

Aus der Abteilung
für Nephrologie
Prof. Dr. Bernhard Banas
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**„Expression von Interleukin-3 und seinem Rezeptor bei Patienten mit
Systemischem Lupus erythematoses, Psoriasis-Arthritis oder
Granulomatose mit Polyangiitis“**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Leoni Schmuck

2023

Aus der Abteilung
für Nephrologie
Prof. Dr. Bernhard Banas
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**„Expression von Interleukin-3 und seinem Rezeptor bei Patienten mit
Systemischem Lupus erythematoses, Psoriasis-Arthritis oder
Granulomatose mit Polyangiitis“**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Leoni Schmuck

2023

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Matthias Mack
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Barbara Schmidt
Tag der mündlichen Prüfung:	23.01.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Systemischer Lupus erythematoses.....	8
1.1.1	Definition und Epidemiologie des Systemischen Lupus erythematoses	8
1.1.2	Pathogenese des SLE	9
1.1.3	Klinik des SLE	11
1.1.4	Lupusnephritis.....	12
1.1.5	Therapie des SLE	14
1.2	Psoriasis-Arthritis	15
1.2.1	Definition und Epidemiologie der Psoriasis-Arthritis.....	15
1.2.2	Pathogenese der PsA	16
1.2.3	Klinik der PsA.....	18
1.2.4	Therapie der PsA.....	19
1.3	Granulomatose mit Polyangiitis	21
1.3.1	Definition und Epidemiologie der Granulomatose mit Polyangiitis.....	21
1.3.2	Pathogenese der GPA.....	21
1.3.3	Klinik der GPA.....	23
1.3.4	Therapie der GPA.....	24
1.4	Interleukin-3	25
1.4.1	Struktur und Funktion von IL-3	25
1.4.2	IL-3 und seine Rolle bei inflammatorischen und autoimmunen Prozessen	26
1.5	Zielsetzung der Arbeit	28
2	Material und Methoden	29
2.1	Laborgeräte und -materialien.....	29
2.1.1	Geräte	29
2.1.2	Glas- und Plastikware.....	30
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien, Puffer.....	31
2.1.4	Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze	31
2.1.5	Zusammensetzung der Zellkulturmedien	32
2.1.6	Antikörper für die extrazelluläre Durchflusszytometrie	32

2.1.7	Antikörper für die intrazelluläre Durchflusszytometrie	33
2.1.8	Zytokine, Antikörper, Enzyme	34
2.1.9	IL-3 ELISA	34
2.1.10	Analyse- und Bearbeitungsprogramme	35
2.2	Methoden	35
2.2.1	Patientenrekrutierung und Gewinnung des Probenmaterials	35
2.2.2	Gewinnung von peripheren mononukleären Zellen aus Vollblut	36
2.2.3	Plasmagewinnung.....	37
2.2.4	Durchflusszytometrie	37
2.2.5	Extrazelluläre FACS-Färbung.....	38
2.2.6	Bestimmung der Zellzahlen.....	39
2.2.7	Zellkultur	40
2.2.8	Intrazelluläre FACS-Färbung	41
2.2.9	Stimulation der Vollblutproben und Überstand-Gewinnung	42
2.2.10	ELISA.....	43
3	Ergebnisse	46
3.1.	Systemischer Lupus erythematoses.....	46
3.1.1	Basischarakteristika der SLE Patienten.....	46
3.1.2	Immunphänotypisierung der T-Zellen bei SLE	47
3.1.3	Immunphänotypisierung der Monozyten bei SLE	49
3.1.4	Zytokin-Produktion im Zellkultur-Überstand von SLE Patienten	51
3.1.5	CD4 ⁺ T-Zellen als potentielle Quelle immunregulatorischer Zytokine bei SLE	53
3.1.6	CD8 ⁺ T-Zellen als potentielle Quelle immunregulatorischer Zytokine bei SLE	55
3.1.7	Regulation des IL-3 Rezeptors auf Basophilen Granulozyten und plasmazytoiden Dendritischen Zellen bei SLE	57
3.2	Psoriasisarthritis.....	61
3.2.1	Basischarakteristika der PsA Patienten	61
3.2.2	Zytokin-Produktion im Zellkultur-Überstand von PsA Patienten.....	63
3.2.3	CD4 ⁺ T-Zellen als potentielle Quelle immunregulatorischer Zytokine bei PsA	65
3.2.4	CD8 ⁺ T-Zellen als potentielle Quelle immunregulatorischer Zytokine bei PsA	67

3.2.5	Regulation des IL-3 Rezeptors auf Basophilen Granulozyten und plasmazytoiden Dendritischen Zellen bei PsA.....	69
3.3	Granulomatose mit Polyangiitis	71
3.3.1	Basischarakteristika der GPA Patienten.....	71
3.3.2	Zytokin-Produktion im Zellkultur-Überstand von GPA Patienten	72
3.3.3	CD4 ⁺ T-Zellen als potentielle Quelle immunregulatorischer Zytokine bei GPA	73
3.3.4	CD8 ⁺ T-Zellen als potentielle Quelle immunregulatorischer Zytokine bei GPA	75
4	Diskussion	77
4.1	Steigende IL-3 Produktion mit zunehmender Krankheitsaktivität bei SLE, PsA und GPA.....	77
4.2	IL-3 Produktion durch T-Zellen bei SLE, PsA und GPA.....	78
4.3	Regulation der IL-3 Rezeptor β -Kette auf Basophilen Granulozyten und plasmazytoiden Dendritischen Zellen bei SLE und PsA.....	79
4.4	Weitere immunregulatorische Zytokine bei SLE, PsA und GPA	80
4.5	Steigende HLA-DR Expression auf T-Zellen mit zunehmender Krankheitsaktivität bei SLE.....	83
4.6	Steigende Siglec-1 Expression auf Monozyten mit zunehmender Krankheitsaktivität bei SLE.....	84
5	Zusammenfassung.....	87
6	Anhang	89
6.1	Tabellenverzeichnis	89
6.2	Abbildungsverzeichnis	89
7	Literaturverzeichnis.....	91
8	Danksagung	
9	Eidesstattliche Erklärung	

Abkürzungsverzeichnis

AAV	ANCA-assoziierte Vaskulitiden
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANA	Anti-nuclear Antibody
ANCA	Anti-neutrophil cytoplasmatic Antibody
APC	Allophycocyanin
BAFF	B-Zell Aktivierungs-Faktor
BLyS	B-Lymphozyten Stimulator
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
CIA	Collagen-induced Arthritis
CNS	Central Nervous System
CRP	C-reaktives Protein
Cy	Cyanin
DAS	Disease Activity Score
DMARDs	Disease modifying antirheumatic Drugs
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
ESR	Erythrocyte Sedimentation Rate (=Blutsenkungsgeschwindigkeit)
FACS	Fluorescence activated Cell Sorting (=Durchflussszytometrie)
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony stimulating Factor
GPA	Granulomatose mit Polyangiitis
HLA	Humane Leukozytenantigene
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen-DR Isotyp
HRP	Horseradish Peroxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IU	International Unit
kDa	Kilodalton
LN	Lupusnephritis
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MOPC	Mouse IGg1 Isotype Control
MPO	Myeloperoxidase
MS	Multiple Sklerose
MTX	Methotrexat
NaCl	Natriumchlorid
NSAIDs	Nichtsteroidale Antirheumatika (Non-steroidal anti-inflammatory Drugs)
PBMC	Peripheral Blood mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
pDCs	plasmazytoide Dendritische Zellen
PE	Phycoerythrin

PR3	Proteinase 3
PsA	Psoriasisarthritis
RA	Rheumatoide Arthritis
rpm	Revolutions per Minute (=Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Siglec-1	Sialic acid-binding Immunoglobulin-like Lectin 1
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SLEDAI	SLE Disease Activity Index
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
Tab.	Tabelle
T _h	T-Helferzelle
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
VAS	Visuelle Analog Skala
WHO	World Health Organization

Gender Erklärung: Aus Gründen der vereinfachten Lesbarkeit wird in dieser Doktorarbeit auf eine geschlechtsneutrale Formulierung verzichtet. Sämtliche männliche Schreibweisen gelten gleichermaßen für alle Geschlechter.

1 Einleitung

1.1 Systemischer Lupus erythematoses

1.1.1 Definition und Epidemiologie des Systemischen Lupus erythematoses

Der Systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine komplexe, chronische Autoimmunerkrankung aus dem rheumatologischen Formenkreis (1, 2). Er wird den Kollagenosen zugeordnet und ist durch die Produktion von Autoantikörpern gegen Zellkernbestandteile (ANAs= Anti-nuclear-Antibodys), die Aktivierung des Komplementsystems sowie die Ablagerung von Immunkomplexen charakterisiert. Dies führt zur Entwicklung gewebeschädigender Entzündungen und ist prinzipiell in allen Organen des Körpers möglich, was die vielfältigen klinischen Manifestationen erklärt. Zu den typischen Symptomen gehören Arthralgien und Hautmanifestationen, wie das Schmetterlingserythem. Klassischerweise verläuft der SLE in Schüben und Remissionen, wobei als wichtigster Prognosefaktor für den Erkrankungsverlauf die Nierenbeteiligung gilt (3–5).

Die Prävalenz des SLE schwankt zwischen 20-70 Erkrankten pro 100.000 Einwohner. Im Jahr 2002 waren es in Deutschland 36,7 Patienten pro 100.000. Die Inzidenz beträgt 1-10/100.000 Personen pro Jahr. Die Zahl der Neuerkrankten im Jahr 2002 belief sich auf circa 30.000 (2, 6). In der Geschlechterverteilung der Betroffenen zeigt sich eine klare Dominanz bei Frauen. Es erkranken vor allem junge Frauen im gebärfähigen Alter. Der Altersgipfel für erstdiagnostizierte Frauen liegt bei 15-44 Jahren. Man spricht von 80-90% Frauenanteil unter den Patienten, die Frau-Mann-Ratio im gebärfähigen Alter liegt laut *Danchenko et al.* sogar bei 12:1 (7, 8).

Auch in der Ethnizität zeigen sich große Differenzen. Der SLE kommt in der afroamerikanischen und asiatischen Bevölkerung 2-4 Mal häufiger vor als bei Kaukasiern. Die Erkrankung weist auch abstammungsbedingte Unterschiede in der phänotypischen Expression auf. Das lässt auf eine Beteiligung von Genetik und Umweltfaktoren an der Pathogenese schließen. Die 5-Jahres Überlebensrate liegt bei circa 90% (2, 7).

1.1.2 Pathogenese des SLE

Die Hintergründe der Ätiologie des SLE sind nicht vollständig geklärt. Man nimmt jedoch eine multifaktorielle und hochkomplexe Genese der Autoimmunerkrankung an. Zu den beteiligten Faktoren gehören genetische Prädisposition und Störungen im angeborenen und erworbenen Immunsystem im Setting von beeinflussenden Umweltfaktoren wie Sonnenlichtexposition oder Infektionen (7, 9).

Der immunologischen Dysregulation beim SLE liegt der Verlust der Selbsttoleranz zu Grunde. Verschiedene Stimuli wie beispielsweise UV-Strahlung bei Keratinozyten treiben Zellen in Apoptose, wodurch nukleare Antigene freigesetzt werden. Die Clearance dieser apoptotischen Zellen ist bei an SLE Erkrankten gestört, sodass Zelltrümmer nur unzureichend entfernt werden (10, 11). Eine Hypothese besagt, dass Immunzellen die Zellkernbestandteile als Viruspartikel interpretieren und eine autoimmune Entzündungsreaktion in Gang setzen (12). Autoantikörper binden die aus dem Zellkern freigesetzten Antigene und bilden so Immunkomplexe, die im Körper zirkulieren und sich potentiell in jedem Gewebe ablagern können. Dadurch wird eine lokale Entzündungsreaktion ausgelöst, die die Organe ernsthaft schädigen kann (3, 13).

In Studien wurden laut *Choi et al.* rund 30 verschiedene Genloki identifiziert, die an der Pathogenese des SLE beteiligt sein können (14). Darunter sind beispielsweise HLA (Humane Leukozytenantigene) Klasse II Gene, ITGAM (Integrin Subunit Alpha M), welches mit Oberflächenproteinen auf Leukozyten assoziiert ist, sowie Gene, die für den Komplementfaktor C1q kodieren. Der SLE weist außerdem eine starke familiäre Konkordanz auf (3, 15).

An der generierten Immunantwort und der aberranten polyklonalen Autoimmunität wirken besonders plasmazytoide Dendritische Zellen (pDCs), T-Helfer-Zellen (T_H -Zellen), B-Zellen und Plasmazellen mit (16). Außerdem weisen Lupus Patienten ein spezifisches Expressionsmuster für Zytokine auf. Die dysregulierte Zytokinproduktion führt zu erhöhten Werten für IFN α (Interferon- α), IFN γ , IL-6 (Interleukin-6), IL-10, IL-17 und IL-21 sowie zu verminderten IL-2 Konzentrationen im Patientenserum. Die gesteigerte Freisetzung von IL-6 und IFN α ist dabei mit der Krankheitsaktivität assoziiert (3, 17). In den letzten Jahren konnte der IFN Typ 1 Zytokin-Familie und insbesondere dem Vertreter IFN α eine solch bedeutende Rolle in der Pathogenese nachgewiesen werden, dass man heute von einer „IFN α Signatur“ spricht (18). Die T-Zellen von SLE Patienten zeigen einen spezifischen und dysfunktionalen Phänotyp. Einerseits aktivieren sie die B-Zellen zu einer vermehrten Antikörperproduktion,

weisen jedoch andererseits gleichzeitig eine verminderte zytotoxische und regulatorische Funktion auf (19). Besonders die T_h-Zellen haben Einfluss auf die Immunantwort. CD4⁺ T_h1-Zellen setzen proinflammatorische Mediatoren wie IFN γ frei, wodurch mehr Immunzellen angelockt werden. T_h2-Zellen sind am Isotyp Switch von Antikörpern (AK) und somit an der Produktion hochaffiner autoantigener ANAs beteiligt. T_h17-Zellen setzen IL-17 frei, was neben der Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten und Monozyten auch die Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von B-Zellen unterstützt (3, 20). Des Weiteren können im Serum der Lupus Patienten erhöhte Level des B-Zell-Surviving-Faktors BLYS (B-Lymphozyten Stimulator), auch als BAFF (B-Zell-Aktivierungs-Faktor) bezeichnet, nachgewiesen werden. BLYS ist ein Ligand der TNF-Familie (Tumornekrosefaktor-Familie) und wichtig für die B-Zell Homöostase. Hohe Werte des Faktors sorgen für eine verminderte B-Zell Selektion. Dadurch können große Mengen der Antikörper produziert werden, was Exazerbationen im Erkrankungsverlauf auslösen kann (21). Das vermehrte Aufkommen von BAFF geht mit einer erhöhten Krankheitsaktivität einher (22).

Zu den bereits erwähnten Umweltfaktoren, die Einfluss auf die Pathogenese des SLE haben, gehören unter anderem der sozioökonomische Status und die Ethnizität des Patienten (2), Nikotinkonsum (9), die Exposition von Silicium-Oxiden, Quecksilber und Pestiziden sowie Infektionen mit beispielsweise dem Epstein-Barr-Virus (8). Die klare weibliche Prädominanz in der Geschlechterverteilung der SLE Patienten (siehe 1.1.1.) macht einen Einfluss von Geschlechtshormonen wie Östrogen wahrscheinlich (23). Für einige Medikamente wurde eine Assoziation mit SLE nachgewiesen. Ibuprofen, östrogenhaltige Kontrazeptiva und andere Präparate können den bestehenden Lupus exazerbieren (24). Der Medikamenten-induzierte SLE ist vor allem auf die Einnahme des Antihypertensivums Hydralazin und des Antiarrhythmikums Procainamid zurückzuführen (25).

Amital et al. wiesen in ihren Untersuchungen einen signifikanten, inversen Zusammenhang der SLE Aktivität mit den Vitamin-D Konzentrationen im Patientenblut nach. Dies lässt eine Beteiligung der Vitamin-D Insuffizienz an der Pathogenese vermuten (26). Unterstützt wird diese These durch die nachgewiesenen Effekte auf das Immunsystem, die das Vitamin aufweist. Zu diesen zählen die verminderte Expression von T_h-Zellen und Zytokinen, die Inhibition Dendritischer Zellen sowie die Verhinderung der B-Zell Proliferation (27).

1.1.3 Klinik des SLE

Der SLE präsentiert sich klinisch zunächst mit den typischen Allgemeinsymptomen einer Autoimmunerkrankung wie Müdigkeit, Fieber und ungewolltem Gewichtsverlust (28). In 64-91% der Fälle weisen Lupus Patienten Arthritiden auf, wobei besonders die kleinen Gelenke der Hände und Handgelenke betroffen sind. Die Arthritiden beim Lupus sind typischerweise symmetrisch und nicht destruktiv (28, 29). Andere muskuloskelettale Manifestationen sind Myalgien und Tendovaginitiden. Bei circa drei Viertel der Erkrankten kommt es zu Hautirritationen wie dem typischen Schmetterlingserythem, das sich symmetrisch über Nase und Wangen ausbreitet, Alopezie oder Photosensitivität. Sehr häufig ist außerdem die Beteiligung der Nieren, die sogenannte Lupusnephritis (siehe 1.1.4.). Betroffen ist oftmals auch das zentrale Nervensystem, was sich durch eher unspezifische Symptome wie Kopfschmerzen, kognitive Defizite oder epileptische Anfälle äußert. Eine Beteiligung des kardiovaskulären Systems kann sich in Form der Lupus-typischen Libman-Sachs-Endokarditis, Perikarditiden oder arteriosklerotischen Gefäßveränderungen zeigen. Weitere häufige Symptome beim SLE sind das Raynaud-Syndrom, Pleuritiden und hämatologische Beschwerden wie Anämien (1, 29, 30). Auch zerebrovaskuläre Manifestationen, darunter Schlaganfälle und Sinusvenenthrombosen, sind nicht untypisch (31).

Eine schwere Komplikation des SLE ist die Entwicklung eines sekundären Antiphospholipidsyndroms. Dabei kommt es zu venösen und arteriellen Thrombosen sowie habituellen Aborten. Für das Syndrom typische Antikörper sind das Lupus Antikoagulanz, Anti-Cardiolipin-AK sowie Anti- β 2-Glykoprotein-AK (32). Schwangere Patientinnen haben ein höheres Risiko für Präeklampsie und Frühgeburtlichkeit (8). Da die IgG-Antikörper transplazentar auf den Fötus übertragen werden, kann es bei Neugeborenen zum sogenannten neonatalen Lupus erythematoses kommen. Sie weisen die Lupus-typische Dermatitis auf, in schweren Fällen kann es auch zum kongenitalen Herzblock kommen (33).

Zur Diagnosestellung werden häufig zwei Klassifikationssysteme verwendet. Nach dem American College of Rheumatology müssen 4 von 11 Kriterien für die Diagnose SLE erfüllt sein. Da hierbei jedoch nicht die Antikörper analysiert werden, kommt es häufig zu Überschätzungen. Deshalb werden gleichzeitig oft die Klassifikationskriterien der SLICC (Systemic Lupus international collaborating Clinics) angewandt (30, 34).

Zu den Autoantikörpern beim SLE gehören neben den ANAs auch Anti-ds-DNA-AK, Anti-ss-DNA-AK, Antikörper gegen Histone und Nukleosomen sowie Anti-Sm-AK, Anti-RNP-AK und Anti-C1q-AK. Um ein sekundäres Sjögren-Syndrom auszuschließen, werden zudem

die Anti-SSA/Ro-AK und Anti-SSB/La-AK bestimmt (35). Weitere für den Lupus typische Laborwerte sind ein normwertiges CRP, ein erhöhtes Erythrozyten-Sediment, Zytopenien sowie erniedrigte Komplementfaktoren C3 und C4 (28, 30).

Ebenfalls wichtig ist die Überwachung der Vitamin D Konzentration im Blut. Zahlreiche Studien haben belegt, dass diese bei SLE Patienten trotz Supplementierung häufig insuffizient ist. Betroffenen wird von übermäßiger UV-Exposition abgeraten, da diese als potentieller Trigger für einen Schub gilt. Nachdem die Vitamin D Defizienz mit Risikofaktoren wie Osteoporose einhergeht, sollten die Spiegel regelmäßig gemessen und bei Bedarf ausgeglichen werden (36–38).

Für eine genaue Erfassung der Krankheitsaktivität stehen verschiedene standardisierte Messverfahren zur Verfügung. Dabei werden zahlreiche klinische und laboranalytische Parameter abgefragt, die mit entsprechenden Punkten unterschiedlich bewertet werden. Die erreichte Gesamtpunktzahl ergibt einen bestimmten Score. Die folgende Tabelle listet die am häufigsten verwendeten Systeme (28, 39).

BILAG	British Isles Lupus Assessment Group Index
ECLAM	European Consensus Lupus Activity Measurement
SLAM	Systemic Lupus Activity Measure Index
SLEDAI	Systemic Lupus erythematosus Disease Activity Index
SLICC/ACR	Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ American College of Rheumatology Damage Index

Tabelle 1: Scoring Systeme zur Erfassung der Krankheitsaktivität beim SLE

1.1.4 Lupusnephritis

Rund 40-80% der SLE Patienten entwickeln im Verlauf eine Beteiligung der Nieren. Die Lupusnephritis (LN) trägt entscheidend zur Morbidität und Mortalität der Betroffenen bei (40, 41). In einem Drittel der Fälle kommt es zum Verlust einer Niere (42). Zirkulierende Immunkomplexe lagern sich in den Gefäßmembranen der Glomeruli ab und aktivieren das Komplementsystem. Sie setzen die autoimmune Entzündungsreaktion in Gang und es kommt zur Schädigung des Gewebes (3). Dabei sind besonders häufig Komplexe aus Anti-dsDNA-AK, die an Nukleosomen gebunden haben (43). Für Anti-Nukleosomen-AK und auch Anti-C1q-AK wurde eine starke Assoziation mit der Krankheitsaktivität bestätigt, weshalb die Nutzung dieser als serologische Marker für die Progression des SLE diskutiert wird (44). Eine

andere Theorie postuliert die Kreuzreaktion der Autoantikörper mit bestimmten Proteinen in der Niere wie beispielsweise α -Actinin, welches für die Aufrechterhaltung der Podozyten Funktion wichtig ist. Diese Reaktion soll einen direkten Schaden auf die renalen Zellen ausüben (45).

Die Lupusnephritis zeigt sich anhand folgender Symptome (35):

Klinisches Symptom der LN	Häufigkeit in %
Proteinurie	100
Nephrotisches Syndrom	45-65
Erythrozytenzylinder	10
Mikroskopische Hämaturie	80
Makroskopische Hämaturie	1-2
Reduzierte Nierenfunktion	40-80
Akutes Nierenversagen	1-2
Hypertension	15-50
Hyperkaliämie	15

Tabelle 2: Klinik der Lupusnephritis

Um die Lupusnephritis frühzeitig diagnostizieren zu können, sollte routinemäßig die Untersuchung des Serum-Kreatinin-Wertes, des Urinstatus, des Urinsediments, des 24-Stunden-Sammelurins sowie der Kreatinin-Clearance erfolgen (30, 35). Eine Biopsie ist im Falle einer Nierenbeteiligung unumgänglich, um den histologischen Grad der Lupusnephritis genau bestimmen zu können. Dieser ist entscheidend für das Therapiekonzept (41). Die Lupusnephritis betrifft besonders die Glomeruli. Es kann zu mesangialer Hyperzellularität, Destruktion der Kapillärwände sowie Halbmondbildung kommen. Die WHO teilt die Lupusnephritis in sechs Klassen ein. Die International Society of Nephrology und die Renal Pathology Society (ISN/RSP) haben die WHO-Klassifikation mittlerweile aktualisiert (46).

Klasse	Beschreibung
I	Minimale mesangiale LN
II	Mesangial proliferative LN
III	Fokale LN
IV	Diffus segmentale oder globale LN
V	Membranöse LN
VI	Fortgeschritten sklerosierende LN

Tabelle 3: ISN/RSP Klassifikation der Lupusnephritis

1.1.5 Therapie des SLE

Um irreversible Organschäden zu verhindern, ist eine schnelle und gezielte Therapieeinleitung beim SLE unerlässlich. Die Behandlung wird meist mit nicht-steroidalen anti-inflammatorischen Medikamenten (NSAIDs= non-steroidal anti-inflammatory Drugs) sowie Glucocorticoiden begonnen. Außerdem kommen zur Induktionstherapie die Antimalariamittel Chloroquin bzw. Hydroxychloroquin hinzu. In schweren Fällen mit Organbeteiligung, bei Nichtansprechen auf die genannten Mittel oder aber wenn die Dosis der Steroide nicht ausreichend ausgeschlichen werden kann, kommen unspezifische Immunsuppressiva wie Azathioprin, Cyclophosphamid, Mycophenolat-Mofetil, Tacrolimus und Ähnliche zum Einsatz (3, 30). Die Mehrzahl dieser Medikamente greift in den Zyklus der Zellteilung ein und wirkt so zytotoxisch (9). Durch Corticosteroide lässt sich die Krankheitsaktivität bei milden Verläufen gut kontrollieren. Aufgrund der teils schweren Nebenwirkungen wie der Osteoporose ist die Langzeitanwendung als Erhaltungstherapie jedoch kritisch zu betrachten (47). Chloroquine bewirken die Erhöhung des pH-Wertes in intrazellulären Vakuolen und die posttranslationale Modifizierung von Proteinen im Golgi-Apparat. Dadurch wird die Präsentation von Peptiden über MHC II Komplexe inhibiert, was die Immunreaktion auf autoantigene Proteine vermindert (48). Die Antimalariamittel verhindern Krankheitsschübe und wirken sich positiv auf das Langzeitüberleben der Patienten aus. Außerdem schützen sie in gewissem Maße vor dauerhaften Organschäden und thrombotischen Ereignissen. Es wird empfohlen, jeden Patient unabhängig von der Krankheitsschwere langfristig mit Chloroquinen zu behandeln (49).

Durch umfassende Forschungen und ein immer höheres Verständnis der Ätiopathogenese des SLE ergeben sich neue Ansatzpunkte für Medikamente, insbesondere Biologika. Diese können zielgerichteter und spezifischer wirken als die meisten bisher eingesetzten Präparate

(50). Sie richten sich gegen einzelne Zytokine wie IL-6, Tumor-Nekrose-Faktoren oder Interferone und inhibieren T- und B-Zellen (51). Ein Antikörper, der in zwei randomisiert kontrollierten Studien bereits vielversprechende Ergebnisse erzielte und von der FDA (Food and Drug Administration) und der European Medicines Agency für die Therapie des Lupus zugelassen wurde, ist Belimumab (52). Es handelt sich dabei um einen monoklonalen Antikörper gegen BLyS. Er bindet mit hoher Affinität und wirkt depletierend auf B-Zellen (53). Belimumab verringert signifikant die Level an Autoantikörpern, die Häufigkeit von Krankheitsschüben sowie die erforderliche Dosis an Corticosteroiden (54, 55).

Ebenfalls richtungsweisend ist die Entwicklung von Janus-Kinase-Inhibitoren (JAK-Inhibitoren) wie Tofacitinib. Diese fanden ursprünglich Einsatz in der Hämatookologie, werden jetzt allerdings auch für die Therapie rheumatologischer Erkrankungen wie dem SLE getestet (56, 57).

Wichtig ist zudem die Therapie der Komorbiditäten, die mit dem Lupus einhergehen. Ein sekundäres Antiphospholipidsyndrom benötigt aufgrund des Risikos für thrombotische Ereignisse eine antikoagulatorische Behandlung. Um das Risiko einer Osteoporose zu verringern und die Homöostase der Knochen aufrecht zu erhalten, sollten die Patienten mit Calcium, Vitamin D und eventuell Bisphosphonaten therapiert werden (30, 38).

1.2 Psoriasis-Arthritis

1.2.1 Definition und Epidemiologie der Psoriasis-Arthritis

Die Psoriasis-Arthritis (PsA) stellt sich als progressive Gelenkentzündung dar, die besonders Hände, Füße und Wirbelsäule betrifft. Gleichzeitig leiden die Patienten an der entzündlichen Hauterkrankung Psoriasis vulgaris. Es handelt sich bei der PsA um eine chronische, immunvermittelte Erkrankung, bei der häufig Rezidive auftreten. Ohne adäquate Therapie kann es zu schwerwiegenden Verläufen kommen, die die betroffenen Gelenke irreversibel deformieren und destruieren. Im Unterschied zur Rheumatoiden Arthritis, bei der es sich ebenso um eine entzündliche Gelenkerkrankung handelt, sind die Rheumafaktoren im Blut der PsA Patienten meist negativ (58, 59). Frauen und Männer erkranken gleich häufig an der PsA. Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 30. und 55. Lebensjahr (60). Die ersten Symptome der PsA sind oftmals unspezifisch. Zudem findet die Weitervermittlung von Psoriasispatienten, die erste Anzeichen einer Gelenkbeteiligung aufweisen, an die Rheumatologie häufig verzögert statt. Deswegen erweist sich die Diagnosestellung immer

noch als schwierig und es wird von einer hohen Dunkelziffer ausgegangen (60). Die Datenlage zur Epidemiologie der PsA ist deshalb lückenhaft und sehr variabel. Nach *Gladman et al.* weisen 2-3% aller Menschen entzündliche Arthritiden auf, unter Psoriasispatienten seien es 6-42% (61). Andere Studien beschreiben, dass circa ein Fünftel aller Menschen mit Psoriasis auch an Psoriasisarthritis leidet (62). In der Gesamtbevölkerung wird laut *Gladman et al.* eine Prävalenz der PsA von 1% angenommen (61). *McArdle, Pennington und FitzGerald* berichten von nur 0,25% Betroffenen (63). Bezüglich der Inzidenz werden Zahlen zwischen 3,4 und 8/100.000 berichtet, wobei man hier von Unterschätzungen ausgeht (61).

1.2.2 Pathogenese der PsA

Auch die exakte Pathogenese der PsA ist bis heute nicht abschließend erforscht. Beteiligt sind genetische und immunologische Faktoren sowie verschiedene Umwelteinflüsse, die auf unterschiedliche Weise zur Krankheitsentstehung beitragen (64). Man vermutet, dass die PsA durch einen noch unbekannten Umweltfaktor getriggert wird, der in genetischen prädisponierten Patienten zur Entwicklung einer autoimmunen Entzündungsantwort führt (65).

Mehrere Faktoren wurden identifiziert, die zur Krankheitsentstehung beitragen können. Positive Assoziationen wurden nachgewiesen für die Rötelnimpfung, rezidivierende orale Ulzerationen, bestimmte Infektionen, unter anderem auch HIV (Humanes Immundefizienz-Virus), sowie für Verletzungen und Knochenbrüche, die eine Behandlung im Krankenhaus erforderten. Dabei wies ein vorausgegangenes Trauma die stärkste Verknüpfung mit der Entwicklung der PsA auf (66, 67). Auch Adipositas stellt einen Risikofaktor dar. Dies hängt vermutlich mit den erhöhten Werten von inflammatorischen Zytokinen zusammen, die übergewichtige Menschen ebenso wie Psoriasis Patienten aufweisen (68). Bei PsA Erkrankten konnte eine erhöhte Prävalenz von einer Reihe weiterer Merkmale wie dem metabolischen Syndrom, Diabetes mellitus, Dyslipidämie und Hypertension festgestellt werden. Das lässt eine Beteiligung auch dieser Faktoren an der Krankheitsentstehung vermuten (59).

