

Aus der Klinik für Innere Medizin I
mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Pneumologie, internistische Intensivmedizin, Endokrinologie, Infektiologie, Rheumatologie, Ernährungs- und Alterungsmedizin
(Direktor: Prof. Dr. Stefan Schreiber)
im Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

LANGZEITVERLAUF UND ZYTOKINSIGNATUR DER LUPUS-LIKE-DISEASE UNTER TNF-ALPHA-INHIBITOR-THERAPIE

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

Vorgelegt von

Wiebke Martensen

aus Heide

Kiel 2018

1. Berichtstatter: Prof. Dr. J. O. Schröder
2. Berichtstatter: Prof. Dr. Sabine Adam

Tag der mündlichen Prüfung 13.03.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 18.12.2018

Gez.: Prof. Dr. Alexander Arlt

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Chronische entzündliche Systemerkrankungen	1
1.2 TNF-Inhibitoren	1
1.3 Nebenwirkungen der TNF-Inhibitor-Therapie	3
1.3.1 Infektionen	3
1.3.2 Malignome	3
1.3.3 Paradoxe Immunreaktionen	4
1.4 Lupus-like-Disease	4
1.5 Klassischer medikamenteninduzierter Lupus erythematoses vs Lupus-like-Disease	5
1.6 Systemischer Lupus Erythematoses vs Lupus-like-Disease	5
1.7 Fragestellung	6
2 MATERIAL UND METHODEN	7
2.1 Material	7
2.1.1 Patienten mit einer Indikation für anti-TNF-Therapie	7
2.1.1.1 Patienten mit rheumatischen Erkrankungen	7
2.1.1.2 Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen	8
2.1.2 Einschlusskriterien	8
2.2 Methoden	9
2.2.1 Serologie	9
2.2.1.1 ANA-Titer Bestimmung	9
2.2.1.2 dsDNA-Antikörper Bestimmung	9
2.2.2 Klinische Definition der Lupus-Like-Disease	10
2.2.3 Interferon-Signaturen	11
2.2.3.1 Isolation der RNA	12
2.2.3.2 cDNA Synthese	12
2.2.3.3 quantitative Real-Time PCR	12
3 ERGEBNISSE	14
3.1 Kohorte A (prospektive Beobachtungskohorte unter TNF-Inhibitor-Therapie)	14
3.2 Kohorte B (Lupus-like-Disease-Kohorte)	14
3.3 Vergleich Kohorte A und B	18
3.4 Verlauf der Serologie	19

3.4.1 ANA-Antikörper	19
3.4.2 dsDNA-Antikörper	20
3.4 Interferonsignaturen	22
4 DISKUSSION	25
5 ZUSAMMENFASSUNG	31
6 LITERATURVERZEICHNIS	33

Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
ACTB	Beta-Aktin
AHA	Anti-Histon-Antikörper
AK	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
ASAS	Assessment of Spondyloarthritis International Society
CASPAR	Classification Criteria for the Diagnosis of Psoriatic Arthritis
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CED	Chronische entzündliche Darmerkrankung
CRP	C-reaktives Protein
CT	Cycle treshold
Ctrl	Kontrolle
CU	Colitis ulcerosa
DEPC	Diethylpyrocarbonat/Diethyldicarbonat
DMARD	Disease-modifying anti-rheumatic-drugs
DNA	Desoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EPSTI	Epithelial Stromal Interaction
EULAR	European League against Rheumatism
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
HLA-B27	Humanes Leukozyten Antigen B27
HEp	Human epithelial
Ig	Immunglobulin
IFI44L	Interferon induced Protein 44 Like
IFI6	Interferon Alpha Inducible Protein 6
IFIT1	Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats 1
IFN	Interferon
IFR5	Interferon Regulatory Factor 5
IFR7	Interferon Regulatory Factor 7
ISG	Interferon Stimulated Genes

LLD	Lupus-like-Disease
MC	Morbus Crohn
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MTX	Methotrexat
MXA	Interferon-induziertes GTP-bindendes Protein Mx1
NSAR	Nicht-steroidale Anti-Rheumatika
OSA3	2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 3
PBS	Phosphate buffered saline=Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction=Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PsA	Psoriasis Arthritis
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure
RSAD2	Radical S-Adenosyl Methionine Domain Containing 2
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
Sm-AK	Smith-Antikörper
SpA	Spondylitis Ankylosans
Taq	Polymerase benannt nach dem Bakterium Thermus aquaticus
TNF	Tumornekrosefaktor

1 Einleitung

1.1 Chronische entzündliche Systemerkrankungen

Chronisch entzündliche Erkrankungen wie Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Rheumatoide Arthritis (RA), Axiale Spondylarthropathie und Psoriasis Arthritis sind eher früh, häufig im jungen Erwachsenenalter einsetzende Krankheiten, unter denen die Patienten Jahrzehnte bis lebenslang leiden. Diese Diagnosen haben einen großen Einfluss auf die Lebensqualität. Etwa 0,26%- 0,45% der deutschen Bevölkerung leiden unter einer chronischen entzündlichen Darmerkrankung wie Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa (Däbritz et al. 2017) und ca. 2,3% an Erkrankungen des rheumatologischen Formenkreises (Herold 2015). Frühere Studien über Rheumatoide Arthritis berichten, dass nach 10 Jahren Krankheitsdauer bis zu 50% der Betroffenen erwerbsunfähig sind. Die Lebenserwartung war bis um sieben Jahre gemindert. Todesursache waren häufig Herzinfarkt, Schlaganfall oder die hohe Krankheitsaktivität. Durch den Einsatz von Kortikosteroiden und DMARD (disease-modifying anti-rheumatic drugs), hier vor allem Methotrexat, Ciclosporin und Leflunomid, haben Patienten mit RA eine günstigere Prognose. Auch Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen haben unter Therapie meist eine annähernd normale Lebenserwartung (Ausnahme: Pankolitis bei Colitis ulcerosa). Es kommen vor allem Sulfasalazin/Mesalazin, Azathioprin und Kortikosteroide zum Einsatz. Eine weitere maßgebliche Verbesserung ist die Therapie durch sogenannte Biologika. Dies sind Antikörper, Rezeptorkonstrukte oder Rezeptorantagonisten, die gegen entzündungsfördernde Botenstoffe gerichtet sind. Zielmoleküle sind beispielsweise Interleukin-1 (Anakinra und Canakinumab), Interleukin-6 (Tocilizumab) oder Tumornekrosefaktor(TNF)-alpha(Infliximab, Adalimumab, Etanercept, Golimumab, Certolizumab pegol).

1.2 TNF-Inhibitoren

Seit der Zulassung im Jahr 1999 spielen TNF-alpha-Inhibitoren eine große Rolle in der Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen. Sie richten sich gegen TNF-alpha, einen Botenstoff sowohl der Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems mit vielfältigen Funktionen. Hauptsächlich von Makrophagen und Monozyten sezerniert, aktiviert TNF-alpha Immunzellen und führt zur Ausschüttung weiterer Zytokine und so zur Intensivierung zahlreicher Immunreaktionen. Zudem ist es notwendig für die Organogenese des Lymphsystems und dessen Aufrechterhaltung. Aufgrund dieser Eigenschaften ist es auch bekannt geworden als zentraler Akteur klinisch dramatischer Reaktionen wie Fieber, Sepsis, Kachexie und Autoimmunerkrankungen (Hehlhans und Pfeffer 2005).

So konnten bei Patienten mit autoimmunologischen Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis sowie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöhte Serumkonzentrationen von TNF-alpha gemessen werden, außerdem fand sich bei Patienten bei aktiver Entzündung der Gelenke erhöhtes TNF-alpha in der Synovialflüssigkeit (Deleuran et al. 1992, Altobelli et al. 2017)

TNF-alpha entfacht seine Wirkung über die Bindung an membranständige TNF-alpha-Rezeptoren. Es gibt zudem lösliche TNF-alpha-Rezeptoren, die TNF-alpha binden und so inaktivieren können (Steed et al. 2003). Diese tragen zur Neutralisierung einer intensiven, TNF-alpha-vermittelten Immunreaktion bei und dienen quasi als Puffer dieses Teils des Immunsystems.

Im Rahmen der hochregulierten Entzündung bei den genannten Erkrankungen ist dieses Gleichgewicht erheblich gestört. Diese Beobachtungen führten dazu, dass TNF-alpha Gegenstand der Entwicklung einer neuen, zielgerichteten Therapie wurde.

Mit einem Molekül, das dem löslichen TNF-Rezeptor nachempfunden ist, soll die TNF-Aktivität und somit die entzündliche Reaktion bei Autoimmunerkrankungen gemindert werden. Dieses Wirkprinzip wurde beim Fusionsprotein Etanercept realisiert, das aus dem TNF-alpha-Rezeptor p75 und dem Fc-Teil des humanen IgG1 besteht.

Ein zweites Wirkprinzip ist der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen TNF-alpha. Monoklonale Antikörper werden hergestellt, indem einer vorher mit dem entsprechenden Antigen immunisierten Maus die Milz und die B-Zellen entnommen werden. Nach Fusion dieser B-Zellen mit einer Myelomzelllinie, selektiert man diejenige sogenannte Hybridomzelle, die am besten zum Antigen passt. So erhält man eine Zelle, die quasi unsterblich ist und die die gewünschten Antikörper produzieren kann. Ein solcher Antikörper ist z. B. Infliximab - allerdings besteht nur noch ein kleiner Teil des Fab-Fragments aus Mausprotein, der übrige Teil besteht aus einer humanen Aminosäuresequenz. Adalimumab und Golimumab sind bereits vollständig humane Antikörper gegen TNF-alpha.

Der TNF-alpha-Inhibitor Certolizumab pegol hingegen besteht aus einem TNF-alpha bindenden Fab-Fragment, das an ein Polyethylenglykol gekoppelt ist.

Die Entzündungsmedizin kann dementsprechend heute auf fünf TNF-alpha-Inhibitoren zurückgreifen (Luchetti et al. 2017).

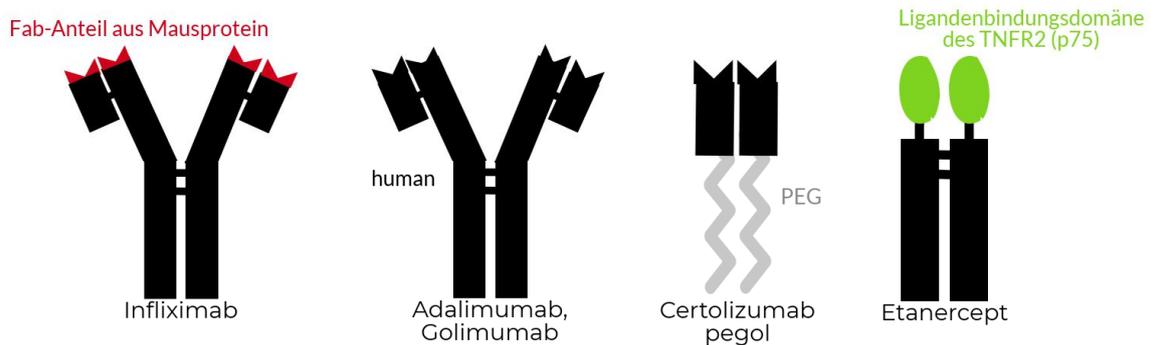


Abbildung 1: Schematische Darstellung der TNF-Inhibitoren (W. Martensen)

1.3 Nebenwirkungen der TNF-Inhibitor-Therapie

1.3.1 Infektionen

Da die Medikamentengruppe der TNFalpha-Inhibitoren in das Immunsystem eingreift, ist leicht ersichtlich, dass sich hier unerwünschte Wirkungen ergeben. So fanden sich im Rahmen einer Metaanalyse mit einer Fallzahl von insgesamt 22760 Patienten 20% mehr Infektionen und 40% mehr ernste Infektionen unter Anti-TNF-Therapie als in der Kontrollgruppe. Insbesondere eine Tuberkuloseinfektion trat sogar 250% häufiger auf als in der Normalbevölkerung (Minozzi et al. 2016). Bei der Tuberkuloseinfektion handelt es sich in den meisten Fällen um eine Reaktivierung einer früher durchgemachten, noch latenten Infektion, weswegen vor Therapiebeginn mit einem TNF-Inhibitor eine Tuberkulosestestung bestehend aus einem Tuberkulinhauttest und einer Röntgenuntersuchung der Thoraxorgane obligat ist (MSD Sharp & Dohme GmbH 2016).

Zudem sollte vor Einleitung einer Therapie mit TNF-Inhibitoren ein Screening auf eine vorliegende Hepatitis B Infektion erfolgen. Bei positiver Testung wird angeraten, zunächst eine antivirale Therapie zu etablieren. Bei negativem Testergebnis sollte eine Impfung gegen Hepatitis B erfolgen (Fonseca Chebli et al. 2014).

1.3.2 Malignome

Die Studienlage hinsichtlich der Häufigkeit von Malignomen unter TNF-alpha-Inhibitor-Therapie ist nicht eindeutig. So ist laut einer umfangreichen Metaanalyse durch Chen et al. nicht das allgemeine Risiko für Malignome erhöht, es gibt aber eine Häufung der als Non-Melanoma-Skin-Cancer bezeichneten Tumoren wie der Basaliome und Spinaliome. Regelmäßiges Screening auf Hauttumoren wird empfohlen.

