

Aus der Klinik für Innere Medizin I
mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Pneumologie, internistische
Intensivmedizin, Endokrinologie, Infektiologie, Rheumatologie, Ernährungs- und
Alterungsmedizin
Sektion für Rheumatologie
(Sektionsleiter: Prof. Dr. J. O. Schröder)
im Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Die Verteilung von Subpopulationen Dendritischer Zellen
des peripheren Blutes bei Patienten mit Rheumatoider
Arthritis, Spondylarthritis und Psoriasisarthritis und der
Effekt einer Biologica-Therapie mit Etanercept auf diese
Zellpopulationen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt

von

Katharina Kay
aus **Neumünster**

Kiel 2016

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Rainald Zeuner (Doktorvater)

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Phillip v. Bismarck, Klinik für Allgemeine Pädiatrie (Korreferent)

Tag der mündlichen Prüfung: 14.03.2018

Zum Druck genehmigt: Kiel, den

gez.

Inhaltsverzeichnis.....	3
I. Verzeichnis der verwendeten medizinischen Abkürzungen.....	4
II. Vorbemerkung.....	5
1. Einleitung.....	6
1.1. Rheumatoide Arthritis.....	7
1.2. Spondylarthritiden.....	8
1.3. Axiale Spondylarthritis.....	8
1.4. Psoriasisarthritis.....	9
1.5. Medikamentöse Therapien.....	9
1.5.1. Biologika.....	10
1.6. Tumornekrosefaktor alpha.....	10
1.6.1. Tumornekrosefaktor-Inhibitoren und Etanercept.....	11
1.6.2. Unerwünschte Wirkungen.....	11
1.7. Dendritische Zellen.....	12
1.7.1. Plasmazytoide Dendritische Zellen.....	14
1.7.2. Myeloische Dendritische Zellen.....	15
1.7.2.1. Myeloische Dendritische Zellen I.....	16
1.7.2.2. Myeloische Dendritische Zellen II.....	16
1.8. Zusammenfassung Einleitung.....	17
2. Patienten, Material und Methoden.....	18
2.1.1. Einschlusskriterien.....	19
2.1.2. Ausschlusskriterien.....	19
2.1.3. Einschlusskriterien Normalkollektiv.....	20
2.1.4. Patientenkollektive und klinische Verlaufsparemeter.....	20
2.1.4.1. Patienten mit Rheumatoider Arthritis	21
2.1.4.2. Patienten mit Spondylarthritis.....	22
2.1.4.3. Patienten mit Psoriasisarthritis.....	22
2.2. Blutproben.....	23
2.2.1. Bestimmung des Leukozytenanteils mit dem Sysmex KX-21N.....	23
2.3. Färbemethodik.....	24
2.3.1. Miltenyi-Kit.....	24
2.3.2. Probenfärbung.....	26
2.3.3. Kompensationsfärbung.....	27
2.4. Flourescence associated cell sorting (FACS).....	28

2.4.1. BD FACS Canto A TM	31
2.4.2. BD FACS Canto II TM	31
2.4.3. Software an den BD FACS Cantos TM	32
2.4.4. Auswertesoftware.....	32
2.4.5. Berechnung.....	32
2.5. Statistische Auswertung.....	35
3. Ergebnisse.....	37
3.1. Vergleich der DC-Subpopulationen vor Therapiebeginn.....	37
3.2. Einfluss der Therapie mit Etanercept auf den klinischen Verlauf und die DC-Subpopulationen.....	41
3.2.1. Abfall des C-reaktiven Protein.....	41
3.2.2. Symptombesserung.....	42
3.2.3. Einfluss der Therapie auf die myeloischen dendritischen Zellen Typ1.....	44
3.2.4. Einfluss der Therapie auf die plasmazytoiden dendritischen Zellen.....	46
3.2.5. Einfluss der Therapie auf die myeloischen dendritischen Zellen Typ2.....	48
4. Diskussion.....	50
5. Zusammenfassung.....	55
6. Interessenskonflikt.....	57
7. Danksagung.....	58
8. Literaturverzeichnis.....	60
9. Anhang.....	68

I. Abkürzungsverzeichnis

Ab = Antikörper

Ag = Antigen

ACPA = Anti-Cyclisches-Citrullinisiertes-Peptid-Antikörper

APC = Antigenpräsentierende Zellen

BDCA = Blood Dendritic Cell Antigen

BSA = Bovines Serum Albumin

BSG = Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit

CD = Cluster of differentiation

cm = centimeter

CRP = C-reaktives Protein

DC = Dendritische Zelle

DIP = distales Interphalangealgelenk
DMARD = Disease modifying antirheumatic drugs
DNA = Desoxyribonukleinsäure
ESR = Erythrocyte sedimentation rate
FSC = Forward Scatter
HLA = Humanes Leukozytenantigen
IL = Interleukin
MCP = Metacarpophalangealgelenk
mg = Milligramm
µl = Mikroliter
ml = Milliliter
MTP = Metatarsophalangealgelenk
nm = Nanometer
PBS = Phosphate buffered Saline
PIP = proximales Interphalangealgelenk
PsA = Psoriasisarthritis
RA = Rheumatoide Arthritis
RF = Rheumafaktor
RNA = Ribonukleinsäure
SpA = Spondylarthritis
SLE = Systemischer Lupus Erythematoses
SIT = Probeninjektionsröhrchen
SSC = Sideward Scatter
TNF α = Tumornekrosefaktor alpha
VAS = Visuelle Analogskala

II. Vorbemerkung

Zur flüssigeren Lesbarkeit wurde darauf verzichtet, bei der Erwähnung des Wortes „Patient“ und „Arzt“, sofern dies nicht durch inhaltliche Gründe notwendig war, die weibliche Form des Wortes „Patientin“ und „Ärztin“ mit zu erwähnen. Dies soll keinesfalls verdeutlichen, dass Frauen keinen Anteil an dieser Studie hatten. Im Gegenteil bestanden beide der oben genannten Kollektive sogar zu einem größeren Anteil aus Frauen.

1. Einleitung

Rheumatoide Arthritis (RA), Spondylarthritis (SpA) und Psoriasisarthritis (PsA) haben als entzündlich rheumatische Systemerkrankungen gemeinsam, dass das Immunsystem des Patienten körpereigene Strukturen erkennt und diese mit den ihm zur Verfügung stehenden Mechanismen angreift (Michelsen et al. 2015). Dabei sind zum einen Teil direkt Immunzellen wie T-Lymphozyten und zum anderen Teil biochemische Substanzen wie verschiedene Zytokine, Botenstoffe zur interzellulären Informationsvermittlung und auch Antikörper (Ab) in den Entzündungsprozess involviert (Aringer et al. 2013). Die Dendritischen Zellen (DC) stellen dabei eine wesentliche Gruppe der Antigenpräsentierenden Zellen (APC) dar. Die APC nehmen Antigene (Ag) auf und präsentieren aus diesen Ag gewonnene Peptide B- und T-Lymphozyten, die dann Ag-spezifische Immunantworten generieren (Di Nicola und Lemoli 2000). Sie sind somit die „Weichensteller“ für eine erworbene Immunantwort. Die Vermittlung erfolgt durch direkte Zell-Zell-Kontakte und auch durch Freisetzung verschiedener Botenstoffe (Lutzky et al. 2007).

Da DC zusätzlich Rezeptoren des angeborenen Immunsystems tragen, fungieren sie als Weichensteller - nicht nur für die Vermittlung humoraler und zellulärer Immunantworten, sondern auch zwischen angeborener und erworbener Immunität (Amodio und Gregori 2012).

Die drei Erkrankungen rheumatoide Arthritis, Spondylarthritis und Psoriasisarthritis teilen - trotz ihrer unterschiedlichen Krankheitsmanifestationen und dem unterschiedlichen klinischen Verlauf - die gute therapeutische Beeinflussbarkeit durch Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α) blockierende Medikamente, sog. Biologica, da TNF α offenbar eines der zentralen Zytokine darstellt, die in diesen Erkrankungen Teile der Entzündungsreaktion vermitteln (Siebert et al. 2015).

Die Frage, welchen Effekt diese neuartige Therapieform auf die DC im peripheren Blut bei diesen rheumatischen Erkrankungen hat, wurde bis dato noch nicht ausreichend geklärt, könnte aber Hinweise auf deren Funktionsweise und auf die immunologischen Prozesse geben, die zur Entstehung der rheumatischen Erkrankungen führen.

1.1. Rheumatoide Arthritis

Rheumatoide Arthritis (RA), auch chronische Polyarthrit, ist eine chronische meist progredient verlaufende Systemerkrankung, die zu einer entzündlichen Schwellung der Gelenkhaut in Form einer Synovialitis führt. Diese proliferative Synovialitis induziert eine Zerstörung von Knorpel und Knochen sowie Sehnen und Sehnenscheiden. Zusätzlich sind Rheumafaktoren (RF) und häufig spezifische Antikörper gegen citrullinierte Peptide (ACPA) nachweisbar (Lutzky et al. 2007). Neben der Entzündung von Gelenk- und Sehnenstrukturen können destruiende Entzündungen auch an anderen Organen entstehen, insbesondere an Lunge und Augen. Darüber hinaus induziert die chronische Entzündung ein erhöhtes Arterioskleroserisiko (McInnes und Schett 2011).

Pathophysiologie

Die Entwicklung des Vollbildes einer RA ist ein mehrschrittiger Prozess, der sich in einer mehrjährigen Entwicklung vollzieht (van Steenbergen et al. 2013, McInnes und Schett 2011).

Dem klinischen Krankheitsbeginn geht, im Falle der seropositiven RA, die Entwicklung einer spezifischen Immunantwort gegen citrullinierte Peptide um Jahre voraus (Nielen et al. 2004). Voraussetzung für diesen Toleranzbruch ist einerseits eine genetische Prädisposition, z.B. unter anderem ein HLA DRB1 Gewebestatus (McInnes und Schett 2011) und eine Exposition gegenüber exogenen Triggern. Im Falle der seropositiven RA sind Rußprodukte im Zigarettenrauch als ein möglicher exogener Trigger identifiziert (Roos et al. 2016, van Steenbergen et al. 2013).

Die Bindung von citrullinierten Peptiden scheint an HLA DR4 1001 Moleküle mit besonderer Affinität zu erfolgen und besonders starke Immunantworten auszulösen (Lutzky et al. 2007).

Die eigentliche entzündliche Gelenkdestruktion scheint zu einem sehr viel späteren Zeitpunkt, insbesondere unter Beteiligung von durch das entzündliche Zytokinmilieu aktivierten synovialen Fibroblasten stattzufinden. Bei RA ohne nachweisbaren RF oder ACPA sind die auslösenden Ursachen nur unzureichend geklärt. Der klinische Verlauf der Erkrankung ist der seropositiven Form ähnlich, die genetischen Prädispositionsfaktoren sind jedoch unterschiedlich (McInnes et al. 2011).

Die Entzündung bei RA wird maßgeblich über verschiedene Signalwege getrieben. TNF α , Interleukin-1 (IL-1), IL-6 und die T-Zell Kostimulation sind zentral beteiligt

(Lutzky et al. 2007), sowie die Aktivierung von B-Lymphozyten. All diese Signalwege stellen damit therapeutische Ansatzpunkte dar (McInnes et al. 2011).

1.2. Spondylarthritiden

Bei den Spondylarthritiden handelt es sich um eine Gruppe von Erkrankungen, die verschiedenen Formen einer Psoriasisarthritis (PsA) und die nicht Psoriasis-assoziierten sich vorwiegend am Achsenskelett manifestierenden Spondylarthritiden. Die Psoriasis-assoziierten - und die Spondylarthritiden ohne Psoriasis-Assoziation unterscheiden sich erheblich hinsichtlich der genetischen Disposition. Während bei der klassischen axialen Spondylarthritis ohne Psoriasis-Assoziation bei 90% der Patienten das HLA Klasse I Merkmal HLA B27 nachweisbar ist, liegt dieses Merkmal bei PsA nur in ca. 16% aller Manifestationsformen der PsA vor (FitzGerald et al. 2015). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird der Begriff Spondylarthritis (SpA) für die Gruppe der nicht Psoriasis-assoziierten Spondylarthritis verwendet und für die Gruppe der Psoriasis-assoziierten Spondylarthritis der Begriff Psoriasisarthritis (PsA).

1.3. Axiale Spondylarthritis

Symptomatisch werden Patienten häufig durch den sog. entzündlichen Rückenschmerz, der im Gegensatz zu den degenerativen Rückenschmerzen v.a. in Ruhe oder nachts auftritt und sich unter Bewegung bessert. Erstmanifestation ist häufig eine Entzündung der Sacroiliacalgelenke. Ein langjähriger Befall der Wirbelsäule führt dann zu Knochenneubildungen mit knöcherner Durchbauung der Sacroiliacalgelenke und zur Bildung von Syndesmophyten, die Wirbelkörper überbrücken und deren gelenkige Verbindungen versteifen - Spondylitis ankylosans (Ozkan 2016). Bei der Beteiligung peripherer Gelenke sind im Gegensatz zur RA eher asymmetrisch einzelne Extremitätengelenke von einer Arthritis betroffen. Sehnenansätze können schmerzhaft entzündlich verändert sein (Enthesitis) und es kann zur Augenbeteiligung in Form einer Uveitis kommen (Ozkan 2016). Ein zentraler Signalweg, über den die Entzündung bei axialen Spondylarthritiden vermittelt wird, ist TNF α . Durch FitzGerald et al. 2015 wurden zusätzlich IL-17 und IL-23 als Signalweg der Entzündung ermittelt.

1.4. Psoriasisarthritis

Bei PsA treten neben den Gelenkbeschwerden spezifische Haut- oder Nagelveränderungen einer Psoriasis vulgaris auf. Die Haut und Gelenkmanifestationen treten nicht immer parallel auf, der Hautbefall kann vor oder auch nach der Arthritis auftreten (Wittkowski et al. 2011). Die klinische Ausprägung der Arthritis kann stark variieren in Form einer Polyarthritis, einer asymmetrischen Oligoarthritis, einer destruierenden Arthritis der Fingerendgelenke, sowie einer Daktylitis. Es kommen auch Manifestationen einer axialen Spondylarthritis vor (Moll und Wright 1973). Die Klassifikation der Erkrankung erfolgt nach Moll & Wright und nach den 2012 erstellten CASPAR Kriterien (Coates et al. 2012). Der Nachweis von RF oder ACPA schließt eine PsA aus (Coates et al. 2012).

Eine HLA-Assoziation mit verschiedenen Subtypen konnte nachgewiesen werden, eklatant ist aber ein Nachweis einer der o.g. Erkrankungsformen in der Familiengeschichte bei nahezu der Hälfte aller Patienten (FitzGerald et al. 2015). Als zentraler Signalweg, über den die Entzündung bei Psoriasisarthritis vermittelt wird, sind TNF α sowie IL6, IL17, IL22 und IL 23 bekannt. (FitzGerald et al. 2015). Ganguly et al. 2009 beschreiben insbesondere eine Aktivierung von plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDC) in Hautläsionen durch endosomale selbstRNA LL37-TLR9-Komplexe, die dann zur Interferonproduktion der pDC führt, welches wiederum im Verlauf myeloische (m)DC stimuliert.

1.5. Medikamentöse Therapien

Den drei Erkrankungen ist gemein, dass eine Therapie so früh wie möglich nach der Diagnosestellung begonnen werden sollte, um Komplikationen und irreversible Schäden zu vermeiden, da Gelenkdestruktion und knöchernen Versteifungen unumkehrbar sind (Aringer et al. 2007, Finzel und Englbrecht 2011, Borchers et al. 2011).

Glukokortikoide stellen nach wie vor zur schnellen Besserung im Schub oder initial zur Remissionsinduktion eine wirksame Medikation dar. Um unerwünschte Wirkungen zu vermeiden, sollten sie möglichst kurz angewendet und im Verlauf ausgeschlichen werden. Bei SpA werden in der Regel höhere Steroiddosen benötigt

und bei PsA zeigen Haut- und Gelenkmanifestationen teilweise ein unterschiedliches Ansprechen (Rodgers et al. 2011).

Basistherapeutika oder auch Disease Modifying Antirheumatic Drugs (DMARD) sind Immunsuppressiva im eigentlichen Sinne. Hauptsächlich verwendet werden Methotrexat, Leflunomid oder Sulfasalazin. Bei axialen Spondylarthritiden sind DMARD in der Regel nicht ausreichend wirksam. Biologika, im Folgenden erläutert, sind eine neue medikamentöse Option, die besonders bei Nichtansprechen auf die DMARD eingesetzt werden können (Finzel und Englbrecht 2011, Gladman 2008).

1.5.1. Biologika

Biologika sind mittels gentechnisch rekombinanter Technologien hergestellte Moleküle. Hierbei kann es sich um monoklonale Antikörper, Antikörperfragmente oder Rezeptorantagonisten handeln. Zusätzlich können Proteinkonstrukte aus klonierten Zytokinrezeptoren, die mit FC-Teilen von Immunglobulin (Ig) G verkoppelt sind, zum Einsatz kommen. Diese Substanzen sind gegen ein spezifisches Ziel gerichtet, das zum einen ein Zytokin wie TNF α , IL1 oder IL6 sein kann (Kay und Upchurch 2012) oder zum anderen gegen Zelloberflächenstrukturen, wie das auf B-Lymphozyten exprimierte CD20.

Bereits 1998 wurde Etanercept für die Behandlung der RA zugelassen, später durch Infliximab, Adalimumab, Certolizumab pegol und Golimumab - ebenfalls TNF α -Inhibitoren - ergänzt. Weitere Ab-Angriffspunkte sind IL1 durch Anakinra, IL6 durch Tozilizumab, T-Zell-Kostimulationsmoleküle durch Abatacept oder B-Zell-Marker durch Rituximab (Woodrick und Ruderman 2011). Für PsA wird auch ein IL12/23-Ab Ustekinumab eingesetzt (Finzel und Englbrecht 2011).

1.6. Tumornekrosefaktor alpha

TNF α ist ein wichtiges Zytokin zur Vermittlung zwischen den Immunzellen bzw. Leukozyten und Lymphozyten und deren Aktivierung, entweder führt es zu Proliferation oder Apoptose (Mewar et al. 2010). Insbesondere zur Reifung von DC ist es notwendig. Nachgewiesen wurde, dass die Interferonproduktion von pDC durch TNF α ausgelöst werden kann (Aringer et al. 2013). TNF α induziert Vasodilatation, einen Temperaturanstieg und die nekrotische Veränderung von Gewebe, also

verschiedene Vorgänge, die entscheidend im Ablauf des Entzündungsprozesses sind (Piccioli et al. 2007). TNF α ist als Zytokin sowohl bei RA, als auch bei SpA und PsA zentral an der Krankheitsmanifestation beteiligt (Listing et al. 2005). Daher ist eine Blockade dieses Signalweges ein therapeutischer Ansatz für alle drei Erkrankungen.

1.6.1. Tumornekrosefaktor-alpha-Inhibitoren und Etanercept

Die TNF α -Inhibitoren haben gemein, dass sie gezielt die biologische Funktion des Moleküls TNF α unterbinden. Verschiedene Zusammensetzungen der Strukturen wurden bis heute entwickelt: Adalimumab und Golimumab als humanisierte (-umab) monoklonale Ab, Infliximab als chimärer (-ximab) monoklonaler Ab, Etanercept, das Konstrukt eines TNF-Rezeptor (-cept) -Fusionsproteins und Certolizumab pegol als chemisch modifiziertes (pegyliertes) humanisiertes Ab-Fab-Fragment (Woodrick und Ruderman 2011).

Die Wirksamkeit von TNF α -Blockern bei RA, SpA und PsA ist vielfach belegt (Aringer et al. 2007, Borchers et al. 2011). Die Therapie hat jedoch nur kompensierenden Charakter, das heißt nach Absetzen der Therapie treten in der Regel Rezidive der Erkrankungen auf (Aringer et al. 2007). Eine Erklärung für diesen Effekt liefern Notley et al. 2010: Die TNF α -Inhibition ist an der Wiederherstellung der regulatorischen T-Lymphozytenfunktion beteiligt. Die regulatorischen T-Lymphozyten können die Immunantwort regulieren, indem sie die Funktion der APC beeinflussen, die Ab-Produktion von Plasmazellen einschränken und die T-Lymphozytenproliferation beschränken (Notley et al. 2010).

Im Gegensatz zu den TNF α -inhibierenden Antikörpern soll laut Windt et al. 2011 Etanercept nur in der Lage sein, frei im Blut zirkulierendes TNF α zu binden. Andere TNF α -Inhibitoren können auch membrangebundenes TNF α außer Funktion setzen. Im Gegensatz zur dieser Darstellung sehen Mewar et al. 2011 Etanercept in der Lage auch membrangebundenes TNF α und zusätzlich membrangebundenes Lymphotoxin α zu binden und damit zu inaktivieren.

1.6.2. Unerwünschte Wirkungen

Zu schweren unerwünschten Wirkungen gehören Infektionen. Durch Blockierung der immunologischen Informationswege und durch Bindung der Botenstoffe können häufiger schwere Infektionen unter der Medikation beobachtet werden, allerdings v.a.

in den ersten Monaten der neuen Therapie. Zusätzlich treten granulomatöse Entzündungen, wie Tuberkulose, häufiger unter TNF α -Blockern auf (Borchers et al. 2011, Listing et al. 2005) und auch Pilzinfektionen sind häufiger unter TNF-Blockern zu verzeichnen (Borchers et al. 2011, Woodrick und Ruderman 2011).

Eine Maßnahme zum Verhindern des Reaktivierens einer latenten Infektion besteht daher darin, die Patienten vor Therapieeinstellung auf eine vorliegende latente Tuberkulose zu untersuchen (Listing et al. 2013).

Weitere Nebenwirkungen sind Unverträglichkeitsreaktionen und die Verschlechterung einer bereits bestehenden höhergradigen Herzinsuffizienz ab NYHA III (Woodrick und Ruderman 2011).

