011;33(6):679–707. doi:10.1016/j.clinthera.2011.05.044 Cited in: PubMed; PMID 21704234.
25. Smolen JS, Landewé RBM, Bijlsma JWJ, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, McInnes IB, Sepriano A, van Vollenhoven RF, Wit M de, Aletaha D, Aringer M, Askling J, Balsa A, Boers M, den Broeder AA, Buch MH, Buttgerit F, Caporali R, Cardiel MH, Cock D de, Codreanu C, Cutolo M, Edwards CJ, van Eijk-Hustings Y, Emery P, Finckh A, Gossec L, Gottenberg J-E, Hetland ML, Huizinga TWJ, Koloumas M, Li Z, Mariette X, Müller-Ladner U, Mysler EF, da Silva JAP, Poór G, Pope JE, Rubbert-Roth A, Ruysen-Witrand A, Saag KG, Strangfeld A, Takeuchi T, Voshaar M, Westhovens R, van der Heijde D. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(6):685–99. doi:10.1136/annrheumdis-2019-216655 Cited in: PubMed; PMID 31969328.
26. Dougados M, Combe B, Cantagrel A, Goupille P, Olive P, Schattenkirchner M, Meusser S, Paimela L, Rau R, Zeidler H, Leirisalo-Repo M, Peldan K. Combination therapy in early rheumatoid arthritis: a randomised, controlled, double blind 52 week clinical trial of sulphasalazine and methotrexate compared with the single components. *Ann Rheum Dis*. 1999;58(4):220–5. doi:10.1136/ard.58.4.220 Cited in: PubMed; PMID 10364900.

27. Behrens F, Koehm M, Burkhardt H. Update 2011: leflunomide in rheumatoid arthritis - strengths and weaknesses. *Curr Opin Rheumatol.* 2011;23(3):282–7. doi:10.1097/BOR.0b013e328344fddb Cited in: PubMed; PMID 21427581.
28. van der Heijde DM, van Riel PL, Nuver-Zwart IH, Gribnau FW, van de Putte LB. Effects of hydroxychloroquine and sulphasalazine on progression of joint damage in rheumatoid arthritis. *Lancet.* 1989;1(8646):1036–8. doi:10.1016/s0140-6736(89)92442-2 Cited in: PubMed; PMID 2565997.
29. O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, Gadina M, McInnes IB, Laurence A. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med.* 2015;66:311–28. doi:10.1146/annurev-med-051113-024537 Cited in: PubMed; PMID 25587654.
30. Risikoinformationen - Xeljanz® (Tofacitinib): Erhöhtes Risiko für venöse thromboembolische Ereignisse und erhöhtes Risiko für schwerwiegende und tödlich verlaufende Infektionen [Internet]. 2022.000Z [updated 2022 Mar 1.000Z; cited 2022 Mar 1.946Z]. Available from: [https://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/RV\\_STP/s-z/xeljanz.html](https://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/RV_STP/s-z/xeljanz.html)
31. Nam JL, Ramiro S, Gaujoux-Viala C, Takase K, Leon-Garcia M, Emery P, Gossec L, Landewe R, Smolen JS, Buch MH. Efficacy of biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(3):516–28. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204577 Cited in: PubMed; PMID 24399231.
32. Smolen JS, Aletaha D. Forget personalised medicine and focus on abating disease activity. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(1):3–6. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202361 Cited in: PubMed; PMID 23136241.
33. Sokka T, Kautiainen H, Pincus T, Verstappen SMM, Aggarwal A, Alten R, Andersone D, Badsha H, Baecklund E, Belmonte M, Craig-Müller J, da Mota LMH, Dimic A, Fathi NA, Ferraccioli G, Fukuda W, Géher P, Gogus F, Hajjaj-Hassouni N, Hamoud H, Haugeberg G, Henrohn D, Horslev-Petersen K, Ionescu R, Karatew D, Kuuse R, Laurindo IMM, Lazovskis J, Luukkainen R, Mofiti A, Murphy E, Nakajima A, Oyoo O,

- Pandya SC, Pohl C, Predeteanu D, Rexhepi M, Rexhepi S, Sharma B, Shono E, Sibilica J, Sierakowski S, Skopouli FN, Stropuviene S, Toloza S, Valter I, Woolf A, Yamanaka H. Work disability remains a major problem in rheumatoid arthritis in the 2000s: data from 32 countries in the QUEST-RA study. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(2):R42. doi:10.1186/ar2951 Cited in: PubMed; PMID 20226018.
34. Gonzalez A, Icen M, Kremers HM, Crowson CS, Davis JM, Therneau TM, Roger VL, Gabriel SE. Mortality trends in rheumatoid arthritis: the role of rheumatoid factor. *J Rheumatol.* 2008;35(6):1009–14. Cited in: PubMed; PMID 18412312.
  35. 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. doi:10.1038/sj.onc.1203594 Cited in: PubMed; PMID 10851052.
  36. Murphy K, Weaver C. *Janeway Immunologie.* 9th ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018. 1207 p. ger.
  37. Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K. Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:295–331. doi:10.1146/annurev.iy.10.040192.001455 Cited in: PubMed; PMID 1590989.
  38. Till S, Li B, Durham S, Humbert M, Assoufi B, Huston D, Dickason R, Jeannin P, Kay AB, Corrigan C. Secretion of the eosinophil-active cytokines interleukin-5, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 by bronchoalveolar lavage CD4+ and CD8+ T cell lines in atopic asthmatics, and atopic and non-atopic controls. *Eur J Immunol.* 1995;25(10):2727–31. doi:10.1002/eji.1830251002 Cited in: PubMed; PMID 7589063.
  39. 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. doi:10.1111/all.12311 Cited in: PubMed; PMID 24410785.
  40. Dalloul AH, Arock M, Fourcade C, Hatzfeld A, Bertho JM, Debré P, Mossalayi MD. Human thymic epithelial cells produce interleukin-3. *Blood.* 1991;77(1):69–74. Cited in: PubMed; PMID 1984804.
  41. Weber GF, Chousterman BG, He S, Fenn AM, Nairz M, Anzai A, Brenner T, Uhle F, Iwamoto Y, Robbins CS, Noiret L, Maier SL, Zönnchen T, Rahbari NN, Schölch S,

- Klotzsche-von Ameln A, Chavakis T, Weitz J, Hofer S, Weigand MA, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK. Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis. *Science*. 2015;347(6227):1260–5. doi:10.1126/science.aaa4268 Cited in: PubMed; PMID 25766237.
42. Schroeder JT, Chichester KL, Bieneman AP. Human basophils secrete IL-3: evidence of autocrine priming for phenotypic and functional responses in allergic disease. *J Immunol*. 2009;182(4):2432–8. doi:10.4049/jimmunol.0801782 Cited in: PubMed; PMID 19201898.
  43. Huang S, Chen Z, Yu JF, Young D, Bashey A, Ho AD, Law P. Correlation between IL-3 receptor expression and growth potential of human CD34+ hematopoietic cells from different tissues. *Stem Cells*. 1999;17(5):265–72. doi:10.1002/stem.170265 Cited in: PubMed; PMID 10527461.
  44. Renner K, Metz S, Metzger A-M, Neumayer S, Schmidbauer K, Talke Y, Buchtler S, Halbritter D, Mack M. Expression of IL-3 receptors and impact of IL-3 on human T and B cells. *Cell Immunol*. 2018;33449–60. doi:10.1016/j.cellimm.2018.09.005 Cited in: PubMed; PMID 30274838.
  45. Sato N, Caux C, Kitamura T, Watanabe Y, Arai K, Banchereau J, Miyajima A. Expression and factor-dependent modulation of the interleukin-3 receptor subunits on human hematopoietic cells. *Blood*. 1993;82(3):752–61. doi:10.1182/blood.V82.3.752.752
  46. Borriello F, Galdiero MR, Varricchi G, Loffredo S, Spadaro G, Marone G. Innate Immune Modulation by GM-CSF and IL-3 in Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4). doi:10.3390/ijms20040834 Cited in: PubMed; PMID 30769926.
  47. Lantz CS, Boesiger J, Song CH, Mach N, Kobayashi T, Mulligan RC, Nawa Y, Dranoff G, Galli SJ. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature*. 1998;392(6671):90–3. doi:10.1038/32190 Cited in: PubMed; PMID 9510253.
  48. Liu K, Zhu M, Huang Y, Wei S, Xie J, Xiao Y. CD123 and its potential clinical application in leukemias. *Life Sci*. 2015;12259–64. doi:10.1016/j.lfs.2014.10.013 Cited in: PubMed; PMID 25445480.

49. Ebner S, Hofer S, van Nguyen A, Fürhapter C, Herold M, Fritsch P, Heufler C, Romani N. A novel role for IL-3: human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern. *J Immunol.* 2002;168(12):6199–207. doi:10.4049/jimmunol.168.12.6199 Cited in: PubMed; PMID 12055233.
50. Finotti G, Tamassia N, Cassatella MA. Synergistic production of TNF $\alpha$  and IFN $\alpha$  by human pDCs incubated with IFN $\lambda$ 3 and IL-3. *Cytokine.* 2016;86:124–31. doi:10.1016/j.cyto.2016.08.005 Cited in: PubMed; PMID 27513213.
51. Haak-Frendscho M, Arai N, Arai K, Baeza ML, Finn A, Kaplan AP. Human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 cause basophil histamine release. *J Clin Invest.* 1988;82(1):17–20. doi:10.1172/JCI113567 Cited in: PubMed; PMID 2455733.
52. Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Conrad DH, Clark-Lewis I, Finkelman FD, Plaut M, Paul WE. IL-3 promotes production of IL-4 by splenic non-B, non-T cells in response to Fc receptor cross-linkage. *J Immunol.* 1990;145(8):2500–6. Cited in: PubMed; PMID 2145362.
53. Didichenko SA, Spiegl N, Brunner T, Dahinden CA. IL-3 induces a Pim1-dependent antiapoptotic pathway in primary human basophils. *Blood.* 2008;112(10):3949–58. doi:10.1182/blood-2008-04-149419 Cited in: PubMed; PMID 18768389.
54. Renner K, Hellerbrand S, Hermann F, Riedhammer C, Talke Y, Schiechl G, Rodriguez Gomez M, Kutzi S, Halbritter D, Goebel N, Brühl H, Weissert R, Mack M. IL-3 promotes the development of experimental autoimmune encephalitis. *JCI Insight.* 2016;1(16):e87157. doi:10.1172/jci.insight.87157 Cited in: PubMed; PMID 27734026.
55. Renner K, Hermann FJ, Schmidbauer K, Talke Y, Rodriguez Gomez M, Schiechl G, Schlossmann J, Brühl H, Anders H-J, Mack M. IL-3 contributes to development of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Kidney Int.* 2015;88(5):1088–98. doi:10.1038/ki.2015.196 Cited in: PubMed; PMID 26131743.
56. Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, editors. *Physiologie.* 7th ed. Stuttgart: Thieme; 2014. 1024 p. ger.

57. Call ME, Pyrdol J, Wiedmann M, Wucherpfennig KW. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell*. 2002;111(7):967–79. doi:10.1016/s0092-8674(02)01194-7 Cited in: PubMed; PMID 12507424.
58. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie*. 4th ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. 299 p. (Experimentator). ger.
59. Flow Cytometry Cell Counting Beads | Thermo Fisher Scientific - DE [Internet]. 2022.000Z [updated 2022 Feb 2.000Z; cited 2022 Feb 2.094Z]. Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/flow-cytometry-calibration/flow-cytometer-cell-counting-beads.html>
60. eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors) (500X) [Internet]. 2022.000Z [updated 2022 Feb 2.000Z; cited 2022 Feb 2.061Z]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/00-4975-03#/00-4975-03>
61. Renner K, Schwittay T, Chaabane S, Gottschling J, Müller C, Tiefenböck C, Salewski J-N, Winter F, Buchtler S, Balam S, Malfertheiner MV, Lubnow M, Lunz D, Graf B, Hitzenbichler F, Hanses F, Poeck H, Kreutz M, Orsó E, Burkhardt R, Niedermair T, Brochhausen C, Gessner A, Salzberger B, Mack M. Severe T cell hyporeactivity in ventilated COVID-19 patients correlates with prolonged virus persistence and poor outcomes. *Nat Commun*. 2021;12(1):3006. doi:10.1038/s41467-021-23334-2 Cited in: PubMed; PMID 34021143.
62. Dougan M, Dranoff G, Dougan SK. GM-CSF, IL-3, and IL-5 Family of Cytokines: Regulators of Inflammation. *Immunity*. 2019;50(4):796–811. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.022 Cited in: PubMed; PMID 30995500.
63. Chen W, Wang Q, Ke Y, Lin J. Neutrophil Function in an Inflammatory Milieu of Rheumatoid Arthritis. *J Immunol Res*. 2018;20188549329. doi:10.1155/2018/8549329 Cited in: PubMed; PMID 30622982.
64. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007;81(3):584–92. doi:10.1189/jlb.0806510 Cited in: PubMed; PMID 17135573.
65. Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17

- cell population. *Arthritis & Rheumatism*. 2012;64(3):671–7. doi:10.1002/art.33418 Cited in: PubMed; PMID 22006178.
66. Klimek E, Mikołajczyk T, Sulicka J, Kwaśny-Krochin B, Korkosz M, Osmenda G, Wizner B, Surdacki A, Guzik T, Grodzicki TK, Skalska A. Blood monocyte subsets and selected cardiovascular risk markers in rheumatoid arthritis of short duration in relation to disease activity. *Biomed Res Int*. 2014;2014736853. doi:10.1155/2014/736853 Cited in: PubMed; PMID 25126574.
  67. Lioté F, Boval-Boizard B, Weill D, Kuntz D, Wautier JL. Blood monocyte activation in rheumatoid arthritis: increased monocyte adhesiveness, integrin expression, and cytokine release. *Clin Exp Immunol*. 1996;106(1):13–9. doi:10.1046/j.1365-2249.1996.d01-820.x Cited in: PubMed; PMID 8870692.
  68. Norris MS, McConnell TJ, Mannie MD. Interleukin-2 promotes antigenic reactivity of rested T cells but prolongs the postactivation refractory phase of activated T cells. *Cell Immunol*. 2001;211(1):51–60. doi:10.1006/cimm.2001.1821 Cited in: PubMed; PMID 11585388.
  69. Tebib JG, Boughaba H, Letroublon MC, Bienvenu J, Noel E, Armanet P, Colson F, Rouillet A, Bouvier M. Serum IL-2 level in rheumatoid arthritis: correlation with joint destruction and disease progression. *Eur Cytokine Netw*. 1991;2(4):239–43. Cited in: PubMed; PMID 1756229.
  70. Kondo N, Kuroda T, Kobayashi D. Cytokine Networks in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(20). doi:10.3390/ijms222010922 Cited in: PubMed; PMID 34681582.
  71. Kato M. New insights into IFN- $\gamma$  in rheumatoid arthritis: role in the era of JAK inhibitors. *Immunol Med*. 2020;43(2):72–8. doi:10.1080/25785826.2020.1751908 Cited in: PubMed; PMID 32338187.
  72. Zhang F, Wei K, Slowikowski K, Fonseka CY, Rao DA, Kelly S, Goodman SM, Tabechian D, Hughes LB, Salomon-Escoto K, Watts GFM, Jonsson AH, Rangel-Moreno J, Meednu N, Roza C, Apruzzese W, Eisenhaure TM, Lieb DJ, Boyle DL, Mandelin AM, Boyce BF, DiCarlo E, Gravallese EM, Gregersen PK, Moreland L, Firestein GS, Hacohen N, Nusbaum C, Lederer JA, Perlman H, Pitzalis C, Filer A, Holers VM, Bykerk VP,



- Donlin LT, Anolik JH, Brenner MB, Raychaudhuri S. Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nat Immunol.* 2019;20(7):928–42. doi:10.1038/s41590-019-0378-1 Cited in: PubMed; PMID 31061532.
73. Haworth C, Brennan FM, Chantry D, Turner M, Maini RN, Feldmann M. Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Eur J Immunol.* 1991;21(10):2575–9. doi:10.1002/eji.1830211039 Cited in: PubMed; PMID 1915559.
74. Alvaro-Gracia JM, Zvaifler NJ, Firestein GS. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. IV. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-mediated induction of class II MHC antigen on human monocytes: a possible role in rheumatoid arthritis. *J Exp Med.* 1989;170(3):865–75. doi:10.1084/jem.170.3.865 Cited in: PubMed; PMID 2504878.
75. Fiehn C, Wermann M, Pezzutto A, Hübner M, Heilig B. GM-CSF-Plasmakonzentrationen bei rheumatoider Arthritis, systemischem Lupus erythematodes und Spondylarthropathie [Plasma GM-CSF concentrations in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and spondyloarthropathy]. *Z Rheumatol.* 1992;51(3):121–6. ger. Cited in: PubMed; PMID 1502858.
76. Burmester GR, Feist E, Sleeman MA, Wang B, White B, Magrini F. Mavrilimumab, a human monoclonal antibody targeting GM-CSF receptor- $\alpha$ , in subjects with rheumatoid arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase I, first-in-human study. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(9):1542–9. doi:10.1136/ard.2010.146225 Cited in: PubMed; PMID 21613310.
77. Singh JA, Hossain A, Tanjong Ghogomu E, Kotb A, Christensen R, Mudano AS, Maxwell LJ, Shah NP, Tugwell P, Wells GA. Biologics or tofacitinib for rheumatoid arthritis in incomplete responders to methotrexate or other traditional disease-modifying anti-rheumatic drugs: a systematic review and network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;(5):CD012183. doi:10.1002/14651858.CD012183 Cited in: PubMed; PMID 27175934.

## **8 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank an alle Personen richten, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Mack, bedanken, dafür, dass er mir dieses interessante Thema anvertraut hat und für die Hilfestellungen in komplexen Situationen.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Renner für die Betreuung und Durchsicht dieser Arbeit. Ihre Anregungen, Verbesserungsvorschläge und Hilfeleistungen im Labor haben wesentlich zum erfolgreichen Abschluss beigetragen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Fleck bedanken, für die Ermöglichung der Patientenrekrutierung an der Asklepios Klinik Bad Abbach. Der reibungslose Ablauf dort und die gute Einbindung in das Team haben diese Arbeit ermöglicht.

Auch dem Team des Labors der AG Mack möchte ich danken. Besonders hervorzuheben sind dabei Frau Yvonne Talke und Frau Sophia Neumayer, für alle technischen Hilfeleistungen sowie die geduldige Einarbeitung in neue Methoden.

Darüber hinaus möchte ich noch danken:

Herrn Dr. Jan-Niklas Salewski, der zur Zeit meiner Laborarbeit selbst an seiner Promotion arbeitete und mir dennoch immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Frau Leoni Schmuck für die immer angenehme Zusammenarbeit im Labor und den Austausch über das weitere Vorgehen.

Meinen Freunden für ihre Unterstützung aller Art.

Zum Schluss möchte ich noch meinen Eltern danken, für ihre Geduld, ihre Unterstützung und den finanziellen Rückhalt, die es mir erst ermöglicht haben, eine solche Arbeit zu beginnen. Ihnen ist die Arbeit gewidmet.

## 9 Eidesstattliche Erklärung

Nach § 3 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung  
der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

Agnes Mager, geboren am 26. Februar 1996 in Schärding

Ich erkläre,

- dass ich den Doktorgrad der Medizin nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe.
- dass ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des medizinischen Doktorgrades zugelassen bin.
- dass ich die medizinische Doktorprüfung nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland endgültig nicht bestanden habe.

Außerdem erkläre ich,

- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen.
- dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Schardenberg, 28.10.2022

Agnes Mager