In mehreren Familien- und Zwillingsstudien wurde eine starke genetische Suszeptibilität für die PsA nachgewiesen (67). Eine positive Familienanamnese stellt vor allem bei Verwandten ersten Grades einen eindeutigen Risikofaktor dar (69). Nach *FitzGerald et al.* weisen 15% der Familienmitglieder eines Indexpatienten mit PsA dieselbe Diagnose auf. 30-45% sind an einer

Psoriasis erkrankt (70). Bislang konnte noch kein PsA spezifisches Antigen bzw. Autoantikörper identifiziert werden. Allerdings wurden einige Gene entdeckt, die für die autoinflammatorische Immunantwort kodieren (64). Dazu gehören besonders die HLAs der Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) der Klasse 1. Dabei spielen vor allem HLA-B*27 und HLA-Cw0602 als genetische Risikofaktoren eine wichtige Rolle. Sie sind mit bestimmten Phänotypen der Erkrankung assoziiert (61, 69–71). Eine Hypothese lautet, dass die Gene durch Mikrotraumata an Entesen, also den Ansatzbereichen von Sehnen und Bändern am Knochen, oder durch Dysbiose der Haut oder Schädigung der Keratinozyten aktiviert werden. Sie kodieren für bestimmte Peptide, auf die wiederum das Immunsystem z.B. in Form von Angiogenese, T-Zell Infiltration und Zytokinfreisetzung reagiert. Diese Immunantwort führt letztlich zur Entstehung von Enthesitis, Synovitis und einer veränderten Knochen-Homöostase (64, 70–72).

In betroffenen Haut- und Gelenkbiopsien lassen sich vor allem lymphozytäre Infiltrate aktivierter $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen identifizieren (73). Im Synovialgewebe und der Gelenkflüssigkeit finden sich vor allem klonal exprimierte $CD8^+$ T-Zellen (70). Außerdem weisen die Gewebeproben erhöhte Werte inflammatorischer Zytokine wie beispielsweise $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 oder IL-18 auf. Viele dieser Zytokine sorgen für eine Hochregulierung von Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen, die daraufhin die Einwanderung weiterer Immunzellen in das entzündete Gewebe initiieren (71, 74). Einige Zytokine wie $TNF\alpha$ und IL-1 β bedingen die vermehrte Produktion von Matrix-Metalloproteinasen durch Makrophagen. Diese führen zu Zerstörung des Gelenkknorpels und überschießender Vaskularisierung. TNFs sind außerdem an der Differenzierung osteoklastischer Vorläuferzellen, der Infiltration ausgereifter Osteoklasten in entzündetes Gewebe und somit auch an der Zerstörung des Knochens beteiligt (71).

Eine weitere wichtige Rolle in der Pathogenese der PsA nimmt die $T_H17/IL-23$ Achse des erworbenen Immunsystems ein. Die im Jahr 2005 entdeckten T_H17 -Zellen scheinen eine Schlüsselrolle in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zu spielen. Dendritische Zellen in der erkrankten Haut produzieren IL-23. Dadurch werden T_H17 -Zellen zur Produktion von IL-17 angeregt. Dies wiederum hat diverse proinflammatorische Effekte wie die Freisetzung von IL-12 und anderen Zytokinen, welche wiederum T_H1 -Zellen und weitere Immunzellen stimulieren und rekrutieren. So wird die Progression der Autoimmunerkrankung vorangetrieben (74–76). SNPs (Single Nucleotid Polymorphismen) in den Genen IL-23R und IL-12B, welches für eine Untereinheit des Liganden des IL-23 Rezeptors kodiert, werden mit der Prädisposition der Psoriasis und auch der PsA assoziiert (65, 75).

Der genaue Zusammenhang der Gelenkbeteiligung und der Hauterkrankung ist bislang unklar (77). Ein erhöhtes Risiko für die Entstehung der PsA bei vorbestehender Psoriasis stellen die Beteiligung der Nägel mit Onycholyse und der Befall der Kopfhaut sowie der Haut der Interoglutealfalte dar. Das Risiko ist ebenfalls höher, je größer die betroffenen Hautareale sind (69).

1.2.3 Klinik der PsA

Die peripheren Arthritiden äußern sich in Form von schmerzenden und steifen Gelenken. Häufig sind Finger und Zehen geschwollen und in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt. Wenn dabei jeweils der gesamte Strahl betroffen ist, spricht man von einer Daktylitis. Die Entzündung kann ebenfalls die Synovia, Sehnen und Entesen, befallen (58). Patienten leiden oftmals unter ausgeprägter Morgensteifigkeit, die länger als 30 Minuten anhalten kann, sich aber durch Bewegung verringert (62). Die Gelenkentzündungen können sehr unterschiedliche Befallsmuster aufweisen. Neben distaler Arthritis, asymmetrischer Oligoarthritis, symmetrischer Polyarthritis und Spondyloarthritis, können auch Ossifikationen, Osteolysen sowie Mischformen auftreten (69). In besonders schweren Fällen kann es durch die Knochenresorption zur Verkürzung der Finger oder sogar zur Entstehung der sogenannten „Teleskopfinger“ kommen. Durch die knöchernen Verwachsungen der Gelenke kann außerdem das Röntgenphänomen „Pencil-in-cup“ entstehen (61). Dabei trifft die osteolytisch zugespitzte Phalanx media auf die destruktiv erweiterte Gelenkfläche der distalen Phalanx, was dem Bild eines Stifts, der in einer Tasse liegt, ähnelt. Auf den psoriatisch betroffenen Hautarealen zeigen sich scharf begrenzte erythematöse Plaques mit weißlicher Schuppung. Prädisloktionsstellen sind hier die Streckseiten der Extremitäten, Ellbeugen, Knie, die behaarte Kopfhaut sowie die Lumbosakralgegend (78). Häufig sind davon auch die Finger- und Fußnägel betroffen. Weitere extraartikuläre Manifestationen der PsA sind beispielsweise Uveitiden (58). Hinzu kommen unspezifische Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit und Leistungsminderung. Die physischen Einschränkungen haben oftmals auch Auswirkungen auf die psychische Verfassung der Betroffenen. Viele Patienten beklagen psychosoziale Belastungen, Arbeitsunfähigkeit und eine verminderte Lebensqualität (60). *Burden et al.* stellten in ihren Untersuchungen außerdem eine Assoziation zwischen schweren Formen der Psoriasisarthritis und einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Depression sowie Diabetes mellitus fest (62).

Um die Diagnose PsA stellen zu können, müssen nach den CASPAR Kriterien (Criteria of the **CLAS**sification of **P**soriatic **A**rthritis) zusätzlich zu einer entzündlichen muskuloskelettalen Erkrankung (Gelenke, Wirbelsäule oder Enthesen) mindestens drei Punkte der in der folgenden Tabelle dargestellten Symptome erfüllt sein.

Symptom	Punkte
Aktuelle Psoriasis	2
Psoriasis in der Anamnese	1
Psoriasis in der Familienanamnese	1
Nagelpsoriasis	1
Negative Testung auf Rheumafaktoren	1
Aktuelle Daktylitis	1
Daktylitis in der Anamnese	1
Radiologischer Hinweis auf juxtaartikuläre Ossifikationen	1

Tabelle 4: CASPAR Kriterien für die Diagnostik der PsA

Die CASPAR Kriterien haben dabei eine Spezifität von 98,7% und eine Sensitivität von 91,4% (58).

1.2.4 Therapie der PsA

Die Therapie der PsA erfolgt abhängig von der Schwere des Befundes. Bei gering ausgeprägten Arthralgien ohne objektivierbaren Nachweis einer Gelenkschwellung werden Bewegungstherapie und die Einnahme von NSAIDs empfohlen. Obwohl die Datenlage zur Effektivität dieser Medikamente bei der PsA unzureichend ist und man um die potentiell schädlichen Einflüsse auf Nieren und Gastrointestinaltrakt weiß, werden NSAIDs aufgrund guter klinischer Erfahrungen häufig eingesetzt (79). Einige Patienten profitieren zudem von den antientzündlichen Effekten durch Glucocorticoid-Injektionen in die betroffenen Gelenke. Auf eine Langzeitbehandlung mit oralen Glucocorticoiden sollte wegen des hohen Nebenwirkungspotenzials verzichtet werden (77).

Bei peripherer Arthritis oder Daktylitis kommen konventionelle krankheitsmodifizierende antirheumatische Medikamente (DMARDs= Disease modifying antirheumatic Drugs) als Basistherapie zum Einsatz (80). Hierzu zählen beispielsweise Methotrexat, das besonders bei

schwerer Hautbeteiligung verwendet wird, Sulfasalazin, Cyclosporin, Azathioprin und Leflunomid (62, 77). DMARDs können die Zerstörung der Gelenke reduzieren und die Gelenkfunktion und -integrität aufrechterhalten (58). Wenn durch die Gabe mindestens eines synthetischen DMARDs keine ausreichende Besserung erzielt wird, kann die Therapie durch ein biologisches DMARD ergänzt werden oder ein Biologikum als Monotherapie eingesetzt werden (80). Hierzu zählen TNF α -Inhibitoren, wie zum Beispiel Infliximab, Certolizumab, Adalimumab oder Etanercept (77). EULAR (European League against Rheumatism), GRAPPA (Group for Research and Assessment of Psoriasis and Psoriatic Arthritis) und die American Academy of Dermatology empfehlen diese bei mittlerer bis schwerer PsA, die vor allem die Wirbelsäule betrifft und bei Nichtansprechen auf DMARDs. TNF α -Inhibitoren beeinflussen das Immunsystem, indem sie die Aktivierung von T-Zellen und die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen durch T-Zellen und Makrophagen unterdrücken (58).

Außerdem kann mit Biologika, die gegen weitere Interleukine gerichtet sind, therapiert werden. Dabei werden besonders Ustekinumab und Secukinumab (IL-17A-Inhibitor) empfohlen (80). Ustekinumab ist ein humaner IgG1 κ -AK gegen IL-12 und IL-23. Diese Interleukine sind an der T_h1/T_h17 Immunantwort beteiligt. T_h17-Zellen werden durch IL-23 aktiviert, um IL-17 zu produzieren. Jenes aktiviert Dendritische Zellen, die IL-12 produzieren, um damit wiederum T_h1-Zellen zu stimulieren (75). Neuere Biologika, die gegen IL-23 gerichtet sind, sind Guselkumab und Risankizumab. Weitere Immunsuppressiva, mit denen die PsA therapiert werden kann, sind Abatacept, Apremilast und Tofacitinib (81). Bei Abatacept handelt es sich um ein Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne von CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Protein 4) und dem modifizierten Fc-Teil von humanem IgG1. Durch die kompetitive Bindung an die Zelloberflächenproteine CD80/CD86 wird der CD28 abhängige Weg zur Aktivierung von T-Zellen unterbunden. In der Folge werden weniger proinflammatorische Zytokine durch T-Lymphozyten freigesetzt (73). Apremilast ist ein Phosphodiesterase-4-Inhibitor, welcher die intrazelluläre Menge an cAMP (zyklisches Adenosin-Mono-Phosphat) erhöht. Dadurch wird die Produktion entzündlicher Proteine gehemmt und die Ausschüttung anti-inflammatorischer Proteine wie IL-10 erhöht (79).

Zur unterstützenden Behandlung der Psoriasis können topische Therapien wie Corticoid-Salben oder Salizylsäure-Präparate verwendet werden. Bei schweren Hautbefunden kann auch die Anwendung von Phototherapien mit Schmalband UVB-Licht oder UVA-Licht in Kombination mit Psoralen erwogen werden (62).

1.3 Granulomatose mit Polyangiitis

1.3.1 Definition und Epidemiologie der Granulomatose mit Polyangiitis

Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA), früher M. Wegener genannt, ist als eine nekrotisierende Vaskulitis der kleinen und mittelgroßen Gefäße definiert. Sie ist durch das Vorhandensein von Anti-Neutrophile-zytoplasmatischen Antikörpern (ANCA) gekennzeichnet (82). Die Erkrankung gehört, ebenso wie die Mikroskopische Polyangiitis und die Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis zur Gruppe der ANCA-assoziierten Vaskulitiden (AAV) (83). Die Inzidenz der GPA liegt in Deutschland bei ca. 6-12 Neuerkrankungen/Millionen pro Jahr (84) mit einem Häufigkeitsgipfel bei 64-75 Jahren. Die Erkrankung betrifft hauptsächlich hellhäutige Kaukasier, kann jedoch grundsätzlich bei Menschen aller Ethnien und aller Altersgruppen auftreten (85). Die Geschlechterverteilung der GPA ist zwischen Männern und Frauen ausgeglichen (86). Die Prävalenz der Vaskulitis unterscheidet sich je nach geographischer Lage. So kommt die GPA in Nordeuropa wesentlich häufiger vor, wobei die Mikroskopische Polyangiitis in den südlichen Ländern Europas öfter auftritt. Dies lässt vermuten, dass die Entstehung der Erkrankung unter anderem auf genetischen Dispositionen, die mit den spezifischen ethnischen Hintergründen der Betroffenen zusammenhängen, beruht (87).

1.3.2 Pathogenese der GPA

Die genaue Ätiologie der GPA ist bis heute unbekannt. Es wird jedoch eine multifaktoriell bedingte Pathogenese der Krankheit angenommen. Neben dem Einfluss der Genetik und verschiedener Umweltfaktoren spielen vor allem das angeborene und das erworbene Immunsystem eine wichtige Rolle. Ein Hauptcharakteristikum der Erkrankung und deshalb wegweisend in der Diagnosestellung, ist das Vorkommen von ANCA im Serum (87). Dabei erweisen sich 80-90% der Patienten als ANCA-positiv (82). Die Antikörper werden in primären Granula von Neutrophilen Granulozyten sowie in Lysosomen von Monozyten exprimiert. In den Granula der Neutrophilen befinden sich verschiedene antibakterielle Proteine. ANCA sind dabei vor allem gegen die Proteinase 3 (PR3) und die Myeloperoxidase (MPO) gerichtet. Bei der GPA kommen in drei Vierteln der Fälle PR3-ANCA vor, wohingegen MPO-ANCA häufiger bei den anderen Entitäten der AAVs zu finden sind (87). *Harper et al.* konnten in einer Studie eine Korrelation der Titer der ANCA im Serum von GPA Patienten mit der Krankheitsaktivität belegen (88). Die Antikörper werden als autoimmune Reaktion des Immunsystems auf vorher abgeschirmte Epitope anderer Proteine

in Neutrophilen Granulozyten gebildet (82). Der Gefäßschaden entsteht durch eine Interaktion von Neutrophilen, ANCAs und den Endothelzellen der Blutgefäße. Die durch proinflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel TNF α , bereits geprimten Neutrophilen und Monozyten exprimieren unter anderem die Antigene PR3 oder MPO auf ihrer Zelloberfläche. An diese binden die Autoantikörper. Die Antigene wiederum binden an entsprechende Rezeptoren auf Endothelzellen. Durch diese Bindung setzen die Granulozyten weitere proinflammatorische Zytokine sowie proteolytische Granula frei, wodurch die Endothelzellen geschädigt werden. Aber auch die Bindung von PR3 bzw. MPO an die Endothelzellen selbst kann in diesen den Apoptose-Prozess auslösen. Des Weiteren wird durch die ANCAs die normale Apoptose der Neutrophilen Granulozyten dysreguliert, was zur sekundären Nekrose der Zellen führt. Dies wiederum verstärkt den Inflamationsprozess und lässt mehr Entzündungszellen einwandern (88, 89).

Eine wichtige Rolle in der Entstehung der GPA wird auch den T-Lymphozyten beigemessen. In immunhistologischen Untersuchungen renaler und pulmonaler Infiltrate von GPA Patienten konnte eine große Zahl an CD4⁺ T-Zellen identifiziert werden. Dabei handelte es sich vornehmlich um T_H1-Zellen, die bekanntermaßen für die zellvermittelte Immunantwort verantwortlich sind (90). Auch B-Lymphozyten kamen vermehrt in entzündeten Gewebeproben vor und sind demnach mit an der Pathogenese der GPA beteiligt. Die Zahl der vorkommenden B-Zellen korreliert ebenfalls mit der Erkrankungsaktivität, wie *Guerry et al.* belegen konnten (91).

Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen der Entstehung von AAVs und verschiedenen Medikamenten bewiesen werden. Besonders das Thyreostatikum Propylthiouracil scheint einen Risikofaktor für GPA darzustellen. Weitere Medikamente sind beispielsweise Hydralazin, das Antibiotikum Cefotaxim oder das antientzündlich wirkende Sulfasalazin. Die Wirkstoffe treten offenbar in Interaktion mit den Immunzellen, die bei der Entstehung der GPA beteiligt sind, woraufhin ANCAs gebildet werden und der Autoimmun-Prozess in Gang gesetzt wird (92).

Ebenso auffällig war in Studien von *Geetha et al.* das gehäufte Vorkommen der GPA in den Wintermonaten. Auch die Exposition von Silikonstaub und Pestiziden stellt einen Risikofaktor für die Entstehung einer Vaskulitis dar. Die nasale Besiedlung mit dem Bakterium *Staphylococcus aureus* ist darüber hinaus assoziiert mit dem Auftreten von Rezidiven (87).

1.3.3 Klinik der GPA

Histomorphologisch charakterisierend für die GPA sind neben der Vaskulitis auch granulomatöse Entzündungen. Diese können umliegendes Gewebe infiltrieren und zerstören (93). Neben unspezifischen Allgemeinsymptomen wie Abgeschlagenheit und Fieber, fallen die Patienten initial oftmals mit chronischen Infektionen des oberen Respirationstraktes auf. Häufig sind dabei Rhinitiden, Sinusitiden oder Otitiden. Es kann zu Rhinorrhoe, Epistaxis und Tracheobronchitiden kommen. Die destruierende Entzündung führt in manchen Fällen zu Perforationen des Septums der Nase oder durch Einbruch ihres knorpeligen Gerüsts zur sogenannten „Sattelnase“ (87). Im späteren Verlauf können sich die Entzündungen generalisieren und auf die inneren Organe ausbreiten.

Mit 62% ist besonders häufig die Lunge betroffen. Dabei treten Symptome wie Husten, Hämoptysen oder Dyspnoe auf. Selten können sogar lebensbedrohliche alveoläre Hämorrhagien und Trachealstenosen vorkommen (89, 93). Es bilden sich Granulome, mikroskopische Ansammlungen von Entzündungszellen, wie Phagozyten oder Langerhans-Riesenzellen (88).

In 50% der Fälle kommt es zur Nierenbeteiligung, die sich meist in Form von nekrotisierenden intra- und extrakapillären Glomerulonephritiden mit Halbmondbildung äußert. Durch kapilläre Thrombosen kommt es zu segmentalen Nekrosen, Kapillarrupturen und Einblutungen in die Bowman-Membran. Die Glomeruli verlieren ihre Funktion, was sich durch Hämaturien sowie Proteinurien zeigt. 10-20% der Patienten entwickeln eine terminale Niereninsuffizienz (88, 93).

Die Generalisation der Entzündungen manifestiert sich außerdem häufig in Form von Gelenkbeschwerden wie Arthralgien und Arthritiden. Des Weiteren kann es zu ernsthaften Schädigungen der Augen durch Episkleritiden, Uveitiden und Optikusischämien kommen. Ebenso kann der Gastrointestinaltrakt durch auftretende Ischämien und Hämorrhagien beeinträchtigt werden. Herz, Haut und Nervensystem können ebenfalls betroffen sein (88, 89, 93).

1.3.4 Therapie der GPA

Bis zur Einführung des Medikaments Cyclophosphamid in den 1970er Jahren (89) war die GPA eine meist tödlich verlaufende Erkrankung. Durch die Entwicklung mehrstufiger Therapiestrategien konnte jedoch eine signifikante Verbesserung der Prognose erreicht werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt heute bei circa 78% (94). Weiterhin als problematisch anzusehen ist jedoch die therapiebedingte Toxizität. Diese äußert sich oftmals in Form von hämorrhagischen Zystitiden, Blasenkarzinomen, lymphoproliferativen oder myelodysplastischen Syndromen (94). Auch das Rezidivrisiko ist mit 25-50% in den ersten drei bis fünf Jahren relativ hoch (89), wobei Patienten mit MPO-ANCA seltener Rückfälle erleiden als Patienten mit PR3-ANCA (94). Die therapeutische Grundlage der GPA ist die Suppression des Immunsystems. Die Behandlung beinhaltet zwei Phasen. Die Induktionstherapie soll in erster Linie den Entzündungsprozess unterdrücken und die Schädigung des Gewebes aufhalten. Sie wird für drei bis sechs Monate durchgeführt. Zum Einsatz kommen hier Glucocorticoide sowie Cyclophosphamid oder der monoklonale Antikörper Rituximab, der gegen das Oberflächenprotein CD20 auf B-Lymphozyten gerichtet ist (95). Mehr als zwei Drittel aller Patienten erreichen dadurch das Stadium der Remission (91). Die Wahl der Präparate in der Induktionstherapie hängt davon ab, ob die GPA bereits Organfunktionen oder sogar das Überleben bedroht (83). Es folgt die Erhaltungstherapie für 24-48 Monate, die das Auftreten von Rezidiven verhindern soll (87). Hier wird mit Glucocorticoiden in niedrigerer Dosis sowie mit Azathioprin oder Methotrexat therapiert (91). Weitere Medikamente, die zur Remissionserhaltung eingesetzt werden, sind Mycophenolat-Mofetil und Leflunomid, welche die Synthese von Purinen bzw. Pyrimidinen inhibieren. Bei lebensbedrohlichen Erkrankungsstadien oder Intoleranz gegenüber einem Wirkstoff können auch die TNF-Inhibitoren Infliximab oder Etanercept angewendet werden (89). Eine weitere Therapiesäule stellt die Plasmapherese dar. Sie soll die Autoantikörper aus dem Blut der Patienten herausfiltern und so die Entstehung oder Rezidive von Glomerulonephritiden verhindern. Ebenso kann sie bei schwerer alveolärer Hämorrhagie zum Einsatz kommen (83). Bei Patienten, die ein Nierenversagen entwickelt haben, bleibt als Therapie der Wahl die Nierentransplantation, um die Lebensqualität zu steigern und das Gesamtüberleben zu sichern (87). Grundsätzlich muss in der Therapie der GPA jeder Patient individuell betrachtet werden. Der Einsatz und die Dosierung von Medikamenten sollte je nach Schwere der Erkrankung, Funktionseinschränkung lebenswichtiger Organe und dem Allgemeinzustand des Betroffenen sorgfältig abgewogen und angepasst werden.

1.4 Interleukin-3

1.4.1 Struktur und Funktion von IL-3

Interleukin-3 (IL-3) ist ein 20-26 kDa großes Glykoprotein, bestehend aus vier kurzen α -Helices, das aufgrund seiner stimulierenden Eigenschaften auf eine Vielzahl unterschiedlicher Zelllinien auch als Multi-CSF (Multi-Lineage Colony stimulating Factor) bezeichnet wird (96, 97). Zusammen mit GM-CSF (Granulozyte-Macrophage Colony-stimulating-Factor) und Interleukin-5 (IL-5) gehört IL-3 zu einer Gruppe hämatopoetischer Zytokine, welche die Differenzierung, die Aktivierung und die Migration multipotenter CD34⁺ Progenitorzellen des Knochenmarks induziert. Der Wachstumsfaktor fördert vor allem die Bildung von Effektorzellen der humoralen und zellvermittelten Immunität wie Makrophagen, Granulozyten, Lymphozyten und Dendritische Zellen (98). So ist das Interleukin an der Reaktion auf infektiöse und inflammatorische Stimuli beteiligt (99).

IL-3 wird überwiegend von CD4⁺ T-Lymphozyten gebildet. Bisher ist das Wissen über die Regulation der IL-3 Sekretion durch T-Zellen jedoch begrenzt (97). Außerdem sind Mastzellen zur Produktion des Zytokins fähig. Sie sezernieren IL-3 als Reaktion auf ihre IgE-Rezeptor vermittelte Aktivierung im Rahmen allergischer Stimuli (100). Aktivierte Basophile Granulozyten können, neben einer Reihe anderer Zytokine, ebenso IL-3 produzieren. Sie sind an vielen immunregulatorischen Funktionen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems beteiligt (101, 102). Im Mausmodell konnten außerdem aktivierte B-Zellen als Produzenten des Zytokins identifiziert werden (103).

IL-3 weist zahlreiche hämatopoetische und immunmodulatorische Effekte auf. So ist das Zytokin an der Differenzierung, dem Wachstum und dem Überleben von Basophilen Granulozyten und Mastzellen beteiligt (104, 105). Basophile Granulozyten werden durch die Bindung von IL-3 an den Oberflächenrezeptor CD123 (= α -Kette des IL-3 Rezeptors) aktiviert und sezernieren daraufhin Histamin sowie IL-4 (106–108). Die von Basophilen Granulozyten und Mastzellen freigesetzten Peptide sind mit der Immunantwort auf allergische Erkrankungen sowie parasitäre Infektionen assoziiert (109). Zudem beeinflusst IL-3 die Funktion von Monozyten und Makrophagen. Das Zytokin reguliert MHC Klasse II Moleküle auf diesen Zellen hoch und unterstützt dadurch die Präsentation von phagozytierten Antigenen auf der Zelloberfläche (97). Außerdem trägt IL-3 zusammen mit IL-4 und IFN γ zur Differenzierung von Monozyten zu Dendritischen Zellen bei (110, 111). Auf Lymphozyten wirkt IL-3 chemotaktisch, indem es die Zellmigration fördert (112). Das Interleukin aktiviert unreife B-Zellen und stimuliert sie in vitro zur Sekretion von

Immunglobulinen (113, 114). Ferner fördert IL-3 die Expression von P-Selektin auf Endothelzellen. Dieses ist maßgeblich an der transendothelialen Migration von Leukozyten beteiligt. Es vermittelt das Rollen der Zellen auf dem Endothel in vivo und die darauffolgende Adhäsion und Gewebeinfiltration in vitro (115).

Der IL-3 Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten. Die 70 kDa große α -Kette bindet das Zytokin mit niedriger Affinität. Die 120 kDa große β -Kette ist für die Signaltransduktion verantwortlich. Sie ist im Rezeptor für IL-3, IL-5 und GM-CSF identisch. Erst durch die Formation eines Heterodimers aus beiden Untereinheiten wird ein hochaffiner Rezeptor gebildet. Der Rezeptor wird vorwiegend auf myeloischen Zellen und einigen CD19⁺ B-Zellen exprimiert (116, 117).

1.4.2 IL-3 und seine Rolle bei inflammatorischen und autoimmunen Prozessen

Der Einfluss von IL-3 auf eine Vielzahl von Immunzellen macht bereits seine bedeutende Rolle in Entzündungsprozessen deutlich. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass das Zytokin einen wichtigen Bestandteil in der Entstehung und dem Progress verschiedener Autoimmunerkrankungen einnimmt. Die dysregulierte Expression von IL-3 oder seinem Rezeptor kann zu überschießender Signaltransduktion und dadurch zu inflammatorischen Immunantworten bis hin zu Leukämien führen (118). Die IL-3 Funktion wird in Verbindung mit Erkrankungen wie Asthma, chronischer Urtikaria und Hypersensitivitätsreaktionen gebracht (98, 119). Im Mausmodell konnte der Einfluss des Zytokins auf die Sepsis nachgewiesen werden. Von B-Zellen sezerniertes IL-3 induzierte die Bildung von Monozyten und Neutrophilen, die einen Zytokin-Sturm auslösten. Dadurch wurde die Inflammation potenziert. Auch beim Menschen konnte dieser Zusammenhang bestätigt werden. Hohe IL-3 Werte im Plasma von Sepsispatienten werden mit einer hohen Mortalität assoziiert (103). *Yamada et al.* fanden in ihren Studien einen SNP in der Region des IL-3 Promotor, der in Zusammenhang mit der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis (RA) gebracht werden konnte (120). Durch Immunoassays konnten außerdem erhöhte Werte von IL-3 im Serum von 16 SLE Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten nachgewiesen werden (121).

Auch im Modell der Experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE) spielt IL-3 eine wichtige Rolle in der Krankheitsentwicklung und dem Krankheitsprozess. Die zerebrale Expression des Zytokins ging im Mausmodell mit erhöhter Infiltration von T-Zellen ins Gehirn einher. Injektion von rekombinantem IL-3 führte zur Exazerbation der entzündlichen

Symptome, während durch Blockierung von IL-3 mit einem monoklonalen Antikörper eine deutliche Verbesserung der Klinik und eine Reduktion der zerebralen Inflammation erreicht werden konnte. Untersuchungen bei Patienten mit Multipler Sklerose (MS) zeigten, dass während eines akuten MS-Schubes die IL-3 Expression durch T-Zellen signifikant erhöht war (122).

Des Weiteren konnte die Beteiligung von IL-3 an der Entwicklung und der Aufrechterhaltung der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) im Mausmodell nachgewiesen werden. Das Auftreten und der Schweregrad der Arthritis wurden durch die Verabreichung von IL-3 signifikant gesteigert. Die Blockade des Zytokins durch einen monoklonalen Antikörper konnte die klinischen und histologischen Zeichen der Gelenkentzündung deutlich minimieren (97).

Außerdem wurde IL-3 als bedeutender Mediator für die Entwicklung der Lupusnephritis in MRL/lpr Mäusen identifiziert. *Renner et al.* konnten durch die Gabe von IL-3 eine Steigerung der Nierenfibrose, der Leukozyteninfiltration und der Ablagerung von Antikörpern belegen. Bei Mäusen, die im Gegenzug einen blockierenden Anti-IL-3-AK erhielten, zeigten sich diese Symptome rückläufig. Auch klinische Parameter wie die Proteinurie, die Kreatinin-Werte und die Produktion von Autoantikörpern waren vermindert (123).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die bisherigen Forschungsergebnisse geben bereits Hinweise auf die Beteiligung von IL-3 an Inflammation und Autoimmunität. Es ist jedoch notwendig, in weiteren Untersuchungen die Rolle von IL-3 an der Pathogenese und dem Progress bestimmter Autoimmunerkrankungen zu belegen.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression und Funktion von IL-3 und seinem Rezeptor bei Patienten mit SLE, PsA oder GPA im Vergleich zu gesunden Kontrollen zu untersuchen und dadurch die bisherigen Studienergebnisse zu verifizieren. Die Pathogenese der genannten Autoimmunerkrankungen ist nicht völlig verstanden, was ihre Therapie erschwert. Die bisherige Strategie zielt meist auf eine relativ unspezifische Immunsuppression ab, die einige Risiken wie beispielsweise Infektionen mit sich bringt. Im Rahmen dieser Studie soll geklärt werden, inwieweit IL-3 in die Entstehung und die Progression der Erkrankungen involviert ist. Die IL-3 Produktion durch T-Zellen soll näher beleuchtet und eine eventuelle Korrelation der IL-3 Expression mit der Krankheitsaktivität analysiert werden. Außerdem soll die Expression der β -Kette des IL-3 Rezeptors auf Basophilen Granulozyten und plasmazytoiden Dendritischen Zellen und damit der Einfluss von IL-3 auf diese untersucht werden. Weiteres Augenmerk wird auf die Beteiligung der immunregulatorischen Zytokine GM-CSF, IL-2, IL-17 und IFN γ am Krankheitsgeschehen gelegt. Zusätzlich soll durch die Untersuchung der Siglec-1 Expression auf Monozyten die IFN α Signatur im SLE näher betrachtet werden.