Als immunologischen Nebenwirkungen sind paradoxe Entwicklungen von psoriasis-artigen Hautläsionen und die Entwicklung von Auto-Ab wie z.B. Antinukleäre Ab oder anti-Doppelstrang-DNA-Ab zu erwähnen, die letztlich Symptome eines systemischen Lupus erythematodes (SLE) oder ein allgemeines Exanthem verursachen können (Woodrick und Ruderman 2011).

1.7. Dendritische Zellen

Erstmalig beschrieben wurden DC 1973 von R. M. Steinman und Z. A. Cohn, die diese durch elektronenmikroskopische Untersuchungen, zytochemische Färbungen und Cinematographie aus Milz und Lymphknoten von Mäusen differenzierten, isolierten und darstellten. Ein Differenzierungsmerkmal dieser Zellpopulation war ihre Adhärenz an Oberflächen und die Ausbildung von Fortsätzen oder Zellästen, namensgebend für die DC - aus dem Altgriechischen Dendro für Baum (Steinman und Cohn 1973). Dabei wird diese typische Sternform nur bei gewebsständigen DC vorgefunden. Die Zellkonfiguration befähigt sie durch Oberflächenvergrößerung insbesondere zum Kontakt zu Antigenen und zur Zell-Zell-Interaktion in den lymphatischen Organen (Merad et al. 2013).

Nur ein geringer Anteil der im Blut vorkommenden Zellen wird bei gesunden Individuen von DC eingenommen, weniger als 1% der Mononukleären Zellen des peripheren Blutes bzw. der Gesamtleukozyten (Tjomsland et al. 2010, Scheinecker et al. 2001, Autissier et al. 2010). Hier erscheinen sie als kugelförmige Zellen (Merad et al. 2013).

Im Normalfall entwickeln sich DC aus CD 34 positiven Knochenmarkszellen, werden als DC-Vorläufer ins Blut freigesetzt, um dann ins Gewebe als gewebständige unreife DC auszuwandern (Khan et al 2009). Ziegler-Heitbrock et al. 2010 postulieren, dass zirkulierende DC wie mDC und pDC Übergangsformen sind, hin zu reiferen Formen der bereits beschriebenen APC. Auch Collin et al. 2013 bestätigen, dass pDC- und mDC-Subpopulationen sich zu APC in lymphatischen und anderen Geweben entwickeln. Im Blut und peripherem Gewebe (Ziegler-Heitbrock et al. 2010) exprimieren sie andere Oberflächenmarker als die „APC-Form“ (Amodio und Gregori 2012). Funktionell ist insbesondere die Fähigkeit zur Phagozytose gesteigert. Darüber hinaus werden viel Toll-like Rezeptoren (TLR) und andere Rezeptoren der angeborenen Abwehr exprimiert. Die Bindung von TLR induziert in Blut-DC die Expression spezifischer Zytokin-Muster und deren Migration und Ausreifung zu APC. Damit stellen Blut-DC eine Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunantwort her.

Treten sie im Gewebe in Kontakt mit Entzündungsmediatoren, reifen sie aus und wandern über das lymphatische System in lymphatische Organe, wo sie insbesondere mit T-Lymphozyten interagieren (Merad et al. 2013, Yilmaz et al. 2006). Während des Transports im lymphatischen System phagozytieren sie per Phagozytose aufgenommene Ag wie z.B. Mikroorganismen oder mikrobielle Moleküle (Scheinecker et al. 2001) und präsentieren sie in Form von MHC-Molekülen den naiven T-Lymphozyten (Tjomsland et al. 2010, Khan et al. 2009).

Erkennen bzw. binden reife naive T-Zellen die Oberflächenmoleküle auf DC, gehen sie in einen Aktivierungszustand über, der im Verlauf zur Proliferation, also klonalen Vermehrung und Umwandlung zu Effektor T-Lymphozyten führt, die sog. positive Selektion. Bindet der Rezeptor des T-Lymphozyten an Antigene, die auf Gewebszellen präsentiert werden, so wird der programmierte Zelltod des Lymphozyten als sog. negative Selektion eingeleitet, um die Ausbildung autoreaktiver Effektor-T-Lymphozyten zu unterbinden (Murphy et al. 2008). Damit führen DC zur T-Zellreifung, -proliferation und auch Anergie oder Apoptose.

Piccioli et al. 2007 beschreiben, dass es Subpopulationen unter den DC gibt, die unterschiedlich auf verschiedene mikrobielle Moleküle reagieren. So wurde nachgewiesen, dass pDC auf Kontakt mit mikrobiellen Nukleotiden mit Interferonproduktion reagieren, also eher virale Infektionen beantworten, während

mDC kein Interferon produzieren und durch Lipopolysaccharide also bakterielle Oberflächenstrukturen aktiviert werden.

Die Zelllinie, der im Körper in verschiedenen Organen vorkommenden DC, setzt sich aus einer großen Vielfalt von Reifungsstufen und Untergruppen zusammen. Ihre experimentelle Reifung - soll heißen in vitro - kann aus peripheren Blutmonozyten durch Granulozyten/Makrophagen-Colony Stimulating Factor, IL4 und später TNF α oder CD40Ligand erreicht werden (Di Nicola und Lemoli 2000, Lakey et al. 2009). Diese verschiedenen Populationen der DC stehen in einem empfindlichen Gleichgewicht zueinander, dies gilt insbesondere hinsichtlich der Weiterentwicklung naiver T-Zellen (Hayashi et al. 2013).

1.7.1. Plasmazytoide Dendritische Zellen

PDC wurden aufgrund ihres Aussehens mit Plasmazellen verglichen und daher als plasmazytoid bezeichnet. Sie können anhand ihrer Oberflächenmarker CD 123 (Yilmaz et al. 2006) und Blood Dendritic Cell Antigen (BDCA)-2 und BDCA-4 und des Fehlens von CD11c differenziert werden. BDCA-2 entspricht CD303 und BDCA-4 entspricht CD304 (Dzionek et al. 2000). Sie werden auch als plasmazytoide T-Zellen bezeichnet (Ziegler-Heitbrock et al. 2010).

Ihre Produktion von Interferon Typ I klassifiziert sie als Interferon produzierende Zellen (IPC) (Migita et al. 2005). PDC exprimieren v.a. Toll-like-receptor Typ 7 für die Erkennung viraler RNA und TLR 9 für die Erkennung viraler und bakterieller DNA (Mold und Du Clos 2013, Lutz et al. 2006). Mutmaßlich besteht ihre physiologische Funktion hauptsächlich in der Immunreaktion gegen Viren und intrazytoplasmatische Bakterien (Narbutt et al. 2004). Zudem sind sie zur Endozytose fähig (Chen et al. 2013).

Ihre Population machten in einer Studie an Gesunden einen wesentlichen Anteil der DC von 0,5% der peripheren Mononukleären Zellen im Durchschnitt aus. Während Narbutt et al. 2004 die pDC als die häufigste Subpopulation von DC im peripheren Blut bestimmten, konnten Orsini et al. 2012 und Autissier et al. 2010 zeigen, dass mDC1 die größte Subpopulation darstellen, gefolgt von den pDC.

Tjomsland et al. 2010 beschreiben, dass pDC dem Knochenmark entstammen und durch Zirkulation im peripheren Blut direkt in Lymphknoten auswandern können.

pDC führen in den sekundären lymphatischen Organen dazu, dass B-Lymphozyten zu den Ab-produzierenden Plasmazellen differenzieren, während mesenchymale Stammzellen dort als Gegenspieler fungieren und Differenzierung und Proliferation der B-Lymphozyten vermindern, aber stattdessen ihre Überlebenszeit verlängern (Tabera et al. 2008). Sie können auch eine T-Helfer-Zell-Typ2 Immunantwort begünstigen (Hayashi et al. 2013).

Die Interaktion zwischen pDC und Lymphozyten findet v.a. in den Lymphorganen insbesondere in Lymphknoten statt. Die pDC gelangen mit dem Blutstrom über Expression spezifischer Selektine und dadurch begünstigte Migration durch die sog. hochendothelialen Venolen in die T-Zellregionen der Lymphknoten (Yoneyama et al. 2004). Durch Interferonproduktion der pDC findet eine Aktivierung von mDC statt (Richez et al. 2008).

1.7.2. Myeloische Dendritische Zellen

mDC werden auch Typ 1 DC genannt. Laut Autissier et al. 2010 machen sie mit 75% der DC innerhalb der PBMC die größte Population aus. Sie stammen von myeloischen Zellen also Knochenmarksvorstufen oder auch peripheren Blutmonozyten ab (Chiang et al. 2011, Ziegler-Heitbrock et al. 2010) und benötigen für ihre Proliferation Granulozyten/Makrophagen-Colony Stimulating Factor, aber auch TNF α , CD40Ligand (Lakey et al. 2009, Hayashi et al. 2013) oder IL4 (Chiang et al. 2011). Ihre Oberflächenmarker sind CD1c entspricht BDCA-1, CD11c, CD33 und CD141 entspricht BDCA-3 (Yilmaz et al. 2006, Autissier et al. 2010).

mDC überwachen primär als ortsständige Zellen die Gewebe oder Organe und kommen so mit Ag von Mikroorganismen in Kontakt. Sie wandern anschließend mit dem Lymphstrom in den Lymphgefäßen in die Lymphknoten, wo sie ihre Ag v.a. T-Lymphozyten präsentieren und diese zur Proliferation stimulieren (Chen et al. 2013). Sie produzieren IL12 und führen zur Entwicklung einer T-Helfer-Zell-Typ1-(TH1)Immunantwort (Hayashi et al. 2013).

Bei Autoimmunerkrankungen wie SLE werden mDC durch Interferon α aus pDC stimuliert und nehmen insbesondere nukleäre Bestandteile auf, die sie autoreaktiven B- und T-Lymphozyten präsentieren und so zur Reaktion gegen körpereigene Zellen führen (Richez et al. 2008).

1.7.2.1. Myeloische Dendritische Zellen Typ I

Die mDC 1 exprimieren CD1c (Autissier et al. 2010) auch BDCA 1 und müssen von CD19 und CD20 exprimierenden B-Lymphozyten differenziert werden, die auch BDCA1 aufweisen können. Eine spezielle Funktion ist die Produktion verschiedener Zytokine (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Nach der Studie von Narbutt et al. 2004 stellen sie die zweitgrößte Population der DC innerhalb der peripheren Mononukleären Zellen mit 0,2 % im Durchschnitt, nur wenig kleiner als die pDC (Collin et al. 2013). Auch Autissier et al. 2010 sahen nur 12% der DC CD1c positiv. Demgegenüber konnten Orsini et al. 2012 und Dzionek et al. 2000 die mDC1 als häufigste Subpopulation bis hin zu 76% der Blut-DC bestimmen. Und auch Smolewska et al. 2008 wiesen diese als die häufigsten DC im Blut bei Patienten mit juveniler Arthritis nach.

Robbins et al. 2008 sehen eine der Hauptaufgaben in der MHC2-Präsentation, zudem aktivieren sie TH1-Lymphozyten (Hayashi et al. 2013).

1.7.2.2. Myeloische Dendritische Zellen Typ II

MDC 2 exprimieren CD141 auch BDCA 3 (Collin et al. 2013). Sie sind eine selten vorkommende Zellpopulation und müssen von CD14 exprimierenden Monozyten unterschieden werden.

Diese Zellen sind mit dem geringsten Anteil unter den peripheren Mononukleären Zellen (PBMC) nachweisbar. Nur 0,1 % der PBMC (Narbutt et al. 2004) oder sogar nur 0,01% der DC sind BDCA 3 positiv (Autissier et al. 2010, Dzionek et al. 2000). Ihre Interaktion mit zytotoxischen T-Lymphozyten über Kreuzpräsentation von Ag und ihre Produktion von Interferon β (Ziegler-Heitbrock et al. 2010) sowie die Phagozytose apoptotischer oder nekrotischer Zellen zeichnet sie aus. Sie sind ebenfalls in die Präsentation viraler RNA/DNA mittels TLR3 und 8 involviert (Collin et al. 2013). Und sie aktivieren TH2-Lymphozyten (Hayashi et al. 2013). Sie können wiederum durch IL3 und IL4 aktiviert werden.

1.8. Zusammenfassung Einleitung

Die DC insbesondere ihre verschiedenen Anteile im Blut und in den entsprechenden Geweben spiegeln den Entzündungsprozess - ob nun autoimmun oder als Abwehrreaktion - wider. Bei der Untersuchung von Patienten mit verschiedenen rheumatischen Erkrankungen fielen erniedrigte Anzahlen aller DC-Populationen im peripheren Blut auf. DC werden durch Entzündungsmediatoren zur Differenzierung oder Aktivierung gebracht. Zusätzlich können auch Therapien, wie z.B. Corticosteroide DC in Apoptose bringen und so zu erniedrigten DC-Zahlen im peripheren Blut beitragen.

Es ist von großem Interesse, die DC-Subpopulationen im peripheren Blut an drei pathophysiologisch verschiedenen rheumatischen Erkrankungen zu bestimmen und den Effekt einer TNF α -blockierenden Biologikatherapie auf die DC-Subpopulationen zu untersuchen.

Hypothese war, dass die Reduktion von DC-Subpopulationen als ein unspezifischer Effekt der Entzündung- unabhängig von der Krankheitsentität- auftritt und dass eine effektive Therapie mit einem TNF α -blockierenden Biologicum zur Erholung der DC-Zellzahlen im peripheren Blut führt.

2. Patienten, Material und Methoden

Die Studie wurde konzipiert als nicht-interventionelle therapiebegleitende Beobachtungsstudie von Patienten mit RA, SpA oder PsA. Eingeschlossen wurden Patienten, die sich durch die Krankheitsaktivität oder den bisherigen Therapieverlauf im Rahmen der Versorgung in der Rheumaambulanz für eine Therapie mit einem TNF α -blockierenden Biologikum qualifizierten. Die Studie sah vor, dass neben der klinischen Dokumentation zusätzlich Blutentnahmen zur Bestimmung der Subpopulationen DC erfolgten.

Die Studie wurde vor ihrer Durchführung einer Ethikkommission vorgestellt und genehmigt und entsprach den Anforderungen der Deklaration von Helsinki.

Die Teilnahme der Patienten war freiwillig und wurde nicht durch finanzielle oder materielle Anreize forciert. Den Patienten wurde sowohl der Studienverlauf als auch die Therapie mit Etanercept erläutert. Abschließend wurde vor Studienbeginn durch jeden Studienteilnehmer eine Einverständniserklärung in schriftlicher Form abgegeben, die im Anhang gelistet ist. Die Patientenuntersuchungen der Studie wurden im Exzellenzzentrum Entzündungsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins in der rheumatologischen Abteilung von den dort angestellten Ärzten durchgeführt, ebenso wurden die Therapieverläufe von ihnen überwacht. Eine Fallkonferenz entschied über die Neueinstellung jedes Patienten. Die Gabe von Etanercept erfolgte als Subcutangabe ggf. auch durch die Patienten selbst in der Dosis von 50 mg einmal in der Woche.

Zu den Zeitpunkten vor Therapie mit Etanercept, zwei Wochen, sechs Wochen und 12 Wochen nach Einnahme wurde jeder Patient körperlich-klinisch und durch die Entnahme peripheren Venenblutes untersucht. Die entnommenen Blutproben wurden im überwiegenden Anteil der Fälle direkt am Tag der Blutentnahme in das Untersuchungslabor transportiert und dort sorgfältig weiter verarbeitet - ausschließlich zum Zweck der durchflusszytometrischen Untersuchung für die Studie verwendet, hauptsächlich als Probe, in geringen Anteilen als Kompensationsfärbungen zur Eichung der Gerätschaften für die jeweiligen Messungen. Die Reste der Proben wurden verworfen.

2.1.1. Einschlusskriterien

Für den Einschluss in die Studie erfolgte eine genaue Befragung bzw. Anamnese, körperlich-klinische und laborchemische sowie größtenteils eine bildgebende Untersuchung des Thorax. Die nach den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie diagnostizierten Erkrankungen RA, SpA und PsA waren ein Kriterium, hierfür s. Punkt 2.1.5. bis 2.1.7..

Teilnehmer der Studie mussten das 17. Lebensjahr vollendet haben. Des Weiteren wurden nur Patienten untersucht, die den Leitlinien entsprechend, aufgrund eines Nichtansprechens auf konventionelle Disease modifying antirheumatic drugs (DMARD) auf Etanercept neu eingestellt werden konnten (van der Heijde et al. 2011, Finzel und Englbrecht 2011). Gleichzeitig setzten wir voraus, dass die Patienten noch nicht mit anderen Biologica-Präparaten vorbehandelt waren.

Ein negativer Quantiferontest bzw. ein unauffälliger Röntgenthorax in Bezug auf Tuberkulose waren entsprechend der Leitlinien notwendig.

Die tägliche Prednisolondosis durfte zehn mg nicht überschreiten, um Effekte des Glukokortikoids auf die Zellpopulation der Leukozyten auszuschließen (Hackstein et al. 2005).

2.1.2. Ausschlusskriterien

Bestehende Erkrankungen wie fortgeschrittene Herzinsuffizienz, Lebererkrankungen oder eine aktive oder latente Tuberkulose schlossen die Einstellung auf Etanercept und somit die Studienteilnahme aus, ebenso eine bestehende Schwangerschaft, sowie deren Planung oder eine aktuelle Stillzeit. Impfungen mit Lebendimpfstoffen waren während der Medikamenteneinnahme kontraindiziert.

Ein Auftreten schwerwiegender Nebenwirkungen des Medikaments wie pathologische Veränderung der Laborparameter, kutane Nebenwirkungen über ein Ausmaß von ca. fünf cm über die Injektionsstelle hinaus, Anzeichen für systemische Infektionen oder Tuberkulose, Symptome, die für einen Lupus erythematodes oder ein Guillain-Barré-Syndrom sprachen, führten zur leitliniengerechten Beendigung der Therapie. Eine Patientin hatte eine bereits im Vorfeld bekannte myeloproliferative Erkrankung und wurde bei bereits vor der Therapie vollkommenem Fehlen von DC im peripheren Blut aus der Studie ausgeschlossen. Weiterhin wurden ein Proband aufgrund eines Progresses der Erkrankung bereits zur 2. Messung ausgeschlossen,

da die Therapie beendet wurde. Zwei weitere Patienten wurden aufgrund einer Remission der Arthritis nach der ersten - also der Vormessung - nicht auf Etanercept eingestellt. Es traten bei einer Probandin nach der 3. Messung Beschwerden auf, die den Verdacht auf ein Guillain-Barré-Syndrom nahelegten. Die bisher gewonnenen Ergebnisse wurden jedoch in der Studie ausgewertet, die Therapie aber beendet und keine weiteren Untersuchungen durchgeführt. Gleiches galt für einen Patienten, der eine kutane Nebenwirkung entwickelte, dieser hatte auch bereits zu 3 Zeitpunkten Ergebnisse vorliegen, so dass die Therapie zu diesem Zeitpunkt beendet wurde, die Auswertung aber stattfand. Zwei weitere Patienten zeigte einen milden Progress der Arthritis nach der zweiten Messung, die Therapie wurde abgebrochen, die Werte bis zu diesem Zeitpunkt aber verwertet.

Ebenso wurde bei Persistenz der Beschwerden über die ersten zwei Wochen ohne Tendenz zur Besserung oder einer Verschlechterung der Ausgangssymptomatik zum Wohl des Patienten die medikamentöse Therapie umgestellt, und daher der Patient aus der Studie ausgeschlossen.

2.1.3. Einschlusskriterien Normalkollektiv:

Für das Kollektiv von 29 gesunden Normalpersonen wurden ebenfalls Einschlusskriterien erstellt, da auch Personen im Alter über 60 Jahren untersucht wurden. Für den Einschluss in das Normalkollektiv waren als Voraussetzungen Normwerte für das C-reaktive Protein und Kreatinin notwendig, um Entzündungen und eine Niereninsuffizienz auszuschließen.

Anamnestisch durfte keine Tumorerkrankung und kein Diabetes mellitus in der Vorgeschichte bekannt sein. Eine Therapie mit Antibiotika oder Steroiden in den letzten 2 Wochen vor der Blutentnahme wurde ebenfalls ausgeschlossen. Weiter war ein Nichtraucherstatus notwendig.

2.1.4. Patientenkollektive und klinische Verlaufsparemeter

Es wurden 38 Patienten in die Studie eingeschlossen, davon 16 mit RA, 14 mit SpA und acht mit PsA.

Das Alter aller Gruppen belief sich auf einer Spanne von 19 bis 80 Jahren mit einem Mittelwert von 50,5 Jahren (Standardfehler 17,52 Jahre), dabei in der RA-Gruppe von

20 bis 80 Jahren, Durchschnitt 58,63 (Standardfehler 20,41 Jahre), in der SpA-Gruppe von 20 bis 68 Jahren Durchschnitt 44,64 (Standardfehler 12,43 Jahre) und in der PsA-Gruppe von 19 bis 61 Jahren, Durchschnitt 44,75 (Standardfehler 13,65 Jahre).

Insgesamt wurden 20 Frauen und 18 Männer untersucht, die sich folgendermaßen auf die Gruppen aufteilten: RA-Gruppe mit 13 Frauen und drei Männern, SpA-Gruppe mit vier Frauen und zehn Männern und PsA-Gruppe mit drei Frauen und fünf Männern.

2.1.4.1. Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Die RA-Gruppe konnte in eine seropositive Gruppe mit 11 Patienten und seronegative Gruppe mit fünf Patienten unterteilt werden, wobei dies für die weitere Auswertung keine Rolle spielte. Alle Patienten erfüllten die aktuellen Klassifikationskriterien für eine rheumatoide Arthritis nach ACR 2009 (Kay und Upchurch 2012). Als klinischer Verlaufspareter wurde der Aktivitätsindex DAS 28 dokumentiert (da Mota et al. 2010). Die Abkürzung DAS 28 steht für disease activity score 28 joint count. Die Zahl 28 bezieht sich auf die Anzahl der in die Berechnung einbezogenen Gelenke. Der Score beinhaltet laborchemische und klinische objektivierbare aber auch subjektive Kriterien und eignet sich sowohl zum Einschätzen des prätherapeutischen Schweregrads, als auch als Verlaufspareter in der klinischen Therapiekontrolle. Der Wert gibt Auskunft über inaktive, mäßig aktive und sehr aktive RA sowie gute, mäßige und keine Verbesserung. Hierfür wird 0,28 multipliziert mit der Wurzel der Anzahl der geschwollenen Gelenke plus 0,56 multipliziert mit der Wurzel der Anzahl der schmerzhaften Gelenke plus 0,36 multipliziert mit dem Logarithmus naturalis BSG in mm/h oder 0,36 multipliziert mit dem Logarithmus naturalis des mit eins addierten CRP-Werts plus 0,14 multipliziert mit zehn multipliziert mit dem Wert der numerischen Visuellen Analog Skala (VAS) von null bis zehn (da Mota et al. 2010).