Eine schwedische Kohortenstudie ergab ein um 50% erhöhtes relatives Risiko für Malignome bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis unter Anti-TNF-Therapie bei gering bleibender absoluter Risikoerhöhung (Raaschou et al. 2013). Das Risiko für Non-Hodgkin-Lymphome bei Kombination mit Thiopurinen und TNF-Inhibitoren wurde bei einer Metaanalyse als gering erhöht eingestuft (Targownik und Bernstein 2013).

1.3.3 Paradoxe Immunreaktionen

Während die bislang beschriebenen Nebenwirkungen von TNF-Inhibitoren, speziell die Infektionen angesichts des immunsupprimierenden Effektes letztlich zu erwarten waren, wurden in den letzten Jahren zunehmend andere, eher überraschende Reaktionen beschrieben, nämlich die Induktion einer von der Grunderkrankung unterscheidbaren pathologischen Immunreaktion. Da diese Effekte dem ursprünglichen Therapieziel entgegengesetzt sind, kann man diese auch als paradox bezeichnen.

So wurden TNF-alpha-Blocker mit Erfolg zur Therapie von Psoriasis eingesetzt, führten aber bei Individuen, die vorher nicht unter Psoriasis litten, zu einer psoriasiformen Hautreaktion (Aslanidis et al. 2008). Außerdem beschrieben ist eine Reihe von autoimmunologischen neurologischen Krankheitsbildern wie beispielsweise dem Guillain-Barré-Syndrom oder dem Miller-Fisher-Syndrom und Multiple Sklerose-ähnliche Neuropathien (Stübgen 2008).

Zu diesen Phänomenen, bei denen durch ein Medikament gegen Autoimmunkrankheiten eine andere Autoimmunerkrankung ausgelöst wird, gehört auch die Lupus-like-Disease, die Gegenstand dieser Arbeit ist.

1.4 Lupus-like-Disease

Die Lupus-like-Disease ähnelt in Serologie und Symptomatik dem Systemischen Lupus Erythematoses(SLE). Die Patienten entwickeln Antinukleäre Antikörper(ANAs) und Antikörper gegen Doppelstrang-DNA(dsDNA-Antikörper), die Symptome sind häufig Gelenkschmerzen und Hauterscheinungen.

Im Gegensatz zum klassischen Medikamenten induzierten Lupus zeigt sich jedoch auch vereinzelt ein schwerer Verlauf mit renaler, zerebraler und Hautbeteiligung (Williams et al. 2009). Mit der Zulassung der TNF-Inhibitoren 1998 wurden auch die ersten Fälle des TNF-alpha-Inhibitor induzierten Lupus Syndroms beschrieben. Infliximab (44%) und Etanercept (40%) wurden in einer Metaanalyse von 233 Fällen als die dominierenden Auslöser beschrieben (Ramos-Casals et al. 2007). Die Häufigkeit von Symptomen und Antikörperanstiegen variieren je nach Studie stark. Wetter et al berichten in einer retrospektiven Studie von

einer Häufigkeit des Lupus Syndroms von 0,5 bis 1% (Wetter und Davis, Mark D. P. 2009), wohingegen in einer prospektiven Studie mit 180 Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung 10% ein klinisch relevantes Lupus Syndrom entwickelten (Beigel et al. 2011), darunter 8,9% mit leichter und 1,1% mit schwerer Symptomatik. In einer prospektiven Studie über zwei Jahre konnten Winkelmann et al. nun in 33% ein serologisches und in 2% ein klinisches Lupus Syndrom unter TNF-alpha-Inhibitortherapie zeigen (Winkelmann 2016).

1.5 Klassischer medikamenteninduzierter Lupus erythematodes vs Lupus-like-Disease

Die durch Medikamente ausgelöste Lupus-like-Disease ist keine gänzlich neue Beobachtung. Ca. 0,5% bis 2% aller Fälle von SLE sind auf Medikamente zurückzuführen. Als Ursache kommen über 90 verschiedene Medikamente in Betracht (Pretel et al. 2014), wobei Procainamid und Hydralazin einen besonderen Stellenwert einnehmen. Hier tritt bei 20% bzw. bei 5 bis 8 % der behandelten Patienten eine Lupus-ähnliche Erkrankung auf. Voraussetzung für die Diagnosestellung ist der Beginn der Symptomatik nach mindestens einmonatiger Medikamentenexposition und das Schwinden der Symptome nach Absetzen der als Auslöser angesehenen Substanz. Wie beim SLE können die Symptome variieren, es kommt unter anderem zu Fieber, muskuloskelettalen Beschwerden und Serositiden, allerdings in vergleichsweise milder Form. Es kommt praktisch nie zum Komplementverbrauch und die Prognose ist deutlich besser als beim SLE. Serologisches Korrelat sind erhöhte ANA- sowie erhöhte Anti-Histon-Antikörper (AHA)-Titer, hier unterscheidet sich der klassische medikamenteninduzierte Lupus sowohl vom SLE als auch von der TNF-alpha-Inhibitor induzierten Lupus-like-Disease (jeweils erhöhte ANA- und dsDNA-AK-Titer).

1.6 Systemischer Lupus Erythematodes vs Lupus-like-Disease

Der Systemische Lupus Erythematodes (SLE) ist eine systemische Autoimmunerkrankung, die chronisch und in Schüben verläuft und alle Organe betreffen kann. Die Varianz dieser Krankheit ist groß und reicht von milden Verläufen bis zu gravierenden Organschäden. Bei etwa der Hälfte der Patienten tritt eine schmetterlingsförmige Hautveränderung im Gesicht auf. Diese wurde im vorletzten Jahrhundert mit der tuberkulosebedingten Hauterscheinung Lupus vulgaris (lat.: gewöhnlicher Wolf) gleichgesetzt und erst im Laufe der Zeit von dieser als Manifestation einer chronischen Autoimmunerkrankung mit dem Begriff Lupus erythematosus (lat.: roter Wolf) differenziert (Wallace und Hahn 1997). Häufige Symptome

sind neben Hautveränderungen Arthritiden, Serositiden, Nierenbeteiligung sowie neurologische und hämatologische Veränderungen. Serologisch finden sich in der Regel (98%) Antinukleäre Antikörper (ANA). Darüber hinaus finden sich bis zu 10 Subspezifitäten von Zellkernantikörpern, von denen insbesondere die Antikörper gegen dsDNA als besonders spezifisch gelten. Das American College of Rheumatology (ACR) hat Kriterien veröffentlicht, die diese Auffälligkeiten beinhalten und bei einem Zutreffen von vier der elf Merkmale die Klassifikation des vorliegenden Krankheitsbildes als SLE zulassen. Die Prognose ist unbehandelt ernst, so wurde im Jahre 1953 die 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit noch mit 51% angegeben (Merrell und Le Shulman 1955). Durch moderne Therapiemöglichkeiten und frühere Diagnosestellung konnte die Prognose allerdings deutlich verbessert werden, sodass die 20-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit nun bei 80% liegt (Pons-Estel et al. 2010). Die Betroffenen haben eine annähernd normale Lebenserwartung und versterben meist nicht am Systemischen Lupus Erythematodes selbst, sondern an Komplikationen des SLE oder der Therapie. Betroffen sind zu 90% Frauen im gebärfähigen Alter bei einer Inzidenz von 6 bis 8 Erkrankungen auf 100.000 Einwohner.

1.7 Fragestellung

Das Auftreten einer Lupus-like-Disease unter TNF-Inhibitor-Therapie ist bereits bekannt. Im Gegensatz zu bisherigen Studien haben Winkelmann et al. auch Patienten erfasst, die serologisch eine Lupus-like-Disease aufwiesen, klinisch jedoch nicht auffällig waren. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Verlauf ebendieser Patienten hinsichtlich Klinik und Serologie über mindestens ein weiteres Jahr und liefert somit Erfahrungen zum Langzeitverlauf einer durch TNF-alpha-Inhibitoren induzierten Lupus-like-Disease im Rahmen einer prospektiven Studie. Dieses Vorgehen lässt uns Aussagen treffen über den Effekt der fortgesetzten Behandlung mit einem TNF-Inhibitor bzw. der Beendigung einer solchen Therapie.

Es ergab sich vor allem folgende Fragestellung:

Bilden sich die Symptome einer Lupus-like-Disease zurück? Bleiben Residuen?

Führt die Weiterbehandlung zwangsweise zu einem Anstieg der Antikörper und zum Auftreten von Symptomen?

Zudem haben wir uns mit der Frage beschäftigt, welche Eigenschaften dazu führen, dass einige Patienten eine Lupus-like-Disease entwickeln und andere nicht. Hierfür wurde die Interferonsignatur von Patienten mit Lupus-like-Disease sowie von gepaarten Kontrollen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patienten mit einer Indikation für anti-TNF-Therapie

Die Patienten rekrutierten wir aus der Studie von Winkelmann et al. Es wurden 223 Patienten untersucht, die aufgrund einer Autoimmunerkrankung mit TNF-alpha-Inhibitoren behandelt wurden. Zu diesen Grunderkrankungen zählten Rheumatoide Arthritis, Spondylitis ankylosans, Psoriasis Arthritis, Juvenile idiopathische Arthritis, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Für die Diagnosestellung dieser entzündlichen Systemerkrankungen waren die Kriterien der jeweiligen Fachgesellschaften heranzuziehen.

2.1.1.1 Patienten mit rheumatischen Erkrankungen

Die Rheumatoide Arthritis definiert sich über die ACR/EULAR-Kriterien von 2010. Voraussetzung ist hier mindestens ein Gelenk mit einer klinischen Synovitis, die nicht durch eine andere Erkrankung erklärbar ist. Anschließend gibt es ein Punktesystem für folgende Kategorien:

- Anzahl und Größe der betroffenen Gelenke
- Serologie
- Akute-Phase-Proteine
- Dauer der Symptomatik.

Bei Vorliegen von 6 aus maximal 10 möglichen Punkten kann eine Gelenkentzündung als Rheumatoide Arthritis klassifiziert werden (Aletaha et al. 2010).

Die Juvenile idiopathische Arthritis wird bei Jugendlichen diagnostiziert, die vor Beginn des 16. Lebensjahres eine Arthritis entwickeln, die länger als 6 Wochen anhält und nicht durch andere Erkrankungen erklärt werden kann. Es existieren Ausschlusskriterien, die auf eine andere Erkrankung hindeuten (beispielsweise das Vorliegen einer Psoriasis oder des genetischen Markers HLA-B27; [Petty 2004]).

Für die Spondylitis ankylosans sind die entsprechenden Kriterien der Assessment of Spondyloarthritis International Society (ASAS) heranzuziehen (Rudwaleit et al. 2009a). Diese besagen, dass für die Diagnose mindestens 3 Monate chronische Rückenschmerzen und ein Krankheitsbeginn vor dem 45. Lebensjahr vorliegen müssen. Zudem ist entweder eine Sakroiliitis in der Bildgebung und mindestens ein für die Spondylitis ankylosans spezifischer klinischer Parameter erforderlich, alternativ kann sich die Diagnose auch auf einen positiven HLA-B27-Status und mindestens 2 klinische Parameter der Spondylitis ankylosans stützen (Rudwaleit et al. 2009b). Hierzu zählen:

- entzündlicher Rückenschmerz
- periphere Arthritis (Enthesitis, Uveitis, Daktylitis, Psoriasis, CED)
- Gutes Ansprechen auf NSAR
- Positive Familienanamnese
- HLA-B27
- Erhöhtes CRP

Patienten mit Psoriasis Arthritis wurden eingeschlossen, sofern sie die CASPAR-Kriterien erfüllten. Sie sind erfüllt bei Vorliegen einer entzündlichen muskuloskelettalen Erkrankung und einem Score von mindestens 3 Punkten. Der Score errechnet sich aus den Merkmalen

- Nachweis einer Psoriasis
- Psoriatische Nagelbeteiligung
- Rheumafaktor und Citrullin-Antikörper negativ
- Daktylitis
- Radiologische Zeichen einer gelenknahen Knochenneubildung (Taylor et al. 2006).

2.1.1.2 Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen

Für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn gibt es keine einfachen Diagnosekriterien. Vielmehr ist die Diagnose in Zusammenschau der Anamnese, der klinischen Untersuchung sowie der laborchemischen, sonografischen, endoskopischen, histologischen und radiologischen Befunde zu stellen (Preiß, J. C., Bokemeyer, B et al. 2014; Dignass et al. 2011)

2.1.2 Einschlusskriterien

Für das Alter der Patienten legten wir die Volljährigkeit als einzige Beschränkung fest. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel geprüft und zugelassen und nach den Richtlinien für gute klinische Praxis in Übereinstimmung mit der Erklärung von Helsinki durchgeführt. Alle Studienteilnehmer gaben nach ausführlicher ärztlicher Aufklärung über Risiken und Nutzen der Studie ihre schriftliche Einwilligung ab.

Eine interdisziplinäre Fallkonferenz bestehend aus Fachärzten der Rheumatologie, Gastroenterologie und Dermatologie hatte zuvor eine leitlinienkonforme Empfehlung zur Einleitung der Anti-TNF-Therapie ausgesprochen.

Voraussetzung für den Einschluss in diese Studie war die Bereitschaft für Follow-up Untersuchungen über mindestens 2 Jahre.

2.2 Methoden

2.2.1 Serologie

Die serologische Diagnosestellung eines Lupus Syndroms definierten wir im Rahmen dieser Arbeit über das Auftreten eines dsDNA-Antikörper-Titers von ≥ 20 U/ml. Wir bestimmten außerdem die ANA-Titer, wobei wir diesen ab einem ANA-Titer von 1:320 als oberhalb der Norm liegend werteten.

