

Aus der Universitätsklinik für Neurologie mit Schwerpunkt  
neurovaskuläre Erkrankungen Tübingen  
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. U. Ziemann

**Der Effekt von Tocilizumab auf terminal  
differenzierte B-Lymphozyten bei Patienten mit  
rheumatoider Arthritis**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Speer, Claudius**

**2017**

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. Felix Bischof

2. Berichterstatter:

Professor Dr. Oliver Planz

Tag der Disputation:

17.05.2017

# I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis.....	3
II	Abkürzungsverzeichnis.....	9
1.	Einleitung.....	11
1.1	Einleitung und Epidemiologie der rheumatoiden Arthritis .....	11
1.1.1	Ätiologie und Pathogenese .....	11
1.1.2	Diagnostik und Klassifizierung .....	14
1.2	Allgemeine Therapiekonzepte der rheumatoiden Arthritis .....	16
1.2.1	DMARDs .....	17
1.2.2	Rituximab .....	19
1.2.3	Abatacept .....	20
1.2.4	TNF-Inhibitor Therapie .....	21
1.2.5	Interleukin-6 Inhibitor Tocilizumab .....	23
1.3	Einführung Immunsystem .....	25
1.3.1	Grundlagen des angeborenes Immunsystems .....	25
1.3.2	Grundlagen des erworbenes Immunsystems.....	27
1.3.3	Aktivierung und Differenzierung der T-Lymphozyten .....	27
1.3.4	Funktion und Entwicklung der B-Lymphozyten .....	28
1.3.5	Aktivierung und Differenzierung der B-Lymphozyten.....	30
1.4	Die Rolle der B-Lymphozyten in der Pathogenese der RA.....	32
2.	Fragestellung der Arbeit.....	34
3.	Material und Methoden.....	35
3.1	Material .....	35
3.1.1	Tabelle verwendeter Lösungen .....	35
3.1.2	Tabelle verwendeter Chemikalien.....	36
3.1.3	Tabelle verwendeter Einwegmaterialien .....	36
3.1.4	Tabelle verwendeter Laborgeräte .....	38

3.1.5	Tabelle verwendeter Antikörper .....	38
3.1.6	Tabelle verwendeter Software .....	39
3.2	Patientengruppen und Kontrollgruppe .....	40
3.3	Bestimmung der Subpopulationen der B-Lymphozyten und Durchführung einer Serumanalyse .....	41
3.4	Immunphänotypisierung mit dem FACS-Gerät .....	42
3.4.1	Ficoll Gradient .....	43
3.4.2	Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer Zählkammer .....	44
3.4.3	FACS-Färbung und Antikörperkonzentrationen .....	44
3.4.4	FACS-Gerät und FACS-Messung .....	48
3.4.5	Auswertung der FACS-Daten .....	48
3.5	Bestimmung verschiedener Serumzytokine mittels ELISA-Technik .....	49
3.5.1	Durchführung der quantitativen Messungen mittels ELISA-Technik .....	49
3.5.2	Auswertung der ELISA-Messungen .....	52
3.6	Statistik .....	52
4.	Ergebnisse .....	52
4.1	Patienten und Probanden .....	52
4.2	Durchflusszytometrische Bestimmung der CD3-CD19+ B-Lymphozyten .....	54
4.2.1	Der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs ist bei der gesunden Kontrollgruppe signifikant höher als bei RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie oder bei RA Patienten mit geringer Immunsuppression .....	57
4.2.2	Der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs ist bei RA Patienten unter Tocilizumab Therapie signifikant höher als bei RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie oder bei RA Patienten mit geringer Immunsuppression .....	59
4.2.3	Der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs bei Patienten unter Tocilizumab Therapie ist vergleichbar mit der gesunden Kontrollgruppe .....	61

4.3 Analyse der CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen der B-Lymphozyten .....	61
4.3.1 Zwischen den Patientenkollektiven gibt es keine signifikanten Unterschiede des Anteils der CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen der B-Lymphozyten .....	63
4.4 Analyse der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten .....	66
4.4.1 Der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an den gesamten B-Lymphozyten ist bei RA Patienten unter geringer Immunsuppression signifikant niedriger als bei der gesunden Kontrollgruppe .....	68
4.4.2 Vergleich des Anteils der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an den gesamten B-Lymphozyten zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen .....	69
4.5 Analyse der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten .....	70
4.5.1 Der Anteil der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten an den gesamten B-Lymphozyten ist bei RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie signifikant höher als bei der gesunden Kontrollgruppe .....	72
4.5.2 Vergleich des Anteils der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten an den gesamten B-Lymphozyten zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen .....	74
4.6 Serumanalyse bei RA Patienten und der gesunden Kontrollgruppe .....	75
4.6.1 Die IgM-Konzentration im Serum der RA Patienten unter Tocilizumab Therapie ist signifikant höher als bei der gesunden Kontrollgruppe .....	76
4.6.2 Vergleich der IgM-Konzentration im Serum zwischen RA Patienten und der gesunden Kontrollgruppe .....	77
4.6.3 Die IgA-Konzentration im Serum der gesunden Kontrollgruppe ist statistisch signifikant niedriger als bei RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie und als bei RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie .....	78

4.6.4 Die IgA-Konzentration im Serum der RA Patienten unter Therapie mit Tocilizumab ist statistisch signifikant niedriger als bei RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie .....	79
4.6.5 Die IgG-Konzentration im Serum der RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie ist statistisch signifikant höher als bei RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie, RA Patienten mit Tocilizumab Therapie und als bei der gesunden Kontrollgruppe .....	80
4.6.6 Vergleich der IL35-Konzentration im Serum zwischen RA Patienten und der gesunden Kontrollgruppe .....	81
4.6.7 Keine Unterschiede der BAFF-Konzentration im Serum der verschiedenen Versuchsgruppen nachweisbar.....	83
4.6.8 Die TNF $\alpha$ -Konzentration im Serum der RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie ist statistisch signifikant höher als bei RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie .....	84
4.6.9 Vergleich der TNF $\alpha$ -Konzentration im Serum zwischen RA Patienten und der gesunden Kontrollgruppe .....	85
4.6.10 Die IL6-Konzentration im Serum der RA Patienten mit Tocilizumab Therapie ist statistisch signifikant höher als bei der gesunden Kontrollgruppe .....	86
4.6.11 Die IL21-Konzentration im Serum der RA Patienten unter Tocilizumab Therapie ist statistisch signifikant höher als bei RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie .....	88
4.6.12 Vergleich der IL21-Konzentration im Serum zwischen RA Patienten und der gesunden Kontrollgruppe .....	88
5. Diskussion .....	89
5.1 Veränderungen des Anteils der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs bei RA Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe .....	89
5.2 Einfluss verschiedener immunsuppressiver Therapieschemata auf den Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs bei Patienten mit RA.....	90

5.3 Veränderungen des Anteils der CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen an den gesamten B-Lymphozyten bei RA Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe.....	91
5.4 Einfluss verschiedener immunsuppressiver Therapien auf den Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen an den gesamten B-Lymphozyten bei Patienten mit RA.....	93
5.5 Veränderungen der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten bei RA Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe.....	94
5.6 Einfluss verschiedener immunsuppressiver Therapien auf die CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten bei Patienten mit RA .....	95
5.7 Veränderungen der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten bei RA Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe.....	97
5.8 Einfluss verschiedener immunsuppressiver Therapien auf die CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten bei Patienten mit RA .....	97
5.9 Unterschiede der Serumkonzentrationen der Zytokine BAFF, IL6, IL21, IL35 und TNF $\alpha$ bei RA Patienten.....	98
5.9.1 BAFF .....	98
5.9.2 IL6 .....	99
5.9.3 IL21 .....	101
5.9.4 IL35 .....	101
5.9.5 TNF $\alpha$ .....	103
5.10 Unterschiedliche Verteilung der Immunglobulinklassen G, A und M bei RA Patienten .....	104
5.11 Beurteilung des Einflusses von Tocilizumab und TNF-Inhibitoren auf terminal differenzierte B-Lymphozyten .....	106
6. Zusammenfassung.....	107
III Tabellenverzeichnis.....	109
IV Abbildungsverzeichnis.....	111
V Literaturverzeichnis.....	116

VI Erklärungen zum Eigenanteil.....	126
VII Danksagung.....	127
VIII Lebenslauf.....	128

## II Abkürzungsverzeichnis

ACPA	Anti Citrullinated Peptide/Protein Antibodies
ACR	American College of Rheumatology
Ak	Antikörper
ANA	Anti-Nuclear Antibodies
APC	Allophycocyanin
APCs	Antigen Presenting Cells
APRIL	A Proliferation-Inducing Ligand
BAFF	B Cell Activating Factor
BCR	B Cell Receptor
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CD	Clusters of Differentiation
CRP	C-reaktives Protein
CTLA	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein
CXCL	CXC Ligand
DAS28	Disease Activity Score 28
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMARDs	Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EULAR	European League Against Rheumatism
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCS	Forward Scatter
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanate
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
HLA	Human Leukocyte Antigen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LORA	Late Onset Rheumatoid Arthritis

MHC	Major Histocompatibility Complex
MTX	Methotrexat
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PB	Pacific Blue
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	Phycoerythrin
PRR	Pattern Recognition Receptor
RF	Rheumafaktor
RA	Rheumatoide Arthritis
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
SSC	Sideward Scatter
TACE	TNF $\alpha$ -Converting Enzyme
TCR	T Cell Receptor
TGF	Transforming Growth Factor
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## **1. Einleitung**

### **1.1 Einleitung und Epidemiologie der rheumatoiden Arthritis**

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche, systemische Autoimmunerkrankung, die über eine Synovialitis zu einer destruierenden Arthritis, Bursitis und Tendovaginitis führt [1]. Die RA manifestiert sich typischer Weise mit symmetrischer Beteiligung vor allem der kleinen Gelenke, wie zum Beispiel der Fingergelenke, Handgelenke oder Zehengelenke [2]. Es handelt sich um eine progrediente Erkrankung, die zu Schmerzen, Steifigkeit und Schwellungen der betroffenen Gelenke führen kann [2]. Zusätzlich kann die RA auch fakultativ extraartikuläre und systemische Organmanifestationen bewirken.

Mit einer Prävalenz von 0,5-0,8% in Mitteleuropa ist die RA die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung, wobei das Verhältnis Frauen zu Männer 2:1 bis 3:1 beträgt [3-6]. Der Erkrankungsgipfel der RA liegt zwischen dem 55. und dem 75. Lebensjahr. Prinzipiell kann die RA jedoch in jedem Lebensalter auftreten. Es sind beispielsweise als Sonderformen der RA die juvenile idiopathische Polyarthrit im Kindesalter oder die Alters-RA (LORA - Late Onset Rheumatoid Arthritis) mit Beginn jenseits des 60. Lebensjahres bekannt.

#### **1.1.1 Ätiologie und Pathogenese**

Die Ätiologie der RA ist trotz intensiver Forschungsarbeiten noch nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass eine genetische Prädisposition vorliegen muss. Mehr als 80% der Patienten mit RA besitzen das HLA-Antigen (Human Leukocyte Antigen) HLA-DRB1 [1, 7] und bei Patienten mit zwei Allelen des HLA-DRB1 Gens ist ein erhöhtes Risiko für systemische Manifestationen der RA bekannt

[1, 8]. Auch Umweltfaktoren wie Rauchen oder verschiedene Infektionen spielen eine entscheidende Rolle [9, 10]. Das komplexe Zusammenspiel von mononukleären Zellen wie B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und Monozyten mit den proinflammatorischen Zytokinen IL1, IL6, TNF $\alpha$  und IL17 spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der RA [1]. Es kommt über eine Infiltration der Gelenkschleimhaut (Synovialis) mit T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen, Plasmazellen, dendritischen Zellen und Mastzellen und einer verstärkten Angiogenese zu einer Entzündung der Gelenkschleimhaut (Synovialitis) [11]. Über den osteoklastenreichen Anteil der Synovialmembran kommt es zu einer knöchernen Destruktion und die Produktion von Elastasen und Kollagenasen durch neutrophile Granulozyten, Chondrozyten und Synoviozyten bewirkt eine zusätzliche Schädigung des Gelenkknorpels [11]. Über die verstärkte Angiogenese und die Bildung des Pannus, einer Hyperplasie der Synovialis, kommt es im Laufe der Erkrankung zunehmend zur Schädigung des Gelenkknorpels und zu erosiven Veränderungen der angrenzenden knöchernen Strukturen [12, 13]. Initiiert und aufrechterhalten werden diese lokalen destruktiven Prozesse über die Freisetzung von verschiedenen Wachstums- und Entzündungsfaktoren wie PDGF, bFGF, TGF $\beta$  und IL1 aus dem Pannusgewebe [14, 15]. Die beschriebenen Destruktionen von Gelenkknorpel und angrenzendem Knochen können im Verlauf zu Funktionsverlust und Fehlstellungen des betroffenen Gelenks führen [14].

Bei bis zur Hälfte der Patienten mit RA kommt es zu extraartikulären Manifestationen wie z.B. einer Perikarditis, Pleuritis, Rheumaknoten, Keratocconjunctivitis sicca oder Uveitis. Auch systemischen Manifestationen, wie z.B. eine Anämie, Produktion von Akute-Phase-Proteinen, Osteoporose, Fatigue, erhöhtes kardiovaskuläres Risiko und Depressionen sind möglich [16-18].

Über die Präsentation von RA assoziierten Autoantigenen durch Makrophagen, dendritische Zellen und aktivierte B-Lymphozyten werden unter anderem CD4+ T-Lymphozyten aktiviert. Diese infiltrieren die Synovia und produzieren dort IL2 und

IFN $\gamma$ , wodurch weitere B- und T-Lymphozyten zur Proliferation und Differenzierung angeregt werden [19]. Auch die IL17 produzierende Subpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (T<sub>H</sub>17) scheint eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der RA zu spielen [20]. Der IL17-Rezeptor wird ubiquitär unter anderem auf Fibroblasten, Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten exprimiert und seine Aktivierung beeinflusst die Interaktion der an der Pathogenese der RA beteiligten Effektorzellen [1, 21]. Die B-Lymphozyten sind nicht nur über die Antigenpräsentation an der Krankheitsentstehung beteiligt, sondern produzieren zusätzlich nach Stimulation auch Antikörper (Ak), Auto-Ak und verschiedene Zytokine [1, 7]. Außerdem werden von den B-Lymphozyten Auto-Ak gegen das Fc-Fragment des IgG (sog. Rheumafaktoren) und Auto-Ak gegen cyclisches citrulliniertes Peptid (Anti-CCP-Ak) gebildet. Es können sich im Rahmen der Ak-Antigen-Reaktion Ak zu großen Immunkomplexe zusammenlagern und zusätzlich die Ausschüttung von Zytokinen stimulieren [1, 7]. Makrophagen sind neben der Antigenpräsentation maßgeblich an der Ausschüttung der Zytokine IL1, IL6 und TNF $\alpha$  beteiligt [7, 11]. Zusätzlich sind sie über die Zytokine IL1, IL6 und IL17 in der Lage, die Osteoklasten über eine vermehrte RANKL-Expression forciert zu aktivieren [22]. Es ist ebenfalls bekannt, dass die Zytokine IL6, IL1 und TNF $\alpha$  von großer Bedeutung bei der Zellmigration und der Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion der RA sind [1, 7]. Das Zytokin IL6 wirkt sowohl lokal auf benachbarte Immunzellen, als auch über größere Distanzen über einen membrangebundenen IL6-Rezeptor (mIL6-R) und über einen löslichen IL6-Rezeptor (sIL6-R), der wiederum über ein membrangebundenes Glykoprotein gp130 die Signalkaskade initiiert (sog. IL-6-trans-signaling). IL6 wirkt unter anderem antiapoptotisch auf T-Lymphozyten, reguliert deren Differenzierung und Proliferation und beeinflusst die Immunglobulinsynthese der B-Lymphozyten [23]. Ergänzend werden durch das Zytokin IL6 die neutrophilen Granulozyten über einen membrangebundenen IL6-Rezeptor rekrutiert und stimuliert. Über eine vermehrte Ausschüttung von proteolytischen Enzymen und von Sauerstoffradikalen bewirken die stimulierten neutrophilen Granulozyten eine Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion und eine direkte, schädigende Wirkung auf vitales Gewebe [9].

Das IL21 wird unter anderem von aktivierten CD4+ T-Lymphozyten und von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) produziert und wirkt über den Rezeptor IL21R, der sich auf B- und T-Lymphozyten befindet, modulierend auf die ausgelöste Immunantwort [24]. Es ist bekannt, dass eine erhöhte Plasmakonzentration von IL21 mit einer stärkeren Krankheitsaktivität assoziiert ist [25] und dass in der Synovia bei Patienten mit RA vermehrt der Rezeptor IL21R exprimiert wird [26]. Auch das Zytokin IL35 scheint im Rahmen der RA eine bedeutende Rolle zu spielen [27]. Es wurde gezeigt, dass IL35 die T-Zell-Proliferation und die T<sub>H</sub>17-Differenzierung hemmt [28] und bei Patienten mit RA deutlich erniedrigt ist [27]. Daher geht man aktuell von einer antiinflammatorischen, immunregulierenden Rolle des IL35 in der Pathogenese der RA aus [27].

### **1.1.2 Diagnostik und Klassifizierung**

Patienten mit RA profitieren deutlich von einem möglichst frühen Therapiebeginn [29, 30]. Frühe medikamentöse Intervention bei Patienten mit RA verbessert das klinische Langzeitergebnis unter anderem in Bezug auf die Gelenkdestruktion und den Grad der Behinderung [29, 31]. Eine RA kann am besten durch den Nachweis struktureller Schädigungen mittels Röntgendarstellung von anderen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises differenziert werden. Problematisch ist jedoch, dass Gelenkdestruktionen recht selten in frühen Stadien der RA, sondern meist erst im weiteren Verlauf der Erkrankung zu detektieren sind [29, 32]. Aus diesen Gründen wurden 2010 die sogenannten ACR/EULAR Klassifikationskriterien (ACR = American College of Rheumatology, EULAR = European League Against Rheumatism) entwickelt [29], um die RA zu einem möglichst frühen Zeitpunkt verlässlich klassifizieren zu können. Nach den ACR/EULAR Klassifikationskriterien sollten diese neuen Kriterien angewandt werden, wenn in mindestens einem Prädilektionsgelenk eine sichere klinische Synovialitis vorhanden ist, die nicht durch eine andere Erkrankung zu erklären wäre [29]. Teil der ACR/EULAR Klassifikationskriterien von 2010 sind die Anzahl der beteiligten Gelenke, die

Serologie (RF und ACPA), Akute-Phase-Proteine (CRP und BSG) sowie die Dauer der Symptome [29]. Addiert man die in Tabelle 4 dargestellten Bewertungspunkte der Kategorien A-D und erhält eine Zahl von  $\geq 6$ , so kann beim jeweiligen Patienten eine RA klassifiziert werden [29].

<b>A) Gelenkbeteiligung</b>	
1 großes Gelenk	0
2-10 große Gelenke	1
1-3 kleine Gelenke (mit und ohne Beteiligung der großen Gelenke)	2
4-10 kleine Gelenke (mit und ohne Beteiligung der großen Gelenke)	3
>10 Gelenke (mit mindestens einem kleinen Gelenk)	5
<b>B) Serologie</b>	
negativer RF und negative ACPA	0
niedrig positiver RF oder niedrig positive ACPA	2
hoch positiver RF oder hoch positive ACPA	3
<b>C) Akute-Phase-Proteine</b>	
normales CRP und normale BSG	0
abnormales CRP oder abnormale BSG	1
<b>D) Dauer der Symptomatik</b>	
<6 Wochen	0
$\geq 6$ Wochen	1

**Tabelle 1: ACR/EULAR Klassifikationskriterien von 2010**

Zusätzlich gibt es weitere Scores, anhand deren man die Krankheitsaktivität beziehungsweise den Grad der Remission unter Therapie bei Patienten mit RA evaluieren kann [33]. Der in der Praxis gebräuchlichste Index ist der DAS28 (Disease Activity Score 28), mit dem die Krankheitsaktivität an 28 verschiedenen Gelenken beurteilt wird. Von Relevanz sind hierbei druckschmerzhaft Gelenke,

geschwollene Gelenke, Entzündungsparameter (BSG oder CRP) und die Patienteneinschätzung der Krankheitsaktivität [7, 34].

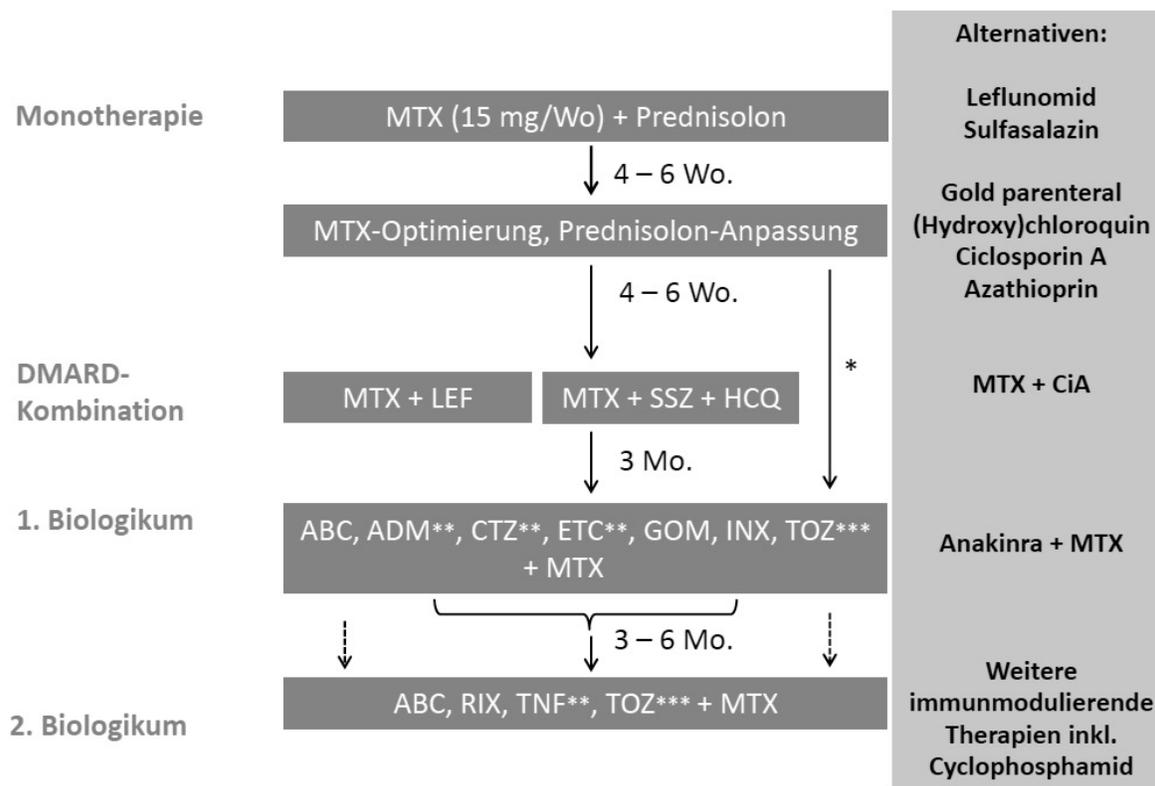
## **1.2 Allgemeine Therapiekonzepte der rheumatoiden Arthritis**

Wesentlich für die Behandlung der RA ist ein möglichst frühzeitiger Behandlungsbeginn, da hierdurch das klinische Langzeitergebnis deutlich verbessert werden kann [29, 31]. Zusätzlich erzielt man eine Remission der RA gerade im frühen Krankheitsstadium häufiger als in späteren Phasen [35, 36]. Eine konsequente Evaluation der Krankheitsaktivität, zum Beispiel mittels DAS28 Score [7, 34] und eine entsprechende Anpassung der Medikation ist regelmäßig notwendig. Dabei sind die Kontrollintervalle vom Wirkungseintritt des jeweiligen Medikaments abhängig. Da die Diagnose der RA jedoch vor allem zu Beginn der Erkrankung häufig nicht eindeutig zu stellen ist, sollte bereits bei einer Verdachtsdiagnose mit einer adäquaten Therapie begonnen werden [29].

Bei der RA kommen zur medikamentösen Therapie Nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR), Glukokortikoide, krankheitsmodifizierende Medikamente (sogenannte DMARDs = Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs) und Biologica in Frage, wobei die einzelnen Substanzgruppen im Folgenden näher erläutert werden. Der Therapiealgorithmus der RA in Anlehnung an die EULAR-Empfehlungen ist in Abbildung 1 [37] dargestellt. Als Ersttherapeutikum der RA wird das Basistherapeutikum Methotrexat (MTX) aufgrund seiner Wirksamkeit und Verträglichkeit [38-40] und einer DAS28-Remissionsrate von 20-30% empfohlen [34]. Bei Unverträglichkeiten oder Kontraindikationen gegenüber einer Therapie mit MTX können alternativ Basistherapeutika wie Leflunomid oder Sulfasalazin eingesetzt werden [37]. Zusätzlich zur frühen Therapie mit DMARDs werden häufig Glukokortikoide aufgrund ihrer symptomlindernden und entzündungshemmenden Wirkung eingesetzt [41]. Da die klassischen DMARDs erst mit Verzögerung ihre volle Wirksamkeit entfalten, wird der rasche therapeutische Effekt der

Glukokortikoide zur Überbrückung und zur symptomlindernden Therapie eingesetzt [42, 43]. Hinsichtlich der symptomatischen Effekte sind die Glukokortikoide den NSAR überlegen [42, 43]. Bei ausbleibendem Therapieerfolg trotz Dosisanpassung der Monotherapie mit MTX nach etwa 12 Wochen ist eine DMARD-Kombinationstherapie zum Beispiel mit MTX + Leflunomid oder MTX + Sulfasalazin + Hydroxychloroquin zu erwägen [37]. Bleibt nach weiteren 3 Monaten eine Kontrolle der Krankheitsaktivität aus, ist in der Regel der Einsatz von Biologica indiziert [37]. Es kommen vor allem die TNF-Inhibitoren Adalimumab, Certolizumab Pegol, Etanercept, Golimumab und Infliximab, sowie Abatacept oder der IL6-Inhibitor Tocilizumab zum Einsatz [37]. Die Kombinationstherapie der TNF-Inhibitoren mit MTX ist der Monotherapie mit MTX sowohl radiologisch als auch klinisch überlegen und daher als Therapieeskalation geeignet [34, 44-46]. Bei fehlendem Therapieansprechen oder Unverträglichkeiten sollte nach 3-6 Monaten, abhängig vom Wirkungsprofil des jeweiligen Biologicums, ein Wechsel auf ein anderes Biologicum erfolgen [37]. Als Kombinationspartner dieser Therapiestufe wird wiederum MTX empfohlen [37].

Neben der medikamentösen Therapie der RA ist eine konservative, problemorientierte Behandlung essenziell, um individuellen Funktionseinschränkungen und Beeinträchtigungen im Alltag entgegenzuwirken. Ziel der Behandlung ist ein ganzheitlicher Therapieansatz in einem multidisziplinären Team, bestehend aus Rheumatologen, Hausärzten, Physiotherapeuten, Psychotherapeuten, Ergotherapeuten, Sozialarbeitern und Pflegekräften [47-49].



\* Vorliegen hoher Krankheitsaktivität, insbesondere mit ungünstigen Prognosefaktoren

\*\* ADM, CEZ, ETC sind auch für die Monotherapie zugelassen, wenn MTX nicht einsetzbar ist.

\*\*\* TOC ist auch für die Monotherapie zugelassen, wenn MTX nicht einsetzbar ist und hat sich in Studien als gleich effektiv in Monotherapie und Kombination mit MTX erwiesen.

### Abbildung 1: Therapiealgorithmus für die RA in Anlehnung an die EULAR-Empfehlungen [37]

Abkürzungen der Abbildung: ABC = Abatacept, ADM = Adalimumab, CEZ = Certolizumab, ETC = Etanercept, GOM = Golimumab, INX = Infliximab, RIX = Rituximab, TOZ = Tocilizumab, CiA = Ciclosporin A, HCQ = Hydroxychloroquin, LEF = Leflunomid, MTX = Methotrexat, SSZ = Sulfasalazin, TNF = TNF-Inhibitoren

#### 1.2.1 DMARDs

Zu den DMARDs werden Medikamente mit unterschiedlichen Wirkstoffen und Wirkungsweisen wie MTX, Leflunomid, Hydroxychloroquin, Sulfasalazin, Azathioprin, Ciclosporin A, D-Penicillinamin und Cyclophosphamid gezählt. MTX ist ein Folsäureantagonist aus der Klasse der Zytostatika, der unter anderem das Enzym Dihydrofolatreduktase (DHFR) durch seine strukturelle Ähnlichkeit zur Folsäure reversibel inhibiert [50]. Hierdurch wird die Reduktion von Dihydrofolsäure zu Tetrahydrofolsäure gehemmt und die von der Tetrahydrofolsäure abhängige De-

novo-Synthese von DNA und RNA verhindert [50]. MTX hat sich als ein hochwirksames DMARD etabliert und wird, insofern keine Kontraindikationen wie zum Beispiel Schwangerschaft, Stillzeit oder eine fortgeschrittene Niereninsuffizienz vorliegen, als Mittel erster Wahl bei der Therapie der RA eingesetzt [37]. MTX spielt eine Schlüsselrolle in der Therapie der RA. Aufgrund seiner Wirksamkeit aber auch vieler zulassungsrelevanter Studien, kann es als Monotherapeutikum oder auch in der Kombination mit weiteren DMARDs oder Biologica eingesetzt werden [37, 51]. Die klinische Wirksamkeit des MTX konnte bisher durch kein anderes Medikament aus der Klasse der DMARDs und auch nicht durch eine Monotherapie mit TNF-Inhibitoren übertroffen werden [37, 51-53].

Bei Kontraindikationen oder Unverträglichkeit gegen MTX können auch andere klassische DMARDs wie zum Beispiel Sulfasalazin, dem Dihydroorotat-Dehydrogenase Inhibitor Leflunomid oder Antimalariamittel wie Hydroxychloroquin eingesetzt werden. Hydroxychloroquin wirkt immunmodulatorisch über eine Inhibierung der Toll-like-Rezeptoren und über eine Beeinflussung der lysosomalen Aktivität, was zu einer Behinderung der Antigenprozessierung führt [54, 55]. Unter Therapie mit dem Antimalariamittel Hydroxychloroquin kommt es zu einer verminderten Aktivität der NK-Zellen und einer geringeren Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL1, IL2 und  $TNF\alpha$  [56].

Der Einsatz von parenteralem Gold als Alternativ-DMARD ist aufgrund zunehmend geringerer Erfahrung im klinischen Alltag umstritten, wird aber aufgrund der immer noch hohen Evidenz aufgrund älterer Studien in der EULAR-Empfehlung weiter berücksichtigt [37, 57].

### **1.2.2 Rituximab**

Rituximab ist ein monoklonaler Ak, der spezifisch gegen das Oberflächenantigen CD20 der B-Lymphozyten gerichtet ist und eine schnelle und anhaltende Depletion

der peripheren B-Lymphozyten, der B-Lymphozyten im Knochenmark und der B-Lymphozyten in der Synovia mit sich bringt [58-60]. Rituximab dezimiert reife B-Lymphozyten und auch Vorläuferzellen der B-Lymphozyten von den frühen Prä-B-Lymphozyten bis hin zu den Gedächtniszellen der B-Lymphozyten [61, 62]. B-Lymphozyten ohne das Oberflächenantigen CD20 wie zum Beispiel Stammzellen der B-Lymphozyten, Pro-B-Lymphozyten oder terminal differenzierte B-Lymphozyten werden hingegen nicht erfasst [61, 62]. Über den Fc-Teil des monoklonalen Ak wirkt Rituximab direkt zytotoxisch, aktiviert das Komplementsystem und führt letztendlich zur Apoptose der CD20+ B-Lymphozyten [61, 62]. Zur Therapie der RA ist Rituximab in Anlehnung an die EULAR-Empfehlungen indiziert, wenn eine Monotherapie oder Kombinationstherapie mit DMARDs keine ausreichende Remission der Krankheitsaktivität bewirkt hat und auch eine TNF-Inhibitor Therapie nur eine inadäquate Besserung brachte [59, 63, 64]. Von besonderer Relevanz ist die Eigenschaft des monoklonalen CD20-Ak Rituximab, als einziges Biologicum zuverlässig auch bei positiver Malignom-Anamnese oder bei einigen Kontraindikationen für TNF-Inhibitoren, wie zum Beispiel einer latenten Tuberkulose, eingesetzt werden zu können [37].

### **1.2.3 Abatacept**

Abatacept ist ein Fusionsprotein, das zum einen aus der modifizierten Fc-Region des IgG1 und zum anderen aus der extrazellulären Domäne des humanen CTLA-4 (zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4) zusammengesetzt ist [65, 66]. Um T-Lymphozyten aktivieren und eine adäquate Immunreaktion generieren zu können, bedarf es einer Co-Stimulation der T-Lymphozyten durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs). Hierzu müssen die T-Lymphozyten über die APCs sowohl durch ein an das MHC-Molekül gebundenes Antigen als auch durch das Oberflächenantigen CD80/CD86 aktiviert werden [66, 67]. Das Fusionsprotein Abatacept bindet mit größerer Affinität an das CD80/86 Oberflächenantigen der APCs als das CD28 der T-Lymphozyten [66]. Somit inhibiert Abatacept die CD28-abhängige T-Zell-Antwort

in naiven und nicht-naiven CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten und die damit verbundene T-Zell-Aktivierung und Proliferation und damit letztendlich auch die immunologische Antwort der B-Lymphozyten [65, 66, 68]. Insofern bei RA Patienten nach 6 Monaten unter Therapie mit klassischer DMARD-Monotherapie und DMARD-Kombinationstherapie keine ausreichende Remission der Erkrankung erzielt wurde, sollten Biologica, gegebenenfalls in Kombination mit MTX zum Einsatz kommen [37]. Neben den TNF $\alpha$ -Inhibitoren Adalimumab, Certolizumab Pegol, Etanercept, Golimumab oder Infliximab können als erste Biologica der IL6-Inhibitor Tocilizumab oder auch Abatacept verwendet werden [37].