Die Formel zur besseren Übersicht:

$$\text{DAS28} = 0.56 \times \sqrt{(\text{tender joints})} + 0.28 \times \sqrt{(\text{swollen joints})} + 0.36 \times \ln(\text{CRP} + 1) + 0.014 \times \text{VAS} + 0,96.$$

DAS 28 Ist-Wert	gute Verbesserung	mäßige Verbesserung	keine Verbesserung
inaktiv < 3,2	> -1,2 v. Ist-Wert	-1,2 bis - 0,6 v. Ist-Wert	< - 0,6 v. Ist-Wert
mäßig aktiv >3,2 <=5,1	nicht möglich	> -1,2 bis - 0,6 v. Ist-Wert	< - 0,6 v. Ist-Wert
sehr aktiv >5,1	nicht möglich	> -1,2 v. Ist-Wert	> -1,2 bis - 0,6 v. Ist-Wert

Abb. 1 Tabelle mit DAS 28-Ergebnissen modifiziert nach Hettenkofer 2003

2.1.4.2. Patienten mit Spondylarthritis

Die 14 Patienten der Spondylarthritis-Gruppe erfüllten alle die Klassifikationskriterien der ASAS (Assessment of Spondylarthritis International Society) von 2011 (Braun et al. 2011) Die Patienten qualifizierten sich weiter nach den Leitlinien für eine Therapie mit TNF α - blockierenden Biologica (van der Heijde et al. 2011).

Der klinische Verlauf der Erkrankung wurde mittels des Aktivitätsindex BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index) (Braun et al. 2002) bestimmt.

2.1.4.3. Patienten mit Psoriasisarthritis

In der Studie wurden 8 Patienten mit Psoriasisarthritis untersucht. Alle Patienten erfüllten die CASPAR Klassifikationskriterien. Caspar ist ein Akronym für Classification criteria for the Diagnosis of Psoriatic Arthritis. Diese beinhalten einen aktuellen Haut- oder Nagelbefund, diagnostizierte Psoriasis ohne aktuelle Beschwerden oder Psoriasis in der Familie, keinen Nachweis von Rheumafaktoren, durchgemachte oder vorhandene Daktylitis und Nachweis von inflammatorischen Gelenkveränderungen im bildgebenden Verfahren (Finzel und Englbrecht 2011). Die definitive Diagnose PsA kann gestellt werden, wenn mindestens drei der genannten Kriterien erfüllt sind, bzw. drei Punkte erreicht werden und periphere Gelenkentzündungen, Wirbelsäulenbefall oder entzündliche Sehnen- bzw. Sehnenansatzveränderungen auftreten (Coates et al. 2012). Finzel und Englbrecht 2011 weisen darauf hin, dass ebenso wie bei RA, das Verhindern von dauerhaften

Schäden vorrangiges Ziel der frühen Diagnosestellung und Therapie einer PsA sein sollte.

Erst im Verlauf der Studie stellte sich heraus, dass das Patientenkollektiv mit PsA Besonderheiten aufwies. Obwohl Etanercept für die Therapie der PsA zugelassen ist (Fiocco et al. 2005), ist die Wirksamkeit von TNF α -blockierenden monoklonalen Antikörpern auf ausgeprägte Psoriasis-Hautmanifestationen reduziert. Es wurden daher vorrangig Patienten mit gesicherter Psoriasisarthritis, aber mit relativ milder Hautmanifestation und prädominanter Arthritis eingeschlossen. Die daher schwierige Rekrutierung begründet die geringe Anzahl von 8 Patienten im Studienzeitraum.

2.2. Blutproben

Es wurde jedem Patienten im Rahmen der Ambulanzsprechstunde pro Termin zusätzlich zu den anderen zu kontrollierenden Laborparametern ein handelsübliches Lithium-Heparin-Röhrchen in gängiger Blutentnahmetechnik abgenommen. Dafür wurde die Haut hygienisch desinfiziert, die obere Extremität gestaut und anschließend mit einer Butterflykanüle eine periphere Vene punktiert.

Das entnommene Röhrchen wurde bis zum Transport bei Zimmertemperatur gelagert.

Während des Transports wurde auf eine konstante Temperatur der Proben geachtet. Vor der weiteren Verarbeitung wurde optisch die grobe Qualität der Probe überprüft, insbesondere wurde auf eine gute Durchmischung der unterschiedlichen Bestandteile innerhalb des Röhrchens geachtet. Zur Gewährleistung der Suspension dieser Bestandteile wurde vor der apparativen Bearbeitung ein Gerät ein sog. „Rollenmischer“ (CAT RM5, Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH, Staufen, Deutschland) verwendet, der die Proben mittels einer dreidimensionalen Bewegung schonend vermennt.

2.2.1. Bestimmung des Leukozytenanteils mit dem Sysmex KX-21N

Waren die Blutproben in den Röhrchen so vermennt wieder gleichmäßig gefärbt, konnten sie auf die Anteile verschiedener Zellarten untersucht werden, um letztendlich den Leukozytenanteil zu definieren. Hierfür wurde der Sysmex KX-21N (Kobe, Japan) verwendet.

Zuerst wurde das Probenröhrchen geöffnet und unter den Probenport gehalten, eine Auslösetaste betätigt und dadurch 50 µl der Probe in das Gerät zur Analyse gesaugt. Innerhalb des Geräts wurde das Probenmaterial mit einer speziellen Flüssigkeit vermengt und dann in der Messzelle mittels elektrischer Impedanzmethode durch einen Stromimpuls die Größe und Leitfähigkeit jedes einzelnen korpuskulären Bestandteils bestimmt. Damit ist eine Analyse von Gesamt- Leukozyten, „Differentialblutbild“, Erythrozyten und Thrombozyten möglich. Parallel wird in dem Gerät eine Hämoglobinbestimmung durchgeführt. Dabei werden die Erythrozyten lysiert und das Hämoglobin mit quartärnären Ammoniumsalzen versetzt. Diese führen im Häm-Molekül zur Fe-Oxidation in Fe³⁺ und induzieren die Bildung von Methämoglobinkomplexen, die photometrisch (555nm) gemessen werden können. (Muster-Standardarbeitsanweisung SYSMEX Hämatologie-System KX-21N) Das Gerät wurde täglich in einer vom Hersteller festgelegten Routine automatisch geeicht.

Die Messereignisse wurden dann innerhalb des Geräts berechnet und auf einem Ergebnisbogen ausgeworfen. Dabei gab es zum einen numerische Werte pro Volumeneinheit für die Zellpopulationen und zum anderen prozentuale Anteile bezogen auf die Zellgesamtheit.

Für die Experimente waren lediglich die numerischen Anzahlen der Gesamt-Leukozyten für die Berechnung der DC relevant.

2.3. Färbemethodik

Für ein Experiment, also die Untersuchung der Probe eines Studienpatienten zu einem der definierten Zeitpunkte, wurde jeweils eine Probenfärbung im nachfolgenden beschriebenen Prozedere durchgeführt. Die Kompensationsfärbungen wurden einmal monatlich - abgestimmt auf die Routine des hämatologischen Labors - teilweise bei technisch-bedingten Veränderungen bestimmter FACS-Gerät-Parameter auch bis zu dreimal im Monat durchgeführt, gespeichert und in jedes Experiment eingerechnet.

2.3.1. Miltenyi-Kit

Für die Versuche wurde ein von MACS Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) bereits fertig zusammen gestellter Kit zur Differenzierung und

Bestimmung peripherer DC, in diesem Fall der pDC, mDC1 und mDC2 aus Vollblut verwendet (Blood Dendritic Cell Enumeration Kit - human). Dieser Kit enthielt alle für 50 Messungen am Durchflusszytometer notwendigen Lösungen, bis auf eine Wasch- und Verdünnungslösung. Dafür waren noch destilliertes Wasser und die in der hämatologischen Untersuchungsroutine am Durchflusszytometer übliche Phosphat-Salz Puffer-Lösung mit einem zugemengten Eiweiß notwendig; siehe Probenfärbung. Ein ml Anti-BDCA-Cocktail enthielt die Fluoreszenz-konjugierten monoklonalen Ab BDCA1-R-phycoerythrin PE (Klon: AD5-8E7 Maus IgG2a-Isotyp), BDCA2-Fluorescein Isothiocyanate FITC (Klon: AC144 Maus IgG1-Isotyp), BDCA3-Allophycocyanin APC (Klon:AD5-14H12 Maus IgG1-Isotyp), CD14-PE-Cy5 (Maus IgG2a-Isotyp) und CD19-PE-Cy5 (Maus IgG1-Isotyp) in 0,05%iger Natriumazidlösung und einen Stabilisator.

Ein ml Control-Cocktail enthielt die Fluoreszenz-konjugierten monoklonalen Ab Maus IgG2a-PE, Maus IgG1-FITC, Maus IgG1-APC, CD14-PE-Cy5 (Maus IgG2a-Isotyp) und CD 19 PE-Cy5 (Maus IgG1-Isotyp). Die CD14 und CD 19 Komponenten der Farbstoffcocktails waren bestimmt für den Ausschluss von B-Lymphocyten und Monocyten. Die anderen Komponenten des Controlcocktails dienten zur Erkennung einer unspezifischen Ab-Farbstoffkonjugat-Bindung z.B. über den Fc-Rezeptor an Zelloberflächen bei gleichen Mauseisotypen der BDCA- und Controlcocktails.

Ein ml Dead Cell Discriminator, eine Fluoreszenz-photolytische Bleiche, gelöst in PBS.

50 ml Red Blood Cell Lysis Solution, die noch zehnfach weiter zu verdünnen war.

25 ml Fix Solution, 3,7 % Formaldehyd, gelöst in PBS.

0,5 ml Discriminator Stop Reagent.

Für die Waschschrirte wurde eine 0,5 %ige Lösung aus in Phosphate-buffered-Saline (PBS) gelöstem Bovinem Serum Albumin (BSA) hergestellt. BSA wurde von den Firmen PAA The Cell Culture Company und PBS von Gibco By Life Technologies verwendet. Für die Lösung wurde auf einen Liter destilliertes Wasser 2 Tabletten PBS mit einem Anteil von 0,5 % BSA vermengt.

Anstatt der Red Blood Cell Lysis Solution aus dem Kit wurde eine 1:10 verdünnte BD FACS™ Lysing Solution verwendet. Nachdem sich in den ersten Vorversuchen zeigte, dass die Lysis Solution in keinem der ersten beiden verwendeten Kits von MACS Miltenyi Biotec so funktionierte, dass die Proben am Ende der Waschschrirte hämoglobinarm waren, beschlossen wir nach Rücksprache mit Miltenyi über mögliche Interaktion mit den Fluoreszenzfarbstoffen, auf die im Labor sonst

üblicherweise verwendete Lyselösung von Becton, Dickinson and Company zurückzugreifen. Diese funktionierte optisch stets einwandfrei in Bezug auf die Zerstörung der roten Blutkörperchen und auch die Ergebnisse der Messungen an den FACS-Geräten waren sichtbar, in Bezug auf die Menge an Zellschrott/Debris. Eine andere Abweichung von der im Kit beschriebenen Methodik war, dass wir auf die Verwendung des Dead Cell Discriminator und folglich auch auf die Discriminator Stop Reagent verzichteten, da die Proben in kürzest möglicher Zeit bearbeitet wurden und wir keine Patientengruppe untersuchten, bei der von einer großen infektiösen Gefahr über nukleäres Material auszugehen war.

2.3.2. Probenfärbung

Für die Färbung der Proben wurde der o.g. MACS Miltenyi Biotec „Blood Dendritic Cell Enumeration Kit human“ verwendet. Dieser Kit beinhaltet zum einen Färbecocktails für die Dendritischen Zellen (Anti-BDCA Cocktail) und für die Negativkontrollen (Control Cocktail), zum anderen Aufbereitelösungen für die Proben zur Zerstörung der roten Blutkörperchen (Red Blood Cell Lysis Solution), zum Ausschluss toter Zellen (Dead Cell Discriminator und Discriminator Stop Reagent) und eine Lösung zur Fixierung der sensiblen Färbungen (Fix Solution).

Für jedes einzelne Experiment, also einen Patientenuntersuchungstermin, wurden je zwei Proben für DC und je zwei Proben für die Negativkontrolle gefärbt, um eine genügend große Anzahl an Ereignissen bzw. Zellen insgesamt messen zu können, da die Gesamtanzahl der DC nur ca. ein Prozent der Blutzellen ausmacht. Dafür wurden also vier mal 300 µl des heparinisierten Vollbluts in die Becton, Dickinson and Company Falcon-Einmal-Polystyrol-Teströhrchen (Größe: 12 mal 75 mm) pipettiert und dann mit der angegebenen Menge des jeweiligen Farbstoffs versetzt und vermischt. Diese Cuvetten wurden in einem Ständer platziert, um dann unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur für exakt zehn min die Reaktion zwischen Ab-Farbstoff und Zellen stattfinden zu lassen. Im Anschluss wurde unter einem üblichen Vermischungsvorgang an Vermischungsgerät (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA) das Vollblut-Farbstoff-Gemisch jeder Cuvette mit je vier ml Lysing Solution versetzt und ebenso wieder unter Lichtabschluss für zehn min in die Zentrifuge gestellt, um einen direkt anschließenden Zentrifugationsvorgang ohne Zeitverzögerung durchführen zu können. Die Zentrifuge wurde unter Raumtemperatur betrieben. Nach der im Kit beschriebenen Anleitung wurde die

Rotationskraft auf 300 mal g eingestellt, welche an dem Gerät Minifuge GL Heraeus Christ (Osterode, Deutschland) bei 1400 Umdrehungen pro min lag. Die Röhrchen wurden dann fünf min lang zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit dem gleichen Prozedere: Die Cuvetten wurden mit einer relativ zügigen manuellen Bewegung gewendet, so dass sich ihr Inhalt entleerte und gleichzeitig der Bodensatz mit den Zellen in den Röhrchen blieb, restliche Tropfen an den Cuvettenrändern wurden in der Überkopffosition abgetupft und erst dann die Gläschen wieder gewendet und in einen Reagenzglasständer gestellt. Die Cuvetten wurden wieder unter dem Vorgang des „vortexens“ mit je vier ml einer 0,5 %igen Lösung aus in Phosphate-buffered-Saline (PBS) gelöstem Bovinem Serum Albumin (BSA) vermischt, bis sich der Bodensatz - auch Pellet genannt - gelöst hatte. Dann wurde wieder ein Zentrifugationsvorgang mit denselben Parametern durchgeführt. Der zweite oben beschriebene Waschschriff erfolgte in gleicher Weise.

Nach dem dritten Zentrifugationsvorgang wurden die Cuvetten in oben beschriebener Art von der Flüssigkeit entleert, um dann mit je 300 µl PBS+ 0,5% BSA aufgefüllt um eine entsprechende Zellsuspension zu erhalten. Die zwei Röhrchen mit dem anti-BDCA-Cocktail wurden in eins zusammengekippt, ebenso die zwei Röhrchen mit dem Controlcocktail. Die fertige Lösung wurde gekippt und nicht pipettiert, um eine Schädigung der Zellen durch Scherkräfte während des Pipettierens zu vermeiden. Die somit verbliebenen zwei unterschiedlich gefärbten Cuvetten mit je 600 µl Lösung aus Farbstoff-Zellgemisch in PBS+ 0,5% BSA wurden mit 300 µl der Kit Fix Solution fixiert und bis zur Messung am FACS-Gerät im Dunkeln gelagert. Die Zeitspanne bis zur Messung belief sich auf maximal 20 min - in den meisten Fällen wurde direkt nach den Färbeschritten gemessen - daher wurde auf ein Kühlen der Proben verzichtet.

Um eine Vermengung von Farbstoffen bzw. Reagenzien im Bereich der Messzelle oder des Probenansaugröhrchens zu vermeiden, wurde ein Reinigungsröhrchen mit reinem PBS zwischen der Messung des Proben- und des nachfolgenden Kontroll-Röhrchens für zwei min „gemessen“. Für dieses Röhrchen wurde eine Cuvette mit ca. zwei ml PBS-Lösung gefüllt.

2.3.3. Kompensationsfärbung

Für die Kompensationen wurden bis auf die separaten Ab-Farbstoffe die gleichen Materialien wie für die Probenfärbungen verwendet, also dieselben Cuvetten und

Verarbeitungsgerätschaften, Lyselösung, PBS+ 0,5% BSA-Lösung, Fix Solution und ebenso heparinisertes Vollblut von den Studienpatienten oder mir selbst.

Die verwendeten Farbstoffe waren im Einzelnen FITC-CD8, PE-CD8, PE Cy5-CD2 und APC-CD3.

Das Färbungsprozedere war folgendes:

Pipettieren von 50 µl heparinisierten Vollbluts in die Cuvetten, dazu wurden dann die Farbstoffe in nach Herstellerangaben definierten Mengen pipettiert. Ein ungefärbtes Kontrollröhrchen zur Festlegung oder Gating des Lymphozytenmessbereiches, ein FITC-Röhrchen mit zehn µl Farbstoff, ein PE-Röhrchen mit zehn µl Farbstoff, ein PE Cy5-Röhrchen mit 20 µl Farbstoff und ein APC-Röhrchen mit 0,5 µl Farbstoff. Die unterschiedlichen Farbstoffmengen richteten sich nach den Herstellerempfehlungen für das jeweilige Probenvolumen. Die Blut-Farbstoff-Gemische wurden dann im Dunkeln bei Raumtemperatur für zehn min inkubiert und anschließend unter vortexen je ein ml Red Blood Cell Lysis Solution des FACS-Labors zugegeben. Diese gut vermischte Suspension wurde dann in der Zentrifuge bei Raumtemperatur erneut zehn min inkubiert und direkt im Anschluss für fünf min bei 300 mal g bzw. 1400 Umdrehungen pro min zentrifugiert.

Es folgten die zwei Waschschrte in gleichem Ablauf wie bei den Probenfärbungen.

Die Cuvetten wurden mit einer zügigen Umwendbewegung entleert, abgetupft, aufgefüllt mittels Pipette mit vier ml PBS + 0,5% BSA während des

Vermischvorgangs auf dem Vortex-Gerät und dann erneut bei 300 g fünf min

abzentrifugiert. Diese Schritte wurden in gleicher Weise wiederholt. Abschließend

folgte noch für die Fixierung das erneute Entleeren der Cuvetten und Auffüllen mit

300 µl PBS + 0,5%ige BSA-Lösung und 150 µl der Fix Solution pro Röhrchen. Auch

diese Cuvetten wurden im Ständer bis zur Messung bei Raumtemperatur und im

Dunkeln gelagert.

2.4. Fluorescence Associated Cell Sorting (FACS)

Die aktuellen Durchflusszytometer mit Zusatzfunktionen werden FACS genannt, für

Fluorescence Associated Cell Sorting. Das heißt, das Gerät kann anhand einer

Floureszenzmarkierung Moleküle, Bestandteile oder Zellen voneinander

differenzieren und diese im Anschluss nach vorher vorgegebenen Parametern

auftrennen/sortieren. Diese Funktion kann notwendig sein, wenn sich weitere

Untersuchungsschritte mit den so anhand von Oberflächenstrukturen sortierten und

definierten Zellen anschließen sollen, z. B. Zellkultur oder Bestimmung von Proteinsynthesemuster der Zellart. Für die durchgeführte Studie war dieser Schritt nicht notwendig, da es allein um die Bestimmung der Zellanzahl ging, also nur um die durchflusszytometrischen Eigenschaften des Geräts.

Ein FACS besteht aus verschiedenen Einrichtungen hierzu gehören :

1. die Vorrichtung für die Probencuvette, in diesem Fall eine Halterung für ein sog. Karussell für maximal 40 Proben, ein Halterarm, der die jeweilige zu messende Probe aufnimmt und zum Probeninjektionsröhrchen (SIT) führt,
2. die Einrichtung zum Flüssigkeitstransport: ein Probeninjektionsröhrchen (SIT), ein Zufluss verschiedener Lösungen zum Spülen des sensiblen Messbereichs, ein gelummanteltes Röhrsystem, das sich von der Probenaufnahme bis zum Durchlauf der Messzelle oder Durchflusszelle soweit verjüngt, dass die Probenpartikel möglichst einzeln im Flüssigkeitsstrom aufgetrennt werden und dann im „Gänsemarsch“ durch das Licht fließen,
3. die Messzelle aus der Lichtquelle in diesem Fall zwei Laser und der komplexen Detektoreinrichtung aus verschiedenen Prismen, Linsen und den eigentlichen Photozellen für relevante Wellenlängenbereiche,
4. dem Netzwerk zwischen den Detektoren und dem Rechner zur Datenverarbeitung mit entsprechender Software.

Der Rechner wird dabei nicht nur verwendet, um die gemessenen Daten auszuwerten, sondern auch um eine Reihe von Parametern des FACS-Geräts für die jeweilige Messung einzustellen, wie Messzeit bzw. maximale Messergebnisanzahl, Schwellenwerte für Messsignale pro Zeiteinheit, Geschwindigkeit des Flüssigkeitsstroms, Anzahl der verwendeten Laser, Kanäle der Photozellen und die Stellung der Prismen bzw. deren Signalverstärkungen.