2.2.1.1 ANA-Titer Bestimmung

Beim Indirekten Immunfluoreszenztest wird anhand einer im Fluoreszenzmikroskop sichtbaren Fluoreszenz abhängig von der Verdünnung des Patientenserums eine Aussage über den ANA-Titer getroffen.

Hierfür werden zunächst pro Reaktionsfeld des Reagenzträgers 30 μ l der verdünnten Probe aufgetragen und der Objektträger aufgelegt. Der Objektträger enthält die BIOCHIPs, die mit HEp-20-10 Zellen beschichtet sind. Dies sind Epithelzellen aus einer humanen Larynxkarzinomzelllinie, die sich durch eine besonders hohe Mitoserate auszeichnen. Beim Auflegen kommt es somit zur Reaktion von eventuell vorhandenen ANAs mit den Zellkernen der HEp-20-10 Zellen. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur folgt eine Wäsche mit PBS-Tween, anschließend werden je Feld 25 μ l markiertes Antiserum zugefügt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgen ein Waschvorgang und das Hinzufügen von 10 μ l Eindeckmedium pro Reaktionsfeld. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird nun beurteilt, bis zu welcher Verdünnungsstufe sich eine Fluoreszenz zeigt.

2.2.1.2 dsDNA-Antikörper Bestimmung

Die dsDNA-Antikörper Bestimmung erfolgte durch einen ELISA. Bei diesem Verfahren wird durch eine enzymatische Reaktion ein Farbumschlag erzeugt, dessen Intensität mit der Höhe des Antikörper-Titers korreliert. Die Kavitäten der im ELISA Test enthaltenen Mikrotiterplatten sind mit humaner rekombinanter dsDNA beschichtet. Im ersten Schritt werden nun jeweils 100 μ l der im Verhältnis von 1:100 verdünnten Patientenproben sowie der Standards A-F und der Positiv- und Negativkontrollen in die Kavitäten gegeben. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur werden die Kavitäten entleert und drei Mal mit jeweils 300 μ l Waschpuffer gewaschen. Hierbei binden die vorhandenen Antikörper der Kontrollen und der Patientenproben an der dsDNA der Mikrotiterplatte. Anschließend folgt die Hinzugabe von jeweils 100 μ l Enzymkonjugat. Während der 15 Minuten Inkubationszeit bindet das Enzymkonjugat an die Antigen-Antikörperkomplexe. Nach Entleeren und nochmals

drei Waschvorgängen wird als Substrat für das vorher hinzugefügte Enzym 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin hinzugefügt und nochmals 15 Minuten inkubiert. Es entsteht ein blaue-färbtes Produkt. Als nächster Schritt sorgt eine Säure als Stoplösung für eine Gelbfärbung. Nach 5 Minuten kann die optische Dichte bei 450nm gemessen werden. Die Intensität der Gelbfärbung korreliert mit der Konzentration der Antigen-Antikörper-Komplexe und folglich mit der dsDNA-Antikörper Konzentration in der Probe bzw. den Kontrollen.

2.2.2 Klinische Definition der Lupus-Like-Disease

Zur Beurteilung des klinischen Lupus Syndroms durch TNF-alpha-Inhibitor-Therapie wurden als Orientierung die ACR-Kriterien herangezogen. Hierzu zählen immunologische Auffälligkeiten wie Antinukleäre Antikörper und dsDNA-Antikörper, Anti-Sm-Antikörper und Antiphospholipidantikörper. Anämien, Leukopenien und Thrombozytopenien können als hämatologische Störungen ebenfalls Manifestationen eines SLE sein. Auswirkungen auf das Nervensystem können zu Psychosen, Krampfanfällen und Neuropathien führen. Bei 70% der SLE-Patienten tritt eine Nierenbeteiligung ein, die sich klinisch als nephrotisches Syndrom mit Ödemen und renalem Hochdruck zeigt und in eine Niereninsuffizienz münden kann. Maßgeblich für die Diagnosestellung gemäß ACR-Kriterien ist hier eine Proteinurie von über 0,5g/Tag oder eine Zylindrurie.

Die Hautbeteiligung beim SLE umfasst das typische Schmetterlingserythem, diskoiden Ausschlag und orale oder nasopharyngeale Ulzerationen. Eine diese Erscheinungen auslösende oder verstärkende Photosensitivität ist charakteristisch. Weitere Kriterien sind das Auftreten von Serositiden wie Perikarditis oder Pleuritis und von Arthritiden, die 2 oder mehr Gelenke betreffen und sich im Röntgenbild als nicht destruierend darstellen.

Für unsere Studie waren vor allem Hautbeteiligung und Arthritiden bedeutend. Ausschlaggebend für die Bewertung eines Symptoms als Ausdruck eines Lupus ähnlichen Syndroms war der zeitliche Zusammenhang zwischen der Einnahme/Gabe des TNF-alpha-Blockers und dem Auftreten der Symptomatik. Es wurden folglich nur solche Arthritiden als Lupus Syndrom gewertet, die sich 1) nach Therapie mit einem TNF-alpha-Inhibitor erstmals manifestierten oder exazerbierten und die 2) im zeitlichen Zusammenhang mit einer neu nachgewiesenen Lupus-typischen Serologie auftraten.

ACR-Kriterium	
1	Schmetterlingserythem
2	Diskoider Ausschlag
3	Photosensitivität
4	Orale oder nasopharyngeale Ulzerationen
5	Arthritis
6	Serositis
7	Renale Manifestationen
8	Neurologische Manifestationen
9	Hämatologische Manifestationen
10	Immunologische Auffälligkeiten wie ds-DNA-Antikörper, Sm-Antikörper oder Antiphospholipid-Antikörper
11	Antinukleäre Antikörper

Tabelle 1: ACR-Kriterien des Systemischen Lupus Erythematoses aus dem Jahre 1997

2.2.3 Interferon-Signaturen

Zur Erfassung immunbiologischer Marker vor und nach der Therapie mit TNF-alpha-Inhibitoren wurden in den Wochen 0, 2, 6, 26, 52, 78 und 104 PaxGene- und EDTA-Röhrchen gesammelt. Wir ermittelten die verfügbaren Proben der Patienten, die eine Lupus-like-Disease entwickelt hatten und bestimmten Kontrollpatienten nach Alter, Geschlecht, Grunderkrankung und TNF-Präparat. Grundvoraussetzung war eine verfügbare Probe zu Woche 0 und das Vorhandensein von mindestens 3 Proben aus der Nachbeobachtungsphase.

Um die Interferonabhängigkeit der Lupus-like-Disease zu ermitteln, wählten wir 6 Interferon-induzierte Gene aus. Die Auswahl trafen wir basierend auf einem Paper von Lübbbers et al. aus dem Jahre 2013, in dem die Nützlichkeit der Interferonsignatur als Biomarker für präklinische Arthritis untersucht wurde. Sie untersuchten die Marker IFI44L, IFI6, IFIT1, MXA, OAS3, RSAD2 and EPSTI.

Wir orientierten uns an dieser Auswahl und entschieden uns für die Untersuchung von IFI44L, IFI6, IFIT1, MXA, OAS3, und RSAD2. Als Referenzgen wurde ACTB herangezogen.

2.2.3.1 Isolation der RNA

Aus den EDTA-Röhrchen isolierten wir totale RNA unter zu Hilfenahme von Invitrogen Ambion® sample preparation Kits. Hierfür wird die Probe für 5 Minute mit PBS gewaschen und die Zellen so lysiert. Hierbei kommt es zur Freisetzung von RNA. Im gleichen Schritt wird durch Zugabe von DNase freigewordene DNA abgebaut. Durch Zugabe einer Stopp-Lösung wird die Lyse beendet (Thermo Fisher Scientific 2014).

2.2.3.2 cDNA Synthese

Aus der gewonnenen RNA synthetisierten wir mithilfe von Invitrogen VILO Kits die zugehörige cDNA. Für jeden Probenansatz wurden 4µl 5X VILO™ Reaction Mix (enthält Random Primer, MgCl₂ und dNTPs in einer Pufferlösung), 2µl 10X SuperScript Enzyme Mix (enthält Reverse Transkriptase, Rekombinanten Ribonuklease Inhibitor und ein eigenes Helferprotein), 20µl DEPC-behandeltes Wasser mit RNA in einem Reagenzglas auf Eis zusammengefügt, anschließend vermischt und für 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Die Primer lagern sich dem RNA-Strang an. Es erfolgt eine Inkubation bei 42°C für 60 Minuten, hier liegt das Temperaturoptimum der Reversen Transkriptase, sie erstellt beginnend bei den Primern einen zur RNA komplementären cDNA-Strang. Anschließend erfolgt eine 5-minütige Inkubation bei 85°C, diese inaktiviert die Reverse Transkriptase (Thermo Fisher Scientific 2015).

2.2.3.3 quantitative Real-Time PCR

Zur Bestimmung der Expressionslevel unserer Zielgene führten wir eine quantitative Real-Time PCR durch. Hierfür nutzten wir das Vii7® Real-Time PCR System der Firma Life Technologies / Applied Biosystem™ und bewerteten die Expressionslevel relativ zu Beta-Aktin mittels der sogenannten „Standard Curve“ Methode.

Durch die PCR kann die im vorherigen Schritt gewonnene cDNA vervielfältigt werden. Hierfür erfolgt zunächst ein Erhitzen auf 94-96°C, wodurch die Doppelstränge voneinander getrennt werden. Durch die Hitze werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Strängen aufgebrochen, dies ist die sogenannte Denaturierung.

Danach erfolgt eine Inkubation für 30 Sekunden bei der Temperatur, die je nach gewähltem Primer 5-10°C unter dessen Schmelzpunkt liegt und eine optimale Anlagerung der Primer an die Einzelstränge ermöglicht. Anschließend komplettiert die DNA-Polymerase den zum Original komplementären Strang beginnend am 3' Ende des Primers. Die Länge dieses Schrittes ist abhängig von der gewählten DNA-Polymerase.

Zur Quantifizierung wurde dem Probenansatz eine TaqMan-Sonde beigefügt, diese besteht aus einem Reporter-Fluoreszenz-Farbstoff und einem Quencher. Der Quencher unterdrückt bei intakter TaqMan-Sonde die Fluoreszenz des Reporters durch strahlungsfreie Energieübertragung (FRET). In diesem Zustand hybridisiert sich die Sonde mit dem komplementären DNA-Strang. Die Taq-Polymerase, die 5'3'Exonukleaseaktivität besitzt, baut die Sonde am 5'-Ende ab, wodurch sich Quencher und Reporter voneinander entfernen und die Fluoreszenz des Reporters sichtbar und messbar wird.

Man kann die Phasen der Amplifikation der PCR in drei Phasen unterteilen. In der ersten und dritten Phase sind die Kopien nur suboptimal quantifizierbar. Eine Quantifizierung ist nur in der zweiten, exponentiellen Phase möglich. Um in der exponentiellen Phase zu messen, bestimmten wir den CT (Cycle threshold)-Wert, an dem die Fluoreszenz das erste Mal signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt.

Verglichen wurde die Anzahl der Kopien mit Beta-Aktin als Referenzgen, dessen Expressionslevel sich durch Änderung der Rahmenbedingungen nicht verändern (Holzapfel und Wickert 2007).

Zur Verdeutlichung der Ergebnisse ermittelten wir einen ISG (Interferon stimulated genes)-Score, indem wir die Mittelwerte der relativen Expression der einzelnen Gene bestimmten.

3 Ergebnisse

3.1 Kohorte A (prospektive Beobachtungskohorte unter TNF-Inhibitor-Therapie)

Die Ausgangskohorte A umfasste 223 Patienten mit den Grunderkrankungen Rheumatoide Arthritis (30,49%), Morbus Crohn (21,97%), Spondylitis Ankylosans (17,49%), Psoriasis Arthritis (12,56%) Colitis Ulcerosa (15,69%) und Juvenile idiopathische Arthritis (1,8%). Die Behandlung der 223 Patienten erfolgte zu 45,9% mit Infliximab, zu 28,4% mit Etanercept, zu 20,3% mit Adalimumab, zu 5% mit Certolizumab pegol und zu 0,5% mit Golimumab. Das Alter rangierte zwischen 20 und 89 Jahren, das durchschnittliche Alter lag bei 49 Jahren.

3.2 Kohorte B (Lupus-like-Disease-Kohorte)

Unter TNF-alpha Inhibitor Therapie wurde bei 37 Patienten eine erhöhte dsDNA-Antikörperkonzentration, bei fünf dieser Patienten zudem eine klinische Lupus-like-Disease festgestellt. Fünf Patienten waren nicht erreichbar und konnten somit nicht in diese Arbeit einbezogen werden. Wir inkludierten eine Patientin, die unter Infliximab eine klinisch relevante Lupus-like-Disease entwickelte, deren Behandlung aber erst nach Abschluss der Studie von Winkelmann et al. begann, sodass sich die Fallzahl der Kohorte B auf 33 Patienten beläuft. Von diesen 33 Patienten litten 55% unter Morbus Crohn, 24% unter Colitis Ulcerosa, 9% unter Spondylitis Ankylosans und jeweils 6% unter Rheumatoider Arthritis und Psoriasisarthritis (vgl. Abbildung 1).

Von den 33 Patienten mit Lupus-like Disease erhielten 84,8% Infliximab, 9,1% Adalimumab und 6,1% Etanercept (vgl. Abbildung 2). Hier wurde bei Patienten, die im Verlauf mit verschiedenen TNF-Inhibitoren behandelt wurden, jeweils das Präparat gewertet, das beim Auftreten der Lupus-like-Disease verabreicht wurde.