Diese Forschungsarbeit soll zudem eine Grundlage für weitere Untersuchungen bieten, die sich mit neuen Strategien in der Behandlung der genannten Autoimmunerkrankungen befassen und IL-3 als Angriffspunkt für potentielle neue Medikamente prüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Laborgeräte und -materialien

2.1.1 Geräte

Laborgerät	Bezugsquelle
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 5: Geräte

2.1.2 Glas- und Plastikware

Glas- und Plastikware	Bezugsquelle
Abdeckfolie für Mikrotestplatten	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
Zentrifugenröhren (15ml, 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht

Tabelle 6: Glas- und Plastikware

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Puffer

Chemikalien	Bezugsquelle
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
Permwash (Intracellular Staining Permwash Buffer)	BioLegend, San Diego, USA
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Roth, Karlsruhe
Tetramethylbenzidin (TMB Substrate Set)	BioLegend, San Diego, USA
Trypanblau-Lösung	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Merck Millipore, Darmstadt

Tabelle 7: Chemikalien, Reagenzien, Puffer

2.1.4 Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze

Zellkulturmedien und -zusätze	Bezugsquelle
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 8: Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze

2.1.5 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

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

Tabelle 9: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

2.1.6 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	FITC	M170	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
CD169	Siglec-1-PE	7-239	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach	1:22
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

Tabelle 10: Antikörper für die extrazelluläre Durchflusszytometrie

2.1.7 Antikörper für die intrazelluläre Durchflusszytometrie

Antikörper	Konjugat	Klon	Bezugsquelle	Eingesetzte Konzentration
GM-CSF	Pacific Blue	BVD2-21C11	BioLegend, San Diego, USA	1:20
IFN γ	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	AG Mack, Regensburg	1:20

Tabelle 11: Antikörper für die intrazelluläre Durchflusszytometrie

2.1.8 Zytokine, Antikörper, Enzyme

Zytokin/Antikörper/Enzym	Bezugsquelle
Anti-Human CD3 (Klon OKT3)	eBioscience, Inc., San Diego, USA
ChromPure Mouse IgG, whole molecule	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
Mouse IgG1 κ isotype control (Klon MOPC-21)	BioXCell, West-Lebanon, USA
Rekombinantes human GM-CSF	Peptrotech, Hamburg
Rekombinantes human IL-3	BioLegend, San Diego, USA

Tabelle 12: Zytokine, Antikörper, Enzyme

2.1.9 IL-3 ELISA

Lösung	Inhaltsstoffe
Block- und Verdünnungspuffer	1% BSA in PBS
Coating-Puffer	1 x PBS
Detektions-AK	AK-13-HRP (400ng/ml)
Entwicklungslösung	TMB Substrate Set
Stopplösung	12,5% H ₂ SO ₄ (Schwefelsäure)
Waschpuffer	0,05% Tween 20 in PBS
10x PBS (für Waschpuffer 1:10 verdünnt)	11,5g Na ₂ HPO ₄ , 80g NaCl, 2g KH ₂ PO ₄ , 2g KCl
Human GM-CSF ELISA DuoSet	R&D, Minneapolis, USA
Human IFN γ ELISA DuoSet	R&D, Minneapolis, USA
Human IL-17 ELISA DuoSet	R&D, Minneapolis, USA
IL-3 ELISA: Coat-anti-IL-3 Detect-anti-IL-3-HRP	AG Mack, Regensburg

Tabelle 13: IL-3 ELISA

2.1.10 Analyse- und Bearbeitungsprogramme

Programm	Bezugsquelle
FACS Diva Version 8.0.1.	BD Biosciences, Heidelberg
Microplate Reader Software i-control TM	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 Studienteilnehmer erfolgte in der rheumatologischen Ambulanz des Asklepios-Klinikums in Bad Abbach. Patienten mit der Diagnose SLE, PsA oder GPA wurden ausführlich über die Teilnahme an der Studie aufgeklärt und erhielten Informationsmaterial bezüglich der Forschungsarbeit. Nach schriftlicher Einwilligung erfolgte im Rahmen der routinemäßigen Blutentnahme in der Klinik die zusätzliche Abnahme von zweimal 6ml EDTA-Blut und einmal 2ml Heparin-Blut. Die gewonnenen Proben wurden stets am selben Tag und unter sterilen Bedingungen aufbereitet. So konnten seit März 2018 38 Patienten (2 Männer und 36 Frauen, Durchschnittsalter 44 Jahre) mit Systemischem Lupus erythematodes, 46 Patienten mit einer Psoriasis-Arthritis (22 Männer und 24 Frauen, Durchschnittsalter 57,5 Jahre) sowie 15 Patienten mit einer Granulomatose mit Polyangiitis (6 Männer und 9 Frauen, Durchschnittsalter 64 Jahre) akquiriert werden. Patienten, die während der Dauer der Probengewinnung öfter in die Asklepios-Klinik kamen, wurden als neue Studienteilnehmer gewertet, da die Krankheit zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Niveaus in der Aktivität zeigt und so unterschiedliche Blutwerte zu erwarten waren. Des Weiteren wurden Blutproben von 39 gesunden Kontrollprobanden (23 Männer und 16 Frauen, Durchschnittsalter 37 Jahre) für die Untersuchung rekrutiert, um die Ergebnisse später vergleichen zu können. Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie waren weitere chronisch-inflammatorische Erkrankungen, wie zum Beispiel Hashimoto-Thyreoiditis, M. Crohn oder MS.

2.2.2 Gewinnung von peripheren mononukleären Zellen aus Vollblut

Zu den PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) zählt man T- und B- Lymphozyten, Monozyten, Dendritische Zellen, Basophile Granulozyten sowie Natürliche Killerzellen. Es handelt sich dabei um einkernige Zellen des Immunsystems (124). Zur Isolation der PBMCs aus Vollblut kann man die Ficoll-Dichtezentrifugation nutzen. Durch die spezifische Dichte des Ficoll-Paques, in das das Vollblut gegeben wird, setzt sich am Boden des Falcons ein Zellpellet ab. Dieses enthält Erythrozyten, Neutrophile Granulozyten, Eosinophile Granulozyten und abgestorbene Zellen. Die PBMCs reichern sich dagegen in der sogenannten Interphase zwischen dem Ficoll-Paque und einem Gemisch aus Blutplasma und PBS an (125).

Für die Isolierung der PBMCs wurde das Patientenblut zuerst im Verhältnis 1:2 mit sterilem PBS in einem 50ml Falcon verdünnt. In ein weiteres Falcon wurden 10ml der Ficoll-Lösung gegeben, welche dann langsam mit der verdünnten Blutprobe überschichtet wurde. Danach folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 21°C und 1500U/min. Die Schicht aus Plasma und PBS wurde daraufhin abgesaugt, um anschließend die Interphase mittels Pipette abzunehmen. Die PBMCs wurden in ein neues Falcon transferiert und mit sterilem PBS gereinigt. Die Zentrifugation erfolgte bei 4°C und 1500U/min für 7 Minuten. Nach dem Waschvorgang wurden die Zellen in 2,5ml Nährmedium (RPMI 1640 + 10% FCS) resuspendiert und nach Zugabe von 2,5ml Einfriermedium (FCS + 20% DMSO) auf Kryoröhrchen (1ml) verteilt und in Kryoboxen mit 1°C pro Stunde auf -80°C eingefroren. Pro Patientenprobe ergaben sich somit fünf Aliquots. Im Verlauf wurden die Kryoröhrchen dann in einen Tank mit flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von circa -200°C überführt.

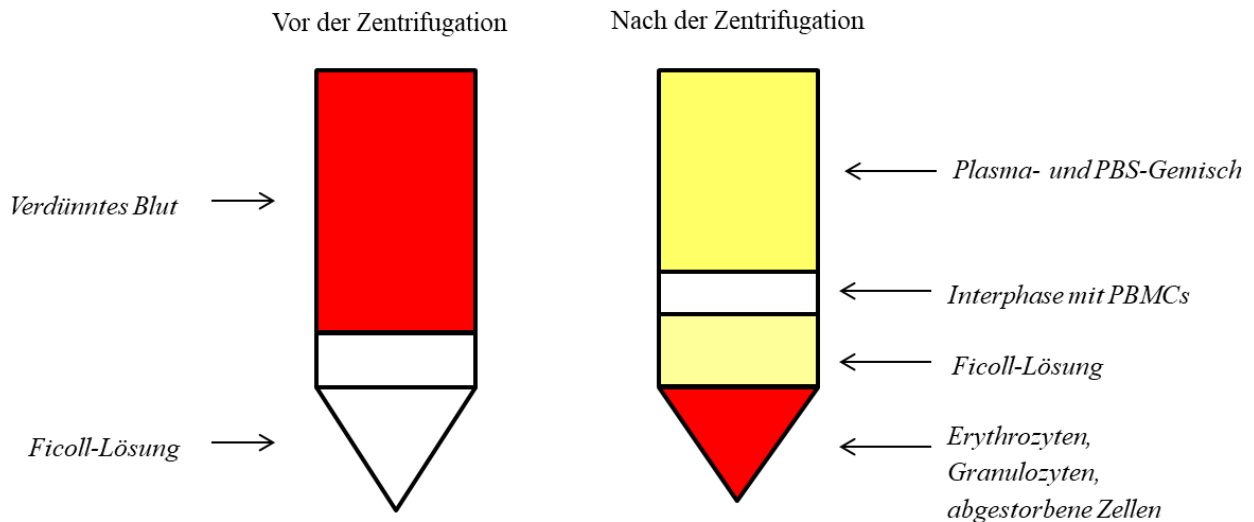


Abbildung 1: Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Links vor der Zentrifugation, rechts danach. Durch die spezifische Dichte des Ficoll-Paques senken sich Erythrozyten und Granulozyten während der Zentrifugation auf den Boden des Falcons ab, während sich die PBMCs in der Interphase über der Ficoll-Lösung sammeln.

2.2.3 Plasmagewinnung

Zusätzlich zu den PBMCs wurde aus dem Vollblut das Blutplasma entnommen. Das Plasma ist der flüssige Bestandteil des Blutes und es enthält Wasser, Elektrolyte und Plasmaproteine (124). Dazu wurden jeweils 1,5ml EDTA-Blut in Eppendorf-Cups überführt und anschließend bei 4°C für 15 Minuten bei 2500U/min. zentrifugiert. Danach befand sich das reine Plasma als Schicht über den abgesetzten korpuskularen Blutbestandteilen. Von dem Plasma wurden pro Patient viermal 200µl abgenommen und in 0,5ml Cups gegeben. Diese wurden bei -20°C eingefroren. So können bei Bedarf zu einem späteren Zeitpunkt wichtige Laborparameter der Studienteilnehmer bestimmt werden.

2.2.4 Durchflusszytometrie

Um die Leukozyten in den Patientenproben zu sortieren und zu zählen, wurden die Blutproben durchflusszytometrisch analysiert. Das FACS-Gerät (Fluorescence-activated Cell Sorter) misst die Streulichteigenschaften der Zellen. Diese passieren dabei einzeln einen Laserstrahl und erzeugen dadurch für sie spezifische Streu- und Fluoreszenzsignale. Photodetektoren wandeln die gemessenen Informationen anschließend in elektrische Signale um. Nach Hinzufügen spezieller Antikörper, an die Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) gekoppelt sind, binden diese an bestimmte Oberflächenantigene der Zellen. Dadurch kann

man Aussagen über die Expression dieser Oberflächenmerkmale auf spezifischen Zellen treffen. So kann auf den jeweils vorliegenden Zelltyp geschlossen werden (126). Der Forward Scatter (FSC, Vorwärtsstreulicht) erbringt Informationen über die Zellgröße, der Sideward Scatter (SSC, Seitwärtsstreulicht) über die Granularität der Zellen (127).

Die Lichtintensität ist dabei direkt proportional zur Anzahl der markierten Antigene auf den Zellen. Je mehr Antikörper an die Zelloberfläche gebunden haben, desto höher ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) (126).

2.2.5 Extrazelluläre FACS-Färbung

Für die extrazelluläre Färbung wurden pro Patient 100µl Vollblut eingesetzt. Die Proben wurden mit drei Mastermixen aus verschiedenen Antikörpern in unterschiedlichen Konzentrationen gefärbt. Je Probe und Färbung wurden 20µl Mastermix verwendet.

Für Färbung 1, welche hauptsächlich Basophile und Neutrophile Granulozyten sowie Monozyten herausfiltern sollte, wurden folgende Antikörper verwendet. In Klammern ist die Konzentration, in der der jeweilige Antikörper in den Mastermixen eingesetzt wurde, angegeben.

- CD116 – FITC (1:40)
- CD123 – PE-Cy5 (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 – V500 (1:100)

Färbung 2 diente vorwiegend der Markierung von B- und T-Lymphozyten. Hierfür wurden folgende Antikörper eingesetzt:

- CD116 – FITC (1:40)
- CD123 – PE-Cy5 (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 – V500 (1:100)

Mit Färbung 3 sollte herausgefunden werden, ob SLE Patienten mit erhöhten IL-3 Werten eine verstärkte IFN α Signatur aufweisen. IFN α induziert in hohem Maße den Oberflächenmarker CD169, auch als Sialic Acid-binding Immunoglobulin-like Lectin 1 (=Siglec-1) bezeichnet, auf Monozyten (128). Für diese Färbung wurden die nachstehenden Antikörper benutzt:

- CD116 – FITC (1:40)
- CD16 – Pacific Blue (1:100)
- CD14 – V500 (1:100)
- CD3 – APC-Cy7 (1:100)
- CD169 – Siglec-1-PE (1:22)

Als Ausgleichsmedium für die jeweiligen Mastermixe wurde 0,9%-Natriumchlorid eingesetzt.

Die Proben wurden für 20 Minuten im Dunkeln bei 4°C mit dem Mastermix inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper, wurden die Proben mit 4ml NaCl versetzt und für 7 Minuten bei 1600rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt war, wurden die Zellen für 10 Minuten mit je 1ml FACS-Lysing-Solution inkubiert. Diese lysiert die in den Blutproben enthaltenen Erythrozyten, wodurch später eine effizientere Detektion der Leukozyten erreicht wird. Nach einem weiteren Waschschrift mit 3ml NaCl, wurden die Röhrchen mit 20 μ l Counting Beads versetzt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Die Counting Beads ermöglichen eine genaue Berechnung der Zellzahlen in den Blutproben. Durch die bekannte Menge und Konzentration der Counting Beads und das bekannte Probenvolumen kann das Durchflusszytometer die Zellzahl/ μ l ermitteln (129).

2.2.6 Bestimmung der Zellzahlen

Um die Zahl lebender Zellen in Zellsuspensionen zu bestimmen, werden diese mit Trypanblau-Lösung versetzt. Durch die gestörte Membranpermeabilität färben sich abgestorbene Zellen blau an. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop jedoch weiterhin hell. Die Zellsuspension wurde zunächst im Verhältnis 1:10 mit Standardmedium

verdünnt. Anschließend wurden 10µl der Probe mit 10µl Trypanblau-Lösung vermischt. Wiederum 10µl der Mischung wurden nun in eine Neubauer Zell-Zählkammer gegeben, um unter dem Durchlichtmikroskop vier repräsentative Quadranten auszuzählen. Aus den vier gezählten Werten wurde der Mittelwert berechnet. Die Zellzahl pro 0,5ml Probe ergab sich aus folgender Rechnung:

$$\text{Zellzahl in 0,5ml} = \text{Mittelwert Zellzahl} * 10^4 * 20 * 0,5$$

Dabei war 10^4 der Kammerfaktor der Zählkammer und 20 der Verdünnungsfaktor, der sich aus der 1:10 Verdünnung der Zellsuspension mit Standardmedium und der darauffolgenden 1:2 Verdünnung der Probe mit Trypanblau-Lösung errechnete.

2.2.7 Zellkultur

Für die Kultivierung der PBMCs wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und für 2-4 Minuten im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Der Inhalt der Röhrchen wurde daraufhin unter der Sterilbank in ein 15ml Falcon mit zuvor erwärmtem sterilem Kulturmedium (RPMI 1640 + 10% FCS) überführt. Anschließend wurden die Proben für 7 Minuten bei 1800rpm und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands in den Falcons wurde das erhaltene Zellpellet in 500µl Standardmedium (RPMI 1640 + 10% FCS + Penicillin/Streptomycin + L-Glutamin) resuspendiert. Je 10µl der Lösung wurden danach mit 90µl Standardmedium verdünnt und in ein 1,5ml Cup gegeben. Daraus wurde die Zahl der lebenden Zellen in der Suspension bestimmt (siehe 2.2.6.). Für die Zellkultur wurden pro Patient Triplikate aus je 500.000 Zellen angelegt. Die Zellen wurden in 96-Well Platten mit 100µl Standardmedium sowie 100µl Anti-CD3 (5µg/ml) versetzt und für 3 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

CD3 ist ein von T-Zellen exprimiertes Oberflächenprotein und Co-Rezeptor des T-Zellrezeptors. Es ist für die Signaltransduktion sowie für die Aktivierung von T-Zellen wichtig. Die Inkubation von Zellen mit Anti-CD3 sollte die T-Zellen aktivieren (124).

Nach drei Tagen wurden aus jedem Well der Zellkulturplatte 180µl Überstand abgenommen und in 0,5ml Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden anschließend bei -20°C eingefroren, um sie zu einem späteren Zeitpunkt für Zytokin-ELISAs (siehe 2.2.10.) zu verwenden.

2.2.8 Intrazelluläre FACS-Färbung

Für die intrazelluläre Färbung wurden pro Patient zwei Wells einer Rundbodenplatte mit je 500.000 Zellen der aufgetauten PBMCs befüllt. Die Zellen wurden in 100µl Standardmedium ausplattiert, welches zuvor mit Cell Stimulation Cocktail (plus Protein Transport Inhibitoren) vermischt wurde. Dieser wurde in der Konzentration 1:250 eingesetzt. Er beinhaltet neben Phorbol 12-Myristat 13-Acetat und Ionomycin, die die intrazelluläre Produktion von Zytokinen anregen, auch Brefeldin A und Monensin (130). Diese Inhaltsstoffe bewirken die Akkumulation sekretorischer Proteine im endoplasmatischen Retikulum durch die Hemmung des Proteinexports über den Golgi-Apparat der Zelle. Dadurch können die produzierten Zytokine im Durchflusszytometer besser nachgewiesen werden (131). Die Zellen wurden für drei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend vier Minuten bei 2400rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgte ein Waschschrift mit je 200µl PBS. Daraufhin wurden die PBMCs für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 10µl mouse IgG (Fc-Block, 100µg/ml) pro Well inkubiert und danach nicht gewaschen. Dadurch sollten unspezifische Fc-Bindungsstellen blockiert werden. Nun wurden die PBMCs zunächst *extrazellulär* gefärbt, um später die Identifizierung des Zelltyps zu ermöglichen. Für 20 Minuten wurden die Rundbodenplatten bei 4°C mit einem Mastermix aus den folgenden Antikörpern in einem Endvolumen von 20µl/Well inkubiert.

- CD3 – APC-Cy7 (1:40)
- CD8 – PerCP Cy5.5 (1:20)
- CD4 – APC (1:20)

Es erfolgte ein weiterer Waschschrift mit PBS, nach welchem die Zellen mit 150µl Cytofix/Cytoperm versetzt wurden und erneut für 20 Minuten im Kühlschrank aufbewahrt wurden. Dies sorgte für die Permeabilisation der Zellmembran, um die Aufnahme der Antikörper für die folgende *intrazelluläre* Färbung zu ermöglichen (124). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Permeabilization Wash Buffer (Permwash) gewaschen. Dieser hielt die in der Zellmembran entstandenen Poren offen. Er wurde zuvor 1:10 mit deionisiertem Wasser verdünnt. Danach erfolgte eine erneute zehnminütige Inkubation im Dunkeln mit Fc-Block mouse IgG, welcher auf eine Konzentration von 100µg/ml in Permwash vorverdünnt wurde. Schließlich wurden die PBMCs *intrazellulär* angefärbt. Dafür wurden die nachstehenden Antikörper verwendet:

- IL-2 – PE-Cy7 (1:20)
- IFN γ – FITC (1:20)
- GM-CSF – Pacific Blue (1:20)
- Anti-IL-3 – PE (5 μ g/ml) bzw. Isotyp mouse IgG1 κ – PE (1:40)

Pro Patient wurden zwei Färbungen durchgeführt, wobei IL-2, IFN γ sowie GM-CSF in beiden Färbungen eingesetzt wurden. Die Färbung auf IL-3 erfolgte mit Anti-IL-3-PE, die Isotyp-Kontrollfärbung hingegen mit IgG1 κ . Die Proben wurden in einem Endvolumen von 20 μ l gefärbt und anschließend für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit Permwash. Letztlich wurden die Zellen in 100 μ l Permwash resuspendiert, in Polystyrolröhrchen überführt und durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.9 Stimulation der Vollblutproben und Überstand-Gewinnung

Die durchflusszytometrische Analyse der Blutproben erfolgte erneut nach Stimulation mit spezifischen Zytokinen und Antikörpern. Das Vollblut wurde mit Interleukin-3, GM-CSF und Anti-CD3-AK, das die T-Zellen zur IL-3 Ausschüttung und Proliferation stimuliert, versetzt. Damit sollte die Expression von IL-3 und seinem zugehörigen Rezeptor zusätzlich unter veränderten Bedingungen untersucht werden.

Hierfür wurden pro Patient fünf Mal 100 μ l Vollblut mit 200 μ l verschiedener Reagenzien vermischt. Eines der fünf Röhrchen wurde im Voraus jeweils für vier Stunden mit 300 μ l Anti-CD3-AK in der Konzentration 5 μ g/ml inkubiert. Aus der folgenden Tabelle lassen sich die Inhaltsstoffe der zugefügten Reagenzien entnehmen.

Röhrchen	Menge an Vollblut	Zugegebenes Stimulans
1	100 μ l	200 μ l Medium (RPMI)
2	100 μ l	200 μ l Medium + IL-3 (3ng/ml)
3	100 μ l	200 μ l Medium + GM-CSF (3ng/ml)
4	100 μ l	200 μ l Medium (Doppelwert)
5	100 μ l	Anti-CD3-AK + 200 μ l Medium

Tabelle 15: Vollblutproben mit ihren jeweiligen Stimulantien

Die Proben wurden für 23,5h bei 37C° und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden pro Röhrchen 130µl Überstand abgenommen, dieser auf 96-Loch Rundbodenplatten überführt und die Platten bei -20C° eingefroren. Diese Überstände wurden zu einem späteren Zeitpunkt für Zytokin-ELISAs verwendet (siehe 2.2.10.). Die verbliebenen Zellen wurden daraufhin entsprechend der unstimulierten Vollblutproben extrazellulär gefärbt. Dafür wurden sie für 20 Minuten im Dunkeln mit Antikörpern inkubiert (entsprechend Färbung 1 – siehe 2.2.4.), mit FACS-Lysing-Solution versetzt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.10 ELISA

Der ELISA (= Enzyme-linked immunosorbent Assay) wird zum Nachweis und zur Quantifizierung von Antigenen genutzt. In dieser Arbeit wurde der sogenannte Sandwich-ELISA durchgeführt. Dabei werden die Mikrotiterplatten mit einem Antigen-spezifischen Capture-AK gecoatet. Dieser soll das nachzuweisende Antigen binden. Unspezifische Bindungen werden durch das Abblocken freier Bindestellen verhindert. Durch Hinzufügen des sogenannten Detektions-AK wird das Antigen an einem anderen Epitop erneut gebunden und es bildet sich ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex („Sandwich“). Anschließend wird ein spezifisches Enzym, welches an ein zweites Antikörper-Konjugat gebunden ist („Enzyme-linked“), zugegeben. Dieses setzt ein im nächsten Schritt ergänztes Substrat um. Dadurch entsteht eine Farbreaktion, welche photometrisch gemessen werden kann. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei direkt proportional zur Menge des detektierten Antigens (126).

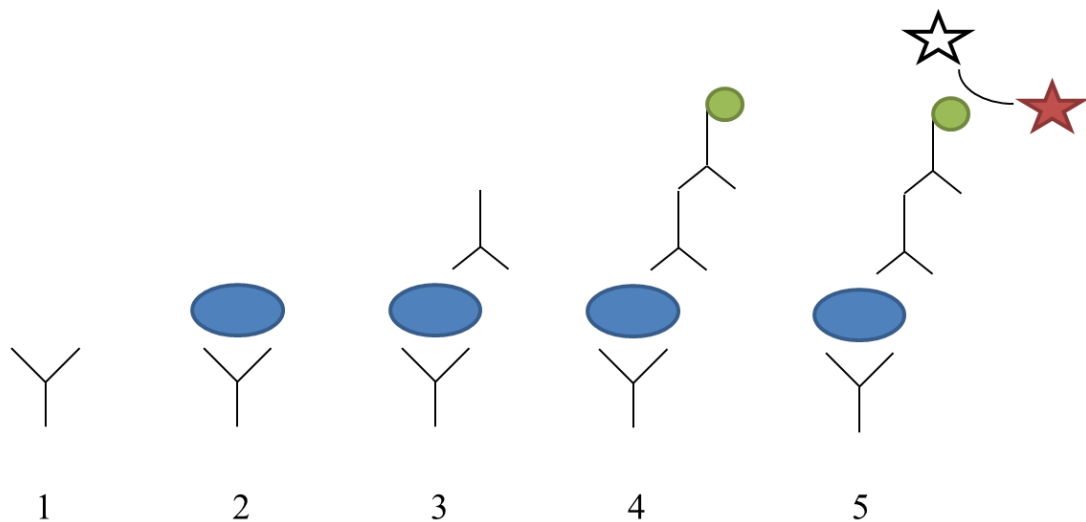


Abbildung 2: Skizzierung eines Sandwich-ELISAs. 1) Coating-Antikörper. 2) Zugabe der zu untersuchenden Probe. 3) Zugabe des Detektions-AK, Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. 4) Zugabe des Enzyms. 5) Zugabe des Substrats und Farbumschlag.

In dieser Arbeit wurden ELISAs auf IL-3, GM-CSF, IL-17 sowie IFN γ durchgeführt. Verwendet wurden dabei jeweils die Überstände der Zellkultur (siehe 2.2.7.) und die Plasma-Überstände der zuvor stimulierten Vollblutproben (siehe 2.2.9.). Alle Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur.

Im Folgenden wird das Vorgehen für den IL-3 ELISA beschrieben. Die ELISAs zur Detektion von IL-17, GM-CSF und IFN γ wurden entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Zunächst wurden 96-Well ELISA-Platten über Nacht mit 60 μ l/Well Coat-Anti-IL-3-Antikörper in der Konzentration 10 μ g/ml gecoatet. Am nächsten Tag wurden die Platten drei Mal mit Waschpuffer (1xPBS + 0,05% Tween) gewaschen, um nicht gebundene Reste des Coating-AK zu entfernen. Anschließend wurde mit 200 μ l/Well 1% BSA in PBS für 60 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Dieser Schritt diente dazu, unspezifische Proteinbindungsstellen abzublocken. Währenddessen wurden die Proben mit Mouse IgG1 κ Isotype Control (MOPC21) präinkubiert. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die Konzentration von MOPC21 betrug für die Zellkultur-Überstände 20 μ g/ml, für die Plasma-Überstände 100 μ g/ml. Die geblockten Platten wurden erneut dreifach gewaschen, um anschließend für zwei Stunden mit je 60 μ l der Proben pro Well inkubiert zu werden. Zusätzlich zu den Proben wurden auf jede Platte zwei Standard-Verdünnungsreihen mit bekannter Konzentration des gesuchten Moleküls aufgetragen. Dies diente der quantitativen

Bestimmung des zu detektierenden Antigens. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf die Platten je im Verhältnis 1:2 verdünnt. Nach weiteren drei Waschschritten erfolgte die Detektion mit 60µl pro Well des Detect-Anti-IL-3-HRP (400ng/ml) für den IL-3-ELISA bzw. mit dem Detektions-Antikörper aus den DuoSets für den IL-17, GM-CSF und IFN γ ELISA. Die Platten wurden für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Es folgten drei weitere Waschvorgänge, bevor die Proben mit je 100µl TMB Substrate Solution versetzt wurden. TMB diente als Substrat, welches vom Enzym HRP (Horseradish-Peroxidase) umgesetzt wurde und die Farbreaktion hervorrief. Die Inkubation mit TMB erfolgte im Dunkeln. Beim IL-3 ELISA war HRP direkt an den Detektions-AK gebunden. Bei den anderen ELISAs musste das Enzym jedoch in einem gesonderten Schritt hinzugefügt werden. Hierfür wurden noch vor der Zugabe von TMB je 60µl Streptavidin-HRP eingesetzt. Die Bindung von Streptavidin an den Detektions-AK fand für 20 Minuten im Dunkeln statt, bevor dann ebenfalls mit 100µl TMB inkubiert wurde. Die Enzym-Substrat-Reaktion wurde bei beiden ELISAs nach 20 Minuten mit 50µl 12,5% Schwefelsäure abgestoppt. Anschließend wurde mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450nm und einer Referenzwellenlänge von 540nm die optische Dichte der Proben bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1. Systemischer Lupus erythematodes

3.1.1 Basischarakteristika der SLE Patienten

In diese Studie wurden 38 Patienten mit der Diagnose SLE integriert. Anhand der zum Zeitpunkt der Probenabnahme aktuellen klinischen Erkrankungsaktivität wurden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt. 23 Studienteilnehmer zeigten zum Untersuchungszeitpunkt keine Merkmale einer aktiven Lupus Erkrankung. Diese Patientengruppe wird im Folgenden als „Inaktiv“ bezeichnet. Die restlichen 15 Patienten wiesen klinische Zeichen eines aktiven Krankheitsstadiums auf und werden folglich „Aktiv“ genannt. Verglichen wurden die Daten der Patienten mit 39 gesunden Kontrollprobanden (=Kontrollen). In Tabelle 16 sind einige grundlegende Charakteristika der Patienten aufgeführt.

	Healthy Control (n=39)	SLE Inactive (n=23)	SLE Active (n=15)
Demographics:			
Mean age (years)	37	39	49
Female sex (%)	41 %	100 %	87 %
SLE duration (months)	-	143	123
Organ involvement:			
Actual Skin involvement (%)	-	9 %	53 %
Heart /Lung /CNS involvement (%)	-	13 %	20 %
Renal involvement (%)	-	35 %	7 %
Medication:			
Steroids (%)	-	52 %	87 %
Steroids mg / day	-	2,8	5,1
Hydroxychloroquin / Chloroquin		52 %	67 %
MMF	-	9 %	7 %
Azathioprin	-	22 %	40 %
Belimumab	-	0 %	13 %
Laboratory findings:			
Ds-DNA Titer (IU/ml)	-	63	90

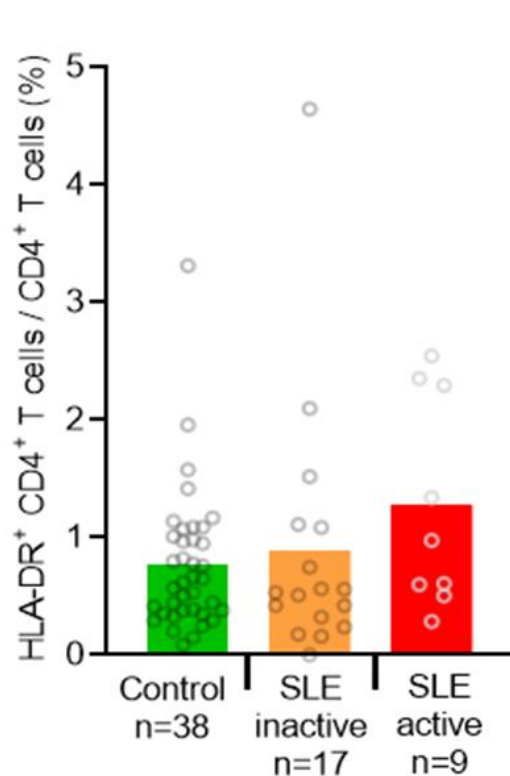
Tabelle 16: Basischarakteristika der SLE Patienten. SLE Patienten wurden mit gesunden Kontrollprobanden (=Healthy Control) verglichen. Die Einteilung der SLE Patienten in Aktive (=SLE Active) und Inaktive (=SLE Inactive) erfolgte anhand der klinischen Erkrankungsaktivität.

Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug bei den Aktiven 49 Jahre, bei den Inaktiven 39 Jahre. Die Kontrollen waren im Mittel 37 Jahre alt. Der Mittelwert der Erkrankungsdauer belief sich bei den Aktiven auf 123 Monate sowie bei den Inaktiven auf 143 Monate. Ein deutliches Ungleichgewicht fiel bei der Geschlechterverteilung auf. 87% der aktiven und 100% der inaktiven SLE Patienten waren weiblich. Ein klarer Unterschied zeigte sich auch bei der aktuellen Hautbeteiligung. Fast sechs Mal so viele aktive wie inaktive Patienten wiesen zum Untersuchungszeitpunkt krankheitstypische Veränderungen der Haut auf. An einer Beteiligung der Nieren litten mit 35% deutlich mehr der Patienten ohne aktives Krankheitsstadium, wohingegen eine Beteiligung anderer Organe, wie Herz oder Lungen, in der Gruppe der Aktiven geringfügig häufiger zu verzeichnen war. Wesentlich mehr Patienten mit einem aktiven Krankheitsstadium wurden mit immunsupprimierenden Medikamenten therapiert als inaktive SLE Patienten. Besonders auffallend war dies bei der Therapie mit Steroiden, die bei Aktiven um 35% häufiger durchgeführt wurde. Auch die tägliche Menge an steroidalen Medikamenten war bei aktiv Erkrankten mit 5,1mg fast doppelt so hoch wie in der inaktiven Vergleichsgruppe. Eine Behandlung mit dem monoklonalen BLys-Antikörper Belimumab wurde nur in der Kohorte aktiver Patienten durchgeführt. Der laborchemisch gemessene Titer der Anti-ds-DNA-Antikörper war bei inaktiven SLE Erkrankten im Vergleich zu den aktiven im Durchschnitt um ca. 30% niedriger.

3.1.2 Immunphänotypisierung der T-Zellen bei SLE

Zunächst wurde durchflusszytometrisch untersucht, ob es Unterschiede in der Anzahl verschiedener Leukozytensubpopulationen sowie Unterschiede in deren Aktivierungsgrad zwischen Erkrankten und Gesunden gab. Dabei waren besonders die T-Zellen von Interesse, da diese bekanntermaßen eine bedeutende Rolle im autoimmunen Entzündungsgeschehen einnehmen und überdies als Hauptproduzenten von IL-3 gelten (siehe 1.4.1). Wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben, wurden die T-Zellen durch extrazelluläre Färbung mit den Antikörpern CD4 und CD8 und anschließende Analyse im Durchflusszytometer in ihre zwei großen Subklassen aufgeteilt. Des Weiteren wurden sie auf das Oberflächenantigen HLA-DR untersucht.

3a)



3b)

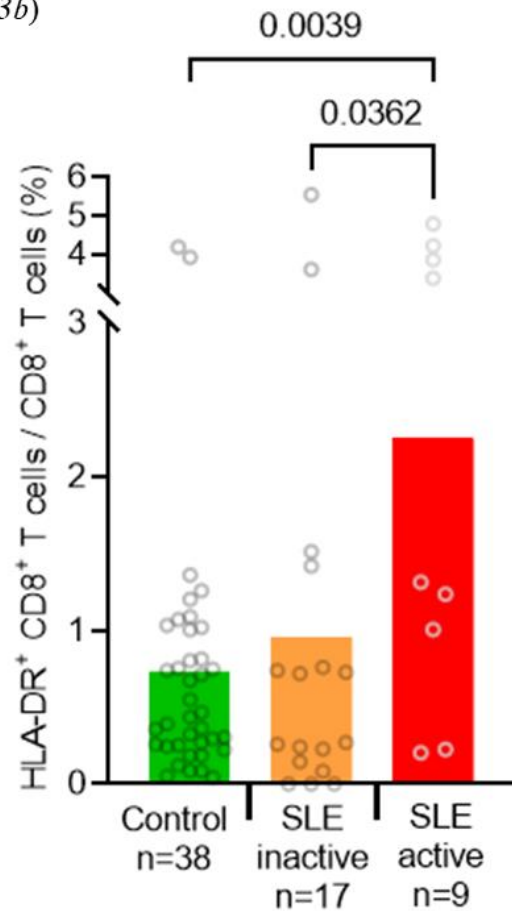


Abbildung 3: Immunphänotypisierung der T-Zellen im peripheren Blut von SLE Patienten: 3a) Anteil der HLA-DR⁺ CD4⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl CD4⁺ T-Zellen in Prozent. 3b) Anteil der HLA-DR⁺ CD8⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl CD8⁺ T-Zellen in Prozent. SLE Patienten wurden mit gesunden Kontrollprobanden (=Control) verglichen. Die Einteilung der SLE Patienten in aktiv (=SLE active) und inaktiv (=SLE inactive) erfolgte anhand der klinischen Erkrankungsaktivität. Die Einzelwerte sind als Dots dargestellt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Proben. Die statistische Berechnung der Signifikanzen wurde mittels One-Way ANOVA mit Bonferroni Post-Test durchgeführt.

Abbildung 3a ist zu entnehmen, dass es bei den CD4⁺ T-Zellen, die in der Durchflusszytometrie positiv für den Oberflächenmarker HLA-DR gemessen wurden, lediglich tendentielle aber nicht signifikante Unterschiede zwischen den drei Vergleichsgruppen gab. Bei den CD8⁺ T-Zellen stellte sich dies anders dar. In Abbildung 3b sieht man, dass aktive Lupuspatienten im Vergleich zu inaktiven signifikant mehr HLA-DR⁺ CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut aufwiesen (p=0,0362). Betrachtet man die Kontrollen im

Vergleich zu aktiven SLE Patienten, zeigte sich sogar ein hoch signifikanter Unterschied ($p=0,0039$).

3.1.3 Immunphänotypisierung der Monozyten bei SLE

Neben den T-Zellen spielen auch die Monozyten eine wichtige Rolle in Autoimmunerkrankungen wie dem Systemischen Lupus erythematoses. Sie wurden analog zu den T-Zellen mittels extrazellulärer Färbung und FACS-Analyse anhand ihrer exprimierten Oberflächenproteine typisiert (siehe 2.2.4 und 2.2.5). Es wurden $CD14^+$ und $CD16^+$ Monozyten unterschieden. Weiterhin wurden die Monozyten auf das Oberflächenantigen CD169 analysiert. Ziel war es herauszufinden, ob Lupuspatienten mehr $CD169^+$ Monozyten im Blut aufweisen als gesunde Kontrollen und ob die Menge der Zellen von der Krankheitsaktivität abhängt. Dies ist in Abbildung 4 dargestellt.

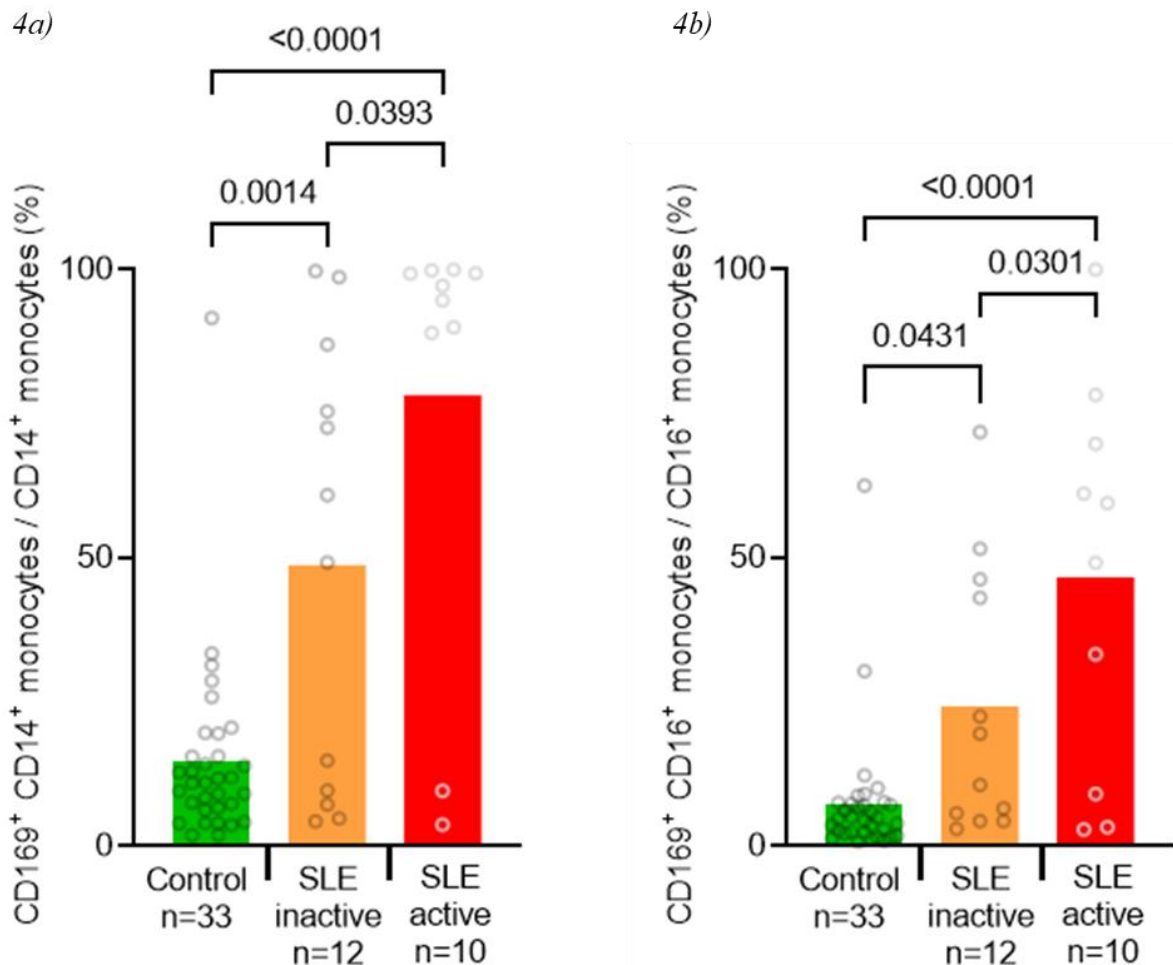


Abbildung 4: Immunphänotypisierung der Monozyten im peripheren Blut von SLE Patienten: 4a) Anteil der CD169⁺ CD14⁺ Monozyten an der Gesamtzahl der CD14⁺ Monozyten in Prozent. 4b) Anteil der CD169⁺ CD16⁺ Monozyten an der Gesamtzahl CD16⁺ Monozyten in Prozent. SLE Patienten wurden mit gesunden Kontrollprobanden (=Control) verglichen. Die Einteilung der SLE Patienten in aktiv (=SLE active) und inaktiv (=SLE inactive) erfolgte anhand der klinischen Erkrankungsaktivität. Die Einzelwerte sind als Dots dargestellt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Proben. Die statistische Berechnung der Signifikanzen wurde mittels One-Way ANOVA mit Bonferroni Post-Test durchgeführt.

Aus Abbildung 4a wird ersichtlich, dass der prozentuale Anteil CD169⁺ CD14⁺ Monozyten an allen CD14⁺ Monozyten bei den aktiven SLE Patienten höchst signifikant größer war als in der Kontrollgruppe (p<0,0001). Ein hoch signifikanter Unterschied fand sich ebenso im Vergleich zwischen Kontrollen und inaktiven Lupuspatienten (p=0,0014). Schließlich zeigte auch die Gegenüberstellung der zwei SLE Patientengruppen, dass Aktive signifikant mehr CD169⁺ CD14⁺ Monozyten aufwiesen als Inaktive (p=0,0393). Ähnliche Ergebnisse ergab auch die Untersuchung der Expression von CD169 auf CD16⁺ Monozyten (siehe Abbildung

4b). Patienten im aktiven Krankheitsstadium wiesen einen höchst signifikanten Mehranteil an CD169⁺ CD16⁺ Monozyten auf als die Kontrollprobanden ($p < 0,0001$). Einen ebenso signifikant höheren Prozentsatz der genannten Zellen fand man bei den inaktiven Patienten im Vergleich zu den Kontrollen ($p = 0,0431$) sowie bei der aktiven SLE Gruppe in Gegenüberstellung mit den Inaktiven ($p = 0,0301$).

3.1.4 Zytokin-Produktion im Zellkultur-Überstand von SLE Patienten

Wie unter 2.2.7 beschrieben, wurden zur Messung der von den PBMCs produzierten Zytokine je Patient 500.000 Zellen pro Well in einer 96-Loch-Zellkulturplatte mit Anti-CD3 für drei Tage kultiviert. In dem Zellkulturüberstand wurden anschließend mittels ELISA die verschiedenen Zytokine quantifiziert. Man untersuchte neben IL-3 auch GM-CSF, IL-17 sowie IFN γ . Mit diesem Versuch sollte geklärt werden, ob Immunzellen von SLE Patienten mehr Zytokine bilden und ob ein Zusammenhang zwischen der Zytokinmenge und dem Krankheitsstadium besteht. Die IL-2 Expression wurde nur intrazellulär untersucht, da sich das Zytokin im ELISA aufgrund zu geringer Mengen nicht detektieren ließ.

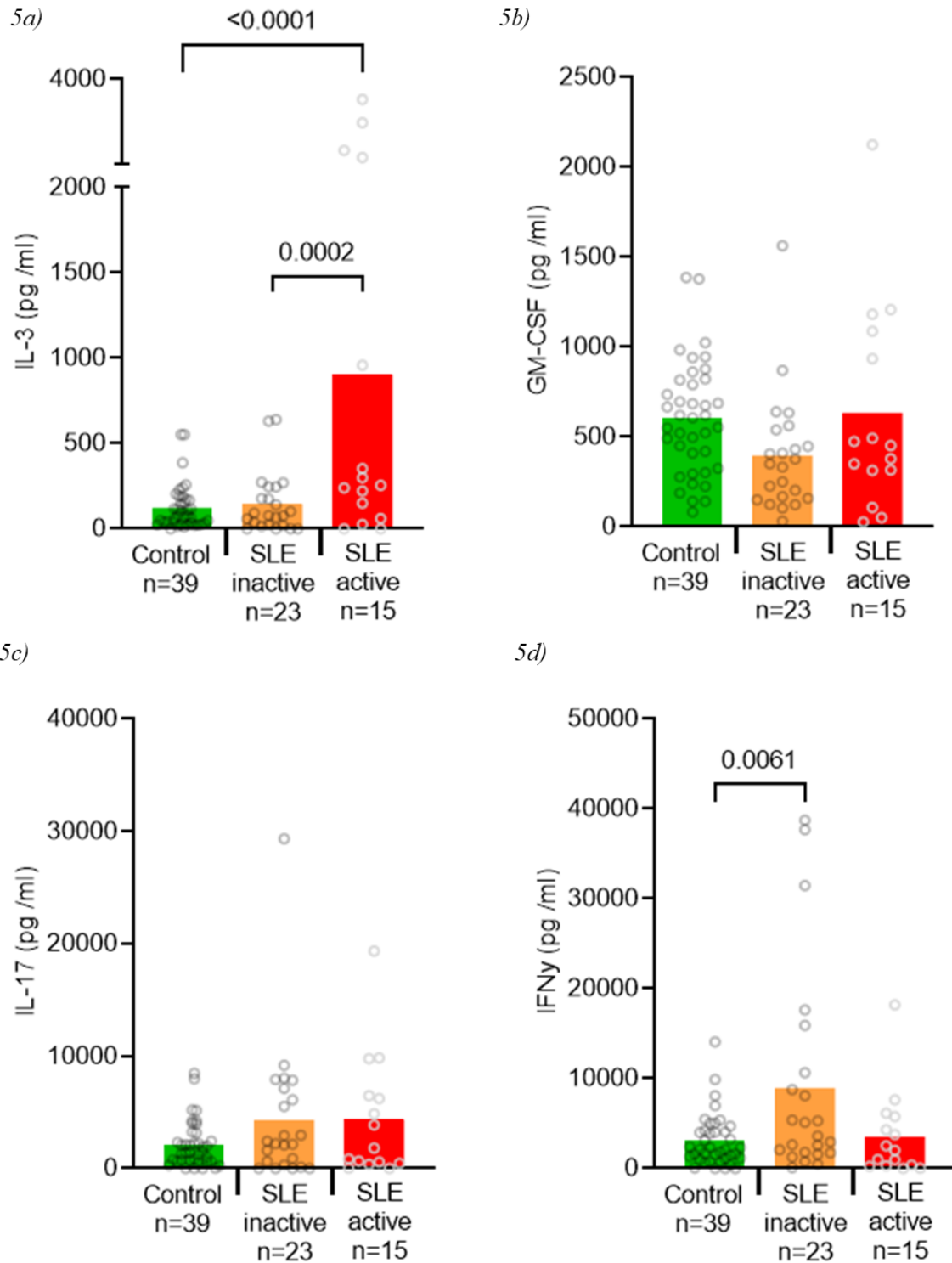


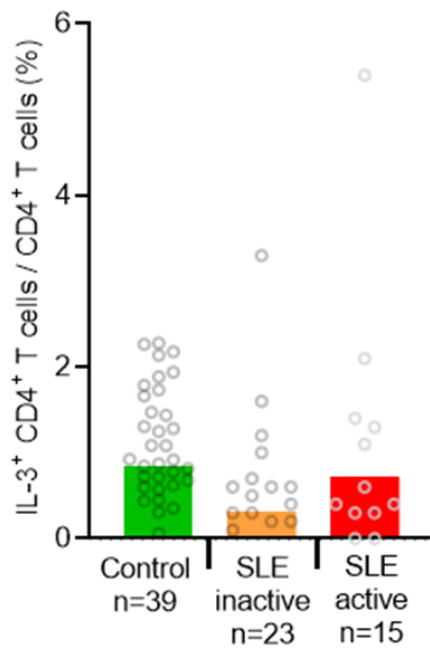
Abbildung 5: Darstellung der Zytokin Konzentration in pg/ml gemessen im Zellkultur-Überstand: 5a) IL-3, 5b) GM-CSF, 5c) IL-17, 5d) IFN γ . SLE Patienten wurden mit gesunden Kontrollprobanden (=Control) verglichen. Die Einteilung der SLE Patienten in aktiv (=SLE active) und inaktiv (=SLE inactive) erfolgte anhand der klinischen Erkrankungsaktivität. Die Einzelwerte sind als Dots dargestellt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Proben. Die statistische Berechnung der Signifikanzen wurde mittels One-Way ANOVA mit Bonferroni Post-Test durchgeführt.

Betrachtet man Abbildung 5a, fällt eine scheinbare Korrelation der IL-3 Produktion mit der Krankheitsaktivität auf. Aktive SLE Patienten produzierten bedeutend mehr IL-3 als die Kontrollprobanden ($p < 0,0001$) sowie auch die Erkrankten ohne klinische Aktivität ($p = 0,0002$). Für GM-CSF (Abb. 5b) und IL-17 (Abb. 5c) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Menge an produziertem Zytokin zwischen den einzelnen Gruppen. Beim IFN γ ELISA (Abb. 5d) zeigten überraschenderweise nur die Inaktiven im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikant höhere Zytokinproduktion ($p = 0,0061$).

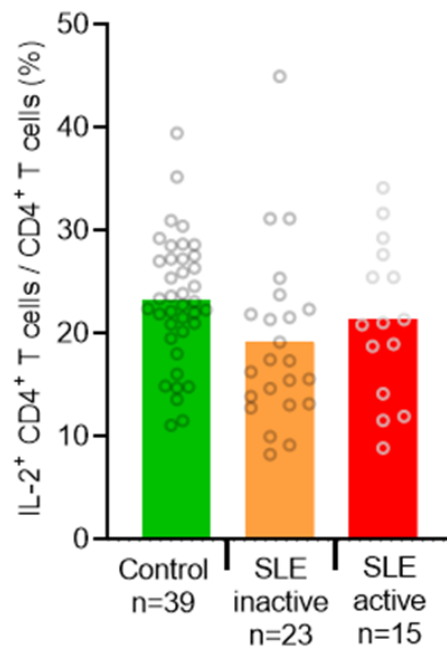
3.1.5 CD4⁺ T-Zellen als potentielle Quelle immunregulatorischer Zytokine bei SLE

Zur Detektion der von CD4⁺ T-Zellen gebildeten Zytokine färbte man diese intrazellulär an und analysierte sie nachfolgend im Durchflusszytometer (siehe 2.2.8). Bestimmt wurden die Zytokine IL-3, IL-2, IFN γ sowie GM-CSF. So sollte erfasst werden, ob CD4⁺ T-Zellen Produzenten der genannten Zytokinen sind und ob die Menge der Zytokin bildenden Zellen von der klinischen Erkrankungsaktivität der Lupuspatienten abhängt. IL-2 wurde wie bereits erwähnt lediglich intrazellulär nachgewiesen.

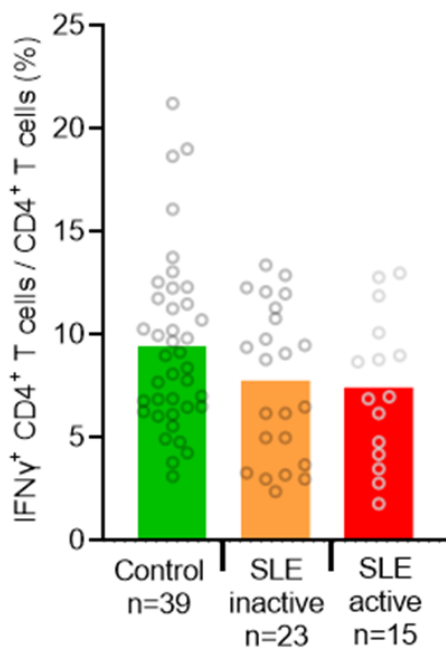
6a)



6b)



6c)



6d)

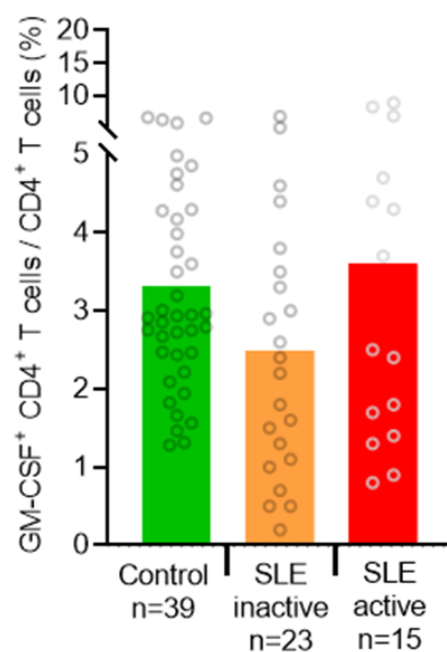


Abbildung 6: Anteil der Zytokin exprimierenden $CD4^+$ T-Zellen an der Gesamtzahl der $CD4^+$ T-Zellen in Prozent nach intrazellulärer Färbung auf: 6a) IL-3, 6b) IL-2, 6c) $IFN\gamma$, 6d) GM-CSF. SLE Patienten wurden mit gesunden Kontrollprobanden (=Control) verglichen. Die Einteilung der SLE Patienten in aktiv (=SLE active) und inaktiv (=SLE inactive) erfolgte anhand der klinischen Erkrankungsaktivität. Die Einzelwerte sind als Dots dargestellt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Proben. Die statistische Berechnung der Signifikanzen wurde mittels One-Way ANOVA mit Bonferroni Post-Test durchgeführt.

In Abbildung 6 lässt sich weder zwischen der Kontrollgruppe und den beiden SLE-Patientengruppen noch zwischen den Patientengruppen untereinander ein signifikanter Unterschied im Anteil der CD4⁺ T-Zellen, die mittels FACS-Analyse positiv auf ein untersuchtes Zytokin gemessen wurden, erkennen. Dies galt für alle vier getesteten Zytokine. Somit schien die Zytokinproduktion der CD4⁺ T-Zellen keinen erheblichen Einfluss auf die autoimmune Entzündungsreaktion der SLE Patienten zu nehmen.

3.1.6 CD8⁺ T-Zellen als potentielle Quelle immunregulatorischer Zytokine bei SLE

Auf dieselbe Weise wie die CD4⁺ T-Zellen wurden auch die CD8⁺ T-Zellen mithilfe der intrazellulären Anfärbung und nachfolgender Analyse im Durchflusszytometer auf die Bildung bestimmter Zytokine untersucht (siehe 2.2.8). Entsprechend der Färbung der CD4⁺ T-Zellen wurden auch die CD8⁺ T-Zellen auf IL-3, IL-2, IFN γ sowie GM-CSF getestet.

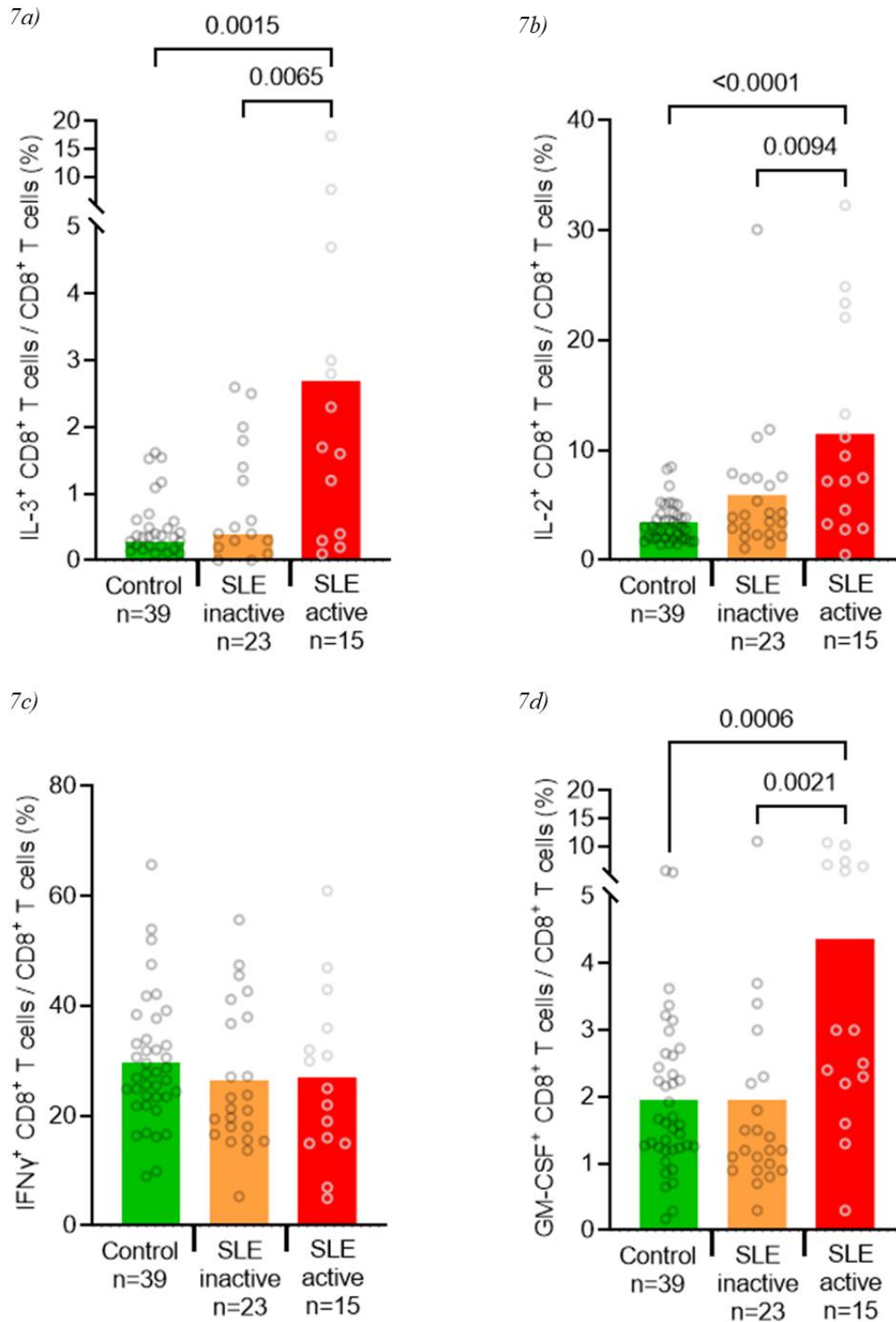


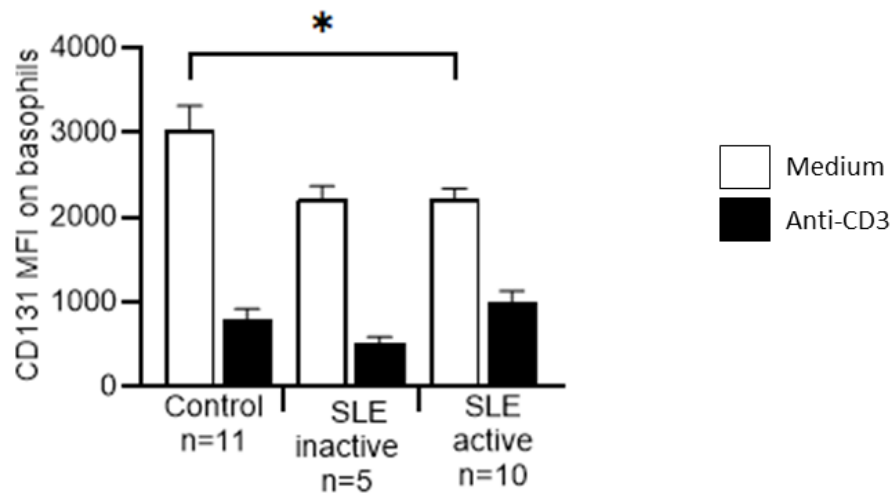
Abbildung 7: Anteil der Zytokin exprimierenden CD8⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen in Prozent nach intrazellulärer Färbung auf: 7a) IL-3, 7b) IL-2, 7c) IFN γ , 7d) GM-CSF. SLE Patienten wurden mit gesunden Kontrollprobanden (=Control) verglichen. Die Einteilung der SLE Patienten in aktiv (=SLE active) und inaktiv (=SLE inactive) erfolgte anhand der klinischen Erkrankungsaktivität. Die Einzelwerte sind als Dots dargestellt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Proben. Die statistische Berechnung der Signifikanzen wurde mittels One-Way ANOVA mit Bonferroni Post-Test durchgeführt.