Wird die Probenflüssigkeit in das Gerät aufgenommen, so wird sie von einem weiteren Flüssigkeitsfilm (sheath stream) aus dem FACS-Gerät selbst ummantelt, um einen gleichmäßigen Fluss der Probe zu gewährleisten. Die Röhre für die Flüssigkeiten verengt sich dabei stetig bis zur eigentlichen Messzelle, so dass die Flüssigkeiten beschleunigt werden und theoretisch nur eine Zelle oder ein Partikel pro sehr kurzer Zeiteinheit im Messvorgang befindlich ist. Dieser Messvorgang beginnt mit dem Eintreten des Partikels in den Laserstrahl, der senkrecht die Flüssigkeiten durchleuchtet, und endet mit dem Austreten der Zelle aus dem Strahl. Während die Zelle sich im Laserstrahl befindet, wird das von ihm emittierte Licht einer definierten Wellenlänge verändert bzw. gebrochen. Das Laserlicht kann aus

mehreren Laserquellen mit unterschiedlichen Wellenlängen/Farben zusammengesetzt werden. In den verwendeten Geräten, bestehend aus einem blauen Laser bei 488-nm, 20 mW, einem roten bei 633-nm, 17 mW und eventuell einem violetten bei 405-nm, 30 mW. Die Strahlen der Quellen werden durch Fiberoptik zur Messzelle geleitet und dort durch Prismen und Linsen so gebündelt, dass sie einzelne konzentrierte Lichtstrahlen durch den Flüssigkeitsstrom senden. Die Auswahl der verwendeten Laser hängt davon ab, wie viele Kanäle also Farbstoffe in der Untersuchung Anwendung finden.

Auf der dem Laser gegenüberliegenden Seite des Flüssigkeitsstroms gibt es dann verschiedene Photodetektoren, die bei Beleuchtung elektrische Signale an die Recheneinheit weiterleiten. Der Forward Scatter (FSC) ist der Laserquelle gegenüber gelegen, somit senkrecht zum Flüssigkeitsstrom ausgerichtet und ermöglicht Aussagen über die Größe des Partikels. Vereinfacht kann man sich auch vorstellen, dass eine größere Zelle einen größeren Schatten auf dem Detektor erzeugen kann. Der Side Scatter (SSC) ist der Detektor in einem Winkel von 90° zum Strahlengang der Lichtquelle. Das Streulicht, das auf diesen Detektor trifft, lässt Aussagen zur inneren Beschaffenheit der Zelle zu, wie z.B. Reichtum an Granula oder Zellorganellen. Sowohl der FSC als auch der SSC sind auf die emittierte Wellenlänge des Primärlasers (blau) eingestellt im Gegensatz zu den weiteren Photozellen, die die Fluoreszenzfarbstoff-Wellenlängen oder die Anteile des gebrochenen Lichts detektieren. Ihre Anzahl ist von den Voreinstellungen abhängig, je nachdem wie viele verschiedene Farbstoffe für den Versuch verwendet werden. In diesem Fall gab es FSC, SSC, FITC, PE, PE Cy5 und APC. Es wurden also vier zusätzliche Kanäle bei definierten Wellenlängen ausgewertet.

Die Wellenlängen, die die Detektoren registrierten, waren folgendermaßen aufgeteilt: FSC und SSC 488 nm, FITC 525 nm, PE 575 nm, PerCP Cy5.5 695 nm und APC 660 nm.

Auf dem Kanal PerCP Cy5.5 wurde der Farbstoff PE Cy5 gemessen, da diese in der Wellenlänge relativ übereinstimmten.

Erwähnenswert ist, dass Wellenlängenbereiche der Fluoreszenzfarbstoffe sich überschneiden können (spectral overlap), dies gilt insbesondere, wenn viele Farbstoffe in einem Vorgang verwendet werden. Um dieses Phänomen zu minimieren, sind dann die entsprechenden Kompensationen notwendig, um die Messbereiche für das jeweilige Fluoreszenzsignal eines Farbstoffs festzulegen bzw. zu begrenzen. Dafür gibt es zum einen durch den FACS-Gerät-Hersteller bereits

vorgefertigte Farbstoffkomponenten sog. BD-FACS-7-Farben-Setup-Mikropartikel oder auch Rainbowbeads, so dass als Routine vor dem Messvorgang die Einstellungen überprüft werden und bei Bedarf justiert werden können. Und zum anderen wird wie bereits im Kapitel 2.2.3. beschrieben für jedes Experiment eine Kompensationsmessung durchgeführt oder aus der gespeicherten Form abgerufen und dann in die Messergebnisse der eigentlichen Messung eingerechnet. Zur Gerätinstandhaltung wurden folgende Lösungen verwendet: BD FACS™ Flow-Lösung, BD FACS™ Clean-Lösung, BD FACS™ Stillleg-Lösung und Bleichlösung. Für die Studie wurden die zwei im Folgenden erläuterten FACS-Geräte verwendet, die sich jedoch nur in geringem Maße unterschieden.

In der vorgelegten Arbeit wurden in jeder Messung 1.Mio Ereignisse/ Zellen untersucht. Durch die hohe Zahl der gemessenen Zellen wurde die Genauigkeit der Analyse der DC Subpopulationen entscheidend erhöht.

2.4.1. BD FACS Canto A™

Der Canto A von Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, USA) war mit drei separat funktionierenden Lasern ausgestattet, so dass verschiedene Lichtwellenlängen eingestrahlt werden konnten. Es wurden für die Studie jedoch nur blaues und rotes Laserlicht verwendet, da die Farbstoffe des Kits den Messbereichen dieser Wellenlängen entsprachen: Blauer Laser für FITC, PE, PerCP oder PerCP-CyTM5.5, PE-CyTM7 mit den Wellenlängen 525, 575, 678 oder 695 und 785 nm und Roter Laser für APC, Alexa Fluor® 700, APC-Cy7 or APC-H7 mit 660, 720 und 785 nm.

2.4.2. BD FACS Canto II™

Auch der Canto II von Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, USA) ermöglichte Messungen mit drei Lasern vorzunehmen, welches allerdings für die Versuche keine Verwendung fand. Es wurden hier lediglich blaues und rotes Laserlicht verwendet mit Kanälen für folgende Farbstoffe: Blauer Laser für FITC, PE, PerCP oder PerCP-CyTM5.5, PE-CyTM7 mit den Wellenlängen 525, 575, 678 oder 695 und 785 nm. Roter Laser für APC und APC-Cy7 mit den Wellenlängen 660 und 785 nm.

2.4.3. Software an den BD FACS Cantos™

Für die Bedienung der FACS-Geräte wurde die FACSDiva™ Software Version 5.0 Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, USA) verwendet. Die Software arbeitete auf der Grundlage eines Windows XP Betriebssystems.

Für die Experimente und die Kompensationen wurde jeweils zu Beginn der Studie eine Vorlage/Template in der BD FACSDiva™ Software Version 5.0 erstellt, die die Einstellungen des FACS-Geräts definierte. Die Experimentenvorlage legte die verwendeten Laserquellen, die verwendeten Photodetektoren, die Verstärkungen für die Photodetektoren, die maximale Laufzeit der Röhren bzw. die maximale Anzahl an Messereignissen, Schwellenwerte der Messereignisse der verschiedenen Messkanäle, Geschwindigkeit des Proben- und Lösungszustroms, mechanische Vermengung der Proben in Lösung im Karussell und Reinigungsvorgänge wie Spülvorgang des SIT oder Messung des Reinigungsröhrchens fest. Bei Bedarf wurden Änderungen vorgenommen wie z.B. die monatlichen Neueinstellungen der Verstärkungen.

2.4.4. Auswertesoftware

Für die Auswertung der Messungen also Kompensationen und eigentlichen Proben wurde FACSDiva™ Software Version 5.0 Becton, Dickinson and Company verwendet. Die Software arbeitete auf der Grundlage eines Windows XP Betriebssystems. Die Auswertung wurde an einem eigens dafür installierten Rechner durchgeführt. Die Messungen wurden in Rohform, d.h. ohne Einberechnung der Kompensation, als Datei auf einem Server gesichert.

2.4.5. Berechnung

Erster Arbeitsschritt nach Öffnen der Messung war das Einberechnen der monatlichen Kompensation in jedes der beiden Messröhrchen, dies erfolgte durch in der Software ermöglichtes Anwenden der Kompensationsparameter (Apply Compensation) in jedes Messröhrchen.

Dann wurden die eigentlichen Messungen bearbeitet, indem eine Analysevorlage (Analysis template) geöffnet wurde, in der die Populationen durch Setzen

entsprechender Gates voneinander abgegrenzt werden konnten: Nach Sichtung der Punktwolken aus verschiedenen Parametern in einem Diagramm mit FSC als Ordinate und SSC als Abszisse wurde die Population der Leukozyten so anhand von Größe und Granularität definiert. Hierfür wurde eine Diagonale zwischen Debris und Lymphozytenpopulation gezogen, die Lymphozyten ins Gate eingeschlossen. Dann wurde noch ein Rechteck zu dieser Linie hinzugefügt, so dass ein asymmetrisches Siebneck entstand. Besonderes Augenmerk lag auf dem Einschluss der Granulozyten im Bereich hoher SSC-Werte sowie dem Ausschluss von Debris mit hohen FSC-Werten.

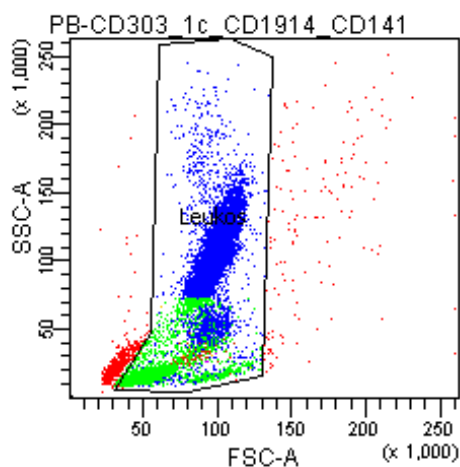


Abb. 2 Auswahl der Leukozytenpopulation: FSC gegen SSC

Dann wurde aus diesem Gate ein neues Diagramm der Werte mit SSC als Ordinate und PE Cy5 als Abszisse erstellt. Hier wurde ein fünfeckiges Gate im Bereich der Lymphozyten gezogen mit Einschluss der im SSC kleinwertigen Granulozyten und im PE Cy5 Kanal kleiner Monozyten.

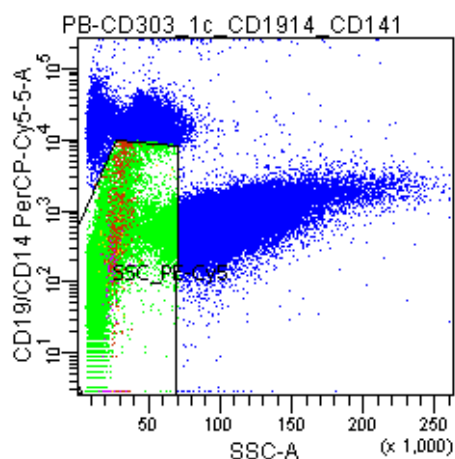


Abb. 3 Auswahl der gesamten DC: CD19/CD14-PE-Cy5 gegen SSC

Aus diesem Gate wurden wiederum zwei neue Gates erstellt einerseits eines für MDC1 und PDC mittels BDCA2 (oder CD303)-FITC als Ordinate und BDCA1 (oder CD1c)-PE als Abszisse. Hier wurden dann die Punktwolken mit Rechtecken eingegrenzt und die Anzahl als Numerische Ziffer in Tabellen sichtbar.

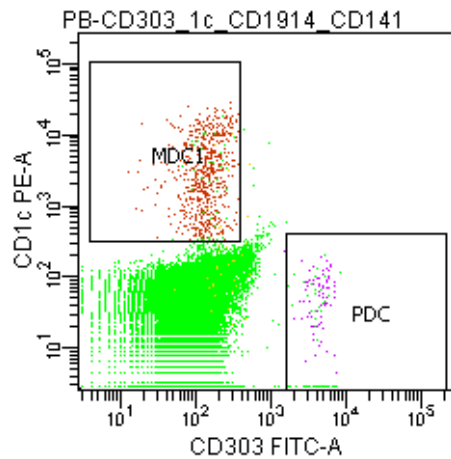


Abb. 4 MDC1 und PDC: BDCA2 gegen BDCA1

In gleicher Weise wurde ein Diagramm für MDC2 erstellt mittels Diagramm mit BDCA2-FITC als Ordinate und BDCA3 (oder CD141)-APC. Auch in diesem Diagramm konnte mittels eines rechteckigen Gates eine numerische Anzahl festgelegt werden.

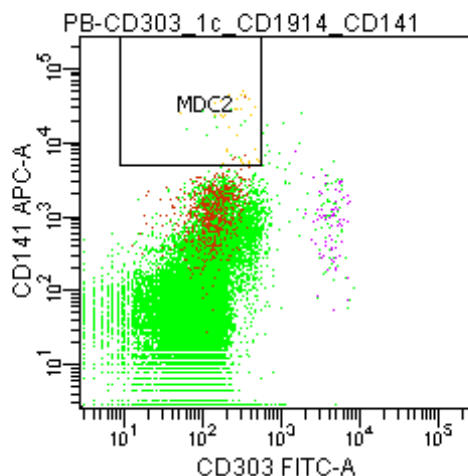


Abb. 5 MDC2: BDCA2 gegen BDCA3

Zur Berechnung der Anzahl der in den Proben vorkommenden DC musste noch ein Berechnungsschritt erfolgen, in dem die sozusagen fehlerhaft erscheinenden Zellen im Kontrollröhrchen mittels einfachem Dreisatz herausgerechnet wurden:

Anzahl der DC in Probe in Prozent minus Anzahl DC im Kontrollröhrchen in Prozent, dieser Wert multipliziert mit der absoluten Leukozytenanzahl aus dem Blutbildergebnis, geteilt durch 100.

$$\left(\left(\text{Tube CD303_1c_CD1914_CD141: \#Events DC/All Events} \times 100 \right) - \left(\text{Tube IgG_IgG_CD19CD14_IgG: \#Events DC/All Events} \times 100 \right) \times \text{Leukozyten pro l (Leukozytenanzahl)} \right) / 100$$

Experiment Name: F0026850							
Specimen Name: PB							
Tube Name: CD303_1c_CD1914_CD141							
Record Date: Mar 3, 2011 8:38:33 PM							
\$OP: Facslabor							
GUID: c3891a4c-97c2-448b-b757-e848317101c1							
Population	#Events	%Parent	CD303 FITC-A Mean	CD1c PE-A CD19/CD14 Per... Mean	CD141 APC-A Mean	CD141 APC-A Mean	CD141 APC-A Mean
All Events	1,253,584	####	245	261	3,626	1,194	1,194
Leukos	1,192,537	95.1	198	230	3,545	1,080	1,080
SSC_PE-Cy5	468,056	39.2	109	90	264	143	143
MDC1	5,875	1.3	146	4,751	1,737	1,392	1,392
PDC	623	0.1	4,542	61	93	1,340	1,340
MDC2	429	0.1	263	1,441	1,093	18,290	18,290

Abb. 6 errechnete Ergebnisse aus den Punktwolkengates

2.5. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse der im Programm Numbers Mac Os X 10.6.8 zusammengefassten Daten wurde die Software SigmaPlot Version 11.0 für Windows verwendet. Für den Vergleich von 2 Gruppen (Normalkollektiv vs. Alle Erkrankten) kam der Rangsummentest nach Mann und Whitney zur Anwendung. Für die Analyse der Zellzahlen vor Beginn der Therapie zwischen den gesunden Kontrollen und den Patientengruppen mit RA, SpA und PsA wurde eine non-parametrische Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis durchgeführt und post-hoc ein Gruppenvergleich gegenüber der Kontrollgruppe nach der Methode von Dunn durchgeführt. Die Zeitverläufe unter Therapie wurden mittels Varianzanalyse (für Wiederholungsmessungen) analysiert unter Verwendung der Holm-Sidak Methode zum post-hoc Vergleich gegenüber der Kontrollgruppe. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Vergleich der DC-Subpopulationen vor Therapiebeginn

Ein Ergebnis war eine verminderte Anzahl an DC aller Subpopulationen im Vergleich zur gesunden Normalbevölkerung bei allen drei Patientengruppen ohne Vorbehandlung. Im Vorfeld war eine Studie durchgeführt worden mit dem Ergebnis, dass in einer standardverteilten Normalbevölkerung die DC in allen Altersgruppen geschlechtsunspezifisch gleichmäßig verteilt waren, mit bestimmten Standardverteilungen für die jeweilige Subpopulation: Die mDC1 hatten einen Mittelwert von 32657,6 Zellen/ml (Standardfehler 3004,5), die pDC einen Mittelwert von 9932,7 Zellen/ml (Standardfehler 828,7) und die mDC2 einen Mittelwert von 1871,0 Zellen/ml (Standardfehler 190). Die Anzahlen der DC über alle Erkrankungen gesehen teilte sich folgendermaßen auf: mDC1 mit durchschnittlich 6791,6 Zellen/ml (Standardfehler 746,5), pDC mit 5523,0 (Standardfehler 460,6) und mDC 2 mit 1011,1 (Standardfehler 121,1).

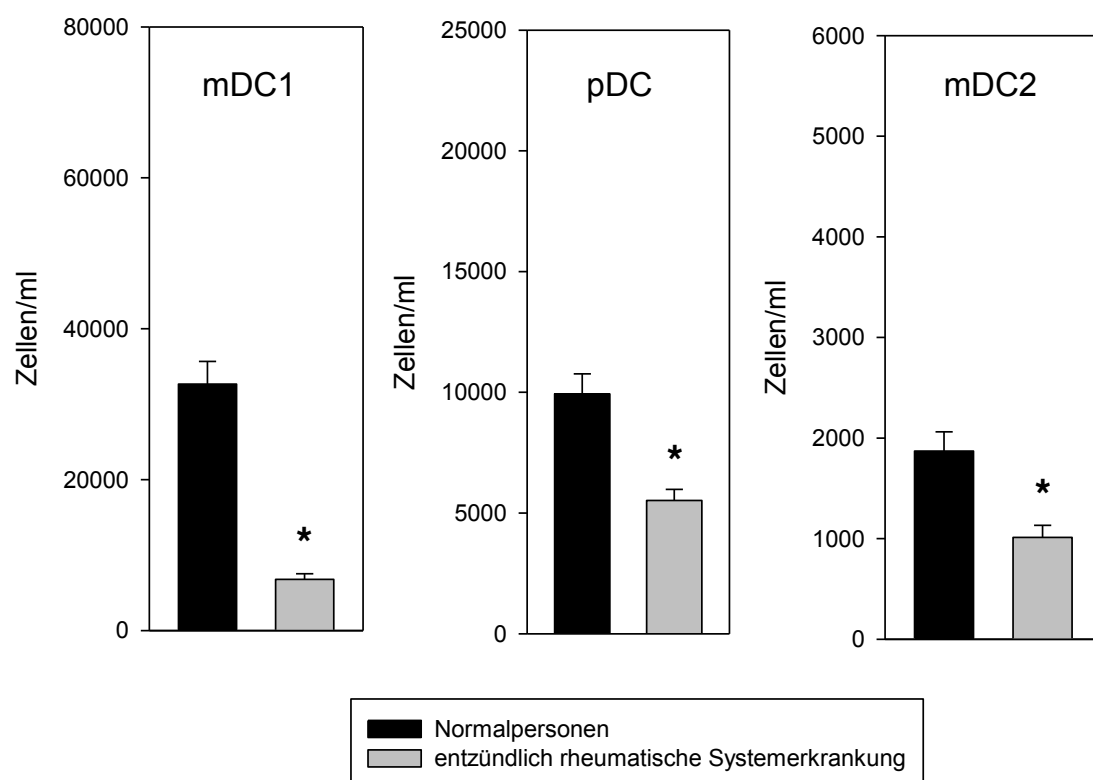


Abb. 7 Vergleich der Anzahl dendritischer Zellen von gesunden Normalpersonen (Schwarz, n=39) und an entzündlich rheumatischen Systemerkrankungen Erkrankter (Grau, n=38, RA, SpA und PsA). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, die

Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede $p < 0,05$ zum Normalkollektiv.

Auch bei dem Vergleich der einzelnen Krankheitsentitäten ergaben sich signifikante Reduktionen von Subpopulationen DC (Abb. 8). Am ausgeprägtesten war dieser Effekt bei den mDC1. Während die Anzahl von mDC1 im Normalkollektiv bei 32657,65 Zellen/ml (Standardfehler 3004,5) lag, wiesen Patienten mit RA 3773,9 Zellen/ml (Standardfehler 737,5) auf. Die Zahl der mDC1 lag bei Patienten mit SpA bei 8688,5 Zellen/ml (Standardfehler 1052,7) und bei Patienten mit PsA bei 9367,0 Zellen/ml (Standardfehler 1785,9).