#	♀♂	Alter	Diagnose	TNF-Blocker	Komedikation	Symptome
1	♂	27	MC	Infliximab	Keine	keine
2	♀	43	CU	Infliximab	Prednisolon	Arthritis
3	♀	31	CU	Infliximab	Keine	keine
4	♀	51	MC	Infliximab	Keine	keine
5	♀	18	CU	Infliximab	Keine	keine
6	♂	37	MC	Infliximab	Keine	keine
7	♀	43	SpA	Infliximab	Keine	keine
8	♀	33	PsA	Infliximab	Keine	keine
9	♂	65	MC	Infliximab	Keine	keine
10	♀	47	MC	Infliximab	Keine	keine
11	♂	37	SpA	Infliximab	MTX	keine
12	♂	48	MC	Infliximab	Keine	keine
13	♀	43	MC	Infliximab	Keine	keine
14	♂	35	MC	Infliximab	Keine	keine
15	♀	26	MC	Infliximab	Keine	keine
16	♀	73	RA	Etanercept	Keine	keine
17	♀	44	MC	Adalimumab	Keine	keine
18	♀	48	MC	Infliximab	Keine	keine
19	♂	44	MC	Infliximab	Keine	keine
20	♂	41	MC	Infliximab	Keine	keine
21	♂	45	SpA	Infliximab	Keine	keine
22	♀	31	CU	Infliximab	Keine	keine
23	♀	29	MC	Adalimumab	Keine	keine
24	♀	32	CU	Infliximab	Keine	Arthritis Morgensteifigkeit
25	♀	53	PsA	Infliximab	MTX	Keine
26	♀	24	MC	Infliximab	Keine	Arthritis Morgensteifigkeit
27	♀	36	CU	Infliximab	Keine	erst später: Arthralgien
28	♀	20	CU	Adalimumab	Keine	Arthralgie
29	♀	83	RA	Etanercept	Keine	keine
30	♀	46	MC	Infliximab	Keine	keine
31	♀	47	MC	Infliximab	Keine	keine
32	♀	53	MC	Adalimumab	Keine	Arthritis
33	♀	21	CU	Infliximab	Keine	Arthritis

Tabelle 2: Demographische und klinische Merkmale der Lupus-like-Disease-Kohorte. MC=Morbus Crohn, CU=Colitis ulcerosa, RA=Rheumatoide Arthritis, PsA=Psoriasisarthritis, SpA=Spondylitis ankylosans; MTX=Methotrexat

Sechs Patienten zeigten eine klinische Symptomatik. Diese äußerte sich in arthritischen (3), arthralgischen (1), und arthritischen Beschwerden verbunden mit Morgensteifigkeit (2). Alle betroffenen Patienten waren weiblichen Geschlechts mit einer CED als Grunderkrankung (4 Patientinnen mit Morbus Crohn, 2 mit Colitis ulcerosa). 4 Patientinnen wurden mit Infliximab, 2 mit Adalimumab behandelt. Das Alter lag zwischen 20 und 53 Jahren.

Bei allen Patienten konnte durch ein Absetzen des TNF-Inhibitors und zusätzliche Therapie mit Kortikosteroiden eine Remission der Symptomatik erzielt werden. Eine Reexposition mit einem alternativen TNF-Inhibitor erfolgte in fünf Fällen. Bei 3 Patientinnen erfolgte die Umstellung auf Golimumab und bei 2 Patientinnen die Umstellung auf Certolizumab pegol.

Eine 36-jährige Patientin der Kohorte B entwickelte im Verlauf des Follow-ups eine klinische Symptomatik im Sinne von Arthralgien. Es erfolgte die Diagnosestellung Lupus-like-Disease unter Infliximab-Therapie und die Umstellung auf den TNF-Inhibitor Adalimumab.

Tabelle 3 zeigt die serologischen Marker der Patienten mit serologischer oder klinischer LLD. Die laufenden Nummern aus Tabelle 2 und Tabelle 3 stimmen überein, sodass in Tabelle 2 unter #1 die demographischen Daten des Patienten #1 aus Tabelle 3 ersichtlich sind.

Prinzipiell verbergen sich hinter den abgefallenen Werten die Patienten, deren Anti-TNF-Therapie abgesetzt oder umgestellt wurde. Der Einfluss der Therapie wird noch einmal detailliert dargestellt in den Abbildungen 4, 5 und 6.

#	ANA (1)	ANA (2)	dsDNA (1)	dsDNA (2)	Therapie- Umstellung?
1	320	*	80,5	72,8	Nein
2	2560	1280	43,7	14	ja
3	640	160	28,5	37,3	Nein
4	1280	5120	64	30,7	Nein
5	160	Negativ	22	12,7	Ja
6	160	1280	20,6	49,2	Nein
7	640	5120	20	15,3	Nein
8	20480	640	41	15	Ja
9	5120	1280	24,9	16,6	Nein
10	160	2560	21	28,6	Nein
11	640	*	53,4	9,5	Ja
12	*	5120	26,4	67,4	Ja
13	1280	1280	21,1	10,2	Nein
14	160	320	29,5	50,2	Ja
15	*	Grenzwertig	29,5	12,1	Ja
16	320	320	20,8	19,6	Nein
17	1280	640	82,3	31	Ja
18	320	320	20,1	21,9	Nein
19	*	320	20,1	9,4	Ja
20	1280	640	20,1	28,3	Nein
21	160	320	27,6	38,7	Nein
22	320	320	23,8	9,9	Ja
23	10240	1280	36,5	8,6	Ja
24	1280	Grenzwertig	25,4	8,1	Ja
25	320	10240	26,7	28,8	Nein
26	2560	Negativ	88,7	17,9	Ja
27	320	5120	32,3	31,7	Nein**
28	10240	1280	37	14,9	Ja
29	Grenzwertig	320	26,5	10,1	Nein
30	320	640	26,3	28,6	Nein
31	10240	5120	32,7	30,6	Nein
32	1280	160	21,2	5,7	Ja
33	5120	2560	37,8	11,7	Ja

Tabelle 3: Serologische Parameter der Lupus-like-Disease Kohorte.

Zeitpunkt (1)=Diagnosestellung der Lupus-like-Disease;

Zeitpunkt (2)=mindestens 1 Jahr nach Diagnosestellung der Lupus-like-Disease

* kein Wert bestimmt

** Patientin entwickelte im Verlauf klinische LLD, daraufhin erfolgte eine Umstellung (zeitlich nach diesen serologischen Werten)

3.3 Vergleich Kohorte A und B

Während die Geschlechterverteilung der Ausgangskohorte mit 47,5% männlichen Patienten und 52,5% weiblichen Patienten relativ ausgeglichen ist, sind nur 27,3% der Lupus Syndrom Kohorte männlichen und 72,7% weiblichen Geschlechts. Die Patienten mit klinisch relevanter Lupus-like-Disease waren zu 100% weiblich. Das durchschnittliche Alter lag in Kohorte A bei 47 Jahren und in Kohorte B bei 41 Jahren.

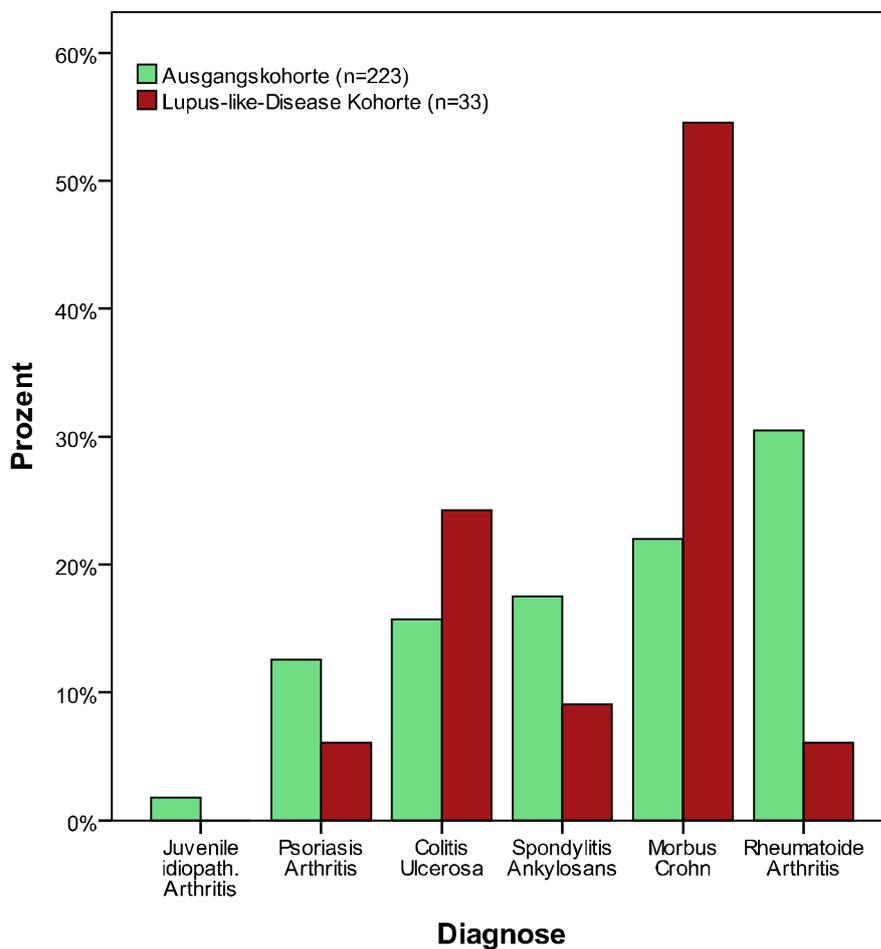


Abbildung 2: relative Häufigkeit der therapiebegründenden Diagnose in der Ausgangskohorte und in der Lupus-like-Disease Kohorte

In der Kohorte B nimmt das Verhältnis von CED und Rheumatischen Erkrankungen zugunsten der CEDs zu. Ebenso ist der Prozentsatz der mit Infliximab behandelten Patienten in Kohorte B höher als in Kohorte A.

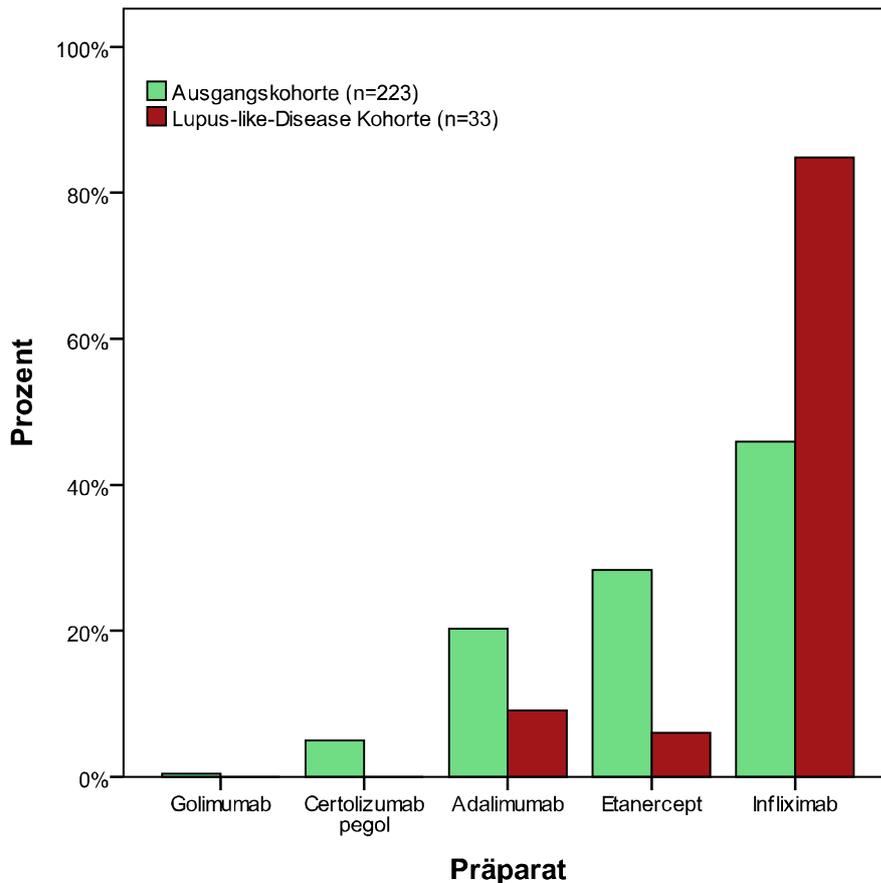


Abbildung 3: relative Häufigkeit der TNF-alpha-Inhibitor-Präparate in Kohorte A (Ausgangskohorte) und der Kohorte B (Lupus-like-Disease Kohorte)

3.4 Verlauf der Serologie

3.4.1 ANA-Antikörper

Den Verlauf der ANA-Titer betrachteten wir hauptsächlich abhängig von einer vorgenommenen Beendigung der TNF-Inhibitor-Therapie. Der mediane Wert der ANA-Titer zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Lupus-ähnliche Erkrankung betrug 1:640. Bei der Kohorte ohne Therapiebeendigung lag der Median bei 1:320 und stieg bis zum zweiten Beobachtungszeitpunkt auf 1:640 ($p=0,389$), während bei den Patienten, bei denen die Therapie umgestellt werden musste, der Median 1:1280 war und nach Therapieumstellung nur noch ein ANA-Titer von 1:640 gemessen wurde ($p=0,081$). Die Beobachtungszeiten variierten von 399 bis 1225 Tagen. Vergleicht man die Änderung der ANA-Titer in beiden Kohorten direkt ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,245$).