Im Gegensatz zu den CD4⁺ T-Zellen (siehe Abb. 6) geht aus Abb. 7 hervor, dass sich bei den CD8⁺ T-Zellen die gebildete Menge an Zytokinen zwischen den einzelnen Testgruppen deutlich unterschied. So ergab sich für den Anteil der IL-3⁺ CD8⁺ T-Zellen an allen CD8⁺ T-Zellen (Abb. 7a) zwischen den Kontrollen und den aktiven Lupuspatienten ein hoch signifikanter Unterschied ($p=0,0015$). Der Anteil an IL-3⁺ CD8⁺ T-Zellen war in der Gruppe der Aktiven auch im Vergleich mit den Inaktiven signifikant höher ($p=0,0065$). Daher ist ein direkter Zusammenhang zwischen der IL-3 Produktion der CD8⁺ T-Zellen und der Krankheitsaktivität anzunehmen. Einen sogar höchst signifikanten Unterschied wies die IL-2 Produktion (Abb. 7b) der aktiven SLE Patienten verglichen mit denen der Kontrollprobanden auf ($p<0,0001$). Auch hier schien die Krankheitsaktivität die Zytokin Produktion zu beeinflussen, denn auch die Gegenüberstellung der Aktiven und Inaktiven zeigte, dass Aktive bedeutend mehr IL-2 bilden ($p=0,0094$). Keinen relevanten Unterschied ergab die Untersuchung auf IFN γ produzierende CD8⁺ T-Zellen in den einzelnen Testgruppen (Abb. 7c). Abb. 7d zeigt wiederum ähnliche Ergebnisse für die GM-CSF Produktion wie für die von IL-3 oder IL-2. Aktive SLE Patienten wiesen einen höchst signifikanten Mehranteil an GM-CSF⁺ CD8⁺ T-Zellen auf als die Kontrollen ($p=0,0006$). Auch der Vergleich der aktiven mit den inaktiven Lupuspatienten ergab einen hoch signifikanten Unterschied ($p=0,0021$) und bestätigte somit die Korrelation zwischen der GM-CSF Produktion und der Krankheitsaktivität.

3.1.7 Regulation des IL-3 Rezeptors auf Basophilen Granulozyten und plasmazytoiden Dendritischen Zellen bei SLE

Zur Untersuchung der Regulation des IL-3 Rezeptors auf Basophilen Granulozyten und plasmazytoiden Dendritischen Zellen wurden unterschiedliche Assays aus Vollblutproben der Lupuspatienten angelegt (siehe 2.2.9). Die Proben wurden entweder mit oder ohne Stimulans für 23,5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Expression der β -Kette des IL-3 Rezeptors (=CD131) auf den Immunzellen mittels Durchflusszytometrie gemessen.

8a)



8b)

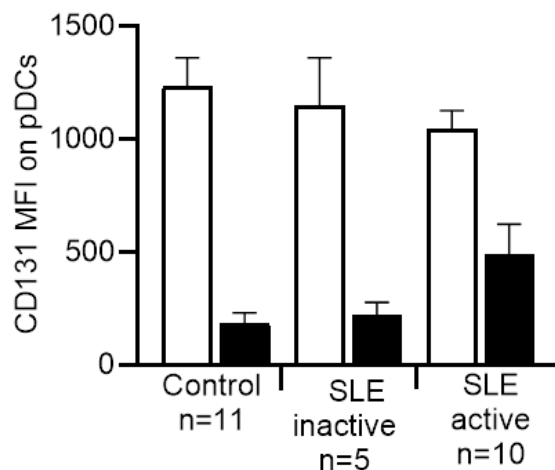


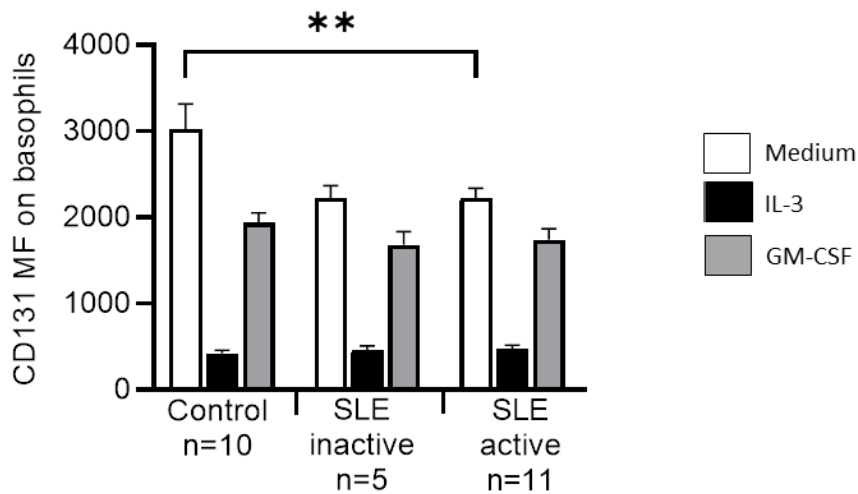
Abbildung 8: Expression von CD131 auf: 8a) Basophilen Granulozyten und 8b) pDCs ohne Stimulation (=Medium) und nach Stimulation mit Anti-CD3. SLE Patienten wurden mit gesunden Kontrollprobanden (=Control) verglichen. Die Einteilung der SLE Patienten in aktiv (=SLE active) und inaktiv (=SLE inactive) erfolgte anhand der klinischen Erkrankungsaktivität. Die Einzelwerte sind als Dots dargestellt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Proben. Die statistische Berechnung der Signifikanzen wurde mittels One-Way ANOVA mit Bonferroni Post-Test durchgeführt.

In Abbildung 8 ist zu erkennen, dass die β -Kette des IL-3 Rezeptors (=CD131) auf Basophilen Granulozyten und pDCs von aktiven Lupuspatienten ohne Stimulation nach 23,5 Stunden bereits herunterreguliert wurde. Im Vergleich der Basophilen Granulozyten gesunder Probanden und aktiv Erkrankter zeigte sich in Abb. 8a ein signifikanter Unterschied der

CD131 Expression ohne vorherige Stimulation. Bei den pDCs der Aktiven (Abb. 8b) ließ sich ebenfalls eine leichte Herunterregulierung der unstimulierten CD131 Expression detektieren, diese war verglichen mit der der Inaktiven oder der Kontrollen jedoch nicht signifikant größer. Durch die Stimulation mit Anti-CD3 ergaben sich bei beiden Zelltypen keine wesentlichen Unterschiede in der Rezeptorregulation zwischen den Patientengruppen und der Kontrollgruppe.

Neben Anti-CD3 wurden auch Assays mit den Stimulantien IL-3 und GM-CSF angelegt. Dadurch sollte untersucht werden, ob die Basophilen Granulozyten sowie die plasmazytoiden Dendritischen Zellen von SLE Patienten sensibler auf eine Stimulation durch diese Wachstumsfaktoren reagieren als gesunde Probanden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

9a)



9b)

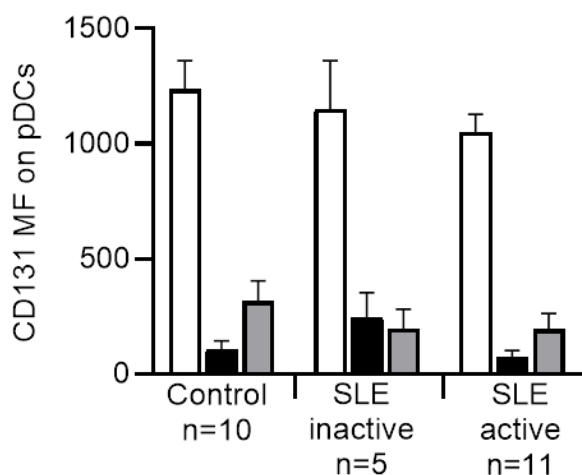


Abbildung 9: Expression von CD131 auf: 9a) Basophilen Granulozyten und 9b) pDCs ohne Stimulation (=Medium) und nach Stimulation mit IL-3 bzw. GM-CSF. SLE Patienten wurden mit gesunden Kontrollprobanden (=Control) verglichen. Die Einteilung der SLE Patienten in aktiv (=SLE active) und inaktiv (=SLE inactive) erfolgte anhand der klinischen Erkrankungsaktivität. Die Einzelwerte sind als Dots dargestellt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Proben. Die statistische Berechnung der Signifikanzen wurde mittels One-Way ANOVA mit Bonferroni Post-Test durchgeführt.

Wie in Abb. 8a ist auch in Abb. 9a erkennbar, dass aktive SLE Patienten ohne Stimulation weniger CD131 auf Basophilen Granulozyten exprimierten. Dies war in Gegenüberstellung mit der Regulation bei den Kontrollen hoch signifikant stärker ausgeprägt. Nach Stimulation mit IL-3 bzw. GM-CSF wurde die β -Kette des IL-3 Rezeptors sowohl bei aktiven als auch

inaktiven SLE Patienten auf das gleiche Niveau herunterreguliert wie bei der gesunden Kontrollgruppe. Hieraus lässt sich ableiten, dass die Basophilen Granulozyten und pDCs von SLE Patienten weder sensibilisiert noch desensibilisiert auf eine Stimulation mit IL-3 bzw. GM-CSF reagierten.

3.2 Psoriasisarthritis

3.2.1 Basischarakteristika der PsA Patienten

In diese Studie wurden 46 Patienten mit einer diagnostizierten Psoriasis-Arthritis inkludiert. Anhand des DAS28-ESR (= **D**isease **A**ctivity **S**core **28**-**J**oint count **E**rythrocyte **S**edimentation **R**ate) Wertes wurden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt. 26 Patienten mit fehlender Krankheitsaktivität und DAS28-ESR Werten $\leq 2,6$ wurden dem Remissionsstadium zugeordnet. Die übrigen 20 Patienten wiesen mit DAS28-ESR-Werten $> 2,6$ eine niedrige bis hohe Krankheitsaktivität auf. Der DAS28-ESR errechnete sich anhand folgender Formel:

$$\text{DAS28-ESR} = 0,56 * \sqrt{\text{druckschmerzhaftige Gelenke}} + 0,28 * \sqrt{\text{geschwollenen Gelenke}} + 0,70 * \ln(\text{ESR}) + 0,014 * \text{Krankheitszustand (VAS)} \quad (132).$$

Dafür wurde die Zahl der von Druckschmerzhaftigkeit bzw. Schwellung betroffenen Gelenke von insgesamt 28 Gelenken sowie der vom Patienten individuell eingeschätzte Krankheitszustand ermittelt.

Analog zu den SLE Patienten (siehe 3.1) wurden auch die PsA Patienten mit 39 gesunden Kontrollprobanden verglichen. Der nachfolgenden Tabelle 17 können grundlegende Informationen über die PsA Patienten entnommen werden.

	Healthy Control (n=39)	PsA DAS28-ESR $\leq$ 2.6 (n=26)	PsA DAS28-ESR $>$ 2.6 (n=20)
Demographics:			
Mean age (years)	37	55	60
Females n (%)	41 %	58 %	45 %
PsA duration (months)	-	164	162
Symptoms:			
Painful joint count	-	0.3	4.3
Swollen joint count	-	0.1	2.6
Laboratory values:			
CRP mg/l		4.4	7.3
ESR 1 h / 2 h		7.4 / 17.4	21.2 / 39.5
Steroids:			
Steroids (%)	-	12 %	30 %
Steroids mg / day	-	0.7	4.0
Biologics:			
TNF inhibitors (%)		35 %	35 %
IL-17 antagonists (%)	-	0 %	5 %
DMARDs:			
MTX	-	65 %	60 %
Others	-	8 %	5 %
NSAIDs:			
	-	8 %	35 %

Tabelle 17: Basischarakteristika der PsA Patienten. PsA Patienten wurden mit gesunden Kontrollprobanden (=Healthy Control) verglichen. Die Einteilung der PsA Patienten in zwei Gruppen erfolgte anhand der DAS28-ESR-Werte.

Im Durchschnitt waren die Patienten in Remission 55 Jahre, die im aktiven Krankheitsstadium 60 Jahre alt. Die Geschlechterverteilung war nahezu ausgeglichen. Von den Patienten mit DAS28-ESR $\leq$ 2,6 waren 58% weiblich, von denen mit DAS28-ESR $>$ 2,6 45%. Die Vergleichsgruppe der Kontrollen bestand zu 41% aus Frauen. Die Patientengruppe mit niedriger bis hoher Krankheitsaktivität gab durchschnittlich deutlich mehr geschwollene oder schmerzende Gelenke an als die Patientengruppe in Remission. Auch die laborchemischen Entzündungsparameter spiegeln die Krankheitsaktivität der zwei Patientengruppen wider.

Sowohl der ESR Wert nach einer Stunde, als auch der nach 2 Stunden war in der DAS28-ESR >2,6 Gruppe mehr als doppelt so hoch wie in der anderen Patientengruppe. Eine Therapie mit Steroiden erhielten 18% mehr Patienten mit aktiver PsA als Patienten in Remission. Die verabreichte Dosis an steroidalen Medikamenten war bei den Patienten mit niedriger bis hoher Krankheitsaktivität mit 4,0mg/Tag mehr als fünfmal so hoch wie bei den inaktiv Erkrankten. Mit IL-17 Antagonisten wurden ausschließlich Patienten im aktiven Krankheitsstadium behandelt, wohingegen der Anteil der mit TFN- α -Inhibitoren therapierten Patienten in beiden Patientengruppen gleich war. Im Gegensatz zu den Patienten mit DAS28-ESR >2,6 erhielt ein geringer Mehranteil der Patienten mit DAS28-ESR $\leq$ 2,6 das Immunsuppressivum Methotrexat. 27% mehr aktiv als inaktiv Erkrankte bekamen eine Therapie mit NSAIDs.

3.2.2 Zytokin-Produktion im Zellkultur-Überstand von PsA Patienten

Die Quantifizierung der von PBMCs gebildeten Zytokine in den Überständen der Zellkultur von PsA Patienten mittels ELISA erfolgte analog zum Vorgehen bei den SLE Patienten (siehe 3.1.4). Auch hier war von Interesse, ob die Zytokin-Produktion in Abhängigkeit zur Krankheitsaktivität steht.

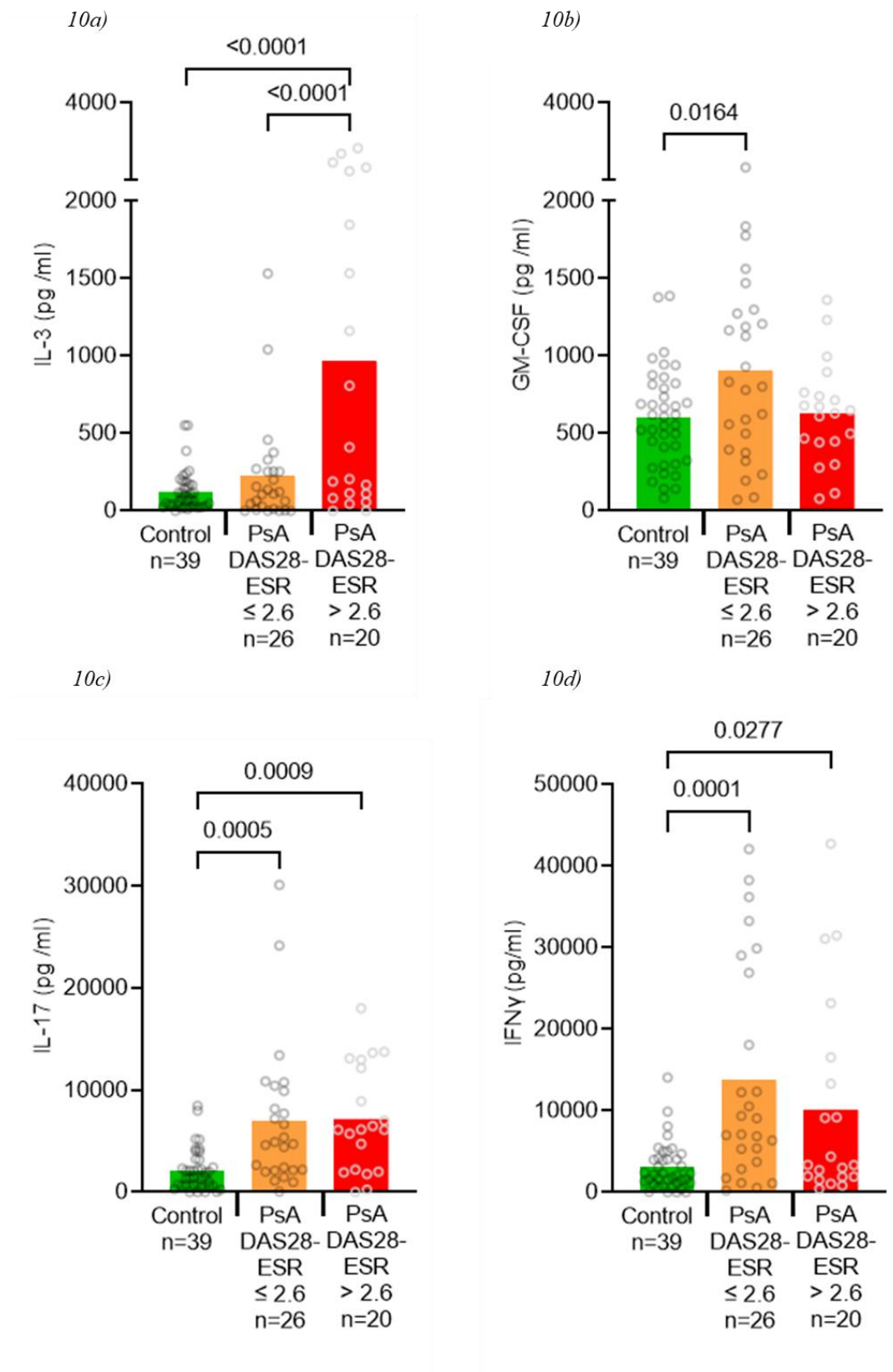


Abbildung 10: Darstellung der Zytokin Konzentration in pg/ml gemessen im Zellkultur-Überstand: 10a) IL-3, 10b) GM-CSF, 10c) IL-17, 10d) IFN γ . PsA Patienten wurden mit gesunden Kontrollprobanden (=Control) verglichen. Die Einteilung der PsA Patienten erfolgte anhand der DAS28-ESR Werte in zwei Gruppen ($\leq 2,6$ = keine Krankheitsaktivität, $> 2,6$ = niedrige bis hohe Krankheitsaktivität). Die Einzelwerte sind als Dots dargestellt. Die Balken repräsentieren die

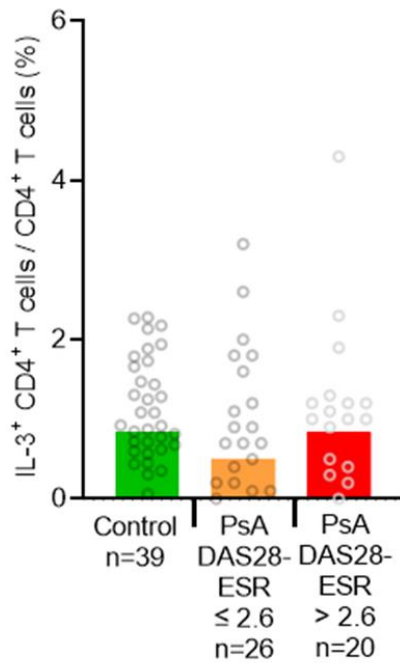
Mittelwerte der Proben. Die statistische Berechnung der Signifikanzen wurde mittels One-Way ANOVA mit Bonferroni Post-Test durchgeführt.

Betrachtet man Abb. 10a, wird - wie beim SLE - bei PsA Patienten mit Krankheitsaktivität eine höchst signifikant höhere IL-3 Bildung ersichtlich als bei gesunden Kontrollen ($p < 0,0001$). Ebenso im Vergleich der beiden PsA Gruppen untereinander bestand ein höchst signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$). Bei der Messung von GM-CSF (Abb. 10b) fiel bei PsA Patienten ohne Krankheitsaktivität eine signifikant größere GM-CSF Ausschüttung auf als bei Kontrollprobanden ($p = 0,0164$). Patienten, bei denen der DAS28-ESR $> 2,6$ lag, zeigten nur eine geringfügig größere GM-CSF Produktion als Gesunde, die aber geringer war als die der Patienten mit DAS28-ESR $\leq 2,6$. Bei IFN γ waren ähnliche Ergebnisse zu verzeichnen (Abb. 10d). Die PBMCs inaktiver Patienten exprimierten hoch signifikant mehr des Zytokins als die der Kontrollgruppe ($p = 0,0001$). Hier zeigte sich jedoch auch ein signifikanter Unterschied zwischen den aktiv Erkrankten und den Gesunden ($p = 0,0277$). Wie auch beim GM-CSF ELISA war die größte IFN γ Ausschüttung bei den inaktiven PsA Patienten zu sehen. Die Untersuchung auf IL-17 (Abb. 10c) ergab wieder ähnliche Ergebnisse wie beim IL-3 ELISA. Patienten im aktiven Krankheitsstadium produzierten höchst signifikant mehr IL-17 als Kontrollpersonen ($p = 0,0009$). Selbiges galt für Patienten ohne Krankheitsaktivität im Vergleich zu den Kontrollen ($p = 0,0005$). Zwischen den beiden PsA Patientengruppen bestand kein signifikanter Unterschied in der IL-17 Expression.

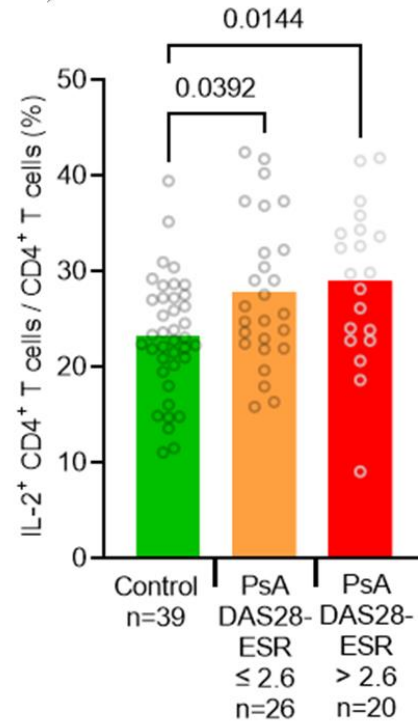
3.2.3 CD4⁺ T-Zellen als potentielle Quelle immunregulatorischer Zytokine bei PsA

Zur Messung der von CD4⁺ T-Zellen produzierten Zytokine wurden die Zellen intrazellulär angefärbt und nachfolgend im Durchflusszytometer aufgetrennt (siehe 2.2.8).

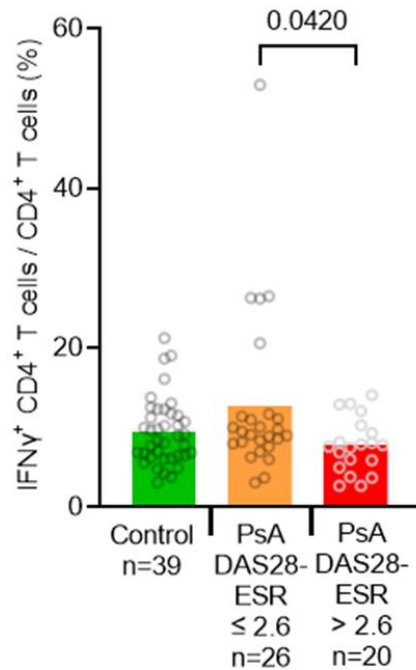
11a)



11b)



11c)



11d)

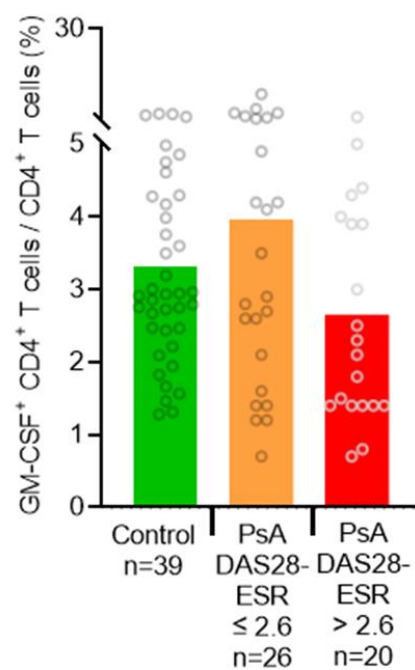


Abbildung 11: Anteil der Zytokin exprimierenden CD4⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4⁺ T-Zellen in Prozent nach intrazellulärer Färbung auf: 11a) IL-3, 11b) IL-2, 11c) IFNγ, 11d) GM-CSF. PsA Patienten wurden mit gesunden Kontrollprobanden (=Control) verglichen. Die Einteilung der PsA Patienten erfolgte anhand der DAS28-ESR Werte in zwei Gruppen (≤2,6 = keine Krankheitsaktivität, >2,6 = niedrige bis hohe Krankheitsaktivität). Die Einzelwerte sind als Dots

dargestellt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Proben. Die statistische Berechnung der Signifikanzen wurde mittels One-Way ANOVA mit Bonferroni Post-Test durchgeführt.

Aus Abbildung 11a geht hervor, dass sich zwischen keiner der drei untersuchten Gruppen der Anteil an IL-3⁺ CD4⁺ T-Zellen an allen CD4⁺ T-Zellen maßgeblich unterschied. Auch bei der Untersuchung der GM-CSF⁺ CD4⁺ T-Zellen ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen feststellen (Abb. 11d). Bei der intrazellulären Anfärbung der CD4⁺ T-Zellen auf IL-2 (Abb. 11b) zeigte sich jedoch bei den PsA Patienten mit vorhandener Krankheitsaktivität ein signifikant höherer Anteil der gesuchten Zellen als bei den Kontrollen (p=0,0144). Auch bei Patienten im inaktiven Krankheitsstadium war im Vergleich zu Gesunden der prozentuale Anteil IL-2⁺ CD4⁺ T-Zellen signifikant höher (p=0,0392). Die zwei Patientengruppen unterschieden sich untereinander jedoch nicht wesentlich. Die Analyse auf IFN γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen (Abb. 11c) ergab lediglich für die PsA Patienten mit DAS28-ESR $\leq 2,6$ in Gegenüberstellung mit der zweiten PsA Patientengruppe einen signifikant höheren Anteil an der Gesamtzahl der CD4⁺ T-Zellen (p=0,0420).

3.2.4 CD8⁺ T-Zellen als potentielle Quelle immunregulatorischer Zytokine bei PsA

Auf die gleiche Weise wie die CD4⁺ T-Zellen wurden auch die CD8⁺ T-Zellen der PsA Patienten intrazellulär auf IL-3, IL-2, IFN γ sowie GM-CSF gefärbt, um zu untersuchen, welche Menge an Zytokinen die unterschiedlichen Versuchsgruppen intrazellulär freisetzten. Die Auftrennung nach Zell- und Zytokintyp erfolgte mittels FACS-Analyse.

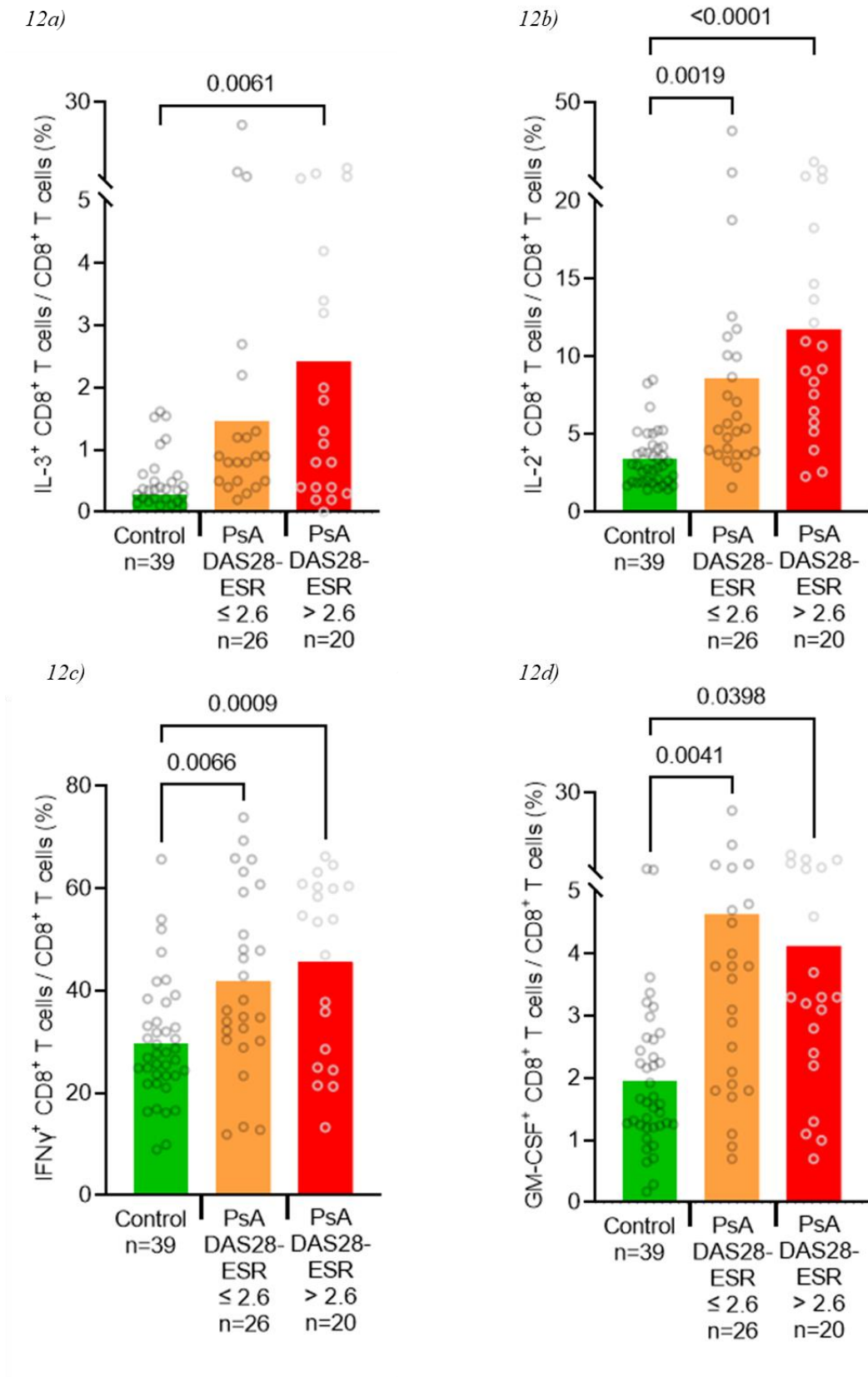


Abbildung 12: Anteil der Zytokin exprimierenden CD8⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen in Prozent nach intrazellulärer Färbung auf: 12a) IL-3, 12b) IL-2, 12c) IFN γ , 12d) GM-CSF. PsA Patienten wurden mit gesunden Kontrollprobanden (=Control) verglichen. Die Einteilung der PsA Patienten erfolgte anhand der DAS28-ESR Werte in zwei Gruppen ($\leq 2,6$ = keine

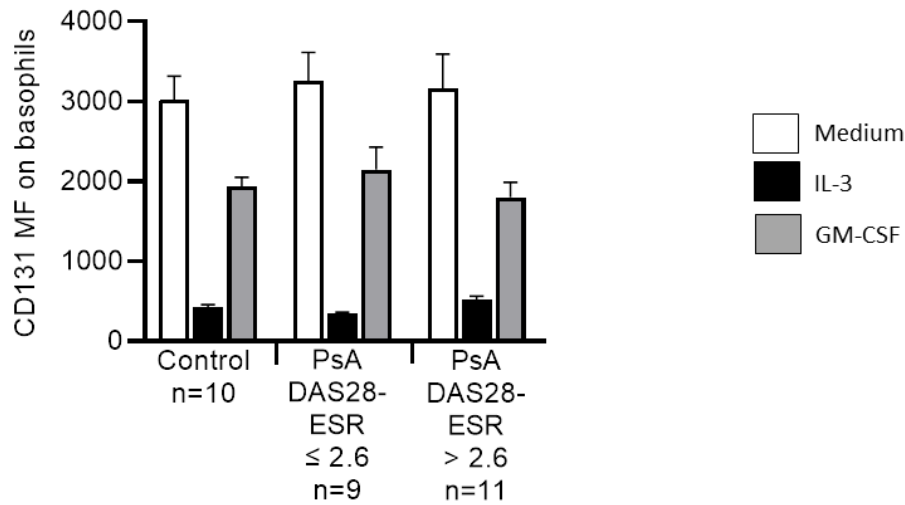
Krankheitsaktivität, $>2,6$ = niedrige bis hohe Krankheitsaktivität). Die Einzelwerte sind als Dots dargestellt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Proben. Die statistische Berechnung der Signifikanzen wurde mittels One-Way ANOVA mit Bonferroni Post-Test durchgeführt.