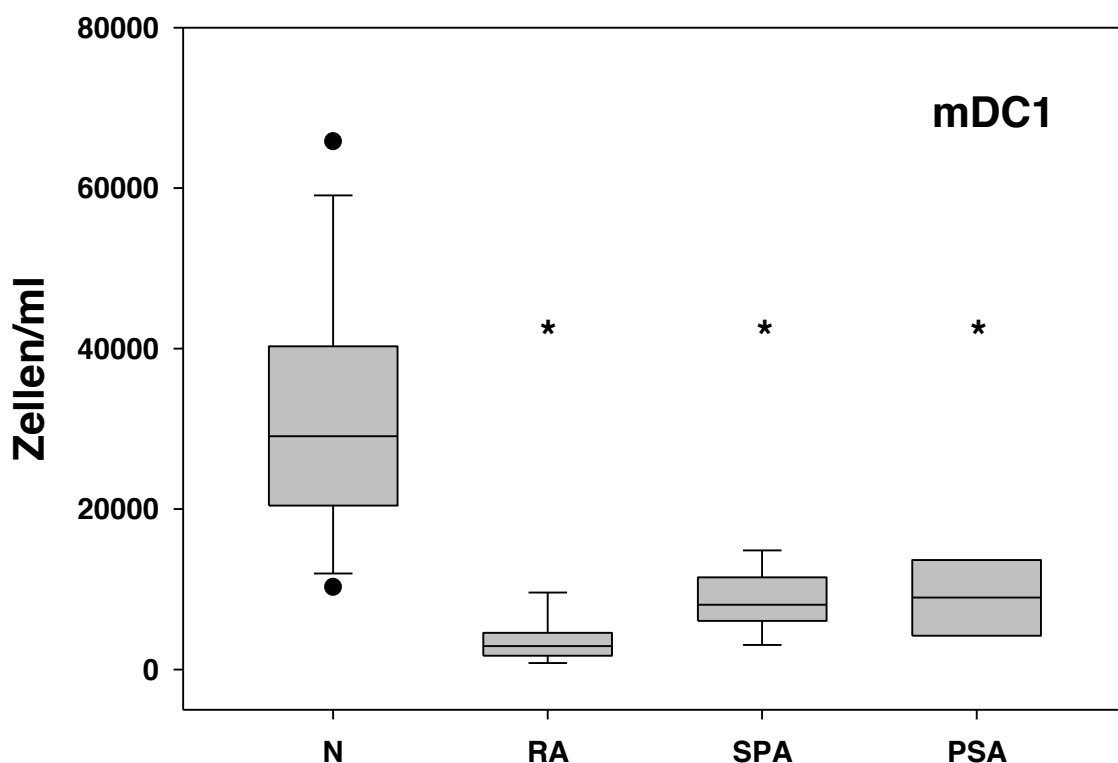


Abb. 8 Vergleich der Anzahl der mDC1 von gesunden Normalpersonen (N, n=39) und Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA, n=16), Spondylarthritis (SpA, n=14) und Psoriasisarthritis (PsA, n=8). Dargestellt sind Mittelwerte, 25 und 75% Perzentile (graue Box) sowie 5 - und 95% Perzentile. Die schwarzen Punkte kennzeichnen Werte außerhalb dieser Grenzen. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede $p < 0,05$ zum Normalkollektiv.

Bei der Analyse der pDC waren in allen drei Krankheitsgruppen die Zellzahlen nominal reduziert, der Unterschied war jedoch nur in der Gruppe der Patienten mit

RA signifikant (Abb. 9). Die Anzahl der pDC lag in der Gruppe RA bei 3879,3 Zellen/ml (Standardfehler 509,3), bei den SpA bei 6853,9 Zellen/ml (Standardfehler 818,2) und bei den Patienten mit PsA bei 6442,4 Zellen/ml (Standardfehler 824,5). Demgegenüber lag die pDC Anzahl im Normalkollektiv bei 9932,7 Zellen/ml (Standardfehler 828,7).

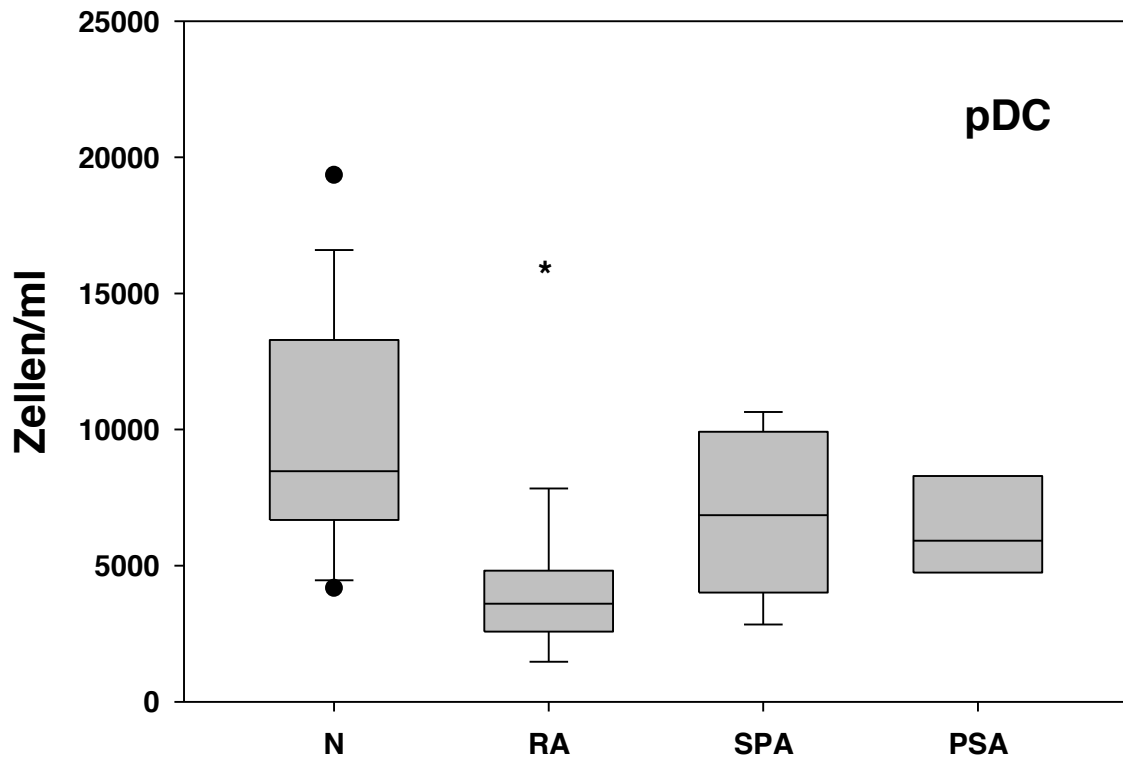


Abb. 9 Vergleich der Anzahl pDC von gesunden Normalpersonen (N, n=39) und Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA, n=16), Spondyloarthritis (SpA, n=14) und Psoriasisarthritis (PsA, n=8). Dargestellt sind Mittelwerte, 25 und 75% Perzentile (graue Box) sowie 5%- und 95%-Perzentile. Die schwarzen Punkte kennzeichnen Werte außerhalb dieser Grenzen. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede $p < 0,05$ zum Normalkollektiv.

Patienten mit RA und mit SpA zeigten in der Analyse der mDC2 eine signifikante Reduktion der Zellzahlen gegenüber dem Normalkollektiv, in dem die mDC2 Zahl bei 1870,9 Zellen/ml (Standardfehler 190) lag (Abb. 10). Die Gruppe der Patienten mit RA wies eine Zellzahl von 915,7 Zellen/ml (Standardfehler 178,3) auf und die Gruppe der SpA 857,2 Zellen/ml (Standardfehler 177,6). Demgegenüber zeigten die mDC2 Zahlen der Gruppe mit PsA mit 1440,0 Zellen/ml (Standardfehler 297,3) keine signifikanten Unterschiede zum Normalkollektiv.

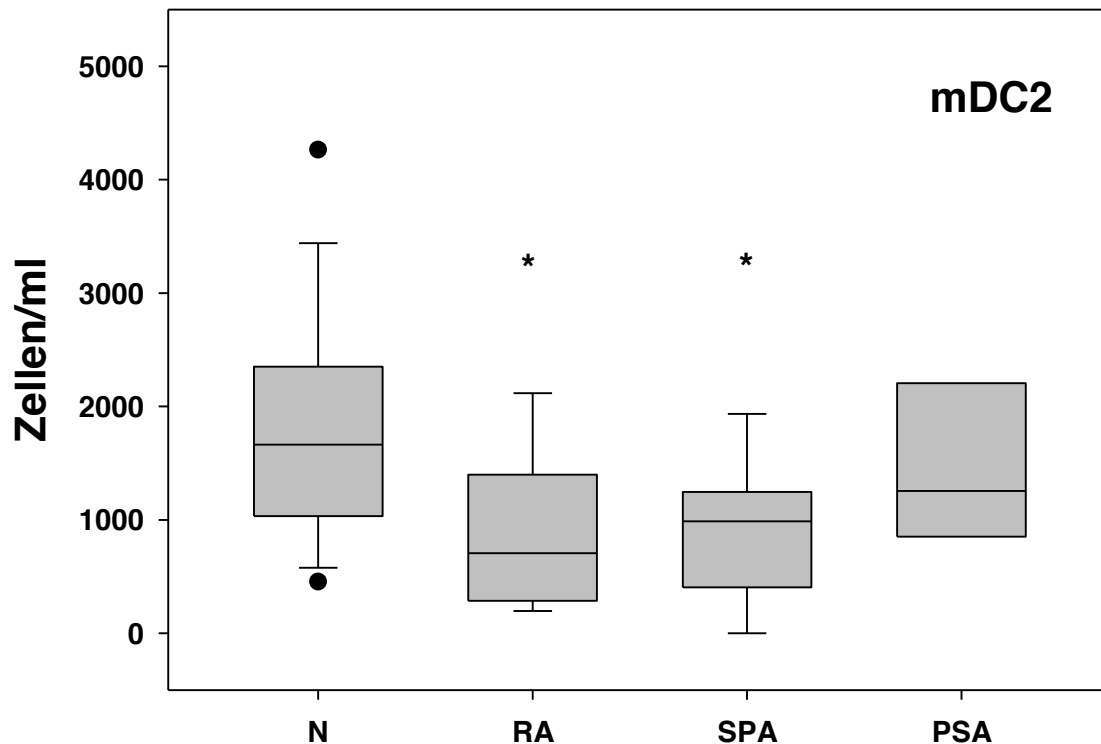


Abb. 10 Vergleich der Anzahl myeloischer dendritischer Zellen Typ 2 von gesunden Normalpersonen (N, n=39) und Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA, n=16), Spondylarthritis (SpA, n=14) und Psoriasisarthritis (PsA, n=8). Dargestellt sind Mittelwerte, 25 und 75% Perzentile (graue Box) sowie 5- und 95% Perzentile. Die schwarzen Punkte kennzeichnen Werte außerhalb dieser Grenzen. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede $p < 0,05$ zum Normalkollektiv.

Bezüglich der vor Behandlung bestehenden Reduktion der DC, insbesondere der mDC1, gehen wir von einem krankheitsunspezifischen Effekt aus. Allen Patienten war gemein, dass die konventionelle Therapie erfolglos geblieben war, so dass weiterhin eine Entzündungsaktivität vorlag mit einem durchschnittliche CPR-Wert von 14,7 mg/dl (Standardfehler 2,2; CRP Werte > 5 mg/dl sind pathologisch).

3.2. Einfluss der Therapie mit Etanercept auf den klinischen Verlauf und die DC-Subpopulation im Blut

3.2.1. Abfall des C-reaktiven Protein

Unter der TNF-blockierenden Therapie mit Etanercept kam es zum laborchemisch nachweisbaren Rückgang der Entzündung, dargestellt durch den CRP-Wert aller Patienten (Abb.11). Der initial erhöhte durchschnittliche CPR-Wert von 14,7 mg/dl (Standardfehler 2,2) fiel im Verlauf auf 5,9 mg/dl (Standardfehler 1,1mg/l) nach zwei Wochen, auf 7,0 mg/dl (Standardfehler 2,1mg/l) nach 6 Wochen und nach 12 Wochen auf 7,2 mg/dl (Standardfehler 2,1mg/l).

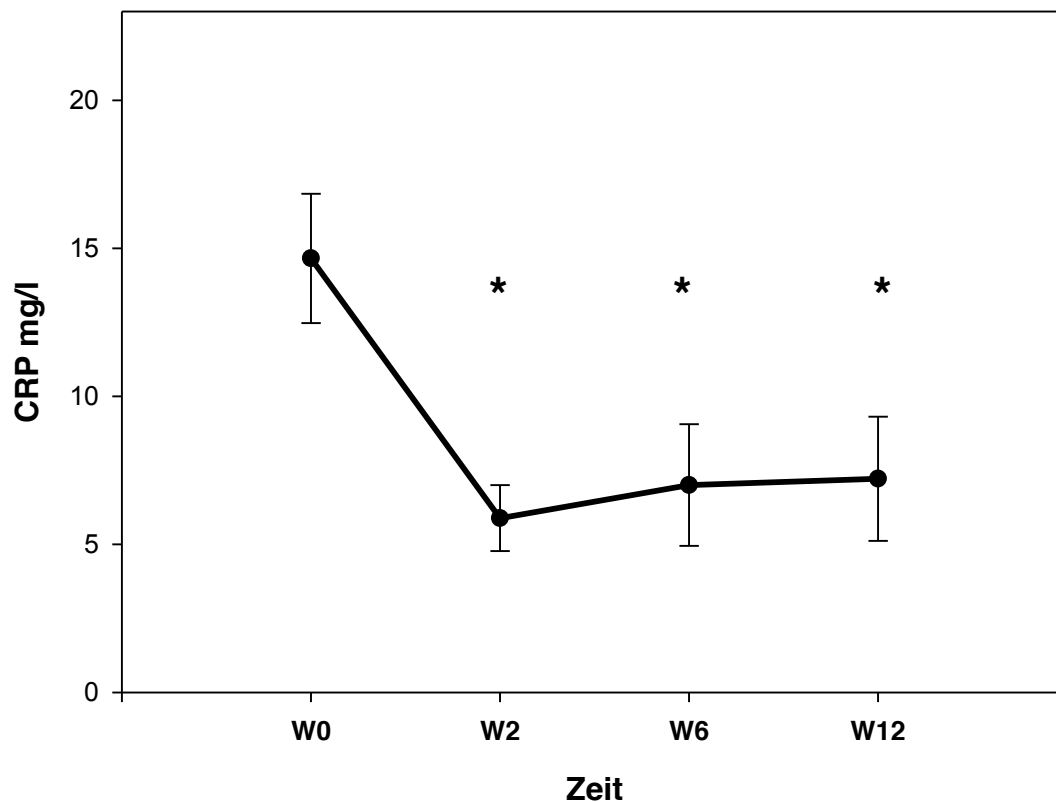


Abb. 11 Verlauf der CRP Konzentration im Blut der Patienten (n=38, RA, SpA, und PsA) in den Woche 2 (W2), Woche 6 (W6) und Woche 12 (W12) nach Beginn einer Therapie mit Etanercept. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede $p < 0,05$ zum Wert vor Therapie (W0).

Bei Untersuchung des CRP Verlaufes innerhalb der einzelnen Krankheiten ergaben sich bei den SpA-Patienten signifikante Abfälle des CRP von 16,25 (Standardfehler

3,75) auf 3,36 mg/l (Standardfehler 1,01) in Woche 2, 2,17mg/l (Standardfehler 0,69) in Woche 6 und 1,89mg/l (Standardfehler 0,38) in Woche 12 ($p > 0,001$). Hier besonders auffällig, dass auch nach 6 und 12 Wochen nach Therapieeinstellung noch ein weiterer Rückgang der CRP-Werte zu sehen ist.

Für die Patienten mit RA wiesen die CRP Werte eine größere Streuung auf und waren von 16,54mg/l (Standardfehler 3,59) nach 2 Wochen auf 8,11mg/l (Standardfehler 1,76) abgefallen. Nach 6 Wochen lagen die Werte bei 11,70mg/l (Standardfehler 4,01) und nach 12 Wochen bei 13,13 (Standardfehler 4,27).

Insgesamt waren die in dieser Gruppe beobachteten Veränderungen nicht signifikant. Auch in der Gruppe der PsA war ein nicht signifikanter Rückgang der CRP Werte zu beobachten. Die Werte lagen initial bei 8,31mg/l (Standardfehler 3,45) und gingen in Woche 2 auf 6,73mg/l (Standardfehler 3,32) zurück und lagen in Woche 6 bei 3,83mg/l (Standardfehler 1,72) und in Woche 12 bei 5,02mg/l (Standardfehler 2,63).

3.2.2. Symptombesserung

Besser darstellbar war der Effekt des Rückgangs der Entzündung in den klinischen Scores, die objektive und subjektive Parameter miteinander verbanden. Für die RA wurde der DAS28 eingesetzt und für die Gruppe der SpA der BASDAI verwendet.

Die klinische Bewertung der PsA erfolgte außerhalb von Scores, da bei geringem Hautbefall für die PsA-Gruppe kein einheitlicher dermatologischer Score, wie z.B. der PASI erhoben wurde, sondern nach Gelenkbefall ein analoger DAS 28 oder BASDAI Anwendung fand. Aufgrund der heterogenen Psoriasisarthritismanifestationen standen keine Aktivitätsscores für die PsA Gruppe zu Verfügung. Nach der klinischen Dokumentation haben alle 8 behandelten Patienten innerhalb der 12 Wochen auf die Behandlung angesprochen.

In der Gruppe mit RA kam es zu einem signifikanten Rückgang des Aktivitätsscore DAS28 (Abb. 12). Der DAS28-Wert lag ebenfalls initial bei 4,14 (Standardfehler 0,45) und fiel in der 2. Woche auf 2,48 (Standardfehler 0,31). Der DAS28 lag in der 6. Woche bei 2,12 (σ 1,23, Standardfehler 0,50) und in der 12. Woche bei einem Wert von 2,04 (Standardfehler 0,40). Da ein DAS28 > 4 eine hohe Krankheitsaktivität anzeigt und ein Wert $< 2,5$ als gute Krankheitskontrolle gewertet werden kann, konnte gezeigt werden, dass die Gruppe der Patienten mit RA ein Kollektiv mit initial

hoher Krankheitsaktivität ist und gut auf die TNF α -blockierende Therapie angesprochen hat.

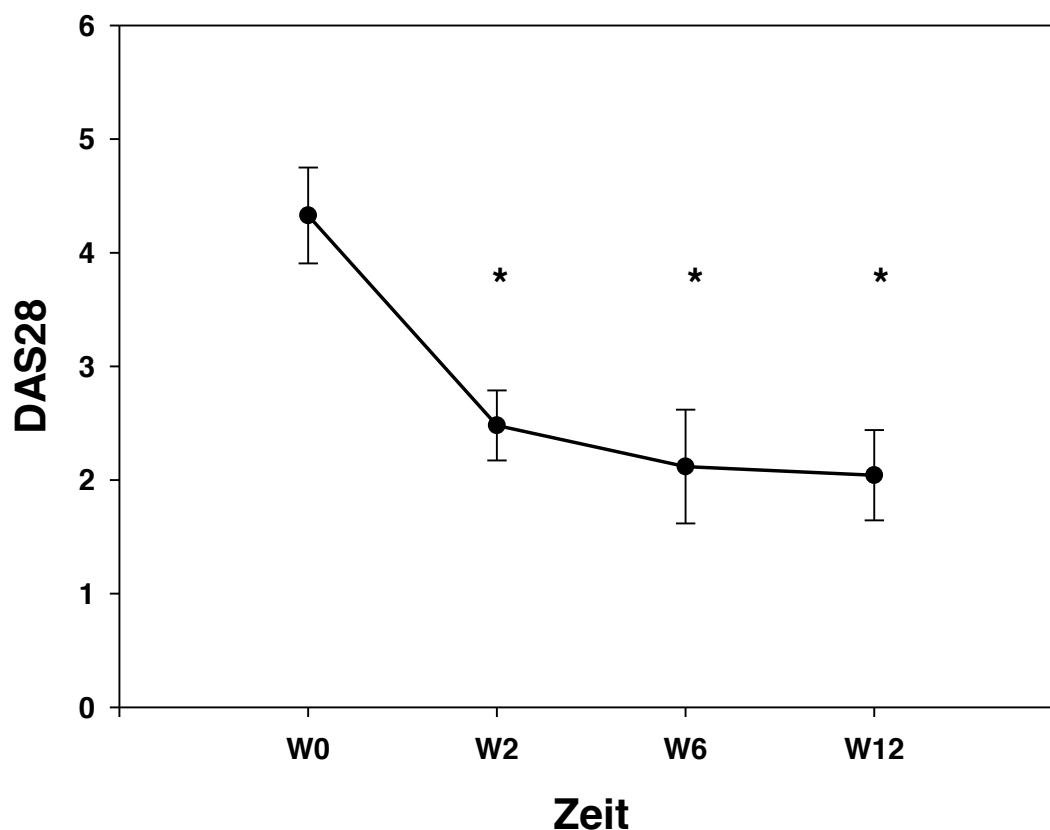


Abb. 11 Verlauf des Aktivitätsindex DAS28 bei Patienten mit RA (n=16) in Woche 2 (W2), Woche 6 (W6) und Woche 12 (W12) nach Beginn einer Therapie mit Etanercept. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede $p < 0,05$ zum Wert vor Therapie (W0).

Zu erwähnen ist, wie bereits in der Erläuterung der Scoreberechnung, die Einberechnung des CRP-Wertes in den DAS28. Hingegen der BASDAI als Zusammenfassung subjektiver Parameter zeigte unabhängig vom CRP-Wert einen weiteren Abfall auch in der 12. Woche, ähnlich wie der Verlauf des CRP-Wertes in dieser Gruppe. Ein entgegengesetzter Verlauf der Werte lässt sich in der RA-Gruppe sehen, also ein leichter Anstieg in der 12. Woche, wobei hier eine Abhängigkeit der Parameter durch Einberechnung des CRP-Wertes vorliegt.

Auch in der Gruppe der SpA kam es unter der Etanercept Therapie zu einem Rückgang des Aktivitätsindex BASDAI (Abb.12). Ein eingangs durchschnittlicher BASDAI Wert von 4,4 (Standardfehler 0,86) fiel in der 2. Woche auf 2,33

(Standardfehler 0,33), in der 6. Woche auf 1,88 (Standardfehler 0,44) und lag in der 12. Woche bei 1,21 (Standardfehler 0,28).

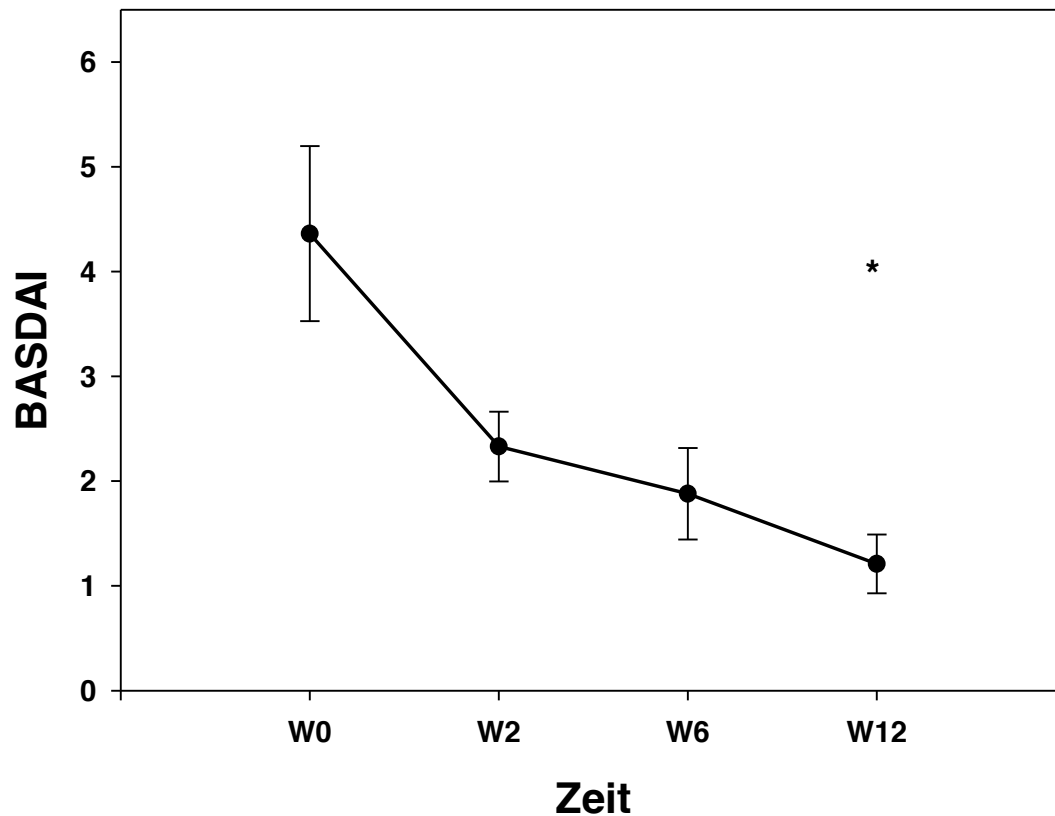


Abb. 12 Verlauf des Aktivitätsindex BASDAI bei Patienten mit Spondylarthritis (n=14) in Woche 2 (w2), Woche 6 (W6) und Woche 12 (W12) nach Beginn einer Therapie mit Etanercept. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, der Stern kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede $p < 0,05$ zum Wert vor Therapie (W0).

3.2.3. Einfluss der Therapie auf die myeloischen dendritischen Zellen Typ1

Die Therapie mit Etanercept führte bei den behandelten Patienten zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl der mDC1 (Abb.13). Die mDC1-Anzahl stieg im Therapieverlauf von durchschnittlich 6791,6 Zellen/ml (Standardfehler 746,5) auf 13348,6 Zellen/ml (Standardfehler 1362,9) nach 2 Wochen, auf 14160,0 Zellen/ml (Standardfehler 2087,3) nach 6 Wochen, bis auf einen Wert von 16170,2 Zellen/ml (Standardfehler 2326,8) nach 12 Wochen. Hier sei darauf hingewiesen, dass besonders die mDC1-Anzahl nach zwei Wochen einen steileren Anstieg zeigte als im restlichen Verlauf.

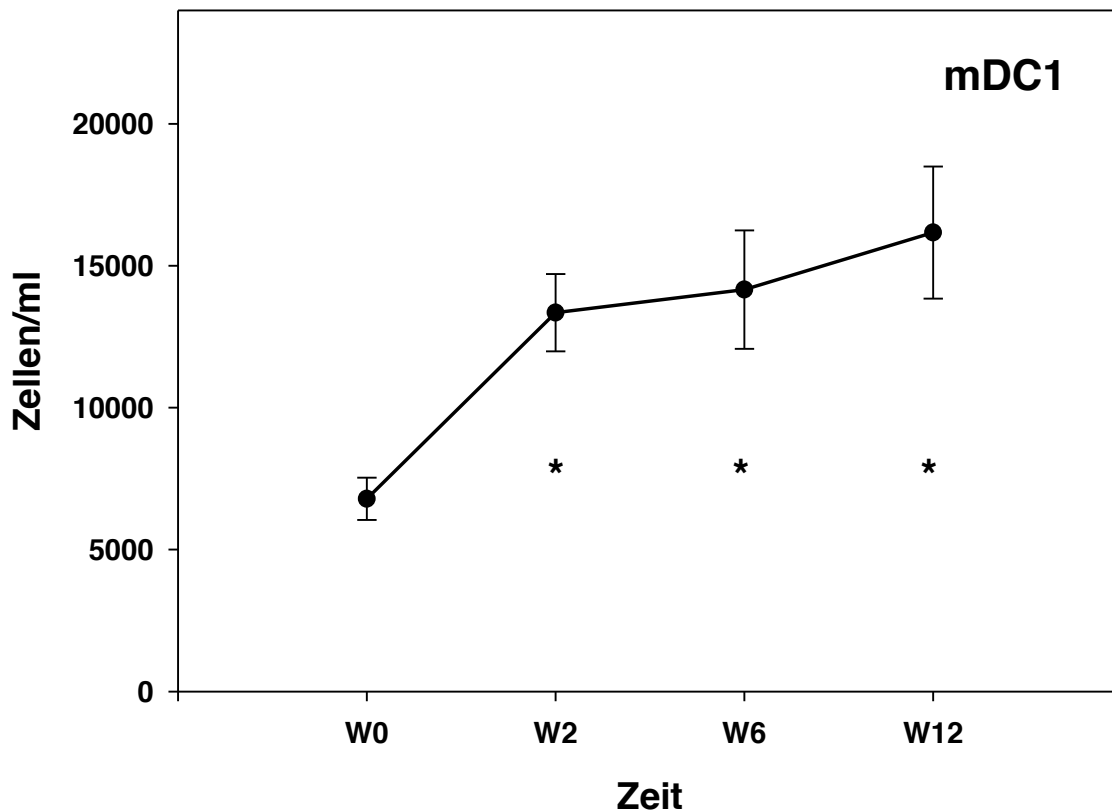


Abb. 13 Verlauf der Anzahl der mDC1 bei den Patienten (n=38, RA, SpA und PsA) in Woche 2 (W2), Woche 6 (W6) und Woche 12 (W12) nach Beginn einer Therapie mit Etanercept. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede $p < 0,05$ zum Wert vor Therapie (W0).

In der Gruppe mit RA (n=16) stellten sich die mDC1 folgendermaßen dar: Vor Behandlung 3773,9 Zellen/ml (Standardfehler 737,5), Anstieg nach 2 Wochen auf 11746,5 Zellen/ml (Standardfehler 2272,3), nach 6 Wochen auf 10422,9 Zellen/ml (Standardfehler 2324,3) und nach 12 Wochen auf 11915,8 Zellen/ml (Standardfehler 3541,2). Diese Werte zeigen einen signifikanten Anstieg gegenüber dem Ausgangswert ($p=0,014$).

Bei den SpA-Patienten (n=14) zeigte sich ein ähnlicher Verlauf wie bei den RA-Patienten. Die Werte lagen vor Therapie bei durchschnittlich 8688,5 Zellen/ml (Standardfehler 1052,7). Nach 2 Wochen konnten 14922,3 Zellen/ml (Standardfehler 2218,2), nach 6 Wochen 18390,7 (Standardfehler 3806,1) und nach 12 Wochen bei 17578,8 Zellen/ml (Standardfehler 2383,0) bezogen auf vor ($p=0,021$) eine Signifikanz nachgewiesen werden. Auch diese Werte belegen einen signifikanten Anstieg der mDC1 unter der Therapie mit Etanercept ($p=0,008$).

Die Gruppe der PsA (n=8) zeigte einen numerischen Anstieg der mDC1 Zahlen, der jedoch vermutlich aufgrund der geringen Fallzahl das Signifikanzniveau verfehlte. Für die Patienten mit PsA wurden folgende mDC1-Werte ermittelt: vor Etanerceptgabe 9367,0 Zellen/ml (Standardfehler 1786,0), nach 2 Wochen medikamentöser Therapie 13598,8 Zellen/ml (Standardfehler 2741,3), nach 6 Wochen 14759,3 Zellen/ml (Standardfehler 5650,3) und nach 12 Wochen 21232,2 Zellen/ml (Standardfehler 5882,6).

3.2.4. Einfluss der Therapie auf die plasmazytoiden dendritischen Zellen

Die pDC zeigten bei der Gesamtanalyse aller Patienten einen signifikanten Anstieg der Zellzahlen nach 2 und 6 Wochen Therapie (Abb.14). Initial lagen die pDC Zellzahlen bei 5523,0 Zellen/ml (Standardfehler 460,6). Unter Etanercept stiegen die Zahlen auf 7100,8 Zellen/ml (Standardfehler 601,2) nach 2 Wochen und lagen nach 6 Wochen bei 7971,9 Zellen/ml (Standardfehler 759,6). In Woche 12 wurden 8328,9 Zellen/ml (Standardfehler 934,7) gemessen. In der statistischen Auswertung zeigte sich in der ANOVA ein signifikanter Unterschied der Werte ($p=0,007$). In der Post-hoc Analyse waren jedoch nur die Werte in Woche 2 und 6 signifikant höher im Vergleich zum Ausgangswert der Woche 0, während die Werte in Woche 12, vermutlich aufgrund der höheren Streuung, das Signifikanzniveau verfehlten.

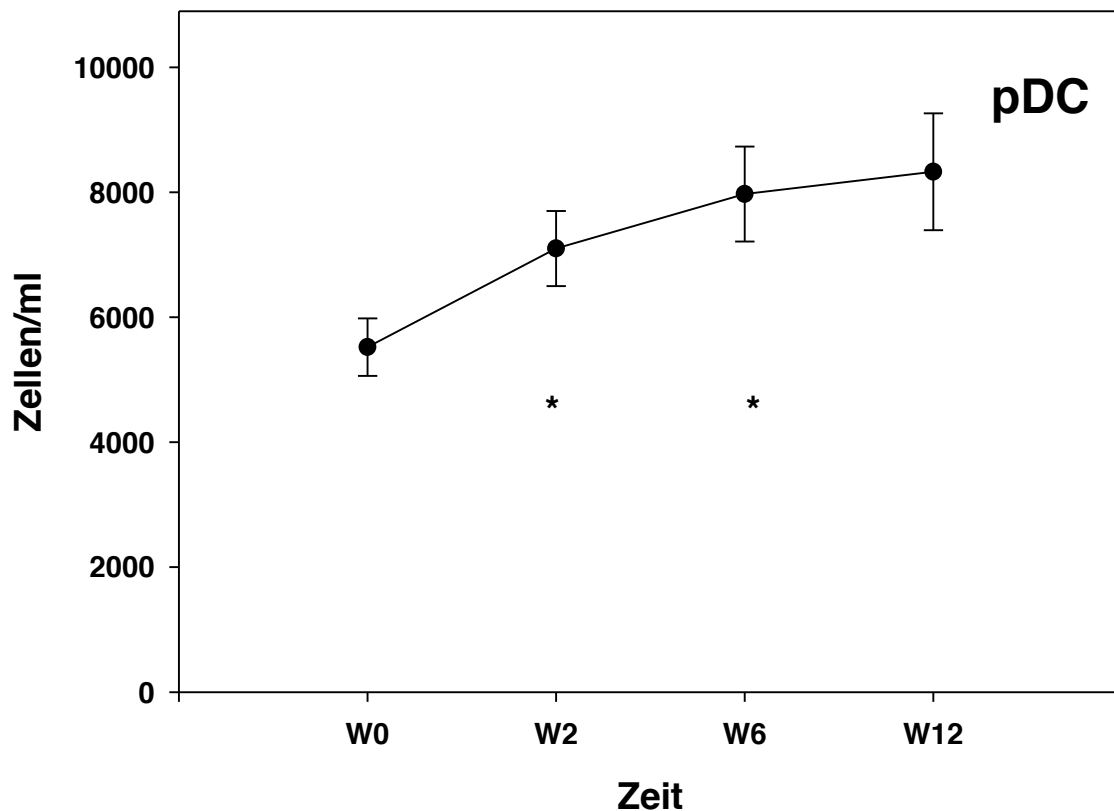


Abb. 14 Verlauf der Anzahl der plasmazytoiden dendritischen Zellen bei den Patienten (n=38, RA, SpA und PsA) in Woche 2 (w2), Woche 6 (W6) und Woche 12 (W12) nach Beginn einer Therapie mit Etanercept. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede $p < 0,05$ zum Wert vor Therapie (W0).

Analog zum Gesamtkollektiv, stiegen die pDC Zahlen in der Gruppe der Patienten mit RA unter Etanercept in den Wochen 2 und 6 signifikant an ($p=0,039$). Vor Therapiebeginn lagen die pDC Zahlen bei 3879,3 Zellen/ml (Standardfehler 509,3), nach 2 Wochen bei 5336,9 Zellen/ml (Standardfehler 571,9) und nach 6 Wochen bei 6575,6 Zellen/ml (Standardfehler 915,0). In Woche 12 erfolgte kein weiterer Anstieg. Die Zellzahlen lagen bei 6512,8 Zellen/ml (Standardfehler 1385,4). Wie im Gesamtkollektiv waren die Werte in Woche 2 und 6 signifikant höher als die Werte in Woche 0, während die Werte in Woche 12 gegenüber Woche 0 keinen signifikanten Unterschied zeigten.

Bei SpA-Patienten lagen die Zahlen der pDC vor Therapie bei durchschnittlich 6853,9 Zellen/ml (Standardfehler 818,2). Nach 2 Wochen bei 8714,9 Zellen/ml (Standardfehler 1264,2), nach 6 Wochen bei 10592,9 Zellen/ml (Standardfehler

1425,0) und nach 12 Wochen bei 10823,6 Zellen/ml (Standardfehler 1699,7). Diese numerischen Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

Die pDC Zahlen der PsA-Patienten entsprachen dieser Entwicklung nicht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zu den Zellzahlen vor Therapie festgestellt werden. Bei PsA-Patienten lagen die Ausgangswerte bei durchschnittlich 6442,4 Zellen/ml (Standardfehler 824,5). Nach 2 Wochen konnten 7583,4 Zellen/ml (Standardfehler 824,5), nach 6 Wochen 6505,6 Zellen/ml (Standardfehler 811,3) und nach 12 Wochen 9950,2 Zellen/ml (Standardfehler 2043,1) gemessen werden.

3.2.5. Einfluss der Therapie auf die myeloischen dendritischen Zellen Typ2

Die mDC2 kommen insgesamt in deutlich geringerer Frequenz im Blut vor, als pDC oder mDC1.

Im Gesamtkollektiv der Patienten war unter der Gabe von Etanercept keine signifikante Veränderung der mDC2 zu beobachten (Abb. 15). Vor Therapie lagen die Zellzahlen bei 1011,1 Zellen/ml (Standardfehler 121,1). Die Werte in Woche 2 waren mit 1292,3 Zellen/ml (Standardfehler 178,3) und in Woche 6 mit 1419,8 Zellen/ml (Standardfehler 253,1) und in Woche 12 mit 1351,8 Zellen/ml (Standardfehler 218,8) im Streubereich der Werte vor Therapie. Auch die Analyse der einzelnen Erkrankungen (RA, SpA und PsA) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den mDC2-Zahlen vor und unter der Therapie mit Etanercept.

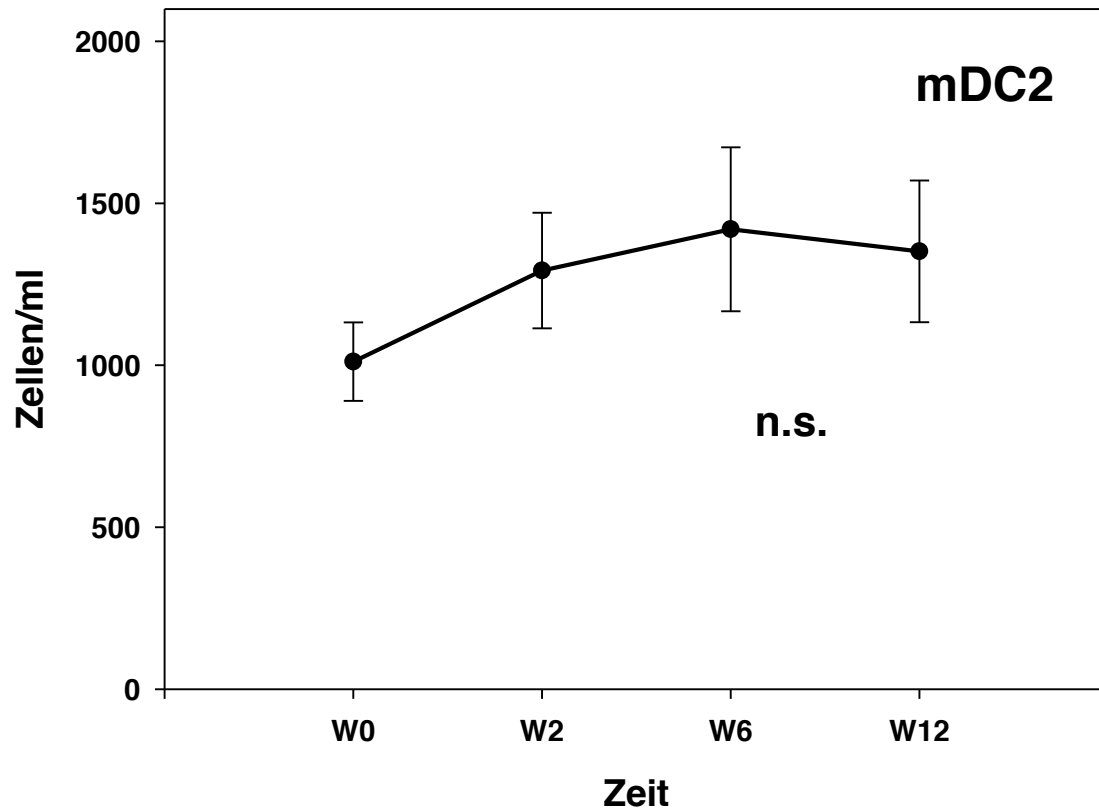


Abb. 15 Verlauf der Anzahl der myeloischen dendritischen Zellen Typ2 bei den Patienten (n=38, RA, SpA und PsA) in Woche 2 (W2), Woche 6 (W6) und Woche 12 (W12) nach Beginn einer Therapie mit Etanercept. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler. Der Vermerk n.s. kennzeichnet, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede zum Wert vor Therapie (W0) nachweisbar waren $p > 0,05$.

4. Diskussion

Da dendritische Zellen eine zentrale Steuerungsfunktion für die Initiierung erworbener Immunantworten wahrnehmen, untersuchte die vorliegende Arbeit die Zusammensetzung der Subpopulationen von dendritischen Zellen in peripherem Blut von Patienten mit drei unterschiedlichen entzündlich rheumatischen Erkrankungen. Es wurden Patienten mit hoher Krankheitsaktivität untersucht, die an rheumatoider Arthritis (RA), Spondylarthritis (SpA) oder Psoriasisarthritis (PsA) erkrankt waren. Alle Patienten qualifizierten sich für eine Therapie mit einem TNF-blockierenden Biologicum und wurden im weiteren Verlauf mit Etanercept behandelt.

Die Zusammensetzung der DC-Subpopulationen der Patienten wurde mit den Ergebnissen von 29 gesunden Kontrollpersonen verglichen. Die Zusammensetzung der DC Subpopulationen in diesem Normalkollektiv stimmt gut mit den in der Literatur angegebenen Daten überein. Insbesondere die von Orsini et al. 2012 in 96 Probanden gefundene Zusammensetzung der DC Subpopulationen zeigt, dass die Daten des Normalkollektivs repräsentativ sind. Die Studie von Narbutt et al. 2004 zeigt ähnliche Größenordnungen in den DC Subpopulationen, konnte aber im Gegensatz zu Orsini et al. 2012 mehr pDC als mDC1 nachweisen. Wir konnten sowohl in unserem Normalkollektiv als auch in den Patienten die mDC1 als zahlenmäßig größte DC-Subpopulation im Blut identifizieren.

Es zeigte sich bei allen drei Erkrankungen im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine signifikante Reduktion der Zellzahlen von myeloischen dendritischen Zellen Typ1 (mDC1), plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) und myeloischen dendritischen Zellen Typ2 (mDC2).

Die Reduktion der Zellzahlen war am ausgeprägtesten für die mDC1 (21% der Normalwerte). Für pDC (56% der Normalwerte) und mDC2 (54% der Normalwerte) war Reduktion der Zellzahlen geringer ausgeprägt.

Die mDC1 waren bei allen drei rheumatischen Systemerkrankungen signifikant erniedrigt, während die pDC nur bei RA erniedrigt waren. Die Reduktion mDC2 war bei RA und SpA signifikant, jedoch nicht bei PsA.

Diese Beobachtung lassen die Schlussfolgerung zu, dass die DC-Subpopulationen unabhängig von der Krankheitsentität bei aktiver Erkrankung reduziert sind und dass dieser Effekt am ausgeprägtesten bei den mDC1 auftritt. Die geringere Reduktion der

Zellzahlen bei der Gruppe der PsA muss zurückhaltend interpretiert werden, da eine geringere Patientenzahl untersucht wurde.

Mehrere Studien bestätigen unser Ergebnis, dass DC-Zahlen im peripheren Blut bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie Asthma, SLE und RA erniedrigt sind, (Blomberg et al. 2003, Autissier et al. 2010). Migita et al. 2005 und Mold und Du Clos 2013 stellten in Versuchen fest, dass sowohl pDC- als auch mDC2-Populationen bei RA und SLE-Patienten reduziert waren. Richez et al. 2009 zeigten ebenfalls bei RA eine Erniedrigung sowohl der pDC als auch der mDC. In einer Studie von Scheinecker et al. 2001 waren bis zu 50 % dieser Zellen bei SLE reduziert, wobei dies v.a. durch einen Mangel an mDC im Gegensatz zu einem normalen Anteilen der pDC bedingt war. So schien auch hier das Gleichgewicht zugunsten der pDC verschoben zu sein, bei allgemein erniedrigten DC-Anzahlen im Vergleich zu Gesunden und auch Hayashi et al. 2013 sahen sogar erhöhte Anzahlen insbesondere der MDC2-Population bei Pat. mit atopischer Erkrankung ohne aktuelle Medikation oder Begleiterkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv.