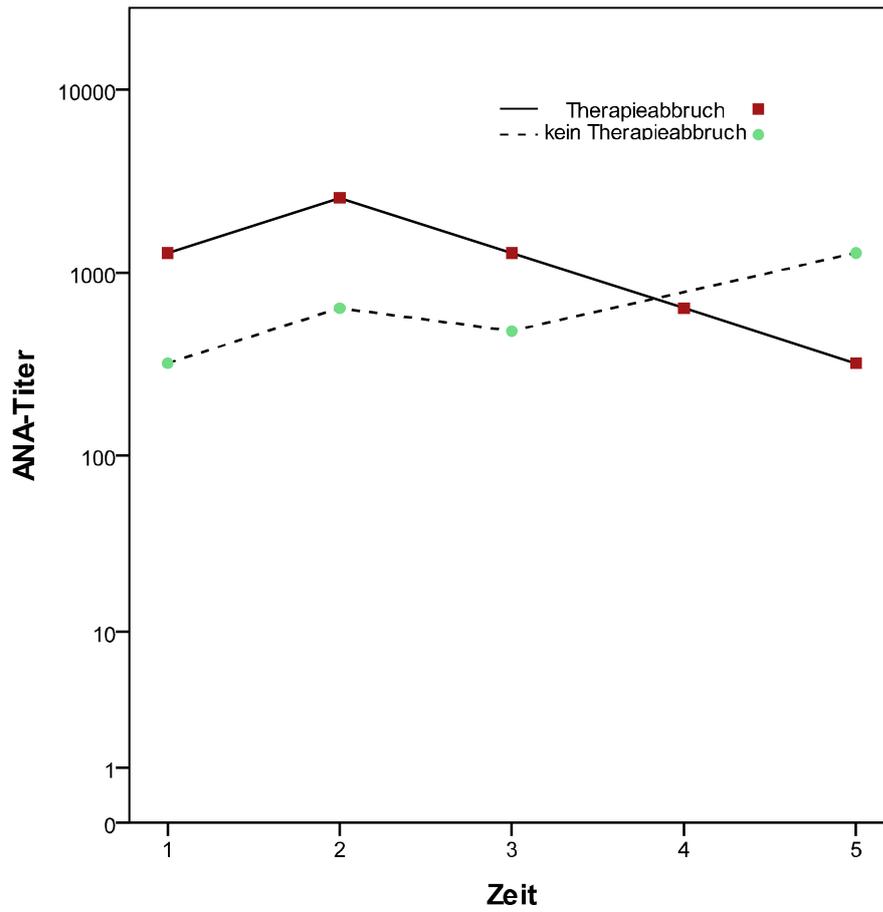


Abb. 4: Median der ANA-Titer über den gesamten Beobachtungszeitraum
 Zeitpunkt 1= Diagnosestellung der Lupus-like-Disease, Zeitpunkt 5=mindestens 1 Jahr nach
 Diagnosestellung der Lupus-like-Disease(Bereich: 399Tage bis 1271Tage nach Zeitpunkt 1)

3.4.2 dsDNA-Antikörper

Die dsDNA-Titer unserer Kohorte lagen zum Diagnosezeitpunkt Lupus-like-Disease bei 26,7 U/ml und nach 399 bis 1271 Tagen bei 17,9 U/ml. In der Subkohorte mit unveränderter Therapie stieg der dsDNA-Titer von 26,3 U/ml auf 28,6 U/ml ($p=0,953$). Patienten, bei denen eine Therapieumstellung vorgenommen wurde, wiesen zunächst einen dsDNA-Titer von 30,9 U/ml (Median) auf. Dieser sank nach Umstellung auf 12,4 U/ml ($p=0,006$). Vergleicht man die Änderungen der dsDNA-Titer der beiden Kohorten, ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,049$).

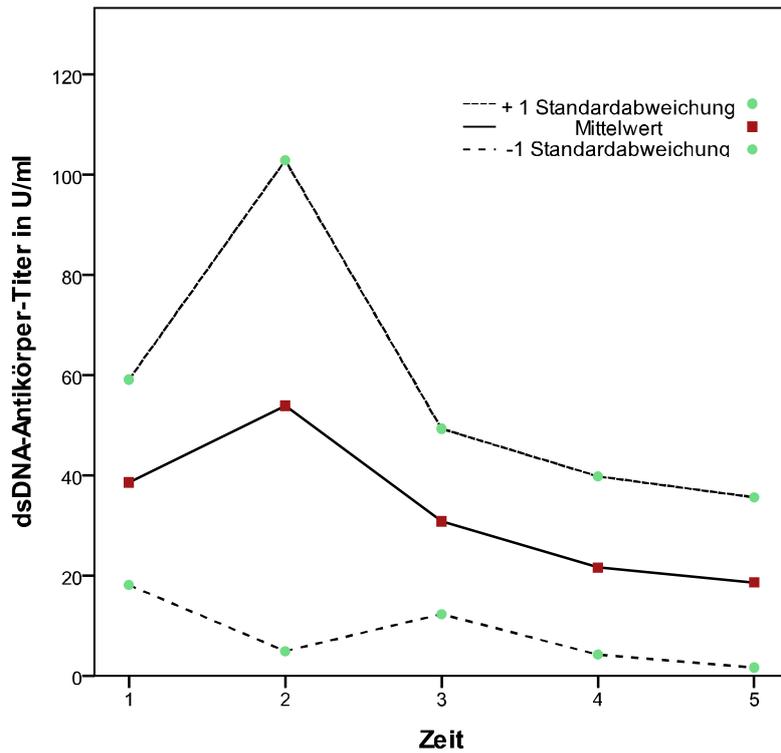


Abbildung 5: Verlauf des dsDNA-Antikörper-Titers bei Absetzen des TNF-Inhibitors. Zeitpunkt 1: Diagnosestellung Lupus-like-Disease, Zeitpunkt 5: mindestens 1 Jahr nach Diagnosestellung Lupus-like-Disease (Bereich: 440 Tage bis 1271 Tage nach Zeitpunkt 1)

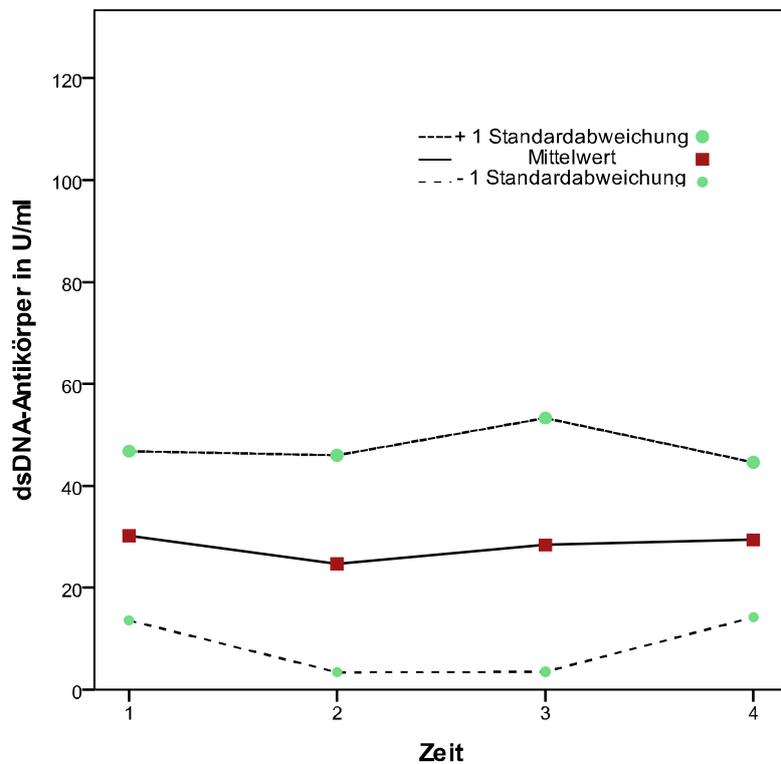


Abbildung 6: Verlauf des dsDNA-Antikörper-Titers ohne Absetzen des TNF-Inhibitors. Zeitpunkt 1: Diagnosestellung Lupus-like-Disease, Zeitpunkt 5: mindestens 1 Jahr nach Diagnosestellung Lupus-like-Disease (Bereich: 440Tage bis 1271Tage nach Zeitpunkt 1)

3.4 Interferonsignaturen

Für die Untersuchung der Interferonsignaturen standen Proben von 8 Patienten der Lupus-like-Disease Kohorte zur Verfügung (zwingend zu Zeitpunkt 0 und mindestens 3 Nachfolgetermine). Zwei dieser Patienten hatten klinische Manifestationen gezeigt. Es fanden sich 10 Kontrollpatienten unter TNF-alpha-Inhibitortherapie, die keine Lupus-like-Disease entwickelt hatten und so ausgewählt wurden, dass sie in Geschlecht, Grunderkrankung, Alter und Präparat den Patienten mit Lupus-like-Disease möglichst gut vergleichbar waren. Ein Patient der Lupus-like-Disease Kohorte war männlich, 7 weiblich. Bei der Kontrollkohorte war ebenfalls ein Patient männlich.

5 Patienten der Lupus-like-Disease Kohorte wiesen als Grunderkrankung eine chronisch entzündliche Darmerkrankung auf (60,5%), 3 eine Erkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis (39,5%). Bei der Kontrollkohorte waren es 6 CED Patienten (60%) und 4 mit rheumatischen Erkrankungen (40%).

Das Alter der Patienten lag im Bereich von 24-76 Jahren (LLD) und 25-63 Jahren (Kontrollen).

Insgesamt wurden 93 Proben von 18 Patienten untersucht.

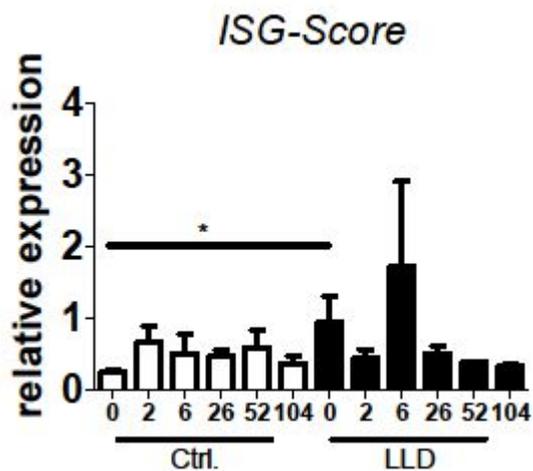


Abbildung 7: Relative Expression der 6 untersuchten Interferone an Woche 0, 2, 6, 26, 52 und 104. Vergleich zwischen Lupus-like-Disease Kohorte (LLD) und Kontrollkohorte (Ctrl.).
* = $p < 0,05$

Beim Vergleich der Interferonsignaturen beider Kohorten zeigte sich ein signifikanter Unterschied des Interferon-stimulated-Gene (ISG)-Scores bei Woche 0 ($p < 0,05$). Zu diesem Zeitpunkt war der ISG-Score der LLD-Kohorte höher als die der Kontrollkohorte. Auch bei Woche 6 zeigten sich deutliche Unterschiede, diese verfehlten aber das Signifikanzniveau.

Betrachtet man die einzelnen durch Interferon stimulierten Gene, lässt sich ebenfalls dieser Unterschied erkennen (siehe Abbildung 8). Zu den anderen Zeitpunkten ist kein signifikanter Unterschied erkennbar.