In der Abb. 12a erkennt man bei PsA Patienten mit Krankheitsaktivität hoch signifikant mehr IL-3⁺ CD8⁺ T-Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen als bei gesunden Kontrollen ($p=0,0061$). Erkrankte in Remission zeigten ebenfalls mehr der genannten Zellen, jedoch fiel der Vergleich mit den Kontrollen nicht signifikant aus. Abb. 12b legt dar, dass der Anteil IL-2⁺ CD8⁺ T-Zellen an allen CD8⁺ T-Zellen sowohl bei aktiv Kranken als auch bei inaktiv Kranken höchst bzw. hoch signifikant größer war als bei den Kontrollprobanden ($p<0,0001$ bzw. $p=0,0019$). Die Patientengruppen unterschieden sich untereinander nicht in signifikantem Maße. Ähnliche Ergebnisse zeigt auch die Abb. 12c. PsA Patienten mit Krankheitsaktivität wiesen anteilig höchst signifikant mehr IFN γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen auf als Gesunde ($p=0,0009$). Als hoch signifikant erwies sich der Unterschied zwischen Patienten in Remission und Kontrollen ($p=0,0066$). In Abb. 12d zeigt sich auch für den Wachstumsfaktor GM-CSF, dass Patienten mit DAS28-ESR $>2,6$ prozentual signifikant mehr GM-CSF⁺ CD8⁺ T-Zellen bildeten als gesunde Probanden ($p=0,0398$). Interessanterweise war dieser Unterschied bei den Patienten mit DAS28-ESR $\leq 2,6$ sogar hoch signifikant ($p=0,0041$).

3.2.5 Regulation des IL-3 Rezeptors auf Basophilen Granulozyten und plasmazytoiden Dendritischen Zellen bei PsA

Auch bei den PsA Patienten wollte man untersuchen, wie sich die Expression der β -Kette des IL-3 Rezeptors auf Basophilen Granulozyten und pDCs durch Stimulation mit den Wachstumsfaktoren IL-3 und GM-CSF im Vergleich zu gesunden Menschen unterscheidet. Dafür wurden die Vollblutproben der PsA Patienten mit den entsprechenden Zusätzen für 23,5 Stunden im Inkubator belassen, anschließend extrazellulär auf CD131 angefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (siehe 2.2.9).

13a)



13b)

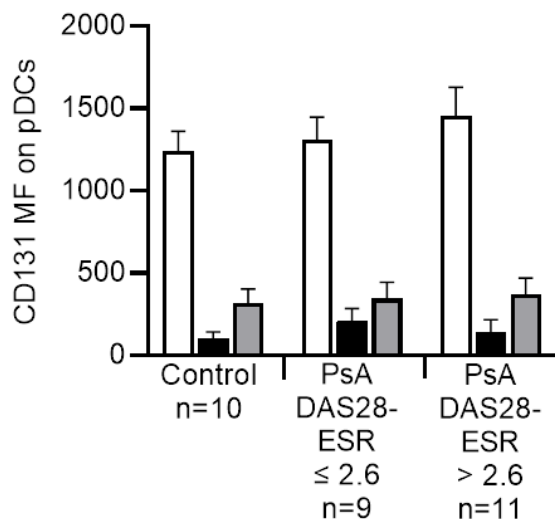


Abbildung 13: Expression von CD131 auf: 13a) Basophilen Granulozyten und 13b) pDCs ohne Stimulation (=Medium) und nach Stimulation mit IL-3 bzw. GM-CSF. PsA Patienten wurden mit gesunden Kontrollprobanden (=Control) verglichen. Die Einteilung der PsA Patienten erfolgte anhand der DAS28-ESR Werte in zwei Gruppen ($\leq 2,6$ = keine Krankheitsaktivität, $> 2,6$ = niedrige bis hohe Krankheitsaktivität). Die Einzelwerte sind als Dots dargestellt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Proben. Die statistische Berechnung der Signifikanzen wurde mittels One-Way ANOVA mit Bonferroni Post-Test durchgeführt.

In Abb. 13 ist, analog zu Abb. 9, weder auf Basophilen Granulozyten noch auf pDCs ein Unterschied in der Expression der β -Rezeptorkette CD131 nach Stimulation mit IL-3 bzw. GM-CSF zwischen Kranken und Gesunden zu erkennen.

3.3 Granulomatose mit Polyangiitis

3.3.1 Basischarakteristika der GPA Patienten

In der Gruppe der GPA Patienten wurde aufgrund der kleinen Zahl der Studienteilnehmer auf eine Einteilung in aktives oder inaktives Krankheitsstadium verzichtet. Wie bei den anderen Krankheitsbildern wurden auch die PsA Patienten mit 39 gesunden Kontrollprobanden verglichen. Von den 15 integrierten Patienten waren zwei Drittel weiblich. Das Durchschnittsalter lag bei 64 Jahren. Jeweils 40% der Erkrankten wurden mit Rituximab oder Methotrexat therapiert. Azathioprin wurde dagegen nur in 13% der Fälle eingesetzt. Das Steroid Prednisolon erhielten 73% der Studienteilnehmer, mit einer durchschnittlichen Dosis von 4,8mg pro Tag. Der Entzündungswert CRP lag im Durchschnitt bei 3,4mg/Liter. Für die Blutsenkungsgeschwindigkeit (ESR) wurden Werte von 12,2mm nach einer und 27,0mm nach zwei Stunden gemessen.

	Healthy Control (n=39)	GPA (n=15)
Demographics:		
Mean age (years)	37	64
Females n (%)	41 %	67 %
GPA duration (months)	-	125
Medication:		
Rituximab (%)	-	40 %
MTX (%)	-	40 %
Azathioprin (%)	-	13 %
Prednisolon (%)	-	73 %
Prednisolon (mg/day)		4.8
Laboratory values:		
CRP mg/l		3.4
ESR 1 h / 2 h		12.2 / 27.0

Tabelle 18: Basischarakteristika der GPA Patienten. GPA Patienten wurden mit gesunden Kontrollprobanden (=Healthy Control) verglichen. Aufgrund der geringen Patientenzahl wurde bei der GPA auf eine Einteilung der Patienten nach Krankheitsaktivität verzichtet.

3.3.2 Zytokin-Produktion im Zellkultur-Überstand von GPA Patienten

Auch bei den Patienten mit einer diagnostizierten GPA inkubierte man je Patient 500.000 Zellen pro Well in einer 96-Loch Zellkulturplatte mit löslichem Anti-CD3 für drei Tage im Brutschrank (siehe 2.2.7). Mit dem Zellkulturüberstand wurden anschließend ELISAs auf bestimmte Zytokine durchgeführt (siehe 2.2.10). So wollte man die unterschiedlich stark ausgeprägte Zytokin-Produktion von Gesunden und an GPA Erkrankten untersuchen.

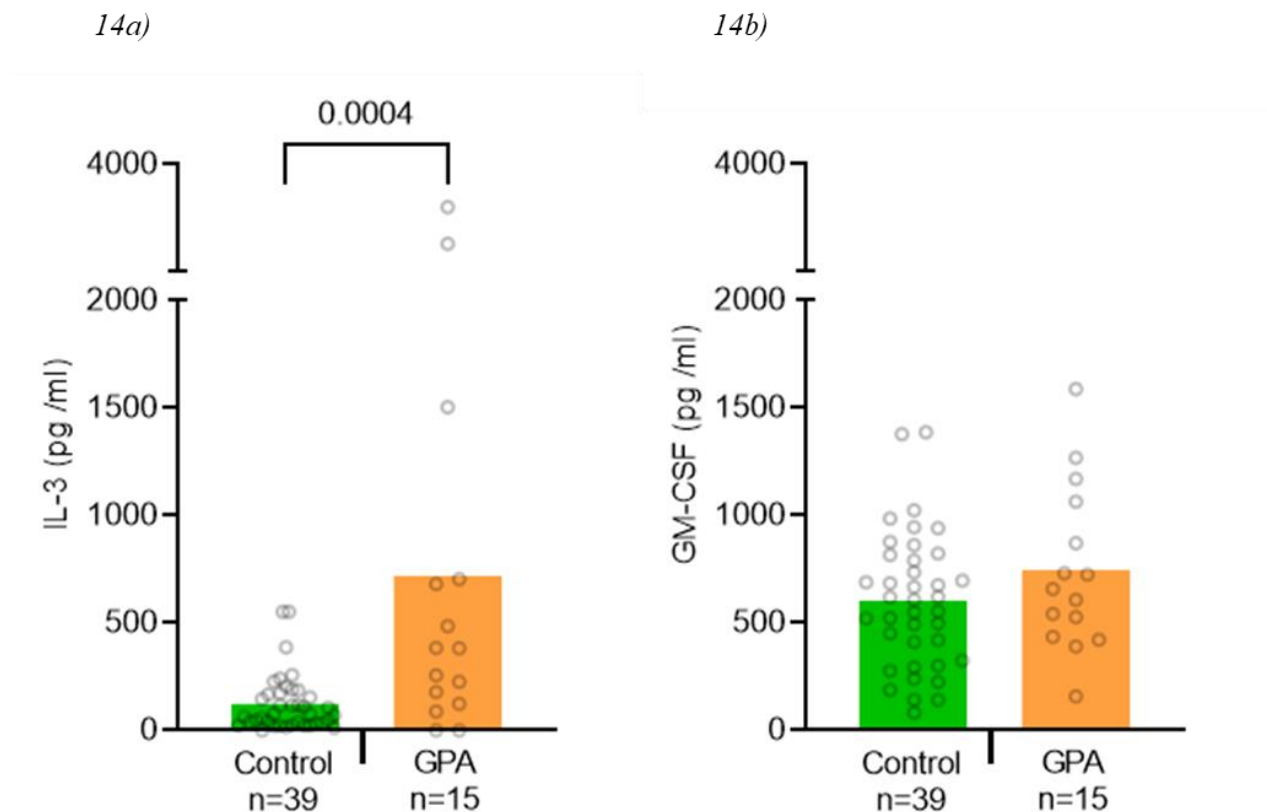


Abbildung 14: Darstellung der Zytokin Konzentration in pg/ml gemessen im Zellkultur-Überstand: 14a) IL-3, 14b) GM-CSF. GPA Patienten wurden mit gesunden Kontrollprobanden (= Control) verglichen. Aufgrund der geringen Patientenzahl wurde bei der GPA auf eine Einteilung der Patienten nach Krankheitsaktivität verzichtet. Die Einzelwerte sind als Dots dargestellt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Proben. Die statistische Berechnung der Signifikanzen wurde mittels 2-sided unpaired Students T-Test durchgeführt.

Aus Abbildung 14a geht hervor, dass Patienten mit GPA höchst signifikant mehr IL-3 ausschütteten als gesunde Kontrollprobanden ($p=0,0004$). Dieser Zusammenhang konnte nun für alle drei untersuchten Krankheiten gezeigt werden (vgl. Abb. 5a und 10a). Im Hinblick auf die Produktion von GM-CSF zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kranken und Gesunden (Abb. 14b).

3.3.3 $CD4^+$ T-Zellen als potentielle Quelle immunregulatorischer Zytokine bei GPA

Zur Darstellung der intrazellulär freigesetzten Zytokine in $CD4^+$ T-Zellen wurden die Zellen intrazellulär auf $IFN\gamma$, IL-3 bzw. IL-2 angefärbt und anschließend im FACS-Gerät analysiert.

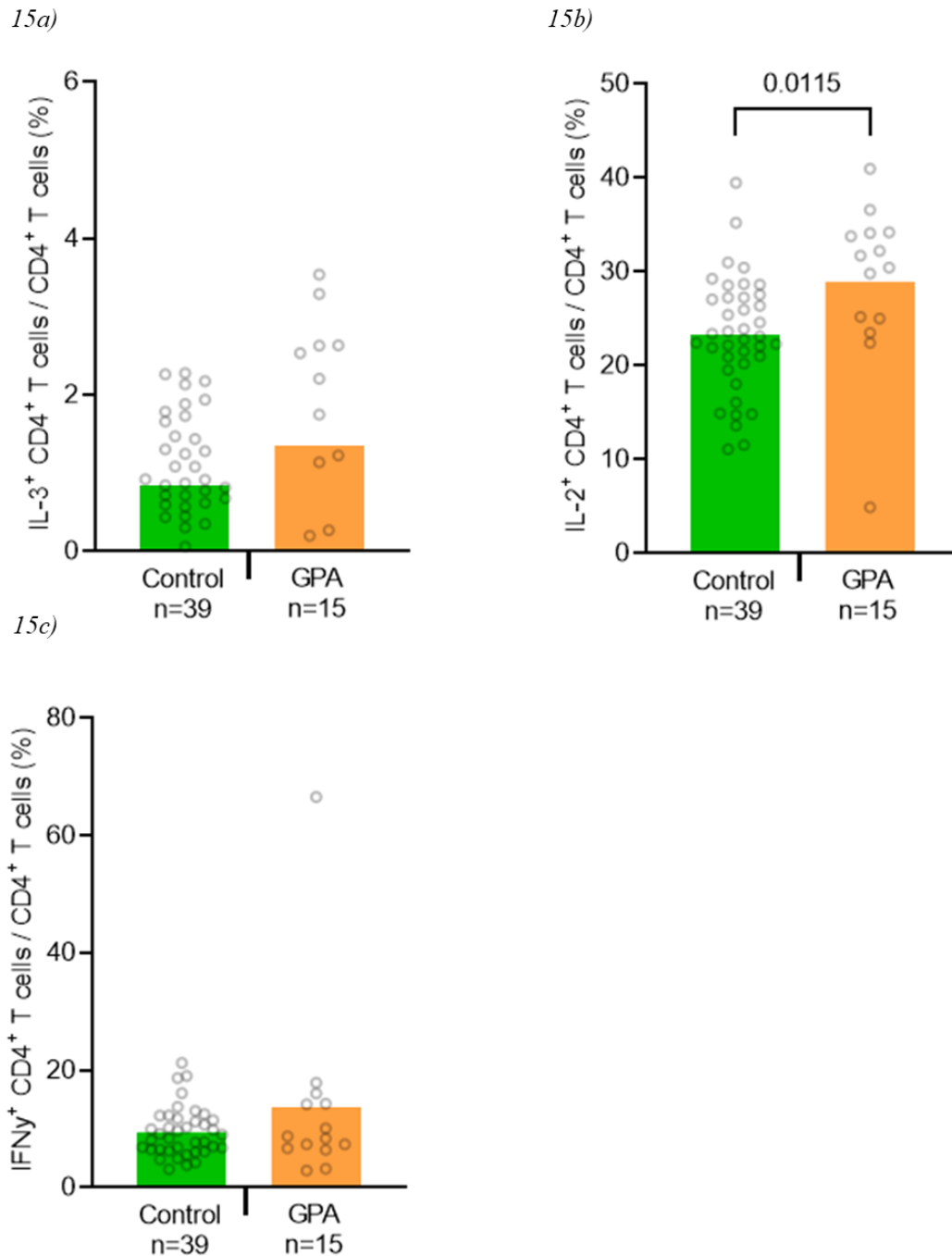


Abbildung 15: Anteil der Zytokin exprimierenden $CD4^+$ T-Zellen an der Gesamtzahl der $CD4^+$ T-Zellen in Prozent nach intrazellulärer Färbung auf: 15a) IL-3, 15b) IL-2, 15c) $IFN\gamma$. GPA Patienten wurden mit gesunden Kontrollprobanden (= Control) verglichen. Aufgrund der geringen Patientenzahl wurde bei der GPA auf eine Einteilung der Patienten nach Krankheitsaktivität verzichtet. Die Einzelwerte sind als Dots dargestellt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der

Proben. Die statistische Berechnung der Signifikanzen wurde mittels 2-sided unpaired Students T-Test durchgeführt.

Betrachtet man Abb. 15, fällt lediglich bei der Analyse auf IL-2⁺ CD4⁺ T-Zellen (Abb. 15b) ein signifikanter Unterschied im prozentualen Anteil an der Gesamtzahl der CD4⁺ T-Zellen zwischen GPA Patienten und Kontrollen auf ($p=0,0115$). CD4⁺ T-Zellen von Erkrankten produzierten nicht erheblich mehr IL-3 (Abb. 15a) oder IFN γ (Abb. 15c) als die Vergleichsgruppe.

3.3.4 $CD8^+$ T-Zellen als potentielle Quelle immunregulatorischer Zytokine bei GPA

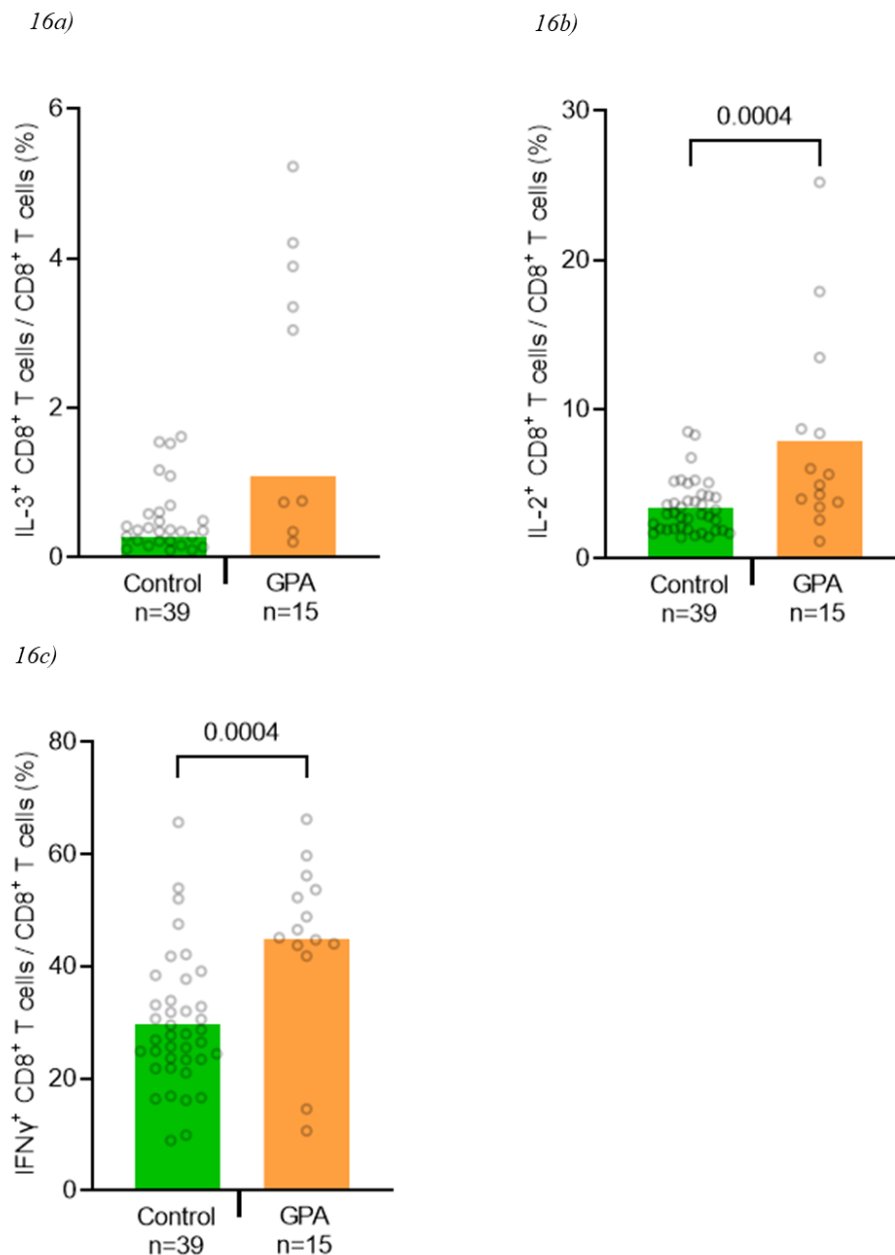


Abbildung 16: Anteil der Zytokin exprimierenden $CD8^+$ T-Zellen an der Gesamtzahl der $CD8^+$ T-Zellen in Prozent nach intrazellulärer Färbung auf: 16a) IL-3, 16b) IL-2, 16c) IFN γ . GPA Patienten wurden mit gesunden Kontrollprobanden (= Control) verglichen. Aufgrund der geringen Patientenzahl wurde bei der GPA auf eine Einteilung der Patienten nach Krankheitsaktivität verzichtet. Die Einzelwerte sind als Dots dargestellt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Proben. Die statistische Berechnung der Signifikanzen wurde mittels 2-sided unpaired Students T-Test durchgeführt.

In der Untersuchung der intrazellulären Zytokin-Produktion von $CD8^+$ T-Zellen zeigte sich, dass analog zu den $CD4^+$ T-Zellen auch hier GPA Patienten mehr IL-2 produzierten als

Kontrollprobanden (Abb. 16b). Dieser Unterschied war höchst signifikant ($p=0,0004$). Ähnlich verhielt es sich mit der $\text{IFN}\gamma$ Produktion (Abb. 16c). An GPA Erkrankte bildeten höchst signifikant mehr $\text{IFN}\gamma$ als ihre gesunde Vergleichsgruppe ($p=0,0004$). In der IL-3 Produktion (Abb. 16a) ließ sich lediglich ein Trend zu höheren Konzentrationen bei den GPA Erkrankten feststellen. Allerdings fand sich bei den GPA Erkrankten eine Patientenpopulation mit stark erhöhter IL-3 Produktion und eine, deren IL-3 Konzentration im Bereich der Kontrollgruppe lag.

4 Diskussion

4.1 Steigende IL-3 Produktion mit zunehmender Krankheitsaktivität bei SLE, PsA und GPA

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass Patienten mit SLE, PsA oder GPA wesentlich höhere Konzentrationen an IL-3 in den Überständen der Zellkultur aufwiesen als gesunde Kontrollen und dass die Werte mit zunehmender Krankheitsaktivität signifikant anstiegen. Somit schienen also IL-3 Ausschüttung und Krankheitslevel positiv zu korrelieren. Aufgrund dieser Beobachtung könnte man folglich annehmen, dass eine gesteigerte IL-3 Produktion zu einem gravierenderen Krankheitsverlauf führt. In der Literatur finden sich einige Studien, die bereits einen Zusammenhang zwischen der IL-3 Expression und dem Krankheitsverlauf verschiedener Autoimmunerkrankungen herstellten. Im Mausmodell der Experimentellen autoimmunen Enzephalitis, der Frühphase der Kollagen-induzierten Arthritis sowie der Lupusnephritis wurde IL-3 als wichtiger Mediator der Pathogenese und des Krankheitsprogresses identifiziert. In allen drei Modellen konnten durch die Blockierung von IL-3 mit einem monoklonalen Antikörper klinische und histologische Verbesserungen erzielt werden, während die Zufuhr von IL-3 zur Exazerbation des Krankheitsstadiums führte (97, 122, 123). Auch bei Sepsispatienten konnte eine Beteiligung von IL-3 an der Inflamationsreaktion bewiesen werden. *Weber et al.* zeigten, dass höhere IL-3 Konzentrationen im Plasma mit einer erhöhten Mortalität einhergingen (103). Kürzlich stellten auch *Anzai et al.* einen Zusammenhang zwischen der IL-3 Ausschüttung durch T-Zellen und der Exazerbation der autoimmunen Inflammation im Krankheitsbild der Myokarditis her. Diese Forschergruppe erreichte ebenfalls durch die Therapie mit einem Anti-IL-3-AK Verbesserungen der akuten Entzündung in erkrankten Mäusen (133).

Die genannten Studien untermauern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. IL-3 ist Teil der chronischen Inflamationsreaktion in Autoimmunerkrankungen und könnte daher einen neuen Angriffspunkt in der Behandlung solcher Erkrankungen darstellen.

4.2 IL-3 Produktion durch T-Zellen bei SLE, PsA und GPA

Als Quellen von IL-3 gelten nach aktueller Datenlage neben Mastzellen (100), Basophilen Granulozyten (101) und B-Zellen (103) vor allem CD4⁺ T-Zellen, also T-Helferzellen (97, 122). In dieser Forschungsarbeit wurden jedoch die CD8⁺ T-Zellen als überwiegende Produzenten von IL-3 identifiziert. Betrachtet man die Quantifizierung der IL-3⁺ T-Zellen von SLE bzw. PsA Patienten im aktiven Krankheitsstadium ließ sich im Vergleich zu den Kontrollprobanden nur bei den CD8⁺ T-Zellen, nicht aber bei den CD4⁺ T-Zellen ein hoch signifikanter Unterschied feststellen. Beim SLE fiel auch der Unterschied zwischen aktiven und inaktiven Patienten signifikant aus, weswegen man auf einen direkten Zusammenhang zwischen der IL-3 Expression in CD8⁺ T-Zellen und der Krankheitsschwere schließen könnte. Bei der GPA ergaben sich im Vergleich von Erkrankten und Gesunden für beide T-Zelltypen ebenfalls Trends hin zu mehr IL-3⁺ Zellen. Die Beobachtung, dass der Anteil IL-3⁺ CD8⁺ T-Zellen bei den Patienten mit hoher Krankheitsaktivität am größten war, spiegelt die Ergebnisse der im Zellkulturüberstand gemessenen IL-3 Konzentrationen wider. Einige andere Studienergebnisse stützen die Beobachtung einer dominierenden Rolle der CD8⁺ T-Zellen in inflammatorischen Prozessen. *Stoeckle et al.* konnten in einer Studie eine erhöhte Produktion von IL-3 durch CD8⁺ T-Zellen nachweisen und postulierten, dass neben den CD4⁺ auch die CD8⁺ T-Zellen als relevante Zytokinquelle berücksichtigt werden sollten. Allerdings beziehen sich diese Daten auf Blutproben von Patienten mit nicht IgE-vermittelter Eosinophilie (134). Bei der Untersuchung der Synovialflüssigkeit von Patienten mit PsA wurde eine signifikant größere Population von CD8⁺ T-Zellen festgestellt als bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis. Bei den PsA Patienten zeigte sich sogar eine Umkehrung der CD4:CD8 Ratio zugunsten der CD8⁺ T-Zellen. Der Vergleich des T-Zellmusters von PsA Patienten und gesunden Kontrollen im peripheren Blut erbrachte jedoch keinen wesentlichen Unterschied (135). Bei Patienten mit schwerer Lupusnephritis identifizierten *Couzi et al.* unter allen renal infiltrierenden Immunzellen die CD8⁺ T-Zellen als vorherrschenden Typ. Die Einwanderung der CD8⁺ T-Zellen in die Niere korrelierte sowohl positiv mit Markern zur Bestimmung der Krankheitsaktivität, als auch mit den Anteilen der CD8⁺ Zellen im Blut (136).

Für die CD4⁺ T-Zellen ließ sich bei SLE und PsA kein Zusammenhang zwischen IL-3 Produktion und Krankheitsaktivität feststellen. Nur bei den GPA Patienten konnte man einen Anstieg des Anteils IL-3⁺ CD4⁺ T-Zellen in Gegenüberstellung mit den Kontrollen erkennen. Da dieser Unterschied jedoch nicht signifikant ausfiel und aufgrund der relativ kleinen Kohorte nicht zwischen aktiven und inaktiven GPA Patienten unterschieden wurde, lässt sich

hier nicht auf eine Korrelation von Krankheitsaktivität und IL-3⁺ T-Zellen schließen. Die Rolle der CD4⁺ T-Zellen an der IL-3 Produktion schien zusammenfassend eher untergeordnet zu sein.

4.3 Regulation der IL-3 Rezeptor β -Kette auf Basophilen Granulozyten und plasmazytoiden Dendritischen Zellen bei SLE und PsA

Während die α -Kette des IL-3 Rezeptors für die Zytokinbindung verantwortlich ist, beeinflusst die β -Kette (=CD131) die weitere Signaltransduktion in der exprimierenden Zelle. Für die Vermittlung der IL-3 Wirkung ist also besonders die β -Kette des Rezeptors relevant. Basophile Granulozyten und pDCs exprimieren den heterodimeren IL-3 Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche und die Bindung von IL-3 aktiviert sie in ihrer Funktion und Differenzierung (106, 137). Daher wurde besonderes Augenmerk auf die Expression der β -Rezeptorkette auf genau diesen beiden Zelltypen gelegt.

Wie in Abb. 8a zu erkennen ist, wurde die Expression der β -Rezeptorkette auf den Basophilen Granulozyten von Lupuspatienten mit hoher Krankheitsaktivität im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen ohne Stimulation bereits nach 23,5 Stunden signifikant herunterreguliert. Auch bei den inaktiven Patienten kam es zu einer deutlichen Herunterregulation von CD131 auf der Zelloberfläche. Bei den pDCs war dieser Effekt nur leicht ausgeprägt. Um zu überprüfen, ob die Basophilen Granulozyten und pDCs von Patienten mit SLE oder PsA anders auf die Konfrontation mit IL-3 bzw. GM-CSF reagieren als die Zellen von gesunden Probanden, wurden die Vollblutproben über Nacht mit den Wachstumsfaktoren inkubiert. Aus Abb. 9 und Abb. 13 ist eine Herunterregulation der β -Rezeptorkette nach Versetzen mit IL-3 oder GM-CSF bei allen Versuchsgruppen in beinahe identischem Maße ersichtlich. Basophile Granulozyten und pDCs von Erkrankten reagierten also nicht sensibler als die Zellen von Gesunden, sondern gleich. Dies bedeutet in der Folge, dass die signifikant ausgeprägtere Herabregulierung der β -Kette auf Basophilen Granulozyten von aktiven Lupuspatienten nicht durch die sensiblere Responderzelle selbst, sondern durch die erhöhte basale IL-3 Freisetzung durch die dysregulierten T-Zellen bedingt sein muss. Wurden die Zellen von gesunden Probanden bzw. Patienten jedoch für 23,5 Stunden mit immobilisiertem Anti-CD3 stimuliert, zeigte sich kein wesentlicher Unterschied mehr in der Herunterregulation der β -Kette zwischen Kranken und Gesunden. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass durch die Anti-CD3 Stimulation eine IL-3 Freisetzung in allen Gruppen erreicht wurde, die bereits zu einer

maximalen Herunterregulation von CD131 führte. Die autoimmune Inflammation geht somit scheinbar mit einer Hyperreaktivität der T-Zellen und einer erhöhten basalen IL-3 Freisetzung einher. Diese Annahme wird durch die Schlussfolgerungen von *Rother et al.* bestärkt. Die Wissenschaftler fassten in einem Review zahlreiche Studien zusammen, die sich mit der gestörten Signaltransduktion der T-Zellen von Lupuspatienten auseinandersetzten. Besonders die Signalwege des T-Zellrezeptors schienen im SLE verändert zu sein. Diese Abweichungen führen laut den Forschern zur Autoreaktivität und Überempfindlichkeit in den T-Zellen (138). Es könnte also bei der Herabregulation der β -Rezeptorkette von einer Reaktion im Sinne einer negativen Rückkopplung auf die höhere IL-3 Ausschüttung ausgegangen werden. Vermutlich handelt es sich um einen körpereigenen Mechanismus, der die potentiell inflammatorische Wirkung von IL-3 durch eine Verminderung der Signaltransduktion abmildern soll.