#### **1.2.4 TNF-Inhibitor Therapie**

Die Therapie der RA hat sich durch den möglichen Einsatz spezifischer Zytokin-modulierender Pharmaka wie den TNF $\alpha$ -Inhibitoren gewandelt. Das Zytokin TNF $\alpha$  nimmt in der Initiierung und Aufrechterhaltung von Entzündungen eine entscheidende Rolle ein, da es diverse zelluläre und humorale Prozesse beeinflusst [69-71]. Viele verschiedene Immunzellen aber auch Nicht-Immunzellen wie T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Mastzellen, Granulozyten, Fibroblasten oder glatte Muskelzellen sind in der Lage, auf Stimuli wie IL1, IL17, GM-CSF, Interferon- $\gamma$  oder Komplementfaktoren mit der Sekretion von TNF $\alpha$  zu antworten [72]. Die TNF-Sekretion dieser Zellen unterliegt komplexen positiven und negativen Rückkopplungsmechanismen. Beispielsweise verstärkt TNF-induziert vermehrt sezernierte Zytokine wie IL1, IL2 oder Interferon- $\gamma$  selbst die weitere TNF-Ausschüttung [72]. Andererseits gibt es Moleküle wie zum Beispiel IL10, Prostaglandine oder Glukokortikoide, die inhibitorisch auf die mRNA Transkription des TNF wirken [72]. Auch die Substanzklasse der Glukokortikoide setzt an dieser Stelle an. Die Stimulation zur TNF-Produktion befähigter Zellen bewirkt eine Oberflächenantigen-Expression von tmTNF-Trimeren (transmembrane TNF), von welchen über das Enzym TACE (TNF $\alpha$ -Converting Enzyme) löslicher sTNF (soluble TNF) abgespalten wird [72]. Sowohl tmTNF als auch sTNF sind aktive

proinflammatorische Zytokine, die bei TNF-responsiven Zellen über die Oberflächenrezeptoren TNFR1 (TNF-Rezeptor 1) und TNFR2 (TNF-Rezeptor 2) Signalkaskaden einleiten können [72]. Über diese Signalkaskaden kommt es zur Apoptose, zur NF- $\kappa$ B Aktivierung und zur Aktivierung inflammatorischer Gensequenzen [72]. Die Konzentration des TNF hängt direkt vom induzierten Stimulus, dem involvierten Zelltyp, dem Anteil aktiver TACE und den natürlichen TACE-Inhibitoren wie zum Beispiel der Metalloproteinase-3 ab [72, 73]. Bei der RA induziert das proinflammatorische Zytokin TNF $\alpha$  eine Aktivierung von Makrophagen, Synoviozyten, Chondrozyten und Osteoklasten [71, 72]. Diese Aktivierung bewirkt eine lokale Inflammation, fördert die Pannusbildung und führt schließlich zu Knorpelerosionen und Knochendestruktionen [71, 72]. Erhöhte TNF $\alpha$ -Konzentrationen wurden bei Patienten mit RA nicht nur systemisch, sondern auch in der Synovialflüssigkeit und der Synovialmembran gemessen [71, 74]. Außerdem korrelieren höhere TNF $\alpha$ -Konzentrationen mit höherer Krankheitsaktivität und destruktivem Krankheitsverlauf, da unter anderem die Osteoklastenfunktion direkt dosisabhängig zu sein scheint [71, 75].

Aktuell stehen mit Adalimumab, Etanercept, Certolizumab Pegol, Golimumab und Infliximab 5 zugelassene TNF $\alpha$ -Inhibitoren zur Behandlung der RA zur Verfügung. Infliximab ist ein chimärer monoklonaler Ak, welcher das Zytokin an der Interaktion mit dem TNFR1 und dem TNFR2 hindert [71]. Etanercept besteht aus zwei verschiedenen Molekülen. Zum einen aus der extrazellulären Domäne des TNFR2 und zum anderen aus dem Fc-Teil des IgG1, die gemeinsam die Bindung des TNF $\alpha$  an die TNF-Rezeptoren kompetitiv verhindern [71, 76]. Der TNF $\alpha$ -Inhibitor Adalimumab ist ein humaner, monoklonaler Ak des rekombinanten IgG1, der ebenfalls die Bindung an die TNF $\alpha$ -Rezeptoren verhindert [71]. Golimumab ist wie Adalimumab ein humaner, monoklonaler Ak, der sich jedoch sowohl gegen den löslichen als auch den transmembranen TNF-Rezeptor richtet und somit sowohl die Initiierung der TNF-induzierten Signalkaskade als auch die TNF-Aktivität der produzierenden Zelle inhibiert [71]. Certolizumab Pegol ist ein humanes

monovalentes und PEGyliertes Fab Ak-Fragment [71, 77]. Im Gegensatz zu den anderen TNF $\alpha$ -Inhibitoren besitzt es keine Fc-Domäne und hat aufgrund seiner strukturellen Unterschiede einen unterschiedlichen Wirkmechanismus und differierende pharmakodynamische Eigenschaften [77]. Eingesetzt werden sollten die TNF $\alpha$ -Inhibitoren, wenn die Krankheitsaktivität über 3-6 Monate mittels intensivierter DMARD-Therapie nicht zu kontrollieren ist [37, 71]. Bei Patienten mit frühzeitig diagnostizierter RA und einer hohen Krankheitsaktivität kann eine Therapie mit TNF $\alpha$ -Inhibitoren auch als Ersttherapie erwogen werden [71]. Bei ausbleibender Remission nach TNF $\alpha$ -Inhibitor Therapie kann auf einen anderen TNF $\alpha$ -Inhibitor [19] oder Biologica mit anderen Wirkmechanismen umgestellt werden [71, 78-80]. Trotz vieler positiver Wirkungen auf die Remission und die Langzeitergebnisse der RA Patienten sprechen jedoch bis zu 40-44% nur unzureichend auf TNF $\alpha$ -Inhibitoren an [70, 71].

### **1.2.5 Interleukin-6 Inhibitor Tocilizumab**

Das stark proinflammatorische IL6 kann von verschiedenen Zelltypen produziert werden, wobei vor allem die Makrophagen und die Fibroblasten eine entscheidende Rolle einnehmen [81, 82]. IL6 spielt eine maßgebliche Rolle in der Pathogenese der RA indem es die Inflammation initiiert, den Knochenmetabolismus beeinflusst und die Hämatopoese reguliert [82]. Es stimuliert die Fibroblasten, Osteoklasten und Makrophagen, wirkt unterstützend auf die Produktion der T-Helferzellen und regulatorischen T-Lymphozyten, beeinflusst die Aktivierung und Differenzierung der B-Lymphozyten und steigert die Produktion von CRP [82]. Über die vermehrte Ausschüttung verschiedener Akute-Phase-Proteine und die intrinsische pyrogene Eigenschaft, spielt IL6 eine entscheidende Rolle in der systemischen Manifestation der RA [82]. Die für den inflammatorischen Reiz der Synovia verantwortlichen neutrophilen Granulozyten werden ebenfalls von IL6 stimuliert und binden daraufhin vermehrt an Fibroblasten, was wiederum eine verstärkte Rekrutierung der Leukozyten und einen verstärkten inflammatorischen Reiz bewirkt [82, 83]. Es

kommt zur Pannusbildung, die unter anderem durch die IL6 induzierte Osteoklasten-Reifung und Osteoklasten-Aktivierung über RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand) sowie über die Proliferation der Synovia aufrechterhalten wird [82]. Ein wichtiger Bestandteil der Pannusbildung ist die Angiogenese, die über die Stimulation von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) durch IL6, IL1 $\beta$  und TNF $\alpha$  gesteigert wird [82, 84]. Die IL1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -Produktion kann durch eine IL6 vermittelte T<sub>H</sub>17-Differenzierung direkt stimuliert werden [82]. Es ist bekannt, dass die IL6-Konzentration in der Synovialflüssigkeit bei Patienten mit RA erhöht vorliegt und zusätzlich mit vermehrter Krankheitsaktivität und Gelenkdestruktion korreliert [82, 85]. Die Signaltransduktion des IL6 funktioniert über ein IL6-Rezeptorsystem, bestehend aus dem IL6-R und dem Molekül gp130 [82, 86]. IL6 kann sowohl über einen löslichen sIL6-R als auch über einen membrangebundenen mL6-R seine Funktion ausüben [82]. Der IL6/IL6-R-Komplex bewirkt eine Homodimerisierung des membrangebundenen gp130 und aktiviert unter anderem den Transkriptionsfaktor STAT3 und setzt somit die Signalkaskade fort [86, 87]. Eine Besonderheit des IL6 ist die Fähigkeit über einen löslichen sIL6-R einen Komplex mit dem gp130 zu bilden und somit auch direkt auf Zellen zu wirken, die keinen mL6-R sondern ausschließlich das ubiquitär vorhandene gp130 exprimieren [86, 88, 89]. Dieser Prozess wird auch als sogenanntes IL6-trans-signaling bezeichnet [86]. Der IL6-Inhibitor Tocilizumab ist ein humanisierter monoklonaler IgG1-Ak, der sowohl den sIL6-R als auch den mL6-R mit hoher Affinität binden und somit die Interaktion mit dem Zytokin IL6 verhindern kann [86]. Durch sämtliche beschriebene Funktionen des IL6 an der Pathogenese der RA ist Tocilizumab ein wichtiges Medikament bei inadäquater Remission der RA unter Therapie mit DMARDs. Tocilizumab wird als Biologicum erster Wahl neben den TNF-Inhibitoren und Abatacept empfohlen und ist auch als Biologicum zweiter Wahl nach Ersttherapie mit TNF-Inhibitoren zugelassen [37].

### **1.3 Einführung Immunsystem**

Die Hauptaufgabe des Immunsystems ist es, potenzielle Pathogene zu erkennen und diese über verschiedene Mechanismen einzudämmen und zu eliminieren. Sind diese Funktionen nicht gewährleistet, kann dies zum vermehrten Auftreten von Neoplasien oder Infektionskrankheiten führen. Außerdem sollte das Immunsystem unter Kontrolle gehalten werden und körperfremde Antigene hochspezifisch erkannt werden, da eine fehlgeleitete Immunregulation zu Allergien und Autoimmunerkrankungen führen kann. Um einen dem Immunsystem bekannten Erreger bei Reinfektion schneller und früher spezifisch attackieren zu können, bildet sich ein sogenanntes immunologisches Gedächtnis. Um eine Homöostase zwischen der Immunreaktion und der Immunregulation zu erreichen, werden verschiedene Teilaspekte des Immunsystems benötigt. Zu trennen sind grundlegend das erworbene, antigenspezifische und das angeborene, antigenunspezifische Immunsystem, die beide im Folgenden näher klassifiziert werden.

#### **1.3.1 Grundlagen des angeborenen Immunsystems**

Das angeborene Immunsystem ist phylogenetisch deutlich älter als das erworbene und ist bei jedem Tier und jeder Pflanze in bestimmter Form anzutreffen. Zum antigenunspezifischen Immunsystem zählt man neben humoralen und zellulären Bestandteilen auch chemische und physikalische Abwehrfaktoren der Haut und Schleimhaut. Erst wenn diese Barrieren durchbrochen sind kommt das zelluläre und humorale Immunsystem zum Einsatz. Die ersten an der Immunantwort beteiligten Zellen sind unspezifisch phagozytierende Zellpopulationen wie Makrophagen, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten. Makrophagen sind in der Lage Mikroorganismen aufzunehmen und abzutöten, sowie Zelltrümmer und tote körpereigene Zellen zu phagozytieren (als sogenannte "scavenger cells"). Darüber hinaus sind sie einer der Hauptproduzenten von verschiedenen Zytokinen wie zum Beispiel IL6, IL1 und  $TNF\alpha$  [7, 11]. Neben den basophilen und den eosinophilen

Granulozyten, die unter anderem eine entscheidende Rolle in der Abwehr von Parasiten spielen, sind neutrophile Granulozyten ebenfalls als Phagozyten an der frühen Bekämpfung körperfremder, potenziell pathogener Antigene beteiligt. Eine weitere Klasse phagozytotischer Zellen sind die dendritischen Zellen. Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen erkennen Mikroorganismen anhand einfacher, unspezifischer Moleküle, sogenannter pathogenassoziierter molekularer Muster (PAMPs) wie Oligosacchariden oder Lipopolysacchariden [90]. Mit Hilfe von Mustererkennungsrezeptoren (PRR = Pattern Recognition Receptors) kann zumindest ungefähr zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen unterschieden werden und ein relativ breites Spektrum von Erregern ohne vorherige Exposition erkannt werden [90]. Makrophagen und dendritische Zellen besitzen zusätzlich die Eigenschaft, als APCs das antigenspezifische Immunsystem zu aktivieren und stellen daher ein essentielles Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar. Ohne diesen Mechanismus wäre die Ausbildung eines erregerspezifischen, immunologischen Gedächtnisses nicht möglich und bei erneutem Erregerkontakt könnte keine optimierte Immunantwort stattfinden. Ebenfalls zum angeborenen Immunsystem werden die NK-Zellen gerechnet, obwohl diese anders als die bisher beschriebenen zellulären Anteile nicht von der myeloiden Vorläuferzelle, sondern genau wie die B- und T-Lymphozyten von der lymphatischen Vorläuferzelle abstammen. Die NK-Zellen sind in der Lage abnormale körpereigene Zellen wie zum Beispiel Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen abzutöten [91].

Als humorale Faktoren sind vor allem das Komplementsystem, Zytokine und Akute-Phase-Proteine relevant. Das Komplementsystem besteht aus proteolytisch wirksamen Enzymen, die pathogene Antigene opsonisieren und lysieren können und die Aktivität der Phagozyten modulieren [92]. Die Zytokine sind dagegen sehr heterogene Glykoproteine, die entschieden an der Aktivierung und Differenzierung verschiedener Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems beteiligt sind.

### **1.3.2 Grundlagen des erworbenes Immunsystems**

Das erworbene Immunsystem kann Abwehrreaktionen gegen spezifische Oberflächenstrukturen pathogener Antigene hervorrufen und bei Reinfektion mit demselben Pathogen schneller und effizienter reagieren. Genau wie beim angeborenen Immunsystem kann man auch das erworbene Immunsystem in zelluläre und humorale Faktoren unterteilen. Zu den zellulären Bestandteilen zählt man die B- und T-Lymphozyten und zu den humoralen die verschiedenen Immunglobuline (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) sowie diverse Zytokine wie zum Beispiel Interleukine und Interferone.

Um das angeborene Immunsystem aktivieren zu können bedarf es APCs, die das Bindeglied zwischen spezifischer und unspezifischer Immunantwort darstellen. Im Folgenden werden die Aktivierung und Differenzierung der T- und B-Lymphozyten besprochen. Die B-Lymphozyten sollen hierbei im Vordergrund stehen, da sie eine Hauptrolle in der vorliegenden Arbeit spielen.

### **1.3.3 Aktivierung und Differenzierung der T-Lymphozyten**

Entscheidend für die Antigenerkennung der T-Lymphozyten ist der T-Zell-Rezeptor (TCR), der die an den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC = Major Histocompatibility Complex) gebundenen Antigene der APCs bindet und diese detektieren kann. Stimuliert werden können die T-Lymphozyten letztendlich ausschließlich durch direkte Präsentation der pathogenen Peptide über MHC-Moleküle. Der TCR besteht aus zwei verschiedenen Polypeptidketten, der TCR $\alpha$ - und der TCR $\beta$ -Kette und ist dem Fab-Fragment der B-Lymphozyten sehr ähnlich [93]. Im Gegensatz zum B-Zell-Rezeptor kann der TCR jedoch nur ein Antigen binden und die T-Lymphozyten können keine TCRs sezernieren [93]. Von den MHC-Molekülen gibt es wiederum zwei verschiedene Klassen. MHC-I Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und können T-Lymphozyten, die den

Korezeptor CD8 exprimieren aktivieren [94]. Die CD8+ Fraktion der T-Lymphozyten bezeichnet man auch als zytotoxische T-Lymphozyten. Die MHC-II Moleküle sind hingegen nur auf APCs und im Thymusparenchym anzutreffen [93, 94]. T-Lymphozyten die den Korezeptor CD4 exprimieren, können über an das MHC-II Molekül gebundene Peptide aktiviert werden [94]. Diese CD4+ Fraktion der T-Lymphozyten bezeichnet man als T-Helferzellen ( $T_H$ -Zellen). Die CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten werden durch die Aktivierung befähigt, präsentierte und erkannte Antigene über Zytotoxine und Zytokine zu eliminieren. Die Aufgabe der  $T_H$ -Zellen ist dagegen die Aktivierung anderer Effektorzellen. Über den Einfluss von Zytokinen wie IL12 oder IL4 differenzieren sich die  $T_H$ -Zellen entweder zu  $T_H1$ -Zellen, die vor allem Makrophagen aktivieren oder zu  $T_H2$ -Zellen, die eher einen Einfluss auf die humorale Immunantwort nehmen [93].

Eine Besonderheit ist die zusätzliche Differenzierung der T-Lymphozyten zu sogenannten regulatorischen CD4+CD25+ T-Zellen, die ihrerseits andere Populationen der T-Lymphozyten aktiv inhibieren können [95]. Um bekannte Antigene bei erneutem Kontakt schneller und effektiver bekämpfen zu können, werden parallel zur akuten Immunantwort T-Gedächtniszellen gebildet.

#### **1.3.4 Funktion und Entwicklung der B-Lymphozyten**

B-Lymphozyten sind befähigt mit ihren B-Zell-Rezeptoren (BCR) Antigene zu erkennen und nach zusätzlicher Aktivierung Ak zu produzieren. Die Ak IgG, IgA, IgM, IgE und IgD sind Glykoproteine und haben neben der Funktion als BCR zu fungieren auch Effektorfunktionen [96]. Hierzu gehören die Opsonierung und somit die erleichterte Phagozytose von erkannten Antigenen, die Aktivierung des Komplementsystems und die Aktivierung von NK-Zellen [96].

Die Immunglobuline bestehen aus paarig zusammengelagerten Schwereketten (IgH) und Leichtketten (IgL), wobei die Schwerekette den Isotyp festlegt. Die IgH besteht aus einer variablen ( $V_H$ ) und 3-4 konstanten Domänen ( $C_H$ ) und die IgL aus einer

variablen ( $V_L$ ) und einer konstanten ( $C_L$ ) Domäne [96]. Die Bindungsstelle für die entsprechenden Antigene bilden jeweils die variable Domäne einer IgL und einer IgH. Die IgH- und IgL-Keimbahngene bestehen aus verschiedenen Abschnitten, den sogenannten V-Segmenten, D-Segmenten und J-Segmenten [96]. Für die Variabilität des BCR bzw. einer gesteigerten Antigen-spezifität der sezernierten Antikörper ist eine Umlagerung und Rekombination (sog. somatische Rekombination oder auch VDJ-Rearrangement) dieser verschiedenen Genloci essentiell [97].

Die B-Lymphozyten werden beim erwachsenen Menschen im Knochenmark ständig aus den hämatopoetischen Stammzellen neu gebildet (Lymphopoese). Über eine multipotente Vorläuferzelle zu einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle entsteht im Knochenmark, unterstützt von einer spezialisierten Mikroumgebung aus nichtlymphatischen Stromazellen, die erste Zelle der B-Lymphozyten-Linie (sog. Pro-B-Zelle) [93]. Bei der B-Lymphopoese findet ein stadienabhängiges Rearrangement der Immunglobulingene statt, was zu unterschiedlichen Genotypen und Immunphänotypen der unterschiedlichen Vorläuferzellen der B-Lymphozyten führt [96]. Ab dem Stadium der Pro-B-Lymphozyten findet die Umlagerung und Rekombination der Genloci statt und endet im Stadium der unreifen B-Lymphozyten [96]. Die Pro-B-Zellen haben nur noch eine begrenzte Fähigkeit zur Selbsterneuerung und können unter anderem durch die Oberflächenantigene CD34, CD19, CD10, Kit, IL7-Rezeptor und CD79a/b klassifiziert werden [96]. Nach erfolgreichem somatischem Rearrangement der Pro-B-Zelle wird eine erste vollständige Schwere-kette des Immunglobulins auf der entstandenen Prä-B-Zelle als Prä-B-Zell-Rezeptor exprimiert [93]. Immunphänotypisch kann man die Prä-B-Zelle anhand der Oberflächenantigene CD19, CD20, CD24 und BP-1 nachweisen [93]. Nachdem auch die Leichtkette durch genetische Rekombination zusammengesetzt wurde, wird ein vollständiges IgM auf der Oberfläche des entstandenen unreifen B-Lymphozyten ( $CD19^+CD20^+CD45^R^+CD24^+$ ) exprimiert [93]. Reife B-Lymphozyten kann man durch das zusätzlich exprimierte IgD auf der Zelloberfläche von den

unreifen B-Lymphozyten abgrenzen [93].

### **1.3.5 Aktivierung und Differenzierung der B-Lymphozyten**

Die reifen, im Knochenmark gebildeten B-Lymphozyten können im peripheren Blut und in der Lymphe über ihren BCR spezifisch Antigene binden, diese Antigene aufnehmen, phagozytieren und daraus Peptide generieren. Anschließend werden diese Peptide mittels MHC-II Molekülen auf ihrer Zelloberfläche präsentiert [98]. Ist zuvor eine  $T_H2$ -Zelle vom gleichen Antigen aktiviert worden, kann diese daraufhin antigen-spezifisch den B-Lymphozyten aktivieren. Am häufigsten werden die B-Lymphozyten durch  $T_H2$ -Zellen im lymphatischen Gewebe aktiviert, da dort die Konzentration der B- und T-Lymphozyten am größten ist und somit auch die Wahrscheinlichkeit, dass die beiden antigenspezifischen Zellen aufeinander treffen am höchsten ist [98]. Die  $T_H2$ -Zellen stimulieren die B-Lymphozyten über zwei Signale. Zusätzlich zur Bindung der  $T_H2$ -Zellen an das über MHC-II präsentierte spezifische Antigen des B-Lymphozyten ist eine Kostimulation durch Bindung von CD40L der T-Lymphozyten an das CD40-Oberflächenmolekül der B-Lymphozyten notwendig [98]. Nach Aktivierung exprimieren die B-Lymphozyten unter anderem Rezeptoren für IL4, IL5 und IL6, die wiederum von den  $T_H2$ -Zellen freigesetzt werden [99]. Durch diese Zytokine werden die B-Lymphozyten in den Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe zur klonalen Expansion angeregt und es findet eine Affinitätsreifung der antigenspezifischen Rezeptoren sowie ein Immunglobulinklassenwechsel statt [99, 100]. Die proliferierenden B-Zell-Klone wandern anschließend zu folliculären dendritischen Zellen und reifen bezüglich ihrer Antigenaffinität [98]. Selektiert werden B-Lymphozyten, die im Rahmen der somatischen Mutation im Bereich der antigenbindenden Domänen eine hochaffine Bindung zum Antigen aufweisen [100]. Beim Immunglobulinklassenwechsel kommt es zu einer Umordnung der Immunglobulingene der aktivierten B-Lymphozyten. Es werden die IgH-Gensegmente umgelagert und rekombiniert, so dass bei gleicher Antigenpezifität Immunglobuline mit verschiedenen Effektormechanismen

entstehen können [101]. In der Frühphase der humoralen Antwort wird stets IgM freigesetzt, während im Verlauf ein zunehmender Wechsel zu IgG, IgA und IgE je nach Antigen stattfindet [99].

Nachdem der naive CD3-CD19+CD20+CD27- [102] B-Lymphozyt T-Zell-abhängig aktiviert wurde, kann er sich in verschiedene Effektorzellen mit unterschiedlichem Wirkspektrum differenzieren. Zum einen können sich die aktivierten B-Lymphozyten zu CD3-CD19+CD20+CD27+ [102] Gedächtniszellen differenzieren, die in der Lage sind bei erneutem Antigenkontakt schnell und spezifisch zu reagieren. Andererseits können sich die naiven B-Lymphozyten in Plasmablasten und Plasmazellen differenzieren [100]. Die migratorischen CD3-CD19+CD20-CD27++ [103] Plasmablasten zirkulieren für kurze Zeit im Blut und können sich im Verlauf im Knochenmark oder entzündlichen Gewebe zu Plasmazellen weiterentwickeln [100]. Sowohl Plasmazellen als auch Plasmablasten sind in der Lage verschiedene Immunglobuline zu sezernieren, wobei ein Teil der Plasmazellen nur für einige Tage Ak produzieren kann (kurzlebige Plasmazellen) während ein anderer Teil in einem bestimmten Mikromilieu sehr lange weiter zur Produktion von Ak fähig ist (langlebige Plasmazellen) [100]. Die Plasmablasten sind die am häufigsten anzutreffenden terminal differenzierten B-Lymphozyten im peripheren Blut nach einer akuten Infektion oder im akuten Schub einer chronischen Entzündung und kommen bei gesunden Individuen jedoch nur zu einem sehr geringer Anteil von maximal 1-3% aller B-Lymphozyten vor [100, 104]. Der Hauptsitz der langlebigen Plasmazellen ist das Knochenmark, das unter anderem von CXCL12-exprimierenden Stromazellen organisiert wird [100, 105] und deren Überleben durch die Zytokine BAFF (B Cell Activating Factor), APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand) und IL6 langfristig garantiert wird [100]. Die CD3-CD19+CD20+CD27+ [102] Gedächtniszellen der B-Lymphozyten sind keine homogene Gruppe, sondern lassen sich weiter in verschiedene Subpopulationen differenzieren. Hierzu gehören differenzierte CD19+CD27+IgD-IgM- Gedächtniszellen die IgG+, IgA+ oder IgE+ exprimieren (switched memory b cells), CD19+CD27+IgD+IgM- Gedächtniszellen die IgD aber

nicht IgM exprimieren (non-switched memory b cells) und CD19+CD27+IgD-IgM+ Gedächtniszellen die zwar IgD auf ihrer Zelloberfläche verloren haben aber weiterhin IgM exprimieren (IgM memory cells) [106]. Die Funktionen dieser Subpopulationen der Gedächtniszellen der B-Lymphozyten sind bisher noch nicht vollständig bekannt. Es wurden jedoch Alterationen der beschriebenen Subpopulationen bei Patienten mit RA im Vergleich zu gesunden Individuen festgestellt [107].

#### **1.4 Die Rolle der B-Lymphozyten in der Pathogenese der RA**

Durch die effektive Therapie der RA durch gegen B-Lymphozyten gerichtete Antikörper, wie zum Beispiel den monoklonalen CD20-Ak Rituximab, wurde man auf die zentrale Rolle der B-Lymphozyten an der Pathogenese der RA aufmerksam. Da sich die vorliegende Arbeit vor allem der Veränderung der Subpopulationen der B-Lymphozyten bei Patienten mit RA unter unterschiedlicher Therapie widmet, soll an dieser Stelle der Einfluss der B-Lymphozyten an der Entstehung und Aufrechterhaltung der RA näher erläutert werden.

Bei gesunden Individuen gibt es gewöhnlich zwei Mechanismen B-Lymphozyten zu eliminieren, die gegen körpereigene Antigene autoreaktiv gerichtet sind [108]. Es gibt einen Kontrollpunkt im Knochenmark, an dem unreife B-Lymphozyten die polyreaktive oder antinukleäre Ak (ANA) exprimieren über ihren BCR und ihren Toll-like-Rezeptor (TLR) ausgesiebt werden [108-110]. Zu einem späteren Zeitpunkt können auch die ins Blut emigrierten B-Lymphozyten auf Autoreaktivität überprüft und unter anderem von regulatorischen T-Lymphozyten an der weiteren Differenzierung gehindert werden [108, 111]. Bei Patienten mit RA scheinen beide beschriebenen Kontrollpunkte defekt zu sein, weshalb bei diesen Patienten eine große Anzahl autoreaktiver, reifer B-Lymphozyten anzutreffen ist [108, 109]. Diese autoreaktiven B-Lymphozyten spielen durch verschiedene Mechanismen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der RA. Hierzu zählen die Produktion von

Auto-Ak, immunmodulierende Effekte auf T-Lymphozyten oder dendritische Zellen und die Produktion von inflammatorischen Zytokinen [108].

Es wurde beobachtet, dass sich die B-Lymphozyten bei Patienten mit RA in unterschiedlichen Kompartimenten anreichern und zusätzlich Alterationen der verschiedenen Subpopulationen der B-Lymphozyten auftreten [108]. Im Gegensatz zu gesunden Probanden konnte bei Patienten mit RA eine Infiltration der Synovia mit B-Lymphozyten nachgewiesen werden [112]. Diese Infiltration kann sowohl diffus als auch bei bis zu 30% folliculär organisiert sein [113, 114]. Bei der folliculären Infiltration der Synovia kommt es zur perivaskulären Aggregation von T-Lymphozyten, die von sich zu Plasmazellen differenzierenden B-Lymphozyten umgeben sind [113, 114]. Die Aktivität der Plasmablasten und kurzlebigen Plasmazellen scheint hier vor allem für die akute B-Zell-Antwort und die Schübe der Autoimmunerkrankung verantwortlich zu sein, während die langlebigen Plasmazellen in speziellen Nischen wie der entzündlichen Synovia oder dem Knochenmark langfristig unter anderem durch die Produktion von Auto-Ak an der Aufrechterhaltung der RA beteiligt sind [100].

Auch im peripheren Blut scheint es Alterationen der verschiedenen Subpopulationen der B-Lymphozyten zu geben [108]. Hinsichtlich der Verteilung der B-Lymphozyten auf die unterschiedlichen Subpopulationen, wie zum Beispiel die naiven CD3-CD19+CD20+CD27- B-Lymphozyten, die CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen oder die CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten, gibt es unterschiedliche Angaben in der Literatur [108]. Diese Variabilität scheint durch die verschiedenen Krankheitsphänotypen und die individuellen Phasen der Erkrankung bei unterschiedlichen Patienten zu entstehen [108].

## **2. Fragestellung der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, inwiefern sich verschiedene

Subpopulationen der B-Lymphozyten im peripheren Blut qualitativ und quantitativ unter unterschiedlichen immunsuppressiven Therapieschemata bei RA Patienten verändern. Zusätzlich sollen in einer Serumanalyse Veränderungen der Immunglobuline sowie der pro- und anti-inflammatorischen Zytokine im Serum detektiert werden. Folgende Fragen sollen hierbei im Einzelnen beantwortet werden:

1. Gibt es Unterschiede des Anteils der gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs zwischen RA Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe?
2. Verändert sich der Anteil der gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs bei RA Patienten unter Therapie mit TNF-Inhibitoren oder Tocilizumab?
3. Unterscheidet sich der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten, der CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen oder der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten zwischen RA Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe?
4. Verändert sich der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten, der CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen oder der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten bei RA Patienten unter Therapie mit TNF-Inhibitoren oder Tocilizumab?
5. Inwiefern verändert sich die Konzentration der Zytokine BAFF, IL6, IL21, IL35 und  $TNF\alpha$  im Serum der Patienten mit RA unter verschiedenen Therapieschemata?
6. Gibt es Unterschiede in der Verteilung der Immunglobulinklassen G, A und M im Serum der RA Patienten unter verschiedenen Therapieschemata?