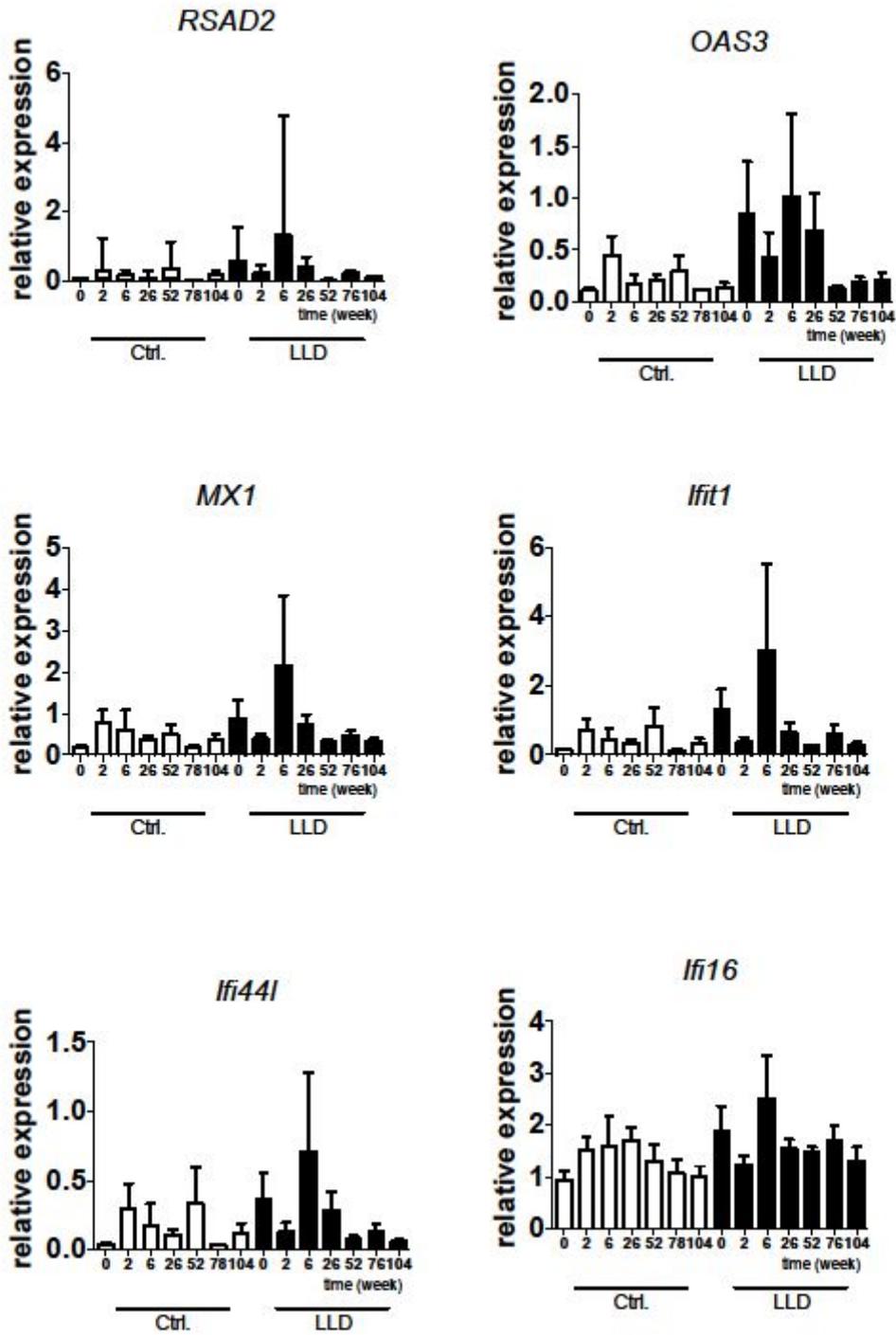


Abbildung 8: Relative Expression der 6 untersuchten Interferone an Woche 0, 2, 6, 26, 52 und 104, einzeln aufgeführt. Vergleich zwischen Lupus-like-Disease Kohorte (LLD) und Kontrollkohorte (Ctrl.). Auf die unterschiedliche Skalierung wird hingewiesen.

4 Diskussion

TNF-Inhibitoren haben in der Behandlung von entzündlichen Systemerkrankungen heute einen großen Stellenwert. Allein im Jahr 2010 in Deutschland wurden Substanzen aus dieser Medikamentengruppe 45.229 Mal verschrieben (Windt et al. 2011). Die Akzeptanz dieser neuen Therapieform zeigt sich auch in dem Interesse vieler Firmen, die mit Ablauf des Patents der Originalpräparate in die Entwicklung von sogenannten Biosimilars investieren. Von Infliximab gibt es bereits vier (Inflectra®, Renflexis®, Remsina®, Flixabi®) und von Etanercept zwei (Brenzys®, Erelzi®) dieser Präparate. TNF-Inhibitoren zählen mit jährlichen Therapiekosten von bis zu 25.000 US-Dollar (Bonafede et al. 2012) für die Pharmaunternehmen zu den 10 profitabelsten Medikamenten weltweit. Mit den neuen Biosimilars dürften die Kosten für eine Therapie nun jedoch sinken (Inflectra ist bereits 35% günstiger als das Originalpräparat Remicade).

Die TNF-Inhibitoren gelten als sehr sichere Medikamente. Auch die Lupus-like-Disease wird als seltene Nebenwirkung bezeichnet. Frühe Arbeiten aus den Jahren 2002-2005 hatten zunächst beschrieben, die Induktion von Autoantikörpern durch TNF-Inhibitor-Therapie führe hauptsächlich zu den kurzlebigen IgM-Antikörpern und sei nicht assoziiert mit klinisch relevanten Symptomen (Kruithof et al. 2002, Garcia-Planella et al. 2003, Ferraro-Peyret et al. 2004, Rycke et al. 2015). Hier wurde oft auf sehr kurze Beobachtungszeiträume (6 Wochen bei Garcia-Planella et al.) und kleine Stichprobenumfänge zurückgegriffen (19 Patienten bei Kruithof et al.). Eine französische, nationale Studie befragte alle Rheumatologen und Internisten des Landes nach dem Auftreten einer Lupus-like-Disease unter Anti-TNF-Therapie und beschrieb eine Inzidenz von 0,19% für Infliximab und 0,18% für Etanercept (Bandt et al. 2005). In den darauffolgenden Jahren gab es Arbeiten, die eine deutlich höhere Zahl ergaben. Bei einer prospektiven Studie von Beigel et al. trat eine milde, nicht interventionsbedürftige Lupus-like-Disease in 8,9% und eine ernste, zum Abbruch der TNF-Inhibitortherapie führende Lupus-like-Disease in 1,1% der Fälle auf.

Die prospektiv untersuchte Kohorte im Exzellenzzentrum Entzündungsmedizin Kiel, die dieser Arbeit zugrunde liegt, ergab ein Risiko von 2% für das Auftreten einer interventionswürdigen Lupus-like-Disease unter TNF-Inhibitor-Therapie und bewegt sich somit in einer ähnlichen Größenordnung wie sie von Beigel et al mitgeteilt wurde.

Eine britische Registerarbeit aus dem Jahr 2017 hingegen ergab eine Inzidenz von lediglich 10 pro 10.000 Patientenjahre für die TNF-Inhibitor induzierte Lupus-like-Disease (Jani et al. 2017). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz liegt in den unterschiedlichen Studien-

designs. Während es sich bei unserer und der Arbeit von Beigel um prospektive Studien handelt, die eine Kohorte innerhalb eines Zentrums kontinuierlich beobachtet, werden bei Jani et al. nur die gemeldeten Fälle einer Lupus-like-Disease beachtet. Es ist anzunehmen, dass die Dunkelziffer größer ist, da nicht alle Fälle einer Lupus-like-Disease erkannt und/oder gemeldet werden. Ein ähnliches Problem birgt die Übersicht von Ramos-Casals et al. 2007, die eine Analyse von 223 innerhalb von 16 Jahren publizierter Fälle vornimmt. Daraus errechnet sich eine Inzidenz von 2/10.000 Patienten. Diese Zahl liegt etwa um den Faktor 100 niedriger als bei unserer Untersuchung. Auch hier ist davon auszugehen, dass nicht alle klinischen Fälle zur Publikation kommen (Winkelmann 2016).

Betrachten wir nur Infliximab, trat die Lupus-like-Disease in unserer Kohorte innerhalb von 2 Jahren sogar in 5% der Fälle auf. Auf ein Jahr gerechnet entspricht dies 2,5 %. Die Prävalenz des primären Systemischen Lupus Erythematoses liegt bei 5-10 Personen pro 100.000 Einwohner, also bei 0,005-0,010%. Die Inzidenz der Lupus-like-Disease liegt somit pro Jahr unter Infliximab-Therapie 250-500 mal höher als die Inzidenz des primären SLE.

Eine serologische Lupus-like-Disease trat sogar bei 28% der mit Infliximab behandelten Patienten auf. Die Tatsache, dass mehr als jeder 4. mit Infliximab Behandelte normalerweise nicht zu beobachtende Autoantikörper entwickelt, wirft u.a. die Frage auf, ob die Messkriterien zu sensitiv eingestellt waren.

Wir legten den Grenzwert für einen auffälligen ANA-Titer mit 1:320 fest, dies geschah in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Ringversuchen, in denen der Anteil der gesunden Bevölkerung, die einen solchen ANA-Titer aufwiesen, bei nur 3,3% lag. Niedrigere Titer erwiesen sich hingegen als ungeeignet. So war der Anteil von gesunden Probanden mit positivem Ergebnis bei einer Verdünnungsstufe von 1:40 bei 31,7% nicht mehr trennscharf (Tan et al. 1997). Der in dieser Untersuchung gewählte Grenzwert ist demnach berechtigt und führt zu aussagekräftigen Ergebnissen. Bei einer Untersuchung von gesunden Blutspendern zeigte sich in keinem einzigen Fall erhöhte dsDNA-Antikörper-Titer (Azizah et al. 1996), weshalb der hier gewählte Grenzwert von 20 U/ml eine hohe Sensitivität besitzt und die erhöhten Titer als Effekt der TNF-Inhibitor-Therapie zu werten sind. Auch in unserer Ausgangskohorte wies keiner der eingeschlossenen Patienten vor Einleitung der TNF-Inhibitor-Therapie eine dsDNA-Antikörperkonzentration im pathologischen Bereich auf.

Einige frühere Arbeiten beschrieben hohe Antikörper-Titer, bestimmten allerdings nur Antikörper vom IgM-Typ (Rycke et al. 2005). IgM-Antikörper sind in der Immun- und Infekterologie häufig unspezifisch und können für falsch hohe Werte sorgen (Landry 2016).

Wir untersuchten in dieser Arbeit jedoch nur IgG-Antikörper. Für die Bildung von IgG Antikörpern ist eine gereifte, T-Zellvermittelte spezifische Immunantwort Voraussetzung.

Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass auch IgG-Antikörper nicht von allen Testsystemen gleichsam detektiert werden. Eine Arbeit von Charles et al. , die allerdings ausschließlich an Patienten mit Rheumatoider Arthritis vorgenommen wurde, verwendete drei verschiedene Messmethoden für dsDNA-Antikörper und zeigte so auf, dass die Messdaten je nach Methode stark variierten. Von 22 Patienten mit durch die Anti-TNF-Therapie erhöhten dsDNA-Antikörper-Titern hatte nur ein Patient IgG-Antikörper aufzuweisen (Charles et al. 2000).

Desweiteren könnte man unterstellen, dass die Induktion von Antikörpern gegen Zellkernmaterial keiner spezifischen SLE-ähnlichen Immunreaktion entspricht, sondern Teil einer unspezifischen Hochregulierung des Immunsystems ist. Dies halten wir für wenig wahrscheinlich, da in der Charakterisierung der Ausgangskohorte systematisch ANCA als Kontroll-Antikörper bestimmt wurden (Winkelmann 2016). Diese veränderten sich durch die TNF-Inhibitor-Medikation nicht, was gegen eine allgemeine, unspezifische Immunstimulation spricht.

Zusammenfassend bestehen wenig Zweifel, dass es sich tatsächlich um immunologische Effekte handelt, die zur Entstehung einer Lupus-like-Disease führen. In der Mehrzahl der Fälle ist dieser allerdings nur in einer Serokonversion zu erkennen, in der Minderheit der Fälle kommt es zusätzlich zu einer klinischen Symptomatik.

Diese Einschätzungen der Lupus-Like-Disease, die auf der medizinischen Literatur und unserer Ausgangsstudie an 223 Patienten beruhen, haben sich bei der Beobachtung der Lupus-Like-Disease Kohorte über zusätzliche 2 Jahre, auf die diese Arbeit besonderes Augenmerk legt, bestätigt.

Tritt eine klinisch relevante Lupus-like-Disease auf, sistiert die Symptomatik nach Beendigung der TNF-alpha-Blockergabe und zusätzlicher Therapie durch Kortikosteroide.

Gleichsinnig verhalten sich die serologischen Marker. Sowohl die dsDNA-Antikörper-Titer als auch die ANAs sinken. Auch wenn dieses Resultat bei den ANAs die statistische Signifikanz knapp verfehlt ($p=0,081$) sehen wir im Verlauf der ANA-Titer (Abb. 4) einen klinisch plausiblen Trend.

Ebenfalls in diesem Sinne lässt sich die Beobachtung deuten, dass bei fortgeführter TNF-Inhibitor-Therapie die Antikörper nicht abfallen. Wie in den Abbildungen 4 und 5b zu sehen,

geht die Persistenz des Stimulus - also der TNF-Inhibitor-Therapie – mit einem Anstieg der ANA-Titer und konstant erhöhten dsDNA-Antikörper-Titer einher.

Zusammenfassend bestätigt diese hier vorgelegte Langzeitbeobachtung einer serologischen Lupus-Like-Disease unter fortgesetzter Therapie, dass die Assoziation zwischen dem Nachweis Lupus-spezifischer Antikörper und der klinischen Symptomatik insgesamt schwach ausgeprägt ist, wie auch von Wetter und Davis beschrieben worden ist. Dies unterstreicht das Dilemma des Klinikers, die Wertigkeit dieser Serologie zu interpretieren.

Im Vergleich der beiden Antikörper scheinen dsDNA-Antikörper die größere klinische Aussagekraft zu besitzen.

Die schwache Korrelation zwischen Serologie und Klinik beinhaltet auch, dass unter fortgesetzter Therapie die Serologie fortbesteht oder ansteigen kann, ohne zu einer klinischen Symptomatik zu führen.

Dies bestätigen auch Rycke et al. 2005 et al. In ihrer Arbeit aus dem Jahr 2005 beschreiben sie einen Anstieg der ANAs und dsDNA-Antikörper bei 49,2% der RA-Patienten und 70,6% der SpA-Patienten nach einem Jahr, dem im zweiten Jahr der Beobachtung jedoch kein weiterer Antikörperanstieg folgt.