4.4 Weitere immunregulatorische Zytokine bei SLE, PsA und GPA

Da die Pathogenese der drei beleuchteten Autoimmunerkrankungen sehr komplex und vielschichtig ist, beschäftigte sich diese Arbeit neben IL-3 auch mit weiteren immunregulatorischen Zytokinen. Es wurde die Expression von IL-17, IL-2, IFN γ und GM-CSF untersucht.

Das Zytokin IL-17 ist maßgeblich an der Gewebeinflammation in Autoimmunerkrankungen wie dem SLE und der PsA beteiligt. Es induziert beispielsweise die Sekretion proinflammatorischer Proteine (unter anderem auch GM-CSF) und unterstützt die Differenzierung von B-Zellen und damit wiederum die Produktion von Antikörpern (64, 139, 140). Biologika, die das Zytokin bzw. die T_H17-Zellpopulation als seine Hauptquelle inhibieren, wurden bereits in mehreren Studien klinisch erprobt und erzielten vielversprechende Ergebnisse für die Behandlung des SLE und der PsA (141, 142). In der Literatur gibt es einige Studien, die eine Korrelation zwischen den IL-17 Werten im Serum von SLE Patienten und der Krankheitsaktivität nachweisen konnten (139, 143). In der vorliegenden Arbeit konnte zwar eine steigende IL-17 Dynamik mit zunehmender Krankheitsschwere der SLE Patienten festgestellt werden, jedoch fielen die Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen nicht signifikant aus. Bei den PsA Patienten ließen sich signifikant höhere IL-17 Konzentrationen als bei den gesunden Kontrollen nachweisen, der Unterschied zwischen den Patienten mit DAS28-ESR $\leq 2,6$ und DAS28-ESR $> 2,6$ war allerdings nicht signifikant.

IL-2 wird vorwiegend von aktivierten T_H -Zellen gebildet und gilt als immunregulatorisches Zytokin, das für eine normale Funktion der Leukozyten wichtig ist (144). In vielen murinen Modellen von Autoimmunerkrankungen wurde, vor allem zu Krankheitsbeginn, eine IL-2 Defizienz festgestellt, welche mit einer gestörten Funktionalität und Homöostase der regulatorischen T-Zellen (T_{reg} -Zellen) einhergeht (139). Diese haben supprimierende Eigenschaften, mit denen sie Autoimmunreaktionen unter Kontrolle halten (145). Auch im humanen SLE konnte die verminderte IL-2 Produktion und deren negative Effekte auf die T_{reg} -Zellen gezeigt werden (146). Durch die verringerte Zahl der T_{reg} -Zellen werden besonders T_H17 -Zellen und B-Zellen unkontrolliert aktiviert, was unter anderem zu einer erhöhten IL-17 Ausschüttung und höheren Antikörpertitern führt (139). Die Konzentration von IL-2 in den Zellkulturüberständen wurde in dieser Arbeit nicht gemessen, da sich das Zytokin erfahrungsgemäß im ELISA nicht detektieren lässt. Die erhöhten IL-17 Werte bei den Patienten könnten jedoch im Umkehrschluss auf eine verminderte IL-2 Produktion hindeuten. Eine spezifische Analyse der einzelnen T-Zellsubgruppen zum Nachweis einer verminderten T_{reg} -Population hätte diese These eventuell weiter untermauern können. In der Literatur finden sich jedoch auch Studien, die erhöhte IL-2 Werte in Autoimmunerkrankungen feststellen konnten. *Salazar-Camarena et al.* beispielsweise konnten in einer Subgruppe von SLE Patienten neben erhöhten BAFF-Werten auch erhöhte IL-2 Konzentrationen im Blut nachweisen (147). Eine weitere Studie beschäftigte sich mit den Unterschieden in den Zytokinprofilen von Patienten mit PsA und Patienten, die an der rein kutanen Form der Psoriasis litten. Bei den PsA Patienten konnte eine deutlich höhere IL-2 Sekretion durch PBMCs festgestellt werden als bei den Psoriasispatienten (148). In dieser Arbeit wiesen die Kontrollprobanden mehr $IL-2^+ CD4^+$ T-Zellen im Vergleich zu aktiven und inaktiven SLE Patienten auf, jedoch unterschieden sich die Anteile nicht in signifikantem Maße. Der Anteil $IL-2^+ CD8^+$ T-Zellen schien bei SLE und PsA mit der Krankheitsschwere zu korrelieren und auch die GPA Patienten zeigten signifikant mehr $IL-2^+ CD8^+$ T-Zellen als die gesunde Vergleichsgruppe. Bei PsA und GPA konnte man diese Beobachtung auch bei den $CD4^+$ T-Zellen machen, jedoch waren die Signifikanzlevel bei den $CD8^+$ T-Zellen höher ausgeprägt. Die $CD8^+$ T-Zellen nehmen folglich auch in der IL-2 Produktion eine dominierende Stellung ein.

In einem Review zur Beteiligung verschiedener Zytokine an der Pathogenese des SLE wird die Rolle von $IFN\gamma$ kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite wurde $IFN\gamma$ durch seine aktivierende Funktion auf Makrophagen sowie durch die Induktion der T-Zell Differenzierung als Mediator in der Entwicklung von Autoimmunphänomenen beschrieben.

Eine andere Studie zeigte jedoch, dass IFN γ -defiziente Mäuse anfälliger für Autoimmunerkrankungen sind, was die proinflammatorische Wirkung des Zytokins in Frage stellt (139). In der vorliegenden Studie wurden sowohl für SLE als auch für PsA und GPA erhöhte Werte für IFN γ im Zellkulturüberstand gemessen. Bei SLE und PsA zeigten interessanterweise die inaktiven Patienten die höchsten Werte. Eine direkte Korrelation zwischen Zytokin Konzentration und Krankheitsaktivität konnte daher nicht gezeigt werden. Auch *Brühl et al.* konnten im Mausmodell der RA keinen Zusammenhang zwischen der IFN γ oder auch GM-CSF Expression in der Synovia und dem Schweregrad der Gelenkentzündung erkennen (97). Die höheren IFN γ Konzentrationen bei inaktiven Patienten im Vergleich zu aktiven sind möglicherweise auf die aggressivere immunsuppressive Therapie der aktiven Patienten zurückzuführen, die die IFN γ Produktion abschwächt. Bei SLE ließ sich weder bei den CD4 $^{+}$ T-Zellen noch bei den CD8 $^{+}$ T-Zellen eine Korrelation der IFN γ Werte mit der Krankheitsaktivität feststellen. Bei PsA konnte eine hoch signifikante Zunahme der IFN γ^{+} CD8 $^{+}$ T-Zellen mit steigenden DAS28-ESR Werten beobachtet werden, bei den CD4 $^{+}$ T-Zellen wiesen erneut die inaktiven Patienten den größten Anteil auf. Bei GPA wurde ebenso nur für die CD8 $^{+}$ T-Zellen ein signifikanter Unterschied zwischen Erkrankten und Kontrollen gemessen. Diese Ergebnisse stärken ebenso wie für IL-3 und IL-2 die These, dass die CD8 $^{+}$ T-Zellen die Hauptproduzenten von IFN γ im Rahmen von autoimmunen Prozessen sind. Entgegengesetzt dazu stehen die Ergebnisse der Studie von *Renner et al.*, die im Mausmodell der MS die CD4 $^{+}$ T-Zellen als Hauptquelle von IFN γ und auch GM-CSF identifizieren konnten (122).

Der Wachstumsfaktor GM-CSF ähnelt in seinen Funktionen denen von IL-3 (116). Mit seinen stimulatorischen Auswirkungen auf Aktivierung, Migration und Überleben von Effektorzellen des Immunsystems trägt es zur Pathogenetik von Autoimmunerkrankungen bei (149). *Steiman et al.* fanden heraus, dass serologisch aktive Lupuspatienten, die jedoch keinerlei klinische Symptome zeigten, neben anderen Chemokinen signifikant niedrigere GM-CSF Werte aufwiesen als serologisch und klinisch aktive Patienten. Chemokine wie GM-CSF stellen in der Schlussfolgerung demnach bessere Biomarker für den SLE dar als serologische Parameter wie Antikörper oder Komplementfaktoren (150). *Willeke et al.* wiesen eine deutlich erhöhte Zahl von GM-CSF sezernierenden PBMCs in Lupuspatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nach, welche sogar mit den Titern der Anti-dsDNA-AK korrelierte (151). Diese Erkenntnisse konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Hier wurde für keine der Erkrankungen ein linearer Zusammenhang zwischen der GM-CSF Produktion im Zellkulturüberstand und der Krankheitsaktivität festgestellt. Lediglich bei den PsA Patienten

mit DAS28-ESR $\leq 2,6$ konnte signifikant mehr GM-CSF gemessen werden als bei den Kontrollen. GPA Patienten zeigten zumindest höhere GM-CSF Titer als Kontrollen, wenn auch nicht signifikant ausgeprägt. In der Auswertung der intrazellulären GM-CSF Expressierung konnte man vor allem beim SLE wieder deutlich die Dominanz der CD8⁺ T-Zellen erkennen. Während der Anteil GM-CSF⁺ CD4⁺ T-Zellen keine Korrelation mit der Krankheitsaktivität zeigte, sah man bei den CD8⁺ T-Zellen eine deutlich ausgeprägtere Produktion bei den aktiven SLE Patienten. Bei der PsA war für beide T-Zelltypen wieder eine höhere GM-CSF Expressierung im inaktiveren Krankheitsstadium erkennbar. Nur bei den CD8⁺ T-Zellen waren die Unterschiede signifikant und auch hier hatten die Patienten mit DAS28-ESR $>2,6$ wesentlich mehr GM-CSF⁺ Zellen als die Kontrollprobanden. Hier schienen also die zytotoxischen T-Zellen wieder eine maßgeblichere Rolle in der Zytokinproduktion zu spielen als die T-Helferzellen.

4.5 Steigende HLA-DR Expression auf T-Zellen mit zunehmender Krankheitsaktivität bei SLE

Im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass SLE Patienten im aktiven Krankheitsstadium hoch signifikant mehr CD8⁺ T-Zellen aufwiesen, die den Oberflächenmarker HLA-DR exprimierten, als gesunde Vergleichsprobanden. Ein ebenfalls signifikanter Unterschied ließ sich zwischen den beiden Lupus Patientengruppen nachweisen. Der Anteil der CD4⁺ T-Zellen, die HLA-DR exprimierten, war bei den SLE Patienten im Vergleich zu den Kontrollen nicht signifikant erhöht. Aus diesen Beobachtungen könnte man einen direkten Zusammenhang zwischen der Menge an HLA-DR⁺ CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut von Lupuspatienten und der Krankheitsaktivität schlussfolgern.

Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen einer Arbeitsgruppe, die sich mit der Problematik auseinandersetzte, einen zuverlässigen Marker für die Vorhersage eines Krankheitsschubes beim SLE zu identifizieren. *Viallard et al.* untersuchten neben bereits allgemein anerkannten Laborwerten, wie den ANAs, Anti-ds-DNA-Antikörpern sowie CH₅₀, als Zeichen der Komplementaktivität, auch die HLA-DR Expression auf T-Zellen. Diese gilt als klassischer Marker für die Aktivität der T-Zellen. Dabei stellten die Forscher unter den verglichenen Parametern für HLA-DR auf CD8⁺ T-Zellen die signifikanteste Übereinstimmung mit dem aktuellen Krankheitsstadium fest. Zusätzlich war die Menge der HLA-DR⁺ CD8⁺ T-Zellen auch am signifikantesten mit dem Auftreten eines akuten

Krankheitsschubes assoziiert (152). In einer anderen Studie wurden die immunphänotypischen Profile von Lymphozyten in SLE Patienten und in Patienten mit diskoidem Lupus erythematoses verglichen. Beide Patientengruppen wiesen mehr zirkulierende HLA-DR⁺ CD3⁺ T-Zellen als Zeichen einer systemischen T-Zellaktivierung auf, als gesunde Kontrollpersonen. Aber nur im SLE fanden sich deutlich mehr CD8⁺ T-Zellen, die HLA-DR exprimierten, was sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit deckt (153).

Das hohe Maß an Aktivität der CD8⁺ T-Zellen aktiver SLE Patienten, welches durch die gesteigerte Expression von HLA-DR angezeigt wird, steht im Konsens mit den oben beschriebenen Erkenntnissen. Je aktiver das Krankheitsstadium, desto aktiver sind die CD8⁺ T-Zellen und desto mehr IL-3 produzieren sie. Je mehr IL-3 wiederum durch die hyperreaktiven T-Zellen basal produziert wird, desto stärker wird die β -Kette des IL-3 Rezeptors auf Basophilen Granulozyten herunterreguliert.

4.6 Steigende Siglec-1 Expression auf Monozyten mit zunehmender Krankheitsaktivität bei SLE

In dieser Arbeit wurde ein höchst signifikant größerer Anteil an CD169⁺ Monozyten im peripheren Blut von aktiven SLE Patienten beobachtet als bei gesunden Kontrollprobanden. Auch im Vergleich inaktiver und aktiver Lupuspatienten wiesen die Aktiven einen signifikant höheren Prozentsatz an CD169⁺ Monozyten auf. Dies galt sowohl für die CD14⁺ als auch für die CD16⁺ Monozyten. Diese Ergebnisse beweisen einen Anstieg der Expression des Oberflächenproteins Siglec-1 auf CD16⁺ bzw. CD14⁺ Monozyten mit der Krankheitsaktivität der SLE Patienten. Die vorliegenden Ergebnisse decken sich mit denen einiger anderer Arbeitsgruppen. Wie bereits unter 1.1.2 beschrieben, tragen Interferone des Typs I, vor allem IFN α einen entscheidenden Teil zur Pathogenese des SLE bei. *Biesen et al.* beschäftigten sich in ihren Untersuchungen mit der IFN Typ I Signatur der SLE Patienten und dabei insbesondere mit ihrem Effekt auf periphere Monozyten. Die Arbeitsgruppe fand heraus, dass das durch die hohe IFN Produktion am stärksten hochregulierte Protein Siglec-1 auf Monozyten war. Außerdem stellte die Arbeitsgruppe fest, dass der Anteil der Subpopulation an Monozyten, die CD169 auf ihrer Oberfläche exprimierten, in direktem Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität der Lupuspatienten stand. So konnte Siglec-1 auf Monozyten als Indikator der IFN Typ I Signatur als potentieller Biomarker für die Überwachung der

Krankheitsaktivität und des Therapieerfolges beim SLE abgeleitet werden (128). *Rose et al.* untersuchten verschiedene Biomarker des SLE auf ihre krankheitsgradbezogene Sensitivität. Neben konventionell genutzten Parametern, wie den Anti-ds-DNA-Antikörpern oder den Komplementfaktoren C3 und C4, wurden auch IFN α , IFN γ -induziertes lösliches Protein 10 und Siglec-1 als IFN-assoziierte Marker bei Lupuspatienten gemessen. Dabei zeigten 86% der aktiven SLE Patienten eine erhöhte Expression von Siglec-1 auf Monozyten. Außerdem ergaben die Untersuchungen dieser Studie die beste Korrelation von IFN α und Siglec-1 mit der Krankheitsaktivität, wobei sich Siglec-1 dabei als der Biomarker mit der höchsten Sensitivität erwies (154). Diese Ergebnisse konnten die Forscher in einer prospektiven Longitudinalstudie verifizieren (155). Zu sehr ähnlichen Schlussfolgerungen kamen auch die Forscher einer anderen Arbeitsgruppe, die sich mit der Expression von Siglec-1 auf Monozyten von pädiatrischen SLE Patienten befassten. Auch hier wurde für die Siglec-1 Expression, verglichen mit einigen anderen Parametern, die beste Korrelation mit einer Verschlechterung des Krankheitszustandes aufgezeigt. Folglich wurde auch hier die Siglec-1 Expression auf Monozyten als sensibler Biomarker für die Krankheitsüberwachung identifiziert, jedoch mit dem Unterschied, dass es sich hier um die kindliche Form des Lupus handelte (156).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Siglec-1 Expression auf Monozyten lediglich bei den SLE Patienten näher analysiert. *Xiong et al.* schlossen aus den Ergebnissen ihrer Untersuchungen zur Siglec-1 Expression auf PBMCs und Monozyten bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis, dass sich auch bei dieser Autoimmunerkrankung Siglec-1 aufgrund einer positiven Korrelation mit den DAS28 und ESR Werten als Marker zur Überwachung der Krankheitsaktivität eignet (157). Zukünftige Untersuchungen könnten also beleuchten, ob auch bei weiteren Autoimmunerkrankungen ein direkter Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und der Siglec-1 Expression besteht.

Wie unter 4.1 dargelegt wird, bestand bei allen drei untersuchten Erkrankungen ein direkter Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und der IL-3 Ausschüttung. IL-3 trägt unter anderem auch zur Entwicklung plasmazytoider Dendritischer Zellen aus CD34⁺ Progenitorzellen und zur generellen Vermehrung Dendritischer Zellen bei (158, 159). Plasmazytoide Dendritische Zellen wiederum gelten als Hauptproduzenten von IFN α (18). Somit liegt die Vermutung nahe, dass eine gesteigerte IL-3 Produktion mit mehr pDCs, damit wiederum erhöhten IFN α Spiegeln und in der Folge auch einer verstärkten Siglec-1

Expression auf Monozyten einhergeht. Möglicherweise spiegeln also die erhöhten IL-3 Werte die IFN-assoziierte Siglec-1 Bildung auf Monozyten.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Patienten mit SLE, PsA oder GPA im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden eine erhöhte Expression des Zytokins Interleukin-3 aufweisen und ob diese mit der Krankheitsaktivität der Patienten korreliert. Außerdem wurde die intrazelluläre Produktion von IL-3 und anderen immunregulatorischen Zytokinen durch die verschiedenen T-Zelltypen bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression der β -Kette des IL-3 Rezeptors auf Immunzellen näher beleuchtet.

Um die Konzentrationen von IL-3 in den Blutproben der Patienten zu bestimmen, wurden die PBMCs mittels Ficoll-Dichtezentrifugation isoliert und für drei Tage mit Anti-CD3 im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Konzentrationen von IL-3 im Überstand dieser Zellkultur durch ELISA quantifiziert. Hierbei wurden bei aktiven SLE, aktiven PsA und GPA Patienten signifikant höhere Werte des Zytokins gemessen als bei den Vergleichsprobanden. Die IL-3 Konzentrationen korrelierten ferner positiv mit der Krankheitsaktivität. Auf die gleiche Weise wurden auch die Titer von GM-CSF, IL-17 und $\text{IFN}\gamma$ bestimmt, wobei für keines der Zytokine eine ähnliche Korrelation mit der Krankheitsschwere festgestellt werden konnte. Bemerkenswerterweise wiesen die inaktiven SLE und PsA Patienten die höchsten $\text{IFN}\gamma$ Werte auf und auch bei GM-CSF zeigten die inaktiven PsA Patienten die höchste Konzentration.

Mittels intrazellulärer Färbung auf IL-3 und nachfolgender FACS-Analyse wurden die IL-3 produzierenden Zellen untersucht. Hierbei war erneut eine positive Korrelation von intrazellulärer IL-3 Expression und steigender Krankheitsaktivität erkennbar. Interessanterweise konnte dies jedoch nur auf den CD8^+ T-Zellen, nicht aber auf den CD4^+ T-Zellen beobachtet werden. Folglich wurden die CD8^+ T-Zellen als Hauptquelle von IL-3 identifiziert. Die intrazelluläre Färbung erfolgte zusätzlich auf die Zytokine IL-2, $\text{IFN}\gamma$ und GM-CSF. Auch hier waren insbesondere die CD8^+ T-Zellen an der Zytokinproduktion beteiligt. Bei allen drei Erkrankungen korrelierten die Anteile der $\text{IL-2}^+ \text{CD8}^+$ T-Zellen mit der Krankheitsaktivität. Bei PsA und GPA ließ sich dies auch für $\text{IFN}\gamma$ nachweisen, bei SLE für GM-CSF. Wie bereits im ELISA wurden auch in der intrazellulären Färbung die höchsten Anteile an Zytokin produzierenden Zellen bei den inaktiven PsA Patienten gemessen. Dies galt für die $\text{IFN}\gamma^+ \text{CD4}^+$ T-Zellen sowie für beide T-Zelltypen, die positiv für GM-CSF waren.

Die Analyse der β -Kette des IL-3 Rezeptors auf Basophilen Granulozyten und pDCs von SLE Patienten nach 23,5 stündiger Inkubation mit Medium zeigte eine deutliche Herabregulierung der Rezeptorexpression, besonders auf den Basophilen Granulozyten der Erkrankten im Vergleich zu den Kontrollen. Da eine sensiblere Reaktion der Zellen von SLE und auch PsA Patienten ausgeschlossen wurde, könnte die verminderte Expression der β -Rezeptorkette auf die erhöhte basale IL-3 Freisetzung durch hyperreaktive T-Zellen zurückgeführt werden.

Für die SLE Patienten erfolgte überdies eine Immunphänotypisierung bestimmter Zellen mittels extrazellulärer Anfärbung und Beurteilung im Durchflusszytometer. $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen wurden auf die Expression des Aktivierungsmarkers HLA-DR untersucht. Dabei zeigte sich ein direkter Zusammenhang zwischen dem Anteil $HLA-DR^+ CD8^+$ T-Zellen und der Krankheitsschwere der Patienten. HLA-DR auf $CD8^+$ T-Zellen könnte somit einen vielversprechenden Biomarker für die Überwachung der Krankheitsaktivität im SLE darstellen. Außerdem spiegelt es das hohe Maß an Aktivität der $CD8^+$ T-Zellen aktiver Patienten wider. Des Weiteren wurden $CD14^+$ und $CD16^+$ Monozyten auf die Expressierung von Siglec-1 untersucht. Hierbei konnte erneut die ansteigende Krankheitsaktivität mit dem Anteil Siglec-1 positiver Monozyten in Korrelation gebracht werden. Da die Siglec-1 Expression durch $IFN\alpha$ induziert wird, könnte Siglec-1 als Maß für die pathogenetisch bedeutsame $IFN\alpha$ Signatur des SLE und somit ebenfalls als Laborparameter zur Einschätzung des Krankheitsstadiums dienen. Ein Zusammenhang der verstärkten $IFN\alpha$ Produktion mit der erhöhten IL-3 Freisetzung und der daraus resultierenden Aktivierung der pDCs ist wahrscheinlich.

Mit den beschriebenen Ergebnissen konnte die relevante Rolle von IL-3 im Krankheitsprogress des SLE, der PsA und der GPA gezeigt werden. Die Blockierung des Zytokins, seines Rezeptors oder der $CD8^+$ T-Zellen als seine Hauptquelle stellt somit einen möglichen neuen Ansatzpunkt für die Therapie dieser rheumatologischen Autoimmunerkrankungen dar.

6 Anhang

6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Scoring Systeme zur Erfassung der Krankheitsaktivität beim SLE	12
Tabelle 2: Klinik der Lupusnephritis	13
Tabelle 3: ISN/RSP Klassifikation der Lupusnephritis.....	14
Tabelle 4: CASPAR Kriterien für die Diagnostik der PsA	19
Tabelle 5: Geräte	29
Tabelle 6: Glas- und Plastikware	30
Tabelle 7: Chemikalien, Reagenzien, Puffer.....	31
Tabelle 8: Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze	32
Tabelle 9: Zusammensetzung der Zellkulturmedien	32
Tabelle 10: Antikörper für die extrazelluläre Durchflusszytometrie	33
Tabelle 11: Antikörper für die intrazelluläre Durchflusszytometrie.....	33
Tabelle 12: Zytokine, Antikörper, Enzyme.....	34
Tabelle 13: IL-3 ELISA	34
Tabelle 14: Analyse- und Bearbeitungsprogramme	35
Tabelle 15: Vollblutproben mit ihren jeweiligen Stimulantien.....	42
Tabelle 16: Basischarakteristika der SLE Patienten	46
Tabelle 17: Basischarakteristika der PsA Patienten.....	62
Tabelle 18: Basischarakteristika der GPA Patienten.....	71

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	37
Abbildung 2: Skizzierung eines Sandwich-ELISAs	44
Abbildung 3: Immunphänotypisierung der T-Zellen im peripheren Blut von SLE Patienten: 3a) Anteil der HLA-DR ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl CD4 ⁺ T-Zellen in Prozent. 3b) Anteil der HLA-DR ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl CD8 ⁺ T- Zellen in Prozent	48
Abbildung 4: Immunphänotypisierung der Monozyten im peripheren Blut von SLE Patienten: 4a) Anteil der CD169 ⁺ CD14 ⁺ Monozyten an der Gesamtzahl der CD14 ⁺ Monozyten in Prozent. 4b) Anteil der CD169 ⁺ CD16 ⁺ Monozyten an der Gesamtzahl CD16 ⁺ Monozyten in Prozent	50

Abbildung 5: Darstellung der Zytokin Konzentration in pg/ml gemessen im Zellkultur- Überstand: 5a) IL-3, 5b) GM-CSF, 5c) IL-17, 5d) IFN γ	52
Abbildung 6: Anteil der Zytokin exprimierenden CD4 ⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4 ⁺ T-Zellen in Prozent nach intrazellulärer Färbung auf: 6a) IL-3, 6b) IL-2, 6c) IFN γ , 6d) GM-CSF	54
Abbildung 7: Anteil der Zytokin exprimierenden CD8 ⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8 ⁺ T-Zellen in Prozent nach intrazellulärer Färbung auf: 7a) IL-3, 7b) IL-2, 7c) IFN γ , 7d) GM-CSF	56
Abbildung 8: Expression von CD131 auf: 8a) Basophilen Granulozyten und 8b) pDCs ohne Stimulation (=Medium) und nach Stimulation mit Anti-CD3	58
Abbildung 9: Expression von CD131 auf: 9a) Basophilen Granulozyten und 9b) pDCs ohne Stimulation (=Medium) und nach Stimulation mit IL-3 bzw. GM-CSF.....	60
Abbildung 10: Darstellung der Zytokin Konzentration in pg/ml gemessen im Zellkultur- Überstand: 10a) IL-3, 10b) GM-CSF, 10c) IL-17, 10d) IFN γ	64
Abbildung 11: Anteil der Zytokin exprimierenden CD4 ⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4 ⁺ T-Zellen in Prozent nach intrazellulärer Färbung auf: 11a) IL-3, 11b) IL- 2, 11c) IFN γ , 11d) GM-CSF.....	66
Abbildung 12: Anteil der Zytokin exprimierenden CD8 ⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8 ⁺ T-Zellen in Prozent nach intrazellulärer Färbung auf: 12a) IL-3, 12b) IL- 2, 12c) IFN γ , 12d) GM-CSF	68
Abbildung 13: Expression von CD131 auf: 13a) Basophilen Granulozyten und 13b) pDCs ohne Stimulation (=Medium) und nach Stimulation mit IL-3 bzw. GM- CSF.....	70
Abbildung 14: Darstellung der Zytokin Konzentration in pg/ml gemessen im Zellkultur- Überstand: 14a) IL-3, 14b) GM-CSF	72
Abbildung 15: Anteil der Zytokin exprimierenden CD4 ⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4 ⁺ T-Zellen in Prozent nach intrazellulärer Färbung auf: 15a) IL-3, 15b) IL-2, 15c) FN γ	73
Abbildung 16: Anteil der Zytokin exprimierenden CD8 ⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8 ⁺ T-Zellen in Prozent nach intrazellulärer Färbung auf: 16a) IL-3, 16b) IL- 2, 16c) IFN γ	75

7 **Literaturverzeichnis**

1. Furst DE, Clarke AE, Fernandes AW, Bancroft T, Greth W, Iorga SR. Incidence and prevalence of adult systemic lupus erythematosus in a large US managed-care population. *Lupus* 2013; 22(1):99–105. doi: 10.1177/0961203312463110.
2. Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the Epidemiology and Progression of Systemic Lupus Erythematosus. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2009; 39(4):257. doi: 10.1016/j.semarthrit.2008.10.007.
3. Gottschalk TA, Tsantikos E, Hibbs ML. Pathogenic Inflammation and Its Therapeutic Targeting in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol* 2015; 6:550. doi: 10.3389/fimmu.2015.00550.
4. Uramoto KM, Michet Jr. CJ, Thumboo J, Sunku J, O'Fallon WM, Gabriel SE. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis Rheum* 1999; 42(1):46–50. doi: 10.1002/1529-0131(199901)42:1<46::AID-ANR6>3.0.CO;2-2.
5. Lema GP de, Maier H, Nieto E, Vielhauer V, Luckow B, Mampaso F et al. Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(7):1369–82. doi: 10.1681/ASN.V1271369.
6. Brinks R, Fischer-Betz R, Sander O, Richter JG, Chehab G, Schneider M. Age-specific prevalence of diagnosed systemic lupus erythematosus in Germany 2002 and projection to 2030. *Lupus* 2014; 23(13):1407–11. doi: 10.1177/0961203314540352.
7. Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus* 2006; 15(5):308–18. doi: 10.1191/0961203306lu2305xx.
8. D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GRV. Systemic lupus erythematosus. *The Lancet* 2007; 369(9561):587–96.
9. Lisnevskaja L, Murphy G, Isenberg D. Systemic lupus erythematosus. *The Lancet* 2014; 384(9957):1878–88. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60128-8.
10. Liu Z, Davidson A. Taming lupus-a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nat Med* 2012; 18(6):871–82. doi: 10.1038/nm.2752.

11. Caricchio R, McPhie L, Cohen PL. Ultraviolet B radiation-induced cell death: critical role of ultraviolet dose in inflammation and lupus autoantigen redistribution. *J Immunol* 2003; 171(11):5778–86.
12. Migliorini A, Anders H-J. A novel pathogenetic concept-antiviral immunity in lupus nephritis. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8(3):183–9. doi: 10.1038/nrneph.2011.197.
13. Muñoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA, Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6(5):280–9. doi: 10.1038/nrrheum.2010.46.
14. Choi J, Kim ST, Craft J. The Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus – An Update. *Curr Opin Immunol* 2012; 24(6):651–7. doi: 10.1016/j.coi.2012.10.004.
15. Arason GJ, Jorgensen GH, Ludviksson BR. Primary immunodeficiency and autoimmunity: lessons from human diseases. *Scand J Immunol* 2010; 71(5):317–28. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02386.x.
16. Lech M, Anders H-J. The pathogenesis of lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24(9):1357–66. doi: 10.1681/ASN.2013010026.
17. Poole BD, Niewold TB, Tsokos GC, Via CS. Cytokines in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010:735169. doi: 10.1155/2010/735169.
18. Obermoser G, Pascual V. The interferon-alpha signature of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2010; 19(9):1012–9. doi: 10.1177/0961203310371161.
19. Crispín JC, Kyttaris VC, Terhorst C, Tsokos GC. T cells as therapeutic targets in SLE. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6(6):317–25. doi: 10.1038/nrrheum.2010.60.
20. Apostolidis SA, Crispín JC, Tsokos GC. IL-17-producing T cells in lupus nephritis. *Lupus* 2011; 20(2):120–4. doi: 10.1177/0961203310389100.
21. Cancro MP, D'Cruz DP, Khamashta MA. The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 2009; 119(5):1066–73. doi: 10.1172/JCI38010.
22. Becker-Merok A, Nikolaisen C, Nossent HC. B-lymphocyte activating factor in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in relation to autoantibody levels, disease measures and time. *Lupus* 2006; 15(9):570–6. doi: 10.1177/0961203306071871.
23. Hughes GC. Progesterone and Autoimmune Disease. *Autoimmun Rev* 2011; 11(6-7):A502-14. doi: 10.1016/j.autrev.2011.12.003.

24. Stratton MA. Drug-induced systemic lupus erythematosus. *Clin Pharm* 1985; 4(6):657–63.
25. Katz U, Zandman-Goddard G. Drug-induced lupus: an update. *Autoimmun Rev* 2010; 10(1):46–50. doi: 10.1016/j.autrev.2010.07.005.
26. Amital H, Szekanecz Z, Szücs G, Dankó K, Nagy E, Csépany T et al. Serum concentrations of 25-OH vitamin D in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) are inversely related to disease activity: is it time to routinely supplement patients with SLE with vitamin D? *Ann Rheum Dis* 2010; 69(6):1155–7. doi: 10.1136/ard.2009.120329.
27. Kamen DL, Aranow C. The link between vitamin D deficiency and systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* 2008; 10(4):273–80. doi: 10.1007/s11926-008-0044-3.
28. Lam GKW PM. Assessment of SLE. *Clin Exp Rheumatol* 2005; (23):120–32.
29. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore)* 1993; 72(2):113–24.
30. Kuhn A, Bonsmann G, Anders H-J, Herzer P, Tenbrock K, Schneider M. The Diagnosis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Dtsch Arztebl Int* 2015; 112(25):423–32. doi: 10.3238/arztebl.2015.0423.
31. Hanly JG, Li Q, Su L, Urowitz MB, Gordon C, Bae S-C et al. Cerebrovascular Events in Systemic Lupus Erythematosus: Results From an International Inception Cohort Study. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2018; 70(10):1478–87. doi: 10.1002/acr.23509.
32. Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *The Lancet* 2010; 376(9751):1498–509. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60709-X.
33. Müller-Ladner U, Benning K, Röther E, Lang B. Neonataler Lupus erythematosus als Beispiel für passiv übertragene Autoimmunität. *Immun Infekt* 1992; 20(4):117–21.
34. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25(11):1271–7.
35. Cameron JS. Lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 1999; (10):413–24.

36. Attar SM, Siddiqui AM. Vitamin D Deficiency in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Oman Med J* 2013; 28(1):42–7. doi: 10.5001/omj.2013.10.
37. Toloza SMA, Cole DEC, Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Vitamin D insufficiency in a large female SLE cohort. *Lupus* 2010; 19(1):13–9. doi: 10.1177/0961203309345775.
38. Kamen DL. Vitamin D in Lupus: New Kid on the Block? *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2010; 68(3):218–22.
39. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992; 35(6):630–40.
40. Chi S, Yu Y, Shi J, Zhang Y, Yang J, Yang L et al. Antibodies against C1q Are a Valuable Serological Marker for Identification of Systemic Lupus Erythematosus Patients with Active Lupus Nephritis. *Dis Markers* 2015; 2015:450351. doi: 10.1155/2015/450351.
41. Haubitz M. Lupusnephritis. *Nephrologie* 2012; 7(1):63–74. doi: 10.1007/s11560-011-0613-8.
42. Davidson A, Aranow C. Pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus nephritis. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18(5):468–75. doi: 10.1097/01.bor.0000240356.45550.13.
43. Berden JH, Licht R, van Bruggen MC, Tax WJ. Role of nucleosomes for induction and glomerular binding of autoantibodies in lupus nephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999; 8(3):299–306. doi: 10.1097/00041552-199905000-00005.
44. Zivković V, Stanković A, Cvetković T, Mitić B, Kostić S, Nedović J et al. Anti-dsDNA, anti-nucleosome and anti-C1q antibodies as disease activity markers in patients with systemic lupus erythematosus. *Srp Arh Celok Lek* 2014; 142(7-8):431–6.
45. Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2008; 358(9):929–39. doi: 10.1056/NEJMra071297.
46. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(2):241–50.
47. Mosca M, Tani C, Carli L, Bombardieri S. Glucocorticoids in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29(5 Suppl 68):S126-9.

48. Fox RI. Mechanism of action of hydroxychloroquine as an antirheumatic drug. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 1993; 23(2 Suppl 1):82–91. doi: 10.1016/s0049-0172(10)80012-5.
49. Ruiz-Irastorza G, Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Khamashta MA. Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Ann Rheum Dis* 2010; 69(1):20–8. doi: 10.1136/ard.2008.101766.
50. van Vollenhoven RF, Parodis I, Levitsky A. Biologics in SLE: towards new approaches. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2013; 27(3):341–9. doi: 10.1016/j.berh.2013.07.006.
51. Haubitz M. New and emerging treatment approaches to lupus. *Biologics* 2010; 4:263–71.
52. Iaccarino L, Bettio S, Reggia R, Zen M, Frassi M, Andreoli L et al. Effects of Belimumab on Flare Rate and Expected Damage Progression in Patients With Active Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2017; 69(1):115–23. doi: 10.1002/acr.22971.
53. Baker KP, Edwards BM, Main SH, Choi GH, Wager RE, Halpern WG et al. Generation and characterization of LymphoStat-B, a human monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulator. *Arthritis Rheum* 2003; 48(11):3253–65. doi: 10.1002/art.11299.
54. Shakoory B, Clatham W. Efficacy and safety data of belimumab in patients with systemic lupus erythematosus. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2011; 3(3):159–64. doi: 10.1177/1759720X11407541.
55. Doria A, Stohl W, Schwarting A, Okada M, Scheinberg M, van Vollenhoven R et al. Efficacy and Safety of Subcutaneous Belimumab in Anti-Double-Stranded DNA-Positive, Hypocomplementemic Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 2018; 70(8):1256–64. doi: 10.1002/art.40511.
56. O'Shea JJ, Kontzias A, Yamaoka K, Tanaka Y, Laurence A. Janus kinase inhibitors in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 2013; 72 Suppl 2:ii111-5. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202576.
57. Furumoto Y, Smith CK, Blanco L, Zhao W, Brooks SR, Thacker SG et al. Tofacitinib Ameliorates Murine Lupus and Its Associated Vascular Dysfunction. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 2017; 69(1):148–60. doi: 10.1002/art.39818.

58. Boehncke WH, Kirby B, Fitzgerald O, van de Kerkhof PCM. New developments in our understanding of psoriatic arthritis and their impact on the diagnosis and clinical management of the disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014; 28(3):264–70. doi: 10.1111/jdv.12222.
59. Horreau C, Pouplard C, Brenaut E, Barnette T, Misery L, Cribier B et al. Cardiovascular morbidity and mortality in psoriasis and psoriatic arthritis: a systematic literature review. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013; 27 Suppl 3:12–29. doi: 10.1111/jdv.12163.
60. Dures E, Bowen C, Brooke M, Lord J, Tillett W, McHugh N et al. Diagnosis and initial management in psoriatic arthritis: a qualitative study with patients. *Rheumatol Adv Pract* 2019; 3(2):rkz022. doi: 10.1093/rap/rkz022.
61. Gladman D, Antoni C, Mease P, Clegg D, Nash P. Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(Suppl 2):ii14-7. doi: 10.1136/ard.2004.032482.
62. Burden AD, Hilton Boon M, Leman J, Wilson H, Richmond R, Ormerod AD. Diagnosis and management of psoriasis and psoriatic arthritis in adults: summary of SIGN guidance. *BMJ* 2010; 341:c5623. doi: 10.1136/bmj.c5623.
63. McArdle A, Pennington S, FitzGerald O. Clinical Features of Psoriatic Arthritis: a Comprehensive Review of Unmet Clinical Needs. *Clin Rev Allergy Immunol* 2018; 55(3):271–94. doi: 10.1007/s12016-017-8630-7.
64. Barnas JL, Ritchlin CT. Etiology and Pathogenesis of Psoriatic Arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2015; 41(4):643–63. doi: 10.1016/j.rdc.2015.07.006.
65. Filer C, Ho P, Smith RL, Griffiths C, Young HS, Worthington J et al. Investigation of association of the IL12B and IL23R genes with psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58(12):3705–9. doi: 10.1002/art.24128.
66. Pattison E, Harrison BJ, Griffiths CEM, Silman AJ, Bruce IN. Environmental risk factors for the development of psoriatic arthritis: results from a case-control study. *Ann Rheum Dis* 2008; 67(5):672–6. doi: 10.1136/ard.2007.073932.
67. Chandran V. Genetics of psoriasis and psoriatic arthritis. *Indian J Dermatol* 2010; 55(2):151–6. doi: 10.4103/0019-5154.62751.

68. Soltani-Arabshahi R, Wong B, Feng B-J, Goldgar DE, Duffin KC, Krueger GG. Obesity in early adulthood as a risk factor for psoriatic arthritis. *Arch Dermatol* 2010; 146(7):721–6. doi: 10.1001/archdermatol.2010.141.
69. Richard M-A, Barnetche T, Rouzaud M, Sevrain M, Villani AP, Aractingi S et al. Evidence-based recommendations on the role of dermatologists in the diagnosis and management of psoriatic arthritis: systematic review and expert opinion. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014; 28 Suppl 5:3–12. doi: 10.1111/jdv.12560.
70. FitzGerald O, Winchester R. Psoriatic arthritis: from pathogenesis to therapy. *Arthritis Res Ther* 2009; 11(1):214. doi: 10.1186/ar2580.
71. Vlam K de, Gottlieb AB, Mease PJ. Current concepts in psoriatic arthritis: pathogenesis and management. *Acta Derm Venereol* 2014; 94(6):627–34. doi: 10.2340/00015555-1833.
72. FitzGerald O, Haroon M, Giles JT, Winchester R. Concepts of pathogenesis in psoriatic arthritis: genotype determines clinical phenotype. *Arthritis Res Ther* 2015; 17:115. doi: 10.1186/s13075-015-0640-3.
73. Veale DJ. New therapies and new goals for psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 2011; 63(4):874–6. doi: 10.1002/art.30173.
74. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 2009; 129(6):1339–50. doi: 10.1038/jid.2009.59.
75. Gottlieb A, Narang K. Ustekinumab in the treatment of psoriatic arthritis: latest findings and clinical potential. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2013; 5(5):277–85. doi: 10.1177/1759720X13501021.
76. Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Zaba LC, Haider AS et al. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol* 2008; 128(5):1207–11. doi: 10.1038/sj.jid.5701213.
77. Brockbank J, Gladman D. Diagnosis and management of psoriatic arthritis. *Drugs* 2002; 62(17):2447–57. doi: 10.2165/00003495-200262170-00004.
78. Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol* 2014; 32:227–55. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120225.
79. Kang EJ, Kavanaugh A. Psoriatic arthritis: latest treatments and their place in therapy. *Ther Adv Chronic Dis* 2015; 6(4):194–203. doi: 10.1177/2040622315582354.

80. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)-Ständige Kommission Leitlinien. S3 - Leitlinie zur Therapie der Psoriasis vulgaris: Update 2017; 2017 [Stand: 18.03.2020]. Verfügbar unter: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/013-001l_S3_Therapie_Psoriasis-vulgaris_2017-12.pdf.
81. Ruysen-Witrand A, Perry R, Watkins C, Braileanu G, Kumar G, Kiri S et al. Efficacy and safety of biologics in psoriatic arthritis: a systematic literature review and network meta-analysis. *RMD Open* 2020; 6(1). doi: 10.1136/rmdopen-2019-001117.
82. Seo P, Stone JH. The antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides. *Am J Med* 2004; 117(1):39–50. doi: 10.1016/j.amjmed.2004.02.030.
83. Yates M, Watts RA, Bajema IM, Cid MC, Crestani B, Hauser T et al. EULAR/ERA-EDTA recommendations for the management of ANCA-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2016; 75(9):1583–94. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-209133.
84. Reinhold-Keller E, Herlyn K, Wagner-Bastmeyer R, Gross WL. Stable incidence of primary systemic vasculitides over five years: results from the German vasculitis register. *Arthritis Rheum* 2005; 53(1):93–9. doi: 10.1002/art.20928.
85. Kubaisi B, Abu Samra K, Foster CS. Granulomatosis with polyangiitis (Wegener's disease): An updated review of ocular disease manifestations. *Intractable Rare Dis Res* 2016; 5(2):61–9. doi: 10.5582/irdr.2016.01014.
86. Watts RA, Mahr A, Mohammad AJ, Gatenby P, Basu N, Flores-Suárez LF. Classification, epidemiology and clinical subgrouping of antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 2015; 30 Suppl 1:i14–22. doi: 10.1093/ndt/gfv022.
87. Geetha D, Jefferson JA. ANCA-Associated Vasculitis: Core Curriculum 2020. *Am J Kidney Dis* 2020; 75(1):124–37. doi: 10.1053/j.ajkd.2019.04.031.
88. Harper L, Savage CO. Pathogenesis of ANCA-associated systemic vasculitis. *J Pathol* 2000; 190(3):349–59. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<349::AID-PATH524>3.0.CO;2-A.
89. Kamesh L, Harper L, Savage COS. ANCA-positive vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(7):1953–60. doi: 10.1097/01.asn.0000016442.33680.3e.

90. Gross WL, Trabandt A, Csernok E. Pathogenesis of Wegener's granulomatosis. *Ann Med Interne (Paris)* 1998; 149(5):280–6.
91. Guerry M-JCJ, Brogan P, Bruce IN, D'Cruz DP, Harper L, Luqmani R et al. Recommendations for the use of rituximab in anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51(4):634–43. doi: 10.1093/rheumatology/ker150.
92. Gao Y, Zhao M-H. Review article: Drug-induced anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Nephrology (Carlton)* 2009; 14(1):33–41. doi: 10.1111/j.1440-1797.2009.01100.x.
93. Holle JU, Reinhold-Keller E, Gross WL. Update Granulomatose mit Polyangiitis (GPA, Wegener-Granulomatose). *Z Rheumatol* 2012; 71(9):745–53. doi: 10.1007/s00393-012-0982-z.
94. Harper L, Morgan MD, Walsh M, Hoglund P, Westman K, Flossmann O et al. Pulse versus daily oral cyclophosphamide for induction of remission in ANCA-associated vasculitis: long-term follow-up. *Ann Rheum Dis* 2012; 71(6):955–60. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200477.
95. Song R, Chung SW, Lee Y-A. Concurrent treatment with rituximab and plasma exchange for severe refractory granulomatosis with polyangiitis: A case report. *Medicine (Baltimore)* 2019; 98(51):e18139. doi: 10.1097/MD.00000000000018139.
96. 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.
97. Brühl H, Cihak J, Niedermeier M, Denzel A, Rodriguez Gomez M, Talke Y et al. Important role of interleukin-3 in the early phase of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; 60(5):1352–61. doi: 10.1002/art.24441.
98. Broughton SE, Dhagat U, Hercus TR, Nero TL, Grimbaldeston MA, Bonder CS et al. The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: from ligand recognition to initiation of signaling. *Immunol Rev* 2012; 250(1):277–302. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01164.x.
99. Kaushansky K, Shoemaker SG, Broudy VC, Lin NL, Matous JV, Alderman EM et al. Structure-function relationships of interleukin-3. An analysis based on the function and binding characteristics of a series of interspecies chimera of gibbon and murine interleukin-3. *J. Clin. Invest.* 1992; 90(5):1879–88. doi: 10.1172/JCI116065.

100. Wodnar-Filipowicz A, Heusser CH, Moroni C. Production of the haemopoietic growth factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE receptor-mediated activation. *Nature* 1989; 339(6220):150–2. doi: 10.1038/339150a0.
101. 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.
102. Schneider E, Thieblemont N, Moraes ML de, Dy M. Basophils: new players in the cytokine network. *Eur Cytokine Netw* 2010; 21(3):142–53. doi: 10.1684/ecn.2010.0197.
103. Weber GF, Chousterman BG, He S, Fenn AM, Nairz M, Anzai A et al. Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis. *Science* 2015; 347(6227):1260–5. doi: 10.1126/science.aaa4268.
104. Kirshenbaum AS, Goff JP, Dreskin SC, Irani AM, Schwartz LB, Metcalfe DD. IL-3-dependent growth of basophil-like cells and mastlike cells from human bone marrow. *J Immunol* 1989; 142(7):2424–9.
105. 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.
106. Valent P, Besemer J, Muhm M, Majdic O, Lechner K, Bettelheim P. Interleukin 3 activates human blood basophils via high-affinity binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989; 86(14):5542–6. doi: 10.1073/pnas.86.14.5542.
107. Yoshimoto T, Yasuda K, Tanaka H, Nakahira M, Imai Y, Fujimori Y et al. Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 2009; 10(7):706–12. doi: 10.1038/ni.1737.
108. MacDonald SM, Schleimer RP, Kagey-Sobotka A, Gillis S, Lichtenstein LM. Recombinant IL-3 induces histamine release from human basophils. *J Immunol* 1989; 142(10):3527–32.
109. Lantz CS, Boesiger J, Song CH, Mach N, Kobayashi T, Mulligan RC et al. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 1998; 392:90 EP -. doi: 10.1038/32190.

110. Buelens C, Bartholomé EJ, Amraoui Z, Boutriaux M, Salmon I, Thielemans K et al. Interleukin-3 and interferon beta cooperate to induce differentiation of monocytes into dendritic cells with potent helper T-cell stimulatory properties. *Blood* 2002; 99(3):993–8. doi: 10.1182/blood.v99.3.993.
111. Ebner S, Hofer S, van Nguyen A, Fürhapter C, Herold M, Fritsch P et al. A novel role for IL-3: human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern. *J Immunol* 2002; 168(12):6199–207. doi: 10.4049/jimmunol.168.12.6199.
112. Bacon K, Gearing A, Camp R. Induction of in vitro human lymphocyte migration by interleukin 3, interleukin 4, and interleukin 6. *Cytokine* 1990; 2(2):100–5. doi: 10.1016/1043-4666(90)90003-c.
113. Kinashi T, Inaba K, Tsubata T, Tashiro K, Palacios R, Honjo T. Differentiation of an interleukin 3-dependent precursor B-cell clone into immunoglobulin-producing cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1988; 85(12):4473–7. doi: 10.1073/pnas.85.12.4473.
114. Tadmori W, Feingersh D, Clark SC, Choi YS. Human recombinant IL-3 stimulates B cell differentiation. *J Immunol* 1989; 142(6):1950–5.
115. Khew-Goodall Y, Butcher CM, Litwin MS, Newlands S, Korpelainen EI, Noack LM et al. Chronic expression of P-selectin on endothelial cells stimulated by the T-cell cytokine, interleukin-3. *Blood* 1996; 87(4):1432–8.
116. Sato N, Caux C, Kitamura T, Watanabe Y, Arai K, Banchereau J et al. Expression and factor-dependent modulation of the interleukin-3 receptor subunits on human hematopoietic cells. *Blood* 1993; 82(3):752–61.
117. Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K-i. Cytokine Receptors and Signal Transduction. *Annu. Rev. Immunol.* 1992; 10(1):295–331. doi: 10.1146/annurev.iy.10.040192.001455.
118. Lopez AF, Hercus TR, Ekert P, Littler DR, Guthridge M, Thomas D et al. Molecular basis of cytokine receptor activation. *IUBMB Life* 2010; 62(7):509–18. doi: 10.1002/iub.350.
119. Kurimoto Y, Weck AL de, Dahinden CA. Interleukin 3-dependent mediator release in basophils triggered by C5a. *J Exp Med* 1989; 170(2):467–79. doi: 10.1084/jem.170.2.467.

120. Yamada R, Tanaka T, Unoki M, Nagai T, Sawada T, Ohnishi Y et al. Association between a single-nucleotide polymorphism in the promoter of the human interleukin-3 gene and rheumatoid arthritis in Japanese patients, and maximum-likelihood estimation of combinatorial effect that two genetic loci have on susceptibility to the disease. *Am J Hum Genet* 2001; 68(3):674–85. doi: 10.1086/318789.
121. Fishman P, Kamashta M, Ehrenfeld M, Vianna J, Hughes GR, Sredni D et al. Interleukin-3 immunoassay in systemic lupus erythematosus patients: preliminary data. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 100(3):215–8. doi: 10.1159/000236414.
122. Renner K, Hellerbrand S, Hermann F, Riedhammer C, Talke Y, Schiechl G et al. IL-3 promotes the development of experimental autoimmune encephalitis. *JCI Insight* 2016; 1(16):e87157. doi: 10.1172/jci.insight.87157.
123. Renner K, Hermann FJ, Schmidbauer K, Talke Y, Rodriguez Gomez M, Schiechl G et al. IL-3 contributes to development of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Kidney Int* 2015; 88(5):1088–98. doi: 10.1038/ki.2015.196.
124. Murphy KM, Travers P, Walport M, Janeway CA, Seidler L, Ehrenstein M. Janeway immunologie. 7. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akad. Verlag; 2009.
125. Jaatinen T, Laine J. Isolation of mononuclear cells from human cord blood by Ficoll-Paque density gradient. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2007:Chapter 2: Unit 2A.1. doi: 10.1002/9780470151808.sc02a01s1.
126. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. Der Experimentator: Immunologie. 4., vollst. überarb. u. korr. Aufl. 2014. Berlin: Springer Spektrum; 2014. (Experimentator). Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-41899-0>.
127. Givan AL. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol* 2011; (699):1–29. doi: 10.1007/978-1-61737-950-5_1.
128. Biesen R, Demir C, Barkhudarova F, Grün JR, Steinbrich-Zöllner M, Backhaus M et al. Sialic acid-binding Ig-like lectin 1 expression in inflammatory and resident monocytes is a potential biomarker for monitoring disease activity and success of therapy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2008; 58(4):1136–45. doi: 10.1002/art.23404.
129. Thermo Fisher Scientific. AccuCheck Counting Beads; 2011 [Stand: 02.03.2020]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/PCB100?ICID=search-product>.

130. Thermo Fisher Scientific. Cell Stimulation Cocktail; 2017 [Stand: 02.03.2020].
Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/00-4975-03#/00-4975-03>.
131. Freer G. Intracellular staining and detection of cytokines by fluorescence-activated flow cytometry. *Methods Mol Biol* 2014; (1172):221–34. doi: 10.1007/978-1-4939-0928-5_20.
132. van Riel PLCM, Renskers L. The Disease Activity Score (DAS) and the Disease Activity Score using 28 joint counts (DAS28) in the management of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2016; 34(5 Suppl 101):S40-S44.
133. Anzai A, Mindur JE, Halle L, Sano S, Choi JL, He S et al. Self-reactive CD4⁺ IL-3⁺ T cells amplify autoimmune inflammation in myocarditis by inciting monocyte chemotaxis. *J Exp Med* 2019; 216(2):369–83. doi: 10.1084/jem.20180722.
134. 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.
135. Costello P, Bresnihan B, O'Farrelly C, Fitzgerald O. Predominance of CD8⁺ T lymphocytes in psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26(5):1117–24.
136. Couzi L, Merville P, Deminière C, Moreau J-F, Combe C, Pellegrin J-L et al. Predominance of CD8⁺ T lymphocytes among periglomerular infiltrating cells and link to the prognosis of class III and class IV lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56(7):2362–70. doi: 10.1002/art.22654.
137. Ghirelli C, Zollinger R, Soumelis V. Systematic cytokine receptor profiling reveals GM-CSF as a novel TLR-independent activator of human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2010; 115(24):5037–40. doi: 10.1182/blood-2010-01-266932.
138. Rother N, van der Vlag J. Disturbed T Cell Signaling and Altered Th17 and Regulatory T Cell Subsets in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol* 2015; 6:610. doi: 10.3389/fimmu.2015.00610.
139. Ohl K, Tenbrock K. Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:432595. doi: 10.1155/2011/432595.
140. Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol* 2012; 181(1):8–18. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.03.044.

141. Li D, Guo B, Wu H, Tan L, Chang C, Lu Q. Interleukin-17 in systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *Autoimmunity* 2015; 48(6):353–61. doi: 10.3109/08916934.2015.1037441.
142. Chiricozzi A. Pathogenic role of IL-17 in psoriasis and psoriatic arthritis. *Actas Dermosifiliogr* 2014; 105 Suppl 1:9–20. doi: 10.1016/S0001-7310(14)70014-6.
143. Abdel Galil SM, Ezzeldin N, El-Boshy ME. The role of serum IL-17 and IL-6 as biomarkers of disease activity and predictors of remission in patients with lupus nephritis. *Cytokine* 2015; 76(2):280–7. doi: 10.1016/j.cyto.2015.05.007.
144. Combe B, Pope RM, Fischbach M, Darnell B, Baron S, Talal N. Interleukin-2 in rheumatoid arthritis: production of and response to interleukin-2 in rheumatoid synovial fluid, synovial tissue and peripheral blood. *Clin Exp Immunol* 1985; 59(3):520–8.
145. Apostolidis SA, Lieberman LA, Kis-Toth K, Crispín JC, Tsokos GC. The dysregulation of cytokine networks in systemic lupus erythematosus. *J Interferon Cytokine Res* 2011; 31(10):769–79. doi: 10.1089/jir.2011.0029.
146. Lieberman LA, Tsokos GC. The IL-2 defect in systemic lupus erythematosus disease has an expansive effect on host immunity. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010:740619. doi: 10.1155/2010/740619.
147. Salazar-Camarena DC, Ortiz-Lazareno P, Marín-Rosales M, Cruz A, Muñoz-Valle F, Tapia-Llanos R et al. BAFF-R and TACI expression on CD3+ T cells: Interplay among BAFF, APRIL and T helper cytokines profile in systemic lupus erythematosus. *Cytokine* 2019; 114:115–27. doi: 10.1016/j.cyto.2018.11.008.
148. Bos F, Capsoni F, Molteni S, Raeli L, Diani M, Altomare A et al. Differential expression of interleukin-2 by anti-CD3-stimulated peripheral blood mononuclear cells in patients with psoriatic arthritis and patients with cutaneous psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 2014; 39(3):385–90. doi: 10.1111/ced.12251.
149. Lotfi N, Thome R, Rezaei N, Zhang G-X, Rezaei A, Rostami A et al. Roles of GM-CSF in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases: An Update. *Front Immunol* 2019; 10:1265. doi: 10.3389/fimmu.2019.01265.
150. Steiman AJ, Gladman DD, Ibañez D, Noamani B, Landolt-Marticorena C, Urowitz MB et al. Lack of Interferon and Proinflammatory Cyto/chemokines in Serologically Active Clinically Quiescent Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol* 2015; 42(12):2318–26. doi: 10.3899/jrheum.150040.

151. Willeke P, Schlüter B, Schotte H, Erren M, Mickholz E, Domschke W et al. Increased frequency of GM-CSF secreting PBMC in patients with active systemic lupus erythematosus can be reduced by immunoadsorption. *Lupus* 2004; 13(4):257–62. doi: 10.1191/0961203304lu1009oa.
152. Viallard JF, Bloch-Michel C, Neau-Cransac M, Taupin JL, Garrigue S, Miossec V et al. HLA-DR expression on lymphocyte subsets as a marker of disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2001; 125(3):485–91. doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01623.x.
153. Wouters CHP, Diegenant C, Ceuppens JL, Degreef H, Stevens EAM. The circulating lymphocyte profiles in patients with discoid lupus erythematosus and systemic lupus erythematosus suggest a pathogenetic relationship. *Br J Dermatol* 2004; 150(4):693–700. doi: 10.1111/j.0007-0963.2004.05883.x.
154. Rose T, Grützkau A, Hirseland H, Huscher D, Dähnrich C, Dzionek A et al. IFN α and its response proteins, IP-10 and SIGLEC-1, are biomarkers of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2013; 72(10):1639–45. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-201586.
155. Rose T, Grützkau A, Klotsche J, Enghard P, Flechsig A, Keller J et al. Are interferon-related biomarkers advantageous for monitoring disease activity in systemic lupus erythematosus? A longitudinal benchmark study. *Rheumatology (Oxford)* 2017; 56(9):1618–26. doi: 10.1093/rheumatology/kex220.
156. Stuckrad SL von, Klotsche J, Biesen R, Lieber M, Thumfart J, Meisel C et al. SIGLEC1 (CD169) is a sensitive biomarker for the deterioration of the clinical course in childhood systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2020; 29(14):1914–25. doi: 10.1177/0961203320965699.
157. Xiong Y-s, Cheng Y, Lin Q-s, Wu A-l, Yu J, Li C et al. Increased expression of Siglec-1 on peripheral blood monocytes and its role in mononuclear cell reactivity to autoantigen in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2014; 53(2):250–9. doi: 10.1093/rheumatology/ket342.
158. Storozytsky E, Woodward JG, Frelinger JG, Lord EM. Interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhance the generation and function of dendritic cells. *Immunology* 1999; 97(1):138–49. doi: 10.1046/j.1365-2567.1999.00741.x.

159. Demoulin S, Roncarati P, Delvenne P, Hubert P. Production of large numbers of plasmacytoid dendritic cells with functional activities from CD34(+) hematopoietic progenitor cells: use of interleukin-3. *Exp Hematol* 2012; 40(4):268–78. doi: 10.1016/j.exphem.2012.01.002.

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Matthias Mack für die Ermöglichung meines Promotionsprojekts und die sehr gute Zusammenarbeit bedanken.

Großer Dank gebührt Frau Dr. Kerstin Renner für die Betreuung dieser Arbeit. Sie stand mir jederzeit mit wertvollen Anregungen und Hilfestellungen zur Seite. Ihre Anleitung und großartige Unterstützung haben wesentlich zur Durchführung dieser Arbeit beigetragen.

Ein herzliches Dankeschön für all die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und für die überaus freundliche Integration in das Team möchte ich auch an die restlichen Mitglieder der Arbeitsgruppe Mack richten: Agnes Mager, Yvonne Talke, Simone Buchtler, Sophia Neumayer, Kathrin Schmidbauer und Jan Salewski.

Abschließend möchte ich mich noch bei meiner Mutter, Susanne Schmuck, für die Durchsicht dieser Arbeit und die liebevolle Begleitung auf meinem gesamten Studien- und Lebensweg bedanken.

9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Leoni Schmuck, geboren am 23.05.1995 in München, an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit

„Die Expression von Interleukin-3 und seinem Rezeptor bei Patienten mit Systemischem Lupus erythematodes, Psoriasis-Arthritis oder Granulomatose mit Polyangiitis“

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

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

Regensburg, den

(Leoni Schmuck)