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

### 3.1.1 Tabelle verwendeter Lösungen

Lösungen	Hersteller
Aqua destilliert	Apotheke Universitätsklinikum, Tübingen
Bovine Serum Albumine (BSA) pH 7,0	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
DMSO (Dimethylsulfoxide) C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
FACS Rinse	Becton & Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS Safe	Becton & Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow	Becton & Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS), inaktiviert	Invitrogen, Auckland, NZ
IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 12440 (1x) & L-Glutamine, 25mM HEPES GIBCO®	Invitrogen, Auckland, NZ
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-
LSM 1077 Lymphocyte Separation Medium	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
PBS: Dulbecco's PBS (1x) without Ca & Mg, steril	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
TrypanBlue Solution (0,4%)	SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA
Tween-20 0,05%	BioRad, München, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Lösungen

### 3.1.2 Tabelle verwendeter Chemikalien

Chemikalien	Zusammensetzung
ELISA Coating-Puffer (1:10)	- 1,2 ml Coating Puffer (ELISA-Kit) - 10,8 ml destilliertes H <sub>2</sub> O
ELISA Blocking-Puffer (1:10)	- 3 ml Assay Puffer A 20x (ELISA-Kit) - 27 ml destilliertes H <sub>2</sub> O
ELISA Assay Puffer 1x (1:20)	- 5 ml Assay Puffer A 20x (ELISA-Kit) - 95 ml destilliertes H <sub>2</sub> O
Wasch-Puffer (ELISA)	- 500 ml PBS - 0,05% Tween-20 (250 µl)
FACS-Puffer	- 500 ml PBS - 5g BSA - 1 ml NaN <sub>3</sub>

**Tabelle 3: Verwendete Chemikalien**

### 3.1.3 Tabelle verwendeter Einwegmaterialien

Einwegmaterial	Hersteller
15 ml Tube CELLSTAR <sup>®</sup>	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
50 ml Tube CELLSTAR <sup>®</sup>	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
96-well Zellkulturplatten Flat-Bottom, mit Deckel, Falcon <sup>®</sup>	Becton Dickison Labware, Franklin Lakes (USA)
96-well Zellkulturplatten U-Bottom, mit Deckel, CELLSTAR <sup>®</sup>	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
BD Microlance 3 Needles	BD Biosciences, Durham (USA)
Deckglas 24x50 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
EDTA KE/9ml Monovette <sup>®</sup>	Sarstedt, Nümbrecht

Eppendorf-Cups	Eppendorf AG, Hamburg
FACS-Tubes (PP-Tubes 1,3ml 8,55/44MM)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Latex-Handschuhe, verschiedene Größen	Ansell, Tamworth (UK)
Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim/Rhön
Objektträger Standard 76x26 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm	Pechiney, Plastic Packaging Menasha (USA)
Pasteurpipetten, Einweg, 3ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Sarstedt, Nümbrecht
Safety-Multifly <sup>®</sup> -Set	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipette verschiedene Volumina costar <sup>®</sup>	Corning Incorporated, Corning (USA)
Serologische Pipette verschiedene Volumina Falcon <sup>®</sup>	Becton Dickison Labware, Franklin Lakes (USA)
S-Monovette <sup>®</sup>	Sarstedt, Nümbrecht

**Tabelle 4: Verwendete Einwegmaterialien**

### 3.1.4 Tabelle verwendeter Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller
- 86°C Freezer	Forma Scientific, Inc., Marietta, Ohio, USA
Auflichtmikroskop Wilovert A	A Hund, Wetzlar
Analysewaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Computer, IBM kompatibel	Fujitsu Siemens Computers, München

Elektrische Eppendorf-Pipette „Easypet“	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
ELISA Reader Labsystems Multiskan MK II, Driver Version 4.04	ThermoScientific, Braunschweig, Deutschland
Eppendorf-Pipetten (verschiedene Volumina und Ausführungen)	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
FACS CyAn™ ADP	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Gilson-Pipetten, Pipetman (verschiedene Volumina)	Gilson, Inc., Middleton, USA
Glasspritzen, Fortuna® Optima®	Poulten & Graf GmbH, Wertheim, Deutschland
Kühlzentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Mikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Sterilisator, A16/50, BJ 1922, Inh. 14,6ltr	WEBECO, Selmsdorf, Deutschland
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

**Tabelle 5: Verwendete Laborgeräte**

### 3.1.5 Tabelle verwendeter Antikörper

Antigen	Klon	Fluorochrom	Ak-Konzentration	Hersteller
CD3	BW264/56	FITC	Keine Angabe d. Herstellers	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CD4	M-T466	PE	1 mg/ml	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CD4	MOPC-21	APC-H7	Keine Angabe d. Herstellers	BD Bioscience, San Jose, CA, USA

CD4	OKT-4	PB	Keine Angabe d. Herstellers	Ebioscience, San Diego, CA, USA
CD4	RPA-T4	APC	Keine Angabe d. Herstellers	Ebioscience, San Diego, CA, USA
CD20	L27	APC-H7	100 µl/ml	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
CD19	HIB-19	PB	Keine Angabe d. Herstellers	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD27	O323	PE	Keine Angabe d. Herstellers	BioLegend, San Diego, CA, USA

**Tabelle 6: Verwendete Antikörper**

### 3.1.6 Tabelle verwendeter Software

Bezeichnung	Version	Hersteller
Excel 2016	1.0	Microsoft®
IBM® SPSS® Statistics	22.0.0	IBM®
Summit®	4.3 Build 2445	Dako Cytomation

**Tabelle 7: Verwendete Software**

## 3.2 Patientengruppen und Kontrollgruppe

Die Patientenproben wurden aus der rheumatologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Tübingen und der rheumatologischen Schwerpunktpraxis Dr. med. Swen H. Jacki in Tübingen bezogen. Es wurden Patienten mit RA unter verschiedenen Therapiekonzepten und eine gesunde Kontrollgruppe untersucht.

Für die untersuchten Patientengruppen und für die gesunde Kontrollgruppe wurden jeweils 10 Proben generiert. Für die FACS-Messungen wurden im Vergleich zur Serumanalyse mittels ELISA nicht die identischen Patienten und nicht die identischen Probanden der Kontrollgruppe verwendet.

gesunde Kontrollgruppe	Es wurden gesunde, freiwillige Probanden in die Studie eingeschlossen.
Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie	RA Patienten ohne stärkere Immunsuppression, wobei <5 mg Prednisolon pro Tag + Sulfasalazin oder Hydroxychloroquin zugelassen waren.
Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie	RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie, wobei die TNF-Inhibitoren Etanercept (Enbrel®) und Adalimumab (Humira®) zugelassen wurden. Als Begleitmedikation waren Methotrexat oder Leflunomid zugelassen.
Patienten unter Tocilizumab Therapie	RA Patienten unter IL6-Inhibitor Therapie (Tocilizumab® i.v. oder s.c.), wobei Methotrexat oder Leflunomid als Begleitmedikation zugelassen waren.

**Tabelle 8: Darstellung der verschiedenen Versuchsgruppen**

Es wurden sowohl seronegative Patienten mit RA als auch seropositive Patienten mit RA in die jeweilige Patientengruppe eingeschlossen. Bei allen RA Patienten wurde die Erkrankung anhand der ACR-EULAR Klassifikation 2010 (Daniel Aletaha, Tuhina Neogi et al. 2010) diagnostiziert. Alle teilnehmenden Patienten und allen gesunden Probanden wurden 20 ml EDTA-Vollblut und 10 ml Serum abgenommen.

Die teilnehmenden Personen wurden zuvor über Risiken und Nebenwirkungen informiert und das Projekt wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen überprüft und am 17. Januar 2014 genehmigt.

### **3.3 Bestimmung der Subpopulationen der B-Lymphozyten und Durchführung einer Serumanalyse**

Ziel der Arbeit war es den Anteil verschieden differenzierter Subpopulationen der B-Lymphozyten bei RA Patienten unter verschiedener Therapie und bei einer gesunden Kontrollgruppe zu detektieren. Sowohl der Einfluss der RA auf die B-Lymphozyten und deren verschiedener Differenzierungsstufen als auch der Effekt der unterschiedlichen Medikamente sollte untersucht werden.

Für diese Klassifizierung wurde eine Immunphänotypisierung mittels FACS-Analyse verwendet. Die Gesamtheit der B-Lymphozyten wurde als CD3-CD19+, naive B-Lymphozyten als CD3-CD19+CD20+CD27-, Gedächtniszellen der B-Lymphozyten als CD3-CD19+CD20+CD27+ [102] und Plasmablasten als CD3-CD19+CD20-CD27++ [103] klassifiziert. Zusätzlich zur Immunphänotypisierung wurden Serumanalysen der gesunden Kontrollgruppe und der verschiedenen Patientengruppen durchgeführt. Hiermit sollten Alterationen der Serumkonzentrationen von Zytokinen und Immunglobulinen bei RA Patienten unter verschiedenen Therapieansätzen und bei einer gesunden Kontrollgruppe erfasst werden. Untersucht wurden hierfür die Serumkonzentrationen von IgG, IgA, IgM, BAFF, IL6, IL21, IL35 und TNF $\alpha$ .

### **3.4 Immunphänotypisierung mit dem FACS-Gerät**

Mittels Immunphänotypisierung ist es möglich, verschiedenste zellmembranständige Antigene zu detektieren und die verschiedenen Zellen somit zu typisieren. Neben der rein morphologischen Beurteilung von Zellgröße und Zellgranularität kann somit

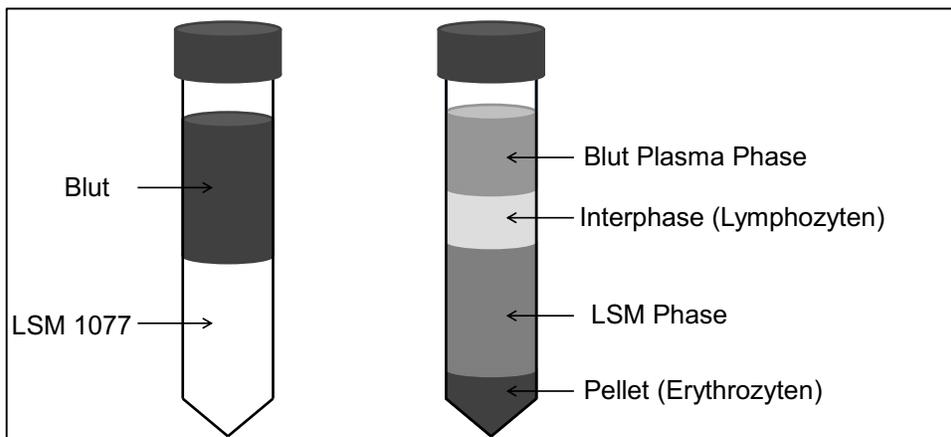
eine weitere Subtypisierung der jeweiligen Zellreihe erfolgen. Mit Hilfe der Multicolor-Durchflusszytometrie können auf derselben Zelle gleichzeitig mehrere Antigene immunfluoreszierend markiert werden und aus der Kombination dieser Antigene kann auf die Herkunft und Differenzierung der jeweiligen Zelle rückgeschlossen werden. Somit können auch die verschiedenen differenzierten Populationen der B-Lymphozyten innerhalb des Vollblutes einer gewonnenen Probe qualitativ und quantitativ differenziert werden.

Nach Isolierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes, zu denen Lymphozyten und Monozyten gehören, wurden 4-fach Färbungen mittels der Fluorochrome FITC, PE, PB und APC-H7 angefertigt. Mittels der genannten fluoreszierenden Antikörper wurden die Oberflächenantigene CD3 (FITC), CD27 (PE), CD19 (PB) und CD20 (APC-H7) markiert. Anhand dieser Oberflächenantigene konnte anschließend auf die Differenzierung des jeweiligen B-Lymphozyten rückgeschlossen werden und das Verhältnis der verschiedenen Subpopulationen bei den verschiedenen Patientengruppen und der Kontrollgruppe angegeben werden. Von besonderer Relevanz war hierbei das Verhältnis von CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen der B-Lymphozyten [102], CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten [103] und CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten [102].

### **3.4.1 Ficoll Gradient**

Jedem der RA Patienten und jedem Probanden der Kontrollgruppe wurden zwei 10ml EDTA-Röhrchen Blut für die Immunphänotypisierung abgenommen. Zur Isolierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs = Peripheral Blood Mononuclear Cells) wurde die Ficoll-Dichte-zentrifugation nach dem Protokoll von PAA verwendet (GmbH, P.L. Protocol for Use Lymphocyte Separation Medium LSM 1077. 2012.). Das zuvor abgenommene und maximal 24 Stunden alte EDTA-Blut wurde zunächst mit dem PBS-Puffer auf 30 ml Gesamtvolumen (18 ml EDTA

Blut und 12 ml PBS) verdünnt. Anschließend wurde das verdünnte EDTA-Blut vorsichtig auf 15 ml Lymphozyten Separationsmedium (LSM) pipettiert, was aufgrund der höheren Dichte ( $D = 1,077 \text{ g/ml}$ ) dieses Mediums möglich ist. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sich das verdünnte EDTA-Blut nicht mit dem zytotoxischen Separationsmedium vermischt. Nach Zentrifugation bei  $22^\circ\text{C}$  über 35 min mit 1800 U/min bildeten sich je nach Dichte die in Abbildung 2 dargestellten, unterschiedlichen Phasen. Die gewünschten Lymphozyten und auch die Monozyten befinden sich entsprechend ihrer spezifischen Dichte zwischen Überstand (Plasma und Thrombozyten) und dem Separationsmedium in der sogenannten Interphase. Aufgrund ihrer höheren Dichte bilden die Erythrozyten und die Granulozyten das Zellsediment. Die Interphase wurde in PBS-Puffer aufgenommen und daraufhin zwei Mal mit PBS bei  $4^\circ\text{C}$  über 20 min bei 1500 U/min gewaschen.



**Abbildung 2: EDTA-Blut vor und nach der Dichtezentrifugation. [146]**

Mittels der Dichtezentrifugation wurden aus dem EDTA-Blut der Patienten und der gesunden Probanden die PBMCs (Lymphozyten und Monozyten) isoliert und anschließend zur FACS-Analyse verwendet.

### 3.4.2 Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer Zählkammer

Die Gesamtzahl der mittels Ficoll-Dichtezentrifugation isolierten Lymphozyten und Monozyten wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Zunächst wurden

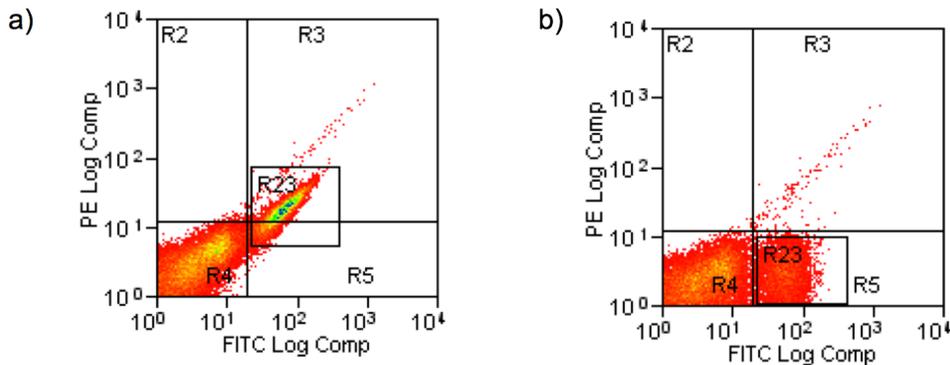
die isolierten Zellen in 5 ml PBS-Puffer resuspendiert. Der Zellsuspension wurden nun 20 µl der Zellsuspension entnommen und mit 20 µl Trypanblau angefärbt. Die entstandene 1:1 Verdünnung wurde mittels Pipette zwischen Neubauer Zählkammer und Deckglas gebracht. Jeder der vier Quadranten (Volumen je 0,1 µl) der Zählkammer wurde gezählt und anschließend der Mittelwert aus den Zählungen gebildet. Der ermittelte Mittelwert wurde daraufhin mit  $2 \times 10^4$  multipliziert, was der jeweiligen Anzahl der PBMCs pro ml entspricht. Mit den isolierten und gezählten Zellen konnten nun die sich anschließenden 1-fach Färbungen und 4-fach Färbungen zur Immunphänotypisierung erfolgen.

### **3.4.3 FACS-Färbung und Antikörperkonzentrationen**

Es wurden mit den isolierten Zellen sowohl 1-fach Färbungen mit den Fluorochromen CD3 FITC, CD4 PE, CD4 APC, CD4 PB und CD4 APC-H7 als auch jeweils drei 4-fach Färbungen mit den Fluorochromen CD3 FITC, CD27 PE, CD19 PB und CD20 APC-H7 durchgeführt. Als Ergebnis wurden stets die Mittelwerte der drei 4-fach Färbungen verwendet. Zusätzlich wurde eine Kontrollprobe mit  $2 \times 10^5$  Zellen ohne Fluorochrome mitgeführt. Für die 1-fach Färbungen wurden  $2 \times 10^5$  Zellen und für die 4-fach Färbungen  $1 \times 10^6$  Zellen verwendet. Die 1-fach Färbungen waren notwendig, da die Fluorochrome FITC und PE bei der durchflusszytometrischen Messung gleichzeitig vom selben Laser erfasst werden und daher ein teilweise überlappendes Emissionsspektrum aufweisen.

Kompensiert wurde mit Hilfe der Mess- und Auswertungssoftware Summit® von DakoCytomation. Angewandt wurde das Digital Signal Processing (DSP) Kompensations-Verfahren, das es ermöglicht, kompensierte Signale in Echtzeit darzustellen und gleichzeitig eine unkompensierte Speicherung der Rohdaten zulässt. Die Grundeinstellung des verwendeten FACS-Geräts musste stets identisch sein um vergleichbare Datensätze generieren zu können. Auch um diese

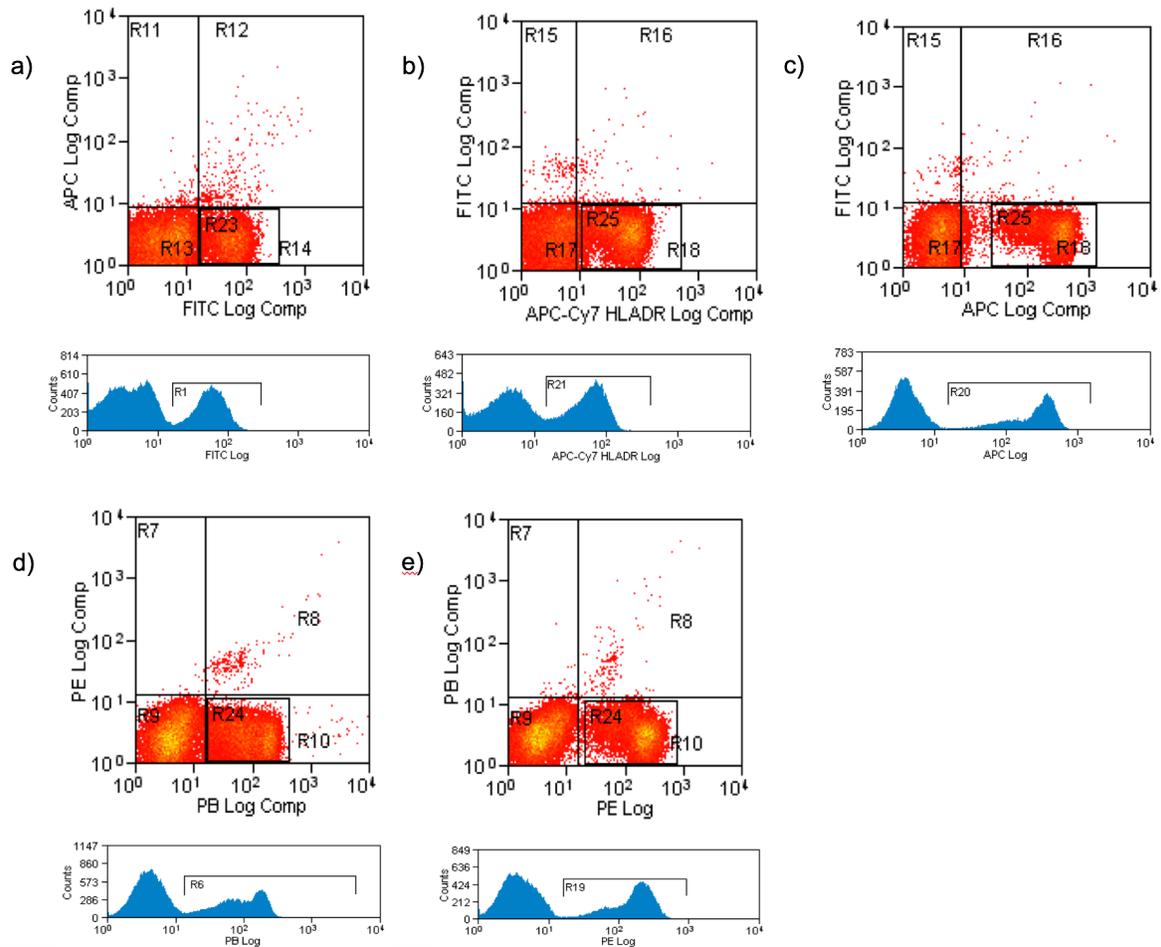
Einstellungen zu überprüfen wurden für die Messung jedes einzelnen Patienten die oben erwähnten Einzelfärbungen mit durchgeführt.



**Abbildung 3: PE-FITC-Diagramm a) vor der Kompensation und b) nach stattgehabter Kompensation mit PBMCs.**

Die Fluorochrome FITC und PE wurden bei der durchflusszytometrischen Messung vom selben Laser (blauer Laser, 488nm) erfasst und weisen daher ein überlappendes Emissionsspektrum auf. Daher mussten die beiden Fluorochrome FITC und PE vor gleichzeitiger Verwendung zur Darstellung der Oberflächenantigene kompensiert werden.

Die zuvor isolierten PBMCs wurden in eine 96-Kammer-Platte pipettiert und in FACS-Puffer aufgenommen. Alle folgenden Waschschriffe wurden mit 200 µl FACS-Puffer bei 4°C über 4 min und mit 1400 U/min durchgeführt. Zu den  $2 \times 10^5$  Zellen für die 1-fach Färbungen wurde anschließend 25 µl Fc-Blocker und zu den  $1 \times 10^6$  Zellen 50 µl Fc-Blocker hinzugefügt und daraufhin 5 min bei 4°C inkubiert. Die Verwendung des Fc-Blockers ist nötig, um unspezifische Bindungen möglichst zu verhindern. Ohne weiteren Waschschriff wurden nun für die 1-fach Färbungen je 5 µl Antikörper in unterschiedlicher Konzentration (siehe Tabelle 9) und je 20 µl FACS-Puffer zu den Zellen und dem Fc-Block pipettiert. Den drei Ansätzen der 4-fach Färbungen wurden je 10 µl der Antikörper CD27 PE, CD20 APC-H7, CD3 FITC und CD19 PB in unterschiedlicher Konzentration (siehe Tabelle 10) hinzugefügt. Die Ansätze in der 96-Kammer-Platte wurden bei 4°C über 30 min lichtgeschützt inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die fluoreszenz-markierten Zellen 2x gewaschen und in jeweils 400 µl FACS-Puffer in 5 ml FACS-Röhrchen aufgenommen. Die FACS-Röhrchen wurden zum Lichtschutz in Aluminiumfolie gehüllt, auf Eis gelagert und innerhalb von maximal 60 min mit dem CyAn™ ADP FACS-Gerät gemessen.



**Abbildung 4: Darstellung der durchflusszytometrischen Einzelfärbungen der Fluorochrome a) FITC, b) APC-H7, c) APC, d) PB und e) PE mit PBMCs in Dotplots und Histogrammkurven.** Vor Durchführung der 4-fach Färbungen wurden stets 1-fach Färbungen aller verwendeten Fluorochrome durchgeführt, um diese kompensieren zu können und um eine optimale Abgrenzung der jeweiligen Emissionsspektren zu erreichen.

verwendete Antikörper	Ak-Konzentration in FACS-Puffer
CD3 FITC	1:100
CD4 PE	1:100
CD4 APC	1:100
CD4 PB	1:100

CD4 APC-H7	1:20
Fc-Block humanes IgG	1:50

**Tabelle 9: Ak-Konzentrationen der 1-fach Färbungen**

verwendete Antikörper	Ak-Konzentration in FACS-Puffer
CD3 FITC	1:100
CD 20 APC-H7	1:25
CD 27 PE	1:50
CD 19 PB	1:100
Fc-Block humanes IgG	1:50

**Tabelle 10: Ak-Konzentrationen der 4-fach Färbungen**

#### **3.4.4 FACS-Gerät und FACS-Messung**

Zur Messung der fluoreszierend markierten PBMCs wurde das Durchflusszytometer CyAn™ ADP mit drei verschiedenen Lasern (Wellenlängen: 635nm, 488nm, 405nm) verwendet. Mit Hilfe des Durchflusszytometers kann für jede einzelne Zelle einer Probe sowohl die Größe und die Zellgranularität als auch die Fluoreszenzintensität eines oder mehrerer fluoreszierend markierter Antikörper gemessen werden. Die Größe wird hierbei über die Vorwärtsstreuung (FCS) und die Zellgranularität über die Seitwärtsstreuung (SSC) detektiert. Die zu untersuchenden Zellen passieren die Messeinheit des Durchflusszytometers einzeln hintereinander, was durch eine vibrierende Fließkammer erreicht wird. Durch das Auftreffen des entsprechenden Laserlichtstrahls auf jede einzelne Zelle kommt es zur Seitwärtsstreuung und zur Vorwärtsstreuung. Zusätzlich werden die an die Zelle gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe FITC, PE, APC, PB und APC-H7 zur jeweils charakteristischen Lichtemission angeregt. Dieser charakteristisch emittierte

Lichtstrahl wird daraufhin über ein System umlenkender und selektiver halbdurchlässiger Spiegel zu einem Detektionssystem fortgeleitet.

### **3.4.5 Auswertung der FACS-Daten**

Zur Auswertung der erhobenen Daten wurde genau wie zuvor für die Durchführung der beschriebenen Kompensation die durch DakoCytomation bereitgestellte Mess- und Auswertungssoftware Summit<sup>®</sup> verwendet. Verschiedene Parameter wie zum Beispiel der prozentuale Anteil der B-Lymphozyten an der Gesamtpopulation der PBMCs oder der prozentuale Anteil der verschiedenen differenzierten B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten wurden in Excel Tabellen übernommen.

### **3.5 Bestimmung verschiedener Serumzytokine mittels ELISA-Technik**

Zusätzlich zur Immunphänotypisierung der B-Lymphozyten wurden die Serumkonzentrationen der Immunglobuline IgG, IgA und IgM sowie die Serumkonzentration der Zytokine BAFF, IL6, IL21, IL35 und TNF $\alpha$  mittels ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay) gemessen. Zur Quantifizierung der unterschiedlichen Serumkonzentrationen an Immunglobulinen und Zytokinen wurde die in Abbildung 5 schematisch dargestellte Sandwich-ELISA Technik angewendet.

Die ELISA-Experimente wurden mit dem Quantikine<sup>®</sup> ELISA BAFF Kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA), Human IgA Ready-SET-Go<sup>®</sup> Kit (eBioscience, Inc., San Diego, USA), Human IgG Ready-SET-Go<sup>®</sup> Kit (eBioscience, Inc., San Diego, USA), Human IgM Ready-SET-Go<sup>®</sup> Kit (eBioscience, Inc., San Diego, USA), Human IL6 Ready-SET-Go<sup>®</sup> Kit (eBioscience, Inc., San Diego, USA), Legend Max<sup>®</sup> Human IL35 Heterodimer Kit (BioLegend, Inc., San Diego, USA), Human TNF $\alpha$  Ready-SET-Go<sup>®</sup> Kit (eBioscience, Inc., San Diego, USA) und dem Human IL21 Ready-SET-Go<sup>®</sup> Kit (eBioscience, Inc., San Diego, USA) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Protokolle variieren je nach gesuchtem

Antigen insbesondere in den verwendeten Antikörpern, Puffern und den Inkubationszeiten. Im Folgenden wird der allgemeine Ablauf der ELISA-Experimente dargestellt.

### 3.5.1 Durchführung der quantitativen Messungen mittels ELISA-Technik

Zunächst wurde die im jeweiligen ELISA Kit enthaltene 96-well Platte mit einem für das jeweilige Antigen spezifischen anti-humanen Ak beschichtet. Die verwendeten Puffer wurden in den verlangten Konzentrationen stets mit destilliertem Wasser hergestellt. Hierzu wurden 100 µl/well des Coating Puffers (Ak-Konzentration 1:250) hinzugegeben und die Platte abgedeckt über 24h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde 2x gewaschen (400 µl/well mit Waschpuffer), mittels Blockpuffer (250 µl/well) unspezifische Bindungen verhindert und 2h bei 4°C inkubiert. Als nächstes wurden Standardverdünnungen mit einem rekombinanten humanen IgG-Ak zur Generierung einer Standardkurve und zur Eichung der gemessenen Probandenwerte hergestellt. Außerdem wurde auch eine Probenverdünnung des gewonnenen Serums der Probanden durchgeführt. Pro Patient und pro Standardverdünnung wurden stets 2 wells angelegt um reproduzierbare Ergebnisse zu generieren.

#### Standardverdünnung mit Assay Buffer A

Sv. 1 - 100 ng/ml:	250 µl Assay Buffer A	+ 250 µl aus 200 ng/ml Standard
Sv. 2 - 50 ng/ml:	250 µl Assay Buffer A	+ 250 µl aus 100 ng/ml Standard 1
Sv. 3 – 25 ng/ml:	250 µl Assay Buffer A	+ 250 µl aus 50 ng/ml Standard 2
Sv. 4 - 12,5 ng/ml:	250 µl Assay Buffer A	+ 250 µl aus 25 ng/ml Standard 3
Sv. 5 - 6,25 ng/ml:	250 µl Assay Buffer A	+ 250 µl aus 12,5 ng/ml Standard 4
Sv. 6 - 3,125 ng/ml:	250 µl Assay Buffer A	+ 250 µl aus 6,25ng/ml Standard 5
Sv. 7 – 1,56 ng/ml:	250 µl Assay Buffer A	+ 250 µl aus 3,125 ng/ml Standard 6
Sv. 8 – 0 g/ml:	Assay Buffer A	

#### Probenverdünnung (1:500.000) mit Assay Buffer A

Vorverdünnung 1 (1:100): 990 µl Assay Buffer A + 10 µl Probandenserum  
Vorverdünnung 2 (1:100): 990 µl Assay Buffer A + 10 µl aus Vorverdünnung 1  
Endverdünnung 3 (1:50): 490 µl Assay Buffer A + 10 µl aus Vorverdünnung 2

Von den hergestellten Standardverdünnungen und von den Endverdünnungen (1:500.000) der Probandenserum wurden in jedes well 100 µl pipettiert und daraufhin abgedeckt für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 4x gewaschen und 100 µl/well des biotinylierten, mit HRP konjugierten Detektionsantikörper (1:250) zu jeder der Proben hinzugefügt. Nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur und 4x Waschen wurden letztendlich pro well 100 µl einer Substratlösung mit Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid in die Platte pipettiert. Inkubiert wurde für 15 Minuten abgedeckt bei Raumtemperatur und anschließend eine Stopp-Lösung (100 µl/well) hinzugegeben, welche die Reaktion des Wasserstoffperoxids mit der Meerrettichperoxidase (HRP) stoppt. Durch die Reaktion des  $H_2O_2$  mit der HRP wird das zugegebene TMB oxidiert und die Lösung färbt sich blau. Durch die Zugabe der Stopp-Lösung entsteht wiederum ein Farbumschlag zu gelb.

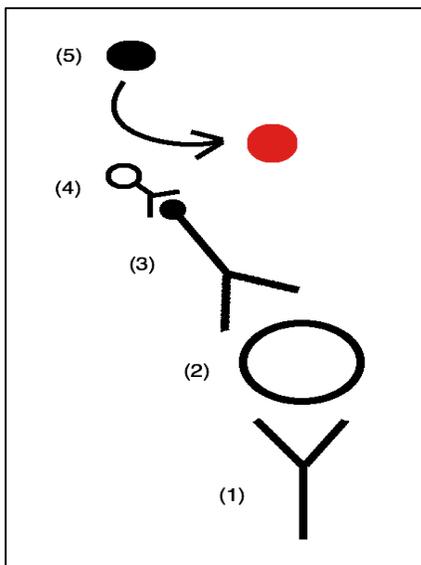


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Sandwich-ELISA Technik.

Das jeweilige zu detektierende Antigen (IgA, IgM, IgG, BAFF, IL6, IL21, IL35 und  $TNF\alpha$ ) ist wie in einem Sandwich zwischen den spezifischen Antikörpern (Coating und Detection-Antikörper) lokalisiert und kann über eine Farbreaktion quantifiziert werden. (1) Auf Platte fixierter Antikörper (Capture-Antikörper), (2) Antigen, (3) biotinylierter spezifischer Detektionsantikörper (Detection-Antikörper), (4) an Streptavidin gebundenes Enzym HRP (Meerrettichperoxidase) und (5) Substrat  $H_2O_2$  und Chromophor (TMB).

### **3.5.2 Auswertung der ELISA-Messungen**

Die unterschiedlichen Intensitäten der gelben Färbung wurden anschließend mit einem ELISA-Plattenlesegerät (Labsystems Multiskan MK II, Driver Version 4.04) bei einer Wellenlänge von 450nm ausgelesen. Zuvor wurde das ELISA-Lesegerät mittels leerer 96-well-Platte kalibriert. Somit wurde die optische Dichte (entspricht Extinktion E) der jeweiligen Probe ermittelt. Diese gemessenen Extinktionen der Probandenproben konnten nun über die Standardkurve mit den BAFF-, IL6-, IL21-, IL35,  $TNF\alpha$ -, IgA-, IgG- und IgM-Konzentrationswerten korreliert werden.

### **3.6 Statistik**

Die statistische Auswertung der erfassten Daten wurde mittels der Statistiksoftware IBM® SPSS® Statistics Version 22 durchgeführt. Die Fallzahl der untersuchten Patientengruppen und der Kontrollgruppe lag stets bei  $n=10$  weshalb die Normalverteilung nach Shapiro und Wilk getestet wurde. Waren die ermittelten Messwerte mit signifikanter Sicherheit normalverteilt wurde ein T-Test bei unabhängigen Stichproben durchgeführt. Die Ergebnisse der ELISA Messungen wurden mit Hilfe des nichtparametrischen Mann-Whitney-U Test durchgeführt, da diese nicht normalverteilt waren. Als statistisch signifikant wurde jeweils ein p-Wert von  $\leq 0,05$  festgelegt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Patienten und Probanden

Für die durchflusszytometrische Analyse der verschiedenen Subpopulationen der B-Lymphozyten wurden die in Tabelle 8 definierten Patientengruppen und eine gesunde Kontrollgruppe verwendet. Das Alter der gesunden Probanden lag im Mittel bei  $42,2 \pm 6,3$  Jahren, wobei 4 Probanden weiblich und 6 männlich waren. Unter den Patienten mit Tocilizumab Therapie waren 2 männliche Patienten und 8 weibliche Patienten, die im Mittel  $53,1 \pm 7,8$  Jahre alt waren und deren Krankheitsdauer zum Zeitpunkt der Blutentnahme  $11,3 \pm 5,6$  Jahre betrug. Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie waren  $56,1 \pm 8,2$  Jahre alt mit einer durchschnittlichen Krankheitsdauer von  $8,5 \pm 4,5$  Jahren, wobei 3 Patienten männlich und 7 Patienten weiblich waren. Unter den Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie waren 2 männliche Patienten und 8 weibliche Patienten, die im Mittel  $56,0 \pm 6,9$  Jahre alt waren und deren Krankheitsdauer im Mittel bei  $6,9 \pm 4,1$  Jahren lag (Tabelle 11).

Für die Serumanalyse wurden nicht die identischen Patienten und nicht die identischen Probanden verwendet. Gesunde Probanden waren durchschnittlich  $42,5 \pm 5,2$  Jahre alt, wobei 6 Probanden männlich und 4 Probanden weiblich waren. Unter den Patienten mit Tocilizumab Therapie waren 2 männliche Patienten und 8 weibliche Patienten, die im Mittel  $53,5 \pm 7,4$  Jahre alt waren und deren Krankheitsdauer  $10,5 \pm 6,8$  Jahre betrug. Das Alter der Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie lag im Mittel bei  $53,7 \pm 7,9$  Jahren mit einer durchschnittlichen Krankheitsdauer von  $9,2 \pm 4,7$  Jahren, wobei 4 Patienten männlich und 6 Patienten weiblich waren. Unter den Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie waren 2 Patienten männlich und 8 Patienten weiblich, das Durchschnittsalter lag bei  $61,6 \pm 8,1$  Jahren und die durchschnittliche Krankheitsdauer betrug  $7,4 \pm 3,4$  Jahre

(Tabelle 12).

	Alter	Geschlecht m:w	Krankheitsdauer
Kontrollgruppe	42,2 ± 6,3 Jahre	6:4	-
RA Patienten unter Tocilizumab Therapie	53,1 ± 7,8 Jahre	2:8	11,3 ± 5,6 Jahre
RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie	56,1 ± 8,2 Jahre	3:7	8,5 ± 4,5 Jahre
RA Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie	56,0 ± 6,9 Jahre	2:8	6,9 ± 4,1 Jahre

**Tabelle 11: Patientendaten und Probandendaten der FACS-Analyse**

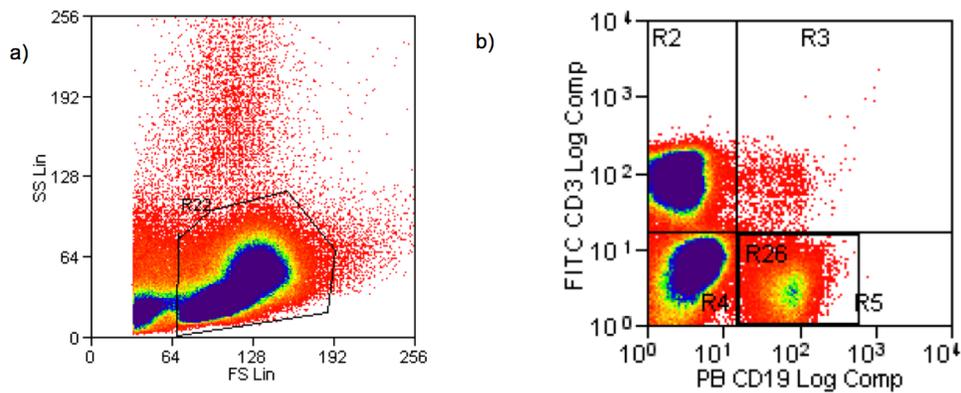
	Alter	Geschlecht m:w	Krankheitsdauer
Kontrollgruppe	42,5 ± 5,2 Jahre	6:4	-
RA Patienten unter Tocilizumab Therapie	53,5 ± 7,4 Jahre	2:8	10,5 ± 6,8 Jahre
RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie	53,7 ± 7,9 Jahre	4:6	9,2 ± 4,7 Jahre
RA Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie	61,6 ± 8,1 Jahre	2:8	7,4 ± 3,4 Jahre

**Tabelle 12: Patientendaten und Probandendaten der Serumanalyse**

## 4.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der CD3-CD19+ B-Lymphozyten

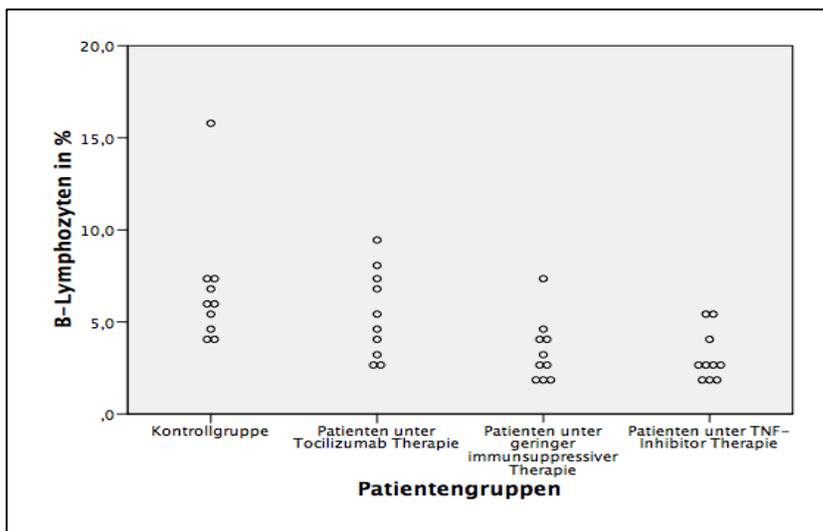
Es wurde eine FACS-Analyse aus dem EDTA-Blut von Patienten mit RA unter verschiedenen Therapiekonzepten und einer gesunden Kontrollgruppe durchgeführt. Hierzu wurden die B-Lymphozyten der Patienten und der gesunden Kontrollgruppe in Bezug auf ihr Oberflächenantigenprofil untersucht und verschieden differenzierte Populationen der B-Lymphozyten klassifiziert. Ziel der Analyse war es zu bestimmen, ob die Erkrankung oder die Therapie der RA mit Veränderungen in der Zusammensetzung, der Differenzierung und der Funktion verschiedener B-Zellpopulationen assoziiert ist. Von besonderem Interesse war die Veränderung der terminal differenzierten B-Lymphozyten bei RA Patienten unter Therapie mit dem IL6-Inhibitor Tocilizumab im Vergleich zu anderen Therapieformen bei Patienten mit RA und einer gesunden Kontrollgruppe.

Zunächst war es von Interesse inwiefern sich der Anteil der B-Lymphozyten an den PBMCs bei den verschiedenen Versuchsgruppen unterscheidet. Hierzu wurden die untersuchten PBMCs nach Isolierung mit Hilfe der fluoreszierenden Antikörper PB-CD19 und FITC-CD3 markiert und die CD3- und zugleich CD19+ Zellen analysiert (Abb. 6). Die gewonnenen Daten wurden auf eine Dezimale genau gerundet, da eine genauere Beurteilung der prozentualen Verteilung der B-Lymphozyten durch die FACS-Technik nicht möglich war. In Tabelle 13 sind die prozentualen Anteile der B-Lymphozyten an den isolierten PBMCs bei den verschiedenen Versuchsgruppen dargestellt.



**Abbildung 6: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD3-CD19+ B-Lymphozyten.**

a) Im Dotplot wurden die PBMCs im dargestellten Bereich R22 markiert. b) Die in a) ausgewählten PBMCs wurden im dargestellten Dotplot auf die Oberflächenantigene CD3 und CD19 untersucht und im Bereich R26 die CD3-CD19+ B-Lymphozyten eingegrenzt.



**Abbildung 7: Darstellung der prozentualen Anteile der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der PBMCs bei Patienten mit RA unter verschiedenen Therapieformen und einer gesunden Kontrollgruppe.**

Durch die Markierung der PBMCs der jeweiligen Versuchsgruppe mit den fluoreszierenden monoklonalen Antikörpern PB-CD19 und FITC-CD3 konnte der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der PBMCs mittels FACS-Analyse bestimmt werden. Jeder einzelne dargestellte Kreis im Punktdiagramm steht für den prozentualen B-Lymphozyten Anteil an der PBMC Gesamtzahl eines einzelnen Patienten bzw. eines gesunden Probanden.

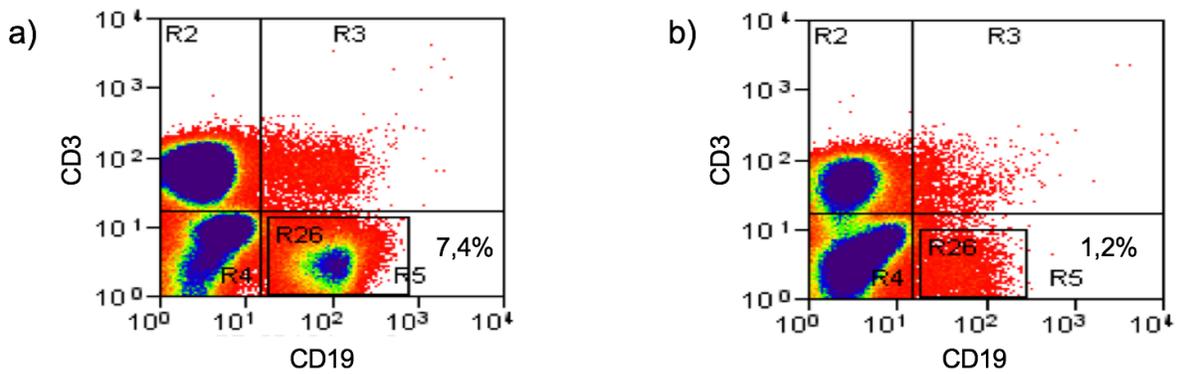
Versuchsgruppe	gesunde Kontrollgruppe	RA Patienten mit Tocilizumab Therapie	RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie	RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie
<b>CD3-CD19+ B-Lymphozyten</b>	MW = 6,7% SEM = 1,1% n = 10	MW = 5,5% SEM = 0,8% n = 10	MW = 3,4% SEM = 0,5% n = 10	MW = 3,1% SEM = 0,4% n = 10

**Tabelle 13: Prozentuale Anteile der CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei den verschiedenen Versuchsgruppen.**

#### **4.2.1 Der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs ist bei der gesunden Kontrollgruppe signifikant höher als bei RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie oder bei RA Patienten mit geringer Immunsuppression**

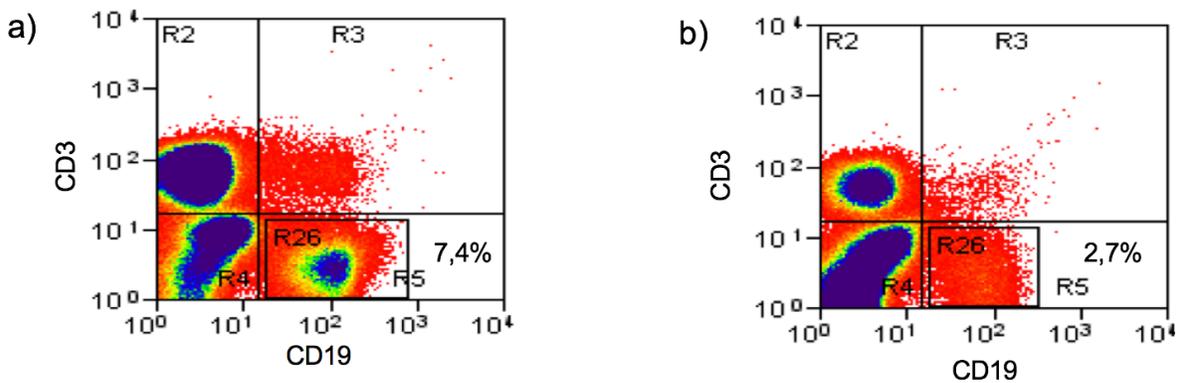
Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit RA unter Therapie mit den TNF-Inhibitoren Adalimumab oder Etanercept einen signifikant niedrigeren Anteil an CD3-CD19+ B-Lymphozyten im peripheren Blut besitzen als die gesunde Kontrollgruppe ( $p=0,008$ ). Die gesunde Kontrollgruppe hat im Mittel einen Anteil von 6,7% CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den untersuchten PBMCs. Bei den Patienten mit RA unter Adalimumab oder Etanercept Therapie liegt der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten dagegen im Mittel bei nur 3,1%.

Auch die RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie haben einen statistisch signifikant niedrigeren Anteil an CD3-CD19+ B-Lymphozyten als die gesunde Kontrollgruppe ( $p=0,015$ ). Patienten mit RA unter leichter Immunsuppression haben im Schnitt nur einen Anteil von 3,4% B-Lymphozyten an den PBMCs während die gesunde Kontrollgruppe hingegen einen Anteil von 6,7% B-Lymphozyten hat, wie in Abbildung 10 zu sehen ist.



**Abbildung 8: Vergleich des durchflusszytometrisch gemessenen Anteils der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs zwischen der gesunden Kontrollgruppe (a) und Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie (b).**

a) Darstellung eines repräsentativen Dotplots eines gesunden Probanden mit einem Anteil der B-Lymphozyten an den PBMCs von 7,4%. b) Darstellung eines repräsentativen Dotplots eines Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie mit einem Anteil der B-Lymphozyten an den PBMCs von 1,2%.

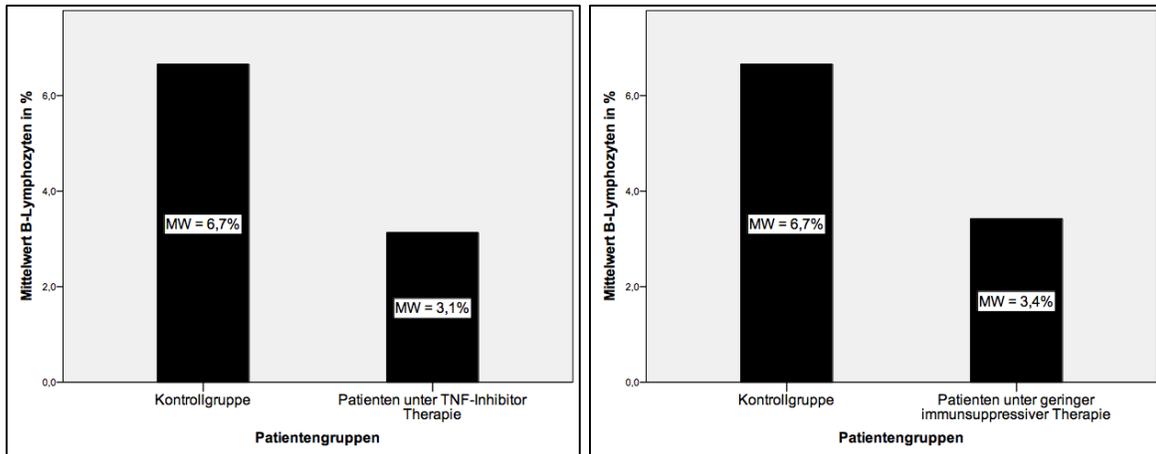


**Abbildung 9: Vergleich des durchflusszytometrisch gemessenen Anteils der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs zwischen der gesunden Kontrollgruppe a) und Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie b).**

a) Darstellung eines repräsentativen Dotplots eines gesunden Probanden mit einem Anteil der B-Lymphozyten an den PBMCs von 7,4%. b) Darstellung eines repräsentativen Dotplots eines Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie mit einem Anteil der B-Lymphozyten an den PBMCs von 2,7%.

a)

b)



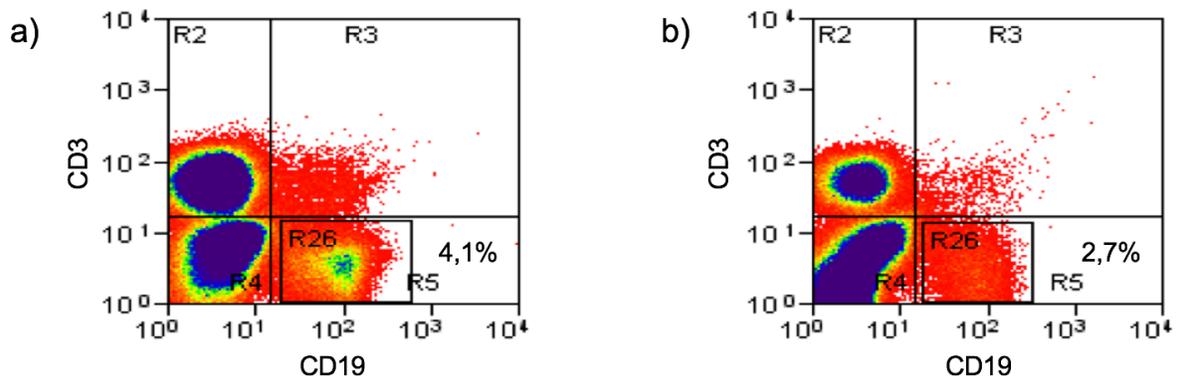
**Abbildung 10: a) Der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der PBMCs ist bei Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie signifikant niedriger als bei der gesunden Kontrollgruppe (3,1% vs. 6,7%;  $p=0,008$ ). b) Der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der PBMCs ist bei Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie signifikant niedriger als bei der gesunden Kontrollgruppe (3,4% vs. 6,7%;  $p=0,015$ ).**

In den dargestellten Balkendiagrammen werden die unterschiedlichen Anteile der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der PBMCs bei den gesunden Probanden mit denen der Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie (a) und denen der Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie (b) verglichen.

#### **4.2.2 Der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs ist bei RA Patienten unter Tocilizumab Therapie signifikant höher als bei RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie oder bei RA Patienten mit geringer Immunsuppression**

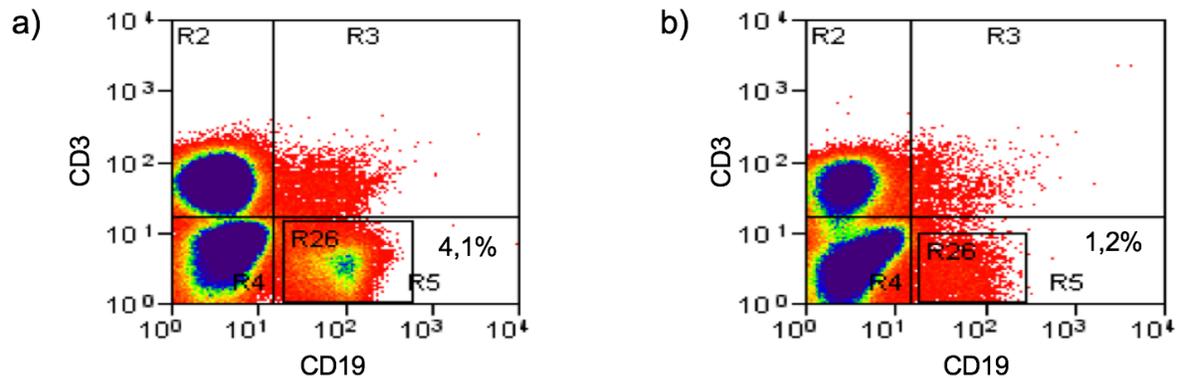
Der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten liegt bei Patienten unter Tocilizumab Therapie im Durchschnitt bei 5,5% und ist somit ähnlich hoch wie bei der gesunden Kontrollgruppe. Der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten ist bei Patienten unter Tocilizumab Therapie außerdem statistisch signifikant höher als bei Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie ( $p=0,041$ ), deren mittlerer Anteil der B-Lymphozyten an allen isolierten PBMCs 3,4% beträgt.

Auch im Vergleich zu Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie ist der Anteil der gesuchten CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei Patienten unter Tocilizumab Therapie signifikant höher (5,5% vs. 3,1%;  $p=0,016$ ).



**Abbildung 11: Vergleich des durchflusszytometrisch gemessenen Anteils der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs zwischen Patienten mit Tocilizumab Therapie (a) und Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie (b).**

a) Darstellung eines repräsentativen Dotplots eines Patienten mit Tocilizumab Therapie mit einem Anteil der B-Lymphozyten an den PBMCs von 4,1%. b) Darstellung eines repräsentativen Dotplots eines Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie mit einem Anteil der B-Lymphozyten an den PBMCs von 2,7%.

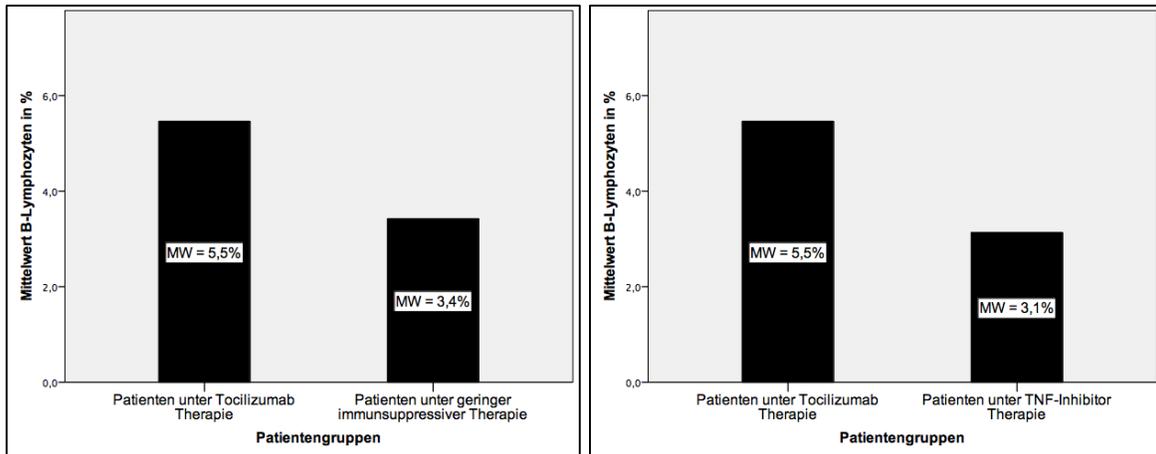


**Abbildung 12: Vergleich der durchflusszytometrisch gemessenen Anzahl an CD3-CD19+ B-Lymphozyten zwischen Patienten mit Tocilizumab Therapie (a) und Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie (b).**

a) Darstellung eines repräsentativen Dotplots der Patienten mit Tocilizumab Therapie mit einem Anteil der B-Lymphozyten an den PBMCs von 4,1%. b) Darstellung eines repräsentativen Dotplots der Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie mit einem Anteil der B-Lymphozyten an den PBMCs von 1,2%.

a)

b)

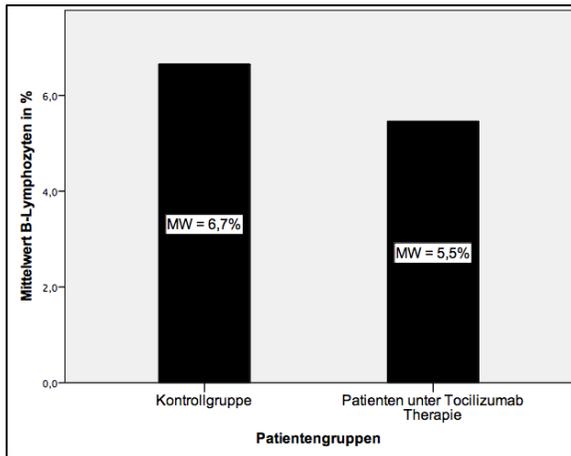


**Abbildung 13: a) Der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der PBMCs ist bei Patienten mit Tocilizumab Therapie signifikant höher als bei den Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie (5,5% vs. 3,4%;  $p=0,041$ ). b) Der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der PBMCs ist bei Patienten mit Tocilizumab Therapie signifikant höher als bei den Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie (5,5% vs. 3,1%;  $p=0,016$ ).** In den dargestellten Balkendiagrammen werden die unterschiedlichen Anteile der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der PBMCs bei den Patienten mit Tocilizumab Therapie mit denen der Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie (a) und den Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie (b) verglichen.

#### **4.2.3 Der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs bei Patienten unter Tocilizumab Therapie ist vergleichbar mit der gesunden Kontrollgruppe**

Der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs ist bei Patienten unter Tocilizumab Therapie und bei der gesunden Kontrollgruppe ähnlich hoch (5,5% vs. 6,7%;  $p=0,378$ ).

Beide Kollektive unterscheiden sich jedoch deutlich vom Anteil der B-Lymphozyten der anderen beiden Versuchsgruppen. Sowohl RA Patienten mit geringer Immunsuppression als auch RA Patienten unter Therapie mit den TNF-Inhibitoren Adalimumab oder Etanercept haben eine deutlich niedrigere Anzahl an CD3-CD19+ B-Lymphozyten als Patienten unter Tocilizumab Therapie oder als die gesunde Kontrollgruppe.

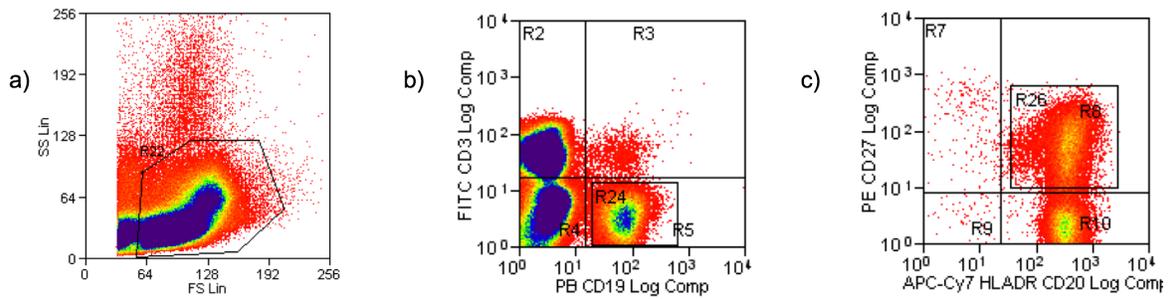


**Abbildung 14:** Der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der PBMCs ist bei Patienten mit Tocilizumab Therapie und bei der gesunden Kontrollgruppe vergleichbar hoch (5,5% vs. 6,7%;  $p=0,378$ ).

Im dargestellten Balkendiagramm werden die unterschiedlichen Anteile der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der PBMCs von Patienten mit Tocilizumab Therapie mit denen der gesunden Kontrollgruppe verglichen.

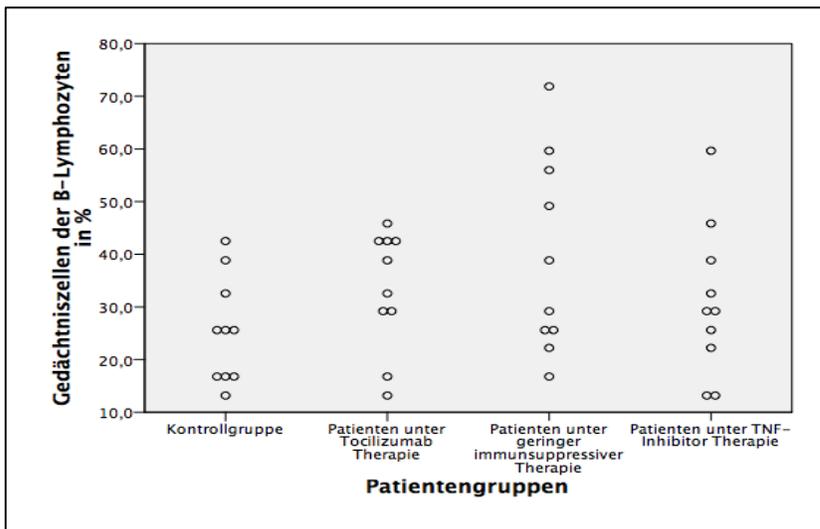
#### 4.3 Analyse der CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen der B-Lymphozyten

Zusätzlich zur Bestimmung der CD3-CD19+ B-Lymphozyten wurden weiter differenzierte CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen der B-Lymphozyten bestimmt. Hierzu wurden zusätzlich zur Färbung der isolierten PBMCs mit den fluoreszierenden Antikörpern PB-CD19 und FITC-CD3 die Antikörper APC-H7-CD20 und PE-CD27 verwendet (Abb. 15). Anschließend wurde bestimmt, welchen Anteil der gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten die CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen der B-Lymphozyten einnehmen. Eine Zusammenfassung der prozentualen Anteile der B-Lymphozyten Gedächtniszellen an den CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei den verschiedenen Versuchsgruppen ist in Tabelle 14 dargestellt.



**Abbildung 15: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD3-CD19+CD20+CD27+ B-Lymphozyten.**

a) Im Dotplot wurden die PBMCs im dargestellten Bereich R22 markiert. b) Die in a) ausgewählten PBMCs wurden im dargestellten Dotplot auf die Oberflächenantigene CD3 und CD19 untersucht und im Bereich R24 die CD3-CD19+ B-Lymphozyten eingegrenzt. c) Die CD3-CD19+ B-Lymphozyten aus Bereich R24 wurden im dargestellten Dotplot auf die Oberflächenantigene CD27 und CD20 untersucht. In Bereich R26 befinden sich die CD3-CD19+CD20+CD27+ B-Lymphozyten.



**Abbildung 16: Darstellung der prozentualen Anteile der CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen der B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei Patienten mit RA unter verschiedenen Therapieformen und einer gesunden Kontrollgruppe.**

Durch die Markierung der PBMCs der jeweiligen Versuchsgruppe mit den fluoreszierenden monoklonalen Antikörpern PB-CD19, FITC-CD3, APC-H7-CD20 und PE-CD27 konnte der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27+ B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der CD3-CD19+ B-Lymphozyten mittels FACS-Analyse bestimmt werden. Jeder einzelne dargestellte Kreis im Punktdiagramm steht für den prozentualen Anteil der Gedächtniszellen der B-Lymphozyten an der B-Lymphozyten Gesamtzahl eines einzelnen Patienten bzw. eines gesunden Probanden.

Versuchsgruppe	gesunde Kontrollgruppe	RA Patienten mit Tocilizumab Therapie	RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie	RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie
<b>CD3-CD19+</b>	MW = 25,5%	MW = 33,0%	MW = 39,4%	MW = 30,7%
<b>CD20+CD27+</b>	SEM = 3,3%	SEM = 3,4%	SEM = 6,0%	SEM = 4,4%
<b>B-Lymphozyten</b>	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10

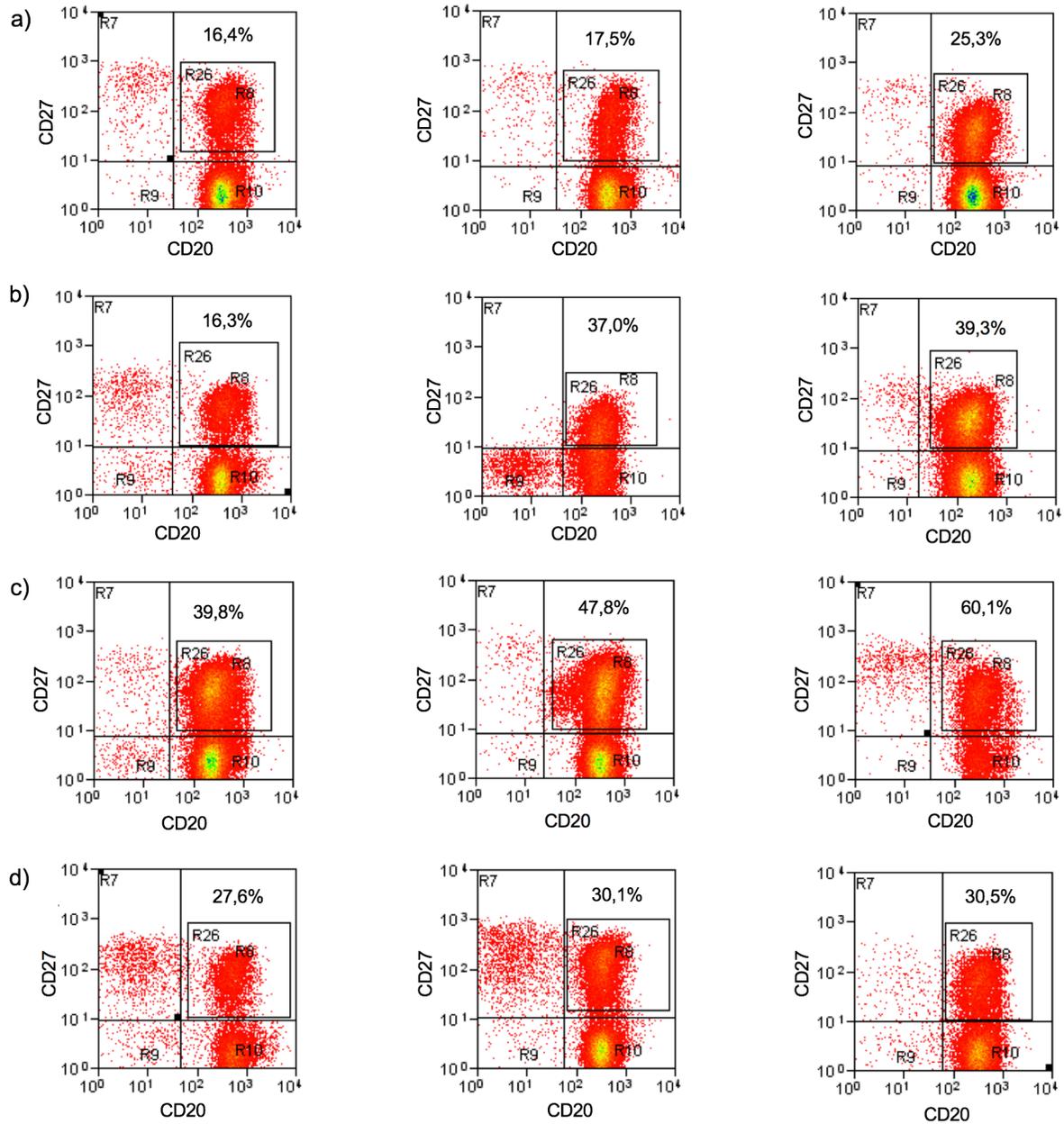
**Tabelle 14: Prozentuale Anteile der CD3-CD19+CD20+CD27+ B-Lymphozyten bei den verschiedenen Versuchsgruppen**

#### **4.3.1 Zwischen den Patientenkollektiven gibt es keine signifikanten Unterschiede des Anteils der CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen der B-Lymphozyten**

Tendenziell ist der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen der B-Lymphozyten bei der gesunden Kontrollgruppe geringer als bei Patienten mit einer diagnostizierten RA. Bei der gesunden Kontrollgruppe beträgt der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen an den CD3-CD19+ B-Lymphozyten 25,5% im Mittel (Tabelle 12). Der Anteil der Gedächtniszellen an den gesamten B-Lymphozyten beträgt bei Patienten mit RA unter geringer Immunsuppression durchschnittlich 39,4% ( $p=0,058$ ), bei RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie 30,7% ( $p=0,360$ ) und bei RA Patienten unter Therapie mit Tocilizumab 33,0% ( $p=0,129$ ). Es gibt jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den Patienten mit RA.

Auch zwischen den Patientenkollektiven gibt es keine signifikanten Alterationen der CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen der B-Lymphozyten. Auffällig sind jedoch die großen interindividuellen Unterschiede der CD3-CD19+CD20+CD27+ B-Zellen innerhalb der einzelnen Untersuchungsgruppen. Es wurden beispielsweise bei den RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie Patienten mit

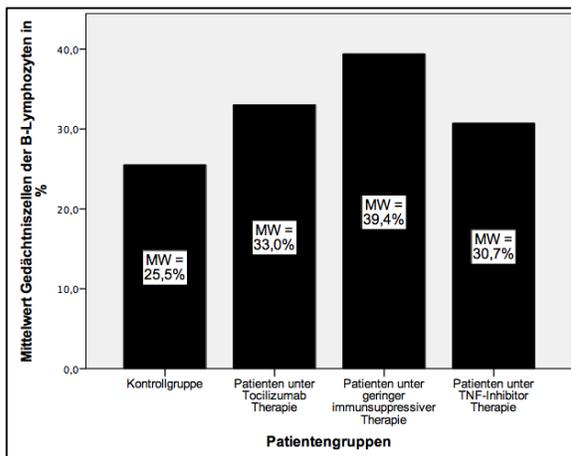
Werten zwischen 16,2% und 72,0% CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen gemessen.



**Abbildung 17: Repräsentative Darstellung des Anteils der durchflusszytometrisch gemessenen CD3-CD19+CD20+CD27+ B-Lymphozyten an den gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten in Dotplots bei der gesunden Kontrollgruppe (a), RA Patienten unter Therapie unter Tocilizumab Therapie (b), RA Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie (c) und bei RA Patienten unter Therapie mit TNF-Inhibitoren (d).**

a) Darstellung der CD3-CD19+CD20+CD27+ B-Lymphozyten von 3 repräsentativen Probanden der

gesunden Kontrollgruppe mit einem Anteil von 16,4%, 17,5% und 25,3% Gedächtniszellen an der Gesamtzahl der CD3-CD19+ B-Zellen. b) Darstellung der CD3-CD19+CD20+CD27+ B-Lymphozyten von 3 repräsentativen Patienten mit Tocilizumab Therapie mit einem Anteil von 16,3%, 37,0% und 39,3% Gedächtniszellen an der Gesamtzahl der CD3-CD19+ B-Zellen. c) Darstellung der CD3-CD19+CD20+CD27+ B-Lymphozyten von 3 repräsentativen Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie mit einem Anteil von 39,8%, 47,8% und 60,1% Gedächtniszellen an der Gesamtzahl der CD3-CD19+ B-Zellen. d) Darstellung der CD3-CD19+CD20+CD27+ B-Lymphozyten von 3 repräsentativen Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie mit einem Anteil von 27,6%, 30,1% und 30,5% Gedächtniszellen an der Gesamtzahl der CD3-CD19+ B-Zellen.



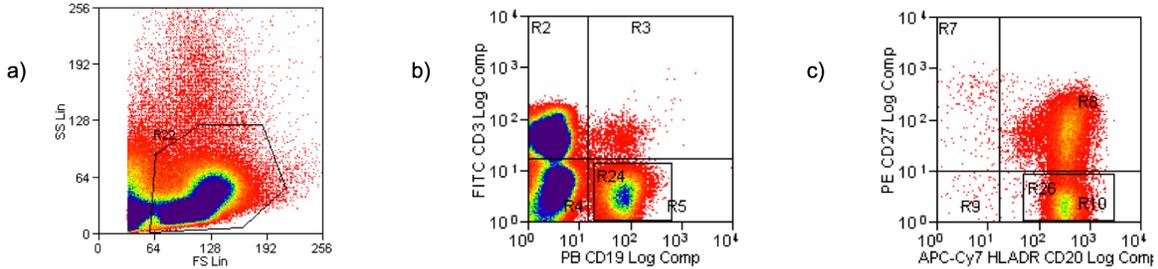
**Abbildung 18:** Es gibt keine signifikanten Unterschiede der Anteile der CD3-CD19+CD20+CD27+ B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten zwischen der gesunden Kontrollgruppe und RA Patienten unter Tocilizumab Therapie (25,5% vs. 33,0%;  $p=0,129$ ), TNF-Inhibitor Therapie (25,5% vs. 30,7%;  $p=0,360$ ) oder geringer immunsuppressiver Therapie (25,5% vs. 39,4%;  $p=0,058$ ). Tendenziell scheint der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27+ B-Lymphozyten bei der gesunden Kontrollgruppe geringer zu sein als bei den RA Patienten.

Im dargestellten Balkendiagramm werden die unterschiedlichen Anteile der CD3-CD19+CD20+CD27+ B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten bei den verschiedenen Versuchsgruppen verglichen.

#### 4.4 Analyse der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten

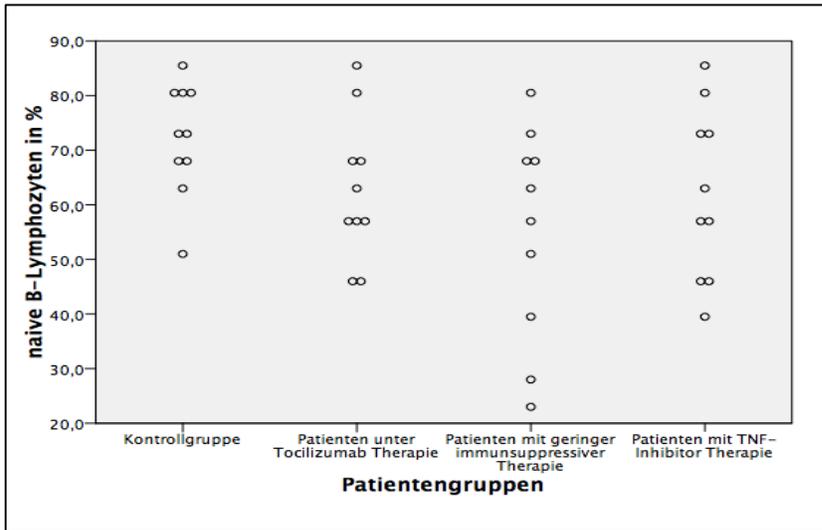
Mit den CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten wurde eine weitere Subpopulation der B-Lymphozyten bestimmt. Dabei wurde mit Hilfe der FACS Analytik der Anteil der CD20+CD27- B-Lymphozyten an der CD3-CD19+ Gesamtzahl der B-Lymphozyten bestimmt. Ergänzend zur Färbung mit den fluoreszierenden Antikörper PB-CD19 und FITC-CD3 wurden die Antikörper APC-H7-CD20 und PE-CD27 verwendet (Abb. 19). Die prozentuale Verteilung des Anteils

der naiven CD3-CD19+CD20+CD27- B-Lymphozyten an der B-Lymphozyten Gesamtzahl aller Versuchsgruppen ist in Tabelle 15 dargestellt.



**Abbildung 19: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten.**

a) Im Dotplot wurden die PBMCs im dargestellten Bereich R22 markiert. b) Die in a) ausgewählten PBMCs wurden im dargestellten Dotplot auf die Oberflächenantigene CD3 und CD19 untersucht und im Bereich R24 die CD3-CD19+ B-Lymphozyten eingegrenzt. c) Die CD3-CD19+ B-Lymphozyten aus Bereich R24 wurden im Dotplot auf die Oberflächenantigene CD27 und CD20 untersucht. In Bereich R26 befinden sich die CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten.



**Abbildung 20: Darstellung der prozentualen Anteile der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei Patienten mit RA unter verschiedenen Therapieformen und einer gesunden Kontrollgruppe.**

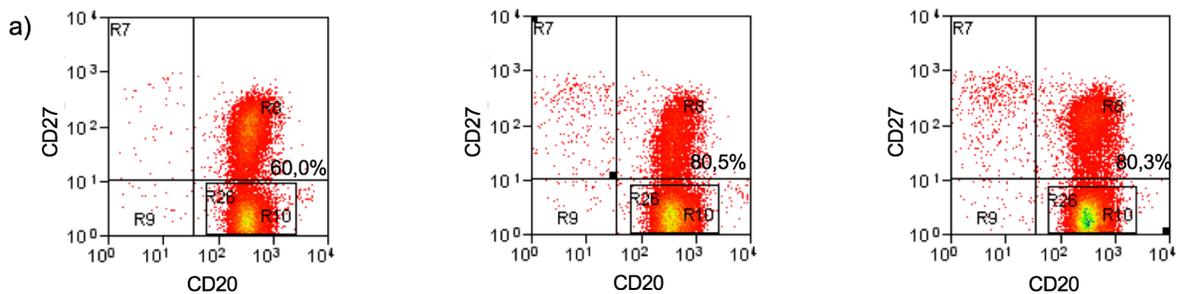
Durch die Markierung der PBMCs der jeweiligen Versuchsgruppe mit den fluoreszierenden monoklonalen Antikörpern PB-CD19, FITC-CD3, APC-H7-CD20 und PE-CD27 konnte der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27- B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der CD3-CD19+ B-Lymphozyten mittels FACS-Analyse bestimmt werden. Jeder einzeln dargestellte Kreis im Punktdiagramm steht für den prozentualen Anteil der naiven B-Lymphozyten an der B-Lymphozyten Gesamtzahl eines einzelnen Patienten bzw. eines gesunden Probanden.

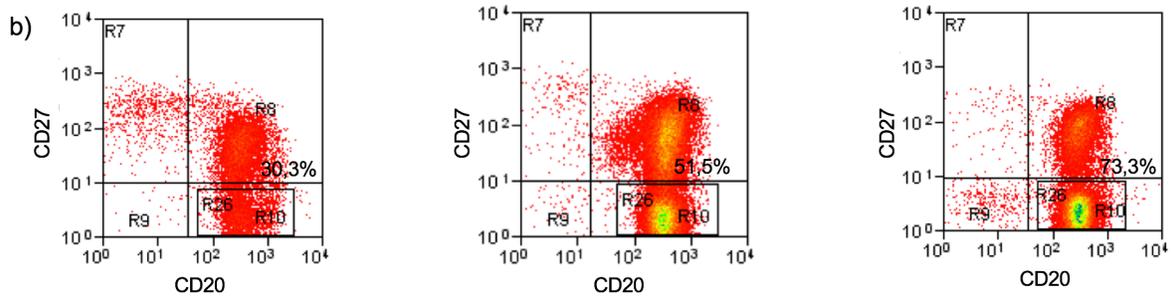
Versuchsgruppe	gesunde Kontrollgruppe	RA Patienten mit Tocilizumab Therapie	RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie	RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie
<b>CD3-CD19+ CD20+CD27- B-Lymphozyten</b>	MW = 72,3% SEM = 3,4% n = 10	MW = 62,0% SEM = 4,2% n = 10	MW = 55,1% SEM = 6,1% n = 10	MW = 62,6% SEM = 4,7% n = 10

Tabelle 15: Prozentuale Anteile der CD3-CD19+CD20+CD27- B-Lymphozyten bei den verschiedenen Versuchsgruppen.

#### 4.4.1 Der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an den gesamten B-Lymphozyten ist bei RA Patienten unter geringer Immunsuppression signifikant niedriger als bei der gesunden Kontrollgruppe

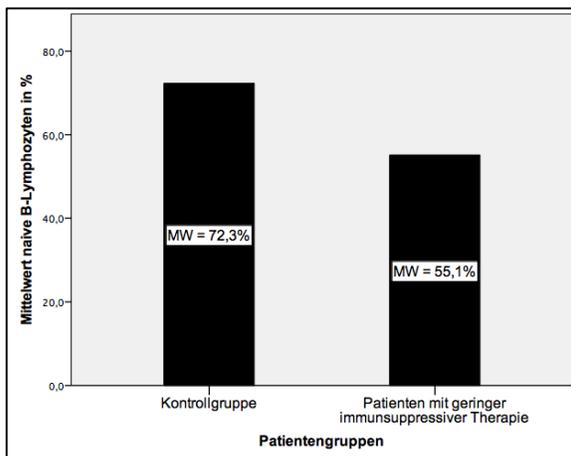
Der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten im peripheren Blut ist bei Patienten mit RA unter geringer immunsuppressiver Therapie statistisch signifikant geringer als bei der gesunden Kontrollgruppe ( $p=0,024$ ). Bei RA Patienten mit geringer Immunsuppression beträgt der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Zellen im Mittel 55,1% während bei der gesunden Kontrollgruppe durchschnittlich 72,3% der B-Lymphozyten als naive CD3-CD19+CD20+CD27- B-Zellen vorliegen (siehe Abbildung 22).





**Abbildung 21: Repräsentative Darstellung des Anteils der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten in Dotplots bei der gesunden Kontrollgruppe (a) und bei den Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie (b).**

a) Darstellung der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten von 3 repräsentativen Probanden der gesunden Kontrollgruppe mit einem Anteil von 60,0%, 80,5% und 80,3% naiven B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der CD3-CD19+ B-Zellen. b) Darstellung der CD3-CD19+CD20+CD27- B-Lymphozyten von 3 repräsentativen Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie mit einem Anteil von 30,3%, 51,5% und 73,3% naiven B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der CD3-CD19+ B-Zellen.



**Abbildung 22: Der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten ist bei RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie statistisch signifikant niedriger als bei der gesunden Kontrollgruppe. (55,1% vs. 72,3%;  $p=0,024$ ).**

Im dargestellten Balkendiagramm werden die unterschiedlichen Anteile der CD3-CD19+CD20+CD27- B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten von Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie mit denen der gesunden Kontrollgruppe verglichen.

#### 4.4.2 Vergleich des Anteils der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an den gesamten B-Lymphozyten zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen

Bei allen RA Patienten unabhängig vom angewandten Therapieschema liegen die B-Lymphozyten seltener als CD3-CD19+CD20+CD27- naive B-Lymphozyten vor als bei der gesunden Kontrollgruppe.

Der Unterschied zwischen den RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie und der gesunden Kontrollgruppe ist statistisch signifikant ( $p=0,024$ ). Im Vergleich zu den RA Patienten unter Tocilizumab Therapie ( $p=0,073$ ) oder den RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie ( $p=0,111$ ) ist der Anteil der naiven B-Lymphozyten an der B-Lymphozyten Gesamtzahl bei der gesunden Kontrollgruppe ebenfalls höher, jedoch statistisch nicht signifikant. Der Anteil der naiven B-Lymphozyten beträgt bei den RA Patienten mit geringer Immunsuppression im Mittel 55,1%, bei den RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie 62,6%, bei den Patienten unter Therapie mit Tocilizumab 62,0% und bei der gesunden Kontrollgruppe 72,3%. In Abbildung 20 wird sichtbar, dass auch bei den CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Zellen sehr deutliche interindividuelle Unterschiede vor allem bei den RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie zu beobachten sind.

#### **4.5 Analyse der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten**

Eine der wichtigsten Fragestellungen der Arbeit war, inwiefern sich der Anteil der Plasmablasten an den gesamten B-Lymphozyten bei Patienten mit RA von dem der gesunden Kontrollgruppe unterscheidet. Weiter wurde der Anteil der Plasmablasten bei den RA Patienten unter verschiedenen Therapieschemata untersucht und quantitative Unterschiede detektiert.

Die Plasmablasten wurden durch das Oberflächenantigenprofil CD3-CD19+CD20-CD27++ klassifiziert. Hierzu wurden zusätzlich zur Färbung mit den fluoreszierenden Antikörpern PB-CD19 und FITC-CD3 die Antikörper APC-H7-CD20 und PE-CD27 verwendet. CD3-CD19+ Zellen wurden mit Hilfe der FACS-Analyse selektiert und anschließend auf den Anteil der CD20-CD27+ Zellen



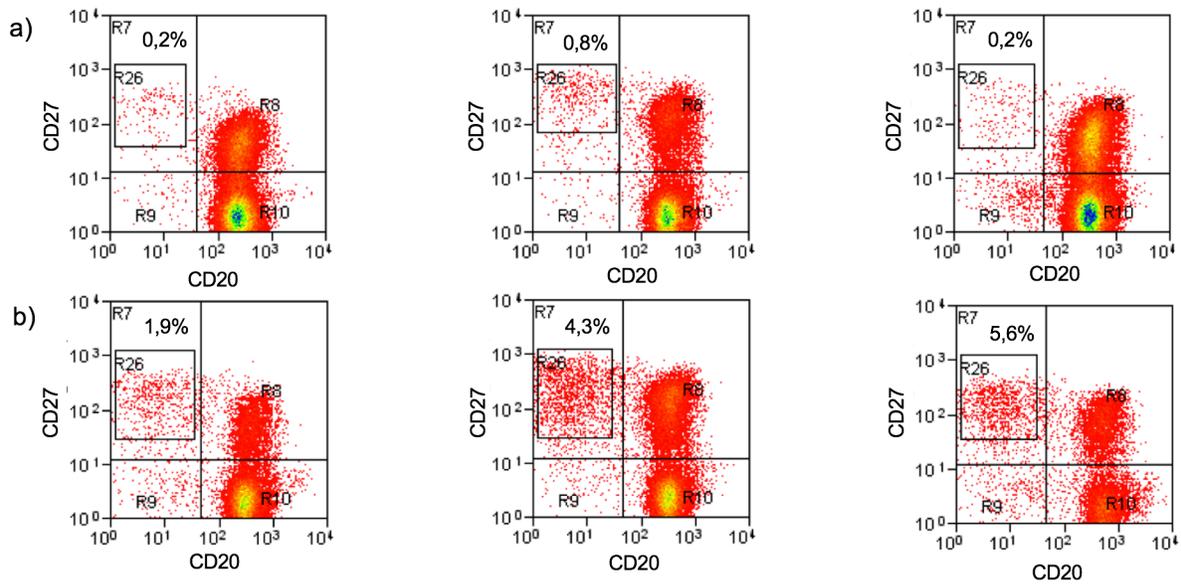
den prozentualen Anteil der Plasmablasten an der B-Lymphozyten Gesamtzahl eines einzelnen Patienten bzw. eines gesunden Probanden.

<b>Versuchsgruppe</b>	gesunde Kontrollgruppe	RA Patienten mit Tocilizumab Therapie	RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie	RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie
<b>CD3-CD19+ CD20+CD27- B-Lymphozyten</b>	MW = 0,5% SEM = 0,1% n = 10	MW = 0,5% SEM = 0,2% n = 10	MW = 1,4% SEM = 0,5% n = 10	MW = 2,1% SEM = 0,7% n = 10

**Tabelle 16: Prozentuale Anteile der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten bei den verschiedenen Versuchsgruppen**

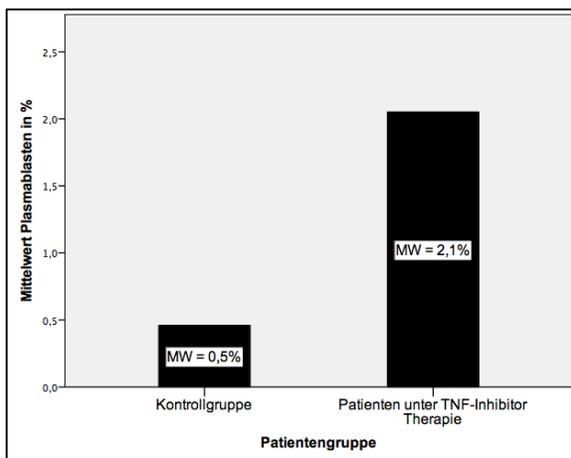
#### **4.5.1 Der Anteil der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten an den gesamten B-Lymphozyten ist bei RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie signifikant höher als bei der gesunden Kontrollgruppe**

Der Anteil der zu CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten differenzierten B-Lymphozyten ist bei den RA Patienten unter Therapie mit den TNF-Inhibitoren Adalimumab oder Etanercept höher als bei allen anderen untersuchten Gruppen. Der Anteil der Plasmablasten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten beträgt bei diesem Patientenkollektiv im Mittel 2,1%. Einen signifikanten Unterschied kann man jedoch nur im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe feststellen. Der Anteil der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten ist bei den RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie statistisch signifikant höher als bei der gesunden Kontrollgruppe ( $p=0,045$ ). Der Anteil der Plasmablasten an allen gemessenen B-Lymphozyten beträgt bei der gesunden Kontrollgruppe durchschnittlich 0,5%.



**Abbildung 25: Repräsentative Darstellung der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten in Dotplots bei der gesunden Kontrollgruppe (a) und den Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie (b).**

a) Darstellung der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten von 3 repräsentativen Probanden der gesunden Kontrollgruppe mit einem Anteil von 0,2%, 0,8% und 0,2% Plasmablasten an der Gesamtzahl der CD3-CD19+ B-Zellen. b) Darstellung der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten von 3 repräsentativen Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie mit einem Anteil von 1,9%, 4,3% und 5,6% Plasmablasten an der Gesamtzahl der CD3-CD19+ B-Zellen.



**Abbildung 26: Der Anteil der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten ist bei RA-Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie statistisch signifikant höher als bei der gesunden Kontrollgruppe. (2,1% vs. 0,5%;  $p=0,045$ ).**

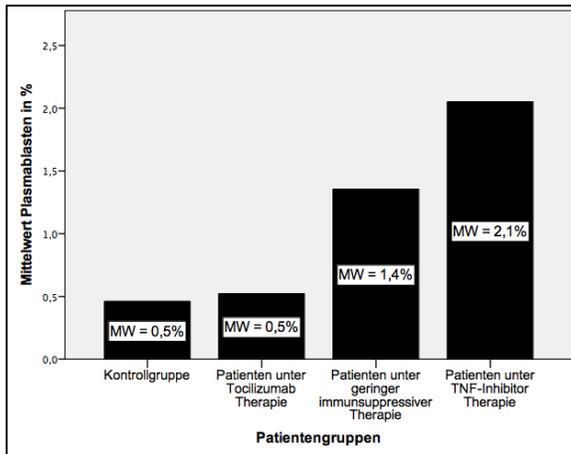
Im dargestellten Balkendiagramm werden die unterschiedlichen Anteile der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten bei den Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie mit denen der gesunden Kontrollgruppe verglichen.

#### **4.5.2 Vergleich des Anteils der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten an den gesamten B-Lymphozyten zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen**

Es konnte durch die FACS-Analyse festgestellt werden, dass Patienten mit RA unter Therapie mit TNF-Inhibitoren oder unter geringer immunsuppressiver Therapie einen niedrigeren Anteil an Plasmablasten im peripheren Blut aufweisen als die gesunde Kontrollgruppe. Statistisch signifikant ist dieser Unterschied nur bei den Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie ( $p=0,045$ ), nicht jedoch bei den Patienten mit geringer Immunsuppression ( $p=0,087$ ). Der Anteil der CD3-CD19+CD20-CD27++ Zellen an den CD3-CD19+ B-Lymphozyten beträgt bei den Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie 2,1% und bei den Patienten mit geringer Immunsuppression 1,4% im Mittel.

Auch die Patienten mit Tocilizumab Therapie scheinen ähnlich niedrige Werte an CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten im peripheren Blut aufzuweisen. Der Anteil der zu Plasmablasten differenzierten B-Lymphozyten beträgt hier im Mittel 0,5%. Statistisch signifikant ist der Unterschied der Patienten mit IL6-Inhibitor Therapie verglichen mit RA Patienten unter Therapie mit TNF-Inhibitoren ( $p=0,059$ ) oder Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie ( $p=0,141$ ) jedoch nicht.

Besonders hohe Werte an CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten wurden ausschließlich bei RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie und bei RA Patienten unter geringer Immunsuppression gemessen. Während bei der gesunden Kontrollgruppe keiner der 10 Probanden einen Plasmablasten-Anteil von über 1,1% aufweisen kann wurden bei 3 der 10 RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie Werte von 4,5% bis 6,4% gemessen. Auch innerhalb der Patientengruppe unter TNF-Inhibitor Therapie gibt es erhebliche interindividuelle Unterschiede, die von einem Anteil an Plasmablasten von 0,2% bis 6,4% reichen (Abbildung 24).



**Abbildung 27: Vergleich der Anteile der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten bei RA Patienten unter unterschiedlichen Therapiekonzepten und der gesunden Kontrollgruppe.**

Im dargestellten Balkendiagramm werden die unterschiedlichen Anteile der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten bei den verschiedenen Versuchsgruppen verglichen.

#### 4.6 Serumanalyse bei RA Patienten und der gesunden Kontrollgruppe

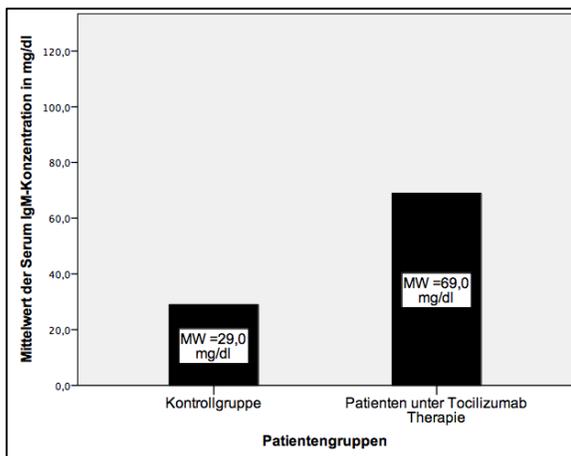
Zusätzlich zur Phänotypisierung der verschiedenen Subpopulationen der B-Lymphozyten mittels FACS-Analyse wurde eine Serumanalyse durchgeführt. Zur Serumanalyse wurden wie bei den FACS-Messungen RA Patienten unter Tocilizumab Therapie, TNF-Inhibitor Therapie und geringer immunsuppressiver Therapie untersucht und mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen.

Für die ELISA-Analysen wurden pro Patient 10ml Serum verwendet. Untersucht wurden die Immunglobuline und Zytokine IgG, IgA, IgM, BAFF, IL6, IL21, IL35 und TNF $\alpha$ . Durch die Serumanalyse mittels ELISA sollte die Konzentration der für Wachstum und Differenzierung der B-Lymphozyten wichtigen Peptide gemessen werden und Differenzen zwischen den verschiedenen therapierten RA Patienten und der gesunden Kontrollgruppe erfasst werden. Außerdem sollten diese differierenden Konzentrationen an Immunglobulinen und Zytokinen in den unterschiedlichen Versuchsgruppen anschließend mit den voneinander abweichenden Anteilen differenzierter B-Lymphozyten verglichen werden. Somit sollte detektiert werden, ob

verschiedene Therapiekonzepte bei RA Patienten die Serumkonzentrationen von IgA, IgM, IgG, BAFF, IL6, IL21, IL35, und  $TNF\alpha$  verändern und ob diese Patienten gleichzeitig verschiedene Anteile differenzierter B-Lymphozyten aufweisen.

#### 4.6.1 Die IgM-Konzentration im Serum der RA Patienten unter Tocilizumab Therapie ist signifikant höher als bei der gesunden Kontrollgruppe

RA Patienten unter Therapie mit Tocilizumab haben eine statistisch signifikant höhere Konzentration an IgM im Serum als die gesunde Kontrollgruppe. Die Konzentration an IgM im Serum der Patienten unter Tocilizumab Therapie beträgt durchschnittlich 69,0 mg/dl während die der Kontrollgruppe lediglich 29,0 mg/dl beträgt ( $p=0,043$ ).



**Abbildung 28: Die IgM-Konzentration im Serum der Patienten mit Tocilizumab Therapie ist statistisch signifikant höher als bei der gesunden Kontrollgruppe (69,0 mg/dl vs. 29,0 mg/dl;  $p=0,043$ ).**

Mittels ELISA-Technik wurde die IgM-Konzentration im Serum der RA Patienten unter unterschiedlicher Therapie und der gesunden Kontrollgruppe gemessen. Im dargestellten Balkendiagramm werden die unterschiedlichen IgM-Serumkonzentrationen von Patienten unter Tocilizumab Therapie mit denen der gesunden Kontrollgruppe verglichen.

#### 4.6.2 Vergleich der IgM-Konzentration im Serum zwischen RA Patienten und der gesunden Kontrollgruppe

Die Konzentration an IgM scheint sowohl bei RA Patienten unter Therapie mit dem

IL6-Inhibitor Tocilizumab als auch unter Therapie mit den TNF-Inhibitoren Adalimumab oder Etanercept höher zu sein als bei Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie oder der gesunden Kontrollgruppe. Patienten unter Tocilizumab Therapie weisen durchschnittlich eine Serumkonzentration von 69,0 mg/dl auf und Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie eine Konzentration von 106,2 mg/dl. In der gesunden Kontrollgruppe ist die IgM-Konzentration im Serum mit 29,0 mg/dl im Mittel niedriger. Auch bei Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie ist die IgM-Konzentration mit durchschnittlich 24,2 mg/dl niedriger. Statistisch signifikant ist der Unterschied zwischen Patienten unter Tocilizumab Therapie und der gesunden Kontrollgruppe ( $p=0,043$ ). Vergleicht man die Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie mit den Patienten unter Tocilizumab Therapie ( $p=0,133$ ) gibt es jedoch keine signifikanten Alterationen. Auch die Differenzen der Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie verglichen mit denen der Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie ( $p=0,549$ ) oder der gesunden Kontrollgruppe ( $p=0,214$ ) sind statistisch nicht signifikant.

<b>Versuchsgruppe</b>	gesunde Kontrollgruppe	RA Patienten mit Tocilizumab Therapie	RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie	RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie
<b>Konzentration IgM</b>	MW = 29,0 mg/dl SEM = 11,9 mg/dl n = 10	MW = 69,0 mg/dl SEM = 16,8 mg/dl n = 10	MW = 24,2 mg/dl SEM = 5,1 mg/dl n = 10	MW = 106,2 mg/dl SEM = 41,0 mg/dl n = 10

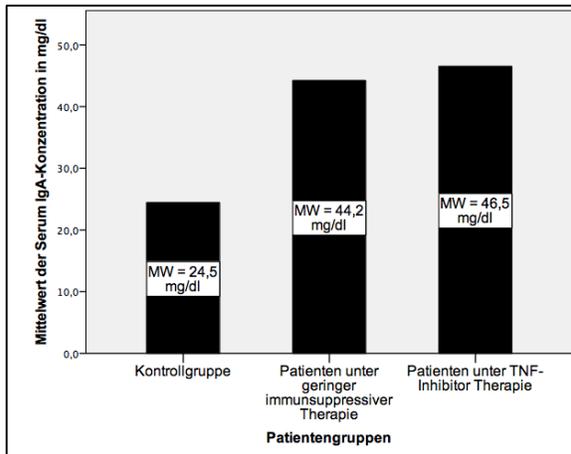
**Tabelle 17: Unterschiede der IgM-Konzentration im Serum der verschiedenen Versuchsgruppen**

**4.6.3 Die IgA-Konzentration im Serum der gesunden Kontrollgruppe ist statistisch signifikant niedriger als bei RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie und als bei RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie**

Die IgA-Konzentration im Serum der gesunden Kontrollgruppe ist niedriger als bei Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie und als bei Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie. Der Unterschied der IgA-Konzentration ist sowohl zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den Patienten mit geringer Immunsuppression ( $p=0,021$ ) als auch zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie ( $p=0,034$ ) statistisch signifikant. Die IgA-Konzentration im Serum der Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie beträgt 44,2 mg/dl im Durchschnitt und die der Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie 46,5 mg/dl. Dagegen liegt die IgA-Konzentration der gesunden Kontrollgruppe mit 24,5 mg/dl deutlich niedriger.

<b>Versuchsgruppe</b>	gesunde Kontrollgruppe	RA Patienten mit Tocilizumab Therapie	RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie	RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie
<b>Konzentration IgA</b>	MW = 24,5 mg/dl SEM = 8,5 mg/dl n = 10	MW = 27,9 mg/dl SEM = 5,1 mg/dl n = 10	MW = 44,2 mg/dl SEM = 4,8 mg/dl n = 10	MW = 46,5 mg/dl SEM = 8,4 mg/dl n = 10

**Tabelle 18: Unterschiede der IgA-Konzentration im Serum der verschiedenen Versuchsgruppen**

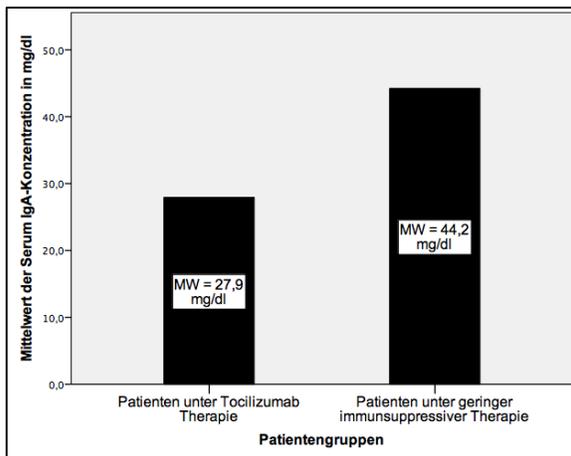


**Abbildung 29: Die IgA-Konzentration im Serum der gesunden Kontrollgruppe ist statistisch signifikant niedriger als bei den RA Patienten unter Therapie mit geringer Immunsuppression (24,5 mg/dl vs. 44,2 mg/dl;  $p=0,021$ ) und als bei den RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie (24,5 mg/dl vs. 46,5 mg/dl;  $p=0,034$ ).**

Mittels ELISA-Technik wurde die IgA-Konzentration im Serum der RA Patienten unter unterschiedlicher Therapie und der gesunden Kontrollgruppe gemessen. Im dargestellten Balkendiagramm werden die unterschiedlichen IgA-Serumkonzentrationen der gesunden Kontrollgruppe mit denen der RA Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie und denen der RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie verglichen.

#### **4.6.4 Die IgA-Konzentration im Serum der RA Patienten unter Therapie mit Tocilizumab ist statistisch signifikant niedriger als bei RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie**

Genau wie bei der gesunden Kontrollgruppe ist die IgA-Konzentration auch im Serum der Patienten unter Tocilizumab Therapie niedriger als bei den RA Patienten unter Therapie mit TNF-Inhibitoren oder unter geringer immunsuppressiver Therapie. Statistisch signifikant niedriger ist die IgA-Konzentration bei Patienten unter Tocilizumab Therapie jedoch nur im Vergleich zu Patienten unter geringer Immunsuppression ( $p=0,043$ ). Die IgA-Konzentration beträgt bei den Patienten unter Tocilizumab Therapie 27,9 mg/dl und bei den Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie hingegen 44,2 mg/dl.



**Abbildung 30: Die IgA-Konzentration im Serum der Patienten mit Tocilizumab Therapie ist statistisch signifikant niedriger als bei Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie (27,9 mg/dl vs. 44,2 mg/dl;  $p=0,043$ ).**

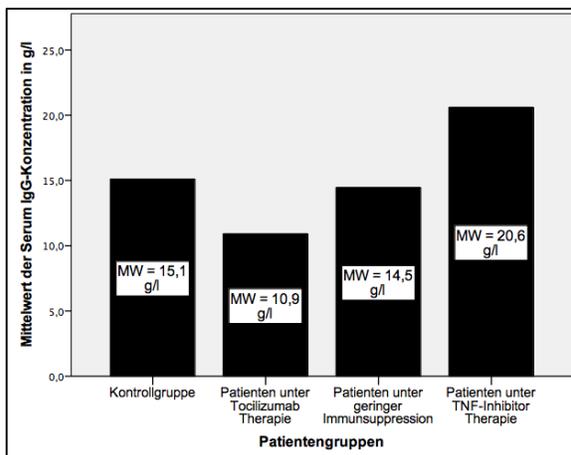
Mittels ELISA-Technik wurde die IgA-Konzentration im Serum der RA Patienten unter unterschiedlicher Therapie und der gesunden Kontrollgruppe gemessen. Im dargestellten Balkendiagramm werden die unterschiedlichen IgA-Serumkonzentrationen von Patienten unter Tocilizumab Therapie mit denen der Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie verglichen.

#### **4.6.5 Die IgG-Konzentration im Serum der RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie ist statistisch signifikant höher als bei RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie, RA Patienten mit Tocilizumab Therapie und als bei der gesunden Kontrollgruppe**

Die IgG-Serumkonzentration ist bei RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie signifikant höher als bei RA Patienten unter Therapie mit Tocilizumab ( $p=0,001$ ) oder geringer immunsuppressiver Therapie ( $p=0,035$ ). Auch im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ist die IgG-Serumkonzentration der Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie signifikant höher ( $p=0,029$ ). Die IgG-Konzentration beträgt bei den Patienten mit geringer Immunsuppression 14,4 g/l, bei den Patienten mit Tocilizumab Therapie 10,9 g/l und bei der gesunden Kontrollgruppe 15,1 g/l. Die Konzentration an IgG liegt bei Patienten unter Therapie mit TNF-Inhibitoren dagegen bei 20,6 g/l.

Versuchsgruppe	gesunde Kontrollgruppe	RA Patienten mit Tocilizumab Therapie	RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie	RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie
Konzentration IgG	MW = 15,1 g/l SEM = 1,4 g/l n = 10	MW = 10,9 g/l SEM = 1,2 g/l n = 10	MW = 14,5 g/l SEM = 1,7 g/l n = 10	MW = 20,6 g/l SEM = 2,0 g/l n = 9

**Tabelle 19: Unterschiede der IgG-Konzentration im Serum der verschiedenen Versuchsgruppen**



**Abbildung 31: Die IgG-Konzentration im Serum der Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie ist statistisch signifikant höher als bei den RA Patienten unter Therapie mit geringer Immunsuppression (20,6 g/l vs. 14,5 g/l;  $p=0,035$ ), den RA Patienten unter Therapie mit Tocilizumab (20,6 g/l vs. 10,9 g/l;  $p=0,001$ ) und als bei der gesunden Kontrollgruppe (20,6 g/l vs. 15,1 g/l;  $p=0,029$ ).**

Mittels ELISA-Technik wurde die IgG-Konzentration im Serum der RA Patienten unter unterschiedlicher Therapie und der gesunden Kontrollgruppe gemessen. Im dargestellten Balkendiagramm werden die unterschiedlichen IgG-Serumkonzentrationen der Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie mit denen der RA Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie, der RA Patienten unter Tocilizumab Therapie und der gesunden Kontrollgruppe verglichen.

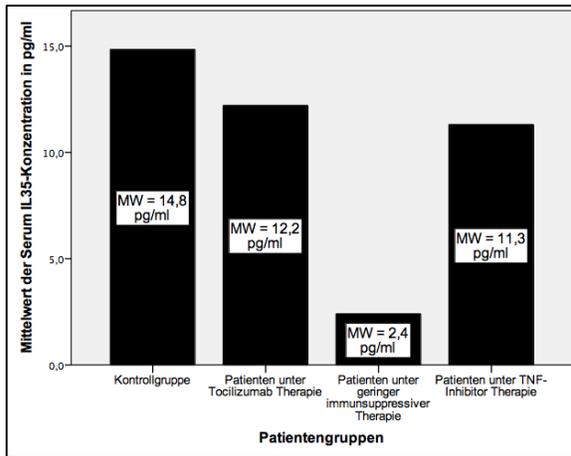
#### **4.6.6 Vergleich der IL35-Konzentration im Serum zwischen RA Patienten und der gesunden Kontrollgruppe**

Aufgrund der sehr geringen Konzentration an IL35 sowohl im Serum der verschiedenen Patientengruppen als auch im Serum der gesunden Kontrollgruppe

lagen einige Werte unterhalb der Nachweisgrenze des von uns verwendeten Test-Kits (<1pg/ml). Die IL35-Konzentration scheint im Serum der Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie niedriger zu sein als im Serum der gesunden Kontrollgruppe (p=0,247), der RA Patienten mit Tocilizumab Therapie (p=0,143) oder als im Serum der Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie (p=0,052). Statistisch signifikant ist jedoch keiner dieser Unterschiede. Die durchschnittliche IL35-Konzentration beträgt bei RA Patienten mit geringer Immunsuppression 2,4 pg/ml, bei RA Patienten unter Tocilizumab Therapie hingegen 12,2 pg/ml und bei RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie 11,3 pg/ml. Die IL35 Konzentration im Serum der gesunden Kontrollgruppe beträgt 14,8 pg/ml und ist somit tendenziell ähnlich hoch wie die Serumkonzentration der RA Patienten unter immunsuppressiver Therapie mit Tocilizumab oder TNF-Inhibitoren.

<b>Versuchsgruppe</b>	gesunde Kontrollgruppe	RA Patienten mit Tocilizumab Therapie	RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie	RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie
<b>Konzentration IgA</b>	MW = 14,8 pg/ml SEM = 6,4 pg/ml n = 10	MW = 12,2 pg/ml SEM = 5,4 pg/ml n = 10	MW = 2,4 pg/ml SEM = 2,3 pg/ml n = 10	MW = 11,3 pg/ml SEM = 5,0 pg/ml n = 10

**Tabelle 20: Unterschiede der IL35-Konzentration im Serum der verschiedenen Versuchsgruppen**



**Abbildung 32:** Die IL35-Konzentration im Serum der Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie scheint niedriger zu sein als bei den RA Patienten unter Therapie mit TNF-Inhibitoren (2,4 pg/ml vs. 11,3 pg/ml;  $p=0,052$ ), den RA Patienten unter Therapie mit Tocilizumab (2,4 pg/ml vs. 12,2 pg/ml;  $p=0,143$ ) und als bei der gesunden Kontrollgruppe (2,4 pg/ml vs. 14,8 pg/ml;  $p=0,247$ ). Statistisch signifikant sind die Differenzen jedoch nicht.

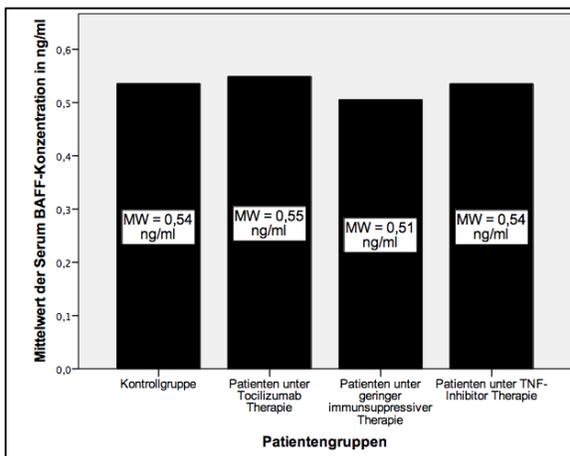
Mittels ELISA-Technik wurde die IL35-Konzentration im Serum der RA Patienten unter unterschiedlicher Therapie und der gesunden Kontrollgruppe gemessen. Im dargestellten Balkendiagramm werden die unterschiedlichen IL35-Serumkonzentrationen der Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie mit denen der RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie, der RA Patienten unter Tocilizumab Therapie und der gesunden Kontrollgruppe verglichen.

#### 4.6.7 Keine Unterschiede der BAFF-Konzentration im Serum der verschiedenen Versuchsgruppen nachweisbar

Die BAFF-Konzentration im Serum unterscheidet sich nicht zwischen den RA Patienten unter verschiedener Therapie. Auch im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe gibt es bei den RA Patienten keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die BAFF-Konzentration im Serum beträgt bei der Kontrollgruppe 0,54 ng/ml. Bei den RA Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie beträgt die Konzentration 0,51 ng/ml, bei den Patienten unter Tocilizumab Therapie 0,55 ng/ml und bei den Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie 0,54 ng/ml.

<b>Versuchsgruppe</b>	gesunde Kontrollgruppe	RA Patienten mit Tocilizumab Therapie	RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie	RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie
<b>Konzentration BAFF</b>	MW = 0,54 ng/ml SEM = 0,03 ng/ml n = 10	MW = 0,55 ng/ml SEM = 0,06 ng/ml n = 10	MW = 0,51 ng/ml SEM = 0,09 ng/ml n = 10	MW = 0,54 ng/ml SEM = 0,1 ng/ml n = 10

**Tabelle 21: Unterschiede der BAFF-Konzentration im Serum der verschiedenen Versuchsgruppen**



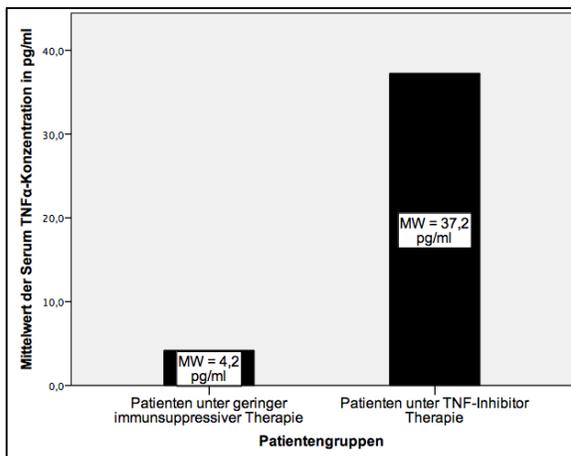
**Abbildung 33: Es sind keine statistisch signifikanten Unterschiede der BAFF-Konzentration im Serum der RA Patienten unter verschiedener Therapie und der gesunden Kontrollgruppe festzustellen.**

Mittels ELISA-Technik wurde die BAFF-Konzentration im Serum der RA Patienten unter unterschiedlicher Therapie und der gesunden Kontrollgruppe gemessen. Im dargestellten Balkendiagramm werden die unterschiedlichen BAFF-Serumkonzentrationen der gesunden Kontrollgruppe und der Patienten unter verschiedener Therapie verglichen.

#### **4.6.8 Die TNF $\alpha$ -Konzentration im Serum der RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie ist statistisch signifikant höher als bei RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie**

Die TNF $\alpha$ -Konzentration im Serum ist bei den RA Patienten unter Therapie mit den TNF-Inhibitoren Adalimumab oder Etanercept statistisch signifikant höher als bei den Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie (p=0,019). Die TNF $\alpha$ -

Konzentration im Serum liegt bei den RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie bei einer durchschnittlichen Konzentration von 37,2 pg/ml. Bei den RA Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie liegt die TNF $\alpha$ -Konzentration im Serum dagegen nur bei 4,2 pg/ml.



**Abbildung 34: Die TNF $\alpha$ -Konzentration im Serum der Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie ist statistisch signifikant höher als bei Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie (37,2 pg/ml vs. 4,2 pg/ml; p=0,019).**

Mittels ELISA-Technik wurde die TNF $\alpha$ -Konzentration im Serum der RA Patienten unter unterschiedlicher Therapie und der gesunden Kontrollgruppe gemessen. Im dargestellten Balkendiagramm werden die unterschiedlichen TNF $\alpha$ -Serumkonzentrationen von Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie mit denen der Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie verglichen.

#### **4.6.9 Vergleich der TNF $\alpha$ -Konzentration im Serum zwischen RA Patienten und der gesunden Kontrollgruppe**

Patienten mit RA unter Therapie mit TNF-Inhibitoren haben im Mittel eine höhere Konzentration an TNF $\alpha$  im Serum als Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie oder Patienten unter Tocilizumab Therapie. Statistisch signifikant sind diese Alterationen jedoch nur zwischen Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie und Patienten unter geringer Immunsuppression (p=0,019). Auch die gesunde Kontrollgruppe scheint eine niedrigere TNF $\alpha$ -Konzentration im Serum aufzuweisen als RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie. Statistisch signifikant ist dieser

Unterschied jedoch nicht.

<b>Versuchsgruppe</b>	gesunde Kontrollgruppe	RA Patienten mit Tocilizumab Therapie	RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie	RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie
<b>Konzentration TNF<math>\alpha</math></b>	MW = 13,8 pg/ml SEM = 9,9 pg/ml n = 10	MW = 12,4 pg/ml SEM = 6,9 pg/ml n = 10	MW = 4,2 pg/ml SEM = 3,1 pg/ml n = 10	MW = 37,2 pg/ml SEM = 14,7 pg/ml n = 10

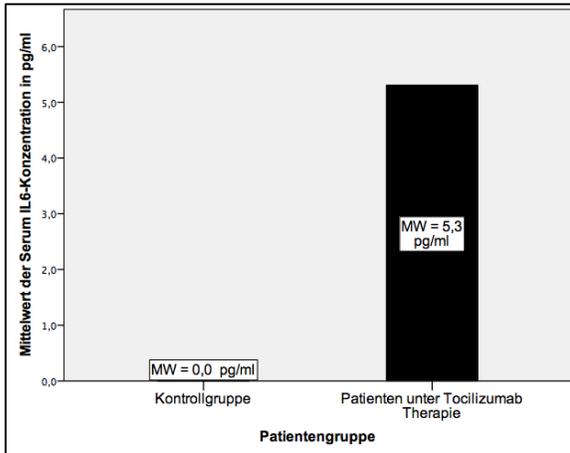
**Tabelle 22: Unterschiede der TNF $\alpha$ -Konzentration im Serum der verschiedenen Versuchsgruppen**

#### **4.6.10 Die IL6-Konzentration im Serum der RA Patienten mit Tocilizumab Therapie ist statistisch signifikant höher als bei der gesunden Kontrollgruppe**

Die Sensitivität des verwendeten ELISA-Tests ließ eine minimal zu detektierende Konzentration von 2 pg/ml zu. Bei der gesunden Kontrollgruppe liegt keine der gemessenen Proben oberhalb dieser Nachweisgrenze und somit sind alle gemessenen IL6-Konzentrationen in dieser Versuchsgruppe  $\leq 2$  pg/ml. Bei den RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie ist lediglich eine gemessene Probe (22,5 pg/ml) über der detektierbaren Schwelle. Bei der Messung der IL6-Konzentration der RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie konnte ebenfalls nur eine Probe (12,4 pg/ml) oberhalb der Nachweisgrenze von 2 pg/ml erfasst werden.

Patienten unter Tocilizumab Therapie haben eine deutlich höhere IL6 Konzentration im Serum als alle anderen untersuchten Patientenkollektive und die gesunde Kontrollgruppe. Bei den RA Patienten unter Therapie mit Tocilizumab konnten 6 von 10 Patienten mit IL6-Werten im Serum oberhalb der Nachweisgrenze erfasst werden. Die durchschnittliche IL6-Konzentration bei Patienten unter Tocilizumab

Therapie liegt bei 5,3 pg/ml. Statistisch signifikant ist der Unterschied der IL6-Serumkonzentration jedoch nur zwischen den RA Patienten unter Tocilizumab und der gesunden Kontrollgruppe (p=0,023).



**Abbildung 35: Die IL6-Konzentration im Serum der Patienten mit Tocilizumab Therapie ist statistisch signifikant höher als bei der gesunden Kontrollgruppe (5,3 pg/ml vs.  $\leq 2$  pg/ml; p=0,023).**

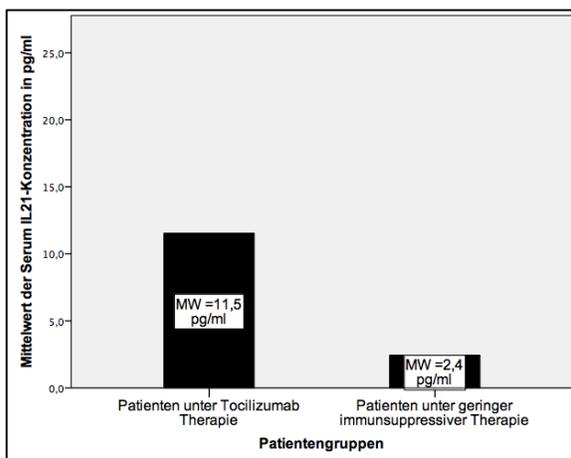
Mittels ELISA-Technik wurde die IL6-Konzentration im Serum der RA Patienten unter unterschiedlicher Therapie und der gesunden Kontrollgruppe gemessen. Im dargestellten Balkendiagramm werden die unterschiedlichen IL6-Serumkonzentrationen von Patienten unter Tocilizumab Therapie mit denen der gesunden Kontrollgruppe verglichen. Die minimal zu detektierende IL6-Serumkonzentration des verwendeten Test-Kits betrug 2 pg/ml. Sämtliche Werte der Probanden der gesunden Kontrollgruppe lagen unterhalb dieser detektierbaren Schwelle.

Versuchsgruppe	gesunde Kontrollgruppe	RA Patienten mit Tocilizumab Therapie	RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie	RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie
<b>Konzentration TNF<math>\alpha</math></b>	MW = $\leq 2$ pg/ml n = 10	MW = 5,3 pg/ml SEM = 1,8 pg/ml n = 10	MW = 2,3 pg/ml SEM = 2,3 pg/ml n = 10	MW = 1,2 pg/ml SEM = 1,2 pg/ml n = 10

**Tabelle 23: Unterschiede der IL6-Konzentration im Serum der verschiedenen Versuchsgruppen**

#### 4.6.11 Die IL21-Konzentration im Serum der RA Patienten unter Tocilizumab Therapie ist statistisch signifikant höher als bei RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie

Die IL21-Konzentration im Serum der RA Patienten unter Tocilizumab Therapie ist signifikant höher als die IL21-Konzentration der RA Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie ( $p=0,029$ ). Die IL21-Serumkonzentration beträgt bei den RA Patienten unter Tocilizumab Therapie 11,5 pg/ml und bei den RA Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie nur 2,4 pg/ml.



**Abbildung 36: Die IL21-Konzentration im Serum der Patienten mit Tocilizumab Therapie ist statistisch signifikant höher als bei Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie (11,5 pg/ml vs. 2,4 pg/ml;  $p=0,029$ ).**

Mittels ELISA-Technik wurde die IL21-Konzentration im Serum der RA Patienten unter unterschiedlicher Therapie und der gesunden Kontrollgruppe gemessen. Im dargestellten Balkendiagramm werden die unterschiedlichen IL21-Serumkonzentrationen von Patienten unter Tocilizumab Therapie mit denen der Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie verglichen.

#### 4.6.12 Vergleich der IL21-Konzentration im Serum zwischen RA Patienten und der gesunden Kontrollgruppe

Die IL21-Konzentration im Serum ist bei den Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie geringer als bei der gesunden Kontrollgruppe oder den

anderen untersuchten Patientengruppen. Statistisch signifikant ist jedoch nur der Unterschied zwischen den RA Patienten unter Tocilizumab Therapie und den RA Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie.

Auch die gesunden Probanden scheinen eine höhere IL21-Serumkonzentration aufzuweisen als die RA Patienten unter Therapie mit Tocilizumab oder TNF-Inhibitoren, statistisch signifikant sind diese Unterschiede jedoch nicht. Die mittlere IL21-Serumkonzentration beträgt bei der gesunden Kontrollgruppe 22,6 pg/ml. Bei den Patienten unter Tocilizumab Therapie wurde im Mittel eine Konzentration von 11,5 pg/ml, bei den Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie eine Konzentration von 18,1 pg/ml und bei den Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie eine IL21-Konzentration von 2,4 pg/ml gemessen.

<b>Versuchsgruppe</b>	gesunde Kontrollgruppe	RA Patienten mit Tocilizumab Therapie	RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie	RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie
<b>Konzentration TNF<math>\alpha</math></b>	MW = 22,6 pg/ml SEM = 12,7 pg/ml n = 10	MW = 11,5 pg/ml SEM = 5,5 pg/ml n = 10	MW = 2,4 pg/ml SEM = 2,4 pg/ml n = 10	MW = 18,1 pg/ml SEM = 9,1 pg/ml n = 10

**Tabelle 24: Unterschiede der IL21-Konzentration im Serum der verschiedenen Versuchsgruppen**

## 5. Diskussion

### 5.1 Veränderungen des Anteils der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs bei RA Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe

Unsere Untersuchungen zeigen, dass der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an

den PBMCs bei Patienten mit RA unter geringer immunsuppressiver Therapie signifikant niedriger ist als bei einer gesunden Kontrollgruppe. Auch im Vergleich zu RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie ist der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe signifikant niedriger.

In der Literatur gibt es bisher unterschiedliche Angaben zur quantitativen Veränderung der CD3-CD19+ B-Lymphozyten. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen wurden in Untersuchungen von Fekete et al. [115] und Roll et al. [86] eine signifikante Abnahme der gesamten B-Lymphozyten bei RA Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden beschrieben. Weshalb genau die CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei Patienten mit RA im peripheren Blut erniedrigt sein könnten wird kontrovers diskutiert. Eine Möglichkeit ist, dass durch eine Umverteilung der B-Lymphozyten in andere Kompartimente, wie zum Beispiel die inflammatorisch veränderte Synovia, die Anzahl der CD3-CD19+ B-Lymphozyten im peripheren Blut absinkt [107]. Es gibt jedoch auch aktuelle Studien bei denen keine Veränderungen festzustellen waren. Nach Mahmood et al. [116] scheint sich die Gesamtzahl der B-Lymphozyten bei Patienten mit RA im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe statistisch nicht signifikant zu verändern. Auch nach den Ergebnissen von Souto-Carneiro et al. [107] gibt es keine Unterschiede, was diese Annahme bestätigt. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind vermutlich auf die individuelle Variabilität des Phänotyps und die unterschiedliche Pathobiologie der RA je nach Krankheitsstadium zurückzuführen [108]. Auch muss beachtet werden, dass durch das leicht zugängliche periphere Blut lediglich die systemische Homöostase der B-Lymphozyten und nicht die lokale Akkumulation im entzündlich veränderten Gewebe beurteilt werden kann [108].

## **5.2 Einfluss verschiedener immunsuppressiver Therapieschemata auf den Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs bei Patienten mit RA**

Unsere Daten zeigen, dass der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs im peripheren Blut bei Patienten mit RA unter Tocilizumab Therapie signifikant höher ist als bei RA Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie oder bei RA Patienten unter Therapie mit TNF-Inhibitoren. Auffallend ist außerdem, dass Patienten unter Therapie mit Tocilizumab nach unseren Untersuchungen einen ähnlichen Anteil an CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs aufweisen wie die gesunde Kontrollgruppe.

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen zeigte sich in einer Studie von Roll et al. [86] ein statistisch signifikanter Anstieg der CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei Patienten mit RA unter Therapie mit Tocilizumab. Wie bei unseren Untersuchungen konnte bisher bei RA Patienten unter Therapie mit TNF-Inhibitoren, im Gegensatz zu RA Patienten unter Therapie mit Tocilizumab, keine Veränderung des Anteils der CD3-CD19+ B-Lymphozyten beobachtet werden [117]. Es lässt sich daher vermuten, dass durch die Therapie mit dem IL6-Inhibitor Tocilizumab der pathologisch niedrige B-Lymphozyten Anteil im peripheren Blut von Patienten mit RA wieder auf einen ähnlichen Anteil der PBMCs steigt wie bei gesunden Individuen. Unter Therapie mit den TNF-Inhibitoren Etanercept oder Adalimumab scheint eine solche Veränderung jedoch nicht möglich zu sein. Ob es sich hierbei gegebenenfalls um eine distributive Veränderung handelt und autoreaktive B-Lymphozyten unter Tocilizumab Therapie in geringerem Ausmaß vom Blut in inflammatorische Kompartimente migrieren, konnte mit unseren Versuchen nicht dargestellt werden und gilt es weiter zu untersuchen.

### **5.3 Veränderungen des Anteils der CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen an den gesamten B-Lymphozyten bei RA Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe**

Beim Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen an den gesamten B-Lymphozyten im peripheren Blut konnten wir keinen signifikanten Unterschied

zwischen Patienten mit RA und einer gesunden Kontrollgruppe feststellen. Tendenziell scheint der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen an den B-Lymphozyten bei Patienten mit RA jedoch höher als bei der gesunden Kontrollgruppe zu sein.

Inwiefern sich der Anteil der Gedächtniszellen der B-Lymphozyten bei Patienten mit RA im Vergleich zu gesunden Probanden verändert ist bisher noch nicht eindeutig geklärt und es gibt unterschiedliche Angaben in verschiedenen Untersuchungen. Wie nach unseren generierten Daten vermutet, gibt es auch in anderen Studien Hinweise darauf, dass die Gesamtzahl der CD20-CD27+ Gedächtniszellen der B-Lymphozyten im peripheren Blut bei Patienten mit RA ansteigt [115, 118]. Es wird davon ausgegangen, dass diese vermehrt im peripheren Blut vorkommenden CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen an der Aufrechterhaltung der chronischen Inflammation der RA beteiligt sind [116]. Nach den Ergebnissen von Souto-Carneiro et al. [107] konnte hingegen kein Unterschied des Anteils der Gedächtniszellen bei Patienten mit RA im Vergleich zur einer gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden [107]. Zu beachten ist, dass die CD27+ Gedächtniszellen bei einigen Studien weiter in IgD+CD27+ pre-switch und IgD-CD27+ post-switch Gedächtniszellen unterteilt wurden [107, 108, 115]. Hierbei scheinen die IgD+CD27+ pre-switch Gedächtniszellen bei Patienten mit RA im peripheren Blut niedriger zu sein als bei gesunden Probanden [107, 108]. Die IgD-CD27+ post-switch Gedächtniszellen im peripheren Blut sind nach Souto-Carneiro et al. [107] hingegen bei zunehmender Krankheitsdauer erhöht. Zusätzlich konnte in der Synovia sowohl eine Anreicherung der IgD-CD27+ post-switch als auch der IgD+CD27+ pre-switch Gedächtniszellen nachgewiesen werden [107]. Durch den erniedrigten Anteil der pre-switch Gedächtniszellen im peripheren Blut bei gleichzeitiger Akkumulation in der Synovia wird angenommen, dass bei der RA IgD+CD27+ pre-switch Gedächtniszellen aus dem peripheren Blut gezielt in die Synovia einwandern und eine chronische Entzündungsreaktion hervorrufen [107, 108, 119, 120]. Auch die IgD-CD27+ post-switch Gedächtniszellen scheinen vom

peripheren Blut in die Synovia zu migrieren, obwohl diese Subpopulation der Gedächtniszellen im peripheren Blut nicht erniedrigt zu sein scheint [107] sondern nach Roll et al. [86] sogar erhöht sein soll. Zusätzlich deutet nach den Untersuchungen von Fedele et al. [121] vieles daraufhin, dass die CD27+ Gedächtniszellen je nach Dauer der RA Erkrankung in unterschiedlicher Konzentration im peripheren Blut vorkommen. Es wurde festgestellt, dass zu Beginn der Erkrankung ein höherer Anteil und eine höhere absolute Anzahl an Gedächtniszellen im peripheren Blut zu messen waren als zu einem späteren Zeitpunkt im Krankheitsverlauf [121]. Da die Datenlage zur Verteilung der verschiedenen Subpopulationen der Gedächtniszellen bei Patienten mit RA bisher uneindeutig und unzureichend ist, bedarf es hier weiterer Untersuchungen. Auch die Bedeutung der CD20+CD27+ Gedächtniszellen an der Pathogenese der RA ist bisher noch weitgehend ungeklärt.

#### **5.4 Einfluss verschiedener immunsuppressiver Therapien auf den Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen an den gesamten B-Lymphozyten bei Patienten mit RA**

Nach unseren Untersuchungen gibt es keine signifikanten Unterschiede des Anteils der CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen an den gesamten B-Lymphozyten im peripheren Blut bei RA Patienten unter unterschiedlichen immunsuppressiven Therapieschemata. Tendenziell scheint der Anteil der Gedächtniszellen bei RA Patienten sowohl unter Therapie mit TNF-Inhibitoren als auch unter Therapie mit Tocilizumab im Vergleich zu RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie abzusinken und sich dem Anteil der gesunden Kontrollgruppe anzunähern.

Auch bezüglich der Veränderungen des Anteils der Gedächtniszellen an den gesamten B-Lymphozyten im peripheren Blut bei RA Patienten unter Therapie mit TNF-Inhibitoren gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Nach Anolik et al. [122] kommt es bei RA Patienten unter Therapie mit TNF-Inhibitoren zu einem

statistisch signifikanten Abfall der CD27+ Gedächtniszellen im peripheren Blut. Anderen Studien zufolge scheinen die Anteile der IgD+CD27+ pre-switch Gedächtniszellen [86, 107] und der IgD-CD27+ post-switch Gedächtniszellen [86] im peripheren Blut unter Therapie mit TNF-Inhibitoren deutlich anzusteigen. Man geht daher davon aus, dass die Migration vor allem der pre-switch Gedächtniszellen in die Synovia unter anderem TNF vermittelt stattfindet und durch eine Therapie mit TNF-Inhibitoren verhindert werden kann [107]. Ähnlich wie bei unseren Untersuchungen scheint nach Roll et al. [86] bei RA Patienten durch eine Therapie mit Tocilizumab der Anteil der CD27+ Gedächtniszellen im peripheren Blut hingegen abzusinken. Weshalb genau eine Therapie mit Tocilizumab bei RA Patienten zu einer solchen Reduzierung der CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen im peripheren Blut führen könnte und inwiefern hierdurch die Infiltration der Synovia beeinflusst wird, ist nach dem aktuellen Stand der Forschung unklar.

#### **5.5 Veränderungen der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten bei RA Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe**

Nach unseren Auswertungen ist der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an den gesamten B-Lymphozyten im peripheren Blut von Patienten mit RA signifikant niedriger als bei der gesunden Kontrollgruppe.

Unsere Daten stimmen hierbei mit bereits durchgeführten Studien überein. Sowohl nach Fekete et al. [115] als auch nach Roll et al. [86] ist der Anteil der naiven B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten im peripheren Blut bei Patienten mit RA signifikant niedriger als bei gesunden Probanden. Nach Souto-Carneiro et al. [107] wurde eine signifikant niedrigere absolute Anzahl an naiven B-Lymphozyten im peripheren Blut von Patienten mit RA gemessen. Der Anteil der naiven B-Lymphozyten an den gesamten B-Lymphozyten im peripheren Blut ist hier hingegen statistisch nicht signifikant verändert [107]. Genau wie der Anteil der CD20+CD27+ Gedächtniszellen an den gesamten B-Lymphozyten scheint auch der

Anteil der CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten im Krankheitsverlauf variabel zu sein [121]. Zu Beginn der Erkrankung wurde ein hoher Anteil an naiven B-Lymphozyten im peripheren Blut festgestellt [121]. Es ist bekannt, dass sich unter den CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten ein entscheidender Teil der autoreaktiven B-Lymphozyten befindet und gerade auf den naiven B-Lymphozyten vermehrt autoreaktive B-Zellrezeptoren anzutreffen sind [121, 123]. Aus diesem Grund geht man davon aus, dass die naiven B-Lymphozyten vor allem zu Beginn der RA Erkrankung eine entscheidende Rolle spielen [121]. Im Krankheitsverlauf scheint der Anteil der naiven B-Lymphozyten im Vergleich zu gesunden Probanden jedoch wieder vermindert zu sein [121], was unsere Daten nahelegen. Weshalb die CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten im peripheren Blut bei Patienten mit RA zu Krankheitsbeginn deutlich erhöht sind und im Krankheitsverlauf wieder abzusinken scheinen ist nicht geklärt.

#### **5.6 Einfluss verschiedener immunsuppressiver Therapien auf die CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten bei Patienten mit RA**

Nach unseren Daten steigt der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten im peripheren Blut bei Patienten mit RA sowohl unter Therapie mit TNF-Inhibitoren als auch unter Therapie mit Tocilizumab im Vergleich zu RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie tendenziell an. Der Anteil der naiven B-Lymphozyten scheint sich unter Therapie mit TNF-Inhibitoren oder unter Therapie mit Tocilizumab den gemessenen Werten der gesunden Probanden anzunähern, bleibt jedoch unter beiden Therapieschemata weiterhin erhöht. Statistisch signifikant sind diese Werte nicht.

Übereinstimmend mit der Tendenz unserer Ergebnisse wurde durch Anolik et al. [122] festgestellt, dass sowohl der Anteil als auch die Gesamtzahl der CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten bei RA Patienten unter Therapie mit TNF-Inhibitoren ansteigt. Da bekannt ist, dass das Zytokin TNF unter anderem murine naive B-

Lymphozyten aus dem Knochenmark mobilisiert [124], ist der erhöht gemessene Anteil der naiven B-Lymphozyten bei RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie bisher nicht zu erklären. Wie bei unseren Untersuchungen festgestellt wurde, ist auch nach den Daten von Roll et al. [86] der Anteil der naiven B-Lymphozyten unter Therapie mit Tocilizumab statistisch nicht signifikant verändert. Die absolute Anzahl der naiven B-Lymphozyten steigt hingegen nach Roll et al. [86] bei RA Patienten unter Therapie mit Tocilizumab statistisch signifikant an.

### **5.7 Veränderungen der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten bei RA Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe**

Von besonderem Interesse war bei unseren durchgeführten Untersuchungen inwiefern sich der Anteil der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten an den gesamten B-Lymphozyten bei Patienten mit RA im peripheren Blut verändert. Hierbei fällt auf, dass sowohl die RA Patienten unter Therapie mit TNF-Inhibitoren als auch die RA Patienten mit geringer Immunsuppression einen höheren Anteil an Plasmablasten im peripheren Blut aufweisen als die gesunde Kontrollgruppe. Statistisch signifikant ist der Unterschied bei den RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie. Bemerkenswert ist außerdem, dass bei den RA Patienten im Gegensatz zu den gesunden Probanden erhebliche interindividuelle Unterschiede zu messen sind.

Bei den aktuellen Untersuchungen von Li et al. [125] konnte übereinstimmend mit unseren Ergebnissen gezeigt werden, dass RA Patienten einen höheren Anteil an Plasmablasten im peripheren Blut aufweisen als gesunde Probanden. Erhöhte Konzentrationen von CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten im peripheren Blut konnten zuvor zwar bereits bei an systemischem Lupus erythematoses erkrankten Patienten nachgewiesen werden [126], nicht jedoch bei Patienten mit RA [117]. Es ist bekannt, dass Plasmablasten eine entscheidende Rolle an der Pathogenese der RA spielen und die Zellpopulation eine stattfindende Immunreaktion widerspiegelt

[125]. Somit könnte sich auch die erhöhte Frequenz der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten im peripheren Blut im Rahmen einer chronisch autoreaktiven Inflammation bei Patienten mit RA erklären lassen. Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass die terminal differenzierten Plasmablasten ein entscheidender Angriffspunkt in der antirheumatischen Therapie darstellen könnten. Weiterhin interessant ist, dass durch Fedele et al. [121] gezeigt werden konnte, dass bei RA Patienten zu Krankheitsbeginn ein statistisch signifikant niedrigerer Anteil an Plasmablasten im peripheren Blut zu messen ist als nach langjährigem Verlauf. Hierdurch lassen sich möglicherweise auch die von uns erfassten interindividuellen Unterschiede der Plasmablasten-Konzentration bei RA Patienten erklären, die bei der gesunden Kontrollgruppe nicht zu messen waren.

#### **5.8 Einfluss verschiedener immunsuppressiver Therapien auf die CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten bei Patienten mit RA**

Wie bereits beschrieben konnten wir nachweisen, dass RA Patienten unter Therapie mit TNF-Inhibitoren einen signifikant höheren Anteil an CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten im peripheren Blut besitzen als eine gesunde Kontrollgruppe. Unter geringer Immunsuppression scheinen die Plasmablasten bei RA Patienten tendenziell ebenfalls erhöht zu sein. Auffallend ist, dass RA Patienten unter Tocilizumab Therapie einen niedrigeren Anteil an Plasmablasten im peripheren Blut aufweisen als RA Patienten unter Therapie mit TNF-Inhibitoren oder RA Patienten mit geringer Immunsuppression. Auch wenn diese Unterschiede statistisch knapp nicht signifikant sind, scheinen Patienten unter IL6-Inhibition wieder ähnliche Werte an Plasmablasten im peripheren Blut zu erreichen wie gesunde Probanden. Es konnte somit das erste Mal gezeigt werden, dass Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie im Vergleich zu gesunden Probanden einen erhöhten Anteil an Plasmablasten im peripheren Blut aufweisen, was hingegen bei Patienten unter Tocilizumab-Therapie nicht der Fall ist.

Es gibt bisher kaum Untersuchungen über den Einfluss von Tocilizumab auf terminal differenzierte CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten. Nach Roll et al. [86] konnte kein signifikanter Abfall der Plasmablasten im peripheren Blut bei RA Patienten unter Therapie mit Tocilizumab nachgewiesen werden. Zum Einfluss der TNF-Inhibitoren auf Plasmablasten im peripheren Blut liegen bisher keine weiteren Daten vor. Wie bereits beschrieben haben nach unseren Untersuchungen RA Patienten unter Tocilizumab Therapie im Vergleich zu gesunden Probanden keinen erhöhten Anteil an Plasmablasten im peripheren Blut, während der Anteil der Plasmablasten bei RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie statistisch signifikant erhöht ist. Aus diesem Grund sollte in weiteren Studien untersucht werden, ob ein niedriger oder sinkender Plasmablasten-Anteil im peripheren Blut von RA Patienten unter Therapie mit Tocilizumab mit einem klinischen Benefit verbunden ist. Weiter gilt es zu erforschen, ob über Veränderungen des Plasmablasten-Anteils Voraussagen über individuelle Wirkung und Therapieansprechen auf eine immunsuppressive Therapie mit Tocilizumab gestellt werden können.

## **5.9 Unterschiede der Serumkonzentrationen der Zytokine BAFF, IL6, IL21, IL35 und TNF $\alpha$ bei RA Patienten**

Ergänzend zur Immunphänotypisierung der B-Lymphozyten im peripheren Blut von RA Patienten unter immunmodulatorischer Therapie wurde eine Serumanalyse verschiedener an der Pathogenese der RA beteiligter Zytokine durchgeführt.

### **5.9.1 BAFF**

Bei der BAFF-Serumkonzentration gibt es nach unseren Messungen keine Unterschiede zwischen Patienten mit RA und gesunden Probanden. Auch unter Therapie mit TNF-Inhibitoren oder Tocilizumab gibt es keine Veränderungen der BAFF-Konzentration im Serum im Vergleich zu RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie.

Es ist bekannt, dass BAFF eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der RA spielt, indem es unter anderem die Homöostase der B-Lymphozyten reguliert und auch an der Reifung der B-Lymphozyten beteiligt ist [127]. Wie nach unseren Daten konnte bei den Untersuchungen von Sellam et al. [128] eine vergleichbare BAFF-Serumkonzentration bei Patienten mit RA und gesunden Probanden festgestellt werden. Es wurden bisher jedoch diverse Einflussfaktoren auf die BAFF-Serumkonzentration im Rahmen einer RA Erkrankung beschrieben [127, 129, 130]. Nach Geng et al. [130] ist die BAFF Konzentration im Serum bei seropositiven RA Patienten signifikant höher als bei seronegativen. Außerdem scheint die BAFF-Konzentration direkt abhängig von der Krankheitsaktivität und dem radiologischen Krankheitsprozess zu sein [130]. Über Veränderungen der BAFF-Serumkonzentration bei RA Patienten unter Therapie mit Tocilizumab oder TNF-Inhibitoren liegen bisher keine Daten vor. Nach unseren Untersuchungen bleibt die BAFF-Konzentration jedoch auch unter der jeweiligen Therapie unverändert.

### **5.9.2 IL6**

Die IL6-Serumkonzentration war bei der gesunden Kontrollgruppe mittels des von uns verwendeten ELISA-Testkits bei keinem der Probanden messbar, da die Konzentration stets unter der Nachweisgrenze von 2 pg/ml lag. Bei RA Patienten unter geringer Immunsuppression oder TNF-Inhibitor Therapie konnten hingegen leicht erhöhte IL6-Konzentrationen im Serum festgestellt werden, auch wenn diese im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe statistisch nicht signifikant waren. Bemerkenswert ist bei unseren Untersuchungen jedoch, dass die IL6-Serumkonzentration bei RA Patienten unter IL6-Inhibitor Therapie mit Tocilizumab im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe statistisch signifikant ansteigt.

Es ist bekannt, dass IL6 eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine im Rahmen der Pathogenese der RA darstellt und IL6 den Grad des aktuellen

Entzündungsgeschehens widerspiegelt [131]. Tendenziell scheinen Patienten mit RA unseren Daten nach im Vergleich zu gesunden Probanden eine erhöhte IL6-Konzentration im Serum aufzuweisen, was nach Saeki et al. [131] vor allem in frühen Stadien der RA der Fall ist. Wie bei unseren Untersuchungen konnten aufgrund der sehr niedrigen physiologischen IL6-Konzentrationen im Serum auch in anderen Studien nicht bei jedem RA Patient oder Probanden Werte oberhalb der je nach Testkit spezifischen Nachweisgrenze erfasst werden [132]. Nach Souto-Carneiro et al. [107] senken TNF-Inhibitoren bei RA Patienten signifikant die IL6-Konzentration, was nach unseren Ergebnissen jedoch nicht der Fall war. Übereinstimmend mit unseren Untersuchungen steigt die IL6-Konzentration im Serum von RA Patienten unter Tocilizumab Therapie nach Nishimoto et al. [87] statistisch signifikant an. Auch die Konzentration des sIL6R scheint nach Nishimoto et al. [87] im Serum unter Tocilizumab Therapie anzusteigen. Es wird vermutet, dass die sIL6R-Konzentration im Serum durch eine Verlängerung der Halbwertszeit durch die Bildung des Tocilizumab/sIL6R-Immunkomplexes erhöht ist [87]. Der erhöhte IL6-Serumspiegel unter Tocilizumab Therapie lässt sich wahrscheinlich durch die Bindungsunfähigkeit von IL6 an den Tocilizumab/sIL6R-Immunkomplex erklären, weshalb das Zytokin nicht physiologisch IL6R-vermittelt verbraucht werden kann und frei im Serum verbleibt [87]. Außerdem korreliert die Erhöhung der IL6-Konzentration nach Gottenberg et al. [132] signifikant mit inflammatorischen Biomarkern wie dem CRP oder der BSG. Es wird letztendlich vermutet, dass der IL6-Serumspiegel zukünftig potentiell dazu beitragen kann, eine Progression der Knochen- und Knorpel-Destruktion vor allem in frühen Krankheitsstadien vorauszusagen [131].

### **5.9.3 IL21**

Nach unseren Daten konnte erstmals gezeigt werden, dass Patienten unter Therapie mit Tocilizumab eine statistisch signifikant höhere IL21-Serumkonzentration aufweisen als Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie. Außerdem konnten wir bei den RA Patienten unter Therapie mit

Tocilizumab, Therapie mit TNF-Inhibitoren und geringer immunsuppressiver Therapie geringere IL21-Serumwerte messen als bei der gesunden Kontrollgruppe. Diese Unterschiede erreichten statistisch jedoch keine Signifikanz.

Nach den Ergebnissen von Zhang et al. [133] scheint der IL21-Serumspiegel bei RA Patienten ohne Therapie statistisch signifikant höher zu sein als bei den gesunden Probanden. Bei Sglunda et al. [134] konnten bei RA Patienten im Frühstadium jedoch vergleichbare Werte wie bei der gesunden Kontrollgruppe ermittelt werden. Übereinstimmend mit unseren Werten sinkt die IL21-Konzentration im Serum bei RA Patienten bereits durch die Gabe geringer Dosen Prednisolon von <5mg pro Tag deutlich ab [134]. Somit scheinen die von uns rekrutierten RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie bei den IL21-Serumkonzentrationen nicht das behandlungsnaive Patientenkollektiv widerzuspiegeln. Es gibt aktuell kaum Daten über den Einfluss von Tocilizumab auf die IL21-Konzentration im Serum. Es bleibt bisher ungeklärt, weshalb die Behandlung mit geringen Dosen Prednisolon (<5mg/d) den IL21-Serumspiegel stärker absenkt als eine Therapie mit Tocilizumab. Zusätzlich gilt es im Folgenden zu untersuchen, ob eine Abnahme des IL21-Serumspiegels direkt mit einer Besserung der Krankheitsaktivität assoziiert ist.

#### **5.9.4 IL35**

RA Patienten unter allen von uns untersuchten Therapieschemata scheinen tendenziell einen niedrigeren IL35-Serumspiegel aufzuweisen als gesunde Probanden. Bei Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie konnten wir des Weiteren niedrigere IL35-Werte messen als bei Patienten unter Therapie mit Tocilizumab oder TNF-Inhibitoren. Statistisch signifikant waren diese Unterschiede jedoch nicht.

Übereinstimmend mit unseren Messwerten ist die IL35-Konzentration nach Nakano et al. [27] bei RA Patienten signifikant niedriger als bei gesunden Probanden.

Außerdem scheinen Patienten mit aktiver RA niedrigere IL35-Werte aufzuweisen als RA Patienten mit inaktiver RA [27]. Über den Einfluss von TNF-Inhibitoren oder Tocilizumab auf die IL35-Serumkonzentration ist bisher wenig bekannt. Wie bereits beschrieben, ist unseren Daten nach jedoch sowohl unter Therapie mit TNF-Inhibitoren als auch unter Therapie mit Tocilizumab ein Trend hin zu einer steigenden IL35-Konzentration im Serum verglichen zu RA Patienten mit geringer Immunsuppression zu sehen. Es wurde beschrieben, dass IL35 ein antiinflammatorisches Zytokin darstellt, indem es unter anderem die Differenzierung zu regulatorischen T-Lymphozyten fördert und die Differenzierung zu Th17-Lymphozyten hemmt [135]. Die regulatorischen T-Lymphozyten scheinen bei RA Patienten unter Therapie mit TNF-Inhibitoren [136] und RA Patienten unter Therapie mit Tocilizumab [137, 138] wiederum anzusteigen. Dies könnte möglicherweise durch einen erhöhten IL35-Serumspiegel bedingt sein, was unsere Daten vermuten lassen. Somit könnte das Zytokin IL35 einen guten Parameter zur Erfassung der Krankheitsaktivität darstellen und gleichzeitig als potentielles therapeutisches Ziel verwendet werden [27].

Einer Studie von Filkova et al. [139] nach konnte in der Synovialmembran eine erhöhte IL35-Konzentration nachgewiesen werden. Zusätzlich fand man heraus, dass IL35 die Synthese verschiedener proinflammatorischer Zytokine erhöhen kann [139]. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass entgegen der bisherigen Datenlage IL35 bei Patienten mit RA auch eine proinflammatorische Komponente enthalten könnte [139]. Um die genaue Funktion des Zytokins IL35 an der Pathogenese der RA genauer festlegen zu können, bedarf es somit weiterer Untersuchungen.

### **5.9.5 TNF $\alpha$**

Wir konnten keine signifikanten Unterschiede der TNF $\alpha$ -Konzentration im Serum zwischen RA Patienten und der gesunden Kontrollgruppe feststellen. Auffällig ist

jedoch, dass die  $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration nach unseren Messungen bei RA Patienten unter Therapie mit den TNF-Inhibitoren Adalimumab oder Etanercept statistisch signifikant höher ist als bei RA Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie. Auch im Vergleich zu Patienten unter Therapie mit Tocilizumab scheinen mit TNF-Inhibitoren behandelte RA Patienten erhöhte  $\text{TNF}\alpha$ -Serumwerte aufzuweisen, dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Nach Solus et al. [140] ist die  $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration bei Patienten mit RA deutlich höher als bei gesunden Probanden. Zu erwähnen ist, dass in dieser Studie [140] mit 164 Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie im Vergleich zu unseren Messungen eine deutlich größere Zahl an Probanden generiert wurde. Die TNF-Inhibitoren spielen eine zentrale Rolle an der Pathogenese der RA und stellen somit wie bereits seit langer Zeit bekannt einen essentiellen Bestandteil der therapeutischen Angriffsziele dar.

Wie nach unseren Ergebnissen konnte auch bei Kotyla et al. [141] gezeigt werden, dass Patienten unter Therapie mit dem TNF-Inhibitor Etanercept erhöhte  $\text{TNF}\alpha$ -Werte aufweisen. Bei den Untersuchungen von Kotyla et al. [141] wurde der TNF-Inhibitor Etanercept jedoch isoliert untersucht, während bei unseren Messungen sowohl Adalimumab als auch Etanercept als TNF-Inhibitoren zugelassen waren. Bisher ist nicht endgültig geklärt, weshalb Etanercept die  $\text{TNF}\alpha$ -Serumkonzentration erhöht. Man geht jedoch davon aus, dass die spezifische Struktur des Fusionsproteins Etanercept, bestehend aus einem p75 Rezeptor und dem Fc-Teil des IgG, für den erhöhten  $\text{TNF}\alpha$ -Wert im Serum der Patienten verantwortlich ist, da Etanercept das Zytokin nur irreversibel binden kann [141]. Zusätzlich scheint Etanercept die Immunreaktivität und die Bioaktivität von  $\text{TNF}\alpha$  zu erhöhen, da es die biologisch aktive homotrimere Form stabilisiert [142]. Da diese Erklärungen bisher lediglich Hypothesen darstellen, sollte die Interaktion zwischen dem TNF-Inhibitor Etanercept und dem Zytokin  $\text{TNF}\alpha$  weiter untersucht werden.

## **5.10 Unterschiedliche Verteilung der Immunglobulinklassen G, A und M bei RA Patienten**

Patienten mit RA und geringer immunsuppressiver Therapie haben nach unseren Messungen eine vergleichbare IgM- und IgG-Konzentration im Serum wie gesunde Probanden. Die IgA-Serumkonzentration hingegen ist bei RA Patienten mit geringer Immunsuppression statistisch signifikant höher als bei der gesunden Kontrollgruppe. Bei Patienten mit RA scheint nach unseren Erkenntnissen folglich die IgA-Konzentration im Serum zu steigen, während die IgM- und IgG-Konzentration im Vergleich zu gesunden Probanden relativ konstant bleiben. Unter Therapie mit TNF-Inhibitoren scheinen die IgA-, IgG- und IgM-Konzentrationen im Serum im Vergleich zu RA Patienten mit geringer Immunsuppression anzusteigen. Statistisch signifikant erhöht ist jedoch nur die IgG-Konzentration. Interessant ist, dass nach unseren Daten der IgG-Serumspiegel von mit Tocilizumab behandelten RA Patienten im Vergleich zu RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie statistisch signifikant niedriger ist. Auch im Vergleich zu RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie scheint dies tendenziell der Fall zu sein, wobei hier keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Zusätzlich sinkt bei RA Patienten unter Tocilizumab Therapie auch der IgA-Serumspiegel im Vergleich zu RA Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie signifikant ab und erreicht ähnliche Werte wie die von uns gemessenen gesunden Probanden. Die IgM-Serumkonzentration hingegen steigt bei Tocilizumab Patienten statistisch signifikant an im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen.

Durch Veys et al. [143] konnte ähnlich wie bei uns gezeigt werden, dass die IgM-Serumkonzentration bei RA Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden unverändert bleibt. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen ist die IgA-Serumkonzentration erhöht [143], wobei nach den Untersuchungen von Veys et al. [143] auch die IgG-Serumkonzentration bei RA Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden ansteigt. Da jedoch bis zu 30% der RA Patienten normale Ig-Spiegel

aufweisen, scheint die Ig-Konzentration im Gegensatz zu vielen anderen von uns gemessenen Zytokinen nur einen geringen diagnostischen Stellenwert einzunehmen [143].

Nach Yazdani-Biuki et al. [144] konnten im Gegensatz zu unseren Erkenntnissen keine Unterschiede der IgG-, IgA- oder IgM-Serumkonzentrationen unter Therapie mit TNF-Inhibitoren festgestellt werden. Bei Patienten unter Therapie mit Etanercept wurde hingegen überraschend eine Erhöhung der IgG- und IgA-Rheumafaktoren gemessen [144]. Inwiefern die von uns gemessene Erhöhung der Ig-Klassen G, A und M mit einer Erhöhung der jeweiligen Rheumafaktoren korreliert und weshalb diese gerade unter Therapie mit Etanercept erhöht sind ist bisher nicht geklärt. Die von uns gemessenen Veränderungen der Ig-Isotypen IgG, IgA und IgM bei RA Patienten unter Tocilizumab Therapie stimmen mit den Untersuchungen von Roll et al. [86] überein. Auch hier wurden unter IL6-Inhibition erniedrigte IgG- und IgA-Serumspiegel gemessen [86]. Der IgM-Serumspiegel sinkt hingegen nicht ab [86] und scheint nach unseren Messungen sogar erhöht zu sein. Es stellt sich bei den vorliegenden Daten die Frage, ob Tocilizumab als IL6-Blocker einen Ig-Klassenwechsel von IgM zu IgA und IgG inhibiert. Es ist bekannt, dass erhöhte IgG-Serumspiegel auf die Chronizität einer Entzündung hinweisen. Daher ist es möglich, dass ein sinkender IgG- oder auch IgA-Serumspiegel im Rahmen eines inhibierten Ig-Klassenwechsels einen der therapeutischen Aspekte der Tocilizumab Therapie darstellt.

### **5.11 Beurteilung des Einflusses von Tocilizumab und TNF-Inhibitoren auf terminal differenzierte B-Lymphozyten**

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass die RA zu einer Veränderung in der Verteilung der verschiedenen Subpopulationen der B-Lymphozyten im peripheren Blut führt. Sowohl die Gesamtzahl der CD3-CD19+ B-Lymphozyten als auch die CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten sinken bei RA Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe signifikant ab. Die CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten scheinen dagegen sowohl bei RA Patienten unter geringer Immunsuppression als auch bei RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie anzusteigen. Unter Therapie mit dem IL6-Rezeptor Inhibitor Tocilizumab konnten wir einen deutlich höheren Anteil an CD3-CD19+ B-Lymphozyten nachweisen als bei RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie oder RA Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie. Interessant ist, dass nach unseren Messungen RA Patienten unter Tocilizumab keinen erhöhten Plasmablasten-Anteil im peripheren Blut aufweisen und ähnliche Werte zu messen sind wie bei der gesunden Kontrollgruppe, während RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie einen signifikant erhöhten Anteil an Plasmablasten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe aufweisen. Folglich scheint eine Medikation mit Tocilizumab bei RA Patienten zu einer teilweisen Wiederherstellung der physiologischen Verteilung der Subpopulationen der B-Lymphozyten im peripheren Blut zu führen. Ob diese Veränderungen der B-Lymphozyten unter Tocilizumab durch distributive Alterationen bedingt sind und ob autoreaktive B-Lymphozyten verschiedener Differenzierung in geringerem Ausmaße in inflammatorische Kompartimente migrieren sollte weiter untersucht werden. Zusätzlich gilt es zu klären, inwiefern der Anteil der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten mit einem klinischen Benefit assoziiert ist und ob der Anteil der Plasmablasten zukünftig als Biomarker bezüglich einer individualisierten Immunsuppression mit Tocilizumab hilfreich sein kann.

## **6. Zusammenfassung**

Nicht zuletzt seit der monoklonale CD20-Inhibitor Rituximab mit Erfolg in der Therapie der RA eingesetzt werden konnte, ist bekannt, dass die B-Lymphozyten eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der RA spielen. Autoreaktive B-Lymphozyten sind an der Entwicklung, Progression und Aufrechterhaltung der RA entscheidend beteiligt. Trotzdem ist über die Verteilung der verschiedenen Subpopulationen der B-Lymphozyten bei RA Patienten und den Einfluss verschiedener Immunsuppressiva auf diese bisher wenig bekannt. Ziel unserer Untersuchungen war es daher mittels FACS-Analyse den Anteil der gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten sowie der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten, CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen der B-Lymphozyten und CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten bei RA Patienten im peripheren Blut zu untersuchen, Veränderungen unter Therapie mit TNF-Inhibitoren oder Tocilizumab zu detektieren und diese mit einer gesunden Kontrollgruppe und RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie zu vergleichen. Somit wurden von uns verschiedene Subpopulationen terminal differenzierter B-Lymphozyten als mögliche Angriffspunkte eines Immunmonitorings unter Tocilizumab Therapie oder TNF-Inhibitor Therapie bei RA Patienten untersucht. Zusätzlich wurden bei den gleichen Versuchsgruppen mittels ELISA die Konzentrationen von an der Pathogenese der RA beteiligter Zytokine und Immunglobuline gemessen. Wir konnten feststellen, dass der Anteil der B-Lymphozyten bei RA Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie oder unter TNF-Inhibitor Therapie signifikant niedriger ist als bei der Kontrollgruppe und unter Therapie mit Tocilizumab wieder auf einen physiologischen Anteil ansteigt. Auch der Anteil der naiven B-Lymphozyten ist bei RA Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe, verändert sich unter Tocilizumab Therapie jedoch kaum. Beim Anteil der Gedächtniszellen konnten wir keine Veränderungen feststellen. Interessant ist, dass Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie einen signifikant höheren Anteil an Plasmablasten aufweisen als die Kontrollgruppe. Bei Patienten unter Tocilizumab Therapie konnten wir hingegen wieder einen ähnlichen Anteil an

Plasmablasten messen wie bei der gesunden Kontrollgruppe. Zusätzlich ist auffallend, dass die IgA-Serumkonzentration bei RA Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie signifikant höher ist als bei der gesunden Kontrollgruppe. Bei RA Patienten unter Tocilizumab Therapie sinkt die IgA-Serumkonzentration hingegen wieder ab, während die IgG-Konzentration zu steigen scheint. Zusammenfassend führt die RA zu einer Dysbalance in der Distribution der verschiedenen Subpopulationen der B-Lymphozyten und der produzierten Immunglobuline. Unter Therapie mit Tocilizumab, nicht jedoch unter TNF-Inhibitor Therapie, konnten wir eine teilweise Wiederherstellung dieser veränderten Verteilung verschieden differenzierter B-Lymphozyten beobachten. Wir konnten erstmals zeigen, dass der Anteil der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten unter Tocilizumab Therapie bei RA Patienten wieder ähnliche Werte annimmt wie bei gesunden Probanden, während RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie deutlich erhöhte Werte aufweisen. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse ist weiter zu untersuchen, ob dieser Effekt von Tocilizumab auf Plasmablasten und die Gesamtzahl der B-Lymphozyten auch mit einem klinischen Benefit assoziiert ist und somit zukünftig bei der Vorhersage individueller Therapieantwort behilflich sein kann.

### **III Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: ACR/EULAR Klassifikationskriterien von 2010.....	15
Tabelle 2: Verwendete Lösungen.....	34
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.....	35
Tabelle 4: Verwendete Einwegmaterialien.....	35
Tabelle 5: Verwendete Laborgeräte.....	38
Tabelle 6: Verwendete Antikörper.....	37
Tabelle 7: Verwendete Software.....	39
Tabelle 8: Darstellung der verschiedenen Versuchsgruppen.....	40
Tabelle 9: Ak-Konzentrationen der 1-fach Färbungen.....	47
Tabelle 10: Ak-Konzentrationen der 4-fach Färbungen.....	46
Tabelle 11: Patientendaten und Probandendaten der FACS-Analyse.....	51
Tabelle 12: Patientendaten und Probandendaten der Serumanalyse.....	51
Tabelle 13: Prozentuale Unterschiede der CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei den verschiedenen Versuchsgruppen.....	54
Tabelle 14: Prozentuale Unterschiede der CD3-CD19+CD20+CD27+ B-Lymphozyten bei den verschiedenen Versuchsgruppen.....	61
Tabelle 15: Prozentuale Unterschiede der CD3-CD19+CD20+CD27- B-Lymphozyten bei den verschiedenen Versuchsgruppen.....	65
Tabelle 16: Prozentuale Unterschiede der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten bei den verschiedenen Versuchsgruppen.....	71
Tabelle 17: Unterschiede der IgM-Konzentration im Serum der verschiedenen Versuchsgruppen.....	76
Tabelle 18: Unterschiede der IgA-Konzentration im Serum der verschiedenen Versuchsgruppen.....	77
Tabelle 19: Unterschiede der IgG-Konzentration im Serum der verschiedenen Versuchsgruppen.....	78
Tabelle 20: Unterschiede der IL35-Konzentration im Serum der verschiedenen Versuchsgruppen.....	79

Tabelle 21: Unterschiede der BAFF-Konzentration im Serum der verschiedenen Versuchsgruppen .....	81
Tabelle 22: Unterschiede der TNF $\alpha$ -Konzentration im Serum der verschiedenen Versuchsgruppen .....	83
Tabelle 23: Unterschiede der IL6-Konzentration im Serum der verschiedenen Versuchsgruppen .....	84
Tabelle 24: Unterschiede der IL21-Konzentration im Serum der verschiedenen Versuchsgruppen .....	86

#### IV **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Therapiealgorithmus für die RA in Anlehnung an die EULAR-Empfehlungen (Kruger) .....	18
Abbildung 2: EDTA-Blut vor und nach der Dichtezentrifugation.....	43
Abbildung 3: PE-FITC-Diagramm a) vor der Kompensation und b) nach stattgehabter Kompensation mit PBMCs. ....	45
Abbildung 4: Darstellung der durchflusszytometrischen Einzelfärbungen der Fluorochrome FITC, PE, PB, APC und APC-H7 mit PBMCs in Dotplots und Histogrammkurven. ....	46
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Sandwich-ELISA Technik.....	50
Abbildung 6: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD3-CD19+ B-Lymphozyten. ....	55
Abbildung 7: Darstellung der prozentualen Anteile der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der PBMCs bei Patienten mit RA unter verschiedenen Therapieformen und einer gesunden Kontrollgruppe.....	55
Abbildung 8: a) Der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der PBMCs ist bei Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie signifikant niedriger als bei der gesunden Kontrollgruppe (3,1% vs. 6,7%; $p=0,008$ ). b) Der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der PBMCs ist bei Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie signifikant niedriger als bei der gesunden Kontrollgruppe (3,4% vs. 6,7%; $p=0,015$ ).....	58
Abbildung 9: Vergleich des durchflusszytometrisch gemessenen Anteils der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs zwischen der gesunden Kontrollgruppe (a) und Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie (b).....	57
Abbildung 10: Vergleich des durchflusszytometrisch gemessenen Anteils der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs zwischen der gesunden Kontrollgruppe a) und Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie b).....	57
Abbildung 11: a) Der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der PBMCs ist bei Patienten mit Tocilizumab Therapie signifikant höher als bei den	

Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie (5,5% vs. 3,4%; $p=0,041$ ). b)	
Der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der PBMCs ist bei	
Patienten mit Tocilizumab Therapie signifikant höher als bei den Patienten mit TNF-	
Inhibitor Therapie (5,5% vs. 3,1%; $p=0,016$ ). .....	60
Abbildung 12: Vergleich des durchflusszytometrisch gemessenen Anteils der CD3-	
CD19+ B-Lymphozyten an den PBMCs zwischen Patienten mit Tocilizumab	
Therapie (a) und Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie (b). .....	59
Abbildung 13: Vergleich der durchflusszytometrisch gemessenen Anzahl an CD3-	
CD19+ B-Lymphozyten zwischen Patienten mit Tocilizumab Therapie (a) und	
Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie (b). .....	59
Abbildung 14: Der Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der	
PBMCs ist bei Patienten mit Tocilizumab Therapie und bei der gesunden	
Kontrollgruppe vergleichbar hoch (5,5% vs. 6,7%; $p=0,378$ ). .....	61
Abbildung 15: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD3-CD19+CD20+CD27+	
B-Lymphozyten. ....	62
Abbildung 16: Darstellung der prozentualen Anteile der CD3-CD19+CD20+CD27+	
Gedächtniszellen der B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der CD3-CD19+ B-	
Lymphozyten bei Patienten mit RA unter verschiedenen Therapieformen und einer	
gesunden Kontrollgruppe. ....	62
Abbildung 17: Repräsentative Darstellung des Anteils der durchflusszytometrisch	
gemessenen CD3-CD19+CD20+CD27+ B-Lymphozyten an den gesamten CD3-	
CD19+ B-Lymphozyten in Dotplots bei der gesunden Kontrollgruppe (a), RA	
Patienten unter Therapie unter Tocilizumab Therapie (b), RA Patienten unter	
geringer immunsuppressiver Therapie (c) und bei RA Patienten unter Therapie mit	
TNF-Inhibitoren (d). .....	64
Abbildung 18: Es gibt keine signifikanten Unterschiede der Anteile der CD3-	
CD19+CD20+CD27+ B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten	
zwischen der gesunden Kontrollgruppe und RA Patienten unter Tocilizumab	
Therapie (25,5% vs. 33,0%; $p=0,129$ ), TNF-Inhibitor Therapie (25,5% vs. 30,7%;	

p=0,360) oder geringer immunsuppressiver Therapie (25,5% vs. 39,4%; p=0,058). Tendenziell scheint der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27+ B-Lymphozyten. .... 65

Abbildung 19: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD3-CD19+CD20+CD27-naiven B-Lymphozyten. .... 66

Abbildung 20: Darstellung der prozentualen Anteile der CD3-CD19+CD20+CD27-naiven B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei Patienten mit RA unter verschiedenen Therapieformen und einer gesunden Kontrollgruppe. .... 66

Abbildung 21: Der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten ist bei RA Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie statistisch signifikant niedriger als bei der gesunden Kontrollgruppe. (55,1% vs. 72,3%; p=0,024). .... 68

Abbildung 22: Repräsentative Darstellung des Anteils der CD3-CD19+CD20+CD27-naiven B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten in Dotplots bei der gesunden Kontrollgruppe (a) und bei den Patienten mit geringer immunsuppressiver Therapie (b). .... 68

Abbildung 23: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten. .... 70

Abbildung 24: Darstellung der prozentualen Anteile der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten an der Gesamtzahl der CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei Patienten mit RA unter verschiedenen Therapieformen und einer gesunden Kontrollgruppe. .... 70

Abbildung 25: Der Anteil der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten ist bei RA Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie statistisch signifikant höher als bei der gesunden Kontrollgruppe. (2,1% vs. 0,5%; p=0,045). .... 72

Abbildung 26: Repräsentative Darstellung der CD3-CD19+CD20-CD27+ Plasmablasten in Dotplots bei der gesunden Kontrollgruppe (a) und den Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie (b). .... 72

Abbildung 27: Vergleich der Anteile der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten bei RA Patienten unter unterschiedlichen Therapiekonzepten und der gesunden Kontrollgruppe. ....	74
Abbildung 28: Die IgM-Konzentration im Serum der Patienten mit Tocilizumab Therapie ist statistisch signifikant höher als bei der gesunden Kontrollgruppe (69,0 mg/dl vs. 29,0 mg/dl; p=0,043). ....	75
Abbildung 29: Die IgA-Konzentration im Serum der gesunden Kontrollgruppe ist statistisch signifikant niedriger als bei den RA Patienten unter Therapie mit geringer Immunsuppression (24,5 mg/dl vs. 44,2 mg/dl; p=0,021) und als bei den RA Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie (24,5 mg/dl vs. 46,5 mg/dl; p=0,034). ....	78
Abbildung 30: Die IgA-Konzentration im Serum der Patienten mit Tocilizumab Therapie ist statistisch signifikant niedriger als bei Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie (27,9 mg/dl vs. 44,2 mg/dl; p=0,043). ....	79
Abbildung 31: Die IgG-Konzentration im Serum der Patienten unter TNF-Inhibitor Therapie ist statistisch signifikant höher als bei den RA Patienten unter Therapie mit geringer Immunsuppression (20,6 g/l vs. 14,5 g/l; p=0,035), den RA Patienten unter Therapie mit Tocilizumab (20,6 g/l vs. 10,9 g/l; p=0,001) und als bei der gesunden Kontrollgruppe (20,6 g/l vs. 15,1 g/l; p=0,029). ....	80
Abbildung 32: Die IL35-Konzentration im Serum der Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie scheint niedriger zu sein als bei den RA Patienten unter Therapie mit TNF-Inhibitoren (2,4 pg/ml vs. 11,3 pg/ml; p=0,052), den RA Patienten unter Therapie mit Tocilizumab (2,4 pg/ml vs. 12,2 pg/ml; p=0,143) und als bei der gesunden Kontrollgruppe (2,4 pg/ml vs. 14,8 pg/ml; p=0,247). Statistisch signifikant sind die Differenzen jedoch nicht. ....	82
Abbildung 33: Es sind keine statistisch signifikanten Unterschiede der BAFF-Konzentration im Serum der RA Patienten unter verschiedener Therapie und der gesunden Kontrollgruppe festzustellen. ....	83
Abbildung 34: Die TNF $\alpha$ -Konzentration im Serum der Patienten mit TNF-Inhibitor Therapie ist statistisch signifikant höher als bei Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie (37,2 pg/ml vs. 4,2 pg/ml; p=0,019). ....	84

Abbildung 35: Die IL6-Konzentration im Serum der Patienten mit Tocilizumab Therapie ist statistisch signifikant höher als bei der gesunden Kontrollgruppe (5,3 pg/ml vs.  $\leq 2$  pg/ml;  $p=0,023$ ). ..... 86

Abbildung 36: Die IL21-Konzentration im Serum der Patienten mit Tocilizumab Therapie ist statistisch signifikant höher als bei Patienten unter geringer immunsuppressiver Therapie (11,5 pg/ml vs. 2,4 pg/ml;  $p=0,029$ ). ..... 87

## V Literaturverzeichnis

1. Choy, E., *Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2012. **51 Suppl 5**: p. v3-11.
2. Langs, G., et al., *Automatic quantification of joint space narrowing and erosions in rheumatoid arthritis*. IEEE Trans Med Imaging, 2009. **28**(1): p. 151-64.
3. Carbonell, J., et al., *The incidence of rheumatoid arthritis in Spain: results from a nationwide primary care registry*. Rheumatology (Oxford), 2008. **47**(7): p. 1088-92.
4. Cimmino, M.A., et al., *Prevalence of rheumatoid arthritis in Italy: the Chiavari Study*. Ann Rheum Dis, 1998. **57**(5): p. 315-8.
5. Schneider, M. and K. Kruger, *Rheumatoid arthritis--early diagnosis and disease management*. Dtsch Arztebl Int, 2013. **110**(27-28): p. 477-84.
6. Symmons, D., et al., *The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century*. Rheumatology (Oxford), 2002. **41**(7): p. 793-800.
7. Smolen, J.S., et al., *A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice*. Rheumatology (Oxford), 2003. **42**(2): p. 244-57.
8. Weyand, C.M., et al., *The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis*. Ann Intern Med, 1992. **117**(10): p. 801-6.
9. Getts, M.T. and S.D. Miller, *99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: triggering of autoimmune diseases by infections*. Clin Exp Immunol, 2010. **160**(1): p. 15-21.
10. Klareskog, L., L. Padyukov, and L. Alfredsson, *Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases*. Curr Opin Rheumatol, 2007. **19**(1): p. 49-54.
11. Smolen, J.S. and G. Steiner, *Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(6): p. 473-88.
12. Chen, L., et al., *Tissue factor expression in rheumatoid synovium: a potential role in pannus invasion of rheumatoid arthritis*. Acta Histochem, 2013. **115**(7): p. 692-7.
13. Picerno, V., et al., *One year in review: the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2015. **33**(4): p. 551-8.
14. Karouzakis, E., et al., *Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction*. Immunol Lett, 2006. **106**(1): p. 8-13.
15. Korb-Pap, A., et al., *Early structural changes in cartilage and bone are required for the attachment and invasion of inflamed synovial tissue during destructive inflammatory arthritis*. Ann Rheum Dis, 2012. **71**(6): p. 1004-11.
16. Dayer, J.M. and E. Choy, *Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor*. Rheumatology (Oxford), 2010. **49**(1): p. 15-24.

17. Hochberg, M.C., S.S. Johnston, and A.K. John, *The incidence and prevalence of extra-articular and systemic manifestations in a cohort of newly-diagnosed patients with rheumatoid arthritis between 1999 and 2006*. *Curr Med Res Opin*, 2008. **24**(2): p. 469-80.
18. Pollard, L., E.H. Choy, and D.L. Scott, *The consequences of rheumatoid arthritis: quality of life measures in the individual patient*. *Clin Exp Rheumatol*, 2005. **23**(5 Suppl 39): p. S43-52.
19. Smolen, J.S., et al., *New therapies for treatment of rheumatoid arthritis*. *Lancet*, 2007. **370**(9602): p. 1861-74.
20. Nalbandian, A., J.C. Crispin, and G.C. Tsokos, *Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts*. *Clin Exp Immunol*, 2009. **157**(2): p. 209-15.
21. Kolls, J.K. and A. Linden, *Interleukin-17 family members and inflammation*. *Immunity*, 2004. **21**(4): p. 467-76.
22. Schett, G., *Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Osteoclasts*. *Arthritis Res Ther*, 2007. **9**(1): p. 203.
23. Jones, S.A., *Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6*. *J Immunol*, 2005. **175**(6): p. 3463-8.
24. Xing, R., et al., *Interleukin-21 Induces Proliferation and Proinflammatory Cytokine Profile of Fibroblast-like Synoviocytes of Patients with Rheumatoid Arthritis*. *Scand J Immunol*, 2016. **83**(1): p. 64-71.
25. Spolski, R. and W.J. Leonard, *The Yin and Yang of interleukin-21 in allergy, autoimmunity and cancer*. *Curr Opin Immunol*, 2008. **20**(3): p. 295-301.
26. Jungel, A., et al., *Expression of interleukin-21 receptor, but not interleukin-21, in synovial fibroblasts and synovial macrophages of patients with rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(5): p. 1468-76.
27. Nakano, S., et al., *Immunoregulatory role of IL-35 in T cells of patients with rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2015. **54**(8): p. 1498-506.
28. Kochetkova, I., et al., *IL-35 stimulation of CD39+ regulatory T cells confers protection against collagen II-induced arthritis via the production of IL-10*. *J Immunol*, 2010. **184**(12): p. 7144-53.
29. Aletaha, D., et al., *2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative*. *Arthritis Rheum*, 2010. **62**(9): p. 2569-81.
30. van der Heide, A., et al., *The effectiveness of early treatment with "second-line" antirheumatic drugs. A randomized, controlled trial*. *Ann Intern Med*, 1996. **124**(8): p. 699-707.
31. Bukhari, M.A., et al., *Influence of disease-modifying therapy on radiographic outcome in inflammatory polyarthritis at five years: results from a large observational inception study*. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(1): p. 46-53.
32. Bohndorf, K. and J. Schalm, *Diagnostic radiography in rheumatoid arthritis: benefits and limitations*. *Baillieres Clin Rheumatol*, 1996. **10**(3): p. 399-407.
33. Prevoo, M.L., et al., *Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal*

- study of patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum, 1995. 38(1): p. 44-8.*
34. Breedveld, F.C., et al., *The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. Arthritis Rheum, 2006. 54(1): p. 26-37.*
  35. Mottonen, T., et al., *Delay to institution of therapy and induction of remission using single-drug or combination-disease-modifying antirheumatic drug therapy in early rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum, 2002. 46(4): p. 894-8.*
  36. van der Kooij, S.M., et al., *Clinical and radiological efficacy of initial vs delayed treatment with infliximab plus methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis, 2009. 68(7): p. 1153-8.*
  37. Kruger, K., et al., *[German 2012 guidelines for the sequential medical treatment of rheumatoid arthritis. Adapted EULAR recommendations and updated treatment algorithm]. Z Rheumatol, 2012. 71(7): p. 592-603.*
  38. Ferraccioli, G.F., et al., *Rescue of combination therapy failures using infliximab, while maintaining the combination or monotherapy with methotrexate: results of an open trial. Rheumatology (Oxford), 2002. 41(10): p. 1109-12.*
  39. Hider, S.L., et al., *Comparing the long-term clinical outcome of treatment with methotrexate or sulfasalazine prescribed as the first disease-modifying antirheumatic drug in patients with inflammatory polyarthritis. Ann Rheum Dis, 2006. 65(11): p. 1449-55.*
  40. Menninger, H., *[Basic therapeutic combination therapy in chronic polyarthritis: an overview]. Z Rheumatol, 1998. 57(1): p. 25-30.*
  41. Laan, R.F., T.L. Jansen, and P.L. van Riel, *Glucocorticosteroids in the management of rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford), 1999. 38(1): p. 6-12.*
  42. Gotzsche, P.C. and H.K. Johansen, *Meta-analysis of short-term low dose prednisolone versus placebo and non-steroidal anti-inflammatory drugs in rheumatoid arthritis. BMJ, 1998. 316(7134): p. 811-8.*
  43. Gotzsche, P.C. and H.K. Johansen, *Short-term low-dose corticosteroids vs placebo and nonsteroidal antiinflammatory drugs in rheumatoid arthritis. Cochrane Database Syst Rev, 2004(3): p. CD000189.*
  44. Durez, P., et al., *Treatment of early rheumatoid arthritis: a randomized magnetic resonance imaging study comparing the effects of methotrexate alone, methotrexate in combination with infliximab, and methotrexate in combination with intravenous pulse methylprednisolone. Arthritis Rheum, 2007. 56(12): p. 3919-27.*
  45. Kimel, M., et al., *Adalimumab plus methotrexate improved SF-36 scores and reduced the effect of rheumatoid arthritis (RA) on work activity for patients with early RA. J Rheumatol, 2008. 35(2): p. 206-15.*
  46. Westhovens, R., et al., *Safety and efficacy of the selective costimulation modulator abatacept in patients with rheumatoid arthritis receiving*

- background methotrexate: a 5-year extended phase IIB study.* J Rheumatol, 2009. **36**(4): p. 736-42.
47. Tijhuis, G.J., et al., *A randomized comparison of care provided by a clinical nurse specialist, an inpatient team, and a day patient team in rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum, 2002. **47**(5): p. 525-31.
  48. Vliet Vlieland, T.P. and J.M. Hazes, *Efficacy of multidisciplinary team care programs in rheumatoid arthritis.* Semin Arthritis Rheum, 1997. **27**(2): p. 110-22.
  49. Vliet Vlieland, T.P., et al., *Determinants of hand function in patients with rheumatoid arthritis.* J Rheumatol, 1996. **23**(5): p. 835-40.
  50. Puig, L., *Methotrexate: new therapeutic approaches.* Actas Dermosifiliogr, 2014. **105**(6): p. 583-9.
  51. Pincus, T., et al., *Methotrexate as the "anchor drug" for the treatment of early rheumatoid arthritis.* Clin Exp Rheumatol, 2003. **21**(5 Suppl 31): p. S179-85.
  52. Gaujoux-Viala, C., et al., *Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with synthetic disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis.* Ann Rheum Dis, 2010. **69**(6): p. 1004-9.
  53. Nam, J.L., et al., *Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of RA.* Ann Rheum Dis, 2010. **69**(6): p. 976-86.
  54. Silva, J.C., et al., *Hydroxychloroquine decreases Th17-related cytokines in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients.* Clinics (Sao Paulo), 2013. **68**(6): p. 766-71.
  55. Solomon, D.H., et al., *Effect of hydroxychloroquine on insulin sensitivity and lipid parameters in rheumatoid arthritis patients without diabetes mellitus: a randomized, blinded crossover trial.* Arthritis Care Res (Hoboken), 2014. **66**(8): p. 1246-51.
  56. Wozniacka, A., et al., *The influence of antimalarial treatment on IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha mRNA expression on UVB-irradiated skin in systemic lupus erythematosus.* Br J Dermatol, 2008. **159**(5): p. 1124-30.
  57. Smolen, J.S., et al., *EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs.* Ann Rheum Dis, 2010. **69**(6): p. 964-75.
  58. Edwards, J.C. and G. Cambridge, *Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes.* Rheumatology (Oxford), 2001. **40**(2): p. 205-11.
  59. Hsue, P.Y., et al., *Depletion of B-cells with rituximab improves endothelial function and reduces inflammation among individuals with rheumatoid arthritis.* J Am Heart Assoc, 2014. **3**(5): p. e001267.
  60. Vos, K., et al., *Early effects of rituximab on the synovial cell infiltrate in patients with rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum, 2007. **56**(3): p. 772-8.

61. Mok, C.C., *Rituximab for the treatment of rheumatoid arthritis: an update*. Drug Des Devel Ther, 2014. **8**: p. 87-100.
62. Pescovitz, M.D., *Rituximab, an anti-cd20 monoclonal antibody: history and mechanism of action*. Am J Transplant, 2006. **6**(5 Pt 1): p. 859-66.
63. Edwards, J.C., et al., *Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 2004. **350**(25): p. 2572-81.
64. Saag, K.G., et al., *American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2008. **59**(6): p. 762-84.
65. Alten, R. and E. Marker-Hermann, *[Selective co-stimulation blockade. CTLA4-Ig (Abatacept)]*. Z Rheumatol, 2010. **69**(7): p. 601-7.
66. Gaubitz, M., et al., *[Recommendations for use of abatacept in patients with rheumatoid arthritis]*. Z Rheumatol, 2014. **73**(10): p. 942-9.
67. Herrero-Beaumont, G., M.J. Martinez Calatrava, and S. Castaneda, *Abatacept mechanism of action: concordance with its clinical profile*. Reumatol Clin, 2012. **8**(2): p. 78-83.
68. Alegre, M.L., K.A. Frauwirth, and C.B. Thompson, *T-cell regulation by CD28 and CTLA-4*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(3): p. 220-8.
69. Bluml, S., et al., *Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis*. Int Immunol, 2012. **24**(5): p. 275-81.
70. Feldmann, M. and R.N. Maini, *Lasker Clinical Medical Research Award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases*. Nat Med, 2003. **9**(10): p. 1245-50.
71. Radner, H. and D. Aletaha, *Anti-TNF in rheumatoid arthritis: an overview*. Wien Med Wochenschr, 2015. **165**(1-2): p. 3-9.
72. Tracey, D., et al., *Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review*. Pharmacol Ther, 2008. **117**(2): p. 244-79.
73. Smookler, D.S., et al., *Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 regulates TNF-dependent systemic inflammation*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 721-5.
74. Di Giovine, F.S., G. Nuki, and G.W. Duff, *Tumour necrosis factor in synovial exudates*. Ann Rheum Dis, 1988. **47**(9): p. 768-72.
75. Azuma, Y., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts*. J Biol Chem, 2000. **275**(7): p. 4858-64.
76. Moreland, L.W., et al., *Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein*. N Engl J Med, 1997. **337**(3): p. 141-7.
77. Pasut, G., *Pegylation of biological molecules and potential benefits: pharmacological properties of certolizumab pegol*. BioDrugs, 2014. **28 Suppl 1**: p. S15-23.
78. Cohen, S.B., et al., *Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(9): p. 2793-806.

79. Emery, P., et al., *IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumour necrosis factor biologicals: results from a 24-week multicentre randomised placebo-controlled trial*. *Ann Rheum Dis*, 2008. **67**(11): p. 1516-23.
80. Genovese, M.C., et al., *Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(11): p. 1114-23.
81. Kishimoto, T., *Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 1-21.
82. Shetty, A., et al., *Tocilizumab in the treatment of rheumatoid arthritis and beyond*. *Drug Des Devel Ther*, 2014. **8**: p. 349-64.
83. Sack, U., et al., *Interleukin-6 in synovial fluid is closely associated with chronic synovitis in rheumatoid arthritis*. *Rheumatol Int*, 1993. **13**(2): p. 45-51.
84. Kotake, S., et al., *Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation*. *J Bone Miner Res*, 1996. **11**(1): p. 88-95.
85. Hirano, T., et al., *Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis*. *Eur J Immunol*, 1988. **18**(11): p. 1797-801.
86. Roll, P., et al., *In vivo effects of the anti-interleukin-6 receptor inhibitor tocilizumab on the B cell compartment*. *Arthritis Rheum*, 2011. **63**(5): p. 1255-64.
87. Nishimoto, N., et al., *Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease*. *Blood*, 2008. **112**(10): p. 3959-64.
88. Fonseca, J.E., et al., *Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction*. *Autoimmun Rev*, 2009. **8**(7): p. 538-42.
89. Rose-John, S., et al., *Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer*. *J Leukoc Biol*, 2006. **80**(2): p. 227-36.
90. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Control of adaptive immunity by the innate immune system*. *Nat Immunol*, 2015. **16**(4): p. 343-53.
91. Wu, S.F., W.J. Wang, and Y.Q. Gao, *Natural killer cells in hepatitis B virus infection*. *Braz J Infect Dis*, 2015. **19**(4): p. 417-25.
92. Melis, J.P., et al., *Complement in therapy and disease: Regulating the complement system with antibody-based therapeutics*. *Mol Immunol*, 2015. **67**(2 Pt A): p. 117-30.
93. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Janeway-Immunologie*, ed. S.A.V.H. 2009. 2009 1093.
94. van den Elsen, P.J., et al., *Regulation of MHC class I and II gene transcription: differences and similarities*. *Immunogenetics*, 1998. **48**(3): p. 208-21.
95. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single*

- mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.* J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
96. Schlegelberger, B., et al., *Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien.* Molekulare Medizin. 2003: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 521.
  97. Hwang, J.K., F.W. Alt, and L.S. Yeap, *Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination.* Microbiol Spectr, 2015. **3**(1): p. MDNA3-0037-2014.
  98. Neumann, J., *Immunbiologie - Eine Einführung.* Springer-Lehrbuch. 2008: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 286.
  99. Gekle, M., et al., *Taschenlehrbuch Physiologie.* 2010. 880.
  100. Hiepe, F., T. Alexander, and R.E. Voll, *[Plasma cells].* Z Rheumatol, 2015. **74**(1): p. 20-5.
  101. Honjo, T., K. Kinoshita, and M. Muramatsu, *Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation.* Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 165-96.
  102. Lee-Chang, C., et al., *B-cell subsets up-regulate alpha4 integrin and accumulate in the cerebrospinal fluid in clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis onset.* Neurosci Lett, 2011. **487**(3): p. 273-7.
  103. Akiyama, M., et al., *Number of Circulating Follicular Helper 2 T Cells Correlates With IgG4 and Interleukin-4 Levels and Plasmablast Numbers in IgG4-Related Disease.* Arthritis Rheumatol, 2015. **67**(9): p. 2476-81.
  104. Buckner, C.M., et al., *Characterization of plasmablasts in the blood of HIV-infected viremic individuals: evidence for nonspecific immune activation.* J Virol, 2013. **87**(10): p. 5800-11.
  105. Tokoyoda, K., et al., *Organization of immunological memory by bone marrow stroma.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 193-200.
  106. McComish, J., et al., *Changes in peripheral blood B cell subsets at diagnosis and after treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with rheumatoid arthritis: correlation with clinical and laboratory parameters.* Int J Rheum Dis, 2015. **18**(4): p. 421-32.
  107. Souto-Carneiro, M.M., et al., *Alterations in peripheral blood memory B cells in patients with active rheumatoid arthritis are dependent on the action of tumour necrosis factor.* Arthritis Res Ther, 2009. **11**(3): p. R84.
  108. Bugatti, S., et al., *B cells in rheumatoid arthritis: from pathogenic players to disease biomarkers.* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 681678.
  109. Samuels, J., et al., *Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis.* J Exp Med, 2005. **201**(10): p. 1659-67.
  110. Wardemann, H., et al., *Predominant autoantibody production by early human B cell precursors.* Science, 2003. **301**(5638): p. 1374-7.
  111. Meffre, E., *The establishment of early B cell tolerance in humans: lessons from primary immunodeficiency diseases.* Ann N Y Acad Sci, 2011. **1246**: p. 1-10.
  112. Kim, H.J. and C. Berek, *B cells in rheumatoid arthritis.* Arthritis Res, 2000. **2**(2): p. 126-31.

113. Boumans, M.J., et al., *Response to rituximab in patients with rheumatoid arthritis in different compartments of the immune system*. *Arthritis Rheum*, 2011. **63**(11): p. 3187-94.
114. Panayi, G.S., *B cells: a fundamental role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis?* *Rheumatology (Oxford)*, 2005. **44 Suppl 2**: p. ii3-ii7.
115. Fekete, A., et al., *Disturbances in B- and T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis: suggested relationships with antigen-driven immune responses*. *J Autoimmun*, 2007. **29**(2-3): p. 154-63.
116. Mahmood, Z., et al., *CD27-IgD- memory B cells are modulated by in vivo interleukin-6 receptor (IL-6R) blockade in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2015. **17**: p. 61.
117. Catalan, D., et al., *B cells from rheumatoid arthritis patients show important alterations in the expression of CD86 and FcγRIIb, which are modulated by anti-tumor necrosis factor therapy*. *Arthritis Res Ther*, 2010. **12**(2): p. R68.
118. Henneken, M., et al., *Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Res Ther*, 2005. **7**(5): p. R1001-13.
119. Jimenez-Boj, E., et al., *Interaction between synovial inflammatory tissue and bone marrow in rheumatoid arthritis*. *J Immunol*, 2005. **175**(4): p. 2579-88.
120. Nanki, T., et al., *Chemokine receptor expression and functional effects of chemokines on B cells: implication in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2009. **11**(5): p. R149.
121. Fedele, A.L., et al., *Memory B cell subsets and plasmablasts are lower in early than in long-standing rheumatoid arthritis*. *BMC Immunol*, 2014. **15**: p. 28.
122. Anolik, J.H., et al., *Cutting edge: anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis inhibits memory B lymphocytes via effects on lymphoid germinal centers and follicular dendritic cell networks*. *J Immunol*, 2008. **180**(2): p. 688-92.
123. Duty, J.A., et al., *Functional anergy in a subpopulation of naive B cells from healthy humans that express autoreactive immunoglobulin receptors*. *J Exp Med*, 2009. **206**(1): p. 139-51.
124. Ueda, T., et al., *Lipid hydroperoxide-induced tumor necrosis factor (TNF)-α, vascular endothelial growth factor and neovascularization in the rabbit cornea: effect of TNF inhibition*. *Angiogenesis*, 1998. **1**(2): p. 174-184.
125. Li, S., et al., *Autoantibodies From Single Circulating Plasmablasts React With Citrullinated Antigens and Porphyromonas gingivalis in Rheumatoid Arthritis*. *Arthritis Rheumatol*, 2016. **68**(3): p. 614-26.
126. Shirota, Y., et al., *Impact of anti-interleukin-6 receptor blockade on circulating T and B cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus*. *Ann Rheum Dis*, 2013. **72**(1): p. 118-28.
127. Wei, F., Y. Chang, and W. Wei, *The role of BAFF in the progression of rheumatoid arthritis*. *Cytokine*, 2015. **76**(2): p. 537-44.

128. Sellam, J., et al., *Blood memory B cells are disturbed and predict the response to rituximab in patients with rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2011. **63**(12): p. 3692-701.
129. Bosello, S., et al., *Concentrations of BAFF correlate with autoantibody levels, clinical disease activity, and response to treatment in early rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol*, 2008. **35**(7): p. 1256-64.
130. Geng, Y. and Z.L. Zhang, *Comparative study on the level of B lymphocyte stimulator (BlyS) and frequency of lymphocytes between sero-negative and sero-positive rheumatoid arthritis patients*. *Int J Rheum Dis*, 2012. **15**(5): p. 478-85.
131. Saeki, Y., et al., *Baseline anti-citrullinated peptide antibody (ACPA) titers and serum interleukin-6 (IL-6) levels possibly predict progression of bone destruction in early stages of rheumatoid arthritis (ERA)*. *Rheumatol Int*, 2013. **33**(2): p. 451-6.
132. Gottenberg, J.E., et al., *Serum IL-6 and IL-21 are associated with markers of B cell activation and structural progression in early rheumatoid arthritis: results from the ESPOIR cohort*. *Ann Rheum Dis*, 2012. **71**(7): p. 1243-8.
133. Zhang, Y., et al., *Elevated circulating Th17 and follicular helper CD4(+) T cells in patients with rheumatoid arthritis*. *APMIS*, 2015. **123**(8): p. 659-66.
134. Sglunda, O., et al., *Decrease in serum interleukin-21 levels is associated with disease activity improvement in patients with recent-onset rheumatoid arthritis*. *Physiol Res*, 2014. **63**(4): p. 475-81.
135. Niedbala, W., et al., *IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells*. *Eur J Immunol*, 2007. **37**(11): p. 3021-9.
136. Nadkarni, S., C. Mauri, and M.R. Ehrenstein, *Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta*. *J Exp Med*, 2007. **204**(1): p. 33-9.
137. Furst, D.E. and P. Emery, *Rheumatoid arthritis pathophysiology: update on emerging cytokine and cytokine-associated cell targets*. *Rheumatology (Oxford)*, 2014. **53**(9): p. 1560-9.
138. Herrath, J., et al., *The inflammatory milieu in the rheumatic joint reduces regulatory T-cell function*. *Eur J Immunol*, 2011. **41**(8): p. 2279-90.
139. Filkova, M., et al., *Pro-inflammatory effects of interleukin-35 in rheumatoid arthritis*. *Cytokine*, 2015. **73**(1): p. 36-43.
140. Solus, J.F., et al., *Genetics of serum concentration of IL-6 and TNFalpha in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a candidate gene analysis*. *Clin Rheumatol*, 2015. **34**(8): p. 1375-82.
141. Kotyla, P., et al., *Etanercept increases tumor necrosis factor-alpha level but not sFas level in patients with rheumatoid arthritis*. *Isr Med Assoc J*, 2015. **17**(1): p. 14-8.
142. Mann, D.L., et al., *Effect of the soluble TNF-antagonist etanercept on tumor necrosis factor bioactivity and stability*. *Clin Transl Sci*, 2008. **1**(2): p. 142-5.
143. Veys, E.M. and H.E. Claessens, *Serum levels of IgG, IgM, and IgA in rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 1968. **27**(5): p. 431-40.

144. Yazdani-Biuki, B., et al., *Blockade of tumour necrosis factor {alpha} significantly alters the serum level of IgG- and IgA-rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2005. **64**(8): p. 1224-6.
145. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Control of adaptive immunity by the innate immune system*. Nat Immunol, 2015 **16**(4): 343-353.
146. Haas Maria-Ruth (2015), *N-Glykosylierung von T Helfer Zell-Populationen bei Patienten mit Multipler Sklerose*. Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen

## **VI Erklärungen zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde im Hertie-Institut für klinische Hirnforschung in der Abteilung Neuroimmunologie unter der Betreuung von PD Dr. Felix Bischof durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit meinem Doktorvater PD Dr. Felix Bischof und meinem Betreuer Yashar Abbasi.

Die FACS-Analyse wurden nach Einarbeitung durch die MTA Evelyn Dubois von mir eigenständig durchgeführt und ausgewertet. Die Serumanalyse wurde durch die MTA Evelyn Dubois durchgeführt und von mir selbst ausgewertet.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung von PD Dr. Felix Bischof durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 28.06.2016

## VII Danksagung

Ich bin Herrn PD Dr. Felix Bischof sehr dankbar für die spannende Fragestellung der vorliegenden Arbeit, seine fundierte fachliche Beratung und die hervorragende Zusammenarbeit und Betreuung innerhalb der Arbeitsgruppe Neuroimmunologie des Hertie-Instituts. Seinem großen Wissen im Bereich der Immunologie ist das Gelingen der Dissertation zu verdanken und durch ihn konnte ich sowohl meine theoretischen als auch meine praktischen Fähigkeiten weiterentwickeln.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn PD Dr. Jörg Henes dem Leiter des Bereichs Rheumatologie des Universitätsklinikums Tübingen für seine exzellente fachliche Beratung und die Bereitstellung der Patientenproben aus der rheumatologischen Ambulanz.

Bei der Generierung der Patientenproben stellte die rheumatologische Schwerpunktpraxis Dr. Jacki eine unverzichtbare Hilfe dar, ohne die die gewünschte Patientenanzahl während der Anfertigung der Arbeit nicht erreichbar gewesen wäre. Hierfür bin ich Herrn Dr. Swen Jacki und seinem Team sehr dankbar.

Evelyn Dubois danke ich sehr für ihre Geduld bei der Einarbeitung in den Laboralltag und die Weitergabe ihrer umfassenden praktischen Fähigkeiten. Durch ihre sympathische und offenherzige Art schaffte sie stets eine freundliche Atmosphäre in unserer Arbeitsgruppe.

Ein besonders großer Dank gilt meinem Freund und Kommilitonen Benjamin Walz. Durch unsere Zusammenarbeit im Labor, sein kritisches Hinterfragen und unsere fachlichen Diskussionen konnte meine Arbeit entscheidend verbessert werden.

Für die moralische Unterstützung nicht zuletzt während meines Studiums und meiner Dissertation danke ich meinen Eltern, Adrian und Paula sehr.

## VIII Lebenslauf

### Persönliche Informationen

Name: Speer  
Vorname: Claudius  
Geburtsdatum: 02.12.1990  
Geburtsort: Öhringen

### Schulische Ausbildung

2001-2010 Fürstenberg-Gymnasium Donaueschingen  
Abitur 2010 mit der Note 1,3

### Akademische Ausbildung

05.-06.12.2016 3. Staatsexamen Humanmedizin  
Note: "sehr gut"  
13.-15.10.2015 2. Staatsexamen Humanmedizin  
Note: "sehr gut"  
21.-22.08.2012 1. Staatsexamen Humanmedizin  
Note: "sehr gut"  
2010-2016 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität  
Tübingen

### Wissenschaftliche Tätigkeiten

2012-2016 wissenschaftlicher Mitarbeiter im Hertie-Institut Tübingen,  
Arbeitsgruppe Neuroimmunologie PD Dr. Felix Bischof

### Ärztliche Tätigkeiten

01.01.2017-dato Assistenzarzt im Nierenzentrum Heidelberg, Sektion  
Nephrologie Uniklinikum Heidelberg