Die häufigste und entscheidende Manifestation einer Lupus-like-Disease ist eine Arthritis/Arthralgie kleiner und großer Gelenke. Betrachtet man die Inzidenz, ist diese ungefähr so häufig wie die polyartikuläre Variante der CED-assoziierten Arthritis vom Typ II (Orchard et al. 1998). Das Vorkommen liegt für eine gegebene CED-Patientenkohorte bei ca. 1% pro Jahr. Da die Lupus-like-Disease vor allem Patienten mit CED betrifft, ist die CED-Arthritis zugleich eine wichtige Differentialdiagnose zur Lupus-like-Disease. Von Bedeutung ist hier, auf den zeitlichen Zusammenhang zur TNF-Inhibitor-Gabe und das Auftreten von Antikörpern zu achten.

Obwohl das Phänomen Lupus-like-Disease schon seit circa 15 Jahren lange bekannt ist, sind die zu Grunde liegenden Mechanismen noch nicht hinreichend verstanden.

Die These, dass es im Rahmen der anti-TNF-Behandlung zu einer unspezifischen Hochregulierung des Immunsystems kommt, haben wir wie bereits erwähnt, mit der Bestimmung eines Kontrollantikörpers weitgehend widerlegt.

Eine andere Hypothese zur Entstehung der Lupus-like-Disease ist die Einleitung der Apoptose durch Bindung der TNF-Inhibitoren an membrangebundenes TNF, welche zur Freisetzung von Zellkernmaterial führt. Dieses ist auf diese Weise für das Immunsystem besser zugänglich und ermöglicht die Bildung von Antikörpern gegen beispielsweise dsDNA.

Diese Hypothese wird durch in vitro Versuche gestützt, denen zufolge monoklonale Antikörper wie Infliximab und Adalimumab höhere Apoptoseraten induzieren als Etanercept. Studien zeigen hierzu passend eine erhöhte Induktion von dsDNA-Antikörpern durch Infliximab und Adalimumab verglichen mit Etanercept (Moulis et al. 2014; Rycke et al. 2005). Auch in der hier vorgelegten Studie ergab sich kein Fall einer Lupus-like-Disease unter Etanercept. Die unterschiedliche Apoptoserate der verschiedenen TNF Präparate wird darauf zurückgeführt, dass Infliximab und Adalimumab intakte Antikörper mit aktivem Fc-Teil sind, wohingegen Etanercept ein nicht aktives Fc-Teil enthält und damit FC-vermittelte Aktivierungen z.B. von Makrophagen nicht induzieren kann.

Bereits frühere Studien hatten gezeigt, dass Certolizumab, bei dem das Fc Teil durch ein Polyethylenglykol ersetzt wurde, ebenfalls ein geringeres Potenzial zur Induktion von Autoantikörpern und der Lupus-like-Disease aufweist (Verma et al. 2011). Dies bestätigte sich in der vorliegenden Untersuchung. Kein Patient der Ausgangskohorte entwickelte Serologie oder Klinik unter Certolizumab (Winkelmann 2016).

Auch in der publizierten Literatur sind die Lupus-like-Disease Fälle unter Etanercept und Certolizumab rar.

Ein dritter Ansatz versucht, die Entstehung der Lupus-like-Disease über die Hochregulierung von Interferonen zu erklären. Dies ist zum einen mit der These vereinbar, dass die Freisetzung nukleärer Antigene zu einer Immunreaktion führen - die mit einer Interferonausschüttung einhergeht. Zudem ist der systemische Lupus erythematoses durch hohe Interferon (IFN)-alpha Level charakterisiert. Der Interferon regulatory factor 5 (IRF5) und der Interferon regulatory factor 7 (IRF7) induzieren die Transkription von Interferon-alpha und anderen Zytokinen und scheinen so eine wichtige Rolle bei der Entstehung des SLE zu spielen (Cham et al. 2012; Sweeney 2011).

Dieser zunehmend gut bekannte Zusammenhang zwischen dem endogenen Lupus und einer Interferon-alpha Signatur veranlasste auch uns, die Interferonaktivität von Patienten mit Lupus-like-Disease und entsprechenden Kontrollpatienten zu vergleichen. Wir untersuchten sechs interferoninduzierte Gene und ein Referenz-Gen bei 2 Patienten mit klinischer Lupus like Disease, 6 Patienten mit serologischer Lupus like Disease und 10 Kontrollen, um dieser Hypothese nachzugehen. Die Messungen erfolgten jeweils vor TNF-alpha-Inhibitor-Gabe und zu verschiedenen Zeitpunkten danach.

Hier ergab sich, dass der Interferon-Score der Lupus-like-Disease Patienten zum Zeitpunkt null signifikant höher waren als die der Kontrollkohorte. Deutliche, aber das Signifikanzniveau unterschreitende Unterschiede waren auch für Woche 6 zu beobachten.

Diese Ergebnisse wären durch Erhöhung der bei uns begrenzten Fallzahl und Erweiterung oder Veränderung der Auswahl an Interferon stimulierten Genen möglicherweise eindrucksvoller darstellbar. Dies wäre aber nur durch weitere Untersuchungen zu klären.

Insgesamt werten wir diese Daten noch nicht als sichere Bestätigung der Interferonhypothese im Zusammenhang mit der Entstehung der Lupus-like-Disease. Die signifikant höhere Interferonsignatur zum Zeitpunkt 0 könnte dafür sprechen, dass diese Gruppe bereits mit einer höheren Interferonaktivität in die Anti-TNF-alpha-Therapie einsteigt und somit für eine höhere Interferonproduktion prädisponiert ist. Diese Annahme wird aber – mit Ausnahme für Woche 6 - bei den nachfolgenden Messzeitpunkten nicht bestätigt, sodass bezogen auf die Interferonproduktion kein sicher erhöhtes Signal während der Anti-TNF-Therapie nachweisbar ist.

Vorläufig kann die Interferonhypothese demnach nicht bestätigt werden, dieses würde immerhin in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren stehen. Cantear et al. untersuchten 21 Patienten mit RA vor und nach Infliximabtherapie und bestimmten dsDNA-Antikörper, ANAs und 43 durch Interferone induzierbare Gene. Es ergab sich keine Korrelation zwischen Interferonsignatur und dsDNA-Antikörper und ANA-Titer.

Um herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen Interferonsignaturen und der Lupus-like-Disease besteht, müssten weitere Analysen in einem prospektiven Setting mit kontinuierlicher Datenerhebung erfolgen.

Insgesamt bestätigt die Langzeituntersuchung an dieser Studienkohorte klinischer und serologischer Lupus-Like-Disease eindrucksvoll den Zusammenhang mit der TNF-Inhibitor-Exposition. Ein Versuch, diesen molekularbiologisch mit der Induktion von Interferon-alpha zu erklären, konnte bislang nicht zu eindeutigen Ergebnissen führen.

5 Zusammenfassung

Inhalt dieser Arbeit ist die Lupus-like-Disease. Hierbei handelt es sich um eine Nebenwirkung der TNF-alpha-Inhibitor-Therapie, die im Einzelfall eine gravierende Beeinträchtigung der Patienten nach sich zieht und einen Therapieabbruch zur Folge hat.

Im vorliegenden Fall wird der Frage nachgegangen, ob die Lupus-like-Disease definitiv abklingt, wenn die TNF-alpha-Inhibitor-Therapie beendet wird und ob im Falle der serologischen Lupus-like-Disease eine Fortführung der Therapie vertretbar ist oder negative Folgen hat.

Material war eine Kohorte von 223 Patienten, die prospektiv über 3 Jahre untersucht wurde und von denen 33 Individuen die Voraussetzungen einer Lupus-like-Disease erfüllten. Das Vollbild mit klinischer Symptomatik, vorherrschend Gelenksbeschwerden, konnte bei fünf Patienten beobachtet werden. 28 weitere Patienten entwickelten mit ANA- und dsDNA-Antikörper-Titern die serologischen Merkmale einer Lupus-like-Disease.

Die klinische Symptomatik erforderte in allen fünf Fällen eine Beendigung oder Umstellung der TNF-Inhibitor-Therapie und zusätzlich die Einleitung einer Prednisolontherapie. Dies führte bei allen Patienten zu einer Ausheilung ohne Rezidiv im weiteren Verlauf.

In den Fällen der serologischen Lupus-like-Disease führte eine Beendigung der Therapie zu einem Rückgang der serologischen Merkmale. Im Falle einer Weiterführung der Therapie blieb das Phänomen weiterhin nachweisbar, zeigte aber keine zunehmende Tendenz.

Die Langzeitbeobachtung dieser gut definierten LLD-Kohorte über bis zu fünfzehn Jahre bestätigt eindrucksvoll, dass die TNF-Inhibitor-Therapie als ursächlich angesehen werden kann, weil ihre Fortführung auch die serologischen Merkmale aufrecht erhält, während die Unterbrechung zu einem Abklingen der serologischen und klinischen Auffälligkeiten führt. Das prospektive Setting sowie die lange Beobachtungsdauer sind als Besonderheit dieser Arbeit hervorzuheben.

Der experimentelle Teil dieser Arbeit ging der Frage nach der Entstehung der Lupus-like-Disease nach. Da der SLE heute als eine stark Interferon-getriebene Erkrankung gilt, prüften wir die Hypothese, dass ähnliche Vorgänge bei der Lupus-like-Disease eine Rolle spielen. Wir untersuchten die Expression sechs interferoninduzierter Gene bei Patienten mit Lupus-like-Disease und von Kontrollen vor TNF-Inhibitor-Therapie und im Verlauf. Hierbei ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten zum Zeitpunkt 0 und nach 6 Wochen. Bei den Lupus-like-Disease Patienten waren die Interferone in beiden Fällen hochreguliert.

Dies ist ein Hinweis darauf, dass es einen Unterschied der Interferonsignaturen bei Patienten mit Lupus-like-Disease zu den Kontrollen gibt. Die fehlende Konstanz der Ergebnisse lässt allerdings keine definitiven Schlüsse zu.

6 Literaturverzeichnis

Aletaha, D.; Neogi, T.; Silman, A. J.; Funovits, J.; Felson, D. T.; Bingham, C. O. et al. (2010): 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. In: *Arthritis & Rheumatism* (62(9)), S. 2569–2581. Online verfügbar unter

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.27584/abstract;jsessionid=4959E9AD3C87C5209C0836D0B8D4B8DE.f03t01>.

Altobelli, E.; Angeletti, P. M.; Piccolo, D.; Angelis, R. de (2017): Synovial Fluid and Serum Concentrations of Inflammatory Markers in Rheumatoid Arthritis, Psoriatic Arthritis and Osteoarthritis: A Systematic Review. In: *Current Rheumatology Reviews* (13(3)), S. 170–179. Online verfügbar unter <http://www.eurekaselect.com/151949/article>.

Aslanidis, S.; Pырpasopoulou, A.; Douma, S.; Triantafyllou, A. (2008): Tumor necrosis factor- α antagonist-induced psoriasis: yet another paradox in medicine. In: *Clinical Rheumatology* (27(3)), S. 377–380. Online verfügbar unter <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10067-007-0789-5>.

Azizah; Azila, M. N.; Zulkifli, M. N.; Norita, T. Y. (1996): The prevalence of antinuclear, anti-dsDNA, anti-Sm and anti-RNP antibodies in a group of healthy blood donors. In: *Asian Pacific journal of allergy and immunology* (14), S. 125–128. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9177827>.

Bandt, M. de; Sibilia, J.; Le Loët, X.; Prouzeau, S.; Fautrel, B.; Marcelli, C. et al. (2005): Systemic lupus erythematosus induced by anti-tumour necrosis factor alpha therapy: a French national survey. In: *Arthritis research & therapy*. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1174953/>.

Beigel, Florian; Schnitzler, Fabian; Paul Laubender, Rüdiger; Pfennig, Simone; Weidinger, Maria; Göke, Burkhard et al. (2011): Formation of antinuclear and double-strand DNA antibodies and frequency of lupus-like syndrome in anti-TNF- α antibody-treated patients with inflammatory bowel disease. In: *Inflammatory bowel diseases* 17 (1), S. 91–98. DOI: 10.1002/ibd.21362.

Bonafede, M. M.; Gandra, SR; Watson, C.; Prinicic, N.; Fox, K. M. (2012): Cost per treated patient for etanercept, adalimumab, and infliximab across adult indications: a claims analysis. In: *Advances in therapy* (29(3)), S. 234–248. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22411424>.

Canteart, T.; van Baarsen, L. G.; Wijbrandts, C. A.; Thurlings, R. M.; van de Sande, CB; van der Pouw, TK et al. (2010): Type I interferons have no major influence on humoral autoimmunity in rheumatoid arthritis. In: *Rheumatology (Oxford, England)* (49), S. 156–166.

Cham, C. M.; Ko, K.; Niewold, T. B. (2012): Interferon Regulatory Factor 5 in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. In: *Clinical and Developmental Immunology*. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3509422/pdf/CDI2012-780436.pdf>.

Charles, P. J.; Smeenk, R. J.; Jong, J. de; Feldmann, M.; Maini, R. N. (2000): Assessment of antibodies to double-stranded DNA induced in rheumatoid arthritis patients following treatment with infliximab, a monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha: findings in open-label and

randomized placebo-controlled trials. In: *Arthritis & Rheumatism* (43(11)), S. 2383–2390. Online verfügbar unter [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1529-0131\(200011\)43:11%3C2383::AID-ANR2%3E3.O.CO;2-D/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1529-0131(200011)43:11%3C2383::AID-ANR2%3E3.O.CO;2-D/pdf).

Däbritz, J.; Gerner, P.; Enninger, A.; Claßen, M.; Radke, M. (2017): Inflammatory Bowel Disease in Childhood and Adolescence. In: *Deutsches Ärzteblatt international* (114(19)), S. 331–338. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5470346/>.