In den zitierten Untersuchungen wurden zum Teil mit Färbemethoden gearbeitet, die keine Unterscheidung zwischen mDC1 und MDC2 erlauben. Zudem wurde häufig die analysierte Gesamtzellzahl pro Untersuchung auf 100.000 Zellen begrenzt. In der vorgelegten Untersuchung wurde eine Färbemethode verwendet, die eine Differenzierung zwischen mDC1 und mDC2 erlaubt und die hohe Gesamtzahl der analysierten Zellen von 1.000.000 pro Untersuchung erlaubt eine genaue Bestimmung der Zellzahlen. Da eine Medikation mit mehr als 10 mg Prednisolon pro Tag zu einer Reduktion von DC im peripheren Blut führt (Hackstein et al. 2005), wurde die maximale Prednisolondosis in der vorgelegten Studie mit 10mg/die festgelegt und im Verlauf konstant gehalten. Die vorgelegten Daten sind daher gut mit den in der Literatur belegten Untersuchungen zu vergleichen.

Das Ergebnis, das unabhängig von der Art der entzündlich rheumatischen Erkrankung eine hohe Krankheitsaktivität zu einer Reduktion der Subpopulationen dendritischer Zellen im peripheren Blut führt, wird in der Literatur bei anderen Autoimmunerkrankungen wie SLE bestätigt (Migita et al. 2005). Sogar bei der Untersuchung von Patienten mit infektiösen Erkrankungen (HIV und Virushepatitis) wurden ähnliche Phänomene beobachtet (Autissier et al. 2010, Tjomsland et al. 2010).

Die Reduktion von Subpopulationen dendritischer Zellen im peripheren Blut ist folglich kein spezifischer Effekt einer bestimmten Immunreaktion, sondern ein generelles unspezifisches Phänomen bei Entzündungsreaktionen verschiedenster Ursache.

Die Analyse von Subpopulationen dendritischer Zellen im peripheren Blut ist somit ungeeignet zur Differenzierung verschiedener Immunreaktionen. Es ist dabei anzunehmen, dass die Reduktion der DC im peripheren Blut im Rahmen der Entzündungsreaktion durch eine verstärkte Ausreifung der DC und Migration in die lymphatischen Organe begründet ist (Migita et al. 2005, Yilmaz et al. 2006).

Die Patienten wurden im weiteren Verlauf mit dem TNF-blockierenden Biologicum Etanercept behandelt und die Verteilung der DC-Subpopulation unter der Therapie untersucht. Unter Therapie mit Etanercept kam es zu einem Abfall des Entzündungswertes CRP im Gesamtkollektiv. Signifikant nachweisbar war dieser Effekt jedoch nur in der SpA-Gruppe für alle Folgewerte bezogen auf den Vorwert. In der RA-Gruppe - trotz vergleichbarer Kollektivgröße - und auch in der PsA-Gruppe konnten keine Signifikanz gezeigt werden. Der CRP-Wert als Routineparameter spiegelt für sich genommen nicht immer die Remission unter dieser Therapie wieder. Daher stellen andere klinische Parameter eine wichtige Institution zur Therapiekontrolle dar, insbesondere der Aktivitätsindex DAS28 für rheumatoide Arthritis und der BASDAI für die Gruppe der Spondylarthritiden. Der DAS28 zeigte einen signifikanten Abfall zu jedem Kontrollzeitpunkt in der RA-Gruppe. Der BASDAI zeigte ebenfalls einen deutlichen Abfall unter Therapie, der in der 12. Woche Signifikanzniveau erreichte. Die Therapie mit Etanercept führte - wie erwartet - zu einer klinischen und serologischen Reduktion der Entzündung.

Unter der Therapie kam es bei Auswertung aller 3 Krankheitsentitäten zu einem signifikanten Anstieg der mDC1-Population im Vergleich zum Ausgangswert (Abb. 13). In der Subgruppenanalyse der einzelnen Erkrankungen ergaben sich jeweils signifikante Anstiege in der RA- und SpA-Gruppe. Die PsA-Gruppe zeigte einen numerischem jedoch nicht signifikanten Anstieg der mDC1-Zahlen. Dies mag in der Patientenzahl begründet sein. Der pDC-Anstieg des Gesamtkollektivs zeigte eine andere zeitliche Kinetik (Abb. 14). Die Anstiege für Woche 2 und 6 konnten als signifikant erhoben werden. Die Subgruppenanalyse bezüglich der Erkrankung zeigte Signifikanz für die Gruppe mit RA. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Studie von

Kavousanaki et al. 2010, die einen Anstieg aller DC-Populationen bei RA in Remission unter TNF α -Inhibitor-Therapie nachwies.

Eine Verschiebung der Subpopulationen hin zu einer pDC-Dominanz konnte nicht gezeigt werden. Im Gegensatz verdoppelte sich die Anzahl der Zellen der mDC1-Gruppe bis zur Woche 12 im Gesamtkollektiv, in der RA-Gruppe und in der SpA-Gruppe mindestens, bis hin zu 2,5 fach. Die pDC hingegen zeigten zwar einen signifikanten aber lange nicht so steilen Anstieg wie die mDC1. Die beobachteten Daten ergeben keine eindeutigen Hinweise auf eine Verschiebung innerhalb der DC-Subpopulationen.

Die Zahlen der mDC2 stiegen unter der Therapie mit Etanercept nur numerisch gering an. Der beobachtete Anstieg war statistisch nicht signifikant. Die Beurteilung der Werte wird durch die geringe Frequenz der Zellen im peripheren Blut erschwert, wodurch höhere Streuungen bei den Messungen auftreten können.

Die mDC2-Population ist eine Zellart, die bislang nur wenig Beachtung in Untersuchungen und Studien in vivo fand. Da sich kaum ein Effekt (Anstieg oder Abfall) in dieser Population ausmachen ließ, bleibt weiterhin unklar, welchen Einfluss sie auf die Prägung der immunologischen Reaktion hat und insbesondere welchen Einfluss sie in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen ausübt.

Möglicherweise werden die mDC2 Zahlen nur in der Entstehung einer rheumatischen Erkrankung auffällig, bevor die Erkrankung klinisch apparent wird, da ihre Funktion in der Phagozytose von apoptotischen Zellen und Nekrosematerial gesehen wird (Collin et al. 2013).

Unsere Studie wies einen Anstieg der Anzahl der DC im peripheren Blut als Effekt einer entzündungshemmenden Therapie mit Etanercept nach. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass durch verminderte Entzündungsaktivität die DC weniger schnell ausreifen, und daher länger im peripheren Blut nachweisbar sind. So geht man davon aus, dass die im Blut zirkulierenden DC Vorstufen für die sich im Gewebe bzw. am Ort des Entzündungsgeschehens weiter differenzierenden DC sind. Unter besonderen Umständen können sich DC aus gewebständigen Monozyten differenzieren (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Umgekehrt erläutern Collin et al. 2013 eine bei Entzündung vermehrte Anzahl von mDC1, mDC2 und pDC in Lymphknoten und somit eine verminderte Anzahl im peripheren Blut.

Wir sahen unter Therapie einen Anstieg der mDC1- und pDC-Subpopulationen im peripheren Blut und damit eine Entwicklung hin zu einer normalen Distribution dieser Immunzellen. Ob die beobachteten Effekte auch klinisch zu einer Verbesserung der Infektabwehr beitragen, muss offen bleiben. Eindeutig ist aber, dass eine TNF-blockierende Therapie mit Etanercept nicht zu einer weiteren Verminderung der DC im peripheren Blut führt.

Möglicherweise trägt die entzündungsbedingte Verminderung von DC im peripheren Blut zur Verminderung der Infektabwehr bei, die bei hochaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankungen unabhängig von einer immunsuppressiven Therapie zu beobachten ist. Die Untersuchung der DC Subpopulationen wird eine an wissenschaftlichen Fragestellungen orientierte Spezialuntersuchung bleiben, da sie keine krankheitsspezifische Differenzierung verschiedener Entzündungswege erlaubt.

5. Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DC) stellen eine Schaltstelle zwischen unspezifischer und adaptiver Immunantwort dar und vermitteln zwischen zellulärer und humoraler Abwehrreaktion. Sie sind durch die Antigenpräsentation in der Lage Lymphozyten zu aktivieren sowie auch durch Produktion von Zytokinen Einfluss auf die Ausprägung einer erworbenen Immunantwort zu nehmen. Dabei stehen insbesondere eine Interleukin 12 geprägte TH1 Antwort einer Interferon-alpha geprägten Antwort gegenüber. Ihr Anteil im Blut, welcher durch Vorläuferzellen repräsentiert wird, ist bei verschiedensten Erkrankungen vermindert, während sie nach Ausreifung am Ort der Inflammation oder in lymphatischen Organen anwesend sind.

Insbesondere bei rheumatischen Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis (RA), Spondylarthritis (SpA) und Psoriasisarthritis (PsA) ist die autoimmune Genese noch nicht vollkommen entschlüsselt und die Remission unter einer suffizienten „immunsuppressiven bzw. immunmodulierenden“ Therapie stellt einen wissenschaftlich interessanten Zeitpunkt für eine Untersuchung der Bestandteile des Immunsystems bzw. der Umstellung deren Zusammensetzung dar.

Dabei wurde in Form einer Verlaufsstudie der Anteil der DC im peripheren Blut untersucht - plasmazytoide (pDC), myeloische Typ 1 (mDC1) und myeloische Typ 2 (mDC2) Dendritische Zellen - mittels peripherer Blutentnahme von Patienten, die an RA, SpA und PsA erkrankt waren und leitliniengerecht neu auf Etanercept ein Tumor Nekrose Faktor alpha-blockierendes Biologicum eingestellt wurden. Die Zellen wurden dann mittels einer Fluorescence associated cell sorting-Durchflusszytometrie mit einem speziellen Färbe-Kit (Blood Dendritic Cell Enumeration Kit) quantifiziert. Die Messzeitpunkte waren direkt vor Therapiebeginn, nach 2 Wochen, 6 Wochen und 12 Wochen. Ebenso bestimmt wurden C-reaktives Protein und Scores der Erkrankungen wie Disease Activity Score 28 (DAS28) und Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity (BASDAI)-Score zu den definierten Zeitpunkten. Als Vergleichswerte dienten gesunde Probanden aus einer zuvor durchgeführten Studie.

Eine signifikante Verminderung der DC vor suffizienter Therapie konnte im Gesamtkollektiv und für alle Subpopulationen bei RA nachgewiesen werden. In der SpA-Gruppe waren mDC1 und mDC2 signifikant erniedrigt, bei Patienten mit PsA nur mDC1 signifikant erniedrigt.

Im Gesamtkollektiv kam es zum signifikanten Rückgang des CRP-Wertes unter Etanercept, die klinischen Aktivitätsscores DAS28 für die RA und BASDAI für die SpA gingen unter der Therapie signifikant zurück.

Die Therapie mit Etanercept führte im Gesamtkollektiv sowie in der RA- und SpA-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg, der vor Therapie erniedrigten mDC1- Zahlen. Ebenfalls konnte eine Zunahme der Anzahl von pDC, jedoch nur in Woche 2 und 6 für das Gesamtkollektiv und in der RA-Gruppe signifikant dargestellt werden.

Die mDC2 Zahlen stiegen unter Therapie lediglich gering und insignifikant an.

Im Rahmen einer aktiven Autoimmunerkrankung wie Rheumatoide Arthritis, Spondylarthritis oder Psoriasisarthritis sind Dendritische Zellen wie mDC1, pDC und mDC2 im peripheren Venenblut vermindert. Dieser Effekt ist eine unspezifische Folge der Entzündungsreaktion und tritt unabhängig von dem krankheitsspezifischen Immunphänotyp der Erkrankung auf.

Eine TNF-blockierende Biologica-Therapie kann durch die Reduktion der Entzündung den beobachteten Effekt der Absenkung der DC-Zahlen im peripheren Blut revertieren. Eine Therapie mit Etanercept führt nicht zu einem verstärkten Abfall der Zahlen dendritischer Zellen im peripheren Blut, sondern trägt möglicherweise zu einer Rekonstitution einer durch die chronisch entzündliche Erkrankung alterierten Immunantwort bei.

6. Interessenskonflikt

Die durchgeführte Studie wurde als Investigator initiated Investigation im Rahmen der Ausschreibung des „Tight Junction“ Projektes der Firma Wyeth (später Pfizer) in einem Peer-Review Verfahren begutachtet und unterstützt. Die Ergebnisse, Auswertungen und Schlüsse wurden unabhängig von der Förderung nicht durch wirtschaftliches Interesse beeinflusst. Der Sponsor hatte keinen Einfluss auf Datenerhebung, Auswertung und Bewertung der hier vorgelegten Daten.

Die Daten wurden im Rahmen des „Tight Junction- Symposiums“ 2011 erstmalig präsentiert.

Zudem wurden Ergebnisse der Untersuchung in der Zeitschrift für Rheumatologie - Research Symposium Rheumatology and Dermatology, Band 71, Supplement 1 im Januar 2012 in Form eines Abstracts publiziert.

7. Danksagung

Ich danke meinen Eltern, die meine Wünsche und Träume ernst nahmen, mich ermutigten und mir ermöglichten, meine Grenzen neu zu definieren, ein Medizinstudium abzuschließen und diese Dissertation zu vollenden.

Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn PD Dr. med. Zeuner für die Bereitstellung und seine motivierende Begeisterung für die Thematik, wissenschaftliche und praktische Beratung, während der gesamten Zeit der Studie, statistische Auswertung der Ergebnisse und Unterstützung während der Entstehung der Dissertation,

Herrn Prof. Dr. med. Schröder für das freundliche Angebot, die Studie in der Abteilung unter seiner Leitung durchführen zu können und auch Motivation an der Entstehung,

Herrn Dr. med. Böttcher für die Möglichkeit der Verwendung der FACS-Geräte und seine freundliche Beratung hinsichtlich der verschiedenen Einstellungen, Programme und Auswertungen der Messungen,

Frau Zahnen, die für die Patiententermine und -verwaltung mit viel Geduld und ihrem organisatorischem Talent die Bedürfnisse aller berücksichtigte und mir immer Zugang zu den Patientendaten und Räumlichkeiten ermöglichte,

Frau Dr. med. Knorr-Spahr und dem MTA-Team des FACS-Labors insbesondere Linda, Elke, Jamileh und Lada, die mich wie selbstverständlich in die Bedienung der Gerätschaften und Färbemethodik einwiesen, sogar am Feierabend noch telefonisch erreichbar waren und mit Rat und Tat und Freude am wissenschaftlichen Arbeiten zur Seite standen, wenn es Probleme gab,

den Ärzten der „Rheumaambulanz“ Herrn Prof. Dr. med. Schröder, Herrn PD Dr. med. Zeuner, Frau Dr. med. Sassen, Frau Dr. med. Barth, Frau Hoffmann und Frau Dr. med. Knorr-Spahr, die für die Rekrutierung der Studienpatienten mitverantwortlich waren und mir einen großen Teil ihrer erhobenen Daten aus der Therapieüberwachung bereitstellten,

meiner Freundin Sonja Buske, die mich beim Zusammenstellen der Zahlen unterstützt hat und mich mit dem Wunderwerk „Tabellenauswertung“ vertraut gemacht hat,

den Angestellten des Exzellenzzentrum Entzündungsmedizin des UKSH, die für die Patientenverwaltung und insbesondere für die Blutentnahmen verantwortlich waren, den Patienten, die an der Studie teilnahmen und damit Zeit und ihr Blut bereitstellten,

allen Korrekturlesern und meinen Freunden, die mich ermutigt haben und mit Rat und Tat zur Seite standen.

8. Literaturverzeichnis (alphabetisch)

Amodio, G., Gregori, S. (2012): Dendritic cells: a double-edge sword in autoimmune responses. *Front Immunol.*, 2, 233

Aringer, M., Leuchten, N., Machold, K. P. (2007): Frühe rheumatoide Arthritis-wer schnell hilft, hilft doppelt. *Z Rheumatol*, 66, 693-701

Aringer, M., Günther, C., Lee-Kirsch, M. A. (2013): Innate immune processes in lupus erythematosus. *Clinical Immunology*, 147, 216-222

Autissier, P., Soulas, C., Burdo, T. H., Williams, K. C. (2010): Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry A*, 77, 410-419

Blomberg, S., Eloranta, M. L., Magnusson, M., Alm, G. V., Rönnblom, L. (2003): Expression of the markers bdca-2 and bdca-4 and production of interferon- α by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 48, 2524-2532

Borchers, A. T., Leibushor, N., Cheema, G. S., Naguwa, S. M., Gerhwin, M. E. (2011): Immune-mediated adverse effects of biologicals used in the treatment of rheumatic diseases. *J Autoimmun.*, 37, 273-288

Braun, J., Sieper, J. (2002): Building consensus on nomenclature and disease classification for ankylosing spondylitis: results and discussion of a questionnaire prepared for the International Workshop on new treatment strategies in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.*, 61, iii61-7

Braun, J., van den Berg, R., Baraliakos, X., Boehm, H., Burgos-Vargas, R., Collantes-Estevez, E., Dagfinrud, H., Dijkmans, B., Dougados, M., Emery, P., Geher, P., Hammoudeh, M., Inman, R. D., Jongkees, M., Khan, M. A., Kiltz, U., Kvien, T. K., Leirisalo-Repo, M., Maksymowych, W. P., Olivieri, I., Pavelka, K., Sieper, J., Stanislawska-Biernat, E., Wendling, D., Özgocmen, S., van Drogen, C., van Royen,

B. J., van der Heijde, D. (2011), 2010 update of the asas/eular recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.*, 70, 896-904

Chen, H. W., Chen, H. Y., Wang, L. T., Wang, F. H., Fang, L. W., Lai, H. Y., Chen, H. H., Lu, J., Hung, M. S., Cheng, Y., Chen, M. Y., Liu, S. J., Chong, P., Lee, O. K. S., Hsu, S. C. (2013), Mesenchymal stem cells tune the development of monocyte-derived dendritic cells toward a myeloid-derived suppressive phenotype through growth-regulated oncogene chemokines, *J Immunol.*, 190, 5065-5077

Chiang, C. L. L., Hagemann, A. R., Leskowitz, R., Mick, R., Garrabrant, T., Czerniecki, B. J., Kandalaf, L. E., Powell Jr., D. J., Coukos, G. (2011): Day-4 myeloid dendritic cells pulsed with whole tumor lysate are highly immunogenic and elicit potent anti-tumor responses. *PLoS One*, 6, e28732

Coates, L. C., Conaghan, P. G., Emery, P., Green, M. J., Ibrahim, G., MacIver, H., Helliwell, P. S. (2012): Sensitivity and specificity of the classification of psoriatic arthritis criteria in early psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum.*, 64, 3150-3155

Collin, M., McGovern, N., Haniffa, M. (2013): Human dendritic cell subsets. *Immunology*, 140, 22-30

da Mota, L. M. H., Magalhães Laurindo, I. M., de Carvalho, J. F., dos Santos Neto, L. L. (2010): Prognostic evaluation of early rheumatoid arthritis. *Swiss Med Wkly.*, 140, w13100

Di Nicola, M., Lemoli, R. M. (2000): Dendritic cells: specialized antigen presenting cells. *Haematologica*, 85, 202-207

Dzionic, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D. W., Schmitz, J. (2000), Bdca-2, bdca-3 and bdca-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol.*, 165, 6037-6046

Finzel, S., Englbrecht, M. (2011): Psoriasisarthritis, Eine bleibende Herausforderung für Rheumatologen und Patienten- Teil 2: Bildgebende Diagnostik, Klassifikation, Therapie. *Z Rheumatol.*, 70, 775-789

Fiocco, U., Ferro, F., Vezzù, M., Cozzi, L., Checchetto, C., Sfriso, P., Botsios, C., Ciprian, L., Armellin, G., Nardacchione, R., Piccoli, A., Todesco, S., Rubaltelli, L. (2005): Rheumatoid and psoriatic knee synovitis: clinical, grey scale, and power doppler ultrasound assessment of the response to etanercept. *Ann Rheum Dis.*, 64, 899-905

FitzGerald, O., Haroon, M., Giles, J. T., Winchester, R. (2015): Concepts of pathogenesis in psoriatic arthritis: genotype determines clinical phenotype. *Arthritis Res Ther.*, 17, 115

Ganguly, D., Chamilos, G., Lande, R., Gregorio, J., Meller, S., Facchinetti, V., Homey, B., Barrat, F. J., Zal, T., Gilliet, M. (2009): Self-rna-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through tlr7 and tlr8. *J Exp Med.*, 206, 1983-1994

Gladman, D. D. (2008): Adalimumab, etanercept and infliximab are equally effective treatments for patients with psoriatic arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.*, 4, 510-511

Hackstein, H., Renner, F. C., Bohnert, A., Nockher, A., Frommer T., Bein, G., Weimer, R., (2005): Dendritic cell deficiency in the blood of kidney transplant patients on long-term immunosuppression: results of a prospective matched-cohort study. *Am J Transplant*, 5, 2945-2953

Hayashi, Y., Ishii, Y., Hata-Suzuki, M., Arai, R., Chibana, K., Takemasa, A., Fukuda, T. (2013): Comparative analysis of circulating dendritic cell subsets in patients with atopic diseases and sarcoidosis, *Respir Res.*, 14, 29

Hettenkofer, H. (2003), *Rheumatologie*. 5. Auflage. Georg Thieme, Stuttgart

Kavousanaki, M., Makrigiannakis, A., Boumpas, D., Verginis, P. (2010): Novel role of plasmacytoid dendritic cells in humans, induction of interleukin-10-producing treg cells by plasmacytoid dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis responding to therapy. *Arthritis Rheum.*, 62, 53-63

- Kay, J., Upchurch, K. S. (2012): ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatology (Oxford)*, 51, vi5-9
- Khan, S., Greenberg, J., Bhardwaj, N., (2009): Dendritic cells as target for therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 5, 566-571
- Lakey, R. L., Morgan, T. G., Rowan, A. D., Isaacs, J. D., Cawston, T. E., Hilkens, C. M. U. (2009): A novel paradigm for dendritic cells as effectors of cartilage destruction. *Rheumatology (Oxford)*, 48, 502-7
- Listing, J., Strangfeld, A., Kary, S., Kau, R., von Hinueber, U., Stoyanova-Scholz, M., Gromnica-Ihle, E., Antoni, C., Herzer, P., Kekow, J., Schneider, M., Zink, A. (2005): Infections in patients with rheumatoid arthritis treated with biologic agents. *Arthritis Rheum.*, 52, 3403-3412
- Listing, J., Gerhold, K., Zink, A. (2013): The risk of infections associated with rheumatoid arthritis, with its comorbidity and treatment. *Rheumatology (Oxford)*, 52, 53-61
- Lutz, M. B., Romani, N., Steinkasserer, A. (2006), *Handbook of Dendritic Cells, Biology, Diseases, and Therapies Vol. 1-3.* Wiley-VCH, Weinheim
- Lutzky, V., Hannawi, S., Thomas, R. (2007): Cells of the synovium in rheumatoid arthritis, dendritic cells. *Arthritis Res Ther.*, 9, 219
- McInnes, I. B., Schett, G. (2011): The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.*, 365, 2205-2219
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., Mortha, A. (2013): The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol.*, 31, 563-604
- Mewar, D., Wilson, A. G. (2011): Treatment of rheumatoid arthritis with tumour necrosis factor inhibitors. *Br J Pharmacol.*, 162, 785-791

Michelsen, B., Fiane, R., Diamantopoulos, A. P., Soldal, D. M., Hansen, I. J. W., Sokka, T., Kavanaugh, A., Haugeberg, G. (2015): A comparison of disease burden in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and axial spondyloarthritis. PLoS One, 10, e0123582

Migita, K., Miyashita, T., Maeda, Y., Kimura, H., Nakamura, M., Yatsunami, H., Ishibashi, H., Eguchi, K. (2005): Reduced blood bdca-2+ (lymphoid) and cd11c+ (myeloid) dendritic cells in systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol., 142, 84-91

Mold, C., Du Clos, T. W. (2013): C-reactive protein inhibits plasmacytoid dendritic cell interferon responses to autoantibody immune complexes. Arthritis Rheum., 65, 1891-1901

Moll, J. M. H., Wright, V. (1973), Psoriatic arthritis. Semin Arthritis Rheum., 3, 55-78

Murphy, K. M., Travers, P., Walport, M. (2008), Janeway's immunobiology. 7. Auflage, Garland Science, New York

Muster-Standardarbeitsanweisung SYSMEX Hämatologie-System KX-21N, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland

Narbutt J, Lesiak A, Zak-Prelich M, Woźniacka A, Sysa-Jedrzejska A, Tybura M, Robak T, Smolewski P. (2004): The distribution of peripheral blood dendritic cells by a new panel of anti-bdca monoclonal antibodies in healthy representatives of the polish population. Cell Mol Biol Lett., 9, 497-509

Nielen, M. M. J., van Schaardenburg, D., Reesink, H. W., van de Stadt, R. J., van der Horst-Bruinsma, I. E., de Koning, M. H. M. T., Habibuw, M. R., Vandenbroucke, J. P., Dijkmans, B. A. C. (2004): Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. Arthritis Rheum., 50, 380-386

Notley, C. A., Ehrenstein, M. R. (2010): The yin and yang of regulatory t cells and inflammation in ra. Nat Rev Rheumatol., 6, 572-577

Orsini, G., Legitimo, A., Failli, A., Massei, F., Biver, P., Consolini, R. (2012): Enumeration of human peripheral blood dendritic cells throughout the life. *International Immunology*, 47, 347-356

Ozkan, Y. (2016): Cardiac involvement in ankylosing spondylitis. *J Clin Med Res.*, 8, 427-430

Piccioli, D., Tavarini, S., Borgogni, E., Steri, V., Nuti, S., Sammicheli, C., Bardelli, M., Montagna, D., Locatelli, F., Wack, A. (2007): Functional specialization of human circulating cd16 and cd1c myeloid dendritic-cell subsets. *Blood*, 109, 5371-5379

Richez, C., Schaeveerbeke, T., Dumoulin, C., Dehais, J., Moreau, J. F., Blanco, P. (2009): Myeloid dendritic cells correlate with clinical response whereas plasmacytoid dendritic cells impact autoantibody development in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab. *Arthritis Res Ther.*, 11, R100

Robbins, S. H., Walzer, T., Dembélé, D., Thibault, C., Defays, A., Bessou, G., Xu, H., Vivier, E., Sellars, M., Pierre, P., Sharp, F. R., Chan, S., Kastner, P., Dalod, M. (2008): Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol.*, 9, R17

Rodgers, M., Epstein, D., Bojke, L., Yang, H., Craig, D., Fonseca, T., Myers, L., Bruce, I., Chalmers, R., Bujkiewicz, S., Lai, M., Cooper, N., Abrams, K., Spiegelhalter, D., Sutton, A., Sculpher, M., Woolacott, N. (2011): Etanercept, infliximab and adalimumab for the treatment of psoriatic arthritis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.*, 15, i-xxi

Roos, K., Martinsson, K., Ziegelasch, M., Sommarin, Y., Svärd, A., Skogh, T., Kastbom, A. (2016): Circulating secretory igA antibodies against cyclic citrullinated peptides in early rheumatoid arthritis associate with inflammatory activity and smoking. *Arthritis Res Ther.*, 18, 119

Scheinecker, C., Zwölfer, B., Köller, M., Männer, G., Smolen, J. S. (2001): Alterations of dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 44, 856-865

Siebert, S., Tsoukas, A., Robertson, J., McInnes, I. (2015): Cytokines as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases. *Pharmacol Rev.*, 67, 280-309

Smolewska, E., Cebula, B., Brózik, H., Stańczyk, J. (2008): Relationship between impaired apoptosis of lymphocytes and distribution of dendritic cells in peripheral blood and synovial fluid of children with juvenile idiopathic arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 56, 283-289

Steinman, R. M., Cohn, Z. A. (1973): Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice, II. functional properties in vitro. *J Exp Med.*, 139, 380-397

Tabera, S., Pérez-Simón, J. A., Díez-Campelo, M., Sánchez-Abarca, L. I., Blanco, B., López, A., Benito, A., Ocio, E., Sánchez-Guijo, F. M., Cañizo, C., San Miguel, J. F. (2008): The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of b-lymphocytes. *Haematologica*, 93, 1301-1309

Tjomsland, V., Sandström, P., Spångeus, A., Messmer, D., Emilsson, J., Falkmer, U., Falkmer, S., Magnusson, K. E., Borch, K., Larsson, M. (2010): Pancreatic adenocarcinoma exerts systemic effects on the peripheral blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells: an indicator of disease severity? *BMC Cancer*, 10, 87

van der Heijde, D., Sieper, J., Maksymowych, W. P., Dougados, M., Burgos-Vargas, R., Landewé, R., Rudwaleit, M., Braun, J. (2011), 2010 Update of the international asas recommendations for the use of anti-tnf agents in patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.*, 70, 905-908

van Steenberghe, H. W., Huizinga, T. W. J., van der Helm-van Mil, A. H. M. (2013): The preclinical phase of rheumatoid arthritis: what is acknowledged and what needs to be assessed? *Arthritis Rheum.* 65, 2219-2232

Windt, R., Glaeske, G., Hoffmann, F. (2011): Versorgung mit TNF- α -Blockern und regionale Unterschiede im Jahr 2010. *Z Rheumatol.*, 70, 874-881

Wittkowski, K. M., Leonardi, C., Gottlieb, A., Menter, A., Krueger, G. G., Tebbey, P. W., Belasco, J., Soltani-Arabshahi, R., Gray, J, Horn, L., Kueger, J. G. (2011): Clinical symptoms of skin, nails, and joints manifest independently in patients with concomitant psoriasis and psoriatic arthritis. *PLoS One*, 6, e20279

Woodrick, R. S., Ruderman, E. M. (2011): Safety of biologic therapy in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.*, 7, 639-652

Yilmaz, A., Weber, J., Cicha, I., Stumpf, C., Klein, M., Raithel, D., Daniel, W. G., Garlichs, C. D. (2006): Decrease in circulating myeloid dendritic cell precursors in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.*, 48, 70-80

Yoneyama, H., Matsuno, K., Zhang, Y., Nishiwaki, T., Kitabatake, M., Ueha, S., Narumi, S., Morikawa, S., Ezaki, T., Lu, B., Gerard, C., Ishikawa, S., Matsushima, K. (2004): Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol.*, 16, 915-928

Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P. J. M., Liu, Y. J., MacPherson, G., Randolph, G. J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J. M., Lutz, M. B. (2010): Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116, e74-8

Anhang

1. Anmeldung
2. Patienteneinwilligung
3. Prüfung der Ethikkommission
4. Lebenslauf

1. Der Effekt einer Etanercept Therapie auf die Verteilung von Subpopulationen dendritischer Zellen des peripheren Blutes bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis, Psoriasisarthritis und M. Bechterew

Die Studie ist angelegt als Verlaufsbeobachtung von Patienten mit nach ACR-Leitlinien diagnostizierter Rheumatoider Arthritis, Psoriasisarthritis und M. Bechterew vor Beginn und nach bis zu 3-monatiger Etanercept Therapie.

Die Patienten der Studie werden im Exzellenzzentrum Entzündungsmedizin der II. Medizinischen Klinik des UKSH während der Behandlung ambulant betreut, der Therapieverlauf wird überwacht und zu den o.g. Zeitpunkten dokumentiert.

Die Patienten werden nur in die Studie eingeschlossen, wenn die Therapie mit Etanercept (Enbrel s.c. 50 mg) leitliniengerecht nach DGRH begonnen werden kann und die Glucocorticoiddosis geringer als 10 mg Prednisolon pro Tag ist.

Bei Auftreten von Nebenwirkungen, die ein vorzeitiges Absetzen der Therapie erfordern, werden keine weiteren Untersuchungen des jeweiligen Patienten durchgeführt.

Für die Untersuchung werden Blutentnahmen von je 10 ml vor Beginn, in den Wochen 2, 6 und 12 nach Beginn der Therapie mit Enbrel vorgenommen.

Die Blutproben werden mittels Durchflusszytometrie am FACS auf deren absolute Anzahl dendritischer Zellen MDC1, PDC und MDC2 anhand ihrer speziellen Oberflächenmarker (BDCA) untersucht.

Dendritische Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Immunreaktion des Körpers sowohl bei mikrobiellen Infektionen als auch bei Autoimmunkrankheiten, da sie zu den Antigenpräsentierenden Zellen gehören und somit die Immunantwort vermitteln.

TNF α gehört zu den Zytokinen, die eine regulierende Wirkung in der Population der Leukozyten ausüben und hier in Zellzyklusvorgänge wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose eingreift.

Eine Hemmung des TNF α durch bestimmte Medikamente wirkt sich dementsprechend wahrscheinlich auch auf die dendritischen Zellen aus.

Durch eine bereits abgeschlossene Beobachtungsstudie wurde nachgewiesen, dass bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis und M. Bechterew die absolute Anzahl dendritischer Zellen im peripheren Blut vermindert ist.

Die Verteilung der dendritischen Zellen im peripheren Blut scheint dabei abhängig von der systemischen Entzündung- wiedergegeben durch das CRP- zu sein.

Zentrale Hypothese ist, dass Etanercept die totale Anzahl dendritischer Zellen im peripheren Blut, während der Normalisation der Entzündungsparameter bzw. Herunterregulation des TNF α , erhöhen wird. Ebenso könnte es zu einer Veränderung des MDC1/PDC Verhältnisses zugunsten der PDC kommen.

Das langfristige Ziel der Studie ist, die Untersuchung der Verteilung dendritischer Zellen während der Anti-TNF Therapie als Auswirkung in Bezug auf Therapieerfolg und mögliche Nebenwirkungen durchzuführen.

Kiel, 29.07.2016 Katharina Kay



UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein • Campus Kiel
 II. Medizinische Klinik • Rheumaamb. • Prof. Dr. med. J.O. Schröder **
 Brunswiker Str. 10, 24105 Kiel



UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein

Campus Kiel

II. Medizinische Klinik und Poliklinik
 Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Kneba

Sektion Rheumatologie

Rheumaambulanz

Sektionsleitung: Prof. Dr. J.O. Schröder

Ansprechpartner: PD Dr. med. R. Zeuner (0431-597-5902)

Tel: 0431 / 597-5900

Fax: 0431 / 597-5446

E-Mail: r.zeuner@med2.uni-kiel.de

Internet: www.uk-s-h.de

Datum:

Aufklärung zur Blutentnahme zu Forschungszwecken

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Die II. Medizinische Klinik Kiel am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein ist bestrebt, ihre Patientinnen und Patienten nach neuesten wissenschaftlichen und medizinischen Erkenntnissen zu behandeln. Diese Kenntnisse und Methoden können nur durch wissenschaftliche Forschung weiterentwickelt werden. Für die Weiterentwicklung von medizinischen Erkenntnissen sind jedoch auch Untersuchungen notwendig, die über die unmittelbaren diagnostischen und therapeutischen Erfordernisse hinausgehen. Im Rahmen der Therapie ihrer Erkrankung (rheumatoide Arthritis, Psoriasisarthritis, Spondylitis ankylosans) werden Sie mit dem Arzneimittel Etanercept (Enbrel) behandelt.

Wir möchten Sie daher um Ihr Einverständnis zu einer Blutentnahme zu Forschungszwecken bitten. Das Ihnen entnommene Blut wird grundsätzlich nur im Rahmen des unten bezeichneten Forschungsprojekts untersucht. Dieses Projekt wurde von der Ethik-Kommission des Universitätsklinikums begutachtet.

Die Blutentnahme soll für folgendes Projekt erfolgen:

Untersuchungen zum Effekt von Etanercept (Enbrel) auf die Verteilung von verschiedenen Typen dendritischer Zellen im peripheren Blut von Patienten Rheumatoider Arthritis, Psoriasisarthritis oder Spondylitis ankylosans.

Im Abwehrsystem des Menschen nehmen „dendritische Zellen“ eine zentrale Rolle ein. Sie sind in der Lage körperfremde Eiweißstoffe aufzunehmen, zu spalten und die entstandenen Spaltprodukte so darzustellen, das andere Zellen der Abwehr mit einer zielgerichteten Entzündung reagieren können. Kürzlich wurde erkannt, dass es verschiedene Typen von dendritischen Zellen gibt, die unterschiedliche

Reaktionsmuster aufweisen. Mit einem neuen Testsystem ist es möglich, die Anzahl verschiedener Typen von dendritischen Zellen im Blut zu bestimmen. Es liegen bisher kaum Untersuchungen darüber vor, ob die Zusammensetzung der dendritischen Zelltypen durch eine Therapie mit Etanercept (Enbrel) verändert wird.

Daher sollen in der Studie bei Personen, die an einer rheumatoiden Arthritis, einer Psoriasisarthritis oder einer Spondylitis ankylosans (Bechterew Erkrankung) erkrankt sind, und die im Rahmen der medizinischen Versorgung das Medikament Etanercept (Enbrel) erhalten, die Anzahl verschiedener Typen von dendritischen Zellen im Blut bestimmt werden. Es erfolgen ausschließlich Untersuchungen zur Anzahl und Funktion dieser Zellen. Im Rahmen dieses Forschungsprojektes erfolgen keine genetischen Untersuchungen.

Die erhobenen Daten würden die Kenntnisse über die Auswirkungen dieser Therapie auf das Immunsystem erweitern, und könnten in Zukunft möglicherweise Anhaltspunkte ergeben, welche Patienten für eine solche Therapie besonders gut geeignet sind.

Es werden zu vier Zeitpunkten (vor Beginn der Therapie, am Tag 14, sowie in der 6. und 12. Woche nach Therapiebeginn) ca. 10 ml Blut benötigt. Die entnommene Blutmenge ist nicht mit zusätzlichen Gesundheitsrisiken verbunden. Die Blutentnahme wird im Rahmen der zur Therapieüberwachung notwendigen Standard-Blutentnahmen vorgenommen werden.

Die mit der Blutentnahme erhobenen Daten sollen zum Verständnis der o.g. Erkrankung beitragen, haben aber aktuell keinen Einfluss auf die Beurteilung des Krankheitsbildes oder auf Therapieentscheidungen. Aus diesem Grunde sind Ergebnisse der Untersuchungen keine Bestandteile der Krankenakte, werden nicht mitgeteilt, und werden getrennt von den Krankenakten in Papierform und auf elektronischen Datenträgern archiviert.

Ich bin darüber informiert worden, dass bei dieser wissenschaftlichen Studie persönliche Daten und medizinische Befunde über mich erhoben werden. Die Weitergabe, Speicherung und Auswertung dieser studienbezogenen Daten erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt die folgende freiwillige Einwilligung voraus:

Alle erhobenen Daten werden strikt vertraulich gemäß den Datenschutzbestimmungen verwendet und sind nur den mit dem Forschungsprojekt befassten Personen zugänglich. Für die wissenschaftliche Auswertung und ggf. Veröffentlichung werden die Daten nur anonymisiert verwendet. Eine Weitergabe der Daten an Personen oder Stellen, die nicht mit dem Forschungsprojekt befasst sind ist ausgeschlossen. Falls sich aus den erhobenen Daten Konsequenzen für den Arzneimittelhersteller (Wyeth) ergeben sollten, können die anonymisierten Daten an den Hersteller übermittelt werden.

Die Zustimmung zur Teilnahme an dem Forschungsprojekt können sie ohne Angabe von Gründen jederzeit widerrufen. Es entstehen Ihnen selbstverständlich keinerlei Nachteile, wenn Sie uns die Zustimmung nicht erteilen oder widerrufen.

Einverständniserklärung für Patienten zur Blutentnahme zu Forschungszwecken

Projekt: Untersuchungen zum Effekt von Etanercept (Enbrel) auf die Verteilung von verschiedenen Typen dendritischer Zellen im peripheren Blut von Patienten rheumatoider Arthritis, Psoriasisarthritis oder Spondylitis ankylosans.

Erklärung des Patienten:

Patientenaufkleber

Nach ausführlichem Gespräch mit _____

Ich willige ein,

dass im Rahmen des o.g. Forschungsprojektes eine Blutentnahme zu wissenschaftlichen Zwecken erfolgt. Ich habe den entsprechenden Aufklärungsbogen gelesen und verstanden und hatte ausreichend Gelegenheit Fragen zu stellen. Mit meiner Unterschrift erkläre ich mich damit einverstanden, dass die im Rahmen der Untersuchung erhobenen, im Aufklärungsprotokoll beschriebenen Daten aufgezeichnet und anonymisiert für die biomedizinische Forschung verwendet werden dürfen. Einer wissenschaftlichen Auswertung der anonymisierten Daten und einer möglichen Veröffentlichung stimme ich zu.

Ich willige nicht ein.

Kiel, den

Unterschrift der Patientin/ des Patienten

Kiel, den

Unterschrift Ärztin/ Arzt

**MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL**

ETHIK-KOMMISSION



A.D. 1665

Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Schwanenweg 20
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09
Telefax 04 31 / 597-18 31

Herrn
PD Dr. R. Zeuner
Prof. Dr. J.O. Schröder
II. Med. Klinik, Rheumaambulanz
Brunswiker Str. 10
24105 Kiel

Datum:

14.4.2009

AZ: D 408/09 (bitte stets angeben)
Studienplan: **Effect of Etanercept therapy on distribution of peripheral blood dendritic cell subsets in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and spondylitis ankylosans**
Prüfplan mit Anlagen, Patienteninformation und Einwilligungserklärung
Antragsteller: PD Dr. R. Zeuner, Prof. Dr. J.O. Schröder, II. Med. Klinik, UKSH, Campus Kiel
Antrag vom: 1.4.2009 (Eingang 3.4.2009)

Sehr geehrter Herr Kollege Zeuner, sehr geehrter, lieber Herr Schröder,

vielen Dank für Ihr Schreiben vom 1.4.2009 mit dem oben genannten Antrag. Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Es wird darauf hingewiesen, daß künftig eventuell für zweckmäßig und notwendig erachtete Änderungen und Erweiterungen des Versuchsplanes der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.

Nach Abschluß der Studie erbittet die Kommission einen kurzen Bericht mit einem Hinweis, ob im Laufe der Studie ethische oder juristische Probleme aufgetreten sind.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

J. Schaub
Prof. Dr. med. Jürgen Schaub
Vorsitzender der Ethik-Kommission

C. Glinicke
Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

4. Curriculum Vitae

Katharina Kay

geb. 02.08.1980 in Neumünster

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1986-1990 Grundschule Pestalozzischule in Neumünster

1990-1999 Gymnasium Klaus-Groth-Schule

26.06.1999 Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

01.08.1999-31.07.2000 Freiwilliges Ökologisches Jahr

Physiotherapieausbildung:

31.10.2000-01.11.2003 Ausbildung zur Physiotherapeutin an der Johann-Hermann-Lubinus-Schule für Physiotherapie

01.11.2003 Abschluss des Staatsexamens für Physiotherapie

2003-2005 Tätigkeit als Physiotherapeutin

Hochschulstudium:

2005-2011 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel

21.08.2007 Abschluss des ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

24.11.2011 Abschluss des zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

Promotion:

2010 Beginn der Untersuchungen für die Dissertation: *„Der Effekt einer Etanercept Therapie auf die Verteilung von Subpopulationen dendritischer Zellen des peripheren Blutes bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis, Psoriasisarthritis und M. Bechterew“* in der II. Med. Klinik des UKSH Sektion Rheumatologie, Innere Medizin I, UKSH Campus Kiel) unter der Betreuung von PD Dr. R. Zeuner

Januar 2012 Publikation eines Abstracts mit dem Titel: „*Influence of TNF- α blockade on the expression profiles of AMP in psoriatic patients*“ in der Zeitschrift für Rheumatologie, Research Symposium-Rheumatology and Dermatology, Band 71, Supplement 1

Tätigkeit als Ärztin:

04.01.2012 Approbation als Ärztin

seit 01.03.2012 Tätigkeit als Assistenzärztin in der Klinik Preetz, Innere Abteilung

Kiel, 29.07.16