Deleuran, B. W.; Chu, C. Q.; Field, M.; Brennan, F. M.; Mitchell, T.; Feldmann, M.; Maini, R. N. (1992): Localization of tumor necrosis factor receptors in the synovial tissue and cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. Implications for local actions of tumor necrosis factor alpha. In: *Arthritis & Rheumatism* (35(10)), S. 1170–1178. Online verfügbar unter <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.1780351009/pdf>.

Dignass, A.; Preiß, J. C.; Aust, D. E.; Autschbach, F.; Ballauff, A.; Barretton, G. et al. (2011): Aktualisierte Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa 2011. Ergebnisse einer Evidenzbasierten Konsensuskonferenz. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* (49), S. 1276–1341. Online verfügbar unter https://www.dgvs.de/wp-content/uploads/2016/11/Leitlinie_Colitis_ulcerosa.pdf.

Ferraro-Peyret, C.; Coury, F.; Tebib, J. G.; Bienvenu, J.; Fabien, N. (2004): Infliximab therapy in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis-induced specific antinuclear and antiphospholipid autoantibodies without autoimmune clinical manifestations: a two-year prospective study. In: *Arthritis research & therapy* (6), S. R535-43. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1064868/>.

Fonseca Chebli, J. M.; Gaburri, P. D.; La Chebli; da Rocha Ribeiro, TC; Pinto, A. L.; Ambrogini Júnior, O.; Damião, A. O. (2014): A guide to preparation of patients with inflammatory bowel diseases for anti-TNF- α therapy. In: *Medical Science Monitor* (20), S. 487–498. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3972052/pdf/medscimonit-20-487.pdf>.

Garcia-Planella, E.; Domènech, E.; Esteve-Comas, M.; Bernal, I.; Cabré, E.; Boix, J.; Gassull, M. A. (2003): Development of antinuclear antibodies and its clinical impact in patients with Crohn's disease treated with chimeric monoclonal anti-TNF α antibodies (infliximab). In: *European journal of gastroenterology & hepatology* (15), S. 351–354. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12655253>.

Hehlgans, Thomas; Pfeffer, Klaus (2005): The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. In: *Immunology* (115(1)), S. 1–20. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1782125/pdf/imm0115-0001.pdf>.

Herold, Gerd (Hg.) (2015): Innere Medizin: Herold, Gerd.

Holzappel, B.; Wickert, L. (2007): Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. In: *Biologie in unserer Zeit* (37(2)), S. 120–126. Online verfügbar unter <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/biuz.200610332/abstract>.

Jani, M.; Dixon, W. G.; Kersley-Fleet, L.; Bruce, I. N.; Chinoy, H.; Barton, A. et al. (2017): Drug-specific risk and characteristics of lupus and vasculitis-like events in patients with rheumatoid arthritis treated with TNFi: results from BSRBR-RA. In: *Rheumatic & Musculoskeletal Diseases* (3(1)). Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28123776>.

Kruithof, E.; Van den Bosch, F; Baeten, D.; Herssens, A.; Keyser, F. de; Mielants, H.; Veys, E. M. (2002): Repeated infusions of infliximab, a chimeric anti-TNF α monoclonal antibody, in patients with active spondyloarthritis: one year follow up. In: *Annals of the rheumatic diseases* (61), S. 207–212. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1754032/>.

Landry, M. L. (2016): Immunoglobulin M for Acute Infection: True or False? In: *Clinical and Vaccine Immunology* (23(7)), S. 540–545. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4933779/>.

Lübbers, J.; Brink, M.; van de Stadt, LA; Vosslamber, S.; Wesseling, J. G.; van Schaardenburg, D. et al. (2013): The type I IFN signature as a biomarker of preclinical rheumatoid arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* (72), S. 776–780.

Luchetti, M.; Benfaremo, D.; Gabrielli, A. (2017): Biologics in inflammatory and immunomediated arthritis. In: *Current pharmaceutical biotechnology* (19). Online verfügbar unter <http://www.eurekaselect.com/158616/article>.

Merrell, M.; Le Shulman (1955): Determination of prognosis in chronic disease, illustrated by systemic lupus erythematosus. In: *Chronic Disease* (1(1)), S. 12–32.

Minozzi, S.; Bonovas, S.; Lytras, T.; Pecoraro, V.; González-Lorenzo, M.; Bastiampillai, A. J. et al. (2016): Risk of infections using anti-TNF agents in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis: a systematic review and meta-analysis. In: *Expert opinion on drug safety* (15(1)), S. 13–34. Online verfügbar unter <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14740338.2016.1240783?journalCode=ieds20>.

Moulis, G.; Sommet, A.; Lapeyre-Mestre, M.; Montastruc, J. L. (2014): Is the risk of tumour necrosis factor inhibitor-induced lupus or lupus-like syndrome the same with monoclonal antibodies and soluble receptor? A case/non-case study in a nationwide pharmacovigilance database. In: *Rheumatology (Oxford, England)* (53(10)), S. 1864–1871. Online verfügbar unter <https://academic.oup.com/rheumatology/article/53/10/1864/1817428>.

MSD Sharp & Dohme GmbH (Hg.) (2016): Fachinformation Remicade. Online verfügbar unter <http://www.msd.de/fileadmin/files/fachinformationen/remicade.pdf>.

Orchard, T. R.; Wordsworth, B. P.; Jewell, D. P. (1998): Peripheral arthropathies in inflammatory bowel disease: their articular distribution and natural history. In: *Gut* (42), S. 387–391. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1727027/pdf/v042p00387.pdf>.

Pons-Estel, G. J.; Alarcón, G. S.; Scofield, L.; Reinlib, L.; Cooper, G. S. (2010): Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. In: *Semin Arthritis Rheum* (39), S. 257–268. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2813992/pdf/nihms104220.pdf>.

Preiß, J. C., Bokemeyer, B; Buhr, H. J.; Dignaß, A.; Häuser, W.; Hartmann, F.; Herrlinger, K. R. et al. (2014): Leitlinien für Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* (52), S. 1431–1484. Online verfügbar unter https://www.dgvs.de/wp-content/uploads/2016/11/DGVS_Empfehlung_fuer_Diagnostik_und_Therapie_des_Morbus_Crohn.pdf.

Pretel, M.; Marquès, L.; Espana, A. (2014): Drug-Induced Lupus Erythematosus. In: *ACTAS Dermo-Sifiliograficas* (105), S. 18–30. Online verfügbar unter <http://www.actasdermo.org/en/drug-induced-lupus-erythematosus/articulo/S1578219013002667/>.

Raaschou, P.; Simard, J. F.; Holmqvist, M.; Askling, J.; ARTIS Study Group (2013): Rheumatoid arthritis, anti-tumour necrosis factor therapy, and risk of malignant melanoma: nationwide population based prospective cohort study from Sweden. In: *BMJ*. Online verfügbar unter <http://www.bmj.com/content/346/bmj.f1939.long>.

Ramos-Casals, Manuel; Brito-Zerón, Pilar; Muñoz, Sandra; Soria, Natalia; Galiana, Diana; Bertolaccini, Laura et al. (2007): Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies: analysis of 233 cases. In: *Medicine* 86 (4), S. 242–251. DOI: 10.1097/MD.0b013e3181441a68.

Rudwaleit, M.; Braun, J.; Sieper J (2009a): ASAS classification criteria for axial spondyloarthritis. In: *Zeitschrift für Rheumatologie* (68(7)), S. 591–593. Online verfügbar unter <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00393-009-0510-y>.

Rudwaleit, M.; van der Heijde, D; Landewé, R.; Listing, J.; Akkoc, N.; Brandt, J. et al. (2009b): The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II). - validation and final selection. In: *Annals of the rheumatic diseases* (68(6)), S. 777–783. Online verfügbar unter <http://ard.bmj.com/content/68/6/777.full.pdf+html>.

Rycke, L. de; Baeten, D.; Kruithof, E.; Van den Bosch, F; Veys, E. M.; Keyser, F. de (2005): Infliximab, but not etanercept, induces IgM anti-double-stranded DNA autoantibodies as main antinuclear reactivity: biologic and clinical implications in autoimmune arthritis. In: *Arthritis & Rheumatism* (52(7)), S. 2192–2201. Online verfügbar unter <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.21190/abstract>.

Rycke, L. de; Baeten, D.; Kruithof, E.; Van den Bosch, F; Veys, E. M.; Keyser, F. de (2015): The effect of TNFalpha blockade on the antinuclear antibody profile in patients with chronic arthritis: biological and clinical implications. In: *Lupus* (14(12)), S. 931–937. Online verfügbar unter http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1191/0961203305lu2240rr?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&.

Steed, P. M.; Tansey, M. G.; Zalevsky, J.; Zhukovsky, E. A.; Desjarlais, JR; Szymkowski, D. E. et al. (2003): Inactivation of TNF Signaling by Rationally Designed Dominant-Negative TNF Variants. In: *Science* (301(5641)), S. 1895–1898. Online verfügbar unter <http://science.sciencemag.org/content/301/5641/1895.long>.

Stübgen, J. P. (2008): Tumor necrosis factor-alpha antagonists and neuropathy. In: *Muscle Nerve* (37(3)), S. 281–292.

Sweeney, S. E. (2011): Hematopoietic stem cell transplant for systemic lupus erythematosus: Interferon regulatory factor 7 activation correlates with the IFN signature and recurrent disease. In: *Lupus* (20(9)), S. 975–980.

Tan, E. M.; Feltkamp, T. E.; Smolen, J. S.; Butcher, B.; Dawkins, R.; Fritzler, M. J. et al. (1997): Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. In: *Arthritis & Rheumatism* (40), S. 1601–1611. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9324014>.

- Targownik, L. E.; Bernstein, C. N. (2013): Infectious and malignant complications of TNF inhibitor therapy in IBD. In: *The American Journal of Gastroenterology* (108(12)), S. 1835–1842. Online verfügbar unter <https://www.nature.com/articles/ajg2013294>.
- Taylor, W.; Gladman, D.; Helliwell, P.; Marchesoni, A.; Mease, P. (2006): Classification criteria for psoriatic arthritis. development of new criteria from a large international study. In: *Arthritis & Rheumatism* (8), S. 2665–2673. Online verfügbar unter <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.21972/pdf>.
- Thermo Fisher Scientific (2014): Cells-to-CT1 1-step Taqman-Kit. Quick Reference.
- Thermo Fisher Scientific (2015): SuperScript™ VILO™cDNA Synthesis Kit. Product Information Sheet, 30.10.2015.
- Verma, H. D.; Scherl, E. J.; Jacob, V. E.; Bosworth, B. P. (2011): Anti-nuclear antibody positivity and the use of certolizumab in inflammatory bowel disease patients who have had arthralgias or lupus-like reactions from infliximab or adalimumab. In: *Journal of digestive diseases* (12(5)), S. 379–383. Online verfügbar unter <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1751-2980.2011.00522.x>.
- Wallace, Daniel J.; Hahn, Bebra Hannahs (1997): Dubois' Lupus Erythematosus. Fifth Edition.
- Wetter, David A.; Davis, Mark D. P. (2009): Lupus-Like Syndrome Attributable to Anti-Tumor Necrosis Factor a Therapy in 14 Patients During an 8-Year Period at Mayo Clinic. In: *Mayo Clinic Proceedings* (84), S. 979–984. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2770909/?report=reader>.
- Williams, Emma L.; Gadola, Stephan; Edwards, Christopher J. (2009): Anti-TNF-induced lupus. In: *Rheumatology (Oxford, England)* (48), S. 716–720.
- Windt, R.; Glaeske, G.; Hoffmann, F. (2011): Prescription of TNF-alpha inhibitors and regional differences in 2010. In: *Zeitschrift für Rheumatologie* (70(10)), S. 874–881. Online verfügbar unter <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00393-011-0873-8>.
- Winkelmann, S. J. (2016): Inzidenz einer klinischen und serologischen Lupus-like-Disease unter TNF-alpha-Inhibitor-Therapie. eine interdisziplinäre, prospektive Studie. Unter Mitarbeit von Schröder, J.O., Zeuner, R.

Danksagung

Prof. Dr. J.O. Schröder möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes danken. Zu jeder Zeit konnte ich mich auf die tatkräftige Unterstützung beim Ausarbeiten und auf eine kompetente Beratung verlassen.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Konrad Aden, für seine Arbeit an den Interferonsignaturen und seiner Hilfe bei deren Auswertung.

Dem Institut popgen und hier insbesondere Lukas Tittmann möchte ich für die Unterstützung und freundliche Zusammenarbeit danken. Ohne die Sammlung und freundliche Herausgabe der Proben wäre diese Arbeit nicht in dieser Form möglich gewesen.

Frau Meike Zahnen danke ich für ihre freundliche Hilfe bei der Lösung jeglicher Probleme, die während meiner Arbeit auftraten.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht und mich immer darin bestärkt haben, meine Ziele zu verfolgen. Seit ich denken kann, stehen sie mir liebevoll und unterstützend zur Seite.

Auch meinen Geschwistern und Freunden möchte ich dafür danken, dass sie mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben.

Publikationen

Langzeitverlauf und Zytokinsignatur der Lupus-like-Disease unter TNF-Inhibitoren

Martensen W, Zeuner R, Winkelmann SJ, Schreiber S, Aden K, Schröder JO.

Poster zum 46. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie,

19.-22. September 2018 in Mannheim (angenommen)

Erklärung

Hiermit versichere ich, Wiebke Martensen, an Eides Statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meines Doktorvaters und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher, weder ganz noch in Teilen, keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat.