

Die Rolle von Interleukin 26 in der angeborenen und adaptiven Immunität bei der Spondylarthritis

Andreas Ossadnik

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen Universität München zur Erlangung eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Ute Reuning

Prüfende der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Christoph Schmaderer
2. Priv.-Doz. Dr. Klaus Thürmel
3. Priv.-Doz. Dr. Philipp Peter Moog

Die Dissertation wurde am 24.06.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Medicine and Health am 01.05.2025 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	12
1.1 Spondylarthritiden - Gruppe multisystemischer rheumatologischer Erkrankungen	12
1.1.1 Krankheitsbilder des Formenkreises Spondyloarthritis und Entwicklung des Begriffs	
axiale Spondylarthritis	12
1.1.2 Klinische Präsentation der (axialen) Spondylarthritis	12
1.1.3 Pathogenese und Limitationen bei der Behandlung der axSpA	14
1.2 Die Th17-Zelle im Kontext der SpA	19
1.2.1 Die Entstehung und Funktion der Th17-Zellen	19
1.2.2 Die IL-23/IL-17 Achse als zentraler Baustein der SpA Pathogenese - Angeborene und adaptive immunologische Mechanismen	23
1.3 Interleukin 26 als aktueller Forschungsgegenstand	25
1.3.1 IL-26 - Regulation, Eigenschaften und Signalwege	25
1.3.2 Zelluläre Produzenten von IL-26	27
1.3.3 Zelluläre Ziele von IL-26	30
1.3.4 IL-26 im Fokus der Inflammation	34
1.3.5 Mögliche Rolle von IL-26 in der Pathogenese der SpA	35
1.4 Ziele unserer Studie im Rahmen des Forschungsthemas	36
1.4.1 Primäre und sekundäre Projektziele	36
1.4.2 Studienendpunkte	36
2 Rahmenbedingungen der Studie	37
2.1 Studiencharakteristika	37
2.1.1 Studiendesign	38
2.1.2 Einschlusskriterien für Patienten	38
2.1.3 Ausschlusskriterien für Patienten	38
2.1.4 Kriterien für gesunde Kontrollen	39
2.1.5 Aufteilung der Studienteilnehmer in Kohorten	40
2.1.6 Eingeschlossene Patienten und Abweichungen vom Studienprotokoll	40
2.1.7 Erweiterte Rekrutierungsmaßnahmen	40
2.2 Patientenrekrutierung	42
2.2.1 Patientenscreening und Anwerbung der Patienten	42

2.2.2 Aufklärung und Einholung der Einwilligung	42
2.2.3 Beschreibung der Datenquellen	43
2.2.4 Auflistung der erfassten pseudonymisierten Patientendaten	43
2.2.5 Zeitraum der Datenerfassung	43
2.2.6 Nutzen-Risiko-Abwägung und ethisch-ärztliche Vertretbarkeit	43
2.3 Biometrie und Datenmanagement	44
2.3.1 Fallzahlschätzung	44
2.3.2 Gewährleistung der Datensicherheit	44
2.3.3 Pseudoanonymisierung der Patientendaten	45
2.3.4 Widerrufs- und Beschwerderecht	45
3 Materialien und Methoden	46
3.1 Kurzes Vorwort zur Etablierung der notwendigen Methodik	46
3.2 Chemikalien, molekularbiologische Reagenzien, Geräte und andere Materialien	46
3.3 Gewinnung von Patientenmaterial	46
3.3.1 Abnahme von humanen Blutproben	46
3.3.2 Gewinnung und Fixierung humaner Synoviaprobe	47
3.4 Zellkultur und Handhabung von PBMCs und Synoviaprobe	47
3.4.1 Isolierung von Serum und EDTA-Plasma	48
3.4.2 Isolierung und Kultivierung von PBMCs und CPT-Plasma	48
3.4.3 Zählen von PBMCs mittels Neubauer-Zählkammer	49
3.4.4 Einfrieren von PBMCs und humaner Proben	50
3.4.5 Auftauen von PBMCs	50
3.4.6 HBV/HIV/HCV Screening der Patientenproben	51
3.4.7 Paraffinisierung und Verarbeitung von humanen Synoviaprobe	52
3.5 Molekularbiologische Methodik	53
3.5.1 Isolierung von mRNA aus humanen Leukozyten Lysaten	53
3.5.2 Messung von mRNA-Konzentrationen und -Integrität	55
3.5.3 Reverse Transkription von mRNA zu cDNA	57
3.5.4 Real Time PCR	58
3.5.5 Auswertung der qPCR-Rohdaten und Quantifizierung	62
3.6 Immunologische Methodik	64
3.6.1 IL-26 Serum – ELISA	64
3.6.2 Induktion von IL-1-R1 in PBMCs und Immunphänotyping von Th17 Zellen	68
3.6.3 IL-26 Immunhistochemie	71
3.6.4 Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie	74
3.7 Funktionelle Assays und Analysen	81
3.7.1 Verwendung der Durchflusszytometer und Kalibrierungsschritte	81

3.7.2 Negative Selektion von CD4+ T-Zellen und Reinheitskontrolle	84
3.7.3 Positive Selektion von CD14+ Makrophagen	87
3.7.4 Induktion von IL-26 in CD4+ T-Zellen	87
3.7.5 Induktion von IL-26 in CD14+ Monozyten	90
3.7.6 Induktion und Immunphänotyping IL26 positiver PBMCs auf Transkriptionsebene	91
3.7.7 Gating-Strategien von Leukozytenpopulationen	97
3.7.8 Semiquantitative Analyse von digitalisierten IHC-Synoviaprobe	102
3.8 Statistische Analysen	105
4 Ergebnisse	106
4.1 Deskriptive Beschreibung des Studienkollektivs	106
4.2 Lokale Expression von IL-26 in Synovialgewebe	110
4.2.1 IL-26 wird vermehrt in Synovialgewebe von Patienten mit axSpA exprimiert	110
4.2.2 PsA-Patienten weisen einen signifikant erhöhten Anteil stark positiv IL-26 exprimierender Zellen in Synovialgewebe auf	115
4.3 Systemische Expression von IL-26 in Serumproben	118
4.3.1 Erhöhte IL-26-Spiegel bei Patienten mit PsA und RA	118
4.3.2 IL-26 Serumkonzentrationen korrelieren positiv mit dem CRP-Spiegel von axSpA-Patienten	118
4.4 Immunphänotypisierung IL-26 produzierender PBMCs	121
4.4.1 IL26 transkribierende PBMCs lassen sich mittels PrimeFlow-Assay darstellen und durch Th17-Oberflächenmarker und IL-1-R1 näher charakterisieren	121
4.4.2 PrimeFlow ist eine geeignete Methode zur Detektion und Phänotypisierung von IL26 transkribierenden „rare cells“	124
4.4.3 PsA-Patienten weisen einen erhöhten Anteil pathogener (IL-1-R1+) Th17-Zellen auf	129
4.5 Quantitative Analyse IL26 induzierender Zytokine in CD4+/CD14+ Monokultur durch RT-qPCR	131
4.5.1 IL26 und assoziierte Zytokine werden in-vitro bei CD4+ T-Zellen vermehrt durch IL-2/IL-1 β /IL-23 induziert, bei CD14+ Monozyten durch LPS jedoch nicht	131
4.5.2 Positive Korrelationen zwischen Transkriptionsraten von IL26 und Th17-typischen Genen in CD4+ T-Zellen unter in-vitro Stimulationsbedingungen	139
5 Diskussion	142
5.1 Übertragbarkeit unseres Studienkollektivs auf die Grundgesamtheit	142
5.1.1 Vergleichbarkeit erhobener klinisch-deskriptiver Daten der axSpA-Kohorte zur Gesamtbevölkerung erkrankter Patienten	142
5.1.2 Deskriptive Beobachtungen innerhalb unserer PsA und RA-Kohorten	145
5.1.3 Systemische Inflammationsmarker stehen im Zusammenhang mit IL-26 Expressionsleveln	146

5.2 Diskrepanz zwischen lokaler und systemischer Expressionslevel von IL-26	149
5.2.1 Gewebsständige CD68+ makrophagenähnliche Synoviozyten und andere Leukozyten produzieren vermehrt IL-26 in entzündlichem Synovialgewebe, in Abhängigkeit zu ihrer Krankheitsentität	149
5.2.2 Systemische IL-26 Serumspiegel lassen sich durch lokale IL-26 Expression bei SpA Patienten nicht hinreichend erklären – Ein Erklärungsversuch	152
5.2.3 Pathologische Th17-Zellen verändern ihren Phänotyp und ihre IL-26 Expressionsfähigkeit in Abhängigkeit zu ihrer inflammatorischen Umgebung	156
5.3 Gewebsabhängige Zytokine IL-1β & IL-23 primen Gedächtnis-CD4 Th-Zellen in-vitro zur vermehrten Expression von <i>IL26</i> und assoziierter Gene	161
5.3.1 Verlust der systemischen IL-26 Expressionsfähigkeit erklärt durch Wegfall autoinduktiver Th17 favorisierender Zytokine	161
5.3.2 Mit IL26 assoziierte Gene teilen sich Induktionsfaktoren, unabhängig von ihrer Abstammung, unterscheiden sich jedoch in ihrer Korrelation zu IL26	163
5.3.3 Mittels IL-1 β /IL-23 induzierte Gedächtnis-CD4+ Th-Zellen von axSpA-Patienten werden zu einem pathogenen Th17 Transkriptionsmuster hin „geprimed“	165
5.4 Potentielle translationale Aspekte unserer Studie	171
5.4.1 Ableitbare therapeutische Ansätze	171
5.4.2 Ableitbare diagnostische Ansätze	172
5.4.3 Notwendigkeit weiterer epigenetischer und gewebspezifischer Untersuchungen zur Rolle von IL-26 als Motor inflammatorischer Rückkopplungsschleifen	173
5.5 Weitere Limitationen	175
5.5.1 Limitationen im Rahmen des Studiendesigns und potentieller Selection-Bias	175
5.5.2 Methodische Limitationen im Rahmen durchgeführter Experimente	176
6 Zusammenfassung	179
7 Anhang	181
7.1 Ergänzende Abbildungen	181
7.2 Verzeichnis verwendeter Einwegmaterialien	185
7.3 Verzeichnis verwendeter Kits	187
7.4 Verzeichnis verwendeter Chemikalien, Reagenzien, Medien	188
7.5 Verzeichnis verwendeter Primer für qPCR	190
7.6 Verzeichnis verwendeter Antikörper, Fluorophore und Sonden	191
7.7 Verzeichnis verwendeter Zytokine und Stimulantien	193
7.8 Verzeichnis verwendeter Geräte	194
7.9 Verzeichnis verwendeter Programme	196
7.10 Verzeichnis teilnehmender Rekrutierungsstandorte und Praxen	197
7.11 Förderung der Promotion durch das Peter-Scriba Promotionsstipendium	198
7.12 Publikationen im Rahmen dieser Dissertation	199
8 Publikationslizenz Grafisches Abstrakt	201

9 Eidesstattliche Erklärung

Fehler! Textmarke nicht definiert.

10 Literaturverzeichnis

202

11 Danksagung

216

12 Lebenslauf

Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: <i>ASAS</i> -Klassifikationskriterien für die axiale SpA (aus Kiltz, Braun et al. 2019)	13
Abbildung 1.2: Potentielle Rollen von HLA-B27 in der Pathogenese der SpA (aus Dougados and Baeten 2011)	14
Abbildung 1.3: Genetische Überlappungen einer Anfälligkeit für Ankylosierende Spondylitis mit anderen Autoimmunerkrankungen (aus Cortes, Hadler et al. 2013)	16
Abbildung 1.4: Pathogenese der axialen Spondyloarthritis (übersetzt und angepasst nach Sieper and Poddubnyy 2017)	17
Abbildung 1.5 Die Differenzierung und Regulierung von Th17-Zellen (aus Wu and Wan 2020)	20
Abbildung 1.6: Biologische Eigenschaften von IL-26 (aus Larochette, Miot et al. 2019)	27
Abbildung 1.7: Schematische Repräsentation der proinflammatorischen Eigenschaften von IL-26 (aus Larochette, Miot et al. 2019)	34
Abbildung 3.1: Screenshot des RT-PCR Programms Roche Lightcycler 480	61
Abbildung 3.2: Datenanalyse für ein typisches Experiment relativer Quantifikation (aus Taylor, Nadeau et al. 2019)	63
Abbildung 3.3: Gatingstrategien für Leukozytenpopulationen	101
Abbildung 3.4: Workflow IHC-Profiler	104
Abbildung 4.1: Lokale IL-26 Expression in Synovialgewebe	113
Abbildung 4.2: Quantitative Analyse IL-26+ Synovialgewebeproben nach Staining	
Kategorien	116
Abbildung 4.3: IL-26 Serumkonzentrationen	119
Abbildung 4.4: Korrelationen zwischen IL-26- und CRP-Serumkonzentrationen	119
Abbildung 4.5: Interleukin-26 Transkription und IL-1-R1+ Th17 Zellen in PBMCs	123
Abbildung 4.6: Subpopulationen <i>IL26</i> transkribierender PBMCs und PrimeFlow Assay	
Methodenbeweis	128
Abbildung 4.7: Immunphänotyping IL-1-R1 exprimierender CD4+ bzw. CD8+ PBMCs mittels Oberflächenfärbung	130
Abbildung 4.8: Effekte unterschiedlicher Zytokinkombinationen auf die Expression von „Leitgenen“ in CD4+ T-Zellen von HC, axSpA-, PsA und RA-Patienten in vitro	135
Abbildung 4.9: Fehlende Induktion von <i>IL26</i> und <i>IL17A</i> in CD14+ Monozyten durch LPS	136
Abbildung 4.10: Korrelationsanalysen zwischen <i>IL26</i> und <i>IL17A</i> , <i>IL22</i> , <i>IL4</i> und <i>IL1R1</i> in CD4+ T-Zellen	140
Abbildung 5.1 Grafisches Abstrakt zur von uns vorgeschlagenen Weiterentwicklung der wissenschaftlich diskutierten IL-26 abhängigen Pathogenese chronisch entzündlicher Arthritis innerhalb des Formenkreises der SpA (© Ossadnik & Hammitzsch, April 2024, erstellt mittels BioRender.com)	171
Abbildung 7.1: Aus PBMCs negativ selektierte CD4+ T-Zellen weisen einen hohen Reinheitsgrad auf	181
Abbildung 7.2: Überprüfung der Spezifität der IL-26 Färbung in der IHC-Profiler Analyse mittels Isotypkontrollen	182
Abbildung 7.3: Nachweis der spezifischen Anfärbung in der Immunfluoreszenz durch Isotypkontrollen	183
Abbildung 7.4: Beispielhafte Konfokale Immunfluoreszenz einer Synoviaprobe der Entität PsA	184

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Definierte Rollen von IL-26 unter verschiedenen Bedingungen (übersetzt und angepasst aus Gowhari Shabgah, Abdelbasset et al. 2022).....	33
Tabelle 4.1: Demographie und deskriptive Statistik Blutproben	108
Tabelle 4.2: Demographie und deskriptive Statistik Synoviaprobe	109
Tabelle 4.3: PFA – <i>IL26</i> transkribierende CD4+ Subpopulationen	125
Tabelle 4.4: PFA - <i>IL26</i> transkribierende CD8+ Subpopulationen.....	125
Tabelle 4.5: Relative Transkriptionsraten unterschiedlicher Stimulationskonditionen für CD4+ T-Zellen getrennt nach Kohorten, bezogen auf die basale Stimulationskondition (1) (Anti-CD2/CD3/CD28-T-Zell-Aktivierungsbeads + IL-2) – kumulativer Zytokineffekt	137
Tabelle 4.6: Relative Transkriptionsraten der untersuchten CD4+ Monokulturen der einzelnen Kohorten, bezogen auf die Gruppe der HCs für die Stimulationskondition (2) (Anti-CD2/CD3/CD28-T-Zell-Aktivierungsbeads + IL-2, IL-1 β , IL-23)	138

Abkürzungsverzeichnis

4% PFA	4%iges Paraformaldehyd
ACR	American College of Rheumatology
ACTB	Beta Actinin
ADAMTs	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
AF	Alexa Fluor
Amp	Amplifikation
AMP	Antimikrobielles Protein
ANCA	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
ANTXR2	Anthrax Toxin Rezeptor 2
APC	Allophycocyanin
APCs	Antigen presenting cells
AS	Ankylosierende Spondylitis
ASAS	Assessment of SpondyloArthritis international Society
BACH2	broad complex-track-bridged and Cap'n'collar homology 2
BASDAI	Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index
BASFI	Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index
BASMI	Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index
BATF	Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like
BP	Band pass
BSA	Bovine serum albumine
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
BV	Brilliant Violet
CAD11	Cadherin 11
CARD9	Caspase recruitment domain-containing protein 9
CASPAR	Classification Criteria for Psoriatic Arthritis
CCL2	CC-Chemokin-Ligand-2
CCP	Zyklisches Citrulinisiertes Protein
CCR	C-C-Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronisch obstruktive pulmonale Erkrankung
COX-2	Cyclooxygenase-2
CPT	Cell preparation tube
CRP	C-reaktives Protein
CT	Cycle Threshold
CVID	Common variable immunodeficiency

Einleitung

CXCL1	C-X-C motif chemokine 1
CXCL12	C-X-C motif chemokine 12
CXCL13	C-X-C motif chemokine 13
CXCL8	CXC-Motiv-Chemokin 8, CXC-Motiv-Chemokin 8
CXCR	CXC chemokine receptor
DA	Dalton
DAB	3, 3'-diaminobenzidine
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DAS28	Disease Activity Score
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMARDs	Disease-modifying anti-rheumatic drugs
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DPBS	Dulbecco Phosphate Buffered Saline
DRKS	Deutsches Register Klinischer Studien
DSGVO	Datenschutzgrundverordnung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EtOh	Ethanol
EULAR	European League Against Rheumatism
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCGR2A	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-a
FCS	Fetal cow serum
FICOLL	Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer
FITC	fluorescein isothiocyanate
Fix & Perm	Fixation & Permeabilisation
fMLP	N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine
FMO	Fluorescence minus one
FSC-A	Forward Scatter - Area
GCP	Good Clinical Practice
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
GM	Geometrisches Mittel
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor
GPR35	G-Protein gekoppelter Rezeptor 35
GPR65	Psychosine receptor
GVHD	Graft vs. Host
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBV	Hepatitis B Virus
HC	Healthy Control
HCV	Hepatitis C Virus
HIV-1/2	Humanes Immundefizienz Virus 1/2
HLA-B27	Humanes Leukozytenantigen B27
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
HRP	Horseradish peroxidase
HS	High Sensitivity
HSV	Herpes simplex Virus
ICOSLG	inducible T-cell co-stimulator ligand
ICS	Ionomycin Calcium Salz
IFNG	Interferon gamma Gen
IFN-γ	Interferon gamma
IFN-α	Interferon alpha
IFN-β	Interferon beta
IgG	Immunglobulin G
IgG1	Immunglobulin G1
IgG2a	Immunglobulin G2a
IgG2B	Immunglobulin G2B
IHC	Immunhistochemie
IL-10	Interleukin-10
IL-10R2	Interleukin-10-Rezeptor 2
IL12B	Interleukin 12 Untereinheit beta
IL17A	Interleukin- 17A

IL-17F	Interleukin-17F
IL-19	Interleukin-19
IL1R1	Interleukin-1-Rezeptor-1
IL-1-R1	Interleukin-1-Rezeptor-1
IL1R2	Interleukin-1-Rezeptor-2
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL-2	Interleukin 2
IL-20	Interleukin-20
IL-20R1	Interleukin-20-Rezeptor 1
IL-22	Interleukin-22
IL-23	Interleukin 23
IL-24	Interleukin-24
IL-26	Interleukin 26
IL27-SULT1A1	Interleukin- 27 Sulphotransferase 1A1
IL-28A	Interleukin-28A
IL-28B	Interleukin-28B
IL-29	Interleukin-29
IL-6	Interleukin 4
IL-8	Interleukin-8
ILC3	Typ 3 angeborene lymphatische Zellen
IMQ	Imiquimod
IRF4	Interferon Regulatory Factor 4
ISG	Iliosakralgelenk
ISO	International Organisation für Normung
JAKi	Janus Kinase Inhibitoren
KIF21B	Kinesin Familienmitglied 21B
KO	Krome Orange
Komp.	Komponente
LTBR	Lymphotoxin beta receptor
MAB	Monocolnal Antibody
MAIT-Zellen	Mucosal-associated invariant T-cells
MALT	Mukosa assoziiertes lymphatisches Gewebe
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
MDB	Membran Entsalzungspufferlösung
MMPs	Matrixmetalloproteasen
MR1	Major histocompatibility complex, class I-related
MRI	(Klinikum) München Rechts der Isar
mRNA	Messenger Rybonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MTA	Material Transfer Agreement
MVZ	Medizinisches Versorgungszentrum
MW	Mittelwert
NET	Neutrophil Extracellular Traps
NF- κ B	(nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NHEK	Normal Human Epidermal Keratinocytes
NK Zellen	Natürliche Killer Zellen
NK22	IL-22 exprimierende NKs
NKX2-3	Homeobox protein Nkx-2.3
NLS	nukleäre Lokalisationssequenzen
NOS2	Stickoxidsynthase
nr-axSPA	Nicht radiographische axiale Spondyloarthritis
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
OA	Osteoarthritis
OD	Optical density
P/S	Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)
PB	Pacific Blue
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Protein free blocking puffer solution
PC7	phycoerythrin-cyanine7 conjugate
PCR	Polymerasekettenreaktion
PerCP	peridinin chlorophyll-A protein
PMA	12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate

Einleitung

PSA	Psoriasisarthritis
PTGER4	Prostaglandin E2 Rezeptor 4
QC	Quality control
qPCR	quantitative PCR
R10	Zellkulturmedium (10% FCS, 1% Pen/Strep)
RA	Rheumatoide Arthritis
rDNase	Rekombinante DNase
RedOx	Reduktion-Oxidation
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver operating characteristic
RORC	RAR-related orphan receptor C
ROR γ	RAR-related orphan receptor gamma
RPL13A	60S-ribosomale Protein L13a
RT	Raumtemperatur (20°C)
RUNX3	Runt-related transcription factor 3
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SEM oE	Standardfehler oberes Ende
SEM uE	Standardfehler unteres Ende
SH2B3	SH2B adapter protein 3
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
SMA	Smooth muscle antigen
SMCs	Smooth muscle cells
SpA	Spondyloarthritis
SSC	Sideward scatter
STAT	signal transducer and activator of transcription
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
STING	stimulator of interferon genes
STM	syonvial tissue-resident macrophages
TBKBPI	TANK-binding kinase 1 protein 1
TBST	Tris Buffered Saline mit Tween 20
TCR β +	T-Zellrezeptor beta positiv
TCR- $\gamma\delta$	T-Cell receptor gamma delta
T _{eff} 17	Effektor- Th17 Zelle
TGF- β	Transforming growth factor beta
TGF- β 1	Transforming growth factor beta-1
TGF β 3	Transforming growth factor beta-3
Th1	T-Helferzelle Typ 1
Th17	Typ-17-Helferzelle
Th2	T-Helferzelle Typ 2
TLR3	Toll like receptor 3
TLR9	Toll like receptor 9
TNFRSF1A	TNF Rezeptor Superfamilie Mitglied 1A
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAV1-2	T Cell Receptor Alpha Variable 1-2
T _{reg} 17	Regulatorische Th17 Zelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSA	Tyramide signal amplification
TXT	Text
TYK2	Tyrosinkinase-2
UBE2E3	Ubiquitin Konjugationsenzym E2 E3
UK	United Kingdom
UV	Ultraviolett
WP	Well plate
WS	Wirbelsäule
ZMIZ1	Zinkfinger MIZ Domäne enthaltendes Protein 1

1 Einleitung

1.1 Spondylarthritiden - Gruppe multisystemischer rheumatologischer Erkrankungen

1.1.1 Krankheitsbilder des Formenkreises Spondyloarthritis und Entwicklung des Begriffs axiale Spondylarthrititis

Bereits 1974 wurden unter dem Begriff „seronegative Spondylarthritiden“ mehrere rheumatologische Krankheitsbilder mit ähnlicher klinischer Präsentation subsummiert (Moll, Haslock et al. 1974). Für diese Gruppe von Erkrankungen galten zunächst die modifizierten New York Kriterien (Linden, Valkenburg et al. 1984), wurden jedoch 2009 durch die ASAS Kriterien abgelöst (Rudwaleit, van der Heijde et al. 2009). Seither umfasst der Sammelbegriff „Spondyloarthritis“ (auch Spondarthrititis, Spondylarthrititis oder abgekürzt SpA) die folgenden Krankheitsentitäten: Psoriasisarthritis, Reaktive Arthritis, Enteropathische Spondylarthrititis, eine Untergruppe der juvenilen idiopathischen Arthritis, sowie zuletzt die ankylosierende Spondylitis (auch Spondylitis ankylosans, Morbus Bechterew) als „Prototyp“ der SpA (Dougados and Baeten 2011) (Dougados and Landewé 2009). Bei Letzterer wird weiter nach axialer oder peripherer Spondylarthrititis unterschieden.

Da durch die modifizierten New York Kriterien von 1984 (Linden, Valkenburg et al. 1984) Frühformen der ankylosierenden Spondylitis (z.B. bei noch fehlenden radiographisch nachweisbaren Veränderungen) nicht diagnostiziert werden konnten, führte man anhand der MRT-Bildgebung der Wirbelsäule/ISG die nicht-radiologische axiale SpA (nr-axSpA) ein. Die radiographisch nachweisbare SpA wird aktuell als axSpA bezeichnet. (Rudwaleit, van der Heijde et al. 2009, Sieper and Poddubnyy 2017). Durch diese neue Einteilung erhöhte sich der Anteil an Frauen mit einer Spondylarthrititis signifikant, so dass heute das Geschlechterverhältnis nahezu ausgeglichen ist (Feldtkeller, Bruckel et al. 2000).

1.1.2 Klinische Präsentation der (axialen) Spondylarthrititis

Die axiale SpA ist eine chronisch inflammatorische, rheumatische Erkrankung, die vorrangig die Iliosakralgelenke, sowie die Wirbelsäule betrifft (Danve and Deodhar 2019). Sie hat eine Prävalenz von ca. 0,54 % in Europa (Dougados and Baeten 2011, Stolwijk, van Onna et al. 2016) und wird in Deutschland auf 0,32-0,5% geschätzt (Albrecht, Binder et al. 2023). Hauptsymptom der Erkrankung ist der „inflammatorische Rückenschmerz“ (Sieper, van der Heijde et al. 2009). Dieser definiert sich durch einen schleichenden Beginn vor dem 40. Lebensjahr, einen chronischen Verlauf (> 3 Monate), eine Verbesserung durch Bewegung, vermehrtes Auftreten nachts (mit Besserung nach dem Erwachen) und fehlende Besserung bei Ruhe (Walsh and Magrey 2021). Der entzündliche Rückenschmerz spricht häufig gut auf NSAR an (Song,

Poddubnyy et al. 2008) und es lässt sich eine familiäre Belastung eruieren (Weisman 2012, Costantino, Mambu Mambueni et al. 2021). Nach wie vor besteht jedoch eine durchschnittliche Verzögerung der Diagnose um 5,7 Jahre, die besonders Frauen und HLA-B27 negative Patienten betrifft (Redeker, Callhoff et al. 2019).

Patienten mit SpA weisen häufig weitere, extraartikuläre Symptome auf wie Psoriasis, inflammatorische Darmerkrankungen, Iritis und anteriore Uveitis, sowie oft auch periphere Arthritiden, Enthesitiden und Daktylitiden. Im Blut sieht man erhöhte Akute-Phase Proteine (CRP und BSG) (Walsh and Magrey 2021).

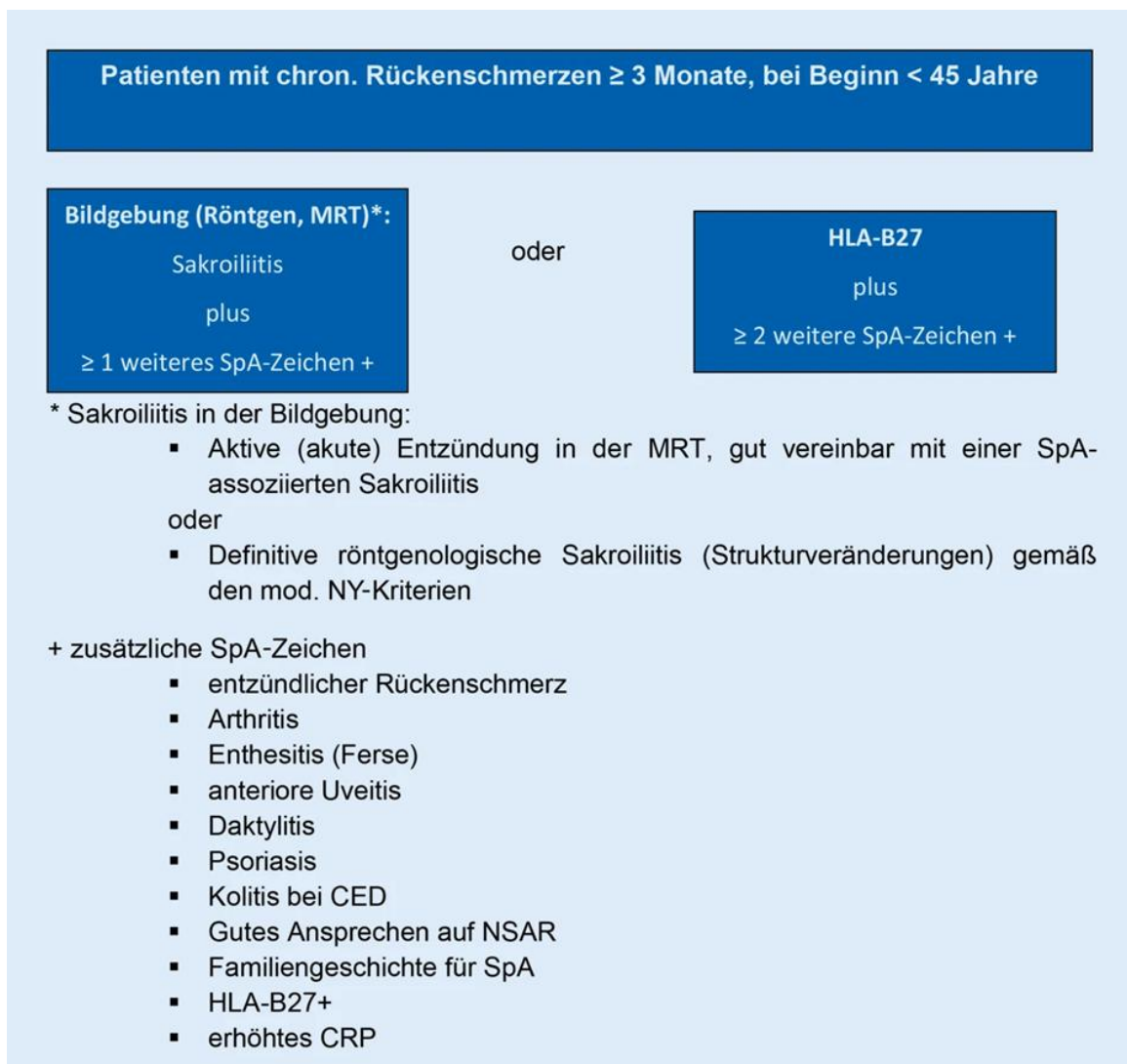


Abbildung 1.1: ASAS-Klassifikationskriterien für die axiale SpA (aus Kiltz, Braun et al. 2019)

Dargestellt sind die drei diagnostischen Säulen der ASAS-Klassifikationskriterien für die axiale SpA: 1. Die radiografische Darstellung pathognomonischer Veränderungen; 2. Die HLA-B27 Typisierung als genetischer Risikofaktor; 3. Die klinisch möglichen & typischen Merkmalausprägungen

1.1.3 Pathogenese und Limitationen bei der Behandlung der axSpA

Man geht davon aus, dass die Pathogenese der axSpA multifaktoriell bedingt ist. Neben unabhängigen genetischen Risikofaktoren kommen unter anderem äußere Umwelteinflüsse, insbesondere physikalische Belastung, bei der Entstehung der charakteristischen Inflammation zum Tragen, welche in Folge zur Krankheitsmanifestation führen (Sieper and Poddubnyy 2017).

Die starke Assoziation von HLA-B27 mit axSpA wurde bereits 1973 erkannt und beschrieben (Brewerton, Hart et al. 1973, Schlosstein, Terasaki et al. 1973). Die genaue Rolle von HLA-B27 in der Pathogenese der axSpA bleibt bis heute weiterhin ungewiss (Chen, Li et al. 2017), es existieren jedoch drei wesentliche Hypothesen, welche die vermutete pathophysiologische Funktion von HLA-B27 beschreiben (Chatzikyriakidou, Voulgari et al. 2011, Bowness 2016, Chen, Li et al. 2017):

I: Potential als arthritogenes Peptid (Präsentation von körpereigenen Peptiden führt zu autoimmuner Reaktion)

II: Fehlfaltung der schweren Ketten von HLA-B27 und resultierender intrazellulärer Stress (in Folge hiervon eine ausgelöste Autoinflammation)

III: Angeborene autoimmune Reaktion auf aberrantes HLA-B27 (Homodimere der schweren Ketten führen zur NK-Zellaktivierung).

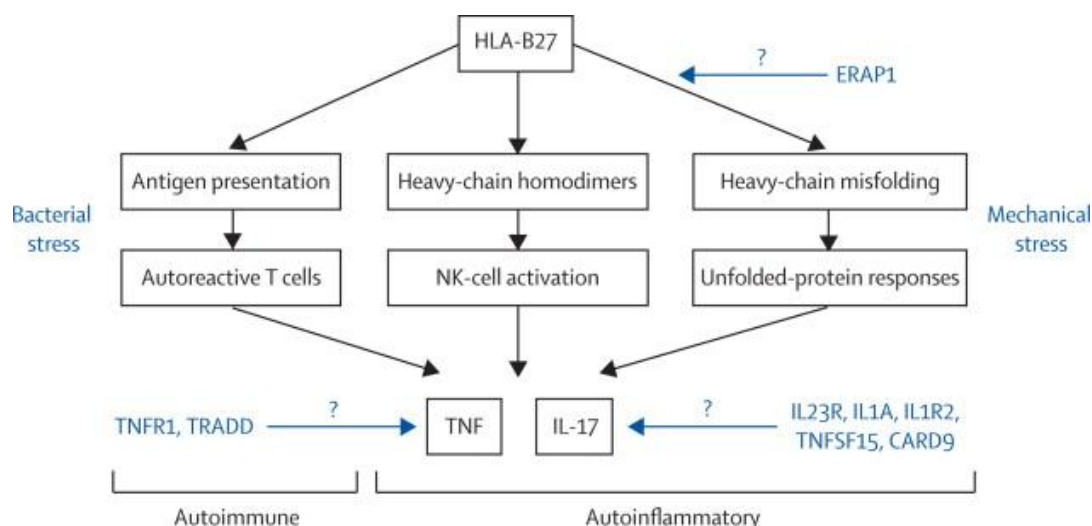


Abbildung 1.2: Potentielle Rollen von HLA-B27 in der Pathogenese der SpA (aus Dougados and Baeten 2011)

Die drei wesentlichen Hypothesen beziehen sich auf die Präsentation von arthritogenen Peptiden gegenüber autoreaktiven T-Zellen, die Bildung von Homodimeren aus schweren Ketten (welche NK-Zellen aktivieren) und die Fehlfaltung von HLA-B27 im endoplasmatischen Retikulum, welche zu einer „ungefalteten“ Protein-Antwort führt. Auf bakteriellen oder mechanischen Stress hin, können diese Pfade zu einer abnormalen Produktion

proinflammatorischer Zytokine, wie *TNF- α* und *IL-17* führen. Die Rolle weiterer genetischer Assoziationen wie z.B. mit *ERAP1* wird bisher nicht in Gänze verstanden. *ERAP1* = Endoplasmatisches Retikulum Aminopeptidase 1. NK = Natürliche Killer Zelle. *TNFR1* = TNF-Rezeptor 1. *TRADD* = TNF-Rezeptor 1- assoziierte Todesdomänenprotein. *IL23R* = Interleukin 23 Rezeptor. *IL1A* = Interleukin 1 α . *IL1R2* = Interleukin 1 Rezeptor 2. *TNFSF15* = TNF Superfamilie Zytokin 15. *CARD9* = Caspase Rekrutierungsdomäne Familie, Mitglied Nr. 9 (Dougados and Baeten 2011)

Zusätzlich konnten in den vergangenen Jahren mittels Genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) weitere genetische Risikofaktoren für die Entwicklung einer axSpA ausgemacht bzw. erneut bestätigt werden. Neben den bereits zuvor bekannten Gen-loci *ANTXR2*, *CARD9*, *ERAP1*, *IL12B*, *IL23R*, *KIF21B*, *PTGER4*, *RUNX3*, *TBKBPI*, *TNFRSF1A* (Burton, Clayton et al. 2007, Reveille, Sims et al. 2010, Evans, Spencer et al. 2011, Cortes, Hadler et al. 2013) sind dies: *IL6R*, *FCGR2A*, *UBE2E3*, *GPR35*, *BACH2*, *ZMIZ1*, *NKX2-3*, *SH2B3*, *GPR65*, *IL27-SULT1A1*, *NOS2*, *TYK2* und *ICOSLG* (Cortes, Hadler et al. 2013). Diese betreffen den Interleukin-23-Signalweg, Aminopeptidase-Gene (welche für die Proteinprozessierung im Endoplasmatischen Retikulum relevant sind), Gene die für die Aktivierung und Differenzierung von Lymphozyten verantwortlich sind, sowie weitere MHC und nicht-MHC Lokalisationen. Zudem konnte man Verdachtsmomente einer Assoziation für eine Region im Chromosom 2q11, welche für die Gene *IL1R2* und *IL1R1* kodiert, festhalten. Diese Gene codieren IL-1-Rezeptoren, die neben diversen proinflammatorischen Funktionen unter anderem auch die Differenzierung von Th17-Zellen vorantreiben (Cortes, Hadler et al. 2013).

Hierbei fiel auf, dass es eine hohe genetische Schnittmenge zwischen der axSpA und anderen immunvermittelten Erkrankungen, insbesondere entzündlichen Darmerkrankungen gibt (Thomas and Brown 2010, Cortes, Hadler et al. 2013).

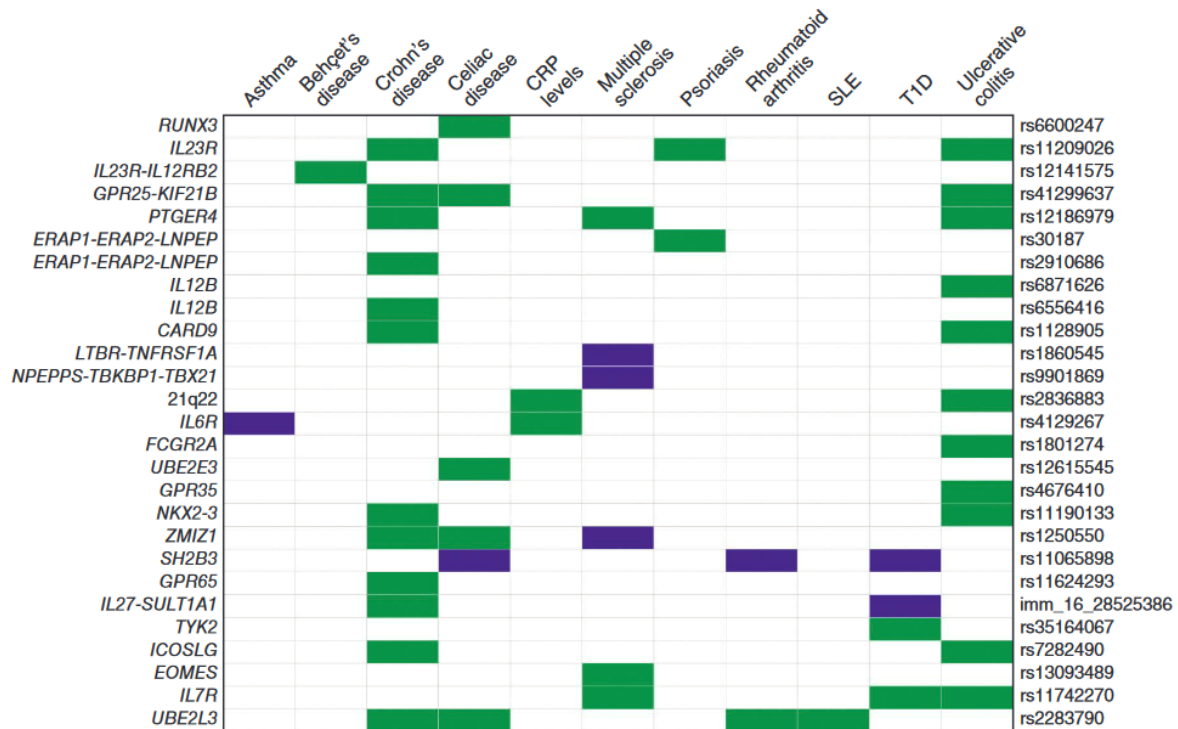


Abbildung 1.3: Genetische Überlappungen einer Anfälligkeit für Ankylosierende Spondylitis mit anderen Autoimmunerkrankungen (aus Cortes, Hadler et al. 2013)

Krankheiten sind dargestellt als Säulen und Gen-loci, die eine Prädisposition für Ankylosierende Spondylitis bedingen, in Zeilen. Geteilte Gen-Loci, die eine Anfälligkeit für beide Krankheiten bedingen (und für welche die Effektgröße konkordant ist) sind grün dargestellt (wenn diese nicht konkordant ist andernfalls lila) [...] (Cortes, Hadler et al. 2013)

Man geht davon aus, dass zwischen 80-90% der möglichen Disposition gegenüber der Entwicklung einer axSpA durch genetische Risikofaktoren bedingt sind (Dougados and Landewé 2009). Da jedoch nur ein kleiner Bruchteil der HLA-B27+ Bevölkerung (ca. 5-6% unter der weißen Bevölkerung) eine axSpA entwickelt, kann mit HLA-B27 nur ca. 20-40% der genetischen Veranlagung erklärt werden (Dougados and Landewé 2009).

Als relevante Umweltbedingungen in der Pathogenese der SpA gelten vor allem Barrierschäden der Haut (Psoriasis), der Schleimhaut (inflammatorische Darmerkrankungen) und die hieraus resultierende Exposition gegenüber Mikroorganismen bzw. deren Metaboliten. So geht man davon aus, dass diese Exposition letztlich zu einer Aktivierung des Immunsystems führt und in Folge die Pathogenese mitbedingt (Sieper, van der Heijde et al. 2009, Sieper and Poddubnyy 2017). Mechanischer Stress scheint für die Initiierung und evtl. auch für die Aufrechterhaltung der Inflammation ebenfalls wichtig zu sein (Jacques, Lambrecht et al. 2014). Tiermodelle konnten zeigen, dass physikalischer Stress im Bereich von Enthesen zur Entwicklung einer Inflammation und neuer Knochenformation beitragen kann, indem Bestandteile des angeborenen Immunsystems aktiviert und Zytokine freigesetzt werden (Perrotta, Lories et al.

2021). Paradoxe Weise profitieren die meisten SpA Patienten auch von körperlicher Betätigung, welche somit eine zentrale therapeutische Säule in der Behandlung darstellt (Perrotta, Lories et al. 2021).

Bei bis zu 60% der Patienten mit SpA besteht eine subklinische Entzündung der Darmmukosa (Mielants, Veys et al. 1988), die sich in ca. 10% zu einem Morbus Crohn entwickeln kann (De Vos, Mielants et al. 1996). Ca. 15-20% einer SpA treten im Rahmen einer bereits diagnostizierten CED auf (Vander Cruyssen, Ribbens et al. 2007, Rudwaleit, Haibel et al. 2009, Sieper and Poddubnyy 2017). Somit überrascht es nicht, dass neben einer großen Schnittmenge an disponierenden Genvarianten (Cortes, Hadler et al. 2013) auch Veränderungen des Mikrobioms (= Dysbiose) bei Patienten mit SpA bestehen (Asquith, Elewaut et al. 2014, Costello, Ciccio et al. 2015). In diesem Zusammenhang wird bereits seit längerem über eine sogenannten *gut-joint-axis* bei der SpA diskutiert (Gracey, Vereecke et al. 2020).

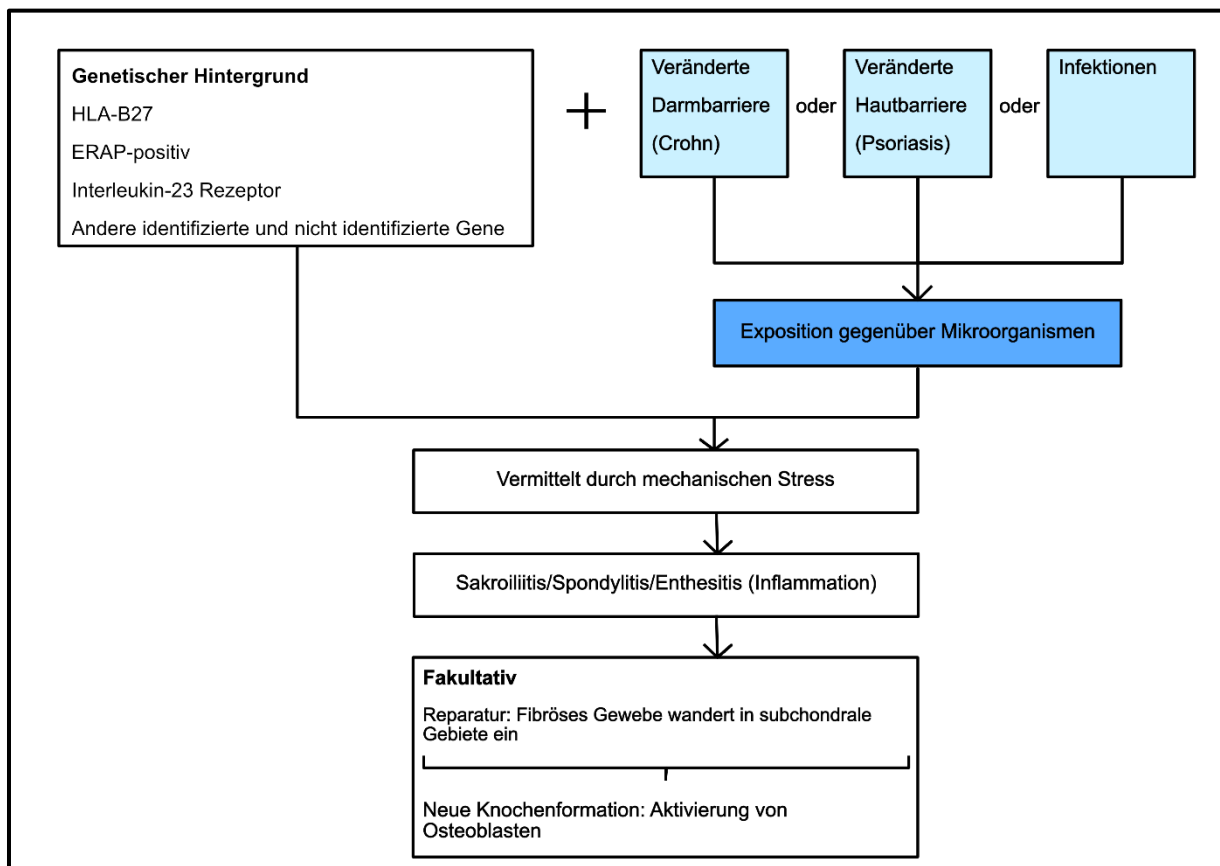


Abbildung 1.4: Pathogenese der axialen Spondyloarthritis (übersetzt und angepasst nach Sieper and Poddubnyy 2017)

Aktuelle Vorstellung der multifaktoriellen Genese der axSpA, in Abhängigkeit von genetischer Veranlagung und äußeren Einflussfaktoren, nach Sieper und Poddubnyy: Unabhängige Risikofaktoren (wie HLA-B27) sorgen bei gleichzeitiger Exposition gegenüber Mikroorganismen (durch geschädigte primäre immunologische Barrieren), unter Vermittlung physikalischer Stressoren, für eine Entzündungsreaktion im (Achsen-)Skelett. Es kommt zur

Invasion fibrösen Gewebes im subchondralen Bereich und zur Ausschüttung aktivierender Faktoren, die ortsständige Osteoblasten zur Knochenbildung anregen und im Verlauf eine Ankylose bewirken.

Die für die SpA charakteristische Inflammation tritt an der Schnittstelle zwischen Knorpel- und Knochengewebe im Bereich der Iliosakralgelenke, der Wirbelsäule und im Bereich der Entthesen auf (Sieper and Poddubnyy 2017). Es konnte gezeigt werden, dass bei der SpA die Bildung von neuem Knochengewebe durch biomechanischen Stress im Bereich der Enthesen vorangetrieben wird und mit dem Inflamationsgrad positiv korreliert (Jacques, Lambrecht et al. 2014). Als Folge des durch die Inflammation bedingten Knochenschadens, scheint die Bildung von neuem Knochengewebe induziert zu werden (Lories 2011, Jacques, Lambrecht et al. 2014). Als osteoproliferative Faktoren in der axSpA wurden die *Wingless pathway proteins*, die *hedgehog proteins* und die *fibroblast growth factors*, mit ihren respektiven Signalwegen identifiziert (Lories 2011, Ruiz-Heiland, Horn et al. 2012, Sieper and Poddubnyy 2017). Studien an MRT-Bildern konnten zeigen, dass sich aktive inflammatorische Läsionen (wie Knochenmarksödeme) im weiteren Verlauf der Erkrankung zu Reparaturaläsionen entwickeln, die weitere Faktoren zur Stimulation neuer Knochenformation freisetzen (Maksymowych, Landewé et al. 2007, Baraliakos, Heldmann et al. 2014, Sieper and Poddubnyy 2017).

In den vergangenen Jahren rückte aufgrund neuer genetischer Assoziationen (Dougados and Baeten 2011), Studien zur Immunzellphänotypisierung und durch die therapeutischen Erfolge von anti-IL-17 Antikörpern, die Interleukin-23/-17A Achse in der Pathogenese der SpA in den Fokus (Shen, Goodall et al. 2009, Sieper and Poddubnyy 2017).

1.2 Die Th17-Zelle im Kontext der SpA

1.2.1 Die Entstehung und Funktion der Th17-Zellen

Zunächst wurden CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit ihrer Antigen-spezifischen Aktivierbarkeit und anhand ihrer Zytokin-Expressionsprofile in Th1- und Th2-Zellen eingeteilt (Mosmann and Coffman 1989). Etwas später wurden Th17-Zellen anhand der Produktion von IL-17A, IL-17F und IL-22 definiert (Aggarwal, Ghilardi et al. 2003, Harrington, Hatton et al. 2005, Park, Li et al. 2005, Liang, Tan et al. 2006, Bettelli, Oukka et al. 2007, Zheng, Danilenko et al. 2007). Sie erwiesen sich als eigenständige Klasse proinflammatorischer T-Helfer-Zellen, die neben ihrer protektiven, physiologischen Rolle, z.B. durch die Produktion von IL-17A in Gegenwart von IL-23 in der Abwehr von Pilzen und extrazellulären Bakterien, sowie der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase an der mukosalen Grenzfläche (Lee, Turner et al. 2009, Hernández-Santos and Gaffen 2012, Davidson, van den Reek et al. 2022, Mills 2022) auch eine entscheidende Rolle in der Entwicklung autoimmuner Erkrankungen spielen (Wilson, Boniface et al. 2007).

Bei der Entstehung von humanen Th17-Zellen muss daher zwischen sogenannten homeostatischen (nicht pathogenen) und pathogenen Th17-Zellen unterschieden werden. Humane pathogene Th17-Zellen generieren sich in-vitro aus naiven CD4⁺ T-Zellen in der Gegenwart von IL-1 β und IL-23 (mit/ohne IL-6) (Wilson, Boniface et al. 2007). IL-23 ist jedoch nicht der initiiierende Faktor der Th17-Differenzierung, da naive CD4⁺ T-Zellen keinen IL-23-Rezeptor exprimieren und es erst durch IL-6 zur Expression des IL-23-Rezeptors kommt (Zhou, Ivanov et al. 2007).

Diese für die Generierung pathogener Th17-Zellen relevanten Zytokine werden unter anderem von aktivierten antigenpräsentierenden Zellen (APCs) nach Kontakt mit Pathogenen in Bereichen exponierter Mucosa, wie dem Darm und dem Respirationstrakt, vermehrt produziert (Gugliani and Khader 2010, Wu and Wan 2020).

Neuere Untersuchungen identifizierten zusätzlich TGF β 3 oder Serum-Amyloid-A Proteine in Kombination mit IL-6 als Induktoren pathogener Th17-Zellen (Lee, Awasthi et al. 2012, Lee, Hall et al. 2020, Wu and Wan 2020). Pathogene Th17-Zellen exprimieren neben IL-17A vermehrt IL-17F, IL-22, GM-CSF, IFN- γ und IL-26, sowie den Transkriptionsfaktor ROR γ t (als Protein des RORC Gens) und können inflammatorische Erkrankungen auslösen (Wilson, Boniface et al. 2007, Corvaisier, Delneste et al. 2012).

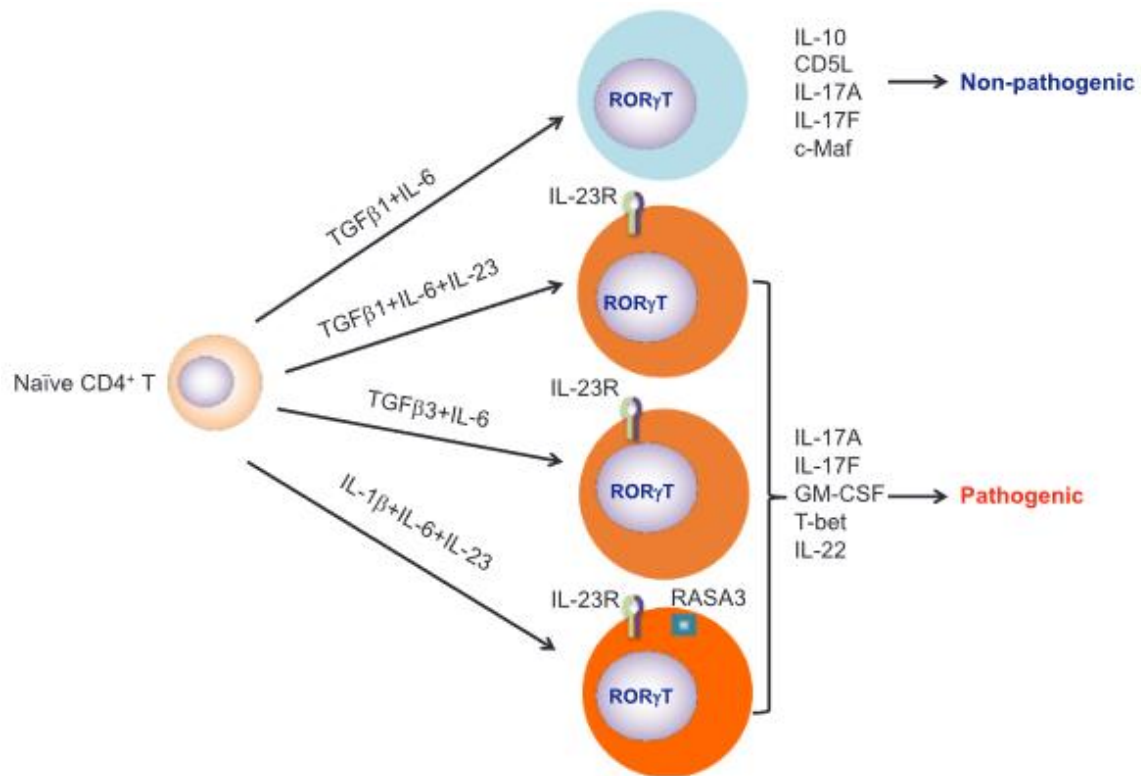


Abbildung 1.5 Die Differenzierung und Regulierung von Th17-Zellen (aus Wu and Wan 2020)

Die Ausdifferenzierung von Th17-Zellen zu einem pathogenen oder nicht pathogenen Phänotyp hin, ist abhängig von den zugrundeliegenden Zytokinkonditionen und somit kontextsensitiv. Es resultiert ein unterschiedliches Expressionsprofil: Bei pathogenen Th17-Zellen vor allem gekennzeichnet durch das zusätzliche Auftreten von GM-CSF, IL-22 (Wilson, Boniface et al. 2007) und IL-26 (nicht dargestellt) (Corvaisier, Delneste et al. 2012) und bei nicht pathogenen Th-17 Zellen v.a. durch das antiinflammatorische IL-10 (McGeachy, Bak-Jensen et al. 2007, Lee, Awasthi et al. 2012) und IL-4 (Cosmi, Maggi et al. 2010) .

In verschiedenen Tiermodellen konnte bereits gezeigt werden, dass die Beeinflussung der Induktionsprozesse von Th17 Zellen, direkte Konsequenzen für die Entstehung oder das Ausbleiben von Autoimmunerkrankungen hat. Beeinflusst man die p19 Untereinheit von IL-23 im Mausmodell, können diese keine Th17 Zellen mehr generieren und sind resistent gegenüber bestimmten Autoimmunerkrankungen, wie EAE, CED und Arthritis (McGeachy, Chen et al. 2009, Ahern, Schiering et al. 2010, Gaffen, Jain et al. 2014). In einem experimentellen Modell allergischer Enzephalomyelitis an Mäusen (EAE) konnte man zudem zeigen, dass Th17-Zellen, welche zunächst mittels TGF-β1 und IL-6 induziert wurden, nicht direkt diese Autoimmunerkrankung vorantreiben, sondern erst bei zusätzlicher Exposition gegenüber IL-23 (Langrish, Chen et al. 2005, Ghoreschi, Laurence et al. 2010). Dies unterstützt die These einer wesentlichen Rolle von IL-23 in der durch pathogene Th17 Zellen vermittelten Inflammation (Wu and Wan 2020). In einem anderen Beispiel tragen mittels IL-23, IL-6 und IL-1β differenzierte Th17-

Zellen im Mausmodell maßgeblich zur Entstehung eines Typ 1 Diabetes bei (Singh, Schwartz et al. 2013).

Verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ t in naiven CD4⁺ T-Zellen induziert Schlüsselgene, welche für die erfolgreiche Th17 Differenzierung notwendig sind (Ivanov, McKenzie et al. 2006). ROR γ t arbeitet mit einem Netzwerk unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren zusammen, vor allem STAT3, IRF4 und BATF, wobei die Aktivierung von STAT3 durch IL-6 und IL-23 für die Zelliniendifferenzierung von Th17-Zellen einen zentralen Punkt darstellt (Gaffen, Jain et al. 2014). Interessanterweise unterscheidet sich die Induktion pathogener und nicht pathogener Th17-Zellen bezüglich der Notwendigkeit der Transkriptionsfaktoren ROR γ t, BATF und IRF4 nicht voneinander, obwohl es sich um unterschiedliche Zellarten zu handeln scheint, wie man in EAE Mausmodellen hat zeigen können (Ivanov, McKenzie et al. 2006, Brüstle, Heink et al. 2007, Schraml, Hildner et al. 2009, Huber and Lohoff 2014).

Im Gegensatz hierzu entstehen homöostatische Th17-Zellen bei Mäusen in-vitro in Gegenwart von TGF- β 1 und IL-6 (oder via IL-21 in vivo), die neben IL-17 unter Anderem (auch beim Menschen) IL-4 (Cosmi, Maggi et al. 2010) und IL-10 (McGeachy, Bak-Jensen et al. 2007, Lee, Awasthi et al. 2012) produzieren. In Gegenwart von IL-23 können im Mausmodell jedoch auch homöostatische Th17-Zellen pathogene Eigenschaften akquirieren (McGeachy, Bak-Jensen et al. 2007, Lee, Awasthi et al. 2012).

Bisheriges Wissen bezüglich der Funktion von Th17 Zellen basiert primär auf Untersuchungen TGF- β 1/IL-6 induzierter nicht pathogener Th17 Zellen aus Tiermodellen. Pathogene mittels IL-1 β /IL-6/IL-23 induzierte humane Th17 Zellen bedürfen bezüglich möglicher spezifischer Transkriptionsfaktoren und Oberflächenmarker, die zu deren Entwicklung führen, trotz der Entwicklung eines besseren Verständnisses in jüngerer Vergangenheit (Capone, Naro et al. 2021), weiterhin nähere Untersuchung. Derartige spezifische pathogene Differenzierungsmerkmale haben das Potential künftige Behandlungsziele für durch pathogene Th17-Zellen vermittelte Erkrankungen zu werden, sollte die nähere Phänotypisierung beim Menschen gelingen (Wu and Wan 2020).

Th17-Zellen sind jedoch wie auch andere Immunzellen nach der initialen Differenzierung weiter „plastisch“ und können somit ihren Phänotyp (Zytokinantwort, Transkriptionsfaktoren-Profil) ändern (Transdifferenzierung). Diese Plastizität tritt z.B. im Rahmen der Inflammationsresolution auf (Gagliani, Amezcua Vesely et al. 2015). Th17-Zellen reduzieren z.B. nach Restimulation unter dem Einfluss von IL-2 und folgend STAT5-Aktivierung die Produktion von IL-17 und erhöhen teilweise IL-10 (Zielinski, Mele et al. 2012). IL-10 produzierende Th17-Zellen

(rTh17-Zellen) können im EAE-Mausmodell die Entwicklung einer entzündlichen Reaktion im ZNS komplett unterdrücken, was die antiinflammatorische Bedeutung dieser Subpopulation veranschaulicht (Esplugues, Huber et al. 2011).

Als weitere Produzenten von IL-17 konnten zudem $\gamma\delta$ T-Zellen (Umemura, Kawabe et al. 2004), group 3 innate lymphoid cells (ILC3) (Takatori, Kanno et al. 2009), CD8⁺ T-Zellen (Shin, Benbernou et al. 1999), natürliche Killerzellen (NK) (Rachitskaya, Hansen et al. 2008) und Mastzellen (de Boer, van der Meer et al. 2010, Moran, Ng et al. 2010) belegt werden.

Die Zytokine der IL-17-Familie (IL-17A und IL-17F) wirken auf angeborene Immunzellen und Epithelzellen und regen diese zur Produktion von G-CSF und IL-8 an, Faktoren, die zur Rekrutierung und Produktion von Neutrophilen notwendig sind (Weaver, Elson et al. 2013). Auf diese Art tragen Th17-Zellen als T-Effektorzellen über die Regulation von Neutrophilen zur angeborenen Immunität bei (Weaver, Elson et al. 2013). Zudem konnte gezeigt werden, dass Th17-Zellen die Funktion von B-Zellen modulieren, indem sie CXCL13 exprimieren, welches B-Zellen zu einer Inflammation hin anlockt (Takagi, Higashi et al. 2008, Crome, Wang et al. 2010).

In Bereichen epithelialer Grenzen zur Außenwelt befinden sich mit Abstand die meisten der beschriebenen Th17 Zellen, insbesondere gastrointestinal. Bei Homöostase zwischen Mikrobiom, Epithel, und angeborenen sowie erworbenen Immunzellen, etabliert sich eine regulatorische Dominanz. Dysregulierte Immunantworten auf das Mikrobiom und Umwelteinflüsse können chronisch inflammatorische Erkrankungen und/oder Th17 abhängige Autoimmunität bedingen (Weaver, Elson et al. 2013). So stimuliert IL-17 epitheliale Zellen zur Produktion von GCSF und Chemokinen, welche Neutrophile Granulozyten zur Chemotaxis bewegt, die Konzentration proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 vor Ort erhöht und zudem die Antikörperproduktion anregt (Majumder and McGeachy 2021), womit IL-17 vor gastrointestinalen Infekten schützt (Jiang, Shao et al. 2017, Linehan, Harrison et al. 2018). In diesem Kontext induziert IL-17 die Pyroptose von infizierten intestinalen Stammzellen und Enterozyten, ebenso wie die Muzinsekretion und die Transzytose von IgA. So scheinen negative gastrointestinale Effekte IL-17 neutralisierender Antikörper (z.B. bei Einsatz i.R. CED) mit der resultierenden Inhibition der Muzinsekretion und IgA Transzytose assoziiert zu sein (Lee, Song et al. 2022).

Diese Beobachtungen stützen die These, dass IL-17 produzierende Th17-Zellen eine feine Balance zwischen notwendiger Abwehr potentieller Infektionen kommensaler Mikroorganismen und gleichzeitiger Aufrechterhaltung der immunologischen Regulation der primären Grenzen

zur Außenwelt aufrechterhalten müssen. Fehlregulierte Th17-Immunantworten können diese Balance zu Gunsten chronisch inflammatorischer Prozesse ins Schwanken bringen.

1.2.2 Die IL-23/IL-17 Achse als zentraler Baustein der SpA Pathogenese - Angeborene und adaptive immunologische Mechanismen

Wie bereits oben beschrieben, kommt IL-23 eine wichtige Rolle bezüglich der Differenzierung pathogener Th17-Zelle zu. Zusätzlich ist es jedoch auch für die Persistenz der Pathogenität notwendig, was vor allem in Tiermodellen bisher gezeigt werden konnte (Cua, Sherlock et al. 2003, Awasthi, Riolf-Blanco et al. 2009, McGeachy, Chen et al. 2009).

Nachdem IL-23 von Oppmann et al. beschrieben und als Produkt aktivierter muriner und humaner Monozyten, Makrophagen und dendritischer Zellen identifiziert wurde (Oppmann, Lesley et al. 2000), konnten vielfache genetische Polymorphismen beim Menschen im Bereich des Th17/IL-23 Signalweges (neben *IL23R* beispielsweise auch *ERAPI1*, *RUNX3*, *IL12B*, *LTBR-TNFRSF1A*, *ANTXR2*, *PTGER4*, *CARD9*, *KIF21B*, *TBKBPI* und weitere) für miteinander verwandt zu sein scheinende Krankheitsbilder wie axSpA, CED und Psoriasis festgehalten werden (Evans, Spencer et al. 2011, Parkes, Cortes et al. 2013). Neben der Assoziation mit HLA-B27 steht die IL-23/IL-17-Achse bei der axialen SpA und der PsA, zusätzlich belegt durch immunologische und klinische Studien, im Vordergrund (Shen, Goodall et al. 2009, Australo-Anglo-American Spondyloarthritis, Reveille et al. 2010, Bowness, Ridley et al. 2011, Poddubnyy, Hermann et al. 2014, Baeten, Sieper et al. 2015).

Unter anderem konnten *CARD9* (ein relevantes Gen in der mittels Pilzen vermittelten Induktion von IL-23 in dendritischen Zellen) und *STAT3* (kodiert das Hauptsignal-Molekül, das durch den IL-23R aktiviert wird) als relevante Gene im Th17-Signalweg in Assoziation mit axialer SpA nachgewiesen werden (Pointon, Harvey et al. 2010, Davidson, Liu et al. 2011, Ma, Liu et al. 2014). Zudem konnte für Patienten mit axSpA im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, erhöhte Inzidenzen IL-23⁺ Zellen im subchondralen Knochenmark, erhöhte IL-17 und IL-23 Serumspiegel sowie erhöhte Werte von IL-23 in Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden (Ciccia, Bombardieri et al. 2009, Wang, Lin et al. 2009, Davidson, Liu et al. 2011, Mei, Pan et al. 2011).

Systemische Überexpression von IL-23 im Tiermodell induziert eine Enthesitis, wie man sie auch bei der SpA vorfindet. Die hierfür verantwortlichen ROR γ t⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁻ T-Zellen produzieren zwar IL-17, welches Osteoklasten aktiviert, können jedoch auch IL-22 auf einen IL-23 Stimulus hin bilden, und somit Osteoproliferation induzieren (Sherlock, Joyce-Shaikh et al. 2012). In der Wirbelsäule von Patienten mit axSpA fand man im Vergleich zu Patienten mit

Osteoarthritis entsprechend höhere Expressionslevel von IL-23 im subchondralen Knochenmark (Appel, Maier et al. 2013).

Für IL-17 konnte gezeigt werden, dass es das Priming von T-Zellen verstärkt und verschiedenste Zelltypen, einschließlich Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen und Epithelzellen zur Produktion proinflammatorischer Mediatoren (wie IL-1, IL-6, TNF- α und Chemokine) veranlasst (Jethwa and Bowness 2016). Man konnte nachweisen, dass IL-17 während der Effektorphase einer inflammatorischen Antwort wirksam ist (Yen, Cheung et al. 2006). Aggarwal et al. konnten zeigen, dass die Aktivierung von T-Zellen in Gegenwart von IL-23 zur Expansion von Th17-Zellen führte und in Folge zu einem Anstieg von IL-17 (Aggarwal, Ghilardi et al. 2003). IL-23 scheint in lokalisierten inflammatorischen, Gewebsreaktionen eine entscheidende Rolle zu spielen, ist jedoch für systemische inflammatorische Reaktionen nicht von Nöten (Hue, Ahern et al. 2006). Veldhoen et al. schlugen schließlich vor, dass IL-23 wahrscheinlich auf zuvor differenzierte Th17-Zellen einwirkt, indem es eher die Amplifikation der Zellzahl und die Stabilisierung des Phänotypen, als die eigentliche Differenzierung zu Th17-Zellen, vorantreibt (Veldhoen, Hocking et al. 2006). Folglich sind Th17-Antworten zum einen charakterisiert durch die Produktion von IL-17 (und anderen proinflammatorischen Zytokinen), und zum anderen durch ihre Abhängigkeit von IL-23 für die Expansion und Aufrechterhaltung ihres Phänotyps (Jethwa and Bowness 2016).

1.3 Interleukin 26 als aktueller Forschungsgegenstand

1.3.1 *IL-26 - Regulation, Eigenschaften und Signalwege*

Ein bisher von mir noch nicht näher beleuchtetes Zytokin, welches ebenfalls von humanen Th17-Zellen produziert wird (Wilson, Boniface et al. 2007) und pathogenes Potential für die Krankheitsbilder des Formenkreises SPA aufweist, ist Interleukin-26.

Das Protein IL-26 ist Mitglied der IL-10 Zytokinfamilie, welche sich aus neun Mitgliedern zusammensetzt: IL-10, den IL-20 Subfamilienmitglieder IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26 und zuletzt die entfernt verwandten Zytokine IL-28A, IL-28B und IL-29 (auch als Typ III Interferone bekannt). Gemeinsame Eigenschaft dieser Zytokine ist, dass sie sowohl von angeborenen, als auch adaptiven Immunzellen gebildet werden und als Effektor- und Regulatorzytokine des Immunsystems fungieren. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei Infektionen, Inflammation, Gewebshomöostase, Autoimmunität und Krebserkrankungen (Ouyang and O'Garra 2019).

Da man erhöhte IL-26 Expressionsraten zunächst v.a. in humanen, chronisch entzündlichen Erkrankungen nachweisen konnte, wies man diesem Interleukin eine inflammatorische Mediatorfunktion zu (Donnelly, Sheikh et al. 2010, Stephen-Victor, Fickenscher et al. 2016). Der Umstand, dass das *IL26* Gen zwar in den meisten Vertebraten konserviert ist, jedoch bei Mäusen und Ratten nicht, verhinderte die genaue Zuordnung der biologischen Funktion dieses Zytokins für geraume Zeit (Collins, Henderson et al. 2012, Larochette, Miot et al. 2019).

Das *IL26* Gen befindet sich auf dem Chromosom 12 (12q15), zwischen den für *IL22* und *IFNG* kodierenden Genen und besteht aus fünf Exons (Goris, Marrosu et al. 2001, Vandenbroeck, Cunningham et al. 2003). Die Gene von *IL26* und *IFNG* sind gleich orientiert und teilen sich eine Enhancer-Sequenz zwischen den beiden Genen (Collins, Henderson et al. 2012, Larochette, Miot et al. 2019). Die molekulare Kontrolle der *IL26*-Transkription ist jedoch kaum beschrieben (Collins, Henderson et al. 2012).

Als Protein setzt sich IL-26 aus 171 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 19,843 DA zusammen und liegt endogen als 36 kDA schweres Homodimer vor, dessen beiden Bausteine aus je sechs, mittels Schleifen und vier Cysteinen verbundenen, alpha-Helices bestehen (Knappe, Hör et al. 2000). Das elektrostatische Potential von IL-26 ist global gesehen positiv, während die Helices E und F amphipathische Eigenschaften aufweisen, was zu den IL-26 spezifischen DNA-Bindungseigenschaften beiträgt (Knappe, Hör et al. 2000, Meller, Di Domizio et al. 2015, Poli, Augusto et al. 2017).

Grundsätzlich wirkt IL-26 über einen Rezeptorkomplex aus IL-10R2 und IL-20R1 (Sheikh, Baurin et al. 2004) und signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 und 3 auf

Neutrophile (Che, Tengvall et al. 2014, Che, Tufvesson et al. 2018), NK (Miot, Beaumont et al. 2015) und epitheliale Zellen (Hör, Pirzer et al. 2004). Limitierend für die Wirkung von IL-26 ist hier die selektive Expression der Rezeptoreinheit IL-20R1 (Nagalakshmi, Murphy et al. 2004).

Auch ein Rezeptor-unabhängiger Weg existiert. Man konnte zeigen, dass IL-26 eine Funktion als DNA-Shuttle besitzt und ohne Vermittlung durch einen spezifischen Rezeptor myeloische Zellen des angeborenen Immunsystems mittels eines STING-abhängigen Mechanismus aktivieren kann (Meller, Di Domizio et al. 2015, Poli, Augusto et al. 2017). Durch seine Funktion als Transporter für extrazelluläre DNA und als antimikrobielles Protein (AMP) kann IL-26 als Kinocidin aufgefasst werden (Meller, Di Domizio et al. 2015, Poli, Augusto et al. 2017). Kinocidine sind Proteine, die im interzellulären Dialog relevant sind und bakterizide Eigenschaften besitzen (Yeaman, Cheng et al. 2004, Yeaman and Yount 2007, Larochette, Miot et al. 2019).

Aufgrund seiner amphipathischen biochemischen Eigenschaften ist IL-26 selbst dazu in der Lage Gram positive und negative extrazelluläre Bakterien durch die Formung von Poren in der Zellmembran zu töten oder in ihrem Wachstum zu behindern, vergleichbar zum angeborenen Komplementsystem (Meller, Di Domizio et al. 2015). Diese antimikrobielle Wirkung konnte auch in einem in-vivo Sepsis-Modell belegt werden (Meller, Di Domizio et al. 2015). Indirekt antimikrobiell wirksam wird IL-26 durch die Induktion von Typ I & II Interferonen in peripheren dendritischen Zellen, Monozyten und NK-Zellen (Meller, Di Domizio et al. 2015, Miot, Beaumont et al. 2015, Poli, Augusto et al. 2017, Larochette, Miot et al. 2019). IL-26 zeigt somit Eigenschaften die an der Schnittstelle angeborener und erworbener immunologischer Eigenschaften einzuordnen sind.

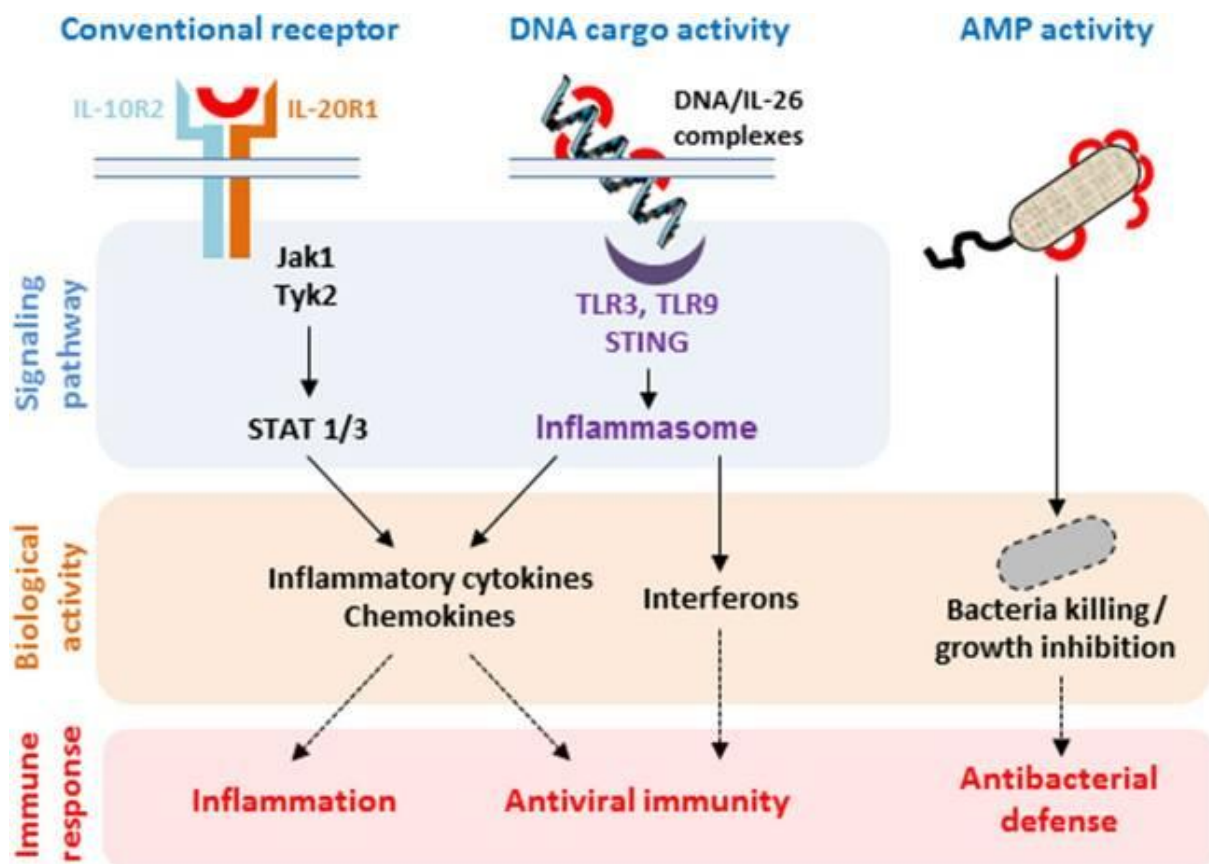


Abbildung 1.6: Biologische Eigenschaften von IL-26 (aus Larochette, Miot et al. 2019)

Die Bindung von IL-26 an den konventionellen Rezeptor, der sich aus den Rezeptorketten IL-20R1 und IL-10R2 zusammensetzt, induziert die Produktion proinflammatorischer Zytokine. IL-26 ist ebenfalls in der Lage als Transportmolekül extrazellulärer DNA-Zugang nach intrazellulär zu verschaffen und so wirksam zu werden. Beide Signalwege induzieren die Produktion proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Typ I und II Interferone durch ausgewählte immunologische und nicht-immunologische Zellen. IL-26 fungiert zudem durch seine Fähigkeit zur Porenbildung in bakteriellen Membranen als antimikrobielles Protein (AMP) (Larochette, Miot et al. 2019)

1.3.2 Zelluläre Produzenten von IL-26

IL-26 wird sowohl von Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems, als auch von Nicht-Immunzellen produziert (Larochette, Miot et al. 2019):

Produzenten im Bereich des adaptiven Immunsystems

Diverse Studien konnten seit der Entdeckung von IL-26 in HSV transformierten T-Zellen (Knappe, Hör et al. 2000) zeigen, dass aktivierte Th1- und Gedächtnis-Th17-CD4⁺-T-Zellen (Meller, Di Domizio et al. 2015), die Hauptproduzenten von IL-26 darstellen.

So wird humanes IL-26 von infiltrierenden proinflammatorischen IL-17 produzierenden T-Zellen gebildet, welche in chronisch entzündlich verändertem Gewebe von Patienten mit CED (Dambacher, Beigel et al. 2009), Gewebe aus Gelenken (Corvaisier, Delneste et al. 2012), Haut (Pène, Chevalier et al. 2008, Zhou, Hou et al. 2015) und Leber (Miot, Beaumont et al. 2015)

gefunden werden können. Als beschriebene Induktoren von IL-26 in humanen Th17-Zellen gelten u.a. IL-23 und IL-1 β (Wilson, Boniface et al. 2007, Volpe, Touzot et al. 2009).

Neuere Untersuchungen an Psoriasispatienten legen nahe, dass im Blut zirkulierende IL-26+ T-Zellen eine Zwischenstufe hin zu ausdifferenzierten Th17-Zellen darstellen könnten (Fries, Saidoune et al. 2023). Fries et al. konnten zeigen, dass frühe IL-26+ Th17-Zellen das Epithel psoriatisch entzündlich veränderter Haut infiltrieren, dort die Expression von TGF- β 1 in basalen Keratinozyten induzieren und so die Th17-Zelldifferenzierung von IL-26+ T-Zellen hin zu reinen IL-17A Produzenten treiben. Gemäß ihrer Hypothese findet eine rasche Differenzierung von naiven T-Zellen, hin zu einer Th17-Zellzwischenstufe, welche IL-26 exprimiert, in der Gegenwart Th17-polarisierender Zytokine statt. Eine weitere hierauf folgende Exposition gegenüber TGF- β 1 bedingt hieraufhin die Ausreifung der frühen IL-26+-Th17-Zellzwischenstufe, hin zu reinen IL-17A+ Th17-Zellen. Die doppelte, für IL-26 und IL-17A positive Th17-Zellzwischenstufe stellt in ihren Augen eine Übergangsform der Ausdifferenzierung dar. Die spezifischen Transkriptionsfaktoren für diese Zwischenform sind jedoch unklar. Sie beschreiben zudem, dass die im Blut zirkulierenden doppelt positiven IL-26+ Th17-Zwischenstufen IL-1R exprimieren. Somit sollen Th17-Zellen ihrer Meinung nach durch die Freisetzung von IL-26 dazu in der Lage sein, ihre eigene Ausdifferenzierung, nach der Infiltration in Epithelien und die dortige Induktion von TGF- β 1, hin zu reifen IL-17A produzierenden Th17-Zellen zu steuern. Sie schlagen vor, dass diese parakrine Feedbackschleife zwischen Epithelzellen und Th17-Zellen die Funktion erfüllt, IL-17A Expression auf Barrieregewebsarten zu beschränken, um die unkontrollierte systemische Produktion von pathologischen Th17-Zytokinen zu vermeiden.

Naive CD4+ T-Zellen exprimieren somit, wenn überhaupt (Meller, Di Domizio et al. 2015) IL-26 auf einem deutlich reduzierterem Niveau als Gedächtnis-CD4+-T-Zellen (Wolk, Kunz et al. 2002). So konnte man zeigen, dass aktivierte Gedächtnis-CD146+CD45RO+ CD4+-T-Zellen, im Vergleich zu Nicht-Gedächtnis-CD146+ CD45RO-CD4+-T-Zellen in ausgeprägtem Maße *IL26*-mRNA bilden (Dagur, Biancotto et al. 2011). In einem pulmonalen GVHD-Modell produzierten zudem vorwiegend CD26+CD4+-T-Zellen, IL-26 (Ohnuma, Hatano et al. 2015). Hingegen weisen CD4+ T-Zellen, welche man hin zu einem regulatorischen Phänotyp polarisiert, ebenso wie Th2-Zellen, nur sehr geringe bis keine Fähigkeit zur Produktion von IL-26 auf (Wolk, Kunz et al. 2002, Meller, Di Domizio et al. 2015). Th1-Zellen scheinen in moderatem Maße dazu in der Lage zu sein IL-26 zu bilden (Nagalakshmi, Murphy et al. 2004, Wilson, Boniface et al. 2007, Pène, Chevalier et al. 2008)

Für CD8⁺-T-Zellen konnte man ebenfalls bereits IL-26 Expression, im Kontext antibakterieller (Che, Tengvall et al. 2014) und anti-parasitärer (Anuradha, George et al. 2014) spezifischer zellulärer Abwehr nachweisen (Anuradha, George et al. 2014, Che, Tengvall et al. 2014).

Somit konnte sich IL-26 bisher vor allem als Marker für hochdifferenzierte Th17-Zellen durchsetzen (Larochette, Miot et al. 2019) und IL-26 scheint für Ausdifferenzierung in diesem Kontext von besonderer Bedeutung.

Produzenten im Bereich des angeborenen Immunsystems

Aber auch Zellen des angeborenen Immunsystems wie *MAIT*-Zellen, NK-Zellen, ILC3 und Makrophagen sind dazu in der Lage IL-26 zu produzieren. (Larochette, Miot et al. 2019).

Man konnte kürzlich nachweisen, dass humane, stimulierte *MAIT*-Zellen (*Mucosal-associated invariant T-cells*) dazu in der Lage sind IL-26 zu exprimieren und die Höhe der IL-26 Expression zwischen IL-17⁺ und IL-17⁻ *MAIT*-Zellen in Folge einer Stimulation vergleichbar scheint (Garner, Amini et al. 2023). Bei diesen Zellen handelt es sich um angeborene T-Zell-ähnliche Zellen, mit einem invarianten T-Zellrezeptor, welcher dazu in der Lage ist, ohne klonale Selektion (wie bei der Expansion humaner T-Zellen nach initialem Antigenkontakt und folgender T-Zellrezeptorspezifizierung) bestimmte Liganden von Geburt an binden zu können (Hinks and Zhang 2020). Die Arbeitsgruppe um Garner et al. geht davon aus, dass es sich bei IL-17⁺ *MAIT*-Zellen um einen funktionellen Zustand handelt, der von allen *MAIT*-Zellen, in Abhängigkeit der zugrundeliegenden Stimulationskondition eingenommen werden kann. Ihre Daten legen nahe, dass ein erhöhter Prozentsatz an *MAIT*-Zellen die Fähigkeit zur Bildung von IL-17 mit der Zeit erlangen kann, was wohl auf induziertes Remodelling des Chromatins zurückzuführen ist. IL-17 produzierende *MAIT*-Zellen zeigen Stimulus spezifische Änderungen ihrer Transkriptionsantwort und stellen keinen a priori „*MAIT17*“ Subpopulation dar, sondern sind bezüglich ihrer Fähigkeit IL-17 zu exprimieren von T-Zellrezeptorstimulationsbedingungen abhängig.

IL-22 exprimierende Natürliche Killerzellen (auch NK22 genannt), welche im MALT auffindbar sind und eine Überwachungsfunktion der Schleimhautbarriere besitzen (Dudakov, Hanash et al. 2015), exprimieren grundlegend IL-26-mRNA (Cella, Fuchs et al. 2009, Hughes, Becknell et al. 2009, Cols, Rahman et al. 2016).

In Patienten mit *CVID* (einer Antikörperdefizienzerkrankung) konnte man zeigen, dass angeborene ILC3-Zellen unter inflammatorischen Umgebungsbedingungen im Blut eine erhöhte Expression des IL-23R und von IL-26 zeigen, was das inflammatorische Potential dieser Zellen veranschaulicht (Cols, Rahman et al. 2016).

Für die Produktion von IL-26 durch Monozyten gibt es unterschiedliche Aussagen. Während manche Studien die fehlende Expression von IL-26 durch Monozyten nachwiesen (Wolk, Kunz et al. 2002, Wolk, Witte et al. 2008), sprechen andere Forschungsgruppen davon, dass Monozyten konstitutionelle IL-26 mRNA Bildner seien (Guerra-Laso, Raposo-García et al. 2015). Alveolare Makrophagen der Lunge von gesunden Individuen bilden IL-26, nachdem man sie mit Endotoxin versetzt (Che, Tengvall et al. 2014, Larochette, Miot et al. 2019).

Produzenten in Bereichen anderer Zellen

Zu den gewebsständigen nicht immunologischen Produzenten von IL-26 gehören unter anderem CD68+ makrophagenähnliche und Synoviolin+ fibroblastenähnliche Synoviozyten, sowie synoviale Myofibroblasten (Corvaisier, Delneste et al. 2012, Heftdal, Andersen et al. 2017), Epithelzellen (Darm, Bronchialsystem) und vaskuläre glatte Muskelzellen.

Bei Patienten mit RA wies man die Expression von IL-26 in Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten, sowie in CD68+ Makrophagen-ähnliche Synoviozyten in entzündeten Gelenken nach (Corvaisier, Delneste et al. 2012). Zudem konnte man für SpA Patienten in α SMA+ Myofibroblasten IL-26 Expression aufzeigen (Heftdal, Andersen et al. 2017).

Primäre, bronchiale Epithelzellen können unter Einfluss eines synthetischen TLR3-Agonisten zusammen mit IL-17A, IL-26 produzieren. In mittels Bronchialbiopsien gewonnenen Epithelzellen gesunder Probanden konnte man ebenfalls IL-26 nachweisen (Che, Kaarteenaho et al. 2017). Auch innerhalb des Lungengewebes konnte man erhöhte IL-26 Konzentrationen nachweisen und die Produktion unter Anderem alveolären Makrophagen, T-Helfer-Zellen und zytotoxischen T-Zellen zuweisen (Che, Tengvall et al. 2014, Konradsen, Nordlund et al. 2016).

In-vitro exprimieren auch primäre, vaskuläre SMCs vermehrt IL-26 auf einen IL-1 β und TNF- α Stimulus hin, und können zudem als IL-26 Produzenten in renalen Arterien von Patienten mit ANCA-assoziiierter Vaskulitis gefunden werden (Poli, Augusto et al. 2017, Larochette, Miot et al. 2019).

1.3.3 Zelluläre Ziele von IL-26

Als Mediator zwischen angeborenen und adaptiven immunologischen Prozessen wirkt IL-26 zudem sowohl auf beide Bestandteile des Immunsystems, als auch auf weitere Zellen (Larochette, Miot et al. 2019):

Ziele im Bereich des adaptiven Immunsystems

Mittels IL-26 stimulierte CD4+-T-Zellen produzieren IL-17 und IL-23 (Kaabachi, Bouali et al. 2017). Durch eine Rückkopplungsschleife könnte IL-26 somit über die fortlaufende Freisetzung

von proinflammatorischen Zytokinen zum Erhalt entzündlicher Gedächtnis-T-Zellen im Gewebe beitragen (Larochette, Miot et al. 2019).

Hummelshoj et al. konnten zeigen, dass IL-26 die Produktion von IgA und IgG durch B-Zellen, die durch einen anti-CD40-AK aktiviert wurden, inhibiert, ebenso wie die Produktion von IgG4, welches durch IL-4 & anti-CD40 AK induziert wurde (Hummelshoj, Ryder et al. 2006).

Zudem, wie bereits unter 1.3.2 dargestellt, scheint IL-26 eine zentrale Rolle in der Ausdifferenzierung von IL-26⁺ Th17-Zellzwischenstufen durch die Induktion von TGF- β 1 in humanen Keratinozyten bei Psoriasis zu spielen (Fries, Saidoune et al. 2023)

Ziele im Bereich des angeborenes Immunsystem

IL-26, als ebenfalls durch pathologische Th17-Zellen produziertes proinflammatorisches Zytokin, ist bei fehlgeleiteter gastrointestinaler Immunantwort bei Patienten mit Morbus Crohn dazu in der Lage, die weitere Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-8 und TNF α durch intestinale Epithelzellen zu induzieren und chronische Entzündungsprozesse somit weiter zu eskalieren (Dambacher, Beigel et al. 2009). Die Kapazität von IL-26, epitheliale Zellen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine anzuregen, wurde zudem durch Studien an Keratinozyten der HaCat-Zelllinie und (in geringerem Maße) auch an primären humanen Keratinozyten gezeigt (Hör, Pirzer et al. 2004, Larochette, Miot et al. 2019). Dies ist im Kontext der biologischen Rolle von IL-26 in T-Zell assoziierten chronisch entzündlichen Hauterkrankungen, wie der Psoriasis, von Bedeutung. So trägt IL-26 unter anderem zur erhöhten Vaskularisation und Immunzellinfiltration in humanen *IL-26* transgenen Mäusen bei, erhöht die in der Haut messbaren Level von (durch Keratinozyten produzierten) Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (auch in humanen Psoriasis Patienten) und wirkt zudem direkt proliferativ auf vaskuläre Endothelzellen und regt diese zur Tubus-Bildung an (Itoh, Hatano et al. 2019).

Humane Monozyten produzieren nach Stimulation mittels IL-26 u.a. die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α , welche wesentlich zur Differenzierung von Th17-Zellen beitragen (Corvaisier, Delneste et al. 2012). In Übereinstimmung mit der Tatsache, dass IL-1 β eine zentrale Rolle in der Generierung von humanen Th17-Zellen zu nehmen scheint (Zielinski, Mele et al. 2012), induzieren mittels IL-26 behandelte Monozyten die Differenzierung bisher nicht festgelegter Gedächtnis CD4⁺ T-Zellen hin zu Th17-Zellen (Corvaisier, Delneste et al. 2012).

Che et al. konnten zeigen, dass IL-26 eine entscheidende Rolle bei der antibakteriellen Host-Abwehr in der menschlichen Lunge spielt (Che, Tengvall et al. 2014, Che, Kaarteenaho et al. 2017, Che, Tufvesson et al. 2018). Sie wiesen nach, dass IL-26 in geringem Maße von T-Helfer und zytotoxischen T-Zellen, aber in großem Maße von alveolären Makrophagen in der Lunge

gebildet wird. Außerdem gelang Ihnen der Nachweis funktioneller Rezeptoren von IL-26 auf Neutrophilen. Derartige Makrophagen haben somit die Möglichkeit durch Freisetzung von IL-26 verstärkt auf neutrophile Granulozyten chemotaktisch einwirken zu können. So wirkt durch bakteriellen Kontakt freigesetztes fMLP (Chemokin und Makrophagenaktivator) und das gleichzeitig freigesetzte archetypische Chemokin IL-8 anlockend für IL-26 produzierende Makrophagen, welche wiederum durch die Freisetzung von IL-26 die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten zum Ort bakterieller Infektion hin potenzieren. Außerdem gelang es nach intranasaler Instillation von rekombinantem humanen IL-26 und lokaler Stimulation mit LPS die Rekrutierung angeborener mononukleärer Zellen in den Bronchoalveolarraum zu simulieren.

Zusätzlich kann IL-26 zur Aktivierung von NK-Zellen führen, die wiederum IL-1 β and TNF- α bilden. Gleichzeitig treibt IL-26 in diesen Zellen die Bildung von Typ I (IFN- β) und II (IFN- γ) Interferonen voran (Miot, Beaumont et al. 2015), welche zentrale Stellung in der angeborenen und adaptiven Antwort auf virale Infektionen einnehmen (Larochette, Miot et al. 2019).

Plasmazytoide dendritische Zellen stellen eine zentrale Rolle in der antiviralen Abwehr da, dank Ihrer Fähigkeit zur Produktion von IFN- α (Fitzgerald-Bocarsly, Dai et al. 2008). Sobald IL-26 mit DNA in Kontakt kommt, ist dieses dazu in der Lage die Produktion von IFN- α durch humane Plasmazytoide dendritische Zellen zu induzieren (Meller, Di Domizio et al. 2015).

Ziele in Bereichen anderer Zellen und (immunologischer) Krankheitsbilder

Osteoblasten sowie Osteoklasten sprechen auf IL-26 an (Larochette, Miot et al. 2019). IL-26 behindert die osteolytische Funktion von reifen Osteoklasten (Peng, Wang et al. 2016) und erhöht für humane Osteoblasten die Mineralisierungsrate (Heftdal, Andersen et al. 2017).

Der Übersichtlichkeit halber sind in der folgenden Tabelle 1.1 weitere zentrale Zielzellen von IL-26 im Kontext ihrer zugehörigen (immunologischen) Krankheitsbilder und Wirkmechanismen beispielshalber zusammenfassend dargestellt (Gowhari Shabgah, Abdelbasset et al. 2022):

Krankheitsbild	IL-26 Quelle	Ziel-Zelle	Effekt	Bedeutung im Krankheitsbild	Referenz
Atopische Dermatitis	Th17	NHEK Zelllinie	Induziert IL-1 β , IL-8 und andere proinflammatorische Zytokine in vitro. Erhöht die Th2- und Th17-Zellantwort in vivo.	Erhöht Krankheitsmanifestation	(Kamijo, Miyagaki et al. 2020)
Multiple Sklerose	Th17	Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke	Erhöht die Anzahl der Tight junction Verbindungen	Reduziert Krankheitsschwere	(Muls, Nasr et al. 2017, Broux, Zandee et al. 2020)
Rheumatoide Arthritis	Synoviozyten	Monozyten und myeloische Zellen, Osteoklasten	Treibt die M1 Makrophagen Differenzierung voran. Inhibiert den Knochenabbau	Ambivalente Rolle	(Peng, Wang et al. 2016, Lin, Wang et al. 2020)
CED	Th17	Myofibroblasten	Produktion von IL-6 und IL-8	Beitrag zur Pathogenese	(Dambacher, Beigel et al. 2009)
Psoriasis	Th17	Neutrophile. TCR β + T-Zellen	Induktion von CXCL1 und CXCL12. Induktion der Angiogenese	Beitrag zur Inflammation der Haut und Pathogenese	(Hatano, Itoh et al. 2019, Itoh, Hatano et al. 2019)
Antikörper assoziierte Vaskulitis	Vaskuläre glatte Muskelzellen	Monozyten	Formation eines Komplexes mit DNA und Aktivierung von TLR9 und Inflammation	Weiterer Krankheitsverlauf	(Poli, Augusto et al. 2017)
Hepatitis C	CD3+ T-Zellen	NK-Zellen	Erhöhte TRAIL Expression. Erhöhte Produktion von IFN- β and IFN- γ	Induktion der Aktivität von NK-Zellen	(Miot, Beaumont et al. 2015)
Tuberkulose	Th1, Th17	Mycobakterium leprae, Makrophagen	Osmotische Bakterienlyse. Induktion der Autophagie in Makrophagen und Inhibition der Blockade der phagolysosomalen Fusion	Inhibiert Disseminierung der Erkrankung	(Dang, Teles et al. 2019)
Graft vs. Host Disease	CD26+ T-Zellen	Fibroblasten	Produktion von Kollagen	Trägt zur obliterativen Bronchiolitis und pulmonalen Fibrose bei	(Ohnuma, Hatano et al. 2015)
COPD	Alveolare Makrophagen, Fibroblasten der Lunge	Neutrophile	Infiltration der Neutrophilen	Induziert verlängerte Inflammation	(Che, Tufvesson et al. 2018, Savchenko and Kaidashev 2018, Che, Sun et al. 2019)

Tabelle 1.1 Definierte Rollen von IL-26 unter verschiedenen Bedingungen (übersetzt und angepasst aus Gowhari Shabgah, Abdelbasset et al. 2022)

1.3.4 IL-26 im Fokus der Inflammation

Larochette et al. postulieren die katalytische Funktion von IL-26 für chronische Inflammation, als positive Feedbackschleife wie folgt (s. Abbildung 1.7):

Aufgrund von exzessivem Zelltod, bedingt durch chronische Inflammation, kommt es zur Akkumulation von extrazellulärer DNA. Diese bildet mit IL-26 Komplexe, welche dazu in der Lage sind, Zellen des angeborene Immunsystems wie Myelozyten zu aktivieren. Diese wiederum generieren Faktoren wie IL-1 β und IL-23, die zur Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen hin zu IL-26 produzierenden Th17-Zellen beitragen. IL-26, das von aktivierten Th17-Zellen und NK22-Zellen produziert wird, induziert wiederum die Produktion von inflammatorischen Mediatoren wie IL-1 β und TNF- α durch Epithelzellen. Das so freigesetzte IL-1 β und TNF- α begünstigt erneut die Bildung neuer inflammatorischer Th17-Zellen und treibt die chronische Gewebszerstörung durch den entzündlichen Prozess voran. Dies führt zu einer nicht nachlassenden Entzündungsreaktion, selbst nach Eliminierung des initial auslösenden Signals (Meller, Di Domizio et al. 2015, Poli, Augusto et al. 2017, Larochette, Miot et al. 2019).

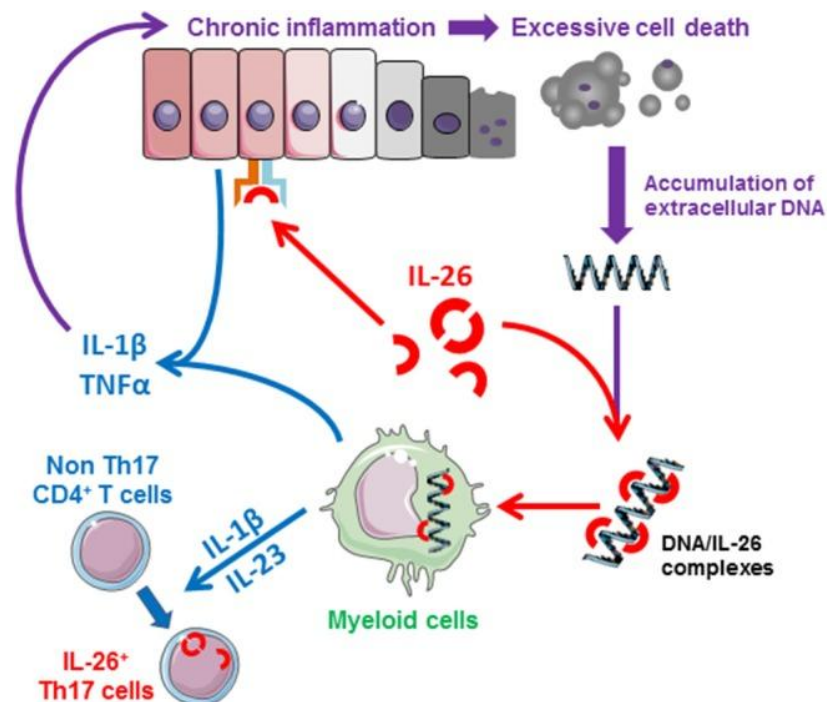


Abbildung 1.7: Schematische Repräsentation der proinflammatorischen Eigenschaften von IL-26 (aus Larochette, Miot et al. 2019)

1.3.5 Mögliche Rolle von IL-26 in der Pathogenese der SpA

Wie bereits oben beschrieben stellte sich die IL-23/IL-17-Achse in den letzten Jahren durch genetische Assoziationsstudien (Cortes, Hadler et al. 2013, Parkes, Cortes et al. 2013), immunologische und klinische Studien (Shen, Goodall et al. 2009, Australo-Anglo-American Spondyloarthritis, Reveille et al. 2010, Bowness, Ridley et al. 2011, Poddubnyy, Hermann et al. 2014, Baeten, Sieper et al. 2015) als wichtiger Baustein in der Pathogenese der SpA in den Vordergrund. In mehreren Studien wurde die Produktion von IL-26 durch Th17-Zellen mit pathogenem Potential bestätigt (Gowhari Shabgah, Abdelbasset et al. 2022). Nachdem bereits in betroffenen Gelenken von Patienten mit RA eine verstärkte Bildung von IL-26 nachgewiesen wurde, zeigten sich auch in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit SpA IL-26-produzierende Zellen, die als Myofibroblasten identifiziert wurden. In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, dass IL-26 in-vitro in Osteoblasten die Bildung neuer Knochenmatrix anregt (Heftdal, Andersen et al. 2017). Hieraus lässt sich ableiten, dass IL-26 ein bisher nicht bedachter Faktor bei Patienten mit SpA im Rahmen der osteoanabolen Vorgängen auf dem Weg zur Ankylose sein könnte. Hiermit ergeben sich möglicherweise neue therapeutische Ansätze zur Verhinderung der Ankylose. Die vorab genannte Studie an 15 Patienten mit SpA unterschied jedoch nicht genauer zwischen den Subtypen der Erkrankung, so dass nicht geklärt ist, welche Zellen nun bei der axialen SpA oder der PsA relevante Produzenten von IL-26 sind oder wie diese zur Produktion von IL-26 angeregt werden. Bei der axSpA besteht aufgrund der limitierten Therapieoptionen (NSAR, TNF-Blocker, anti-IL-17 und JAKi) inklusive Wirkungsverlust im Verlauf, sowie dem jungen Manifestationsalter und den durch die Krankheit bedingten Einschränkungen im Berufs- und Privatleben ein hoher Bedarf an neuen Therapieoptionen. Auch wirken alle bisher zugelassenen Medikamente eher indirekt über die Verhinderung von Inflammation auf die Knochenneubildung.

Unsere Hypothese ist, dass IL-26 von sogenannten „pathogenen“ Th17-Zellen, möglicherweise auch anderen Immunzellen, sezerniert wird und bei der SpA Einfluss auf die lokalen Umbauprozesse im Gelenk, vornehmlich die Knochenneubildung, nimmt. Daher erhoffen wir uns, ein neues Ziel für eine gerichtete Therapie in SpA-Patienten zu evaluieren, womit langfristig bei erhaltenen protektiven Th17-Zellen (Pilzinfektionen, extrazelluläre Bakterien) die Verknöcherung der Wirbelsäule und peripherer Gelenke verhindert werden kann.

1.4 Ziele unserer Studie im Rahmen des Forschungsthemas

1.4.1 Primäre und sekundäre Projektziele

Folgende Ziele und Fragestellungen sollten beantwortet werden:

- 1) Bestimmung von IL-26 in Blut- und Synovialgewebeproben von Patienten mit axSpA, PsA und RA im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden
 - Sind bei Patienten mit axSpA, PsA und RA größere Mengen an IL-26 vorhanden?
 - Wo sind die Konzentrationen von IL-26 am höchsten?
- 2) Identifizierung und Charakterisierung von IL-26 produzierenden Zellen bei Patienten mit axSpA, PsA und RA
 - Welche Zellen im peripheren Blut und in der Synovia von Patienten mit axSpA, PsA und RA produzieren primär IL-26?
 - Kann man diese Zellen durch Oberflächenmoleküle differenzieren?
 - Welche Faktoren induzieren die Produktion von IL-26 in diesen Zellen?

1.4.2 Studienendpunkte

Primärer Endpunkt: Menge an Interleukin 26 im Blut von Patienten vs. Kontrollen gemessen mittels ELISA.

Sekundäre Endpunkte:

- Identifizierung und prozentuale Quantifizierung der IL-26 produzierenden Zellen im Blut von Patienten vs. Kontrollen mittels Durchflusszytometrie
- Identifizierung & Quantifizierung der IL-26 produzierenden Zellen in Synovialgewebe von Patienten vs. Kontrollen mittels Immunhistochemie und -fluoreszenz.

Messzeitpunkt war jeweils der Einschlusszeitpunkt des Patienten/der Kontrolle.

2 Rahmenbedingungen der Studie

2.1 Studiencharakteristika

Teile dieser Doktorarbeit wurden vorab bereits in abgewandelter Form einem Peer-Review Prozess unterzogen und im Rahmen einer wissenschaftlichen Publikation mit geteilter Erst-Autorenschaft am 10.05.2024 im Fachjournal *Frontiers in Immunology* veröffentlicht (Hammitzsch, Ossadnik et al. 2024).

Zudem erfolgte eine Präsentation von Zwischenergebnissen unserer Studie vorab im Rahmen eines Poster- und Livevortrages im Rahmen des 48. Deutschen Rheumatologiekongress 2020 der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh) (Hammitzsch, Ossadnik et al. 2020), sowie ein weiterer Poster- und Livevortrag im Rahmen der Teilnahme am 129. DGIM Kongress 2023 innerhalb des Peter-Scriba-Promotionsstipendiums 2020 und des Panels „Best of DGIM - Spitzenforschung in der Inneren Medizin (Promotionsstipendien)“ (Hammitzsch, Ossadnik et al. 2023) (vgl. auch 7.12).

Somit ist es möglich, dass Teile dieser Dissertationsschrift, sowie Abbildungen, Tabellen und sonstige Angaben sich mit den erwähnten Publikationen inhaltlich decken bzw. hier in abgewandelter Form präsentiert werden. Etwaige Überschneidungen mit bereits publizierten Inhalten sind somit im Rahmen dieser Dissertationsschrift als (indirekte) Zitate aufzufassen und werden im Folgenden (der Übersicht halber) nicht erneut bzw. individuell an den entsprechenden Stellen gekennzeichnet.

Die direkt folgenden Angaben von 2.1.1 bis 2.3.4 beziehen sich auf das Studienprotokoll, welches am 03.05.2018 im Deutschen Register Klinischer Studien (DRKS), unter der DRKS ID 00014672 registriert wurde (Hammitzsch 2018). Selbiges wurde stellenweise im Rahmen meiner Ausführungen und eigenen geleisteten Arbeit wahrheitsgemäß ergänzt bzw. an diese Dissertationsschrift in ihrem Umfang angepasst und somit ebenfalls (direkt und indirekt) zitiert.

2.1.1 Studiendesign

Bei der durchgeführten Studie handelt es sich um eine kontrollierte, nicht randomisierte, prospektive translationale Studie, ohne Verblindung.

Zweck der Studie ist die Erforschung der Rolle von IL-26 in der Pathophysiologie der Spondylarthritiden, um hierdurch neue therapeutische Optionen zu generieren.

Der Studieneinschluss erfolgte monozentrisch, unter Berücksichtigung der beteiligten peripheren Rheumatologischen Praxen, sowie des Klinikums Oberamergau und des Botnar Research Centre der Universität Oxford (UK). Weitere Details diesbezüglich, finden Sie im Anhang unter Punkt 7.10.

2.1.2 Einschlusskriterien für Patienten

Für teilnehmende Patienten galten die folgenden Einschlusskriterien:

- Diagnose einer Ankylosierenden Spondylitis nach den modifizierten New York Kriterien (Kiltz 2019) oder Diagnose einer Psoriasis Arthritis nach den CASPAR Kriterien (Taylor, Gladman et al. 2006) oder Diagnose einer rheumatoiden Arthritis nach den EULAR/ACR-Kriterien (Kay and Upchurch 2012)
- Alter > 18 Jahre
- Nach Möglichkeit zum Zeitpunkt des Studieneinschluss, aktive Erkrankung
- Keine Biologikatherapie (z.B. anti-TNF α oder anti-CD20) oder Kortikosteroide
- Zum Einschlusszeitpunkt stabiles Therapieregime

Es sei hier vollständigkeithalber erwähnt, dass Immunsuppressiva, die der Substanzklasse der DMARDs angehören als Basistherapeutika erlaubt waren. Ebenso wurden Substanzen der Klasse NSAR und selektive COX-2 Hemmer, die u.U. ebenfalls begrenzt immunsuppressive Wirkung zeigen können, ebenfalls toleriert.

Es wurden nach Bedarf eingenommene inhalative Kortikosteroide, z.B. im Rahmen einer Asthma bronchiale Basistherapie, aufgrund ihrer hohen präsystemischen Elimination, toleriert.

2.1.3 Ausschlusskriterien für Patienten

Für potentiell teilnehmende Patienten galten zudem die folgenden Ausschlusskriterien:

- Nicht Erfüllen der Einschlusskriterien
- Aktive Infektion oder Krebserkrankung (Interferenz mit Inflammationsmarkern)

- Andere Autoimmunerkrankungen (inklusive Morbus Hashimoto)
- Operation weniger als 2 Wochen vor dem Einschluss in die Studie
- Schwangerschaft
- fehlende Einwilligungsfähigkeit; fehlende Einwilligung

Ausschlusskriterien, die fälschlicherweise erst nach Einschluss des jeweiligen Patienten in die Studie festgestellt werden konnten (z.B. durch zunächst fehlende Angabe einer Autoimmunerkrankung, bei initialem Einschluss), führten folglich zum nachträglichen Ausschluss aus dem untersuchten Studienkollektiv. Diese pseudonymisierten Patientendaten wurden dementsprechend nicht in den nachfolgenden Untersuchungen inkludiert und alle Materialien besagter Probanden vernichtet.

2.1.4 Kriterien für gesunde Kontrollen

Die Gruppe der gesunden Kontrollen beinhaltet Patienten, die sich aufgrund einer Sportverletzung, eines Unfalls oder einer Arthrose einer medizinisch indizierten Gelenkspiegelung oder –operation unterziehen mussten oder sich nach sorgfältiger Aufklärung einer freiwilligen, einmaligen Blutabnahme unterzogen und sich ansonsten als gesunde Kontrollpersonen nicht in ärztlicher Behandlung bei einem Rheumatologen befanden. Die Gruppe der gesunden Kontrollen wurde bezüglich der Alter- und Geschlechterverteilung an die Gruppe der axSpA-Patienten weitestgehend angeglichen, um diese beiden Störgrößen in weiteren Untersuchungen zu minimieren.

Einschlusskriterien:

- Keine rheumatologische Grunderkrankung
- Medizinische Indikation zur Gelenkspiegelung oder -operation (bei Entnahme von Synovialproben)
- Alter >18 Jahre
- Keine Kortikosteroide

Ausschlusskriterien:

- Nicht Erfüllen der Einschlusskriterien
- Aktive Infektion oder Krebserkrankung (Interferenz mit Inflammationsmarkern)
- Vorhandensein anderer Autoimmunerkrankungen

- Operation weniger als 2 Wochen vor dem Einschluss in die Studie
- Schwangerschaft
- Fehlende Einwilligungsfähigkeit; fehlende Einwilligung

2.1.5 Aufteilung der Studienteilnehmer in Kohorten

Im Rahmen der Studie sollten folgende Krankheitsentitäten rekrutiert werden: Jeweils 30 Patienten mit Ankylosierender Spondylitis (axSpA), Psoriasisarthritis (PsA), rheumatoide Arthritis (RA), sowie 30 gesunde Kontrollen (HC) zur Analyse von peripherem Blut (Serum, Plasma, Zellen) und nach Möglichkeit auch Synovialflüssigkeit. Zudem sollten jeweils zusätzlich von fünf Patienten mit axSpA, PsA und RA, sowie von fünf gesunden Kontrollen zur immunhistologischen Aufarbeitung, Synoviaprobe gewonnen werden.

2.1.6 Eingeschlossene Patienten und Abweichungen vom Studienprotokoll

Im Rahmen der Patientenrekrutierung konnten zum Zeitpunkt des Studienabschlusses insgesamt 120 Patienten rekrutiert werden.

Hiervon entfielen 37 Patienten in die Kohorte der HCs (35 Blutproben/ 5 Synoviaprobe), 38 in die Gruppe der axSpA-Patienten (29 Blutproben/ 9 Synoviaprobe), 23 in die PsA-Kohorte (20 Blutproben/ 3 Synoviaprobe) und 22 in die Gruppe der Patienten mit RA (15 Blutproben/ 7 Synoviaprobe).

Insgesamt mussten drei Blutproben von axSpA-Patienten, zwei von Patienten mit PsA und eine HC-Probe nachträglich ausgeschlossen werden. Von den Patienten, die Gelenkproben spendeten, mussten wir aufgrund mangelnder Einschlusskriterien, nachträglich drei RA-Proben, zwei axSpA-Proben, sowie eine HC-Probe aus der Studie ausschließen. Somit sind diese Patienten nicht Teil der durchgeführten Untersuchungen.

Initial wurde im Rahmen des Studienprotokolls auch die Akquirierung von Synovialflüssigkeit, sowie Stuhlproben beabsichtigt. Diese Forschungsaspekte wurden jedoch aufgrund der im Studienkollektiv kaum vorhandenen peripheren Arthritiden zum Einschlusszeitpunkt nicht weiterverfolgt.

2.1.7 Erweiterte Rekrutierungsmaßnahmen

Die Patienten sollten, vor allem zu Beginn der Studie, primär in der Rheumaambulanz des Klinikums Rechts der Isar und ggf. auch auf der Nephrologischen Station bzw. auf Konsiliardiensanten im Haus rekrutiert werden. Für das Synovialgewebe wurden Patienten auch in der Abteilung

für Orthopädie am Klinikum München Rechts der Isar angesprochen. Da dort nur sehr selten Operationen an Patienten mit rheumatischen Erkrankungen durchgeführt werden, wurden Patienten auch in der Abteilung für Rheumachirurgie und Handchirurgie, Zentrum für Rheumatologie, Orthopädie und Schmerztherapie, Klinikum Oberammergau im Rahmen medizinisch notwendiger Eingriffe rekrutiert. Dort wurden die Proben in entsprechende Probengefäße mit Fixierlösung verpackt und per Post nach München geschickt (s. 7.10 sowie 3.4.7). Zum Erreichen der vordefinierten Patientenzahlen, mussten auch periphere Rheumatologische Praxen (z.B. Rheumazentrum Bad Aibling/Erding, MVZ Endokrinologikum München) eingebunden werden. Gesunde Kontrollen waren für die Studie ebenfalls essentiell. Hierzu sollten initial aus statistischen Gründen (passendes Alter/Geschlecht), soweit verfügbar, Partner der Patienten angesprochen werden.

Aufgrund der zu Beginn der Studie äußerst niedrigen Fallzahlen, weiteten wir im Verlauf der Studie unsere Rekrutierungsmaßnahmen weiter aus. Hierfür wurden meinerseits weitere Anstrengungen unternommen:

Für die Rekrutierung gesunder Kontrollen wurden vermehrt Personen aus dem eigenen Bekanntenkreis, die bezüglich der Einschlusskriterien und der Alters- und Geschlechterverteilung geeignet waren, gezielt eingeschlossen.

Zudem wurde über soziale Werbeplattformen, vornehmlich Facebook, in „Selbsthilfegruppen“, in denen sich Betroffene und deren Angehörige selbstständig organisieren und über ihre Krankheitsbilder austauschen, für unser Projekt geworben. Hierfür wurde nach Rücksprache mit den verantwortlichen Administratoren der jeweiligen Gruppen, unter Einbeziehung der jeweils geltenden gruppeninternen Richtlinien, Anzeigen geschaltet, die alle Interessenten über unser Projekt aufklären sollten und zugleich selbige aufforderten, bei Interesse, auf freiwilliger Basis, sich entweder telefonisch oder per E-Mail, bei mir zu melden, um eine eventuelle Teilnahme näher abzuklären. Für Teilnehmer, die teils große Wegstrecken für Ihre Teilnahme zurücklegen mussten, wurden, zur Vergrößerung unserer potentiellen Reichweite, die Fahrtkosten für An- und Abreise, seitens der Abteilung für Nephrologie, über die Personalabteilung des Klinikums MRI, in Höhe von bis zu 200€, übernommen. Weitere Vergütungen oder Aufwandsentschädigungen erfolgten für Teilnehmende aus ethischen Gründen nicht.

Des Weiteren wurde gemeinsam mit der Abteilung für Unternehmenskommunikation/Grafik am Klinikum MRI ein Informationsflyer erstellt, der anschließend bei teilnehmenden Praxen und Abteilungen ausgelegt wurde und zudem als Informationsmaterial bei Anzeigen oder im direkten Patientenkontakt diente.

Besagte Maßnahmen, die ich aus Eigeninitiative ergriff, sorgten dafür, dass wir innerhalb kurzer Zeit unsere Rekrutierungsrate enorm steigern konnten. Näheres hierzu finden Sie unter Punkt 2.2.1.

Für die Rekrutierung weiterer Synoviaprobe wurde eine Kooperation mit Prof. Paul Bowness vom Botnar Research Centre der Universität Oxford (UK) begonnen. Nach Abschluss eines MTAs konnten hier insgesamt 6 Proben gewonnen werden. Eine weitere Synoviaprobe konnte über den Service der Gewebebank des Klinikums München Rechts der Isar (Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie, TUM, Frau PD Dr. med. Slotta-Huspenina) akquiriert werden.

2.2 Patientenrekrutierung

2.2.1 Patientenscreening und Anwerbung der Patienten

Im Rahmen der bereits beschriebenen, über das anfängliche Studienprotokoll hinausführenden, Rekrutierungsmaßnahmen meinerseits, wurden insgesamt über 100 potentielle Patienten und gesunde Kontrollpersonen für eine Studienteilnahme evaluiert. Nach initialer Kontaktaufnahme per E-Mail oder Telefon, wurden alle Interessenten anonym, unter der Vergabe einer vorläufigen Identifikationsnummer, auf alle Studienkriterien, mittels einer Checkliste, überprüft. Bei Erfüllung der Einschlusskriterien wurde ein individueller Termin am Klinikum MRI zum Studieneinschluss vereinbart. Die Probanden legten zur Überprüfung der Diagnose und Angaben bereits zuvor angefertigte ärztliche Befunde aus Akten und Arztbriefen, ihrer jeweils behandelnden Rheumatologen vor. Kopien dieser Unterlagen, wurden anschließend, nach Prüfung und Übernahme aller studienrelevanten Punkte gemäß Studienprotokoll (s. 2.2.4, 2.3.2) in pseudonymisierter Form, aus Datenschutzgründen vernichtet.

Insgesamt wurden auf diesem Wege 15 zusätzliche Patienten der Gruppe axSpA und alle 30 gesunden Kontrollen, jeweils als Blutspender, in die Studie eingeschlossen. Somit wurden über fünfzig Prozent der axSpA-Blutproben und einhundert Prozent der gesunden Kontrollgruppe außerhalb des initialen Einzugsfeldes des Klinikums MRI rekrutiert.

2.2.2 Aufklärung und Einholung der Einwilligung

Die Patienten wurden bei Ihrem Besuch am Klinikum MRI von den Studienärzten im Haus bzw. von den externen Rheumatologischen Praxen und am Klinikum Oberammergau im Rahmen der OP-Aufklärung, über die Studienteilnahme aufgeklärt. Die Studienärzte standen für Rückfragen jederzeit zur Verfügung. Alle an der Aufklärung beteiligten Ärzte hatten Erfahrung in der Durchführung klinischer Studien. Alle beteiligten Ärzte haben den GCP-Kurs erfolgreich absolviert.

Nach der formalen Aufklärung der teilnehmenden Patienten und gesunden Kontrollen, unterschrieben selbige eine schriftliche Teilnahmeverständniserklärung, die anschließend von uns archiviert wurde. Die entsprechenden Aufklärungsbögen wurden den Probanden übergeben.

2.2.3 Beschreibung der Datenquellen

Klinische pseudonymisierte Daten wurden im Gespräch mit dem Patienten, durch die körperliche Untersuchung zum Studieneinschlusszeitpunkt und aus den Krankenakten erhoben. Routineparameter (z.B. CRP und BSG) und HLA-B27-Status, wurden im Rahmen der Diagnosestellung bzw. des Routinemonitorings (vierteljährliche Blutentnahmen) über ISO-zertifizierte Routinelaboratorien bestimmt. Alle übrigen Parameter (Interleukine im Blut und Synovialflüssigkeit, Durchflusszytometrische Analysen, RNA-Transkript-Bestimmungen, Zellkulturuntersuchungen etc.) wurden im nephrologischen Forschungslabor, oder bei unseren Kooperationspartnern (Dr. Matthias Schiemann Institut für Mikrobiologie, und Dr. Katrin Rothe, Institut für Mikrobiologie, TUM) durch mich bestimmt. Des Weiteren wurden zum Einschlusszeitpunkt nach Möglichkeit standardisierte Krankheitsaktivitätsindices (BASDAI, BASFI, BASMI, DAS28-CRP) festgehalten. Hierzu mussten die Patienten entsprechende Fragebögen ausfüllen bzw. standardisierte Bewegungen durchführen.

2.2.4 Auflistung der erfassten pseudonymisierten Patientendaten

Im Rahmen des Studieneinschlusses wurden die folgenden deskriptiven und laborchemischen Parameter, sofern möglich, von uns erfasst (experimentelle Untersuchungen sind hier nicht gelistet):

Basis Demographie (Alter, Geschlecht), spezifische Komorbiditäten (inflammatorische Darmerkrankungen, Psoriasis, inflammatorische Augenerkrankungen, andere Autoimmunkrankheiten), aktuelles Therapieregime, HLA-B27-Status, anti-CCP Antikörperstatus, Rheumafaktorstatus, Krankheitsaktivitätsindices (BASDAI, BASFI, DAS28-CRP), physikalische Einschränkung (BASMI), Entzündungsparameter (CRP, BSG)

2.2.5 Zeitraum der Datenerfassung

Die Patientenrekrutierung fand ab Mai 2018 bis März 2020 statt. Laborchemische und experimentelle Untersuchungen erfolgten sukzessive mit fortschreitender Patientenrekrutierung.

2.2.6 Nutzen-Risiko-Abwägung und ethisch-ärztliche Vertretbarkeit

Eine grundsätzliche Nutzen-Risiko Bewertung wurde aus ethischen Gründen der Studie zu Grunde gelegt und mit allen Patienten vor der Studienteilnahme im Rahmen des obligaten Aufklärungsgespräches besprochen. Etwaige Risiken oder persönliche Vorteile durch die Studienteilnahme konnten im Rahmen der Patientenaufklärung erörtert, sowie potentiell falsche

Erwartungen an die Studie, im Rahmen ihres prospektiven nicht therapeutischen Charakters, ausgeräumt werden. Die Studienteilnahme erfolgte somit im Sinne eines „*informed consent*“.

Die Ethikkommission stimmte der Durchführung der Studie zu (federführende Ethikkommissions Vorlage-Nr.: 100/18 S, Ethik-Kommission der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München).

2.3 Biometrie und Datenmanagement

2.3.1 Fallzahlschätzung

Da es sich um eine konfirmatorische Studie mit einer Eingangshypothese handelt, wurde zur initialen Fallzahlschätzung folgende Annahmen getroffen:

Die Fallzahlschätzung erfolgte anhand der primären Zielgröße und der relevanten Effektstärke geplanter statistischer Testverfahren.

Basierend auf den Ergebnissen einer Studie, die IL-26 Konzentrationen in Serum und Synovialflüssigkeit von Patienten mit Rheumatoider Arthritis untersuchte (Corvaisier, Delneste et al. 2012), wurde angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit, dass eine zufällig ausgewählte Person mit Ankylosierender Spondylitis eine höhere IL-26 Konzentration aufweist als eine zufällig ausgewählte gesunde Kontrollperson, mindestens 75% beträgt (d.h. es wird angenommen, dass die Fläche unter der ROC-Kurve mindestens 0.75 beträgt). Unter dieser Annahme müssten 30 Patienten mit axSpA und 30 gesunde Kontrollen untersucht werden, um mit einem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben einen Gruppenunterschied mit einer Wahrscheinlichkeit (= Power) von ca. 90% detektieren zu können ($\alpha = 5\%$, zweiseitiger Test).

Die Fallzahlberechnung erfolgte mit der Fallzahlkalkulationssoftware nQuery Advisor Version 7.0.

2.3.2 Gewährleistung der Datensicherheit

Die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz in Übereinstimmung mit den nationalen Gesetzen und der europäischen Datenschutzgrundverordnung (DSGVO 2016) galten im Rahmen der Studie uneingeschränkt. Es wird zugesichert, dass keine individualisierten Daten weitergegeben oder publiziert werden. Dritte erhielten keinen Einblick in Originalunterlagen. Alle medizinischen Dokumente wurden gemäß geltenden Vorschriften aufbewahrt. Ort der Datenspeicherung ist das nephrologische Forschungslabor, Abteilung für Nephrologie, Medizinische Klinik II, Klinikum rechts der Isar, Ismaninger Straße 22, 81675 München. Die Daten werden für 10 Jahre gespeichert. Ein Datenaustausch pseudonymisierter Daten

mit berechtigten Personen erfolgt nur in verschlüsselter Form mittels Passwort-geschützter externer Festplatte oder USB-Stick.

2.3.3 Pseudoanonymisierung der Patientendaten

Für das Projekt wurde eine Pseudonymisierung in folgender Form durchgeführt:

Die patientenbezogenen Daten wurden in einer Excel-Liste auf einem Klinikinternen, Passwort-geschütztem Rechner gespeichert, wobei jedem Patienten eine fortlaufende Studiennummer zugeteilt wurde, die die Rangfolge des Eintritts in die Studie widerspiegelt, aber keine weiteren Merkmale des Patienten enthält. Die Auswertung der Studienergebnisse erfolgte mit Listen, in denen ausschließlich die Studiennummern verwendet wurden.

Eine Entschlüsselung der Pseudonymisierung erfolgte lediglich in Fällen, in denen es die klinische Betreuung der Patienten erforderte („medizinische Gründe“) oder falls es zu Änderungen in der wissenschaftlichen Fragestellung kam („wissenschaftliche Gründe“). Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse blieb die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.

2.3.4 Widerrufs- und Beschwerderecht

Bei Widerruf der Einwilligungserklärung wurden alle Daten und Proben gelöscht bzw. entsorgt und ausgedruckte Unterlagen vernichtet.

Patienten konnten jederzeit Auskunft über die sie betreffenden Daten erhalten, auch in Form einer unentgeltlichen Kopie. Darüber hinaus konnten Patienten auch die Berichtigung ihrer Daten verlangen.

Die Patienten wurden auf ihr Beschwerderecht in Bezug auf Datenschutzverletzungen hingewiesen und mit den entsprechenden Kontaktdaten ausgestattet.

3 Materialien und Methoden

3.1 Kurzes Vorwort zur Etablierung der notwendigen Methodik

Die im Folgenden dargestellten Versuche wurden zu weiten Teilen an die vorherrschenden Rahmenbedingungen unseres S2-Labors sowie der Notwendigkeiten gemäß unseres Studiendesigns und der von uns zu erreichenden Projektziele individuell angepasst.

Somit beziehen sich die nachfolgenden Ausführungen lediglich auf die letztlich von uns analysierten Datensätze einer finalisierten Methodik, wie sie nach einer erfolgreichen Etablierung der notwendigen Versuchskonzeptionen im Rahmen unserer durchgeführten Versuchsreihen zu tragen kam. Auf die diversen hiervon abweichenden Bedingungen etwaiger Vorversuche, vorhergehender Etablierungsschritte und notwendiger Kontrollen wird der Übersichtlichkeit halber im Folgenden nicht näher eingegangen.

Es sei an dieser Stelle lediglich erwähnt, dass weite Teile der nachfolgenden immunologischen, mikrobiologischen und funktionalen Assays aufgrund unserer teils sehr spezifischen Bedürfnisse/Zwecke in teils sehr aufwändigen Vorversuchen zunächst etabliert werden mussten und nach Vollendung unseres Projektes dem Labor nun als (in Teilen gänzlich) neue Untersuchungsmethoden zur Verfügung stehen.

3.2 Chemikalien, molekularbiologische Reagenzien, Geräte und andere Materialien

Ein vollständiges und sortiertes Verzeichnis aller verwendeten Materialien, Chemikalien, Pufferlösungen, Reagenzien und deren Hersteller findet sich im Anhang ab Punkt 7.2.

Weitere ergänzende Informationen zu Verdünnungen, Rekonstitutionen, Konzentrationen, Medienzusammensetzungen, Kit-Bestandteilen o.Ä. finden Sie, sofern dies für die Nachvollziehbarkeit der verschiedenen Methoden notwendig ist, an entsprechender Stelle in den weiter folgenden Erläuterungen.

3.3 Gewinnung von Patientenmaterial

3.3.1 *Abnahme von humanen Blutproben*

Abgenommene Probenmengen je Patient

S-Monovette Kalium-EDTA 2,7ml	1x
S-Monovette Serum-Gel 4,7ml	1x
CPT Tube, NC 1,0ml, FICOLL 2,0ml	4x

Nach eingehender Aufklärung der an der Studie beteiligten Versuchspersonen über mögliche Risiken der Studie etc. und Einholung der individuellen Einwilligungserklärung (s. 2.2.2 ff), wurden die Blutproben abgenommen.

Hierfür wurde aus einer gestauten Kubitalvene nach entsprechender Lokalisation und Desinfektion mit einer Safety-Multifly Einmalkanüle Blut entnommen. Oben genannte Probenröhrchen wurden vollständig befüllt, unmittelbar mehrmals invertiert, bevor sie bei Raumtemperatur (RT) für maximal drei Stunden gelagert wurden.

3.3.2 Gewinnung und Fixierung humaner Synoviaprobe

Fixierungsmedium Synoviaprobe (4% PFA)

Twist Röhrchen	20 ml
Gepuffertes Formaldehyd	4%

Wie bereits zuvor beschrieben, wurden humane Synoviaprobe lediglich im Rahmen medizinisch indizierter Eingriffe nach vorheriger Aufklärung und Einholung der schriftlichen Einwilligung entnommen, soweit dies nach aktuellen Standards des vorgenommenen Eingriffs ohne Risiko möglich war. Das entnommene Material wurde anschließend an uns weitergeleitet. Gewebeprobe aus der orthopädischen Abteilung des Klinikums MRI, legte man unmittelbar nach Entnahme in einen sterilen 50 ml Falcon, befüllt mit ca. 10 bis 20ml sterilen R10 Medium. Nach Ankunft im Labor wurde das Gewebe für mindestens 48 Stunden in einem 20 ml Twist-Röhrchen, befüllt mit 4% Formaldehyd Lösung, fixiert. Proben von außerhalb des Klinikums wurden wie oben beschrieben gewonnen, jedoch vor Ort in 4% Formaldehydlösung fixiert und dann versandt. Daher variiert die Dauer der Fixierung, betrug aber immer mindestens 48 Stunden. Alle Proben aus Oxford wurden bereits vor Ort in 4% Formaldehydlösung für ebenfalls 48h fixiert, entwässert und zudem paraffinisiert, bevor sie versandt wurden. Proben aus der Gewebebank des Klinikums MRI wurden von den Mitarbeitern dort standardisiert aufbereitet und als Paraffinblöcke an uns schnittfertig weitergereicht.

3.4 Zellkultur und Handhabung von PBMCs und Synoviaprobe

Alle Arbeitsschritte, die im Rahmen der Zellkultur erfolgten, wurden unter streng sterilen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Hierfür wurde stets den Bedingungen eines S1-Laboratoriums gemäß gearbeitet und alle Proben und Versuche unter einer Biologischen Sicherheitswerkbank der Klasse II unter Anlage von

Nitrilhandschuhen verarbeitet. Ein laminarer Luftstrom, sowie eine großzügige Flächendesinfektion mit 80% Ethanol und UV-Licht Bestrahlung der Arbeitsfläche und Geräte für mindestens 30 Minuten vor jeder Benutzung, sorgten für sterile, kontaminationsfreie Arbeitsbedingungen. Alle Materialien, die in diesen sterilen Arbeitsbereich gelangten, wurden ebenfalls zuvor mit 80% Ethanol eingesprüht und anschließend mit einem Kosmetiktuch abgewischt oder zuvor autoklaviert. Alle sterilen Versuchsobjekte, die aus der Arbeitsumgebung entnommen wurden, wurden, sofern dies für die weitere sterile Bearbeitung nötig war, in luftdichter Umgebung verpackt entnommen und erst wiedereröffnet, sobald selbige sich erneut in steriler Umgebung befanden.

3.4.1 *Isolierung von Serum und EDTA-Plasma*

Die gewonnenen Serum- und EDTA-Röhrchen wurden anschließend für mindestens eine Stunde, jedoch maximal für drei Stunden, aufrechtstehend bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden die Röhrchen bei 2000g für 10 Minuten bei RT, unter Verwendung der Bremseinstellung, zentrifugiert. Danach wurden jeweils fünfmal 350µl des Serumüberstandes bzw. dreimal 330µl des EDTA-Plasmaüberstandes in 2,0 ml große Biosphere Mikroröhren, die zuvor mit den jeweiligen Patienten IDs beschriftet wurden, unter sterilen Bedingungen pipettiert. Diese Röhrchen wurden daraufhin bei -20°C eingefroren und anschließend für die weitere Lagerung in einen -80°C Kühlschrank überführt.

3.4.2 *Isolierung und Kultivierung von PBMCs und CPT-Plasma*

Medien

Zellkulturmedium „R10“ (10% FCS, 1% P/S)

RPMI-1640 Medium („R0“)	445 ml
+ Bovine Calf Serum („FCS“)	50 ml
+ Penicillin (10,000 IU/ml) und	5 ml
+ Streptomycin (10mg/ml) („P/S“)	

Die gewonnenen Blutproben der CPT-Röhrchen wurden nach Abnahme innerhalb von spätestens drei Stunden weiterverarbeitet. Zu Beginn der PBMC-Isolation wurde das Wasserbad auf 37°C erhitzt und das R0, sowie das R10 Medium auf diese Temperatur vorgewärmt. Zudem wurden alle später aufgeführten Proben-Aliquots mit entsprechenden ID-Labels markiert, um die Proben auch zu einem späteren Zeitpunkt wieder eindeutig zuordnen zu können. Anschließend wurden alle CPT-Röhrchen achtmalig invertiert, um schließlich bei 1650g, ohne Bremseinstellung, für 20 Minuten bei RT zentrifugiert zu werden. Daraufhin wurden unter

sterilen Bedingungen jeweils dreimal 550 µl des CPT-Plasmaüberstandes in Biosphere Mikroröhren aliquotiert und selbige bei -20°C eingefroren. Der restliche Überstand wurde mittels einer serologischen Pipette verworfen, wobei ca. 1cm über dem sichtbaren „Buffy coat“ gestoppt wurde. Die im „Buffy coat“ befindlichen PBMCs wurden daraufhin mit derselben 10ml Pipette gesammelt und in einen 50 ml Falcon gegeben. Dieser wurde anschließend mit R0 Medium auf 50 ml Endvolumen aufgefüllt. Dieser Falcon wurde nun bei 800g für 15 Minuten, mit Bremse bei RT zentrifugiert. Der Überstand des Zellpellets wurde ebenfalls verworfen und das Pellet mit 1 ml 37°C warmen R10 Medium mittels einer Pipette resuspendiert. Es wurden weitere 29 ml R10 Medium hinzugegeben und erneut bei 540g für 10 Minuten, mit Bremse bei RT zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml R10 Medium resuspendiert. Anschließend wurden exakt 19 ml R10 Medium hinzugegeben und wie unter 3.4.3 beschrieben die Anzahl an PBMCs ermittelt.

Zwischenzeitlich wurden die PBMCs in Suspension bei 37°C, 5% CO₂ im Inkubator gelagert.

3.4.3 Zählen von PBMCs mittels Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Anzahl gewonnener Zellen, bzw. der Zellkonzentration einer beliebigen Suspension, wurden diese mittels eines Einweg-Hämocytometer Chips, nach Neubauer, händisch ausgezählt.

Zunächst wurden die Zellen, die wir zuvor wie unter 3.4.2 beschrieben, in einem Gesamtvolumen von beispielshalber 20 ml R10 resuspendiert haben, mit 0,4% Trypan-Blau Lösung 1:2 verdünnt.

Hierfür entnahm man der Suspension (mit bekanntem Ausgangsvolumen), nach vorherigem, gründlichem Mischen mit einer 1000 µl Pipette, anschließend 10 µl, welche man daraufhin in eine konische 96-Well Platte überführte und ebenfalls mit 10 µl 0,4% Trypan-Blau Lösung mischte. Nachdem man die toten Zellen auf diese Weise gefärbt hatte, während die Lebendigen ungefärbt blieben, gab man wiederum 10 µl der Mischung in eine der beiden Zählkammern des Chips. Unter dem Mikroskop und 20x Objektiv zählte man dann die hellen und somit lebendigen PBMCs in mehreren der äußeren 16-feldrigen Quadranten, mäandernd aus und berechnete anschließend die Zellkonzentration in der Ausgangssuspension wie folgt (INCYTO 2004):

$$\text{Zellen pro ml Suspension} = \text{Durchschnittszellzahl je Quadrant} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumenfaktor}$$

Da das Ausgangsvolumen der Suspension stets bekannt war, konnte man so nun die Zellmenge in der jeweils vorhandenen Suspension bestimmen und beispielshalber anschließend durch erneutes zentrifugieren und Anpassen des Volumens, die Zellkonzentration pro ml Medium, gemäß den Gegebenheiten des jeweiligen Versuches, variieren.

3.4.4 Einfrieren von PBMCs und humaner Proben

Medien

Freezing Medium (FCS, 10% DMSO)

Bovine Calf Serum (FCS)	9ml
Dimethyl Sulfoxide >99,7% (DMSO)	1ml

PBMCs die nicht unmittelbar für Versuche verwendet werden konnten, wurden wie folgt kryokonserviert:

Zunächst wurde eine bekannte Menge lebender, in R10 suspendierter PBMCs in einem 50 ml Falcon bei 540g für 5 Minuten bei RT zentrifugiert. Ein mit 250 ml Isopropanol befüllter „Mr. Frosty“ Gefriercontainer wurde vorab im Kühlschrank auf 4°C heruntergekühlt. Nach fünfmaligem Gebrauch wurde die Kühlflüssigkeit gewechselt. Zeitgleich wurde ein 9 ml FCS Aliquot aufgetaut und mit 1 ml DMSO versetzt („Freezing Medium“), daraufhin auf Eis gekühlt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Nach Entfernung des zellfreien R10 Überstandes oberhalb des Zellpellets und Entnahme der letzten Medium-Reste mit einer 200 µl Pipette wurde das Zell-Pellet mit eiskaltem „Freezing Medium“ mittels einer 1000 µl Pipette rasch und vorsichtig auf eine Konzentration von 10-20 x 10⁶ PBMCs/ml resuspendiert. Anschließend wurden 1 ml Aliquots, in beschrifteten 1,6 ml Cryotubes, erstellt. Diese wurden in den vorgekühlten „Mr. Frosty“ Gefriercontainer gegeben und für mindestens 24 Stunden bei -80°C heruntergekühlt. Anschließend wurden die Proben in einen Stickstofftank überführt und dort in der flüssigen Phase am Boden des Tanks gelagert.

3.4.5 Auftauen von PBMCs

Maximal 3 Cryotubes mit eingefrorenen PBMCs wurden aus dem Stickstofftank entnommen und unmittelbar in ein auf 37° vorgeheiztes Wasserbad überführt. Nach ca. 90 Sekunden, beziehungsweise bei nur noch geringen Eisrestklumpen, wurde die aufgetaute Zellsuspension dann in ein 50 ml Falcon überführt und das Kryotube daraufhin mit 1 ml vorgewärmten R10 Medium vorsichtig mit einer 1000 µl Pipette ausgespült. Derjenige Milliliter, den man zum Ausspülen des Tubes verwendet hatte, wurde daraufhin tröpfchenweise der Zellsuspension mit den verbliebenen, noch teilweise gefrorenen Zellen beigeführt. Anschließend wurden weitere 8

ml des vorgewärmten R10 Mediums tröpfchenweise hinzugegeben. Die nun vollständig aufgetaute Zellsuspension wurde bei 700g für 10 Minuten bei RT „gewaschen“, um durch die 1:10 Verdünnung mit R10 Medium, das toxische DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde abgossen und das Pellet erneut in 1 ml R10 resuspendiert. Über einem zweiten 50 ml Falcon wurde ein 70 µm dichter Nylon-Einwegfilter gelegt und die Zellsuspension von „Zellschrott“ durch tropfenweise Filtrierung befreit. Der ursprüngliche Falcon wurde nun noch mit 9 ml R10 Medium gespült und anschließend Selbiges ebenfalls filtriert. Nach erneutem Zentrifugieren, wie zuvor beschrieben, wurde der Überstand erneut verworfen und die Zellen in 10 ml R10 Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl gemäß 3.4.3 bestimmt und die Zellkonzentration durch Zugabe/Abnahme von Medium dem jeweiligen Versuch entsprechend angepasst.

Vor Verwendung der jeweils aufgetauten Patientenprobe in in-vitro Versuchen wurden die Zellen immer zunächst über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ in einem Inkubator ruhen gelassen und am nächsten Tag erneut gezählt. Es erfolgte dann eine erneute Anpassung der Zellkonzentration vor Beginn der Versuche.

3.4.6 HBV/HIV/HCV Screening der Patientenproben

Bestandteile des Miriad Rapid HBc/HIV/HCV Test Kits

Test Kammer	1x
Universal Puffer Lösungen 1 & 2 mit Ständer und Pipette	Je 1x
InstandGold Filter Kappe für Test Kammer	1x

Alle Patientenproben wurden nach Einschluss in die Studie und vor der weiteren Verarbeitung, unter Verwendung des Miriad Rapid Test Kits, auf die folgenden Infektionskrankheiten gescreent: Hepatitis B (HBc Kern Antigen, HBV), Humanes Immundefizienz Virus Typ 1/2 (HIV-1/2), Hepatitis C (HCV).

Hierfür wurden gemäß Protokolls (MedMira 2017) entweder frische oder zuvor bei mindestens -20°C gelagerte Serumproben der jeweiligen Patienten verwendet. Nach Auftauen, falls nötig, wurden die Serumproben zunächst bei 2000g für 10 Minuten bei RT, zentrifugiert. Der Test wurde danach bei RT durchgeführt. Hierfür gab man zunächst einen Tropfen des jeweiligen Serums in die Universal Puffer Lösung 1, welche daraufhin für 15-30 Sekunden vorsichtig durchmischt wurde. Der Inhalt wurde dann auf die Test Kammer gegeben und solange gewartet, bis die Lösung aufgesogen wurde. Als nächstes legte man die Filter Kappe auf die Kammer und

goss auf diese die 2. Puffer Lösung und ließ diese ebenfalls zunächst vollständig aufsaugen. Nach der Entfernung der Kappe und Aufsaugen des Flüssigkeitsspiegels konnte das Ergebnis abgelesen werden.

Es ergab sich zu keiner Zeit ein positives Testergebnis bei einem der Probanden.

3.4.7 Paraffinisierung und Verarbeitung von humanen Synoviaprobe

Die wie unter 3.3.2 erwähnten, von entsprechenden Patienten im Rahmen von Routineeingriffen entnommenen Gewebeproben, peripherer Gelenke, wurden nach Fixierung, mittels eines Einwegskalpells zurechtgeschnitten.

Hierbei wurde unter Anderem Fettgewebe entfernt und die Größe der einzelnen Probenstücke, an die Einbettungskassetten angepasst. Es wurde stets darauf geachtet, dass das Gewebe während dieses Vorganges feucht gehalten wurde. Die Probenstücke wurden daraufhin in die Kassetten gelegt und anschließend in 70% Ethanol zur Paraffinisierung transportiert. Dieser Vorgang wurde durch das Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie am Klinikum MRI nach standardisiertem Protokoll durchgeführt.

Die in Paraffin eingebetteten Gewebestücke wurden daraufhin unter Verwendung eines Mikrotoms und eines Wasserbades zurechtgeschnitten. Hierfür wurde eine Schnittdicke von 1-1,5 µm gewählt und die Präparate auf Objektträger transferiert. Diese wurden daraufhin bei 37°C in einem Inkubator luftgetrocknet, bevor selbige in unserem Labor lichtgeschützt bei RT in Kassetten gelagert wurden.

3.5 Molekularbiologische Methodik

Bezüglich der Handhabung von Gen-Transkripten wie mRNA und cDNA, sowie die hierfür notwendigen Materialien und Reagenzien, wurden besondere Maßnahmen gegenüber möglichen Kontaminations- und Fehlerquellen getroffen:

In unserem Labor wurde sowohl für Arbeiten mit mRNA, als auch cDNA und DNA-Produkten, allgemein ein jeweils eigener, abgetrennter Arbeitsbereich eingerichtet mit speziell nur hierfür verwendeten Pipetten, Geräten und Materialien. Vor jeder Verwendung der jeweiligen Arbeitsflächen und -materialien wurden alle Oberflächen mit einer RNase-Dekontaminierungslösung großzügig eingesprüht und anschließend mit Kosmetiktüchern gesäubert. Alle verwendeten Materialien, die mit mRNA oder cDNA-Isolaten in Kontakt kamen, waren stets als DNase-/RNase-/Nuclease-frei gekennzeichnet, um eine möglichst lange Integrität der Isolate zu garantieren. Alle Pipettenspitzen unterlagen ebenfalls diesen Kriterien und waren mit einem zusätzlichen Filter ausgestattet und steril verpackt (s. 7.2). Um Kontaminierungen zu minimieren wurden zudem stets von allen verwendeten Chemikalien, kleinere Aliquots hergestellt, die regelmäßig ausgetauscht wurden. Auf regelmäßiges Wechseln und stetes Arbeiten mit Nitrilhandschuhen wurde penibel geachtet und alle Proben und Materialien nur mit solchen angefasst. Proben wurden stets auf Eis gelagert und „Freeze-thaw-cycles“, sofern möglich, vermieden. Die Arbeiten fanden jedoch nicht im sterilen Bereich einer Werkbank mit Abzug statt, sondern lediglich auf einer normalen Arbeitsbank.

3.5.1 Isolierung von mRNA aus humanen Leukozyten Lysaten

Folgende Auszüge stammen v.a. aus dem Kit-Protokoll (MACHEREY-NAGEL 2022) und wurden der eigenen Verwendung gemäß angepasst.

Bestandteile Nucleospin RNA Isolations Kit (250 Präparationen)

Zell-Lyse Puffer RA1	125 ml
Wasch-Puffer Lösung RAW2	80 ml
Wasch-Puffer Konzentrat RA3	3 x 35 ml
Membran Entsalzungspufferlösung MDB	125 ml
Reaktionspufferlösung für rDNase	30 ml
rDNase (RNase-frei) lyophilisiert	5 x
RNase-freies H ₂ O	60 ml
Nucleospin Filter	250 x
Nucleospin RNA Säulen mit Sammel-Tubes	250 x
Sammel-Tubes, 2 ml	750 x

Sammel-Tubes, 1,5 ml

250 x

Weitere verwendete Chemikalien

Ethanol 100%

Ethanol 70%

rDNase (RNase-freie) Rekonstitution

Dieser Arbeitsschritt wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt (s. 3.4). Zunächst wurden die lyophilisierten und zuvor bei 4°C gelagerten rDNase Proben bei 1000g für 5 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden 550 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben und für eine Minute bei RT inkubiert. Die rekonstituierte rDNase wurde daraufhin aliquotiert und bei -20°C für maximal 6 Monate gelagert.

Wasch-Puffer Arbeitslösung RA3

Vor Verwendung der RA3-Pufferlösung wurde diese mit 100 ml 100% Ethanol versetzt.

Aufreinigung von RNA aus Zelllysaten

Die zuvor in Zellkultur gehaltenen Leukozyten wurden zunächst mittels einer 1000 µl Pipette unter sterilen Arbeitsbedingungen resuspendiert und anschließend in ein RNase-freies Mikroröhrchen transferiert. Nun zentrifugierte man die Zellsuspension bei 700 g für 5 Minuten bei RT und nahm danach den Zellüberstand vorsichtig mit einer 1000 µl und 200 µl Pipette ab. Das trockene Zellpellet wurde durch Zugabe von 350 µl RA1 Lyse-Puffer nun durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren aufgelöst und anschließend entweder bei -80°C für maximal zwei Wochen zwischengelagert, oder direkt weiterverarbeitet. Es wurden nie mehr als 5×10^6 bzw. weniger als $0,5 \times 10^6$ Zellen pro 350 µl RA1 Puffer lysiert. Zunächst eingefrorene Zelllysate wurden auf Eis vorsichtig aufgetaut und anschließend für eine Minute unter maximaler Einstellung gevortext. Es wurden nie mehr als maximal 8 Zelllysate gleichzeitig gehandhabt. Die Zelllysate wurden wie zuvor unter 3.5 beschrieben, im RNase-freien Arbeitsbereich filtriert. Hierfür wurden die 350 µl Zelllösung durch einen Nucleospin Filter bei 11,000 g für eine Minute bei RT zentrifugiert und in einem 2 ml Sammeltube aufgefangen. Anschließend versetzte man das zu filtrierende Zelllysate mit 350 µl 70% Ethanol, um es an die RNA-Bindungsfähigkeit der Auffangmembran anzupassen. Unter mehrmaligem Auf- und Abpipettieren mit einer 1000 µl Pipette wurden die 700 µl an Mixtur auf eine Nucleospin RNA Säule, die in einem neuen 2 ml Sammelröhrchen platziert wurde, transferiert. Selbige wurde für 30 Sekunden bei 11,000 g bei RT zentrifugiert und die Säule anschließend in einem

neuen 2 ml Auffangröhrchen platziert. Die Silica-Membran wurde mit 350 µl MDB entsalzt und bei 11,000 g für 1 Minute bei RT zentrifugiert. Jetzt wurde pro RNA-Isolat 10 µl der rekonstituierten rDNase mit 90 µl rDNase Reaktionspufferlösung versetzt und anschließend 95 µl der Mischung direkt auf die Membran pipettiert, um diese für 15 Minuten bei RT inkubieren zu lassen. Nach Verdauung der DNA wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl des RAW2 Puffers gestoppt und die Säule bei 11,000 g für 30 Sekunden durch Zentrifugation gewaschen, um anschließend in ein neues 2,0 ml Auffangröhrchen platziert zu werden. Nach Zugabe von 600 µl RA3 Puffer wurde dieser Vorgang erneut wiederholt, jedoch das aufgefangene Volumen nach dem Zentrifugieren verworfen und kein neues Röhrchen verwendet. Nach diesem 2. Waschvorgang wurde ein letztes Mal mit 250 µl RA3 Puffer gewaschen und erneut für 2 Minuten zentrifugiert, um die Membran möglichst vollständig zu trocknen. Die Säule wurde nun in ein Nuklease-freies 1,5 ml Sammelröhrchen platziert, um durch die Zugabe von 40 µl RNase-freiem H₂O die aufgereinigte RNA bei 11,000 g für eine Minute bei RT zu eluieren.

Die RNA-Eluate wurden anschließend entweder direkt durch Fluorometrie, wie unter 3.5.2 beschrieben, gemessen bzw. anschließend wie unter 3.5.3 in cDNA transkribiert oder zunächst für maximal fünf Tage bei -80°C erneut eingefroren.

3.5.2 Messung von mRNA-Konzentrationen und -Integrität

Folgende Auszüge stammen aus den Kit-Protokollen (ThermoFisher 2022) (ThermoFisher 2022) und wurden der eigenen Verwendung gemäß angepasst. Es wurde das Qubit 4 Fluorometer verwendet.

Bestandteile Qubit RNA HS Assay Kit

Qubit RNA HS Reagenz (Komp. A1)	200x Konzentrat in DMSO
Qubit RNA HS Puffer (Komp. B1)	
Qubit RNA HS Standard #1 (Komp. C1)	0 ng/µl in TE-Puffer
Qubit RNA HS Standard #2 (Komp. D1)	10 ng/µl in TE-Puffer
Qubit Assay tubes	

Bestandteile Qubit RNA IQ Assay Kit

Qubit RNA IQ Reagenz (Komp. A2)	200x Konzentrat in DMSO
Qubit RNA IQ Puffer (Komp. B2)	
Qubit RNA IQ Standard #1 (Komp. C2)	0 ng/μl in 1 mM Zitrat-Puffer
Qubit RNA IQ Standard #2 (Komp. D2)	100 ng/μl kleine RNA in 1 mM Zitrat Puffer
Qubit RNA IQ Standard #3 (Komp. E2)	100 ng/μl große RNA in 1 mM Zitrat Puffer
Qubit Assay tubes	

Allgemeine Hinweise

Alle Komponenten wurden vor Verwendung auf RT aufgewärmt. Nach Zugabe der RNA-Eluat zum Assay wurde stets die empfohlene Inkubationszeit bei RT von mindestens 2 Minuten eingehalten. Sofern möglich wurden die Komponenten vor Licht-Einstrahlung geschützt und im RNase-freien Bereich gehandhabt. Das Gerät wurde vor jeder Anwendung durch die mitgelieferten Standards kalibriert oder die zuletzt angefertigte Standardkurve verwendet.

Anwendung des RNA HS Assay Kits

Zunächst wurde die Arbeitslösung durch Zugabe von Komponente A1 in einer 1:200 Verdünnung zur Komponente B1 in einem RNase-freien Mikroröhrchen, hergestellt. Von selbiger wurde anschließend für die Standards 190 μl und für die RNA-Messungen zwischen 195 – 199 μl in entsprechende Qubit Assay tubes pipettiert. Zu den Standardtubes wurden je 10 μl Standard #1 bzw. #2 hinzugegeben und zu den RNA-Proben tubes je 1 – 5 μl, für ein Endvolumen von je 200 μl. Die Proben wurden danach für 2 – 3 Sekunden gevortext und anschließend inkubiert.

Anwendung des RNA IQ Assay Kits

Die Verwendung erfolgte quasi identisch zum HS RNA Kit, lediglich wurde ein weiterer Standard vorbereitet und die Komponenten A2 bis E2 statt der Komponenten A1 bis D1 verwendet (ThermoFisher 2022). Die Arbeitsschritte waren jedoch deckungsgleich.

Anwendung des Qubit 4 Fluorometers

Nach der Herstellung der Messproben und Standards, wurden diese in das Qubit 4 Fluorometer gestellt. Auf dem Touch-Screen wurde das entsprechend verwendete Assay ausgewählt und ggf. der neue Standard, anhand der vorbereiteten Standardproben, kalibriert. Anschließend wurden die Proben nacheinander in das Gerät gegeben und das entsprechende RNA-Eluat Volumen eingegeben.

Für das RNA HS Assay Kit wurde schließlich die RNA-Konzentration in der jeweiligen Probe in ng/µl ausgegeben und notiert.

Für das RNA IQ Assay Kit wurde die RNA-Integrität anhand des Standards berechnet und in einem IQ-Score von 0 bis 10 wiedergegeben, wobei 10 vollständig intakte und 0 im Prinzip nicht verwertbare RNA widerspiegelt.

3.5.3 Reverse Transkription von mRNA zu cDNA

Folgende Auszüge stammen aus dem Kit-Protokoll (ThermoFisher 2018) und wurden der eigenen Verwendung angepasst. Es wurde der C1000 Touch Thermal Cycler verwendet.

Bestandteile High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (10 µl Volumen pro Probe)

RT-Puffer 10x	2,0 µl
RT Random Primers 10x	2,0 µl
dNTP Mix 25x (100mM)	0,8 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase 50U/µl	1,0 µl
Nuklease-freies H ₂ O	3,2 µl

Anwendung cDNA Reverse Transcription Kit

Es wurde, wie unter 3.5 beschrieben, in einem dekontaminierten, RNA/RNase/DNA/DNase-freien Arbeitsbereich gearbeitet. Alle Komponenten wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Es wurde für jede zu transkribierende Probe im Voraus, über ein Excel Worksheet das nötige Volumen, für 100 ng an RNA „Template“ berechnet. Sollte das hierfür notwendige Volumen 10 µl überschritten haben (weil die Ausgangskonzentration zu niedrig war), wurden stattdessen 10 µl an RNA-Eluat für die Transkription (und dementsprechend weniger Menge an RNA-Templates) verwendet. Es wurde ein Master Mix gemäß der obigen Tabelle in einem Nuklease-freien Mikroröhrchen angemischt und auf Eis gestellt. Anschließend wurden je 10 µl an Master Mix pro Reaktion in 0,2 ml PCR Soft-Tubes vorgelegt und nun die berechnete Menge an RNA-Eluat (bis maximal 10 µl) hinzugegeben. Sollte die Menge an RNA-Eluat weniger als 10 µl betragen haben, wurde das Endvolumen mit entsprechend viel Nuklease-freiem H₂O auf 20 µl aufgefüllt.

Die Tubes wurden daraufhin mit einer Mini-Zentrifuge durchmischt und anschließend fest verschlossen. Vor Verwendung des Thermocyclers wurden die Proben auf Eis zwischengelagert.

Einstellung	Stufe 1	Stufe 2	Stufe 3	Stufe 4
Temperatur (°C)	25	37	85	4
Zeit (min.)	10	120	5	∞

Nach Beendigung der Transkription wurden die gekühlten Proben aus dem Gerät entnommen und bei -20°C gelagert.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass alle Ziel-Gene, mit den jeweiligen Basensequenzen, Konzentrationen, Primern etc. und allen weiteren Angaben, die für die Durchführung der Real Time PCR verwendet wurden, der Übersichtlichkeit halber im Anhang unter 7.5 auffindbar sind.

TE Puffer pH 8

cDNA-Proben	0,225 µl
PrimeTime qPCR Assay Probe (5 µM) mit	0,25 µl
Forward- und Backward-Primer (10 µM)	
Luna Universal Probe qPCR Master Mix	2,5 µl
Nuklease-freies H ₂ O	2,025 µl

cDNA-Proben	0,225 µl
qPCR-Probe (5 µM)	0,25 µl
Forward Primer (10 µM)	0,25 µl
Backward Primer (10 µM)	0,25 µl
Luna Universal Probe qPCR Master Mix	2,5 µl
Nuklease-freies H ₂ O	1,525 µl

Rekonstitution und Aliquotierung von qPCR Assays

Die jeweiligen qPCR Assays wurden zunächst rekonstituiert. Hierfür wurden die gelieferten Proben zunächst bei 750 g für 10 Sekunden bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde unter sterilen und Nuklease-freien Arbeitsbedingungen, dem jeweiligen Assay entsprechend (s. 7.5) TE-Puffer (pH 8) hinzugegeben, um eine Endkonzentration von 5 µM für die Probes und 10 µM für die jeweiligen Primer zu erreichen. Die Lösungen wurden mehrmals vorsichtig auf- und abpipettiert und anschließend erneut bei 750g für 10 Sekunden RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in 0,2 ml PCR-Soft Tubes aliquotiert (20 – 40 µl pro Aliquot) und bei -20°C gelagert.

Allgemeine Hinweise

Es wurden für unterschiedliche Ziel-Gene, verschiedene Assays (s. 7.5) verwendet. Um die Vergleichbarkeit innerhalb der Versuchsreihe zu gewährleisten, wurden die Mengenangaben der Komponenten pro Reaktion entsprechend angepasst, sodass die Menge an cDNA-Templates pro Well immer gleich blieb. Wie bereits unter 3.5 beschrieben, wurden Kontaminationsvorsichtsmaßnahmen getroffen. Es wurde stets auf Eis gearbeitet und Licht-Exposition gegenüber den Assay-Komponenten vermieden. Alle Proben wurden stets in Triplikaten angelegt, um Abweichungen einzelner CT-Werte pro Well zu kompensieren. Die Proben wurden stets auf Eis langsam aufgetaut und „Freeze-Thaw-Cycles“ durch Aliquotierung vermieden. Nach Möglichkeit wurde je nach Arbeitsschritt, die jeweils „kleinste“ Pipette verwendet, um beim Pipettieren möglichst genau zu bleiben und die Pipettenspitzen bei jeder Kontaminationsmöglichkeit gewechselt.

Pipettieren der 384 Well Platten

Zunächst wurde das jeweils angedachte Panel auf einer DIN A4 Seite skizziert, um die CT-Werte zu einem späteren Zeitpunkt den Proben zuordnen zu können. Anschließend wurde besagtes Panel mit einem Filzstift auf eine 384 Well Platte mit konischem Boden übertragen und alle nötigen Materialien auf Eis gestellt. Nun wurden die cDNA-Proben in 0,2 ml PCR-Soft Tubes mit Nuklease-freiem H₂O, gemäß der obigen Tabelle, abhängig von dem jeweiligen Ziel-Gen, verdünnt. Danach wurden die Master-Mix Cocktails durch Beigabe der Probe, des Forward- und Reverse-Primers, ebenfalls gemäß der obigen Tabelle, zum Luna Universal Probe qPCR Master Mix in 0,2 ml PCR Soft Tubes angemischt. Nach diesen Vorbereitungsschritten wurde die auf Eis befindliche 384 Well-Platte gemäß dem angedachten Panel mit entweder 2,25 µl für die Ziel-Gene des PrimeTime Assays oder mit 1,75 µl pro Well für die Ziel-Gene des Sigma-Aldrich Assays der verdünnten cDNA-Proben bestückt. Nun wurden entweder 2,75 µl

oder 3,25 µl erneut abhängig von dem jeweils pro Ziel-Gen verwendeten Assay für ein Endvolumen von 5 µl pro Well hinzu pipettiert.

Pro Platte wurde zudem als Kontrolle auch stets eine cDNA-freie Kontrollreihe angelegt, in der sich statt der verdünnten cDNA, lediglich Nuklease-freies H₂O und der Master-Mix Cocktail befanden.

Die fertig pipettierte Platte wurde anschließend mit einer Klebefolie versiegelt und bei 1000 g für eine Minute bei 4°C zentrifugiert. Vor dem Schritt der Signalamplifikation im Thermocycler wurde die Platte, in Aluminiumfolie verpackt, bei 4°C für maximal 3 Stunden aufbewahrt.

Verwendung des Roche Lightcyclers 480 zur Signalamplifikation und Quantifizierung

Die fertigen Platten wurden anschließend, unter Verwendung des folgenden Protokolls, in den Lightcycler 480 von Roche gegeben.

Programmschritte (5 µl Volumen pro Well, 384 Well Platte konisch)

<u>Schritt</u>	<u>Anzahl Zyklen</u>	<u>Analyse-Modus</u>
Präinkubation	1	Keine
Amplifikation	45	Quantifizierung
Abkühlen	1	Keine

Zykluskonditionen (45 Zyklen pro Platte)

<u>Schritt</u>	<u>Ziel-Temperatur (Anstieg/s)</u>	<u>Dauer (Zyklen)</u>
1) Initiale Denaturierung	95°C (+4,8°C/s) → 60°C (-4,8°C/s)	60 s (1x)
2) Extension (+ Messung)	60°C (0°C/s) → Messung	30 s (45x)
3) Denaturierung pro Zyklus	Messung → 95°C (+4,8°C/s)	15 s (45x)
4) Finales Abkühlen	Letzte Messung → 40°C (-4,8°C/s)	60 s (1x)

Analyse der gemessenen Fluoreszenz gegen die Zeit

Nach erfolgreicher Anwendung des obigen Protokolls, welches die gemessenen Fluoreszenzwerte (von 465-510 nm) der einzelnen Wells in einem Diagramm gegen die Zeit, aufzeichnete, ließ man sich die gemessenen CT-Werte berechnen. Durch die Analyse-Funktion „Abs Quant/2nd Derivative Max for all“ kalkulierte man die individuellen CT-Werte, welche man anschließend in einer TXT-Datei speicherte und in Excel auslesen ließ. Von selbigen CT-Werten bildete man anschließend pro Triplikat den Mittelwert mit SD, um mit diesem die nun

anschließenden Berechnungen zur Quantifizierung der ursprünglichen cDNA-Proben durchzuführen.

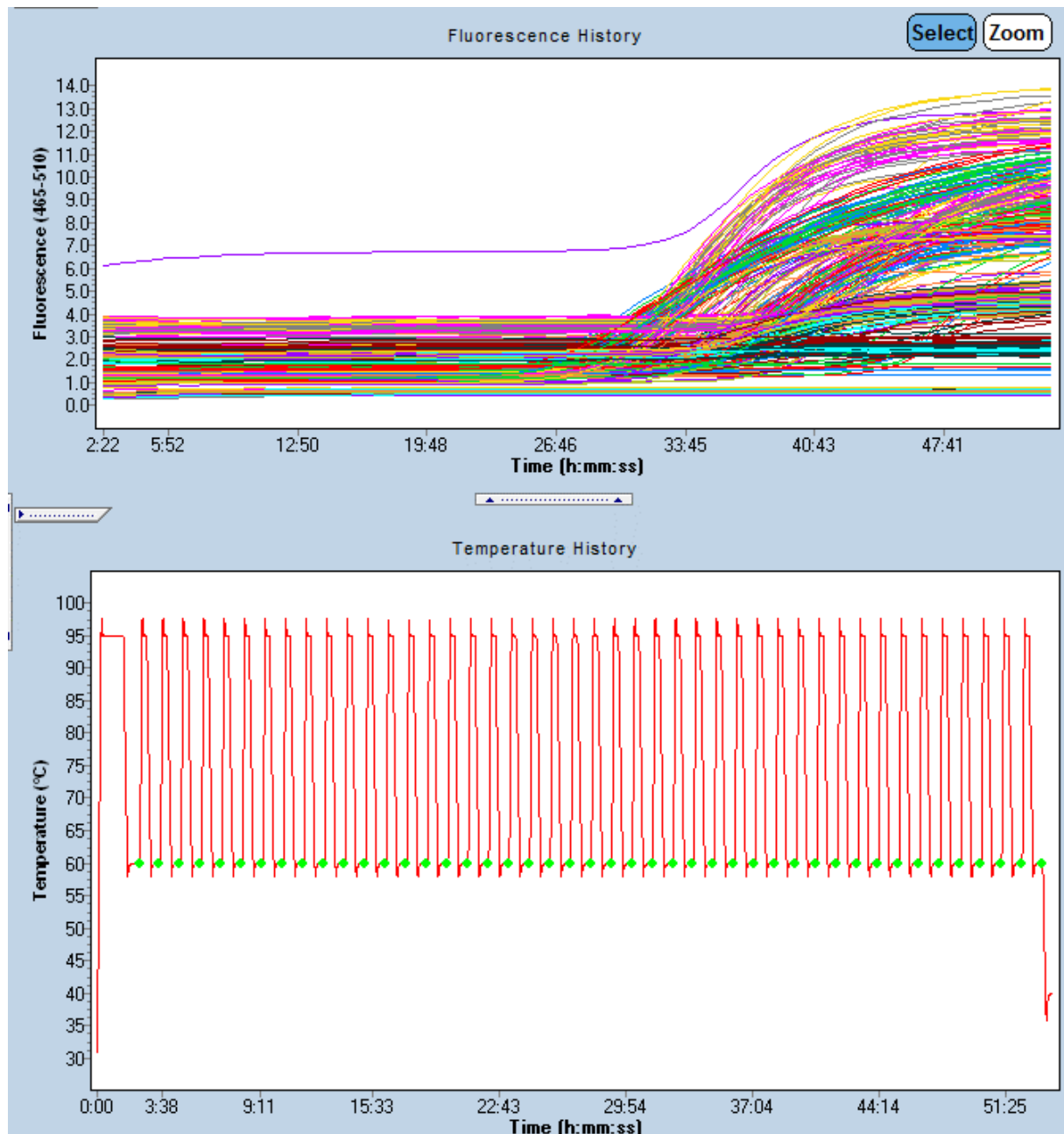


Abbildung 3.1: Screenshot des RT-PCR Programms Roche Lightcycler 480

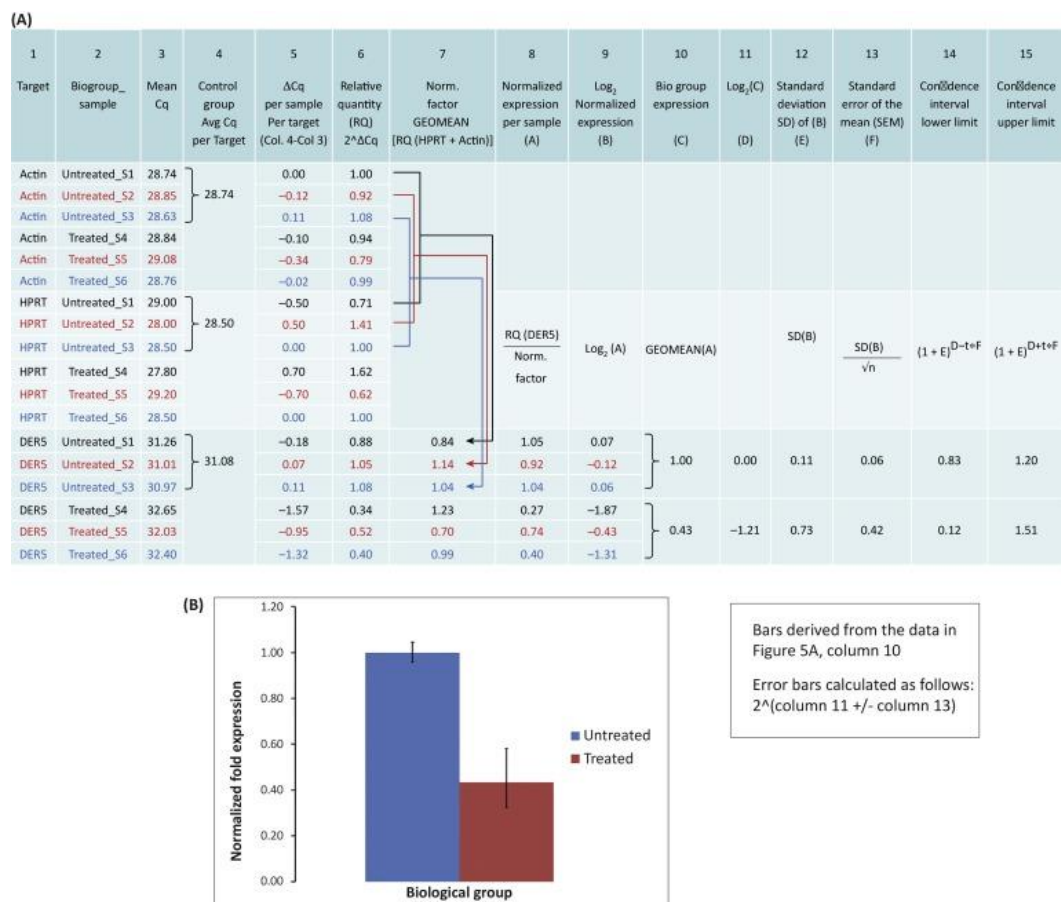
Der untere Bildabschnitt zeigt das angewandte Temperatur-Protokoll. Zunächst erfolgte eine initiale Denaturierung bei 95°C für 60s. Danach ein 45-zyklisches Programm für Extension, Messung und anschließender Re-Denaturierung mit schwankender Temp. Zwischen 60 – 95°C. Zuletzt wurden die Proben, nach erfolgter letzter Messung auf 40°C gekühlt. Der obere Bildabschnitt zeigt das resultierende gemessene Fluoreszenzsignal im Wellenlängenbereich von 465-510 nm über die Zeit. Jede einzelne Kurve stellt das Signal eines Wells der 384 WP dar.

3.5.5 Auswertung der qPCR-Rohdaten und Quantifizierung

Zur weiteren Auswertung der CT Werte der einzelnen Ziel-Gene wurde gemäß dem Protokoll „The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time“ von Taylor et al. (Taylor, Nadeau et al. 2019), wie folgt vorgegangen:

1. Zunächst wurden für die einzelnen Proben die jeweiligen CT-Werte extrahiert und die einzelnen Mittelwerte der Triplikate aller Ziel- und Referenz-Gene gebildet.
2. Nun bildete man jeweils den Durchschnitts-CT-Wert, aller Triplikat-Mittelwerte der beiden Referenz Gene (RPL13A & ACTB) für alle Patientenproben innerhalb der Kontrollgruppe der jeweiligen Analyse.
3. Es musste nun der Δ CT-Wert der Referenz-Gene für jede einzelne Patientenprobe berechnet werden: Indem man von dem jeweiligen Durchschnitts-CT-Wert, aller Triplikat-Mittelwerte der beiden Referenz Gene, den jeweiligen CT-Triplikat-MW von RPL13A bzw. ACTB der jeweiligen Patientenprobe subtrahierte, erhielt man pro Patientenprobe einen Referenz-Gen Δ CT-Wert
4. Anschließend wurde die relative Quantität der Referenz Gene bestimmt, indem man die Potenz aus $(1 + 1,0 (= \text{PCR-Effizienz}))^{\Delta\text{CT}}$ für alle Patientenproben berechnete.
5. In Folge konnte man die normalisierte Expression pro Patientenprobe und dem jeweiligen Ziel-Gen (z.B. IL26) berechnen: Zunächst bildete man erneut den Δ CT-Wert des Ziel-Gens der einzelnen Patientenproben, indem man von dem jeweiligen Durchschnitts-CT-Wert aller Triplikat-MW des Ziel-Gens, den jeweiligen CT-Triplikat-MW des Ziel-Gens der einzelnen Patientenproben subtrahierte. Es musste für die relative Quantität des Ziel-Gens jetzt erneut die Potenz $2^{\Delta\text{CT}}$ für alle Patientenproben gebildet werden. Der Normalisierungsfaktor für eine einzelne Patientenprobe ergab sich nun aus dem Geometrischen Mittel der Patientenproben spezifischen relativen Quantität der beiden Referenz Gene. Man berechnete die normalisierte Expression der einzelnen Patientenproben, indem man die relative Quantität des Ziel-Gens durch den Normalisierungsfaktor teilte. Zur Berechnung der SD, des SEM, des Konfidenzintervalls, sowie des Fehlerbalkens, wurde die normalisierte Expression nun noch zur Basis 2 logarithmiert.
6. Für die einzelnen Kohorten/Gruppen von Interesse bildete man letztlich noch das jeweilige geometrische Mittel aller normalisierten Expressionswerte des jeweiligen Ziel-Gens aller Patientenproben innerhalb der Kohorte. Für die Kontrollgruppe ergab sich innerhalb einer Analyse somit immer die normalisierte Expressionsrate des Ziel-Gens von 1 ($\pm$ SD). Die

anderen hierauf Bezug nehmenden, relativen Expressionsraten der anderen Kohorten/Gruppen konnten somit in Referenz hierzu als x-fache Expression dargestellt werden. Statistische Analysen erfolgten jedoch mit den logarithmierten, normalisierten Expressionsraten.



Trends in Biotechnology

Abbildung 3.2: Datenanalyse für ein typisches Experiment relativer Quantifikation (aus Taylor, Nadeau et al. 2019)

(A) Darstellung des Workflows. In diesem Beispiel wird die DER5 Expression gemessen zwischen behandelten und unbehandelten Kohorten im direkten Gruppenvergleich. Jeder Datenpunkt setzt sich aus drei biologischen Replikaten zusammen. Aktin und HPRT werden als Referenzgene verwendet. Die Arbeitsschritte entsprechen der Beschreibung unter 3.5.5. (B) Grafische Darstellung der durchschnittlichen relativen, normalisierten Expression mit zugehörigen Fehlerbalken (in diesem Fall SEM) (Taylor, Nadeau et al. 2019).

3.6 Immunologische Methodik

3.6.1 IL-26 Serum – ELISA

Das für diesen Bereich verwendete Kit wurde für die Zwecke unserer Versuchsreihe modifiziert und das nachfolgende Protokoll dementsprechend angepasst und bzgl. der ursprünglichen Herstellerangaben (Elabscience 2021) abgewandelt, um eine höhere Sensitivität für niedrige Serumkonzentrationen zu gewährleisten.

Bestandteile des ELAB IL-26 ELISA Test Kits

Micro ELISA Platte (96 Well, flat Bottom)	8 Wells x 12 Strips
Referenz-IL-26-Standard	2x 2000 pg
Konzentrierter biotinylierter Detektionsantikörper (100x)	120 µl
Konzentriertes HRP Konjugat (100x)	120 µl
Referenz Standard- und Sample-Lösung	20 ml
Biotinylierter Detektionsantikörper-Lösung	14 ml
HRP Konjugat Lösung	14 ml
Konzentrierte Wasch-Puffer Lösung (25x)	30 ml
Substrat Reagenz	10 ml
Stopp-Lösung	10 ml
Platten-Versiegelung	5x

Zusätzlich benötigte Materialien und Medien

ddH ₂ O	720 ml
ChromePure Bovine IgG (ganzes Molekül)	11,4 mg/ml
Sterile 96 Well-Platte, U-Bottom	
Biotinyliertes Tyramid	100 mM
Bor-Puffer-Lösung	0,1 M
Wasserstoffperoxid-Lösung	50%
Pierce High Sensitivity NeutrAvidin-HRP	1 mg/ml
Pierce Protein-Free Blocking Puffer (PBS)	
Tween-20	99,9%

Rekonstitution des Biotinyl-Tyramids

Für die Verwendung des IL-26 ELISAs wurden 25 mg Biotinyl-Tyramid durch Zugabe von 687,82 µl DMSO rekonstituiert. Die hergestellte 100 mM Lösung wurde daraufhin in 40 µl Aliquots bei -20°C eingefroren und maximal für 6 Wochen verwendet.

Herstellung der Amplifikations-Puffer-Lösung

Es wurden zunächst 6,18 g Bor-Säure 99% (p.a.) in 1l ddH₂O aufgelöst, um eine 0,1 M Bor-Säure Lösung herzustellen. Anschließend wurde der pH-Wert durch Zugabe von 1 M Natronlauge bzw. von 25% Salzsäure-Lösung unter Verwendung eines kalibrierten pH-Meters auf 8,5 titriert. Die hergestellte Lösung wurde bei 4°C gelagert und für maximal 6 Wochen verwendet.

Allgemeine Vorbereitungen des Assays

Am Tag vor dem Assay wurden alle Serumproben herausgesucht und separat bei -20°C gelagert. Am Tag der Durchführung des ELISAs wurden die Proben für ca. 4 Stunden auf Eis langsam aufgetaut und alle Komponenten des ELSIA-Test Kits auf Raumtemperatur aufgewärmt. Vor der Verwendung der Serum-Proben wurden diese zudem bei 1000 g bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Waschpufferlösung wurde durch Zugabe von 720 ml ddH₂O zu den 30 ml Konzentrat hergestellt und die Arbeitslösungen für den Biotinylierten Detektionsantikörper, sowie für das HRP-Konjugat, jeweils in einer 1:100 Verdünnung durch Zugabe der jeweilig verfügbaren Lösungen zu den Stock-Tubes 15 Minuten vor der individuellen Verwendung, zubereitet.

Herstellung der Bovine IgG Block-Lösung

Um unspezifischen Signalinterferenzen, durch das Abfangen für das Assay nicht relevanter Antikörper vorzubeugen, wurde die Standard- und Sample-Lösung mit Bovine IgG versetzt und Hitze-aggregiert. Hierfür wurde für die Standard-Wells eine 10 µg/ml haltige Bovine IgG Lösung (Stock 11,4 mg/ml) hergestellt und für die Patientenproben, abhängig von der jeweiligen Verdünnung des Serums im weiteren Assay, eine entsprechend höher konzentrierte Lösung (Bsp.: 20 µg/ml für 1:2 bzw. 80 µg/ml für 1:8). Die Hitze-Aggregation der IgG Antikörper erfolgte bei 63°C für 30 Minuten in einem vorgeheizten Wasserbad. Die Lösungen wurden vor Verwendung anschließend auf RT heruntergekühlt. Das „Crosslinking“ von Bovine IgG Antikörpern konnte in diversen Vorversuchen im Vergleich zur Behandlung der Proben mit spezifischen Block-Lösungen (z.B. Heteroblock), die besten Ergebnisse erzielen.

Präparation des Standards und der Serumproben

In einer bereitgelegten, sterilen 96 Well Platte mit U-Bottom wurden nun je 60 µl pro Well (bzw. bei höheren Verdünnungen entsprechend weniger), der jeweiligen Serumproben in Duplikaten, vorgelegt. Der IL-26-Standard wurde bei 10,000 g für eine Minute bei RT zentrifugiert und anschließend 1 ml der Bovine IgG 10mg/ml Lösung hinzugegeben. Während der 10 min Rekonstitutionszeit des Standards, unter regelmäßiger Invertierung des Tubes, wurden 2,0 ml Eppendorf-Röhrchen für die Verdünnungsreihe, mit je 500 µl der 10 mg/ml Bovine IgG Lösung versehen.

Nach Ablauf der Zeit wurde die Inkubation der Verdünnungsreihe des Standards und der restlichen Serumproben auf der 96 WP mit dem aggregierten Bovine-IgG für 30 Minuten bei RT möglichst zeitgleich gestartet:

Der 2000 pg/ml haltige IL-26 Standard wurde in 1:2 Verdünnungsschritten durch Transfer von je 500 µl in das jeweils nachfolgende Tube (bis auf Ausnahme der letzten, IL-26-freien Stufe) unter mehrmaligem Auf- und Abpipettieren, graduell verdünnt. Der Gradient umfasste dabei die Verdünnungen 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 und 0 pg/ml. Die höher konzentrierte Bovine IgG Lösung, wurde, abhängig von der gewählten Verdünnung der Serumproben, mittels einer Multikanal-Pipette zu den Samples hinzugegeben und ebenfalls durchmischt. In der Regel wurde eine 1:2 oder 1:10 Verdünnung für die Serumproben gewählt.

Start des IL-26 ELISAs

Nach Ende der Inkubation des Standards und der Serumprobenverdünnungen wurde auch die Standard-Verdünnungsreihe auf die separate 96 WP in Duplikaten transferiert. Nun wurden je 100 µl pro Well von der vorgelegten 96 WP, mittels einer Multi-Kanal Pipette auf die bereits mit dem Primär-Antikörper beschichtete ELISA-Platte des Test-Kits übertragen. Zur Bindung der IL-26 Moleküle wurde die ELISA Platte daraufhin für 90 Minuten bei 37°C, mit einer Schutzfolie versehen, inkubiert.

Danach wurde die Platte schwingvoll über einem Waschbecken ausgegossen und auf einem Stapel Papiertücher trocken geklopft. Anschließend gab man je 100 µl der vorbereiteten Biotinyl-Detektionsantikörper Arbeitslösung in die Wells der ELISA Platte und inkubierte erneut für eine Stunde bei 37°C mit einer Schutzfolie.

Erneut wurde das Ausgießen und Trocknen, wie zu vor beschrieben, wiederholt und nun mit 300 µl Wasch-Puffer Lösung pro Well gewaschen. Die Platte wurde hierfür ca. 1 – 2 Minuten auf einen Plattenrüttler gestellt und danach erneut ausgegossen und getrocknet. Der Waschvorgang wurde nun weitere viermal wiederholt.

Nach Beendigung des Waschvorgangs wurde mit 100 µl HRP-Konjugat Lösung pro Well, die zuvor vorbereitet wurde, erneut bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, um anschließend erneut sechsmal zu waschen.

TSA-Amplifikation

Zu den Wells wurde nun je 100 µl Biotinyl-Tyramid (100 mM Stock) in einer 1:100 Verdünnung in der vorbereiteten Bor-Säure Lösung, die direkt vor der Verwendung zudem mit 0,01% H₂O₂ versetzt wurde, gegeben und für 15 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde erneut sechsmal gewaschen.

Danach gab man je 100 µl pro Well an Neutravidin-HRP hinzu, welches zuvor 1:20,000 in Protein-Free Blocking Puffer verdünnt und mit 0,05% Tween-20 ergänzt wurde und inkubierte ein weiteres Mal für 20 Minuten bei RT im Dunkeln. Zuletzt wurde erneut achtmal gewaschen.

Substratumsatz und Messung der optischen Dichte

Auf die nun fertige ELISA-Detektionsplatte wurden nun mit einer Multikanal-Pipette 90 µl des Substrats pro Well aufgetragen und die Platte mit einer neuen Schutzfolie im Dunkeln bei RT inkubiert. Hierbei wurde der allmähliche Farbumschlag regelmäßig überprüft und zu einem Zeitpunkt gestoppt, zu dem die Farbgraduierung der Standardkurve zwar bereits vollständig ausgeprägt, die IL-26-freie, letzte Verdünnung des Standards jedoch noch farblos erschien. In derselben Reihenfolge, in der man das Substrat auf die Platte auftrug, wurde nun die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Stopp-Lösung pro Well unterbrochen. Die Optische Dichte der nun gelben Wells, wurde durch das Multiskan FC Mikrotiterplatten Photometer, welches 15 Minuten zuvor zur Temperaturkalibrierung gestartet wurde, gemessen. Hierfür wurde ein Detektionswellenlänge von 450 nm, sowie eine Korrekturwellenlänge von 560 nm gewählt, und letztere Messung von der ersten abgezogen. Die ausgelesenen OD-Werte wurden in einer Excel-Datei gespeichert.

Berechnung der Serumkonzentrationen der Patientenproben mittels Standardkurve

Die ermittelten OD-Werte wurden nun mittels einer Excel-Datei, unter Berechnung und Plotten der Standardkurve ihren entsprechenden IL-26 Serumkonzentrationen zugeordnet. Hierfür wurde eine vollautomatisierte Arbeitsmappe verwendet, in welche man sowohl die jeweilige Verdünnung, als auch die Zuordnung der OD-Werte zu den Patienten-IDs eintrug. Unter Berechnung der Mittelwerte der angelegten Duplikate wurden hier wiederum die berechneten IL-26 Ausgangskonzentrationen, in pg/ml ausgegeben.

Es konnte bei Proben deren OD „out of range“ erschien, kein signifikanter Vorteil durch wiederholte Messungen der Proben, oder höhere Verdünnungen gewonnen werden. Diese Datenpunkte wurden somit mit dem höchsten Wert der Standardkurve (2000 pg/ml) gleichgesetzt.

Bei wiederholten Messungen einzelner Patientenproben, wurde, um ein Selection-Bias zu vermeiden, der jeweils erste verfügbare Messpunkt verwendet. Im Rahmen der statistischen Untersuchungen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen einer Analyse mit den jeweils ersten Datenpunkten aller Patientenproben, oder den Mittelwerten aller verfügbaren Datenpunkte jedes einzelnen Patienten, festgehalten werden. Eine Verfälschung der erhobenen Gruppenunterschiede durch diese Festlegung ist somit unwahrscheinlich.

3.6.2 Induktion von *IL-1-R1* in PBMCs und Immunphänotyping von *Th17* Zellen

Medien

FACS-Wash (DPBS, 1% FCS)

Dulbeco Phosphate Buffered Saline (DPBS)	495 ml
Bovine Calf Serum (FCS)	5 ml

FACS-Fix (FACS-Wash, 2% PFA)

FACS-Wash (DPBS, 1% FCS)	47,37 ml
Formaldehyd 38%	2,63 ml

Rekonstitutionsmedium für Zytokine (DPBS, 0,1% BSA, steril filtriert)

Dulbeco Phosphate Buffered Saline (DPBS)	50 ml
Bovine Serum Albumin	500 mg

Essigsäurelösung für IL-2 Rekonstitution (100 mM Essigsäure in H₂O, steril filtriert)

Ampuwa Wasser, steril	9,943 ml
Essigsäure, 99,9%	57,2 µl

Verwendete Antikörper und Fluorophore mit Inkubationsbedingungen und Verdünnungen

<u>Antigen</u>	<u>Fluorophore</u>	<u>Kanal (BP-Filter in nm)</u>	<u>Laser (in nm)</u>	<u>Verdün- nung</u>	<u>Inkubation</u>
Live/dead	APC-Cy7	APC-A750 (780/60)	638	1:400	30 Minuten bei RT im Dunkeln
CD3	BV510	KO-525 (525/40)	405	1:50	
CD4	BV605	Violet 610 (610/20)	405	1:25	
CD8	ECD	ECD/mCherry (610/20)	561	1:50	
CD26	PeCy7	PC7 (780/60)	561	1:50	
CD161	BV421	PB450 (450/45)	405	1:25	
IL-1-R1	PE	PE/DsRed (585/42)	561	1:10	
CCR4	APC	APC (660/20)	638	1:25	
CCR6	AF488	FITC (525/40)	638	1:100	
CD45RO	PerCPCy5.5	PerCP/PC5 (690/50)	488	1:100	
CXCR3	BV785	BV780 (780/60)	405	1:50	20 Minuten bei 37°C, 5% CO ₂

Rekonstitution der verwendeten Zytokine

Vor der in-vitro Stimulation der PBMCs, wurden die angelieferten lyophilisierten Zytokine zunächst unter sterilen Bedingungen rekonstituiert und aliquotiert: IL-2 wurde hierfür bei 11,000 g für 3 Minuten bei RT zentrifugiert und anschließend auf eine Konzentration von 1 mg/ml zunächst mit der vorbereiteten und mit einem 0,2 µm Filter steril filtrierten 100 mM Essigsäurelösung rekonstituiert. Nach 3 Minuten Inkubationszeit bei RT, wurde mit DPBS, 0,1% BSA (ebenfalls steril filtriert) auf eine Stock-Konzentration von 100.000 IU/ml weiter verdünnt. Daraufhin wurden Aliquots angefertigt und diese bei -20°C eingefroren.

IL-1β wurde ebenfalls wie beschrieben zentrifugiert, jedoch danach nur mit 50 µl sterilem H₂O zunächst rekonstituiert und anschließend mit DPBS, 0,1% BSA auf eine Stock-Konzentration von 20 µg/ml verdünnt und aliquotiert. Die Aliquots wurden ebenfalls bei -20°C eingefroren.

Vorbereitung der PBMCs und in-vitro Stimulation

Um die Patienten-PBMCs für die Oberflächenfärbung vorzubereiten, wurden diese entweder direkt nach der Abnahme und Isolation aus den CPT-Röhrchen, wie unter 3.4.2 beschrieben, in-vitro über Nacht inkubiert und am nächsten Tag stimuliert oder, sollten diese zuvor eingefroren gewesen sein, wie unter 0 beschrieben, zunächst aufgetaut und anschließend ruhen gelassen (mit bzw. ohne in-vitro Stimulation).

Hierfür wurden die zunächst eingefrorenen PBMCs mit 1×10^6 PBMCs in 200 µl R10 Medium plus 1000 IU/ml IL-2 (oder nicht) pro Well (also einer Dichte von 5×10^6 PBMCs/ml) bei 37°C, 5% CO₂, auf einer sterilen 96 Well Platte mit U-Bottom stimuliert und zugleich, vor weiterer Verarbeitung, über Nacht ruhen gelassen. Die am Tag vor der Färbung „frisch“ isolierten PBMCs wurden ebenfalls auf einer sterilen 96

WP mit U-Bottom in 200 µl R10 Medium mit 1×10^6 PBMCs pro Well bei 37°C, 5% CO₂, jedoch zunächst ohne Zellstimulus, in-vitro über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag der Färbung wurden die PMBCs mit 100 ng/ml IL-1β für 4 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ stimuliert (oder nicht).

Ab diesem Zeitpunkt wurden die zuvor eingefrorenen und die zuvor nicht eingefrorenen PBMCs in allen folgenden Schritten gleichbehandelt.

Färbung der Oberflächenantigene

Zur Vorbereitung der Färbung wurde die 96 WP bei 540 g und RT zunächst für 5 Minuten zentrifugiert, um anschließend die Zellüberstände in 0,2 ml PCR-Soft Tubes zu sammeln (für eine spätere mögliche Quantifizierung der IL-26 Konzentrationen mittels ELISA) und um die Zellpellets danach in frischen 200 µl R10 Medium zu resuspendieren. Die PBMCs wurden daraufhin auf eine weitere 96 WP mit konischem Boden und niedrigen Bindungseigenschaften transferiert. Nun wurde zunächst in einer 1:50 Verdünnung, das CXCR3 Antigen in-vitro für 20 Minuten bei 37°C, 5% CO₂ im Dunkeln gefärbt. Dieser Schritt war nötig, um das zwischen der Zelloberfläche und Intrazellularraum zirkulierende Antigen anfärben zu können. Danach wurde erneut zentrifugiert und anschließend mit 200 µl pro well FACS Wash, die nicht gebundenen CXCR3 Antikörper gewaschen. Dieser Schritt wurde nach abermaligem Zentrifugieren und Abgießen der Überstände mit Schwung über einem Waschbecken, erneut wiederholt. Zeitgleich wurde ein Master-Mix mit allen übrigen FACS-Antikörpern der obigen Tabelle, inklusive Live/dead Stain gemäß der angegebenen Verdünnungen, angefertigt. Hierfür wurden 50 µl FACS Wash pro Well benötigt und die Antikörper dafür in einem 15 ml Falcon verdünnt. Auf die zentrifugierten Zellpellets wurden anschließend je 50 µl des Master-Mix gegeben und mit einer Multikanalpipette resuspendiert. Die PBMCs wurden daraufhin für 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert.

Nach erneutem, zweimaligem Waschen, wurden die PBMCs in je 200 µl FACS-Fix Lösung für weitere 30 Minuten auf Eis fixiert und anschließend erneut zweimal gewaschen. Die nun vollständig gefärbten PBMCs wurden letztlich in 250 µl FACS Wash resuspendiert und mit einer Klebefolie abgedeckt und in Aluminiumfolie eingewickelt. Bis zur Analyse am Durchflusszytometer, die in der Regel innerhalb von 1-2 h stattfand, wurden die PBMCs bei 4°C im Dunkeln gelagert.

3.6.3 IL-26 Immunhistochemie

Verwendete Primärantikörper und zugehörige Isotypenkontrollen

<u>Antigen (human)</u>	<u>Klon</u>	<u>Host</u>	<u>Antikörperklasse</u>	<u>Firma</u>	<u>Konzentration</u>
IL-26	MAB1375	Maus	IgG2B, monoklonal	R&D	10 µg/ml
Isotypenkontrolle	MAB0042	Maus	IgG2B, monoklonal	R&D	10 µg/ml

Verwendete Chemikalien und Medien

Pufferlösung zur Antigendemaskierung im Wasserbad (TRIS-EDTA, pH 9)

ddH ₂ O	990 ml
Antigen Retrieval Puffer (100x, pH 9,0)	10 ml

Pufferlösung zum Waschen der IHC Slides (TBST)

ddH ₂ O	900 ml
Tris Buffered Saline mit Tween 20 (TBST 10x)	100 ml

Alkoholreihe zum Deparaffinisieren und Dehydrieren (je auf- und absteigend getrennt)

<u>Alkohol</u>	<u>Anzahl Bäder</u>	<u>Dauer absteigend (min)</u>	<u>Dauer aufsteigend (sec)</u>
Xylol, 100%	3 x	8	10
Ethanol, 100%	2 x	4	10
Ethanol, 96%	1 x	2	10
Ethanol, 70%	1 x	2	10
ddH ₂ O	1 x	5	-

Bestandteile DAKO Envision+ System HRP (DAB) Kit

Peroxidase Block (0,3% H ₂ O ₂)	15 ml
Labelled Polymer HRP, goat-anti-mouse	15 ml
DAB Substrat Puffer-Lösung, pH 7,5	18 ml
DAB Chromogen (3,3'-Diaminobenzidine Chromogen)	1 ml

Weitere verwendete Komponenten

Normal Goat Serum	60 mg/ml
Saures Hämalun nach Mayer	1 l
Roti-Histokitt II, synthet. Einschlussmittel	100 ml
Menzel Deckgläser, Glas	24 x 60 mm

DAKO Serum free Protein Block

110 ml

Rekonstitution des Normal Goat Serums

Das gefrier-getrocknete Normal Goat Serum wurde in 10 ml ddH₂O rekonstituiert auf eine Endkonzentration von 60 mg/ml. Die vorbereiteten Aliquots wurden daraufhin bei -30°C eingefroren und wiederholte Auftau-Zyklen vermieden.

Rekonstitution der verwendeten Primärantikörper

Die verwendeten Primärantikörper wurden zunächst bei 11,000 g für eine Minute bei RT zentrifugiert. Daraufhin wurden die Antikörper in sterilem DPBS ohne Zusätze, auf ihre Stockkonzentration von 0,5 mg/ml für anti-IL-26 bzw. den Isotyp, rekonstituiert und anschließend aliquotiert. Die Aliquots wurden wiederum bei -30°C gelagert und erneut Auftau-Zyklen vermieden.

Weitere Vorbereitungen und Details

Vor jedem Batch an IHC-Slides wurden bestimmte Vorkehrungen getroffen. So wurden die oben beschriebenen Pufferlösungen stets neu angemischt und Antikörperaliquots lediglich einmal aufgetaut und auf Eis gelagert. Die verwendeten Koplin-Gefäße wurden vor jeder Verwendung gereinigt und die Alkoholreihen nach mehrmaliger Verwendung ausgetauscht. Während der Färbung der Slides wurden diese stets feucht gehalten und penibel darauf geachtet, dass kein Austrocknen des Gewebes stattfindet. Zum Selbstschutz wurde stets unter einer Sicherheitswerkbank mit Abzug gearbeitet und Handschuhe sowie Kittel getragen.

Vor der Entscheidung, welchen der angefertigten Gewebestücke man je Patient für die Färbung der Antigene verwenden würde, wurden probeweise zudem von allen Blöcken einzelne Slides mit Hämalaun angefärbt, um die Qualität des Gewebes zu beurteilen. Hierbei wurde u.A. auf die Zahl vorhandener Leukozyten, das Verhältnis von Zellen zu Binde- und Fettgewebe, sowie die Größe des Gewebestückes geachtet.

Deparaffinisierung und Antigen-Demaskierung

Die ausgewählten Slides wurden vor Verwendung bei 60°C in einem Inkubator für eine Stunde „gebacken“. Die nun angeschmolzenen Paraffinslides wurden anschließend gemäß der obigen Tabelle durch eine prozentual absteigende Alkoholreihe gezogen, um das noch im Gewebe gebundene Paraffin zu lösen. Zeitgleich wurde ein Koplin-Gefäß mit frisch angemischtem TRIS-EDTA Puffer pH 9 befüllt und in einen mit Wasser befüllten Topf mit Glasabdeckung oberhalb des Puffers gestellt. Das Wasserbad wurde daraufhin auf einer Kochplatte auf höchster

Einstellung erhitzt, bis eine Zieltemperatur der Pufferlösung von $97\pm 1^\circ\text{C}$ erreicht wurde. Die am Ende der Alkoholreihe angelangten Gewebeproben wurden nun mit einem Bleistift beschriftet und in das Pufferbad gegeben, um für 20 Minuten bei der zuvor erreichten Temperatur gekocht zu werden.

Nach Ablauf der Zeit wurde das Kopplin-Gefäß aus dem Wasserbad entnommen, um für weitere 25 Minuten bei RT abkühlen zu können. Die nun Antigen-demaskierten Gewebeproben wurden aus dem Puffer entnommen und gründlich mit TBST in einer Feuchtkammer gespült. Nach vorsichtigem Trockentupfen der Gewebeumgebung wurde mittels eines Fett-Stiftes die Zirkumferenz des Gewebes umrandet und erneut mit TBST gespült.

Blocken unspezifischer Signalquellen und Inkubation der Primärantikörper

Nach erneutem Trockentupfen der Gewebepерipherie, ohne diese zu berühren, wurde für 5 Minuten bei RT mit 100 µl DAKO Peroxidase Block die intrinsische Peroxidase-Aktivität des Gewebes inhibiert. Danach wurde erneut mit TBST gespült und anschließend wie zuvor mit je einem Tropfen Serum free Protein Block Puffer von DAKO unspezifische Bindungsstellen für 30 Minuten bei RT blockiert. Nachdem man erneut mit TBST gespült hat, wurden die Primärantikörper appliziert.

Diese wurden wie folgt angemischt: Sowohl die Isotypenkontrolle, als auch der anti-IL-26 Antikörper wurden auf 10 µg/ml in TBST, welches mit 5% Normal Goat Serum versetzt wurde, verdünnt und pro Slide 100 µl vorbereitet. Die erneut trockengetupften Slides wurden nun mit dem Antikörper überschichtet und in einer Feuchtkammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei jedem angefertigten Batch an IHC-Slides wurde mindestens eine jeweilige Isotypenkontrolle mitangefertigt, um unspezifische Signale feststellen zu können.

Inkubation des Polymer-HRP Konjugats und Färbung der Slides

Am nachfolgenden Tag wurden die Slides aus dem Kühlschrank entnommen und auf ihre Feuchtigkeit überprüft. Anschließend wurden nicht gebundene Antikörper vorsichtig, jedoch gründlich mit TBST vom Gewebe gespült. Nun wurden die erneut trocken getupften Slides mit einem Tropfen HRP konjugierten, polymerisierten goat-anti-mouse Sekundärantikörper für 30 Minuten bei RT inkubiert und anschließend erneut gründlich mit TBST gespült. Zum Färben der nun markierten IL-26 Moleküle wurde eine DAB-Arbeitslösung durch Zugabe von einem Tropfen DAB-Chromogen zu je 1 ml DAB-Substrat Puffer hergestellt. Die Slides wurden daraufhin mit je 100 µl der Lösung überschichtet und für 7 Minuten bei RT inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurde anschließend mit einer Spritzflasche ddH₂O gespült und die Slides für 5 Minuten in einem Wasserbad gewaschen. Die nun braun gefärbten Proben

wurden danach in ein weiteres, mit Häkalaunlösung befülltes Kopplin-Gefäß gegeben und hierin für weitere 5 Minuten gegengefärbt. Schließlich gab man die Slides in ein weiteres Wasserbecken, um das restliche Häkalaun unter fließendem Wasser für weitere 5 Minuten zu entfernen.

Aufsteigende Alkoholreihe und Eindecken der Slides

Die nun zweifach gefärbten Slides wurden nun erneut, gemäß der obigen Tabelle, durch eine aufsteigende Alkoholreihe gezogen, um dem Gewebe Wasser zu entziehen. Am Ende der Alkoholreihe wurden die Slides für wenige Sekunden luftgetrocknet und anschließend mit je einem Tropfen synthetischem Einschlussmedium und einem Menzel-Glas eingedeckt. Die fertig präparierten Slides wurden schließlich für mindestens 24 Stunden unter dem Abzug getrocknet und anschließend in Kassetten bei Raumtemperatur bis zur weiteren Analyse verstaut.

3.6.4 Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie

Verwendete Primärantikörper und zugehörige Isotypenkontrollen

<u>Antigen (human)</u>	<u>Klon</u>	<u>Host</u>	<u>Antikörper-</u> <u>klasse</u>		<u>Firma</u>	<u>Konzentra-</u> <u>tion</u>
IL-26	MAB1375	Maus	IgG2B, klonal	mono-	R&D	10 µg/ml
Isotypenkontrolle	MAB0042	Maus	IgG2B, klonal	mono-	R&D	10 µg/ml
CD3	EP4426	Kaninchen	IgG, klonal	mono-	Abcam	2,32 µg/ml
Isotypenkontrolle	AB-105-C	Kaninchen	IgG, klonal	mono-	R&D	2,32 µg/ml
CD163	EDHU-1	Maus	IgG1, klonal	mono-	Biorad	1,25 µg/ml
Isotypenkontrolle	G3A1	Maus	IgG1, klonal	mono-	CST	1,25 µg/ml
CD68	D4B9C	Kaninchen	IgG, klonal	mono-	CST	365 ng/ml
Isotypenkontrolle	AB-105-C	Kaninchen	IgG, klonal	mono-	R&D	365 ng/ml

SMA	1A4	Maus	IgG2a, klonal	mono-	Agilent	700 ng/ml
Isotypenkontrolle	eBM2a	Maus	IgG2a, klonal	mono-	TFS	700 ng/ml

Verwendete Sekundärantikörper und Fluorophore

<u>Antigen (species)</u>	<u>Fluoro- phore</u>	<u>Host</u>	<u>Antikörperklasse</u>	<u>Firma</u>	<u>Verdünnung</u>
Anti-mouse	FITC	Ziege	IgG, polyklonal	Dia- nova	1:100
Anti-rabbit	FITC	Ziege	IgG, polyklonal	Dia- nova	1:100

Verwendete Chemikalien und Medien

Pufferlösung zur Antigendemaskierung im Wasserbad (TRIS-EDTA, pH 9)

s. 3.6.3

Pufferlösung zum Waschen der IHC Slides (TBST)

s. 3.6.3

Alkoholreihe zum Deparaffinisieren (nur aufsteigend)

s. 3.6.3 (lediglich aufsteigende Reihe)

Bestandteile Alexa Fluor 594 Tyramide SuperBoost Kit

Blocking Puffer (10% Goat-Serum) (Komp. A)	22,5 ml
Poly-HRP-konjugierter Sekundärantikörper (anti-mouse IgG) (Komp. B)	7,5 ml
Alexa Fluor 594 Tyramid Reagenz 100x (Komp. C1)	
Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂ (3%) (Komp. C2)	28,5 ml
Reaktionspuffer 20x (Komp. C3)	6 ml
Reaktionsstopplösung (Komp. D)	8 mg
Dimethylsulfoxide (DMSO) (Komp. E)	200 µl

Weitere verwendete Komponenten

Normal Goat Serum	60 mg/ml
Normal Donkey Serum	60 mg/ml
DAKO Peroxidase Block (0,3% H ₂ O ₂)	15 ml
Menzel Deckgläser, Glas	24 x 60 mm
DAKO Serum free Protein Block	110 ml
PBS (pH 7,2)	10,2 g
Nagellack, klar	
Vectashield Mounting Medium (DAPI)	
Ethanol 95%	

Rekonstitution des Normal Donkey Serums

Das gefrier-getrocknete Normal Donkey Serum wurde in 10 ml ddH₂O auf eine Endkonzentration von 60 mg/ml rekonstituiert. Die vorbereiteten Aliquots wurden daraufhin bei -30°C eingefroren und wiederholte Auftau-Zyklen vermieden.

Rekonstitution der verwendeten Primärantikörper

Die verwendeten Primärantikörper wurden gemäß der jeweiligen Herstellerangaben ggf. aliquotiert und anschließend je nach Herstellerempfehlung bei -30°C bzw. 4°C gelagert.

Rekonstitution der verwendeten Sekundärantikörper

Die verwendeten Sekundärantikörper waren zum Zeitpunkt der Studie bereits in nach Herstellerangaben rekonstituiertem Zustand bei -20°C gelagert.

Vorbereitung des Alexa Fluor 594 Tyramide SuperBoost Kit

Alle Komponenten des Kits wurden zunächst auf RT aufgewärmt.

Das AF594 Tyramid Reagenz wurde in 50 µl DMSO unter Abschirmung von Licht aufgelöst. Die 100x konzentrierte Lösung wurde bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Die 11x konzentrierte Reaktionsstopplösung wurde durch Zugabe von 1,45 ml 95% Ethanol, zu 8 mg der Komponente D vorbereitet und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Die nun folgenden Komponenten wurden jeweils direkt vor ihrer Verwendung frisch hergestellt:

Zur Herstellung der 100x konzentrierten Wasserstoffperoxid-Lösung, wurde 1 Tropfen der Komponente C2 zu 1 ml ddH₂O gegeben. Die 1x konzentrierte Reaktionspufferlösung wurde durch Zugabe von 50 µl der Komponente C3 zu 1 ml ddH₂O hergestellt. Die zum Stoppen der

Reaktion verwendete Arbeitslösung wurde durch 1:11 Verdünnung der Komponente D in PBS (pH 7,2) vorbereitet.

Deparaffinisierung und erste Antigendemaskierung

Die unter diesem Punkt durchgeführten Schritte gleichen dem IHC-Protokoll unter 3.6.3 und werden deshalb an dieser Stelle nicht erneut aufgeführt.

Blocken unspezifischer Signalquellen und Inkubation des ersten Primärantikörpers

Nach erneutem Trockentupfen der Gewebeperipherie, ohne diese zu berühren, wurde für 10 Minuten bei RT mit 100 µl DAKO Peroxidase Block die intrinsische Peroxidase-Aktivität des Gewebes inhibiert. Danach wurde erneut mit TBST gespült und anschließend wie zuvor mit je einem Tropfen der Blocking Puffer Lösung des AF594 Tyramide SuperBoost Kits unspezifische Bindungsstellen für eine Stunde bei RT blockiert. Nachdem man erneut mit TBST gespült hat, wurden die ersten Primärantikörper appliziert.

Diese wurden wie folgt angemischt: Sowohl die Isotypenkontrolle, als auch der anti-IL-26 Antikörper wurden auf 10 µg/ml in TBST, welches mit 10% Normal Goat Serum versetzt wurde, verdünnt und pro Slide 100 µl vorbereitet. Die erneut trockengetupften Slides wurden nun mit dem Antikörper überschichtet und in einer Feuchtkammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei jedem angefertigten Batch an Immunofluoreszenz (IF) Slides wurde mindestens eine konzentrationsgleiche Isotypenkontrolle pro Primärantikörper mitangefertigt, um unspezifische Signale ausschließen zu können.

Umsatz des Tyramid Reagenz

Anschließend wurde am nächsten Tag die Tyramid Arbeitslösung mit je 100 µl kalkuliertem Volumen pro Slide wie folgt hergestellt:

1x Reaktionspufferlösung	98 µl
100x Tyramid Reagenzlösung	+ 1 µl
100x H ₂ O ₂ Lösung	+ 1 µl

Zuvor wurden die noch mit dem anti-IL-26 Primärantikörper überschichteten Slides zunächst gründlich mit TBST gespült, um nicht gebundene Primärantikörper zu entfernen. Anschließend wurde mit je einem Tropfen Poly-HRP-konjugierten Sekundärantikörper (anti-mouse IgG, Komp. B) für eine Stunde bei RT inkubiert und erneut gründlich mit TBST gespült. Die nun für den Umsatz des Tyramid Reagenz vorbereiteten Slides wurden dann mit je 100 µl der vorbereiteten Tyramid-Arbeitslösung überschichtet und für 10 Minuten bei RT im Dunkeln

inkubiert. Alle weiteren Schritte fanden anschließend stets unter Abschirmung von Licht statt. Zur Beendigung der ablaufenden Reaktion wurden nun je 100 µl der 1:11 verdünnten Reaktionsstopplösung aufgetragen und anschließend gründlich mit TBST gespült.

Multiplexing mit weiteren Primärantikörpern artgleicher und artfremder Spezies (Maus/nicht Maus)

Um zusätzliche Antigene mit weiteren Primärantikörpern, eines artgleichen Hosts, wie des ersten Primärantikörpers gegen IL-26 (Maus), zu markieren, musste erneut eine Antigen-Demaskierung, wie zuvor beschrieben, in einem aufgeheizten Wasserbad erfolgen. Hierfür wurde erneut TRIS-EDTA Puffer, pH 9 in einem Wasserbad auf $97\pm 1^\circ\text{C}$ erhitzt und die entsprechenden Slides hierin für 20 Minuten gekocht. Anschließend wurden die Slides für 20 Minuten bei RT erneut abgekühlt und mit TBST gespült.

Für weitere Primärantikörper artfremder Hosts (also nicht Maus bei anti-IL-26 aus Maus) entfiel der Schritt einer erneuten Antigen-Demaskierung.

Alle Slides wurden anschließend gleichermaßen zunächst für 10 Minuten erneut mit einem Tropfen Peroxidase-Block bei RT inkubiert und anschließend unspezifische Bindungen mit Serum-free Protein Blocking Lösung für weitere 30 Minuten bei RT blockiert.

Der zweite Primärantikörper wurde nun gemäß der obigen Tabelle, in 10% Normal-Goat-Serum TBST, mit je 100 µl pro Slide, angemischt und die Slides daraufhin erneut über Nacht bei 4°C im Dunkeln in einer Feuchtkammer inkubiert. Für jedes weitere Zielantigen, wurde zudem stets eine konzentrationsgleiche Isotypenkontrolle angelegt, um Hintergrundsignal detektieren zu können.

Am darauffolgenden Tag wurden die Slides erneut gründlich mit TBST gespült und mit je 100 µl des zweiten Sekundärantikörpers überschichtet. Dieser wurde abhängig der Zielspezies des Hosts des zweiten Primärantikörpers gewählt (anti-mouse FITC oder anti-rabbit FITC) und in 10% Normal-Donkey Serum TBST in einer 1:100 Verdünnung angemischt. Dieser Antikörper wurde nun für eine weitere Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend ein letztes Mal die Slides mit TBST gespült. Für den zweiten Sekundärantikörper wurde keine Isotypenkontrolle geführt.

Eindecken und Versiegeln der Slides

Die nun fertigen Slides wurden letztlich vorsichtig in der Gewebeperipherie trocken getupft und anschließend mit je einem Tropfen DAPI-Mounting Medium zur Färbung der Kerne und Feuchthalten des Gewebes benetzt.

Die nun mit DAPI-Medium befeuchteten Slides wurden anschließend mit einem Deckglas eingedeckt und, um diese vor Austrocknung zu schützen, mit Nagellack ringsum großzügig versiegelt.

Sobald der Nagellack ausreichend getrocknet war, wurden die Slides in einer Box luftdicht mit Parafilm Verschlussfolie versiegelt, um RedOx-Reaktionen zu unterbinden und bei -20°C für maximal vier Wochen bis zu Ihrer Analyse an einem Konfokalmikroskop eingefroren.

Verwendung des Konfokalmikroskop Leica SP5

Für die Analyse der angefertigten Slides wurde das Leica SP5 Konfokalmikroskop, mit folgenden Lasern und Farben, sowie Objektiven verwendet:

<u>Farbe</u> <u>des La-</u>	<u>Wellenlänge</u> <u>(nm)</u>	<u>Zugehöriges</u> <u>orophor</u>	<u>Flu-</u> <u>(Peak in nm)</u>	<u>Absorptionsspektrum</u> <u>(Peak in nm)</u>	<u>Emissionsspektrum</u> <u>(Peak in nm)</u>
<u>sers</u>					
Violett	405	DAPI		358	461
Blau	488	FITC		495	519
Gelb	595	AF594		590	617

<u>Objektiv</u>	<u>Immersionsmedium</u>
10x	Luft
20x	Immersionsöl
40x	Immersionsöl
60x	Immersionsöl/H ₂ O

Die vorhandene Bandbreite der Detektionsfilter wurde an die Emissionsspektren der jeweiligen Fluorophore angepasst und eine Auflösung der anzufertigenden Bilder von mindestens 512 x 512 Pixeln gewählt. Die verschiedenen Fluorophore wurden in zwei Sequenzen gescannt, wobei in Sequenz 1 DAPI und AF597 bestrahlt und in Sequenz 2 FITC, sowie die normale Durchlichtfunktion gewählt wurden.

Nach Voreinstellung des Mikroskops wurden die jeweiligen Slides zunächst durch das Okular händisch korrekt fokussiert und eine passende Stelle für Aufnahmen gewählt. Anschließend wurden für jeden Kanal (FITC, DAPI und AF594) individuell die Einstellungen der Laser-Power und des Gains angepasst. Hierbei wurden die Einstellungen der Kanäle durch Verwendung der jeweiligen Isotyp-Kontrollslides kalibriert. Dies bedeutet, dass alle Kanäle derart eingestellt wurden, dass für den jeweiligen Kanal der zugehörige Isotyp nach Möglichkeit nicht aufleuchtete und somit bei Verwendung derselben Einstellungen für die wahren Probenslides mit den jeweils markierten Antigenen nur das jeweilige Antigen von Interesse Licht emittiert und mögliche Hintergrundstrahlung oder Autofluoreszenz nicht detektiert werden. Es folgte zudem eine Feinadjustierung für höhere Bildqualität durch Anpassung des Hintergrundrauschens und der Smart-offset Einstellung. Nach Übernahme der kalibrierten Einstellungen wurden die wahren Probenslides eingelegt, fokussiert und von diesen Aufnahmen getätigt. Die Bilder wurden mit der LAS AF Lite Software analysiert.

3.7 Funktionelle Assays und Analysen

3.7.1 Verwendung der Durchflusszytometer und Kalibrierungsschritte

Verwendete Materialien und Medien

CytoFLEX Sheath Lösung

ddH ₂ O	20 l
2-Phenoxyethanol	+ 40 ml

Kompensationskontrollen

FACS-Wash	DPBS, 1% FCS
Arc reactive Kompensationsbeads	
Arc negative Kompensationsbeads	
UltraComp eBeads	
CytoFLEX Daily QC Fluorophores	

Verwendete Durchflusszytometer und Setups

CytoFLEX Verwendung: CD-4 Reinheitsmessung

<u>Laser (Farbe, nm)</u>	<u>Kanäle</u>	<u>Bandpassfilter (Peak/range in nm)</u>
Violet, 405	PB450 oder VioletSSC	450/45 oder 405/10
	KO525 oder PB450	525/40 oder 450/45
	Violet610	610/20
	Violet660	660/20
	Violet780	780/60
Blau, 488	SSC	488/8
	ECD	610/20
	PE	585/42
	FITC	525/40
	PC5.5	690/50
	PC7	780/60
Rot, 638	APC-A750	780/60
	APC	660/20
	APC-A700	712/25

CytoFLEX S *Verwendung: Prime-Flow Assay und Th17/IL-1-R1 Surface Stain*

<u>Laser (Farbe, nm)</u>	<u>Kanäle</u>	<u>Bandpassfilter (Peak/range in nm)</u>
Violet, 405	PB450	450/45
	KO525	525/40
	Violet610	610/20
	Violet660 oder BV780	660/20 oder 780/60
Blau, 488	SSC	488/8
	FITC	525/40
	PerCP/PC5	690/50
Gelb, 561	ECD/mCherry	610/20
	PE/DsRed	585/42
	PC5.5	690/50
	PC7	780/60
Rot, 638	APC-A750	780/60
	APC	660/20
	APC-A700	712/25

Herstellung Kompensationskontrollen

Vor jeder Verwendung der Instrumente wurden stets neue Kompensationskontrollen angefertigt. Hierfür wurden Beads statt Zellen verwendet.

Für die Färbung von „lebenden/toten“ Beads im „live/dead“ Kanal wurden zunächst 50 µl FACS-Wash in ein FACS-Probenröhrchen pipettiert und anschließend eBioscience Fixable Viability Dye eFluor 780 in einer 1:400 Verdünnung hinzugefügt. Anschließend gab man zwei Tropfen Arc reactive Kompensationsbeads hinzu und inkubierte diese für 30 Minuten bei RT im Dunkeln. Danach wurden die Beads durch Zugabe von 500 µl FACS-Wash und Zentrifugation bei 1800rpm für 3 Minuten bei RT gewaschen und der Überstand abgegossen. Die Beads wurden schließlich in 300 µl FACS-Wash resuspendiert und weitere zwei Tropfen Arc negative Kompensationsbeads hinzugegeben. Die Beads wurden bis zur Verwendung bei 4°C im Dunkeln für maximal 2 Stunden gelagert.

Um für die anderen Kanäle Kompensationskontrollen herzustellen, verwendete man je einen Tropfen UltraComp eBeads und gab je 1 µl des jeweiligen Antikörpers mit zugehörigem Fluorophor des jeweiligen Kanals hinzu. Anschließend inkubierte man für 30 Minuten auf Eis im

Dunkeln, um schließlich, genau wie bei den „live/dead“ Beads zu waschen und resuspendieren. Die Beads wurden nun auf die gleiche Weise für maximal 2 Stunden gelagert.

Systemstart und Qualitätskontrolle

Vor der Verwendung des jeweiligen Geräts, wurde zunächst die notwendige „Sheath“ Lösung für den laminaren Zellstrom angemischt und aufgefüllt. Nach dem Start des Gerätes wurde stets das „System startup program“ durchlaufen, indem drei Wells einer 96-WP mit V-Bottom mit je 250 µl ddH₂O befüllt wurden. Nach Beendigung des Programmes begann man mit der täglichen Qualitätskontrolle der Geräteeinstellungen (samt verwendeter Filter) und Kalibration. Hierfür gab man drei Tropfen CytoFLEX Daily QC Fluorophores in 1 ml ddH₂O und von dieser Mischung wiederum nach vorherigem Vortexen 150 µl in ein weiteres Well. Nach Auswahl der zugehörigen Lot-Nummer der Beads in dem „Daily QC“ Programm wurde die QC gestartet. Nach Beendigung der QC wurde mit den Kompensationsproben fortgefahren.

Acquisition der Kompensationskontrollen und Erstellung der Kompensationsmatrix

Für jedes durchgeführte Experiment wurde eine individuelle Kompensationsmatrix angelegt. Hierfür wurden die zuvor einzeln gefärbten Kompensationsbeads für die jeweils Panel-abhängigen Kanäle auf die 96 WP pipettiert und die, den ausgewählten Kanälen zugehörigen Wells, in dem angelegten Kompensationsexperiment des Programmes markiert. Nach Anlegen des Experiments wurden die Beads aller Kanäle händisch in den Plots markiert und die jeweiligen Gains der einzelnen Kanäle an das jeweilige Panel angepasst. Anschließend nahm man jeweils 3000 Events für jeden einzelnen Kanal auf und kalkulierte auf der Basis der hierdurch gewonnenen Daten die für das Experiment notwendige Kompensationsmatrix. Alle getätigten Veränderungen der Gains, sowie die angefertigte Matrix wurden schließlich auf das nun folgende Experiment angewendet.

Allgemeine Einstellungen und Hinweise für die Durchführung der Experimente

An dieser Stelle sei erwähnt, dass die folgenden grundsätzlichen Einstellungen, sich auf alle Experimente beziehen, aber im Detail den jeweils gegebenen Bedingungen, ggf. angepasst wurden.

Nach dem Anlegen eines neuen Experiments wurden die einzelnen Proben auf einer virtuellen 96 WP händisch einzeln eingetragen und mit einem Namen versehen. Anschließend wurde der Threshold-Trigger für die Signalaufnahme im FSC-A Kanal auf 20,000 gesetzt und die zuvor erstellte Kompensationsmatrix mit den zugehörigen Gains auf das Experiment angewendet. Die einzelnen Kanäle wurden mit den hierdurch dargestellten, durch Antikörper markierten Antigenen bezeichnet (z.B. BV510 → CD3). Die einzelnen Kanäle wurden nun durch X-Y-Plots

dargestellt und eine entsprechende Gating Strategie (s. 3.7.7) zur Überprüfung des „Erfolgs“ der Färbung, angelegt. Zur Aufnahme der Events wurde das korrekte Plattenformat ausgewählt und die Geschwindigkeit der Zell-Acquisition auf maximal 10,000 Events/Sekunde begrenzt. Anschließend wurden die einzelnen Proben automatisch aufgenommen und als FACS-Dateien auf einer externen Festplatte gespeichert, um später mittels der Software Flow-Jo analysiert zu werden.

3.7.2 Negative Selektion von CD4⁺ T-Zellen und Reinheitskontrolle

Die folgenden Auszüge entsprechen dem von uns angepassten Protokoll des Herstellers (BioLegend 2018).

Verwendete Chemikalien und Medien

Bestandteile MojoSort Human CD4 T Cell Isolation Kit und sonstige Komponenten

Biotin Antikörper Cocktail	Biotin anti- CD8a, CD11b, CD16, CD14, CD19, CD20, CD36, CD56, TCR- $\gamma\delta$, CD123, CD235ab
Streptavidin Nanobeads	
MojoSort Magnet	

MojoSort Pufferlösung (DPBS, 2mM EDTA, 0,5% BSA, steril filtriert)

Dulbeco Phosphate Buffered Saline (DPBS)	492,5 ml
Bovine Serum Albumin, >98%	+ 2,5 g
EDTA-Lösung, 200 mM in DPBS	+ 5 ml

Vorbereitung der PBMCs und MojoSort Pufferlösung

Die verwendeten PBMCs wurden am Tag vor der Isolation gem. 0 aufgetaut und vor der CD4-Zellisolation bei 37°C, 5% CO₂ über Nacht in R10 Medium ruhen gelassen. Die MojoSort Pufferlösung wurde nach der obigen Tabelle angemischt und die zum DPBS hinzugegebenen Komponenten zuvor mit einem 0,2 μ m Filter steril filtriert. Die Lösung wurde bei 4°C gelagert und für maximal 8 Wochen verwendet.

Depletion CD4- negativer Leukozyten mittels „Magnetic Cell Separation“

Zu Beginn des Protokolls wurden alle Komponenten des Protokolls auf Eis gestellt und die vorbereiteten PBMCs erneut gem. 3.4.3 gezählt. Anschließend wurden die PBMCs bei 500g RT für 5 Minuten zentrifugiert und mit so viel Volumen an eiskalter MojoSort Pufferlösung resuspendiert, dass eine Konzentration von 1×10^8 PBMCs/ml gegeben war. Nun wurden pro 1×10^7 vorhandenen PBMCs je 10 μ l Biotin Antikörper Cocktail hinzugegeben und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden weitere 10 μ l Streptavidin Nanobeads pro 1×10^7 PBMCs hinzugemischt und erneut für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Schließlich wurden die Zellen durch Zugabe weiterer 2,5 ml der Pufferlösung weiter verdünnt und in 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tubes transferiert, die anschließend für 5 Minuten bei RT in den Magneten gegeben wurden.

Nach Ablauf der Zeit wurden die Tubes mit samt dem Magneten, über einem 50 ml Falcon invertiert, um die von non-CD4-Leukozyten depletierte und somit aufgereinigte Zellsuspension darin aufzufangen. Die an der Wand des jeweiligen Tubes gebundenen non-CD4-Leukozyten wurden nun mit weiteren 2,5 ml der Pufferlösung erneut resuspendiert, um weitere, bisher nicht aufgereinigte CD4+ Leukozyten zu gewinnen. Nach Wiederholung der Inkubation und Ausleeren der klaren CD4+ Zellsuspension wurden die markierten und somit CD4 negativen Leukozyten in der Regel verworfen. Zwischenzeitlich wurden die CD4+ Zellen auf Eis gelagert, bevor sie weiterverarbeitet wurden.

Vorbereitung der 6- Tage IL-26 Induktion und CD4-Purity FACS Stain

Die CD4+ T-Zellen wurden anschließend erneut gezählt, um danach bei 500g RT für 5 Minuten zentrifugiert zu werden. Nun wurde die Zellkonzentration nach Verwerfen des Überstandes auf $2,666 \times 10^6$ CD4+/ml mit R10 Medium angepasst und die Zellen, bis diese wie unter 3.7.4 beschrieben weiter in-vitro behandelt wurden, bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

Für die Analyse des gewonnenen CD4-Reinheitsgrades der Zellisolate wurden nun jeweils ca. 1×10^5 CD4+ Leukozyten separiert und anschließend gem. des Vorgehens unter 3.6.2 für Oberflächenantigene nach dem folgenden Panel für die Durchflusszytometrie gefärbt:

<u>Antigen</u>	<u>Fluorophore</u>	<u>Kanal (BP-Filter in nm)</u>	<u>Laser (in nm)</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Inkubation</u>
Live/dead	APC-Cy7	APC-A750 (780/60)	638	1:400	
CD3	BV605	Violet 610 (610/20)	405	1:100	30 Minuten auf
CD4	BV785	Violet780 (780/60)	405	1:200	Eis im Dunkeln
CD8	BV510	KO525 (525/40)	405	1:200	

Zur Analyse der gefärbten CD4 T-Zellen wurde anschließend das Durchflusszytometer Cytoflex von BC verwendet.

Nun wurden die gewonnenen Probendaten, wie in Abbildung 7.1 A (s. Anhang) dargestellt, einer einfachen Gating-Strategie unterzogen. Der CD4-Reinheitsgrad entsprach hierbei dem %-Anteil der als CD4⁺ definierten Zellen an allen detektierten lebendigen Zellen, innerhalb einer Probe.

Hierdurch konnten wir zeigen, dass für alle Kohorten kein signifikanter Unterschied im Reinheitsgrad bestand. So bestanden die CD4⁺ Monokulturen der Krankheitsentitäten axSpA (n = 15; MW = 92,29%; SEM = 1,36%; p = ns), PsA (n = 15; MW = 89,01%; SEM = 1,75%; p = ns), RA (n = 13; MW = 90,52%, SEM = 1,908%; p = ns) und der HCs (n = 10; MW = 92,03%; SEM = 1,24%) zu ca. 90% aus CD4⁺ T-Zellen (s. Abbildung 7.1 B, Anhang)

3.7.3 Positive Selektion von CD14⁺ Makrophagen

Die folgenden Auszüge entsprechen dem von uns angepassten Protokoll des Herstellers (BioLegend 2018).

Verwendete Chemikalien und Medien

Bestandteile MojoSort Human CD14 Cell Selection Kit und sonstige Komponenten

Biotin Antikörper	anti-human CD14 Antikörper (Klon 63D3)
Streptavidin Nanobeads	
MojoSort Magnet	

MojoSort Pufferlösung (DPBS, 2mM EDTA, 0,5% BSA, steril filtriert)

s. 3.7.2

Die Schritte dieses Protokolls entsprachen grundsätzlich denen unter Punkt 3.7.2, jedoch wurde die durch die Nanobeads markierte CD14⁺ Monozytenfraktion gesammelt. Es handelte sich hierbei somit um eine positive Selektion, im Gegensatz zur Gewinnung der CD4⁺ T-Helferzellen.

Als Ausgangsmaterial wurden die zuvor unter Punkt 3.7.2 noch nicht vorselektierten PBMCs mittels anti-CD14 Antikörper und Nanobeads markiert und vor der negativen CD4⁺ Selektion in Punkt 3.7.2 zunächst CD14⁺ Monozyten präselektiert. Die CD14⁻ negative (ansonsten verworfene) Zellpopulation wurde im Falle der zusätzlichen Selektion der CD4⁺ Zellen, anschließend dem Protokoll unter Punkt 3.7.2 zugeführt. Die Anreicherung CD14⁺ Monozyten erfolgte lediglich für insgesamt fünf gesunde Kontrollen als Vergleichspopulation.

3.7.4 Induktion von IL-26 in CD4⁺ T-Zellen

Verwendete Chemikalien und Medien

Bestandteile T-Zell Aktivierungs-/Expansions Kit human

Anti-Biotin MACSiBead Particles, cell culture grade	2 x 10 ⁸ Beads/ml
CD2-Biotin, human	100 µg/ml
CD3-Biotin, human	100 µg/ml
CD28-Biotin, human	100 µg/ml

Verwendete Zytokine und Konzentrationen für in-vitro-Stimulation

<u>Zytokin (human)</u>	<u>Stock-Konzentration</u>	<u>In-vitro</u>
IL-2	100,000 IU/ml	10 IU/ml (oder 100 IU/ml)
IL-1 β	20 μ g/ml	20 ng/ml
IL-23	20 μ g/ml	20 ng/ml
TNF- α	10 μ g/ml	10 ng/ml
IL-6	20 μ g/ml	20 ng/ml

Zytokinkombinationen für in-vitro Stimulation

<u>Kondi- tion</u>	<u>Beads pro Zellen</u>	<u>IL-2</u>	<u>IL-1β</u>	<u>IL-23</u>	<u>TNF-α</u>	<u>IL-6</u>
1	1:10	10 IU/ml	/	/	/	/
2	1:10	10 IU/ml	20 ng/ml	20 ng/ml	/	/
3	1:10	10 IU/ml	20 ng/ml	20 ng/ml	10 ng/ml	/
4	1:20	100 IU/ml	20 ng/ml	20 ng/ml	/	20 ng/ml

Herstellung der T-Zell Aktivierungs-/Expansions Beads

Zunächst wurden je 100 μ l von je den CD2-, CD3- und CD28-Biotin Aliquots in ein 2 ml RNase-freies 2 ml Tube, unter sterilen Bedingungen pipettiert. Anschließend wurden 500 μ l der MACSiBead Particles hinzugegeben und das Volumen mit weiteren 200 μ l des in Punkt 3.7.2 hergestellten MojoSort Puffers auf 1 ml aufgefüllt.

Nun wurde das Tube in einen Rotator eingespannt und für zwei Stunden bei 4°C in einer Kühlkammer konstant durchmischt und inkubiert. Die fertigen Beads wurden daraufhin für maximal vier Monate bei 4°C gelagert.

Rekonstitution der Zytokine

Die einzelnen Zytokine wurden gemäß der jeweiligen Herstellerangaben auf ihre jeweilige Stock-Konzentration rekonstituiert und anschließend aliquotiert und bei -20°C gelagert. Jedes Aliquot wurde lediglich einmalig verwendet und somit auch nur einmal aufgetaut.

Ausplattieren der CD4 T-Zellen und in-vitro Simulation

Zunächst wurden aus den einzelnen CD4-Proben jeweils mindestens 1 x 10⁶ T-Zellen entnommen, um diese bei 750g RT für 5 Minuten in einem 2 ml RNase-freiem Tube zu zentrifugieren. Der Überstand wurde anschließend verworfen, das Zellpellet für die D0-RNA Kontrollen in

jeweils 350 µl des in Punkt 3.5.1 erwähnten RA1-Lyse Puffers aufgelöst und die nun gewonnene Zellsuspension bei -80°C für maximal 6 Tage gelagert.

Die zuvor auf eine Konzentration von $2,666 \times 10^6$ CD4⁺/ml R10 Medium konzentrierten Leukozyten wurden nun auf eine sterile 48 Well Platte mit Flat-Bottom ausplattiert. Zunächst wurden die Zellsuspensionen mit den entsprechenden Mengen an T-Zell Aktivierungs-/Expansion-beads versetzt, um die oben aufgeführten Verhältnisse von Beads zu Zellen pro Kondition herzustellen. Nun wurden pro Well je 375 µl und somit je 1×10^6 T-Zellen pro Stimulationskondition auf die Platten transferiert.

In 15 ml Falcons wurden anschließend für die einzelnen Stimulationskonditionen die Zytokin-Master-Mix Kombinationen einzeln hergestellt, indem für jedes zu stimulierende Well 375 µl R10 Medium kalkuliert wurde und die entsprechenden Zytokine in einer doppelt so hohen Konzentration wie oben angegeben hinzugegeben wurden. Dies hatte den Hintergrund, dass nun jeweils wiederum 375 µl der Master-Mix Cocktails zu den 375 µl der bereits ausplattierten Zellsuspensionen hinzugegeben werden konnten, was einer 1:2 Verdünnung entsprach, um die gewünschten Zytokinkonzentrationen pro Well zu erreichen. Die noch freien Wells wurden daraufhin mit je 1 ml DPBS versehen, um Verdunstungserscheinungen der Proben vorzubeugen und anschließend für drei Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

Medienwechsel nach Tag 3

Am dritten Tag nach Start der in-vitro Stimulation wurden vorsichtig mit einer 1000 µl Pipette, ohne die am Boden der Platten befindlichen Zellen aufzuwirbeln, je 375 µl der einzelnen Wells abgenommen und in 0,5 ml Eppendorf Tubes bei -20°C für spätere ELISAs eingefroren. Anschließend gab man wiederum 375 µl, neu angemischter Master-Mix Cocktails für die einzelnen Konditionen hinzu, die nun aber lediglich die Zielkonzentration der obigen Tabelle an Zytokinen enthielten und nicht die doppelten Konzentrationen wie zuvor. Beads wurden nicht erneut hinzugegeben. Anschließend wurde für weitere drei Tage inkubiert.

Lyse der CD4⁺ T-Zellen für spätere mRNA-Isolation

Am 6. Tag der in-vitro Stimulation wurden die Zellen in den einzelnen Wells jeweils resuspendiert, um danach in 2 ml RNase-freien Tubes bei 800g RT für 5 Minuten zentrifugiert zu werden.

Die Zellüberstände wurden nun wiederum vorsichtig abgenommen und gesondert bei -20°C für ELISAs eingefroren, während das trockene Zellpellet letztlich in 375 µl des RA1 Lyse Puffers aufgelöst wurde.

Die Zelllysate wurden anschließend entweder direkt oder nach vorheriger Lagerung für maximal 6 Tage bei -80°C dem Protokoll unter Punkt 3.5.1 zugeführt.

3.7.5 Induktion von IL-26 in CD14⁺ Monozyten

Verwendete Chemikalien und Medien

Verwendeter Stimulus

LPS-B5 Ultrapure	10 ng/ml
------------------	----------

Bestandteile Versene Pufferlösung (0,48 mM EDTA in PBS)

EDTA-Lösung, 200 mM in DPBS	120 µl
DPBS	+ 50ml

Vorbereitung der LPS-Lösung

Zunächst wurde das angelieferte LPS-B5 Ultrapure in 1 ml mitgeliefertem, Endotoxin-freien Wasser unter sterilen Bedingungen auf seine Stock-Lösung von 5 mg/ml resuspendiert. Die vorbereitete hoch konzentrierte Lösung wurde schließlich in 100 µl große Aliquots aufgeteilt und für maximal sechs Monate bei -20°C gelagert.

Ausplattieren der CD14⁺ Monozyten und in-vitro Stimulation

Als erstes wurden aus den einzelnen CD14-Proben jeweils mindestens 1×10^6 Monozyten entnommen, um diese bei 750g RT für 5 Minuten in einem 2 ml RNase-freiem Tube zu zentrifugieren. Der Überstand wurde anschließend verworfen, das Zellpellet für die D0-RNA Kontrollen in jeweils 350 µl des in Punkt 3.5.1 erwähnten RA1-Lyse Puffers aufgelöst und die nun gewonnene Zelllösung bei -80°C für maximal 6 Tage gelagert.

Die zuvor unter 3.7.3 gewonnenen und im Inkubator gelagerten CD14⁺ Monozyten wurden anschließend mittels R10 Medium auf eine Ausgangskonzentration von 1×10^6 CD14⁺/ml gebracht. Nun wurden die Monozyten auf eine Ultra Low Cluster, Ultra Low Attachment 6 WP mit Flat Bottom mit 1×10^6 CD14⁺ Zellen (und somit 1 ml Medium) pro Well steril ausplattiert. Pro Patientenprobe verwendete man zwei Wells, je eines für die drei bzw. sechs Tage Stimulationskondition.

Anschließend stimulierte man die Monozyten durch Zugabe von LPS. Hierfür wurden die 5 mg/ml vorbereiteten Aliquots mittels R10 Medium im Verhältnis 1:5 auf eine Konzentration von 1000 µg/ml verdünnt und von dieser Verdünnung wiederum jeweils 10 µl in die 1 ml

Zellsuspensionen gegeben. Somit wurden die Monozyten mit einer Konzentration von 10 µg/ml LPS für drei Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

Lyse der D3 Stimulationskondition

An D3 der in-vitro Stimulation entnahm man die Zellen der D3 Wells mittels einer 1 ml Pipette, indem man diese vorsichtig steril resuspendierte. Die so gewonnen Monozyten wurden in 15 ml Falcons auf Eis zwischengelagert. Die am Boden der Wells adhärenen Monozyten löste man anschließend vorsichtig durch Zugabe von 1 ml eiskalter Versene Pufferlösung und 500 µl R10 Medium. Die nun so vom Boden der Plates gelösten Monozyten gab man ebenfalls in die Falcons auf Eis. Anschließend zentrifugierte man die Falcons bei 500 g für 5 min bei RT und verwarf den Überstand. Das trockene Zellpellet konnte in 375 µl des RA1 Lyse Puffers aufgelöst werden und die Lysate wurden nun für maximal 6 Tage bei -80°C gelagert.

Lyse der D6 Stimulationskondition

Die Zellen der sechstägigen Stimulationskondition wurden ebenso behandelt und lysiert. Die gesammelten Zellysate wurden anschließend zeitnah dem Protokoll unter Punkt 3.5.1 zugeführt.

3.7.6 Induktion und Immunphänotyping IL26 positiver PBMCs auf Transkriptionsebene

Dieses Assay stellt eine neuartige Form der Detektion von in-vitro Markern mittels Durchflusszytometrie auf Transkriptionsebene dar. Diese Methodik musste daher von mir in unserem Labor erst in diversen Vorversuchen etabliert werden. Das gesamte PrimeFlow Assay ist anspruchsvoll in der korrekten Handhabung und somit waren zunächst mehrere Optimierungsschritte von Nöten, um das vom Hersteller zur Verfügung gestellte Protokoll (ThermoFisher 2019) an unsere Zwecke anzupassen.

Dank dieser Vorarbeiten, stand zum Zeitpunkt des Schreibens dieser Dissertation unserem Labor eine moderne Methode zum Immunphänotyping von sog. „Rare Cells“ auf Transkriptionsebene zur Verfügung, die auch auf zukünftige Projekte angewendet werden kann. Die künftige Verwendung dieses Assays zum „Sorten und Poolen“ kleiner Zellpopulationen für die keine verlässlichen FACS-Antikörper zur Markierung existieren und anschließender genomische Analyse dieser Reinkulturen, liegt daher nahe und könnte zum Verständnis ansonsten schwer zu untersuchender Populationen beitragen.

Bestandteile PrimeFlow RNA Assay Kit

PrimeFlow RNA Fixation Puffer 1A & 1B
 PrimeFlow RNA Permeabilization Puffer (10x)
 PrimeFlow RNA Fixation Puffer 2 (8x)
 PrimeFlow RNA Wash Puffer
 PrimeFlow RNA Target Probe Diluent
 PrimeFlow RNA PreAmp Mix
 PrimeFlow RNA Amp Mix
 PrimeFlow RNA Label Probe Diluent
 PrimeFlow RNA Storage Puffer
 PrimeFlow RNase Inhibitors (100x)
 PrimeFlow Kompensation Kit
 IC Fixation Puffer
 PrimeFlow RNA Label Probes, Alexa Fluor 647
 PrimeFlow RPL13A Target Probes, human
 PrimeFlow IL-26 Target Probes, human
 Kompensation Kontrolle AF647

Verwendete Antikörper und Fluorophore mit Inkubationsbedingungen und Verdünnungen

<i>Antigen</i>	<i>Fluorophore</i>	<i>Kanal (BP-Filter in nm)</i>	<i>Laser (in nm)</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Inkubation</i>
Live/dead	APC-Cy7	APC-A750 (780/60)	638	1:400	
CD3	BV510	KO-525 (525/40)	405	1:50	Surface Stain:
CD4	BV605	Violet 610 (610/20)	405	1:25	30 Minuten
CD8	ECD	ECD/mCherry (610/20)	561	1:50	auf Eis im
CD26	PeCy7	PC7 (780/60)	561	1:50	Dunkeln (vor
CD161	BV421	PB450 (450/45)	405	1:25	Fix & Perm)
CD4	BV605	Violet 610 (610/20)	405	1:25	IC Stain:
IL17A	FITC	FITC (525/40)	488	1:50	30 Minuten
IFN- γ	AF700	APC-A700 (712/25)	638	1:50	auf Eis im
					Dunkeln
IL-26/RPL13A (mRNA-Target Probes)	AF647	APC (660/20)	638	1:20 ($\rightarrow$ 1:40)	2 h, 40 $\pm$ 1°C 5% CO ₂ im Dunkeln

Temperatur-Validierung des verwendeten Inkubators

Die Verwendung des PrimeFlow Assay Kits setzte einen Temperatur-stabilen Inkubator, der konstant 40 $\pm$ 1°C halten kann, voraus.

Hierfür wurde zunächst der verwendete Inkubator auf 40°C, 5% CO₂ eingestellt und ein Metall-Hitze Block für 1,5 ml Eppendorf-Tubes in das mittlere Fach gestellt. Nun wurde der Block bei

geschlossener Türe, über Nacht auf die gewünschte Temperatur vorgeheizt. Am nächsten Tag wurde in den Deckel eines 1,5 ml Eppendorf-Tubes ein kleines Loch gebohrt und selbiges mit 0,2 ml ddH₂O befüllt. Über das Loch wurde eine Typ-K Beaded Sensor-Sonde eines zertifizierten Traceable Pocket Size Thermometers in das Wasser eingeführt und mit Parafilm Verschlussfolie luftdicht versiegelt.

Nun wurde das Tube mit der Sonde in den vorgewärmten Metallblock des Inkubators gegeben und die Türe verschlossen. Nach 15 Minuten Kalibrierungszeit wurde die angezeigte Temperatur des Inkubators derart eingestellt, dass 40°C in dem Tube nach erneuter Kalibrierung gemessen werden konnten. Dieser Schritt wurde für verschiedene Standorte innerhalb des Inkubators wiederholt, um die Temperaturuniformität beurteilen zu können. Anschließend wurde die Aufheizgeschwindigkeit des Inkubators überprüft. Hierfür wurde das Tube aus dem Inkubator genommen und auf RT abgekühlt. Die Türe des Inkubators wurde nun für eine Minute geöffnet und das Tube erneut in den Metallblock gestellt. Nach Schließen der Türe wurde die Zeit gemessen, die nötig war, um erneut 40°C in dem Tube zu erreichen. Dies wurde weitere zweimal wiederholt und überprüft, ob der Inkubator dieses Ziel innerhalb von 10 Minuten erreichen konnte.

Diese Validierung wurde vor jedem PrimeFlow Assay Versuch wiederholt, da das verwendete Protokoll hiervon vollständig abhängig war.

Rekonstitution und Aliquotierung von PMA und Ionomycin Calcium Salz

Das verwendete 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate (PMA), sowie das Ionomycin Calcium Salz zur Stimulation der PBMCs wurde gem. der Herstellerangaben steril rekonstituiert und aliquotiert. Es wurden schließlich PMA 100 µg/ml und ICS 1 mg/ml Aliquots hergestellt und bei -20°C eingefroren.

Vorbereitung der PBMCs und Stimulation mit PMA + ICS

Die Patienten PBMCs wurden entweder am Tag zuvor gem. 3.4.5 aufgetaut und bei 37°C, 5% CO₂ in R10 Medium in 50 ml Falcons (in einer Dichte von 5×10^6 PBMCs/ml) über Nacht ruhen gelassen, oder direkt nach der Isolation der PBMCs gem. 3.4.2, verwendet. Am Tag des Assays wurden die PBMCs nun auf eine Dichte von 25×10^6 PBMCs/ml gebracht, und je 200 µl der Zellsuspension pro Well (entsprechend 5×10^6 PBMCs/Well) auf eine sterile 96 Well Platte mit U-Bottom ausplattiert. Die Leukozyten wurden zuvor mit folgenden Substanzen in-vitro stimuliert und anschließend für vier Stunden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert:

12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate (PMA)	100 ng/ml
Ionomycin Calcium Salz (ICS)	1 µg/ml
BD GolgiPlug, Brefeldin A -haltig, Protein Transport Inhibitor	1:1000
BD GolgiStop, Monensin Lösung, Protein Transport Inhibitor	1:1500

Färbung, Fixierung und Permeabilisierung der PBMCs

Zu Beginn des Protokolls wurde die verwendete Zentrifuge zunächst auf 4°C abgekühlt. Die zuvor stimulierten PBMCs wurden für 5 Minuten bei 540 g bei 4°C zentrifugiert und anschließend über einem Waschbecken die Überstände abgegossen. Die PBMCs wurden nun kurz gevortext und in je 200 µl, eiskaltem FACS-Wash resuspendiert und auf eine 96 ELISA-WP (Medium Bind) mit V-Bottom transferiert, auf der das Assay durchgeführt wurde. Dieser Schritt war notwendig, um den durch das sehr lange Protokoll nachfolgenden Zellverlust möglichst gering zu halten. Die PBMCs wurden nun bei 500g für 4 Minuten bei 4°C erneut zum Waschen mit je 200 µl FACS-Wash zentrifugiert.

Währenddessen wurde der „Surface Stain“ Master Mix zur Oberflächenfärbung der Antigene vorbereitet. Hierfür wurden 50 µl FACS-Wash pro Well kalkuliert und mit den in der obigen Tabelle aufgeführten Antikörpern in den angegebenen Verdünnungen, versetzt. Die Zellüberstände wurden nun erneut abgegossen und die trockenen Zellpellets gevortext und in je 50 µl Master Mix resuspendiert und auf Eis für 30 Minuten inkubiert.

Anschließend wurde der Waschvorgang wie zuvor, durch Zugabe von 200 µl FACS-Wash zweimal wiederholt.

Die Fixierungs-Puffer Lösung wurde durch Mischen von gleichen Anteilen der Kit Bestandteile 1A und 1B hergestellt und 200 µl pro Well kalkuliert. Nach dem letzten Waschen wurden die Zellen in 200 µl Fixierungs-Puffer Lösung resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln fixiert.

Es wurde der PrimeFlow RNA Permeabilisierungs-Puffer durch Zugabe von RNase Inhibitoren (100x) in einer 1:100 Verdünnung zu einer Mischung von RNase-freiem Wasser und dem konzentrierten Puffer (10x) in einem 1:10 Verhältnis hergestellt. Hierfür wurden pro Well 700 µl kalkuliert und ein RNase-freies Tube verwendet. Anschließend wurden die Zellen bei 1,200 g für 4 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand mit einer Multikanal-Pipette vorsichtig unter Halten der Platte in einem 45° Winkel und ohne Berühren der Zellen abgenommen und verworfen. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Überstände stets auf diese Weise entfernt, um Zellverluste gering zu halten.

Nach kurzem Vortexen der Platte, wurden die Zellen in 200 µl des Permeabilisationspuffer resuspendiert und bei 1,200 g für 4 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nun wurden erneut die Überstände entfernt und dieser Schritt ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurden die Antikörper der intrazellulären Färbung gemäß der obigen Tabelle, in 50 µl pro Well an Permeabilisationspuffer angemischt und die Zellen für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln hierin inkubiert. Hierbei wurde ebenfalls erneut der CD4 Marker angefärbt, da dieser den Fixierungsschritt nur bedingt vertrug und dieser Vorgang zu einer besseren Aufspaltung der Populationen beitrug. Ebenso wurde bei jeder Platte mindestens eine FMO IL17A Kontrolle geführt. Nach Ablauf der Zeit wurden weitere 200 µl der Pufferlösung zu den Zellen hinzugegeben und erneut wie zuvor zentrifugiert. Parallel wurde der 2. Fixierungspuffer durch Kombination von 25 µl des 8x konzentrierten RNA Fixation Buffer 2 mit 175 µl des PF RNA Wash Buffer, pro Well hergestellt. Die Überstände wurden erneut verworfen, die Platte gevortext und 200 µl der vorbereiteten Lösung zu den Zellen gegeben, um erneut für weitere 60 Minuten bei RT im Dunkeln zu inkubieren. Es wurde erneut bei 1,200g für 4 Minuten, aber bei RT, zentrifugiert und die Überstände verworfen. Anschließend wusch man die PBMCs in 200 µl des Wasch Puffers, zentrifugierte erneut und wiederholte diesen Vorgang ein weiteres Mal, bevor man mit der Hybridisierung der mRNA Probes begann.

Hybridisierung der mRNA Target Probes

Die Target Probes wurden zunächst langsam auf Eis im Dunkeln aufgetaut und anschließend auf RT gebracht. Der PF RNA Target Probe Diluent wurde in RNase-freie Tubes aliquotiert, wobei 100 µl pro Well kalkuliert wurden und auf 40°C im Wasserbad aufgeheizt. Nach dem letzten Waschschrift des Protokolls wurden die Zellen mit einer Multikanalpipette sorgfältig „getrocknet“, indem der Überstand restlos abgenommen wurde. Die RPL13A und IL-26 Target Probes wurden in einer 1:20 Verdünnung in 100 µl des warmen Diluents aufgelöst und pro Platte mindestens ein Kontroll-Well mit RPL13A, sowie für jede Patientenprobe, ein Well des Diluents ohne IL-26 Probe, als IL-26 FMO-Kontrolle vorbereitet. Die PBMCs wurden nun zunächst in 100 µl des auf 40±1°C temperierten PF RNA Wash Buffers resuspendiert, anschließend 100 µl der Target Probe Lösungen hinzugegeben und erneut mit einer Pipette durchmischt. Die Platte wurde mit einem Deckel versehen und bei 40±1°C, 5% CO₂ für zwei Stunden im Dunkeln inkubiert. Zum schnellen Abkühlen der Zellen wurde die Platte nach jedem Inkubationsschritt bei 40°C für 2-3 Minuten auf Eis gestellt; dies trug ebenfalls zum geringeren Zellverlust bei.

Nun wurde erneut zweimal bei 1,200g für 4 Minuten bei RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit 200 µl RNA Wash Buffer gewaschen. Zur Lagerung der Zellen über Nacht

wurden pro Well 100 µl RNA Wash Buffer mit RNase Inhibitoren in einer 1:100 Verdünnung vorbereitet und die PBMCs nach dem letzten Waschschrift hierin resuspendiert. Die Platte wurde in Aluminiumfolie, mit einer Versiegelungsfolie bedeckt, eingewickelt und bei 4°C über Nacht im Dunkeln gelagert.

Signalamplifikation der mRNA-Targets

Die Platte wurde am nächsten Tag zunächst auf RT, gemeinsam mit den restlichen Komponenten, erwärmt. Die Komponenten PF RNA PreAmp Mix, Amp Mix und Label Probe Diluent wurden wie zuvor in RNase-freie Tubes mit 100 µl kalkuliertem Volumen pro Well aliquotiert und auf 40°C im Wasserbad erwärmt. Die PF RNA Label Probes (100x) wurden auf Eis im Dunkeln aufgetaut. Anschließend gab man je 100 µl des PF RNA Pre AmpMix in die 100 µl der Zellsuspensionen des Vortages, mischte erneut mit einer Multikanal Pipette und inkubierte erneut für 90 Minuten bei 40±1°C, 5% CO₂ im Dunkeln, mit Deckel. Es wurde erneut wie am Vortag zentrifugiert, mit 200 µl RNA Wash Buffer gewaschen und der Waschvorgang erneut wiederholt. Nach dem zweiten Waschschrift wurde in 100 µl RNA Wash Buffer resuspendiert, 100 µl des PF RNA AmpMix pro Well hinzugegeben, erneut durchmischt und für weitere 90 Minuten bei 40±1°C, 5% CO₂ im Dunkeln mit Deckel inkubiert. Anschließend wurde wieder zentrifugiert, zwei weitere Male gewaschen und die PBMCs in 100 µl Wash Buffer resuspendiert. Nun wurden pro Well 100 µl der RNA Label Probes, welche zuvor 1:100 in RNA Label Probe Diluent verdünnt wurden, zu den PBMCs hinzugegeben und durchmischt. Es folgte ein letztes Mal inkubieren für 60 Minuten bei 40±1°C, 5% CO₂ im Dunkeln mit Deckel.

Anschließend wurde ein weiteres Mal zentrifugiert, Überstände verworfen und drei weitere Male mit 200 µl RNA Wash Buffer gewaschen. Zum Lagern der Zellen wurden diese in 125 µl FACS Wash resuspendiert und weitere 125 µl des IC Fixation Buffers hinzugegeben.

Die Platte wurde nun entweder direkt im Anschluss an einem Durchflusszytometer analysiert oder maximal erneut über Nacht bei 4°C im Dunkeln gelagert und am Folgetag hiermit fortgeführt. Kompensationskontrollen wurden gem. 3.7.1 am Tag der Acquisition hergestellt und das jeweilige Gerät ebenso, wie dort beschrieben, verwendet.

3.7.7 Gating-Strategien von Leukozytenpopulationen

Die, wie unter Punkt 3.7.1 beschrieben, gewonnenen FACS-Daten der einzelnen Versuchsaufbauten, wurden anschließend mittels dem Softwareprogramm FlowJo gruppenweise analysiert.

Die für den jeweiligen Datensatz erstellte Kompensationsmatrix wurde auf ihre Integrität und auf mögliche „Ausreißer“ jeweils überprüft und ggf. einzelne Werte zur Vermeidung eines „Spillovers“ einzelner Farb-Kanäle in Einzelkanalvergleichen angepasst. Es erfolgte die Anwendung einer individuellen Gating-Strategie der Populationen von Interesse, die im Folgenden näher erläutert und veranschaulicht werden soll.

Folgende Grundsätze wurden beim Gating hierbei beachtet:

Gatinggrenzen wurden stets anhand mitgeführter Positiv- bzw. Negativkontrollen der einzelnen Farbkanäle normiert und pro Batch für alle Proben gleichermaßen angepasst. Es wurden einzelne Proben im Rahmen ihrer interindividuellen Ausprägung ggf. bezüglich einzelner Gates händisch verändert (sollten besagte Proben in ihrem Phänotyp stark von der Batch-Norm abweichen). Dies erfolgte jedoch zur Vermeidung eines „Selection-Bias“ nur für vereinzelte, ansonsten offensichtlich falsch selektierte Zellcluster.

Alle Achsen und Farbkanäle wurden untereinander normiert und an eine möglichst gute Auftrennung der Populationen adjustiert. Es wurde bei fraglicher Antigen- Positivität/Negativität stets möglichst konservativ vorgegangen, sollten sich die Populationen schlecht auftrennen oder nur vereinzelte Zellen vorfinden.

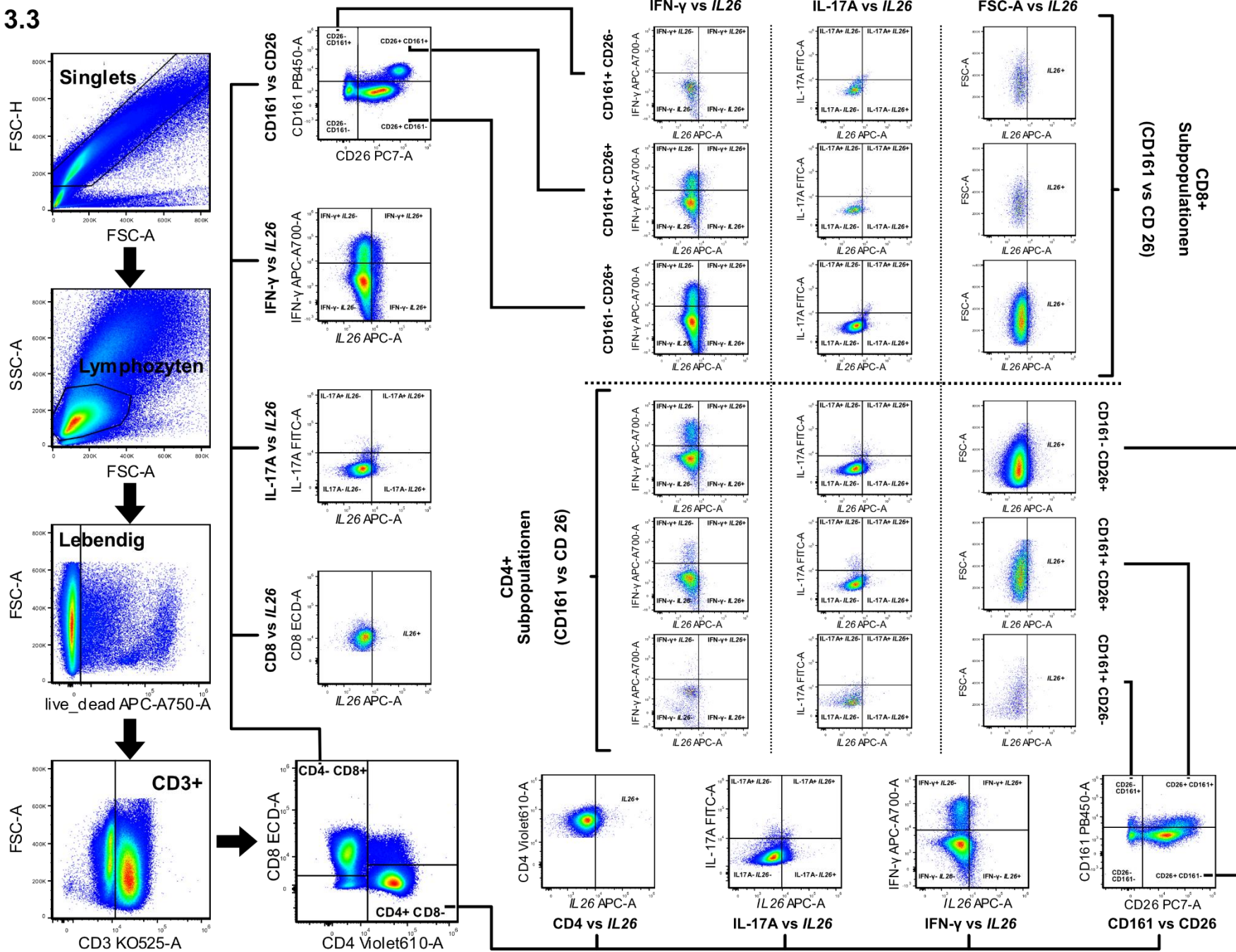
Bei der Selektion *IL26*⁺ transkribierender Leukozyten wurde sich an den *IL26* FMO Kontrollen orientiert und die entsprechenden Gates hieran für jedes einzelne Probenpärchen individuell gleichermaßen angepasst. Im Rahmen der Selektion *IL-1-R1*⁺ *Th-17* Zellen wandten wir die von Weiss et al. vorgeschlagene Gating-Strategie an (Weiss, Ma et al. 2019).

Um „falsch positiv“ charakterisierte *IL26*⁺ Zellen aus der nachfolgenden Statistik zu entfernen, wurden für alle *IL26*/FMO *IL26* Pärchen definiert, dass die detektierte zugehörige FMO-*IL26* Population von der „reellen“ als *IL26*⁺ markierten Population subtrahiert wird.

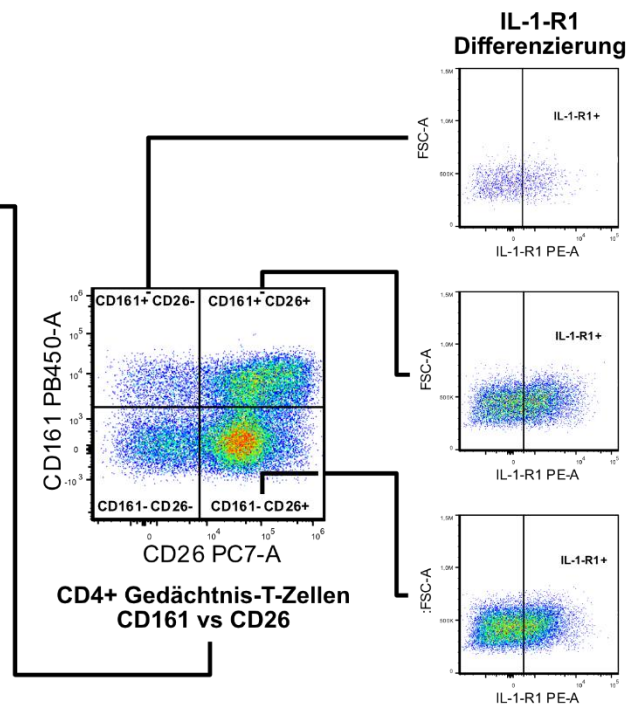
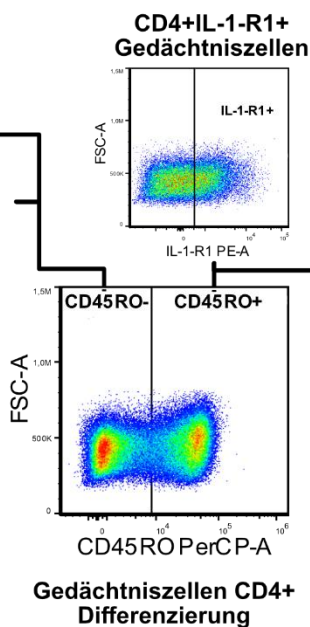
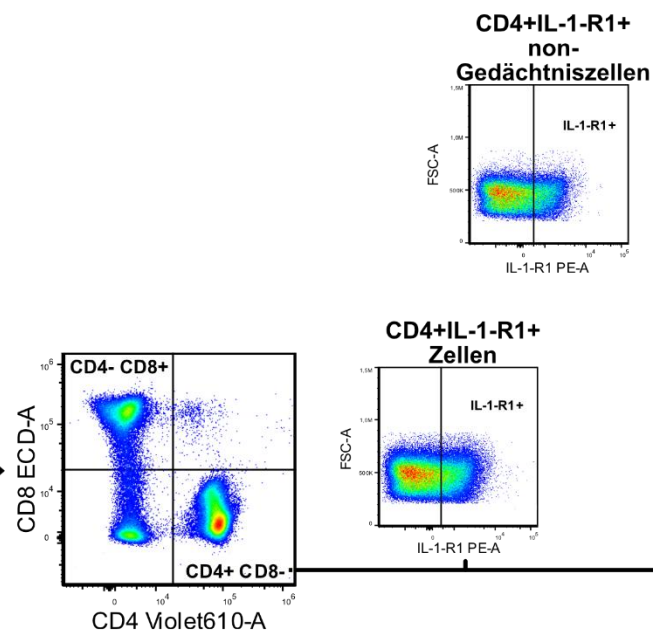
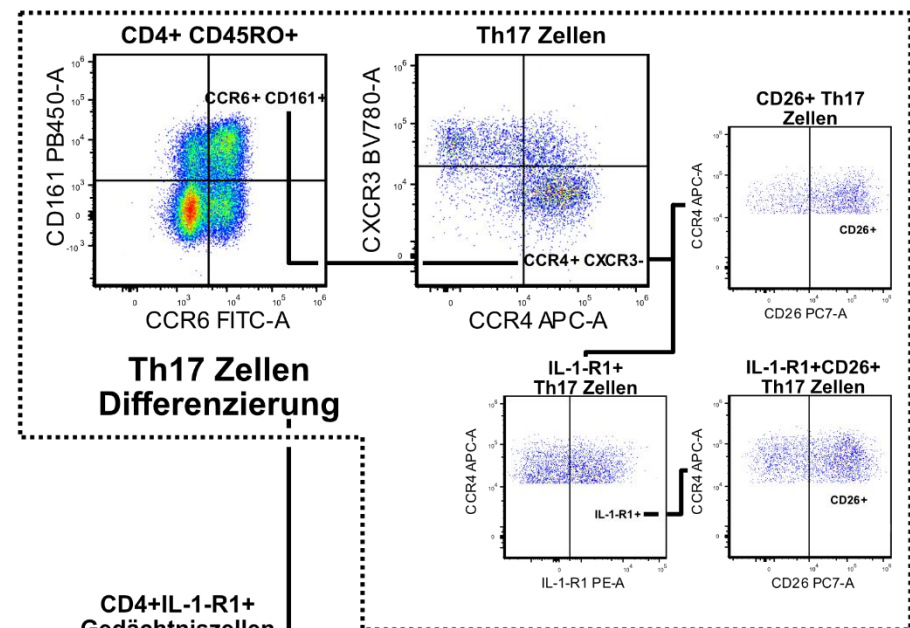
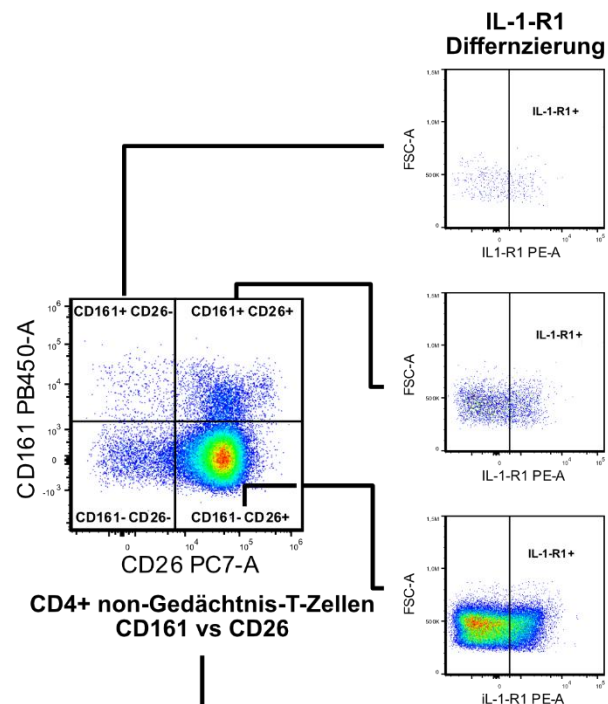
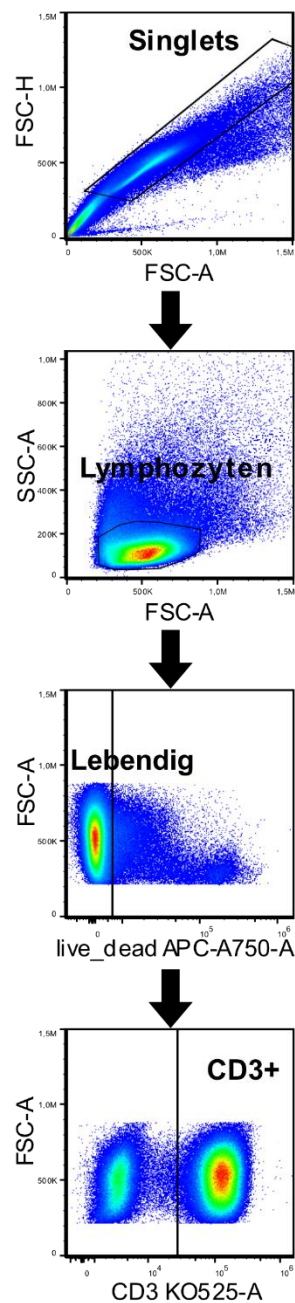
Die so selektierten Populationsdaten einzelner Immunphänotypen wurden nun als %-Werte bzw. Gesamtanzahl aus den Datensätzen extrahiert und für statistische Analysen in einer Excel Datei sortiert und gesammelt.

Abb. 3.3

A)



B)



C)

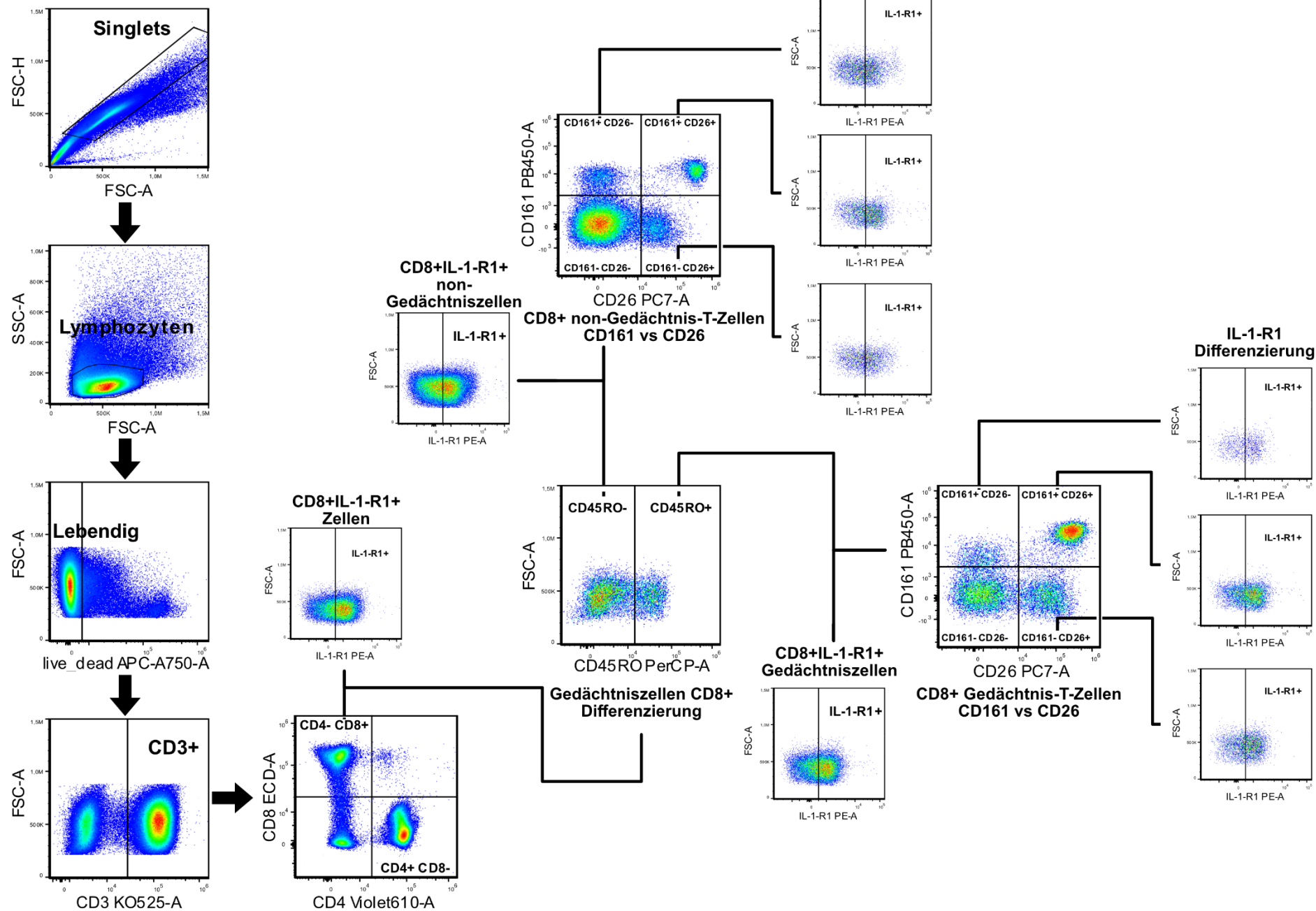


Abbildung 3.3: Gatingstrategien für Leukozytenpopulationen

Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Probe eines axSpA-Patienten. Für alle Leukozytenpopulationen wurden zunächst gleichermaßen die CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen bestimmt. Hierfür selektierte man zunächst die Singlets (FSC-A vs. FSC-H) und anschließend die Lymphozyten (FSC-A vs. SSC-A). Nun selektierte man die lebenden Lymphozyten, indem man die nicht mit Fixable Viability Dye eFluor 780 gefärbten Zellen einschloss. Anschließend wählte man die CD3⁺ markierte Zellpopulation und trennte diese in CD4 vs. CD8 Zellen auf. **(A)** veranschaulicht das notwendige Gating zur Immunphänotypisierung IL26 transkribierender Subpopulationen unter PMA + ICS bzw. IL-1 β Stimulus im Rahmen des unter Punkt 3.7.6 durchgeführten Prime-Flow Assays. Es wurden vornehmlich CD4⁺ T-Helferzellen sowie CD8⁺ Zellen analysiert. Zudem untersuchten wir mögliche Co-Expressionen von IL-17A und IFN- γ mit IL26-Transkripten. Ebenso interessierten uns CD161/CD26 $\pm$ CD4-Zellen, da diese beiden Marker als Surrogate für die Charakterisierung von Th17-Zellen dienen (Maggi, Santarlaschi et al. 2010, Bengsch, Seigel et al. 2012), die für die Produktion von IL-26 bereits beschrieben werden konnten (Meller, Di Domizio et al. 2015, Weiss, Ma et al. 2019, Louhaichi, Mlika et al. 2020). Diese Subpopulationen CD8⁺/CD4⁺ Zellen wurden anschließend erneut näher auf ihre IL26-Transkriptionsfähigkeit, im Kontext der Co-Expression von IL-17A und IFN- γ hin untersucht. In **(B)** werden die postulierten notwendigen Schritte zur Phänotypisierung von CD4⁺ Th17-Zellen und deren Expressionsrate von IL-1-R1 unter einem IL-2 Stimulus, wie in 3.6.2 beschrieben, erläutert. Hierfür ist zunächst die Unterscheidung von CD4⁺ Gedächtnis- vs. Nicht-Gedächtniszellen, anhand der Expression des CD45RO Markers, notwendig (Saxena, Dagur et al. 2019). CD4⁺CD45RO⁺ Gedächtnis-T-Zellen wurden daraufhin erneut bezüglich der Surrogat-Marker CD161 und CD26 sub-klassifiziert und auf ihre IL-1-R1 Expressionsraten hin untersucht. Zudem wurde zur Quantifizierung der Th17-Zellen die von Weiss et. al vorgeschlagene Phänotypisierung auf CD4⁺CD45RO⁺ T-Zellen angewandt (Weiss, Ma et al. 2019) und diese ebenfalls auf das Vorhandensein von IL-1-R1 und CD26 hin untersucht. Ebenso untersuchte man CD4⁺CD45RO⁻ T-Zellen auf das Vorhandensein von IL-1-R1 und wandte hier ebenso die Unterklassifizierung mittels CD26 und CD161 an. Im Abschnitt **(C)** wird gezeigt, wie für CD8⁺ T-Zellen dieselbe Unterscheidung wie in **(B)** bezüglich CD45RO angewandt wurde, um Gedächtnis- von Nicht-Gedächtnis Zellen zu unterscheiden und diese anschließend ebenso CD26 und CD161 betreffend hin weiter zu klassifizieren. Hier konnten nun ebenfalls CD8⁺IL-1-R1⁺ Subpopulationen näher auf ihren Immunphänotyp nach IL-2 Stimulus untersucht werden.

3.7.8 *Semiquantitative Analyse von digitalisierten IHC-Synoviaprobe*

Scannen der IHC Slides

Zur semiquantitativen Analyse der unter Punkt 3.6.3 gewonnen IL-26+ IHC Slides mussten diese zunächst digitalisiert werden. Hierfür wurde ein Whole-Slide Scanner von Hamamatsu, der NanoZoomer 2.0-RS C10730, verwendet.

Zunächst wurden die Slides in Batches von sechs Stück mit 70% EtOh und einem Tuch gereinigt, um Flecken und Rückstände der Färbung zu entfernen und anschließend in die Haltevorrichtung des Geräts gelegt. Mittels der Software NDP.Scan wurden die eingelegten Slides im Gerät ausgewählt und das zu digitalisierende Areal jeweils markiert. Es wurde nach Möglichkeit nur der Bereich des Gewebes auf dem jeweiligen Slide markiert. Nun wurden händisch Fokuspunkte gesetzt und die Slides in einer 40x optischen Auflösung als Ganzes schließlich digital eingescannt.

Die digitalisierten Gewebeproben konnten anschließend durch die Software NDP.View beurteilt und ggf. erneut für den Scan angepasst werden. Alle Proben konnten somit nach Abschluss der Digitalisierung jederzeit an einem handelsüblichen PC in einer vollständig variablen optischen Vergrößerung von 1-40x und einer zusätzlichen digitalen Vergrößerung von bis zu 80x, als Ganzes untersucht werden.

Gewinnung von Einzelbildern zur Quantifizierung der Färbung

Die digitalisierten Slides wurden nun mittels NDP.View in einzelne Bilder zur weiteren Analyse zerlegt. Hierfür wurden die Slides mittels der Software aufgerufen und zunächst die Übersichtskarte der Slides gestartet. Mittels 20x optischer Vergrößerung (Skala: 100%) wurden mit einer Auflösung von 3440 x 1456 Pixeln @ 300 DPI Einzelbilder in einer Größe von 29,13 x 12,33 cm exportiert. Die Bildeinstellungen wurden hierfür auf eine Gamma-Korrektur von 1,8, eine Helligkeit und Kontrast von 100% und eine Farbbalance über alle Kanäle von jeweils 100% ohne Schärfefilter gesetzt. Auf der Miniaturansicht der Übersichtskarte wurde ein Startpunkt zur Akquirierung der Einzelbilder gesetzt und anschließend das komplette Gewebe mittels Pfeiltasten und Maus abgefahren, um in obiger Auflösung und Vergrößerung dieses in Einzelbilder zu unterteilen. Die exportierten Einzelbilder, die als Ganzes das gesamte Gewebe abbildeten, wurden für jedes Slide digital gesammelt und fortlaufend beschriftet. Nach dem Ende des Trackings wurde ein Screenshot der Tracking-Map angefertigt und gesondert gespeichert (zur Nachvollziehbarkeit der Datenstruktur).

Automatisierte semiquantitative Analyse mittels Open-Source Tool „IHC-Profiler“

Zur Quantifizierung der IL-26 Färbung und zur weiteren statistischen Untersuchung der IL-26 positiven Zellen im direkten Gruppenvergleich wurde das von Varghese et al. 2014 entwickelte Open Source plugin für das ebenfalls frei verfügbare Programm ImageJ angewandt (Varghese, Bukhari et al. 2014).

Das von Varghese et al. entwickelte Tool ermöglicht eine unvoreingenommene und quantitative Analyse eines zytoplasmatischen oder nukleären Antikörpers, indem es die Farbkanäle der eingespeisten Ausgangsbilder in einen DAB+ und Hematoxylin+ Farbkanal auftrennt und anschließend den DAB+ Farbkanal in einer Pixel-Analyse quantifiziert. Jedem Pixel des DAB+ Kanals des Quellbildes wird ein Score anhand der jeweiligen Pixel-Intensität zugewiesen (Negative 181-235, Low-Positive 121-180, Positive 61-120, High Positive 0-60) und die Anzahl der Pixel jeder Kategorie gezählt und als Histogramm dargestellt. Jedes Bild wurde somit einer Pixel by Pixel Analyse unterzogen und die Daten aller Einzelbilder einer Gewebeprobe anschließend gesammelt und in Ihrer Gesamtheit statistisch untersucht. Das Plugin wies im Rahmen der hierfür durchgeführten Studie eine Übereinstimmung von 88,6% ($p < 0,0001$, CI = 95%) im Vergleich zur manuellen Beurteilung in Staining-Kategorien durch einen Pathologen auf und konnte für diverse Antigene verifiziert werden (Varghese, Bukhari et al. 2014)

Es wurde zur Analyse unseres Antigens IL-26 der zytoplasmatische Modus des Plugins verwendet und zur automatischen Akquirierung der Einzelbilddaten folgendes Makro von mir verfasst:

<pre>path=getDirectory(""); spath=getDirectory("") list=getFileList(path); x=0; for(i=0,0;i<list.length;i++){ x=replace(list[i], ".jpg", ""); print(list[i]); print(x); f1=toString(x)+".jpg-(DAB Stain)"; print(f1); f2=toString(x)+".jpg-(Hematoxy- lin Stain)"; print(f2); f3=toString(x)+".jpg"; f4="Log";</pre>	<pre>print(f4); f5="Color deconvolution"; print(f5); f6=toString(x)+"Histogram.jpg"; print(f6); f7="Histogram"; print(f7); open(path+list[i]); run("IHC Profiler",("Cytoplas- matic Stained Image")); selectWindow(f1); run("Create Selection"); run("IHC Profiler Macro"); selectWindow("Log"); saveAs("txt", spath + f1);</pre>	<pre>selectWindow(f1); saveAs("Jpeg", spath+f1); f8=toString(x)+".jpg-(DAB Stain).jpg"; print(f8); selectWindow(f7); saveAs("JPEG", spath+f6); close(f1); close(f2); close(f3); close(f5); close(f6); close(f7); close(f8); }</pre>
---	---	---

Abb. 3.4

A)



B)

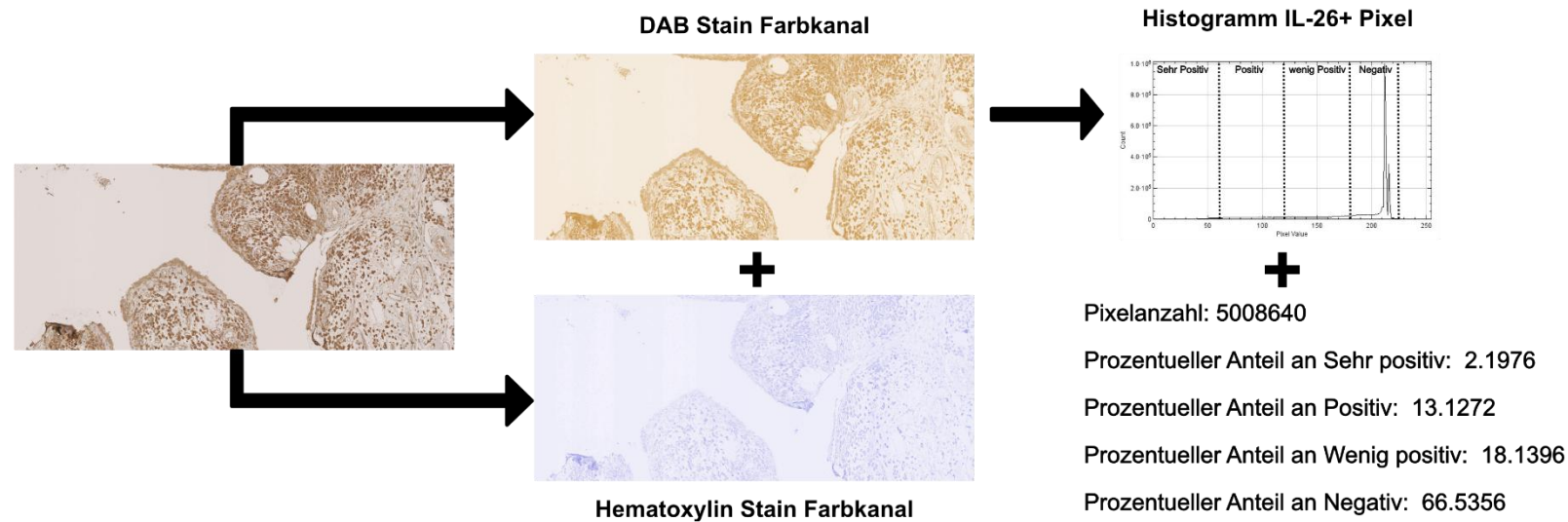


Abbildung 3.4: Workflow IHC-Profiler

(A) Zeigt die notwendigen Schritte zur Akquirierung der Einzelbilder der digitalisierten Slides. *(B)* veranschaulicht den Workflow innerhalb des IHC-Profiler Plugins, mittels dessen die Quellbilder in ihre Farbkanäle zerlegt und anschließend als Histogramm geplottet und die Pixel nach ihrer Staining Kategorie sortiert werden.

3.8 Statistische Analysen

Sämtliche statistischen Untersuchungen und grafischen Veranschaulichungen wurden mittels GraphPad Prism 5 erstellt.

Für multiple Gruppenvergleiche unabhängiger, stetiger Variablen mit Probenanzahl von > 5 je Gruppe, welche normalverteilt ausfielen, konnte eine univariate Varianzanalyse (One-way analysis of variance) mit Dunnett Post-Test (HC-Kohorte als Kontrollgruppe) angewandt werden. Für multiple Gruppenvergleiche abhängiger, normalverteilter stetiger Variablen bei einer Gruppengröße von > 5 wurde der Repeated Measures ANOVA Test mit Dunnett Post Test (HC-Kohorte als Kontrollgruppe) verwendet. Zum multiplen Gruppenvergleich unabhängiger, nicht normalverteilter, stetiger Variablen bei Gruppengrößen von ≤ 5 wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunns Post-Test (HC-Kohorte als Kontrollgruppe) benutzt.

Zum Vergleich abhängiger, nicht normalverteilter, stetiger Variablen zweier Gruppen mit je ≤ 5 Proben pro Gruppe wurde der Wilcoxon matched-pairs signed rank test genutzt.

Zur Analyse möglicher Korrelationen normalverteilter stetiger Variablen, wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt.

Als grafische Darstellung wurde der jeweilige Mittelwert mit zugehörigem Standardfehler (SEM) gewählt. Für einzelne Grafen wurden die einzelnen Datenpunkte der jeweiligen Kohorte zudem in die Darstellung integriert.

Das Signifikanzniveau α betrug 5% (sofern möglich als two-tailed Test) und Gruppenunterschiede wurden als statistisch signifikant gewertet, sofern der Signifikanzwert p das vorgegebene Signifikanzniveau ($\alpha = 0,05$) unterschritt. Für die Kennzeichnung von signifikanten Gruppenunterschieden wurde in Grafen/Tabellen die folgende Symbolik verwendet:

***: $p < 0,001$

**: $p < 0,01$

*: $p < 0,05$

ns: nicht statistisch signifikant

4 Ergebnisse

4.1 Deskriptive Beschreibung des Studienkollektivs

Im Rahmen der durchgeführten Studie untersuchten wir ein Studienkollektiv von insgesamt 120 Patienten. Die Aufteilung dieser Patienten erfolgte anhand der zugeteilten Kohorten und des gespendeten Materials, weshalb eine getrennte Beschreibung der Proben erfolgte:

Deskriptive Statistik gespendeter Blutproben

Es konnte von 99 Probanden Blutproben gewonnen werden. Hierbei wurde auf eine symmetrische Verteilung der möglichen Störvariablen Alter und Geschlecht bei der Rekrutierung der gesunden Kontrollen, bezogen auf die Gruppe der axSpA-Patienten, geachtet. Die genaue Verteilung ist in Tabelle 4.1 unten dargestellt. Zusammengefasst ergab sich bezogen auf Alter und Geschlecht eine nahezu gleiche Verteilung in der Gruppe der HC und der axSpA-Patienten (HC vs. axSpA: Medianes Alter 35,0 vs. 34,0 J; Geschlechterverhältnis m/w 48,57/51,43% vs. 55,17/44,83%). Das mediane Alter der axSpA-Patienten ist repräsentativ für diese Patientenpopulation. Ebenfalls repräsentativ waren in der PsA-Kohorte ($n = 20$), sowie in der Gruppe der RA-Patienten ($n = 15$) das Medianalter deutlich höher (52,5 bzw. 57,0 Jahre). Zusätzlich waren in der Gruppe der RA-Patienten primär weibliche Probanden ($n = 14$) (93,33% Frauenanteil), was nicht ganz repräsentativ für diese Erkrankung ist.

Die meisten der axSpA-Patienten waren HLA-B27 positiv (82,76%, $n = 24$). Der BASDAI-MW betrug $3,99 \pm 1,82$ ($n = 26$), entsprechend einer mittleren bis hohen Krankheitsaktivität. Dies korrespondiert mit dem hohen Anteil an nicht immunmodulatorisch behandelten Patienten (82,76%, $n = 24$). Die systemischen Inflammationsparameter CRP und BSG waren in dieser Gruppe jedoch kaum erhöht (CRP-MW $6,79 \pm 9,28$ mg/l und BSG-MW nach 1h $19,38 \pm 18,06$ mm). Der BASFI-MW betrug $1,77 \pm 1,73$ ($n = 26$) und der BASMI-MW $2,07 \pm 1,88$ ($n = 26$), was somit einer eher geringen Einschränkung entspricht.

Lediglich 15,00% ($n = 3$) der Patienten der PsA-Kohorte waren HLA-B27 positiv. Zudem lag nur bei 55,00% ($n = 11$) der PsA-Patienten eine Psoriasis oder eine immunmodulatorische Therapie vor.

In der RA-Kohorte waren jeweils ca. ein Drittel der Patientin positiv für Rheumafaktor (66,67%, $n = 10$) oder anti-CCP-Antikörper (60,00%, $n = 9$). Obwohl 53,33% der Patienten mit einem DMARD behandelt waren, betrug der mittlere DAS-28 CRP $4,00 \pm 1,14$ ($n = 10$), entsprechend einer moderaten Krankheitsaktivität. Der CRP-MW war mit $10,24 \pm 11,23$ mg/l ($n = 14$) in dieser Gruppe am höchsten.

Insgesamt lagen in allen Krankheitsgruppen leider nur von gut zwei Drittel der Probanden Krankheitsaktivitätsparameter oder aktuelle Laborwerte vor.

Deskriptive Statistik gespendeter Synoviaprobe

Insgesamt schlossen wir von 24 Probanden Synoviaprobe in unsere Analyse ein. Aufgrund der geringen Fallzahlen pro Kohorte und der Notwendigkeit der Entnahme im Rahmen einer operativen Intervention konnte hier keine Anpassung an möglich Störvariablen bezüglich der gesunden Kontrollgruppe erfolgen. Die durchschnittlichen präoperativen Entzündungswerte (CRP und BSG) waren bei diesen Patienten im Vergleich zu den Probanden, die nur Blutproben spendeten, deutlich erhöht. Für weitere klinische und demografische Daten verweise ich auf die nachfolgende Tabelle 4.2.

Blutproben (n = 99)		HC-Gruppe, n = 35	axSpA-Gruppe, n = 29	PsA-Gruppe, n = 20	RA-Gruppe, n = 15
Geschlecht, Anzahl (%)	männlich	17 (48,57)	16 (55,17)	13 (65,00)	1 (6,67)
	weiblich	18 (51,43)	13 (44,83)	7 (35,00)	14 (93,33)
Alter, Jahre Median (Max. Alter/Min. Alter)		35,0 (67/20)	34,0 (66/22)	52,5 (77/28)	57,00 (79/31)
HLA-B27 Status, Anzahl (%)	positiv	na	24 (82,76)	3 (15,00)	na
	negativ	na	5 (17,24)	10 (50,00)	4 (26,67)
Rheumafaktor, Anzahl (%)	positiv	na	1 (3,45)	na	10 (66,67)
	negativ	na	4 (13,79)	14 (70)	5 (33,33)
Anti-CCP AK, Anzahl (%)	positiv	na	na	na	9 (60,00)
	negativ	na	4 (13,79)	14 (70,00)	5 (33,33)
BASDAI-MW (SD/Anzahl)		na	3,99 (1,82/26)	2,44 (2,92/5)	na
BASFI-MW (SD/Anzahl)		na	1,77 (1,73/26)	0 (0/4)	na
BASMI-MW (SD/Anzahl)		na	2,07 (1,88/26)	0 (0/4)	na
DAS28-CRP-MW (SD/Anzahl)		na	1,81 (0,28/2)	2,66 (0,65/11)	4,00 (1,14/10)
CRP-MW in mg/l (SD/Anzahl)		na	6,79 (9,28/25)	9,03 (8,53/16)	10,24 (11,23/14)
BSG-MW 1h in mm (SD/Anzahl)		na	19,38 (18,06/24)	13,92 (11,55/13)	16,63 (9,16/8)
Behandlung	anti-TNF, Anzahl (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	DMARD, Anzahl (%)	0 (0)	4 (13,79)	8 (40,00)	8 (53,33)
	Steroide, Anzahl (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Keine immunmodulatorische Therapie, Anzahl (%)	35 (100)	24 (82,76)	11 (55,00)	7 (46,67)
Komorbiditäten	Uveitis, Anzahl (%)	0 (0)	3 (10,34)	1 (5,00)	1 (6,67)
	Psoriasis, Anzahl (%)	0 (0)	1 (3,45)	11 (55,00)	0 (0)
	CED, Anzahl (%)	0 (0)	3 (10,34)	0 (0)	0 (0)

Tabelle 4.1: Demographie und deskriptive Statistik Blutproben

Legende: HLA-B27 (Humanes Leukozytenantigen – B27); Anti-CCP AK (Anti-Zyklisches citrulliniertes Peptid Antikörper); BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index); BASFI (Bath Ankylosing Spondylitis Functioning Index); BASMI (Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index); DAS-28 CRP (Disease Activity Score 28 – CRP); CRP (C-Reaktives Protein); BSG (Blutsenkungsgeschwindigkeit nach 1h); DMARD (Disease modifying antirheumatic drug); CED (Chronisch entzündliche Darmerkrankung); HC (Gesunde Kontrolle); axSpA (Ankylosierende Spondylitis); PsA (Psoriasisarthritis); RA (rheumatoide Arthritis); n (Anzahl); SD (Standardabweichung); MW (Mittelwert); na (nicht vorhanden)

Synoviaproben (n = 24)		HC-Gruppe, n = 5	axSpA-Gruppe, n = 9	PsA-Gruppe, n = 3	RA-Gruppe, n = 7
Geschlecht, Anzahl (%)	<i>männlich</i>	3 (60,00)	5 (55,56)	1 (33,33)	0 (0)
	<i>weiblich</i>	2 (40,00)	4 (44,44)	2 (66,67)	7 (100,00)
Alter, Jahre Median (Max. Alter/Min. Alter)		39 (65/20)	51 (71/35)	47 (73/22)	70 (77/53)
Art des Gelenks	<i>Hüfte, Anzahl (%)</i>	3 (60,00)	5 (55,56)	0 (0)	0 (0)
	<i>Knie, Anzahl (%)</i>	2 (40,00)	2 (22,22)	2 (66,67)	5 (71,43)
	<i>Schulter, Anzahl (%)</i>	0 (0)	1 (11,11)	0 (0)	0 (0)
	<i>Hand, Anzahl (%)</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (14,29)
HLA-B27 Status, Anzahl (%)	<i>positiv</i>	na	7 (77,78)	na	na
	<i>negativ</i>	na	1 (11,11)	1 (33,33)	na
Rheumafaktor, Anzahl (%)	<i>positiv</i>	na	na	na	3 (42,86)
	<i>negativ</i>	na	1 (11,11)	1 (33,33)	3 (42,86)
Anti-CCP AK, Anzahl (%)	<i>positiv</i>	na	na	na	3 (42,86)
	<i>negativ</i>	na	1 (11,11)	1 (33,33)	na
BASDAI-MW (SD/Anzahl)		na	5,05 (1,49/4)	na	na
BASFI-MW (SD/Anzahl)		na	5,00 (2,26/2)	1,50 (0/1)	na
BASMI-MW (SD/Anzahl)		na	2,80 (0/1)	na	na
DAS28-CRP-MW (SD/Anzahl)		na	na	3,66 (0/1)	na
CRP-MW in mg/l (SD/Anzahl)		na	52,26 (95,19/4)	46,94 (33,82/3)	29,46 (50,78/5)
		na	35,00 (0/1)	3,50 (2,12/2)	14,75 (10,34/4)
Behandlung	<i>anti-TNF, Anzahl (%)</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>DMARD, Anzahl (%)</i>	0 (0)	1 (11,11)	1 (33,33)	3 (42,86)
	<i>Steroide, Anzahl (%)</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>Keine immunmodulatorische Therapie, Anzahl (%)</i>	5 (100)	8 (88,89)	2 (66,67)	4 (57,14)
Komorbiditäten	<i>Uveitis, Anzahl (%)</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>Psoriasis, Anzahl (%)</i>	0 (0)	2 (22,22)	1 (33,33)	0 (0)
	<i>CED, Anzahl (%)</i>	0 (0)	0 (0)	1 (33,33)	0 (0)

Tabelle 4.2: Demographie und deskriptive Statistik Synoviaproben

Legende: HLA-B27 (Humanes Leukozytenantigen – B27); Anti-CCP AK (Anti-Zyklisches citrulliniertes Peptid Antikörper); BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index); BASFI (Bath Ankylosing Spondylitis Functioning Index); BASMI (Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index); DAS-28 CRP (Disease Activity Score 28 – CRP); CRP (C-Reaktives Protein); BSG (Blutsenkungsgeschwindigkeit nach 1h); DMARD (Disease modifying antirheumatic drug); CED (Chronisch entzündliche Darmerkrankung); HC (Gesunde Kontrolle); axSpA (Ankylosierende Spondylitis); PsA (Psoriasisarthritis); RA (rheumatoide Arthritis); n (Anzahl); SD (Standardabweichung); MW (Mittelwert); na (nicht vorhanden)

4.2 Lokale Expression von IL-26 in Synovialgewebe

4.2.1 *IL-26 wird vermehrt in Synovialgewebe von Patienten mit axSpA exprimiert*

Als sekundärer Endpunkt unserer Studie wurde ein zu bestimmender Unterschied von IL-26 positiven Zellen in Synovialgewebe zwischen gesunden Kontrollen und Patienten mit axSpA, PsA und RA definiert.

Anhand der durchgeführten, Isotyp-kontrollierten, immunhistochemischen Analyse von IL-26 an Synoviaprobe peripherer Gelenke unserer Probanden (s. 3.5.3), konnten wir zeigen, dass alle drei von uns untersuchten Krankheitsentitäten bereits histopathologisch feststellbar vermehrt IL-26 in ihrer Synovia exprimierten (Abbildung 4.1 A). Die teilweise als Lymphfollikel organisierten IL-26 exprimierenden Leukozyten konnten bereits in einer 20x Vergrößerung erkannt werden. In einer 80x Vergrößerung erkennt man das zytoplasmatische Färbungsmuster der betreffenden Zellen, welches im Vergleich zu den gesunden Kontrollen und der Isotypen-Kontrolle in Kontrast zu den mit Hämatoxylin gefärbten Zellkernen eine kräftige Braunfärbung aufweist.

Um eine Quantifizierung der immunhistochemischen Färbung zu erreichen, bedienten wir uns dem von Varghese et al. entwickelten Open-Source Plugins IHC-Profiler (Varghese, Bukhari et al. 2014) wie unter 3.7.8 beschrieben. Mittels dieses Tools konnten wir zeigen, dass Patienten mit axSpA ($n = 9$; MW = 22,88%; SEM = 3,575%), im Vergleich zu gesunden Kontrollen ($n = 5$; MW = 5,25%; SEM = 0,5762%) bezogen auf alle analysierten Pixel in den Whole-Slide-Scans signifikant mehr IL-26+ Pixel aufweisen konnten (Abbildung 4.1 B, $p^{**} < 0,01$). Patienten mit PsA ($n = 3$; MW = 18,14%; SEM = 5,841%) und RA ($n = 7$; MW = 11,71%; SEM = 3,333%) zeigten ebenfalls einen erhöhten prozentualen Anteil IL-26+ Pixel, wobei aber im Vergleich zur Kohorte gesunder Kontrollen kein signifikanter Unterschied bestand.

Um ein besseres Verständnis der hierfür lokal verantwortlichen Zellen zu entwickeln, führten wir zudem Färbungen mittels Isotypen-kontrollierter Immunfluoreszenz durch (s. 3.5.4). Die für das Multiplexing verwendeten Kanäle waren DAPI (blau), FITC (grün) und AF594 (rot). Die Einzelbilder der jeweiligen Kanäle wurden anschließend in einem Overlay zusammengefügt um Kollokalisierungen zu detektieren.

Hier konnten wir beispielshalber für einen axSpA-Patienten zeigen, dass CD68 mit IL-26 kollokalisiert (Abbildung 4.1 C). Dies könnte auf eine Produktion von IL-26 durch CD68+ Makrophagen im Gelenk hinweisen. Weitere Kollokalisierungen von IL-26 mit den von uns untersuchten Sekundärantigenen CD3 (IL-26+ T-Zellen), SMA (aktivierte IL-26+ Myofibroblasten), CD163 (IL-26+ Makrophagen) und IL1R1 (pathologische IL-26+ Th17-Zellen), CD90

(fibroblastenähnliche Synoviozyten unterhalb des synovialen Epithels) und CAD11 (fibroblastenähnliche Synoviozyten der Synovialschleimhaut) konnten wir nicht nachweisen. Man beachte die negative Emission im roten Farbkanal (IL-26) für die dargestellten Isotypenkontrolle von IL-26 im Overlay mit SMA bzw. CD3 (rechte Spalte Abbildung 4.1 C).

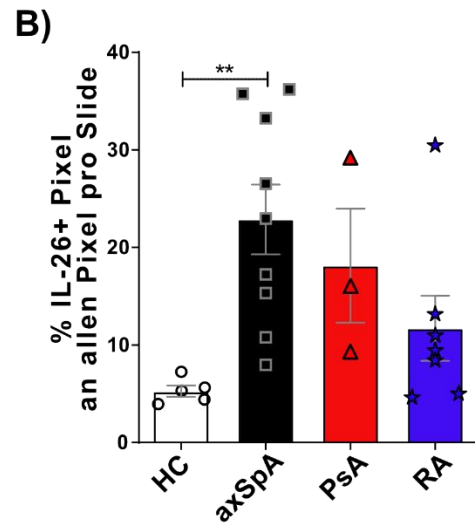
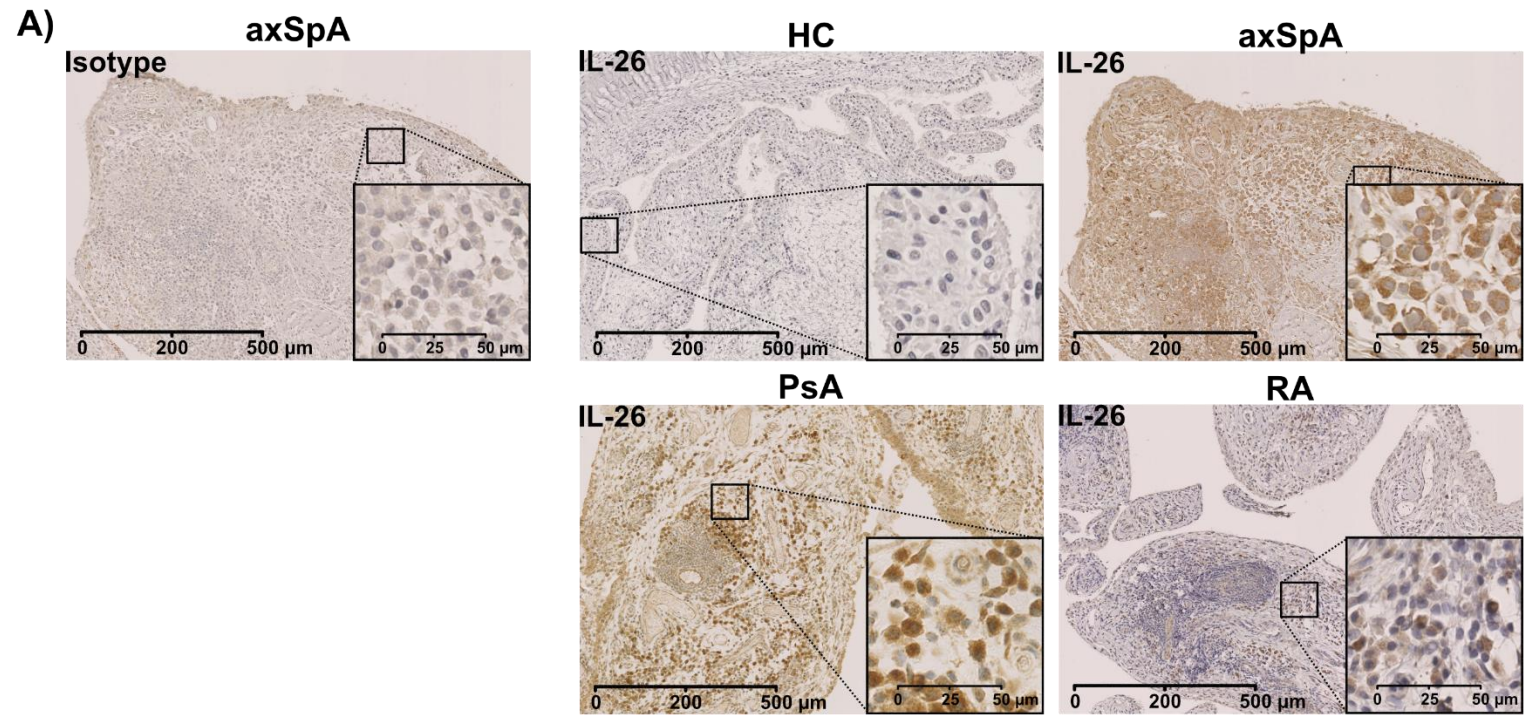
Die Quantifikation der IHC-Färbung von IL-26 mittels IHC-Profiler ist als Isotyp-kontrollierte Methodik zur Detektion von Gruppenunterschieden verwertbar. Da für jeden Färbedurchgang ein Pärchen mittels anti IL-26 IgG2B mAb und konzentrationsgleichem, primären Isotypantikörper markierter Slides existierte, konnten wir die Methodik im direkten Gruppenvergleich validieren (die zugehörige Abbildung 7.2 finden Sie im Anhang vor). Die gefärbten Kontrollslides ($n = 6$; $MW = 5,727 \times 10^8$ Pixel/Slide; $SEM = 1,344 \times 10^8$ Pixel/Slide) hatten somit beinahe dieselbe Größe, wie die IL-26+ IHC-Slides ($n = 6$; $MW = 5,543 \times 10^8$ Pixel/Slide; $SEM = 3,341 \times 10^8$ Pixel/Slide) ($p = ns$). Für alle untersuchten Pixelintensitäten konnten wir einen signifikanten Gruppenunterschied festhalten ($p^* < 0,05$).

Wie unter 3.6.4 bereits beschrieben, führten wir zur Sicherung der Verwertbarkeit der registrierten Emissionsspektren der FITC und AF594 Kanäle unserer Immunfluoreszenzversuche für alle verwendeten Primärantikörper konzentrationsgleiche Isotypkontrollfärbungen durch. Besagte Isotypkontrollen wurden anschließend zur Kalibrierung der Einstellungen des Konfokalmikroskops, vornehmlich der Power des Lasers und des jeweiligen Gains, des zugehörigen Emissionskanals, genutzt. Die Einstellungen wurden so gewählt, dass der Farbkanal der zugehörigen Isotypkontrolle nach Möglichkeit kein Signal generierte.

Abbildung 7.3 (im Anhang) zeigt für alle Primärantikörper der untersuchten Antigene (anti-IL-26, anti-CD3, anti-SMA, anti-CD163, anti-IL1R1 und anti-CD68) eine repräsentative Isotypenkontrollfärbung von Synovialgewebeproben der Entität axSpA. Die der Isotypenkontrolle zugehörigen Farbkanäle (FITC bzw. AF594) generieren nachweislich kein spezifisches Emissionssignal.

Zudem konnten wir der in Abbildung 4.1 C von uns dargestellten Kolo-kalisation von IL-26 mit CD68 bei Patienten mit axSpA, anhand einer weiteren Färbung einer beispielhaften PsA-Probe, Nachdruck verleihen, da wir auch hier eine Kolo-kalisation der beiden Antigene vorfinden konnten (Abbildung 7.4, im Anhang). Selbiges gilt für die bereits unter 4.2.1 beschriebene, fehlende Kolo-kalisation von SMA bzw. CD163 mit IL-26.

Abb. 4.1



C)

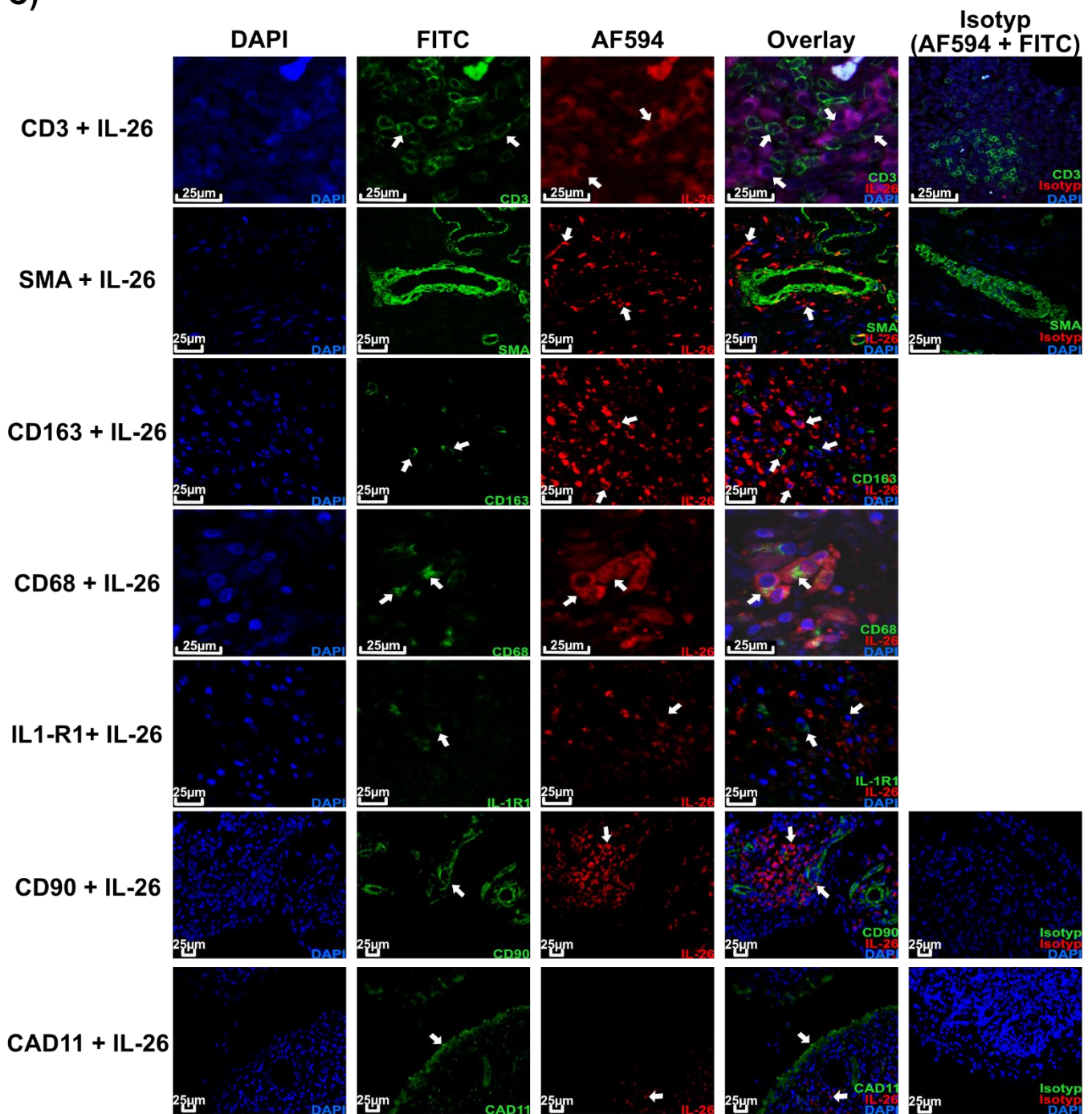


Abbildung 4.1: Lokale IL-26 Expression in Synovialgewebe

(A) *Repräsentative Immunhistochemie auf IL-26 der Synovialgewebeproben* von axSpA ($n = 9$), PsA ($n = 3$), RA ($n = 7$) Patienten und HCs ($n = 5$), braun = monoklonaler anti-humaner IL-26 IgG2B AK oder monoklonaler anti-humaner Isotypenkontroll- IgG2B AK, je einmal in 20x (Skala 500 µm) und 80x (Skala 50 µm) Vergrößerung.

(B) *Semiquantitative Analyse der IL-26-Färbung mittels IHC-Profiler*. Dargestellt ist der Prozentwert IL-26+ Pixel bezogen auf alle Pixel aller Einzelbilder der jeweils ausgehenden Whole-Slide Scans als MW mit zugehörigem SEM. Hierfür addierte man die einzelnen ermittelten Pixelanzahlen der Kategorien „stark positiv“, „positiv“ und „wenig positiv“ und setzte diese in Bezug zur ermittelten Gesamtpixelzahl aller Einzelbilder des jeweiligen

*Slides. ($p^{**} < 0,01$ Kruskal-Wallis Test). (C) **Konfokale Immunfluoreszenz** (von oben nach unten: CD3, SMA, CD163, CD68, IL-1-R1, CD90, CAD11) am Beispiel eines axSpA-Patienten ($n = 1$). Von links nach rechts: DAPI (blau), FITC (grün), AF594 (rot) und Overlay (Spalte ganz rechts entspricht Isotypkontrolle für IL-26 bzw. dem Zweitantikörper im Overlay). Pfeile weisen auf die angefärbten Bereiche von Interesse im jeweiligen Farbkanal hin.*

4.2.2 PsA-Patienten weisen einen signifikant erhöhten Anteil stark positiv IL-26 exprimierender Zellen in Synovialgewebe auf

Da augenscheinlich in der Immunhistochemie für IL-26 auch eine deutlich vermehrte Positivität im PsA-Gewebe aufgefallen war, sich aber diese nicht statistisch bestätigte, führten wir eine detaillierte Auswertung durch.

Hierfür analysierten wir zunächst die durchschnittliche Gewebegröße durch Addition der Gesamtpixelzahlen aller Einzelbilder der jeweiligen Slides einer Kohorte. Hierbei zeigten sich die Gewebeproben der Slides der RA-Kohorte mit einem Mittelwert von 97,86 Bildern/Slide ($n = 7$; SEM = 6,906 Bilder/slide) und $4,894 \times 10^8$ Pixeln/Slide ($n = 7$; SEM = $3,407 \times 10^7$ Pixel/Slide) signifikant größer als die der Gruppe der HCs mit im Schnitt 37,20 Bildern/Slide ($n = 5$; SEM = 6,756 Bilder/Slide) und hieraus resultierenden $1,853 \times 10^8$ Pixeln/Slide ($n = 5$; SEM = $3,311 \times 10^7$ Pixel/Slide) (Abbildung 4.2 B, $p^* < 0,05$). Trotz des signifikanten Größenunterschieds konnten die Proben der RA-Kohorte in keiner Unterkategorie der Pixelintensitäten einen signifikanten Unterschied gegenüber den HCs zeigen.

Die genauere Untersuchung der Gruppenunterschiede innerhalb der unterschiedlichen Staining-Kategorien brachte für den bereits festgehaltenen signifikanten Gruppenunterschied von IL-26+ Pixeln zwischen der axSpA- und HC-Kohorte keine weiteren Erkenntnisse. In allen Unterklassifikationen der Pixelintensitäten konnten wir sehen, dass Patienten der axSpA-Kohorte signifikant mehr IL-26+ Pixel aufweisen. Auch für die negativ klassifizierten Pixel konnten wir den gegenteiligen Kontrollnachweis erbringen, dass Patienten mit axSpA ($n = 9$; MW = 77,12%; SEM = 3,575%) gegenüber gesunden Kontrollen ($n = 5$; MW = 94,75%; SEM = 0,5762%) signifikant weniger als IL-26 negativ zu klassifizierende Pixel haben (Abbildung 4.2 F, $p^{**} < 0,01$).

Jedoch ergab sich für Patienten mit PsA ($n = 3$; MW = 0,3321%; SEM = 0,1657%) in der Kategorie stark IL-26 positiver Pixel (Threshold 0-60) gegenüber den HCs ($n = 5$; MW = 0,00021%; SEM = $8,883 \times 10^{-5}\%$) ein signifikant höherer Anteil (Abbildung 4.2 C, $p^* < 0,05$). Dieser Unterschied wurde durch die Zusammenfassung aller Pixelintensitätskategorien zuvor verdeckt (s. Abbildung 4.1 B). Aufgrund der kleinen Gruppengröße der PsA-Kohorte ($n = 3$) muss der nachgewiesene Unterschied in dieser Unterkategorie derart hoch sein, dass trotz dieser Limitation eine statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte.

Abb. 4.2

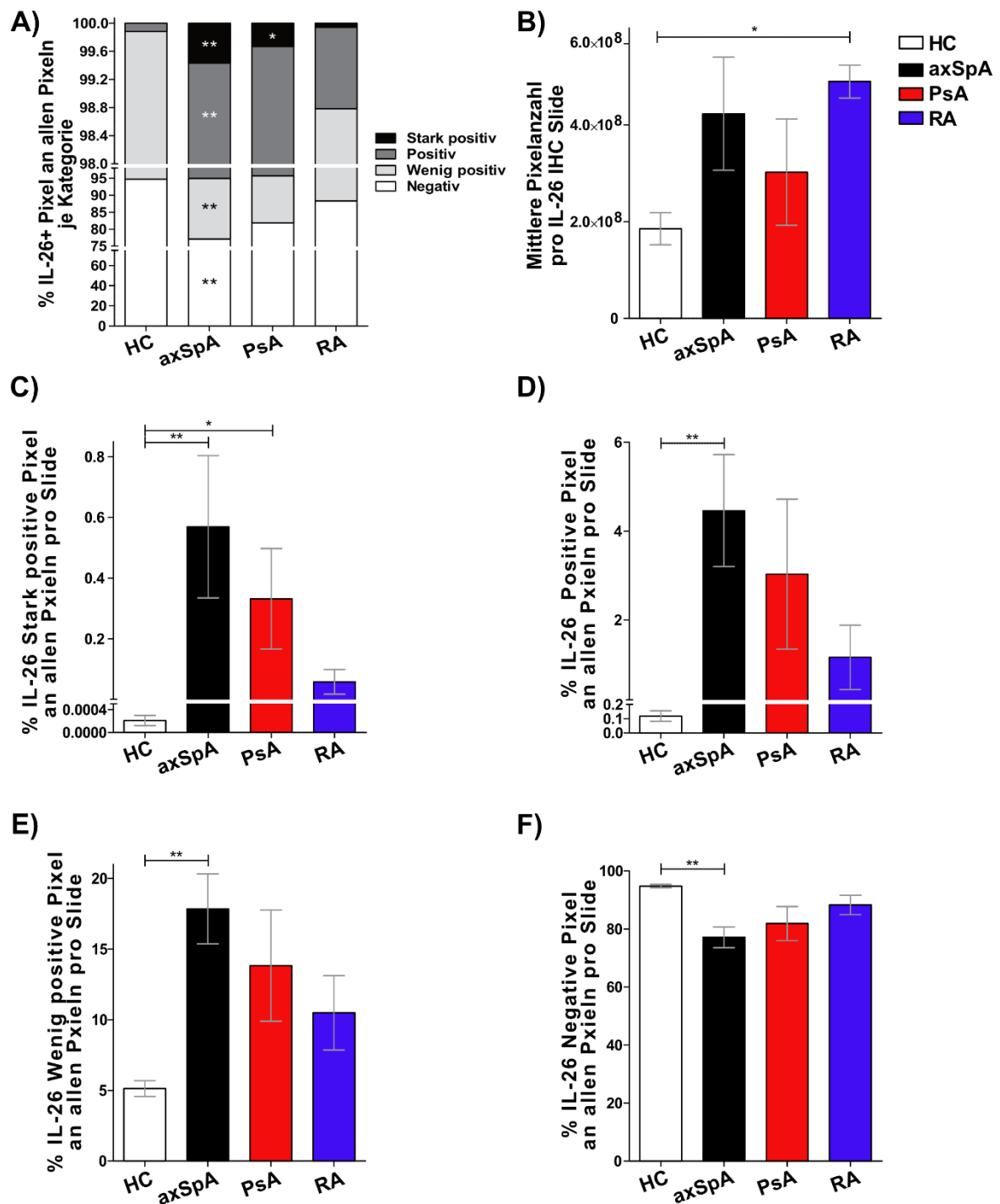


Abbildung 4.2: Quantitative Analyse IL-26+ Synovialgewebeproben nach Staining Kategorien

(A) Zusammenfassung der festgehaltenen Gruppenunterschiede für alle Pixelintensitätskategorien der in (C) – (F) durchgeführten Analysen für IL-26+ gefärbte IHC-Slides, aufgetrennt nach den jeweiligen Kohorten (Säulen) und Kategorien (Graustufen). Dargestellt als %-Werte bezogen auf die Gesamtpixelzahl. (*) markiert festgestellte signifikante Unterschiede ($p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$) innerhalb der jeweiligen Kategorie, bezogen auf die zugehörige Kohorte vs. HCs. (B) Mittlere Größe der digitalisierten Slides aller Kohorten, als MW ($\pm$ SEM) der Gesamtpixelzahl aller Einzelbilder aller digitalisierten Slides je Kohorte. Die Abbildungen (C) – (F)

veranschaulichen für die einzelnen Pixelintensitätskategorien des IHC-Profilers mögliche Gruppenunterschiede zwischen den Kohorten HC ($n = 5$), axSpA ($n = 9$), PsA ($n = 3$) und RA ($n = 7$). Die Thresholds der einzelnen Pixelintensitätskategorien wurden definiert als: (C) Stark positiv 0-60; (D) Positiv 61-120; (E) Wenig Positiv 121-180; (F) Negativ 181-235. Als statistischer Test wurde jeweils der Kruskal-Wallis Test mit Dunns Post Test verwendet.

4.3 Systemische Expression von IL-26 in Serumproben

4.3.1 Erhöhte IL-26-Spiegel bei Patienten mit PsA und RA

Im Rahmen der von uns durchgeführten Studie setzten wir uns den primären Endpunkt eines festzuhaltenden Unterschieds der IL-26 Serumkonzentrationen zwischen gesunden Kontrollen und Patienten der Entitäten axSpA, PsA und RA gemessen mittels ELISA.

Nachdem wir, wie in 4.2 dargestellt, für Patienten der Krankheitsbilder axSpA und in geringerem Umfang auch für PsA-Probanden einen signifikanten Unterschied der lokalen IL-26 Produktion in Synovialgewebeproben gegenüber HCs verzeichnen konnten (s. 4.2.1; 4.2.2), gingen wir zunächst von einem analogen Gruppenunterschied bei den untersuchten Serumproben aus.

Die mittels ELISA auf IL-26 untersuchten Serumproben wiesen jedoch lediglich für Patienten mit PsA ($n = 20$; MW = 649,3 pg/ml; SEM = 153,2 pg/ml) und RA ($n = 15$; MW = 970,5 pg/ml; SEM = 238,2 pg/ml) einen signifikant höheren IL-26 Serumspiegel gegenüber der Gruppe der HCs ($n = 35$; MW = 131,8 pg/ml; SEM = 25,19 pg/ml) auf (s. Abbildung 4.3; PsA $p^{**} < 0,01$; RA $p^{***} < 0,001$). axSpA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen konnten einen derartigen Gruppenunterschied nicht verzeichnen ($n = 29$; MW = 187,2 pg/ml; SEM = 60,78 pg/ml; $p = \text{ns}$).

Somit konnte der primäre Endpunkt lediglich für die Gruppenvergleiche von Patienten mit RA bzw. PsA gegenüber gesunden Kontrollen erreicht werden, nicht jedoch für die Gruppe der axSpA-Patienten. Dies ist insbesondere interessant, da in der Immunhistochemie der Synovia axSpA und PsA-Proben gegenüber HCs mehr IL-26 zeigten (s. Abbildung 4.2).

4.3.2 IL-26 Serumkonzentrationen korrelieren positiv mit dem CRP-Spiegel von axSpA-Patienten

Aufgrund der Diskrepanz, zwischen lokaler und systemischer IL-26-Expression untersuchten wir Korrelationen der IL-26-Serumspiegel mit den klinischen Patientenparametern (s. Tabelle 4.1).

Für axSpA-Patienten ($n = 25$) konnten wir eine plausible, positive Korrelation von steigenden IL-26-Serumspiegeln und steigenden Serum-CRP-Konzentrationen nachweisen ($r = 0,4666$; 95%-CI $[r] = 0,08757$ bis $0,7277$; $r^2 = 0,2177$; s. Abbildung 4.4 $p^* < 0,05$). Diese statistisch signifikante Korrelation konnten wir bei Patienten mit PsA ($n = 16$; $r = -0,2012$; 95%-CI $[r] = -0,6338$ bis $0,3272$; $r^2 = 0,0405$; $p = \text{ns}$) und bei Patienten mit RA ($n = 14$; $r = 0,5021$; 95%-CI $[r] = -0,03893$ bis $0,8155$; $r^2 = 0,2521$; $p = \text{ns}$) nicht nachweisen.

Weitere statistisch signifikante positive oder negative Korrelationen zwischen der IL-26-Serumkonzentration und den klinischen Parametern (s. Tabelle 4.1), konnten wir nicht finden.

Abb. 4.3

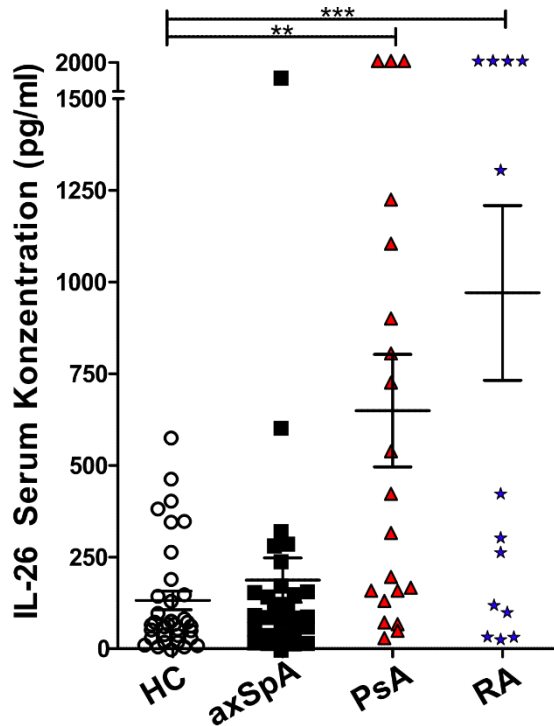


Abbildung 4.3: IL-26 Serumkonzentrationen

Dargestellt sind die IL-26 Serumkonzentrationen in pg/ml der Krankheitsentitäten axSpA ($n = 29$), PsA ($n = 20$), RA ($n = 15$), sowie der Gruppe gesunder Kontrollen HC ($n = 35$) als $MW \pm SEM$ und die einzelnen zugehörigen Datenpunkte (HC vs.: PsA $p^{**} < 0,01$; RA $p^{***} < 0,001$; axSpA $p = ns$; One-Way ANOVA mit Dunnett Post Test).

Abb. 4.4

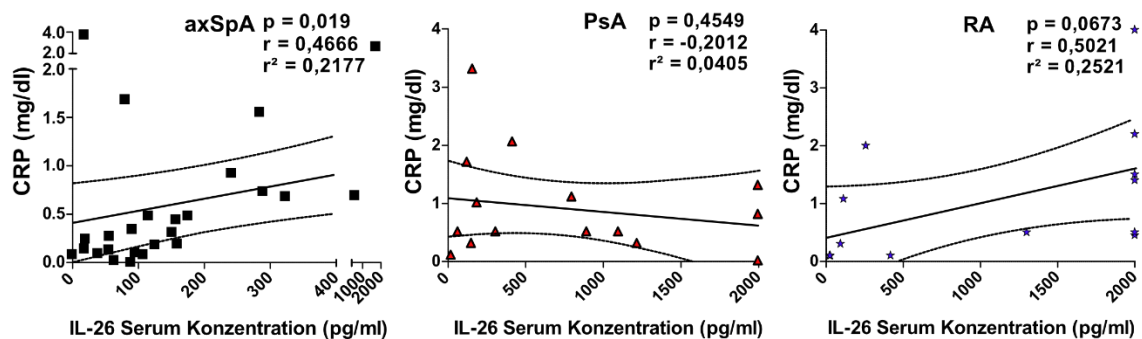


Abbildung 4.4: Korrelationen zwischen IL-26- und CRP-Serumkonzentrationen

Untersuchung möglicher Korrelationen zwischen der IL-26 Serumkonzentration in pg/ml (x-Achse) und der zugehörigen CRP-Serumkonzentration im mg/dl (y-Achse), aufgetrennt nach Kohorten (axSpA $n = 25$; PsA $n = 16$; RA

$n = 14$). Dargestellt ist jeweils der zugehörige Pearson Korrelationskoeffizient r (Range: -1 bis 1), der zugehörige „goodness of fit“ Wert r^2 (Range: 0 bis 1), sowie das Ergebnis der durchgeführten Pearson-Korrelationsanalyse, die statistische Signifikanz betreffend (p -Wert). Zudem wurden Trendlinien eines linearen Regressionsmodells der jeweiligen Daten (durchgezogene Linien) mit zugehörigem 95% Konfidenzintervall (gestrichelte Linien) zur besseren Veranschaulichung des korrelativen Zusammenhangs eingezeichnet.

4.4 Immunphänotypisierung IL-26 produzierender PBMCs

4.4.1 *IL26 transkribierende PBMCs lassen sich mittels PrimeFlow-Assay darstellen und durch Th17-Oberflächenmarker und IL-1-R1 näher charakterisieren*

In diversen Vorversuchen gelang es nicht IL-26+ PBMCs mittels aktuell verfügbarer anti-IL-26-Antikörper am Durchflusszytometer verlässlich zu detektieren. Daher führten wir eine auf mRNA-Expression basierende, durchflusszytometrische Methode zur Bestimmung des prozentualen Anteils an *IL26*-positiven T-Zellen an in-vitro stimulierten PBMCs von HCs, axSpA- und PsA-Patienten durch (PMA + Ionomycin 4h; axSpA n = 15; PsA n = 14; HCs n = 15). Zur näheren Charakterisierung der T-Zellen wurden gleichzeitig Färbungen von standardisierten Oberflächen-Antigenen und intrazellulären Zytokinen angewandt (s. 3.7.6).

Abbildung 4.5 A zeigt am Beispiel eines PsA-Patienten für CD4+ T-Helfer Zellen, dass 3,27% der CD4+ Leukozyten dieses Patienten *IL26*-mRNA-Transkripte aufweisen konnten. Zur Normierung wurden für alle Patienten *IL26*-FMO-Kontrollen und pro Platte mindestens eine Referenzgen Kontrolle (*60S ribosomales Protein L13a* bzw. *RPL13a*) mitgeführt. Der unter Abbildung 4.5 A dargestellte Patient zeigt für die FMO *IL26*, dass 0,015% der CD4+ T-Zellen als „*IL26*+“ markiert wurden und für die Positivkontrolle, 99,3% mittels *RPL13A* Sonde als positiv. Am Beispiel des Patienten ergeben sich somit $(3,31\% - 0,070\% =) 3,24\%$, als Datenpunkt erfasste *IL26*-transkribierende CD4+ T-Zellen, die in die Statistik eingingen.

Wir konnten zeigen, dass Patienten mit axSpA (n = 15; MW = 4,742%; SEM = 1,692%) und PsA (n = 14; MW = 4,416%; SEM = 0,6391%) tendenziell mehr *IL26* transkribierende CD4+ T-Helferzellen aufweisen, als die Gruppe der HCs (n = 15; MW = 3,704%; SEM = 0,8510%). Patienten mit axSpA (n = 15; MW = 8,362%; SEM = 2,626%) und PsA (n = 14; MW = 7,621%; SEM = 1,034%) weisen im Vergleich zu gesunden Kontrollen (n = 15; MW = 6,632%; SEM = 1,795%) einen höheren Anteil *IL26* transkribierender PBMCs bezogen auf alle CD4+CD26+CD161+ T-Zellen auf. Die dargestellten Unterschiede waren jedoch, wohl aufgrund der kleinen Effektstärke und Gruppengröße, nicht signifikant (Abbildung 4.5 B; p = ns).

Da IL-1-R1+ „antimikrobielle Th17-Zellen“ bereits als relevante Produzenten von IL-26 beschrieben wurden, wandten wir die publizierte Oberflächencharakterisierungsstrategie an (s. Abbildung 3.3 B) (Weiss, Ma et al. 2019). Pro Platte wurde mindestens eine IL-1-R1 FMO Kontrolle geführt (Abbildung 4.5 C).

Wir konnten für Patienten mit PsA (n = 14; MW = 4,40%; SEM = 1,132%), gegenüber gesunden Probanden (n = 21; MW = 1,784%; SEM = 0,2468%) signifikant mehr IL-1-R1+ Th17-Zellen (CD3+CD4+CD45RO+CCR6+CD161+CCR4+CXCR3- T-Zellen), bezogen auf

lebendige CD4⁺ T-Zellen nachweisen ($p^{**} < 0,01$). Für Patienten mit axSpA ($n = 22$; MW = 1,604%; SEM = 0,2341%) und RA ($n = 13$; MW = 1,693%; SEM = 0,3455%) galt dies nicht ($p = ns$). Auch für den Anteil IL-1-R1+CD26+CD161+ Gedächtniszellen (CD45RO⁺) an lebendigen CD4⁺ Zellen ergab sich für Patienten mit PsA ($n = 14$; MW = 11,20%; SEM = 2,843%) im Vergleich zu HCs ($n = 21$; MW = 5,765%; SEM = 0,7430%) ein signifikant höherer Prozentsatz ($p^* < 0,05$), für axSpA ($n = 22$; MW = 4,93%; SEM = 0,6795%) und RA-Patienten ($n = 13$; MW = 3,857%; SEM = 0,706%) jedoch nicht ($p = ns$) (s. Abbildung 4.5 D).

Abb. 4.5

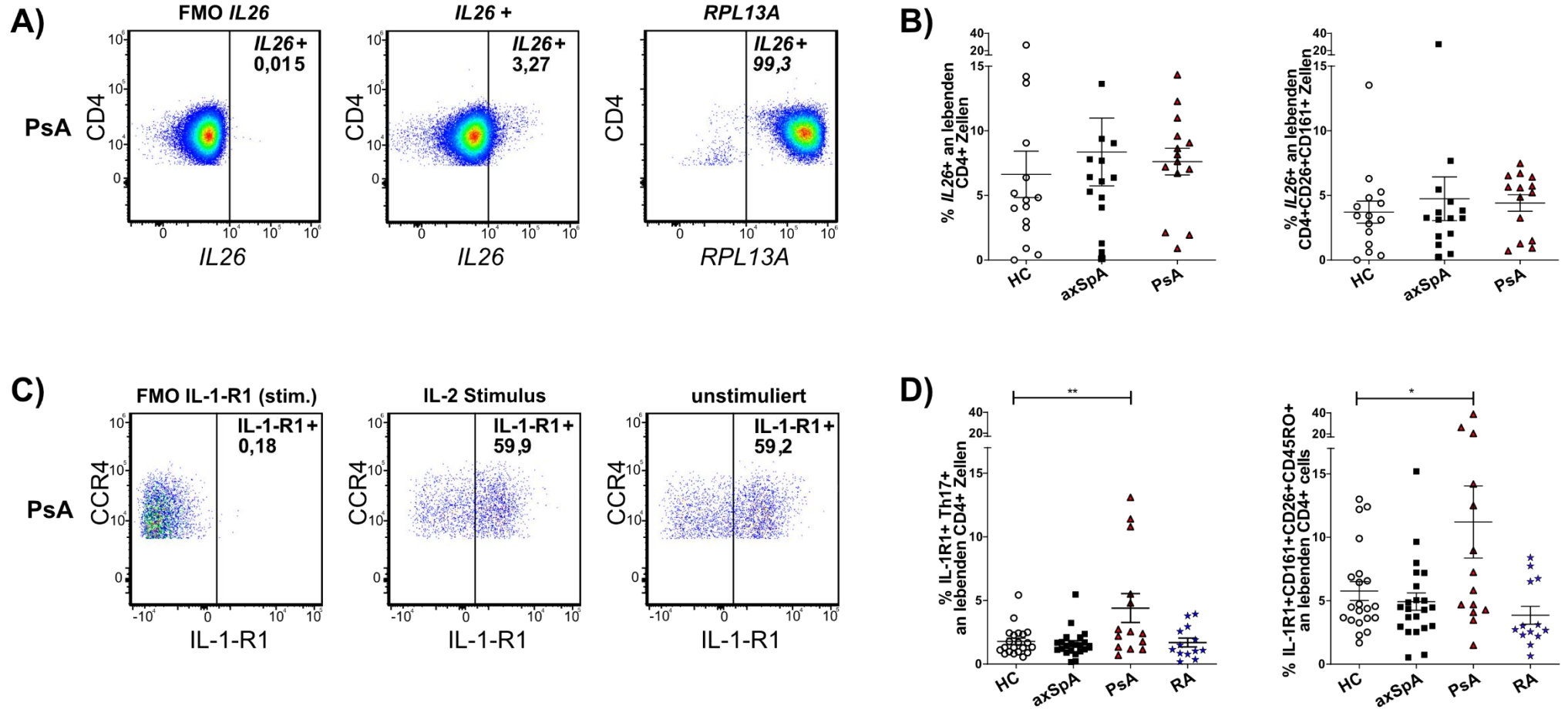


Abbildung 4.5: Interleukin-26 Transkription und IL-1-R1+ Th17 Zellen in PBMCs

(A) Beispielhaftes PrimeFlow-Assay für IL26 an einem PsA-Patienten mit zugehöriger FMO- und RPL13A-Kontrolle (PBMCs, in-vitro-Stimulation mit 100 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin; x-Achse CD4 und y-Achse IL26 bzw. RPL13A). **(B) Graphische Darstellung des %-Anteils IL26-transkribierender Leukozyten** an lebenden CD4+ (links) bzw. an lebenden CD4+CD26+CD161+ Zellen (rechts) mittels PrimeFlow-Assay (axSpA: n = 15, PsA: n = 14, HCs: n = 15; p = ns). **(C) Beispielhafte Oberflächenfärbung für IL-1-R1 an PBMCs eines PsA-Patienten** (In-vitro-Stimulation mit 1000 IU/ml IL-2 über Nacht; x-Achse CD4 und y-Achse IL1-R1). **(D) Graphische Darstellung des %-Anteil IL-1-R1+ Th17-Zellen** (CD3+CD4+CD45RO+CCR6+CD161+ CCR4+CXCR3-) an lebenden CD4+ Zellen (links) bzw. %-Anteil IL-1-R1+CD26+CD161+ Gedächtniszellen (CD45RO+) an lebenden CD4+ Th-Zellen (rechts) (HC: n = 21; axSpA: n = 22; PsA: n = 14; RA: n = 13; p* < 0,05; p** < 0,01). Als statistischer Test wurde jeweils ein One-way ANOVA mit Dunnett Post-test verwendet.

4.4.2 PrimeFlow ist eine geeignete Methode zur Detektion und Phänotypisierung von IL26 transkribierenden „rare cells“

Zur genaueren Charakterisierung der IL26 transkribierenden T-Zellen wurden diese mittels Durchflusszytometrie zusätzlich auf Expression von bestimmten Zelloberflächenmolekülen und Zytokinen hin untersucht. Insbesondere die Surrogatmarker potentiell pathogener Th17-Zellen CD26 und CD161 sowie die „Signature“-Zytokine IL-17A und IFN-γ waren von Interesse (s. Abbildung 3.3 A).

Der Übersichtlichkeit halber werden im Folgenden die ebenfalls in Abbildung 4.6 A & B grafisch dargestellten Ergebnisse getrennt für die CD4+ bzw. CD8+ Populationen tabellarisch zusammengefasst präsentiert. Als einen wichtigen Punkt konnten wir festhalten, dass in allen Kohorten der Anteil IL-26+ an lebenden CD4+IL-17A+ T-Zellen im Mittel höher ausfiel, als für CD4+IFN-γ+ T-Zellen (s. Tabelle 4.3 und Abbildung 4.6 A).

Abbildung 4.6 C wiederum veranschaulicht, dass die Detektion von IL26 mRNA Transkripten mittels PrimeFlow eine valide Methodik zur genaueren Phänotypisierung von potentiellen IL-26 produzierenden Leukozyten darstellt. So konnten wir durch unsere Positivkontrollen RPL13A (n = 13) und Negativkontrollen, mittels FMO IL26 (n = 40) gegenüber den mit tatsächlichen IL26 Sonden markierten Patientenproben (n = 40) zeigen, dass das von uns gemessene Signal für IL26 spezifisch ist. Der Anteil der RPL13A+, als „IL26+“ detektierten Zellen, an allen lebenden CD4+ Th-Zellen, die mittels RPL13A+ Sonden als Positivkontrolle markiert wurden (MW = 95,38%; SEM = 2,655%; p *** < 0,001), war signifikant größer, als der Anteil der mittels IL26+ mRNA-Sonden markierten und korrekt als IL26+ charakterisierten Leukozyten (MW = 4,141%; SEM = 0,4159%). Zudem war der Anteil der fälschlicherweise „IL26+“ detektierten Zellen, die als FMO IL26 nicht mit IL26 mRNA Sonden markiert wurden (MW = 0,3168%; SEM = 0,04379%; p *** < 0,001), signifikant geringer als für die mittels RPL13A oder IL26 Sonden markierten CD4+ Th-Zellen. Das von uns durch PrimeFlow als IL26+

beschriebene Signal scheint somit für die Beschreibung *IL26* transkribierender Leukozytenpopulationen geeignet.

%-Phänotyp PBMCs	HC	axSpA		PsA	
CD4+	(n = 15)	(n = 15)		(n = 14)	
	MW ± SEM [%]	MW ± SEM [%]	p-Wert	MW ± SEM [%]	p-Wert
% CD26+CD161+ an lebenden CD4+	11,83 ± 1,191	13,03 ± 1,607	ns	9,954 ± 1,494	ns
% <i>IL26</i> + an lebenden CD4+CD161+	5,908 ± 1,447	7,654 ± 2,253	ns	7,149 ± 0,9502	ns
% <i>IL26</i> + an lebenden CD4+CD26+	4,079 ± 0,9493	5,439 ± 2,268	ns	4,902 ± 0,7124	ns
% CD26- an lebenden CD4+	12,86 ± 2,327	18,65 ± 4,253	ns	11,70 ± 1,723	ns
% IL-17A+ an lebenden CD4+	0,7373 ± 0,1667	0,6251 ± 0,1139	ns	0,6064 ± 0,09377	ns
% <i>IL26</i> + an lebenden CD4+IL-17A+	21,91 ± 3,980	20,13 ± 2,342	ns	21,74 ± 13,33	ns
% <i>IL26</i> +IL-17A+ an lebenden CD4+	0,1538 ± 0,0353	0,1348 ± 0,03205	ns	0,1515 ± 0,04163	ns
% IFN-γ+ an lebenden CD4+	10,22 ± 3,073	9,308 ± 1,383	ns	12,64 ± 2,898	ns
% <i>IL26</i> + an lebenden CD4+IFN-γ+	5,850 ± 1,301	6,730 ± 1,693	ns	5,728 ± 0,8131	ns
% <i>IL26</i> +IFN-γ+ an lebenden CD4+	0,8181 ± 0,3667	0,7065 ± 0,2086	ns	0,5563 ± 0,1390	ns

Tabelle 4.3: PFA – *IL26* transkribierende CD4+ Subpopulationen

%-Phänotyp PBMCs	HC	axSpA		PsA	
CD8+	(n = 15)	(n = 15)		(n = 14)	
	MW ± SEM [%]	MW ± SEM [%]	p-Wert	MW ± SEM [%]	p-Wert
% <i>IL26</i> + an lebenden CD8+	2,263 ± 0,5264	4,206 ± 1,545	ns	3,173 ± 0,4212	ns
% <i>IL26</i> + an lebenden CD8+CD161+	8,104 ± 2,039	9,417 ± 1,675	ns	7,823 ± 2,026	ns
% <i>IL26</i> + an lebenden CD8+CD26+	3,305 ± 0,7798	5,471 ± 2,219	ns	3,901 ± 0,5657	ns
% <i>IL26</i> + an lebenden CD8+CD26+CD161+	11,29 ± 3,33	11,09 ± 1,99	ns	10,63 ± 2,85	ns
% IL-17A+ an lebenden CD8+	0,7827 ± 0,07957	0,5793 ± 0,1159	ns	0,9493 ± 0,2106	ns
% IFN-γ+ an lebenden CD8+	35,88 ± 5,465	28,09 ± 4,186	ns	38,97 ± 7,389	ns

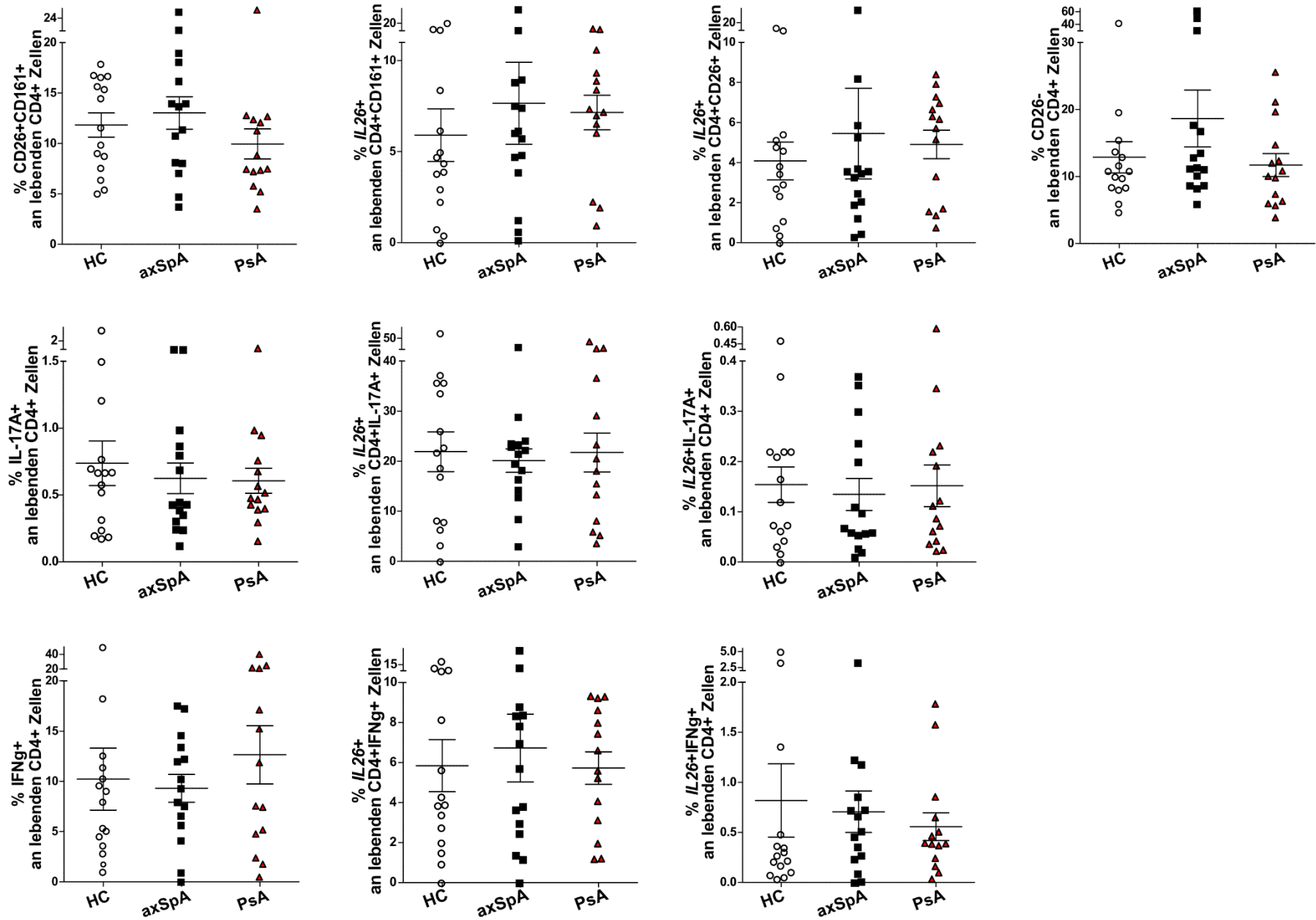
Tabelle 4.4: PFA - *IL26* transkribierende CD8+ Subpopulationen

Legende Tab. 4.3 & 4.4: MW ± SEM; PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells); HC (Healthy control); axSpA (Ankylosierende Spondylitis); PsA (Psoriasisarthritis); MW (Mittelwert); SEM (Standardfehler); ns (nicht

signifikanter Gruppunterschied bezogen auf die HC-Kohorte); PFA (PrimeFlow Assay) One-way ANOVA mit Dunnett Post-test

Abb. 4.6

A)



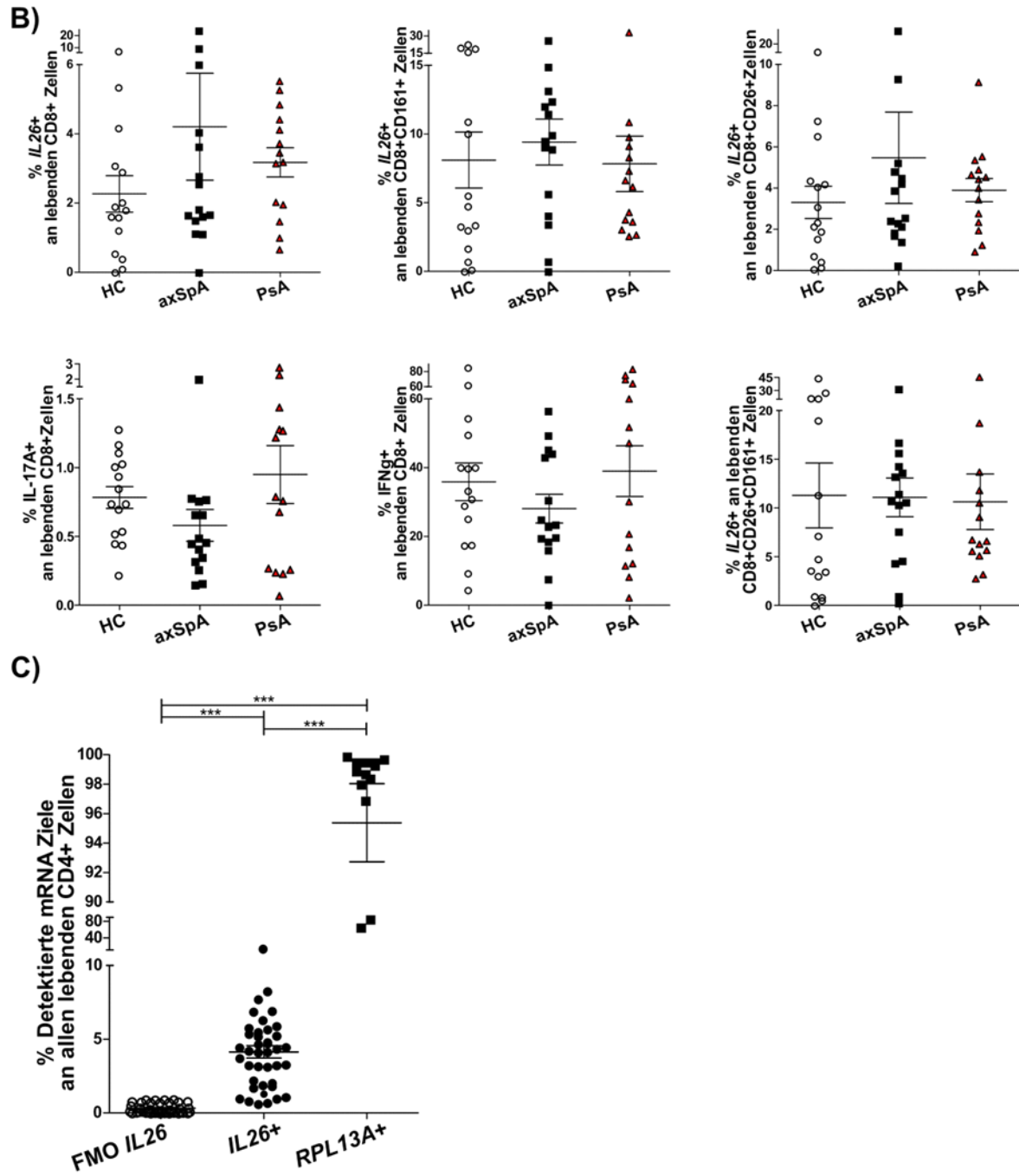


Abbildung 4.6: Subpopulationen *IL26* transkribierender PBMCs und PrimeFlow Assay Methodenbeweis

(A) Grafische Darstellung der in Tabelle 4.3 bzw. für (B) in Tabelle 4.4, aufgeführten Daten. (C) Methodenbeweisführung anhand RPL13A ($n = 13$) als Positiv- und FMO IL26 ($n = 40$) als Negativkontrollgruppe für IL26+ detektierte PBMCs ($n = 40$; $p^{***} < 0,001$). Als statistischer Test wurde für A) und B) jeweils ein One-way ANOVA mit Dunnett Post-test verwendet, für C) jeweils ein One-way ANOVA mit Bonferroni Post test.

4.4.3 PsA-Patienten weisen einen erhöhten Anteil pathogener (IL-1-R1+) Th17-Zellen auf

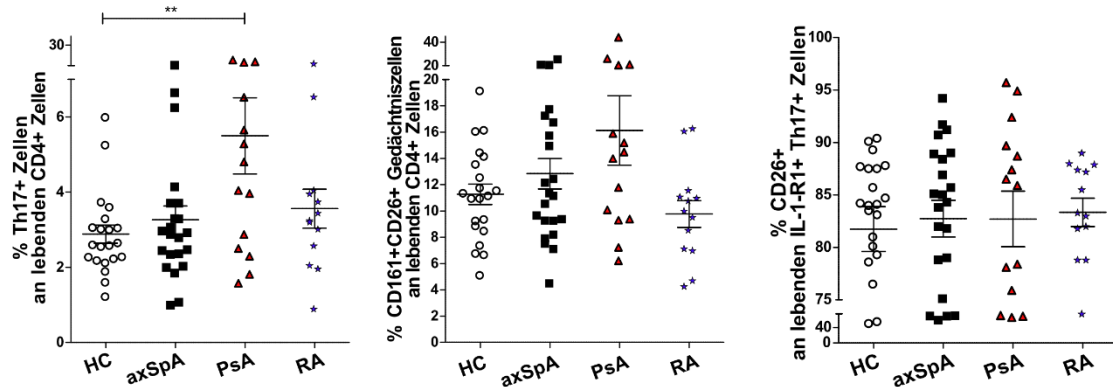
Wie bereits unter Punkt 4.4.1 gezeigt, besitzen mittels IL-2 stimulierte PBMCs von PsA-Patienten im Vergleich zu HCs signifikant mehr IL-1-R1+ „antimikrobielle Th17-Zellen“, welche als IL-26 Produzenten gelten (Weiss, Ma et al. 2019).

In den gleichen Versuchen zeigte sich, dass PsA-Patienten generell einen signifikant höheren %-Anteil an Th17-Zellen, bezogen auf alle CD4+ Th-Zellen, aufweisen (n = 14; MW = 5,5%; SEM = 1,012%; $p^{**} < 0,01$) als gesunde Kontrollen (n = 21; MW = 2,885%; SEM = 0,2426%). Selbiges galt nicht für axSpA- (n = 22; MW = 3,265%; SEM = 0,3725%; p = ns) und RA-Patienten (n = 13; MW = 3,563%; SEM = 0,5179%; p = ns). Zudem scheint es, dass Patienten mit axSpA (n = 22; MW = 12,84%; SEM = 1,157%; p = ns) und v.a. PsA (n = 12; MW = 16,13%; SEM = 2,641%; p = ns) im Vergleich zu HCs (n = 21; MW = 11,27%; SEM = 0,7716%) mehr CD161+CD26+CD45RO+ Zellen an lebenden CD4+ aufweisen. Für Patienten mit RA (n = 13; MW = 9,766%; SEM = 1,018%; p = ns) waren es weniger. Für den %-Anteil CD26+ Leukozyten an IL-1-R1+Th17-Zellen konnten wir festhalten, dass für axSpA- (n = 22; MW = 82,74%; SEM = 1,748%; p = ns), PsA- (n = 14; MW = 82,71%; SEM = 2,648%; p = ns) und unsere RA-Patienten (n = 13; MW = 83,35%; SEM = 1,345%; p = ns), ebenso wie für unsere HCs (n = 21; MW = 81,75%; SEM = 2,128%) der Anteil auf relativ gleichmäßig hohem Niveau ausfiel (Abbildung 4.7 A).

Für die untersuchten CD8+ PBMCs konnten wir sehen, dass Patienten mit RA (n = 13; MW = 3,165%; SEM = 0,8549%; $p^* < 0,05$) prozentual signifikant weniger CD161+CD26+CD45RO+ Zellen an CD8+ T-Zellen aufwiesen als HC-Probanden (n = 21; MW = 7,856%; SEM = 0,9747%), während bei Patienten mit axSpA (n = 22; MW = 6,293%; SEM = 0,9234%; p = ns) und PsA (n = 14; MW = 5,369%; SEM = 1,481%; p = ns) kein signifikanter Unterschied bestand. Jedoch fiel der %-Anteil IL-1-R1+CD161+CD26+ Gedächtniszellen (CD45RO+) an lebenden CD8+ T-Zellen nicht nur für RA-Patienten (n = 13; MW = 1,474%; SEM = 0,4989%; $p^* < 0,05$) signifikant geringer aus als für HCs (n = 21; MW = 3,5%; SEM = 0,6842%), sondern auch für PsA-Patienten (n = 14; MW = 1,048%; SEM = 0,2498%; $p^{**} < 0,01$). Für axSpA-Patienten (n = 22; MW = 2,770%; SEM = 0,4340%; p = ns) galt dies nicht (Abbildung 4.7 B).

Abb. 4.7

A)



B)

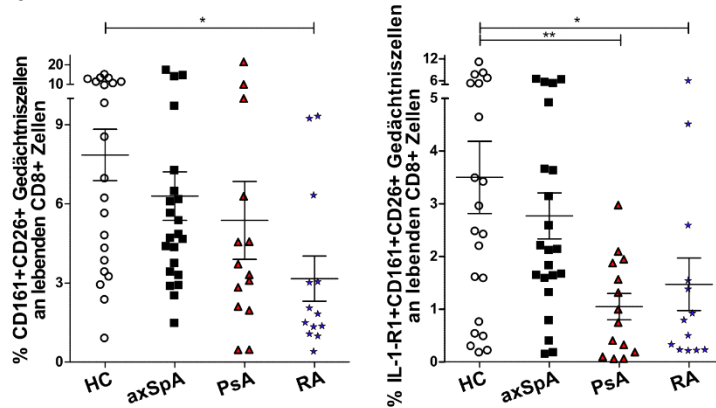


Abbildung 4.7: Immunphänotyping IL-1-R1 exprimierender CD4⁺ bzw. CD8⁺ PBMCs mittels Oberflächenfärbung

(A) %- Anteile mittels IL-2 stimulierter und oberflächlich gefärbter PBMCs, dargestellt als CD4⁺ Subpopulationen, aufgetrennt nach Kohorten und jeweiligem Phänotyp. PsA-Patienten ($n = 14$, $p^{**} < 0,01$), axSpA-Patienten ($n = 22$, $p = ns$), RA-Patienten ($n = 13$, $p = ns$), HCs ($n = 21$) (B) Analoge Darstellung der %-Anteile CD8⁺ Subpopulationen. PsA-Patienten ($n = 14$, $p^{**} < 0,01$), axSpA-Patienten ($n = 22$, $p = ns$), RA-Patienten ($n = 13$, $p^* < 0,05$), HCs ($n = 21$). Als statistischer Test wurde jeweils ein One-way ANOVA mit Dunnett Post-test verwendet.

4.5 Quantitative Analyse *IL26* induzierender Zytokine in CD4⁺/CD14⁺ Monokultur durch RT-qPCR

4.5.1 IL26 und assoziierte Zytokine werden in-vitro bei CD4⁺ T-Zellen vermehrt durch IL-2/IL-1 β /IL-23 induziert, bei CD14⁺ Monozyten durch LPS jedoch nicht

Weiteres Ziel der Studie war die Erforschung IL-26 induzierender Faktoren in Leukozyten von Patienten mit axSpA, PsA und RA im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. Hierfür wurden in-vitro CD4⁺/CD14⁺ Monokulturen, welche wir durch negative/positive Selektion aus PBMCs zuvor gewannen (s. 3.7.2 und 3.7.3), mit unterschiedlichen Zytokinkombinationen und T-Zell-Aktivierungsbeads bzw. LPS (s. 3.7.4 und 3.7.5) stimuliert. Anschließend wurde die Expression von *IL26* und anderen Th17-Zytokinen sowie Kontrollzytotoenen mittels quantitativer RT-PCR evaluiert.

Bereits zu D0, also vor jeglicher in-vitro Simulation, zeigte sich, dass in CD4⁺ Monokulturen von HCs der Anteil von *IL26*⁺ Proben bezogen auf die gesamte Kohorte (n = 20) am geringsten ausfiel (%-Anteil *IL26*⁺ an allen D0-Proben: MW = 45,00%; n = 9). In der axSpA- (%-Anteil *IL26*⁺ an allen D0-Proben: MW = 63,16%; n = 12), PsA- (%-Anteil *IL26*⁺ an allen D0-Proben: MW = 77,78%; n = 14) als auch RA-Kohorte (%-Anteil *IL26*⁺ an allen D0-Proben: MW = 53,85%; n = 7) war der Anteil *IL26*⁺ qPCR-Proben an D0 höher (s. Abbildung 4.8 A, links). Für *IL17A*, das Leit-Zytokin von Th17-Zellen, zeigte sich zu Tag 0 für HCs (%-Anteil *IL17A*⁺ an allen D0-Proben: MW = 85,00%, n = 17), axSpA- (%-Anteil *IL17A*⁺ an allen D0-Proben: MW = 89,47%, n = 17) und PsA-Patienten (%-Anteil *IL17A*⁺ an allen D0-Proben: MW = 83,33%, n = 15) in CD4⁺ T-Zellen ein vergleichbarer prozentualer Anteil an *IL17A*⁺ Proben. Lediglich für Patienten mit RA (%-Anteil *IL17A*⁺ an allen D0-Proben: MW = 46,15%; n = 6) lag der Wert niedriger (s. Abbildung 4.8 A, rechts).

Anschließend wurden innerhalb der jeweiligen Kohorten die kumulativen Effekte einzelner Zytokine auf die Transkriptionsraten von *IL26* hin untersucht. Hierfür wurden normalisierten Transkriptionsraten der Zytokinkombinationen (2), (3) und (4) innerhalb der Kohorten, in Relation zur Zytokin-Stimulationskondition (1) gesetzt, welche lediglich T-Zell Aktivierungsbeads und IL-2 enthielt (s. 3.7.4). Somit konnte der additive Effekt von IL-1 β , IL-23, TNF- α und IL-6 zur basalen Stimulationskondition (1) evaluiert werden (s. Abbildung 4.8 B).

Hierbei zeigte sich für alle Gruppen eine signifikante Zunahme der Transkriptionsraten von *IL26* und *IL17A* für CD4⁺ Th-Zellen nach 6 Tagen in-vitro Stimulation durch Zugabe von IL-1 β und IL-23 zu IL-2 (HC, axSpA, PsA: p*** < 0,001; RA: p** < 0,01). Dagegen erhöhte sich die Transkriptionsrate von *IL26* und *IL17A* durch die Zugabe von TNF- α zu IL-2, IL-1b und

IL-23 nicht weiter. Ein signifikanter Unterschied ergab sich nur gegenüber der Grundstimulation mit IL-2 (HC, axSpA, PsA: $p^{***} < 0,001$; RA: $p^{**} < 0,01$). Zudem war nach Zugabe von IL-6 zu IL-2, IL-1b und IL-23 lediglich innerhalb der Gruppe der RA-Patienten ein leichter Anstieg der relativen Transkriptionsraten für *IL26* und *IL17A* gegenüber der basalen Kondition mit IL-2 zu beobachten ($p = ns$). Für axSpA, PsA und HC stiegen die relativen Transkriptionsraten von *IL26* bzw. *IL17A* unter IL-2, IL-1b, IL-23 und IL-6 kaum an (HC, axSpA, PsA: $p = ns$) (Für nähere Angaben: s. Abbildung 4.8 B und Tabelle 4.5).

Bezüglich der Transkriptionsrate von *IFNG* zeigte sich in allen Kohorten ein signifikanter Anstieg durch die Zugabe von IL-1b und IL-23 sowie von TNF- α zu IL-2 (HC, axSpA, PsA: $p^{***} < 0,001$; RA: $p^{**} < 0,01$). Die zusätzliche Gabe von TNF- α erhöhte nur in axSpA-Patienten die Expression von *IFNG* etwas mehr. Für *IL22*, als weiteren Vertreter der IL-10 Superfamilie, zu der auch *IL26* gehört (Commings, Steinke et al. 2008), war ebenfalls eine signifikante Zunahme der Transkriptionsrate über alle Kohorten hinweg zu beobachten (HC, axSpA, PsA, RA Kondition (3): $p^{***} < 0,001$; RA Kondition (2): $p^{**} < 0,01$). Für *RORC* bestand lediglich in der PsA-Kohorte ein signifikanter Anstieg der Transkriptionsrate durch Zugabe von IL-1b und IL-23 zu IL-2 ($p^* < 0,05$). *IL4* verzeichnete hingegen in der Gruppe der axSpA-Patienten sowohl für die Kombination aus IL-2, IL-1b und IL-23, sowie für die Kombination aus IL-2, IL-1b, IL-23 und TNF- α eine signifikante Abnahme der Transkriptionsrate ($p^{**} < 0,01$ und $p^* < 0,05$). Für *IL1R1* ergab sich in keiner Kohorte unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen eine signifikante Veränderung der relativen Transkriptionsrate (HC, axSpA, PsA, RA: $p = ns$). Für die „klassische“ Th17-Stimulationskondition aus IL-2, IL-1b, IL-23 und IL-6 fand sich bei reduzierter n-Zahl in keiner Gruppe für *IL4*, *IL1R1*, *RORC*, *IFNG* oder *IL22* ein signifikanter Unterschied. Jedoch war unter dieser Kondition für die axSpA-Kohorte tendenziell eine Abnahme der relativen Transkriptionsraten von sowohl *IL4*, *IL1R1*, *IFN γ* , als auch am ausgeprägtesten für *IL22* zu beobachten ($p = ns$). Ein gegenteiliger Trend im Sinne einer Zunahme der relativen Transkriptionsraten für diese Ziel-Gene lag in der PsA-Kohorte vor ($p = ns$) (Für nähere Angaben: s. Abbildung 4.8 B und Tabelle 4.5).

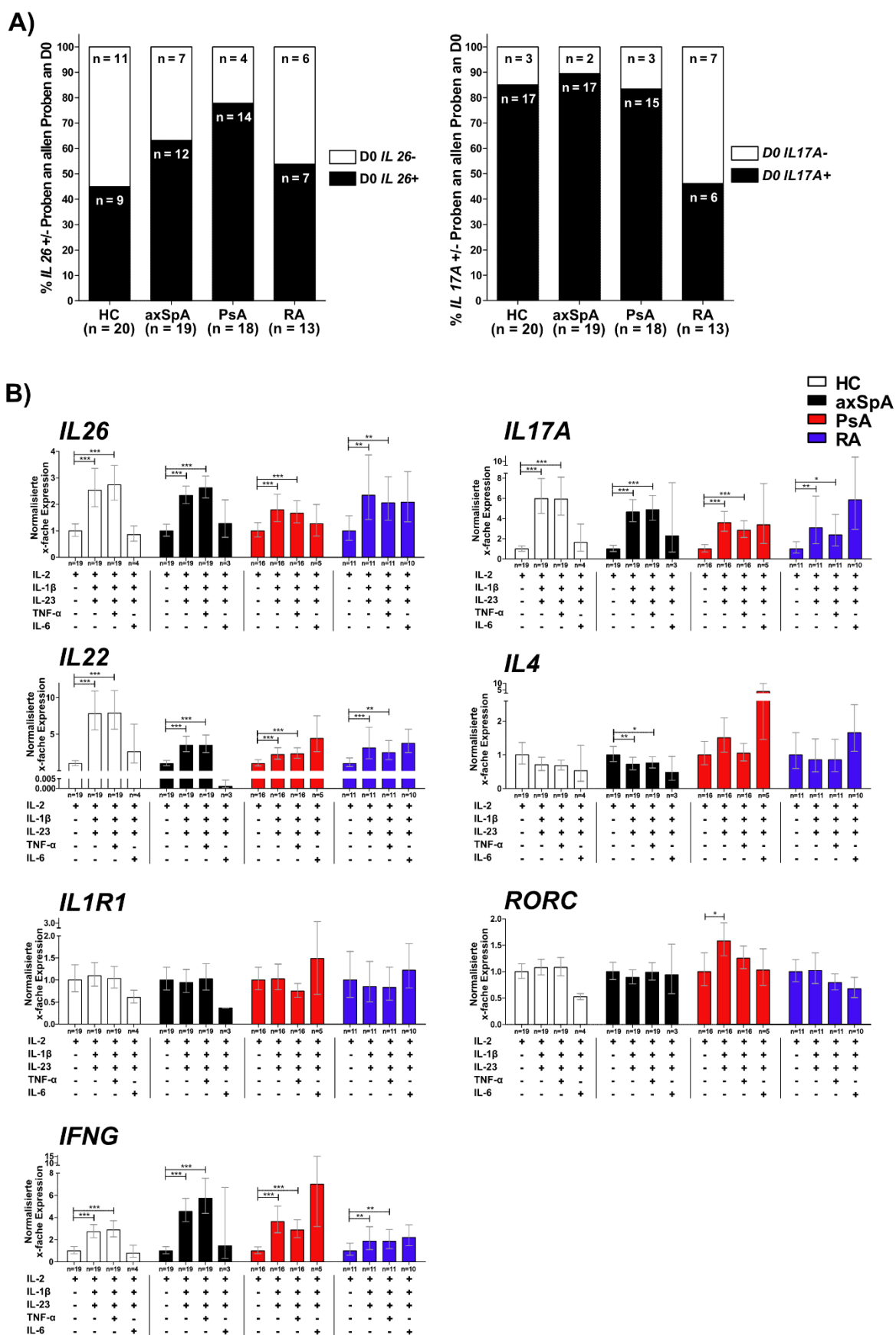
Zum Vergleich der relativen Transkriptionsraten von *IL26* und hiermit assoziierter Zytokine zwischen den Kohorten wurden die gewonnenen CT-Werte mittels *ACTB* und *RPL13A* normalisiert (s. 3.5.5) und auf die Gruppe der HCs bezogen. CD4⁺ Monokulturen sprachen nach sechs Tagen in-vitro am ausgeprägtesten auf die Stimulationskondition (2) an: Anti-CD2/CD3/CD28 T-Zell-Aktivierungsbeads (1:10) + IL-2/IL-1 β /IL-23 (s. 3.7.4). Aus diesem Grund wurden die Kohortenvergleiche mit den Daten dieser Kondition durchgeführt.

Insbesondere *IL26* war bei Patienten mit axSpA ($n = 19$; GM = 1,69; SEM oE = 1,94; SEM uE = 1,47; $p = \text{ns}$) nach 6 Tagen bezogen auf HCs ($n = 19$; GM = 1,0; SEM oE = 1,33; SEM uE = 0,754) vermehrt nachweisbar. Selbiges galt bei axSpA-Patienten gegenüber HCs für *IL17A* ($n = 19$; GM = 1,51; SEM oE = 1,91; SEM uE = 1,20; $p = \text{ns}$) und ebenfalls für *IL22* ($n = 19$; GM = 1,21; SEM oE = 1,60; SEM uE = 0,92; $p = \text{ns}$). In direktem Kontrast hierzu konnte für Patienten mit PsA und RA festgehalten werden, dass nach 6 Tagen in-vitro Stimulation die relativen Transkriptionsraten von *IL26*, *IL17A* und *IL22* jeweils in Relation zur HC-Kohorte abnahmen (Für nähere Angaben: s. Abbildung 4.8 C und Tabelle 4.6).

Bei Betrachtung der relativen Expressionsraten von Kontrollgenen *IL4* (Th2-Zellen), *IFNG* (Th1-Zellen), *RORC* (Haupttranskriptionsfaktor für Th17-Zellen) sowie *IL1R1* (Oberflächenrezeptor von IL-26 sekretierenden Th17-Zellen) zeigte sich für *IL4* in CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu HCs nach 6 Tagen Stimulation mit IL-2, IL-1b und IL-23 nur für RA-Patienten ein signifikanter Anstieg ($p^* < 0,05$). Für *IL1R1*, *RORC* und *IFNG* konnten weder für axSpA, noch für PsA oder RA-Patienten signifikante Änderungen der relativen Transkriptionsraten im Vergleich zur HC-Gruppe festgehalten werden ($p = \text{ns}$). Lediglich für *RORC* in axSpA-Patienten ergab sich ein leichter Anstieg ($p = \text{ns}$). Wohingegen *IL1R1* mit Stimulation tendenziell in Patienten mit axSpA bzw. PsA leicht abnahm ($p = \text{ns}$). Die Expression von *IFNG* veränderte sich unter der Stimulation in axSpA- und RA-Patienten kaum, fiel jedoch in PsA-Patienten leicht ab ($p = \text{ns}$) (für nähere Angaben: s. Abbildung 4.8 C und Tabelle 4.6).

Initial wurde nach der immunfluoreszenztechnisch nachgewiesenen Kolo-kalisation von IL-26 und CD68 zusätzlich auch in CD14⁺ selektierten Monozyten aus dem peripheren Blut der Patienten die Expression von *IL26* untersucht. Hierzu erfolgte nach einem sechstägigen LPS-Stimulus in-vitro die Analyse von *IL26* und *IL17A* mittels RT-qPCR (s. 3.7.3 und 3.7.5). In gesunden Kontrollprobanden ($n = 5$) zeigte sich lediglich in 1 von 5 Proben nach 6 Tagen ein Signal für *IL26*. *IL17A* war sogar in keiner der untersuchten Proben zu Zeitpunkt 0, Tag 3 und 6 nachweisbar (s. Abbildung 4.9). Da dies mit den Ergebnissen anderer Studien übereinstimmte, wurden im Weiteren nur noch CD4⁺ T-Zellen analysiert.

Abb. 4.8



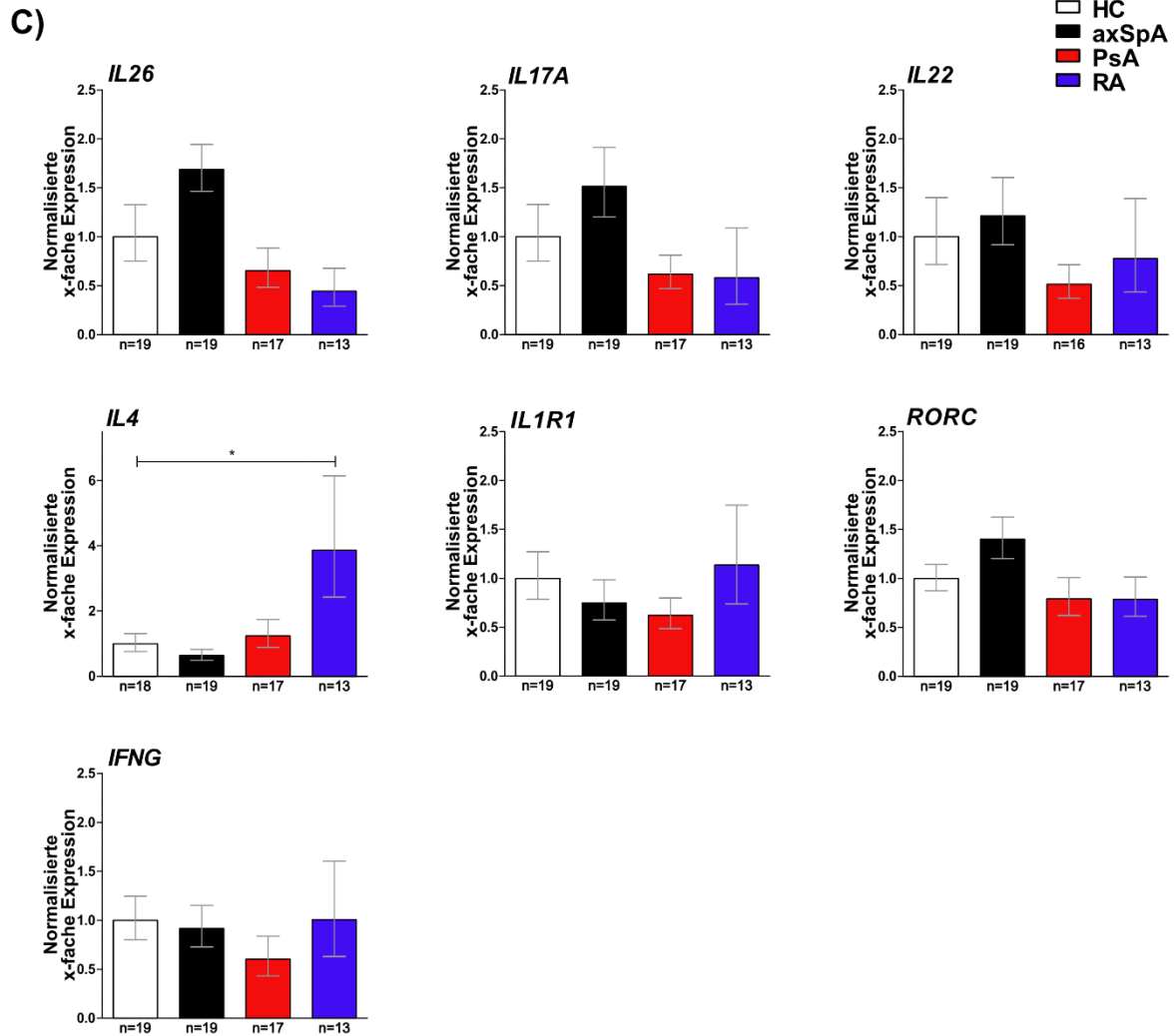


Abbildung 4.8: Effekte unterschiedlicher Zytokinkombinationen auf die Expression von „Leitgenen“ in CD4⁺ T-Zellen von HC, axSpA-, PsA und RA-Patienten in vitro

(A) %-Anteil mittels RT-qPCR nachgewiesener, IL26 (links) bzw. IL17A (rechts) +/- CD4⁺ Zellproben an D0 (ohne Stimulus), aufgetrennt nach Kohorten. Farbliche Kodierung der Säulen: Schwarz = IL26 bzw. IL17A +; Weiß = IL26 bzw. IL17A – (zusätzliche Ergänzung der absoluten Probenzahlen je Kategorie, als Schriftzug im jeweiligen Säulenabschnitt) **(B)** Zur basalen Stimulationskondition relative, mittels RT-qPCR ermittelte, Transkriptionsraten der untersuchten Ziel-Gene aufgetrennt nach Kohorten für die jeweiligen in-vitro Stimulationskonditionen [(1) = Beads + IL-2; (2) = (1) + IL-1 β /IL-23; (3) = (2) + TNF- α ; (4) = (2) + IL-6] in CD4⁺ Monokulturen nach 6 Tagen, bezogen auf die, mittels RPL13A und ACTB normalisierten, Transkriptionsraten der basalen Stimulationskondition [(1) = Beads + IL-2]. Dargestellt ist der kumulative Effekt der Zugabe einzelner Zytokine (gekennzeichnet als Tabelle unter dem Grafen) in Relation zur basalen Stimulationskondition auf die jeweiligen x-fachen Transkriptionsraten der untersuchten Gene innerhalb der Kohorten. Die y--Achse entspricht der normalisierten x-fachen Transkriptionsrate (im Graf Expression bezeichnet) bezogen auf die basale Stimulationskondition innerhalb der jeweiligen Kohorte. Für genauere Angaben s. Tabelle 4.5. **(C)** Zur HC-Kohorte relative, mittels RT-qPCR ermittelte, Transkriptionsraten der untersuchten Ziel-Gene, aufgetrennt nach Kohorten bezogen auf die, mittels RPL13A und ACTB normalisierten Transkriptionsraten der Gruppe der HCs für die in-vitro

Stimulationskondition 2 (Beads/IL-2/ IL-1 β /IL-23) in CD4⁺ Monokulturen nach 6 Tagen. Die y-Achse entspricht der normalisierten x-fachen Transkriptionsrate (im GrafExpression bezeichnet) bezogen auf die Gruppe der HCs. Für genauere Angaben s. Tabelle 4.6. Als statistischer Test wurde für **B)** jeweils ein Repeated Measures ANOVA mit Dunnett Post-test verwendet, für **C)** jeweils ein One-way ANOVA mit Dunnett Post-test.

Abb. 4.9

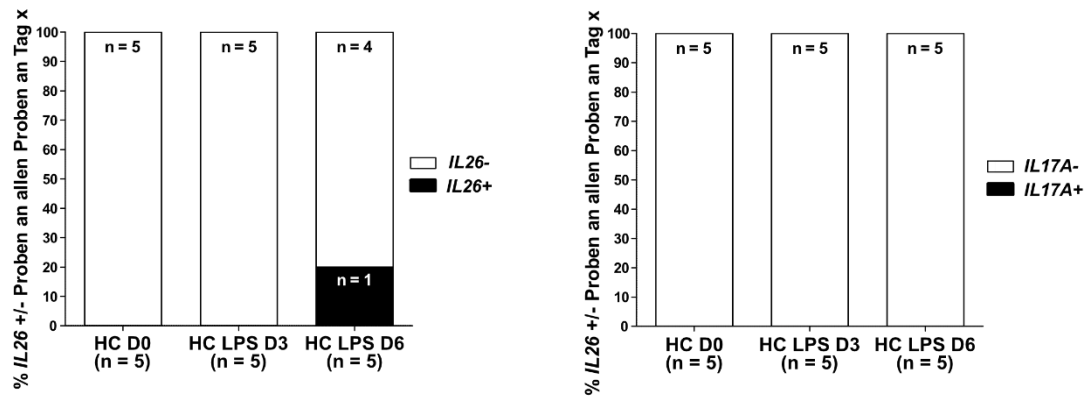


Abbildung 4.9: Fehlende Induktion von IL26 und IL17A in CD14⁺ Monozyten durch LPS

%-Anteil mittels RT qPCR nachgewiesener, IL26 (links) bzw. IL17A +/- (rechts) CD14⁺ Zellproben an D0 (ohne Stimulus), D3 und D6 (nach Stimulation). Es wurden jeweils nur Proben von HCs (n = 5) verwendet und in vitro mit 10 ng/ml LPS über den jeweiligen Zeitraum stimuliert. Farbliche Kodierung der Säulen: Schwarz = IL26 bzw. IL17A +; Weiß = IL26 bzw. IL17A – (zusätzliche Ergänzung der absoluten Probenzahlen je Kategorie, als Schriftzug im jeweiligen Säulenabschnitt).

Kohorten	HC				axSpA				PsA				RA			
	Geom. Mittel/SEM ob.Ende/SEM unt.				Geom. Mittel/SEM ob.Ende/SEM unt.				Geom. Mittel/SEM ob.Ende/SEM unt.				Geom. Mittel/SEM ob.Ende/SEM unt.			
	Ende (p-Wert)				Ende (p-Wert)				Ende (p-Wert)				Ende (p-Wert)			
Stimulus- kondition (n)	(1) (n = 19) -Ref.-	(2) (n = 19)	(3) (n = 19)	(4) (n = 4)	(1) (n = 19) -Ref.-	(2) (n = 19)	(3) (n = 19)	(4) (n = 3)	(1) (n = 16) -Ref.-	(2) (n = 16)	(3) (n = 16)	(4) (n = 5)	(1) (n = 11) -Ref.-	(2) (n = 11)	(3) (n = 11)	(4) (n = 10)
Ziel-Gene																
<i>IL26</i>	1,00/1,27 /0,79 (***)	2,53/3,36 /1,91 (***)	2,74/3,48 /2,16 (***)	0,85/1,19 /0,61 (ns)	1,00/1,25 /0,80 (***)	2,34/2,69 /2,03 (***)	2,63/3,07 /2,25 (***)	1,27/2,17 /0,76 (ns)	1,00/1,31 /0,76 (***)	1,79/2,38 /1,35 (***)	1,67/2,14 /1,30 (***)	1,27/2,00 /0,81 (ns)	1,00/1,57 /0,64 (**)	2,35/3,87 /1,43 (**)	2,06/3,05 /1,40 (**)	2,08/3,24 /1,34 (ns)
<i>IL17A</i>	1,00/1,30 /0,77 (***)	5,99/7,96 /4,51 (***)	5,93/8,11 /4,34 (***)	1,64/3,47 /0,78 (ns)	1,00/1,37 /0,73 (***)	4,66/5,88 /3,69 (***)	4,90/6,27 /3,83 (***)	2,30/7,56 /0,70 (ns)	1,00/1,42 /0,70 (***)	3,60/4,72 /2,74 (***)	2,85/3,78 /2,14 (***)	3,39/7,47 /1,54 (ns)	1,00/1,72 /0,58 (**)	3,07/6,24 /1,51 (**)	2,39/4,41 /1,30 (*)	5,85/11,6 /2,95 (ns)
<i>IL22</i>	1,00/1,36 /0,73 (***)	7,81/10,9 /5,59 (***)	7,89/10,9 /5,68 (***)	2,62/6,36 /1,08 (ns)	1,00/1,41 /0,71 (***)	3,51/4,71 /2,61 (***)	3,50/4,89 /2,50 (***)	0,001/0,0 04/0,000 3 (ns)	1,00/1,52 /0,66 (***)	2,24/3,17 /1,58 (***)	2,32/3,16 /1,70 (***)	4,44/7,51 /2,62 (ns)	1,00/1,78 /0,56 (***)	3,13/5,96 /1,65 (***)	2,50/4,13 /1,51 (**)	3,77/5,69 /2,50 (ns)
<i>IL4</i>	1,00/1,37 0,73 (ns)	0,71/0,93 /0,54 (ns)	0,68/0,85 /0,55 (ns)	0,53/1,29 /0,22 (ns)	1,001,25/ 0,80 (**)	0,72/0,93 /0,56 (**)	0,76/0,95 /0,62 (*)	0,48/0,96 /0,25 (ns)	1,00/1,40 /0,71 (ns)	1,51/2,10 /1,09 (ns)	1,05/1,35 /0,82 (ns)	3,81/9,92 /1,46 (ns)	1,00/1,66 /0,60 (ns)	0,86/1,48 /0,50 (ns)	0,86/1,47 /0,50 (ns)	1,66/2,49 /1,11 (ns)
<i>IL1RI</i>	1,00/1,35 /0,74 (ns)	1,10/ 1,39/0,6 (ns)	1,03/1,30 /0,82 (ns)	0,61/0,77 /0,48 (ns)	1,00/1,29 /0,77 (ns)	0,94/1,23 /0,72 (ns)	1,03/1,37 /0,77 (ns)	0,37/0,37 /0,36 (ns)	1,00/1,29 /0,78 (ns)	1,03/1,36 /0,78 (ns)	0,75/0,92 /0,61 (ns)	1,49/3,28 /0,68 (ns)	1,00/1,65 /0,61 (ns)	0,85/1,42 /0,51 (ns)	0,83/1,29 /0,54 (ns)	1,22/1,82 /0,82 (ns)
<i>RORC</i>	1,00/1,15 /0,87 (ns)	1,08/1,23 /0,94 (ns)	1,08/1,27 /0,92 (ns)	0,53/0,58 /0,47 (ns)	1,00/1,18 /0,85 (ns)	0,89/1,04 /0,77 (ns)	0,99/1,17 /0,84 (ns)	0,94/1,52 /0,58 (ns)	1,00/1,36 /0,74 (*)	1,58/1,93 /1,30 (ns)	1,25/1,49 /1,06 (ns)	1,03/1,43 /0,74 (ns)	1,00/1,23 /0,81 (ns)	1,02/1,35 /0,77 (ns)	0,79/0,96 /0,65 (ns)	0,68/0,89 /0,51 (ns)
<i>IFNG</i>	1,00/1,38 /0,72 (***)	2,70/3,37 /2,17 (***)	2,89/3,71 /2,25 (***)	0,78/1,50 /0,41 (ns)	1,00/1,38 /0,73 (***)	4,56/5,73 /3,63 (***)	5,74/7,55 /4,37 (***)	1,45/6,73 /0,31 (ns)	1,00/1,35 /0,74 (***)	3,63/5,04 /2,62 (***)	2,87/3,79 /2,18 (***)	7,00/15,3 /3,2 (ns)	1,00/1,69 /0,59 (**)	1,86/3,17 /1,09 (**)	1,85/2,92 /1,18 (**)	2,20/3,34 /1,45 (ns)

Tabelle 4.5: Relative Transkriptionsraten unterschiedlicher Stimulationskonditionen für CD4+ T-Zellen getrennt nach Kohorten, bezogen auf die basale Stimulationskondition (1) (Anti-CD2/CD3/CD28-T-Zell-Aktivierungsbeads + IL-2) – kumulativer Zytokineffekt

Ziel-Gene	Relativ zur HC-Kohorte, normalisierte x-fache Expression			axSpA				PsA				RA			
	HC														
	Geom. Mittel (n)	SEM Oberes Ende	SEM unteres Ende	Geom. Mittel (n)	SEM Oberes Ende	SEM unteres Ende	p-Wert	Geom. Mittel (n)	SEM Oberes Ende	SEM unteres Ende	p-Wert	Geom. Mittel (n)	SEM Oberes Ende	SEM unteres Ende	p-Wert
<i>IL26</i>	1,0 (19)	1,33	0,754	1,69 (19)	1,94	1,47	ns	0,66 (17)	0,89	0,48	ns	0,44 (13)	0,68	0,29	ns
<i>IL17A</i>	1,0 (19)	1,33	0,75	1,51 (19)	1,91	1,20	ns	0,62 (17)	0,81	0,47	ns	0,58 (13)	1,09	0,31	ns
<i>IL22</i>	1,0 (19)	1,40	0,72	1,21 (19)	1,60	0,92	ns	0,52 (16)	0,71	0,37	ns	0,78 (13)	1,39	0,43	ns
<i>IL4</i>	1,0 (18)	1,31	0,76	0,64 (19)	0,82	0,50	ns	1,24 (17)	1,74	0,89	ns	3,86 (13)	6,14	2,43	*
<i>IL1R1</i>	1,0 (19)	1,27	0,79	0,75 (19)	0,99	0,57	ns	0,62 (17)	0,80	0,48	ns	1,14 (13)	1,75	0,74	ns
<i>RORC</i>	1,0 (19)	1,14	0,87	1,40 (19)	1,63	1,20	ns	0,79 (17)	1,01	0,62	ns	0,79 (13)	1,01	0,61	ns
<i>IFNG</i>	1,0 (19)	1,25	0,80	0,92 (19)	1,15	0,73	ns	0,60 (17)	0,84	0,43	ns	1,01 (13)	1,60	0,63	ns

Tabelle 4.6: Relative Transkriptionsraten der untersuchten CD4+ Monokulturen der einzelnen Kohorten, bezogen auf die Gruppe der HCs für die Stimulationskondition (2) (Anti-CD2/CD3/CD28-T-Zell-Aktivierungsbeads + IL-2, IL-1 β , IL-23)

Legende Tab. 4.5 & 4.6: Relative Transkriptionsraten in-vitro stimulierter CD4+ T-Zellen

Stimulationskonditionen: **(1)** = Beads + IL-2; **(2)** = (1) + IL-1 β /IL-23; **(3)** = (2) + TNF- α ; **(4)** = (2) + IL-6; HC (gesunde Kontrolle); axSpA (Ankylosierende Spondylitis); PsA (Psoriasisarthritis); RA (Rheumatoide Arthritis); Ref. (Referenz); Geom. Mittel (Geometrisches Mittel); SEM (Standardfehler); ns (nicht signifikant); $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$; $p^{***} < 0,001$; Tabelle 4.5: Repeated Measures ANOVA mit Dunnett Post-test; Tabelle 4.6: One-way ANOVA mit Dunnett Post-test

4.5.2 Positive Korrelationen zwischen Transkriptionsraten von *IL26* und *Th17*-typischen Genen in *CD4+* T-Zellen unter *in-vitro* Stimulationsbedingungen

Nachdem der Einfluss einzelner Zytokinkombinationen auf die Transkriptionsraten von *IL26* und *Th17*-typischen Genen in *CD4+* T-Zellen untersucht worden war, erfolgten Korrelationsanalysen innerhalb der jeweiligen Kohorten

Aufgrund der höchsten relativen „Induktionsstärke“ für *IL26* wurden die Korrelationen nur für die Kondition (2) Beads + IL-2, IL-1 β , IL-23 berechnet. Für die Analyse wurden folgende Ziel-Gene ausgewählt: *IL17A*, *IL22*, *IL4* und *IL1R1*. Interessanterweise zeigten sich in diesem Zusammenhang innerhalb der Kohorten unterschiedliche Beziehungsverhältnisse zwischen den jeweiligen Genen (s. Abbildung 4.10):

Die Transkriptionsraten von *IL26* und *IL17A* korrelieren sowohl für Patienten mit PsA ($n = 16$; $r = 0,7063$; $r^2 = 0,4989$; $p^{**} = 0,0022$), als auch für gesunde Kontrollen ($n = 19$; $r = 0,6622$; $r^2 = 0,4385$; $p^{**} = 0,0020$) signifikant positiv miteinander. Für Patienten mit RA ($n = 10$; $r = 0,9199$; $r^2 = 0,8462$; $p^{***} = 0,0002$) war dieser Zusammenhang am stärksten. Interessanterweise ergab sich für die axSpA-Kohorte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen *IL26* und *IL17A* ($n = 19$; $r = 0,2155$; $r^2 = 0,0464$; $p = \text{ns}$).

Ein ebenfalls positiver Zusammenhang zeigte sich für *IL26* und *IL22*. Auch hier bestand für Patienten mit PsA ($n = 15$; $r = 0,5800$; $r^2 = 0,3364$; $p^* = 0,0234$) und RA ($n = 11$; $r = 0,8070$; $r^2 = 0,6513$; $p^{**} = 0,0048$), sowie für HCs ($n = 19$; $r = 0,5518$; $r^2 = 0,3045$; $p^* = 0,0143$) eine statistisch signifikante positive Korrelation. Hingegen konnte ein derartiges Verhältnis für Patienten mit axSpA nicht gezeigt werden ($n = 18$; $r = 0,2470$; $r^2 = 0,0610$; $p = \text{ns}$).

Das Verhältnis der Transkriptionsraten von *IL26* und *IL4* (hier verwendet als Negativkontrolle im Sinne eines Th2-assoziierten Zytokins) zeigte in diesem Kontext jedoch ein anderes Muster. So wiesen nur Patienten mit RA ($n = 11$; $r = 0,6617$; $r^2 = 0,4379$; $p^* = 0,0266$) im Gegensatz zu Patienten mit axSpA ($n = 19$; $r = 0,3443$; $r^2 = 0,1185$; $p = \text{ns}$), PsA ($n = 16$; $r = 0,1697$; $r^2 = 0,0288$; $p = \text{ns}$) und gesunden Kontrollen ($n = 19$; $r = 0,01952$; $r^2 = 0,0004$; $p = \text{ns}$) eine statistisch signifikante, positive Korrelation auf.

Zuletzt konnte für *IL26* und *IL1R1* festhalten werden, dass lediglich *CD4+* T-Zellen von RA-Patienten ($n = 11$; $r = 0,8460$; $r^2 = 0,7157$; $p^{**} = 0,0010$), sowie von HCs ($n = 19$; $r = 0,5119$; $r^2 = 0,2620$; $p^* = 0,0251$) ein statistisch signifikantes, positiv zueinander korrelierendes

Verhältnis zeigten. Für axSpA ($n = 19$; $r = 0,3224$; $r^2 = 0,1039$; $p = \text{ns}$) und PsA-Patienten ($n = 15$; $r = 0,3951$; $r^2 = 0,1561$; $p = \text{ns}$) konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden.

Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass in CD4+ T-Zellen unter der in-vitro Stimulation mit IL-2, IL-1 β , IL-23 und anti-CD2/3/28-Beads unterschiedliche, jedoch stets, sofern beobachtbar, positiv zu *IL26* korrelierende Effekte auf die einzelnen Transkriptionsraten der Targets *IL17A*, *IL22*, *IL4* und *IL1R1* innerhalb der jeweiligen Kohorten auftreten. CD4+ T-Zellen scheinen in-vitro in Abhängigkeit von der zugrundeliegenden Erkrankung unterschiedliche Transkriptionsmuster auf dieselben Stimuli aufzuweisen.

Abb. 4.10

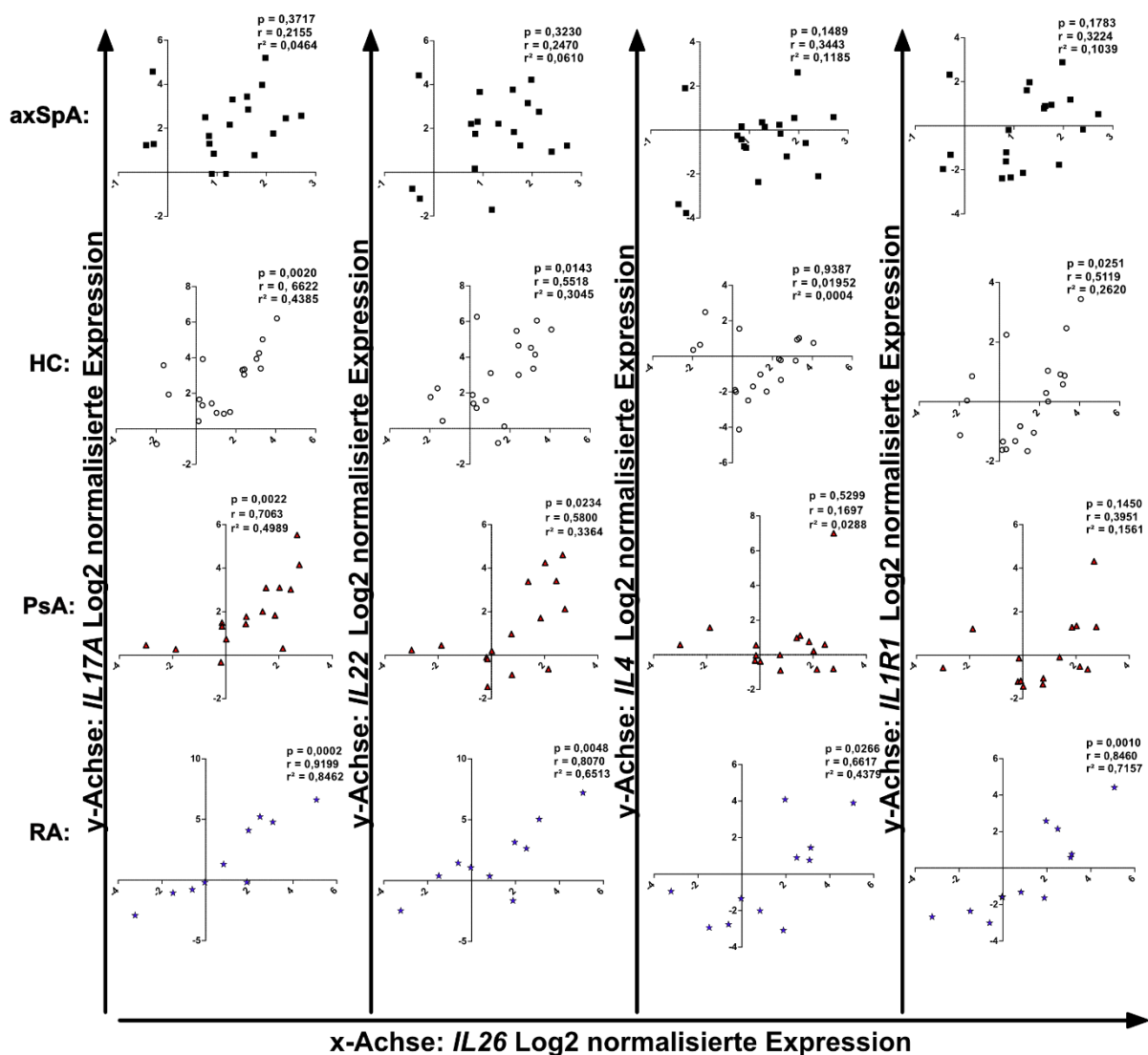


Abbildung 4.10: Korrelationsanalysen zwischen *IL26* und *IL17A*, *IL22*, *IL4* und *IL1R1* in CD4+ T-Zellen

Korrelationsanalyse nach Pearson, aufgetrennt nach Kohorten und untersuchten Korrelationspartnern. Untersucht wurde das Verhältnis der relativen Transkriptionsraten (relative, zur Stimulationskondition (1), normalisierte x-fache Expression, s. Tabelle 4.6) von *IL26* (x-Achse) und *IL17A/IL22/IL4/IL1R1* (jeweilige y-Achse, von

links nach rechts) nach in-vitro Stimulation von CD4+ T-Zellen mit anti-CD2/3/28-Beads und IL-2, IL-1 β und IL23 für 6 Tage. Die jeweils dargestellten Datenpunkte entsprechen den berechneten Log2 normalisierten Expressionen der einzelnen Patientenproben gem. 0. Dargestellt ist jeweils zudem der Korrelationskoeffizient r (Range: -1 für negative Korrelation bis +1 für positive Korrelation), der Determinationskoeffizienten r^2 als Maß für die „goodness of fit“ (Range: 0 bis 1), sowie der mittels Pearson Korrelationsanalyse berechnete p -Wert.

5 Diskussion

5.1 Übertragbarkeit unseres Studienkollektivs auf die Grundgesamtheit

Im Rahmen des Projekts wurde versucht verschiedene Formen des Bias sowie mögliche Störvariablen bereits im Voraus durch das Studiendesign zu minimieren. So wurden beispielshalber sukzessive die gesunden Kontrollprobanden bezüglich Alter und Geschlecht als „Matches“ für die bereits eingeschlossenen axSpA-Patienten gewählt, um eine vergleichbare Geschlechter- und Altersverteilung zu garantieren. Die Stichprobengröße für die Hauptstudienpopulation (axSpA-Kohorte) ergab sich aus einer Fallzahlschätzung, die auf Daten einer Studie von 2012 beruhte (Corvaisier, Delneste et al. 2012). Unter den getroffenen Annahmen war die aktuelle Studie auf 90%, unseren primären Endpunkt betreffend, „gepowert“ (s. 2.3.1). Lassen sich die gewonnen klinisch-deskriptiven Daten auf das Gesamtkollektiv der einzelnen Krankheitsentitäten übertragen und ist die Studienpopulation somit repräsentativ für das jeweilige Krankheitsbild und wenn ja, für welches Aktivitätsstadium?

5.1.1 Vergleichbarkeit erhobener klinisch-deskriptiver Daten der axSpA-Kohorte zur Gesamtbevölkerung erkrankter Patienten

Die Prävalenz der axSpA wird in Deutschland mit 0,32 – 0,5% beziffert (Albrecht, Binder et al. 2023), mit einer geschätzten Geschlechterverteilung (m : w) von 61,5% zu 38,5% für die r-axSPA bzw. 50% : 50% für die nr-axSPA (Kiltz 2019). Die Angaben des Manifestationsalter einer axSpA schwanken zwischen 35 – 45 Jahren (Baraliakos, Heldmann et al. 2014, van der Heijde, Ramiro et al. 2017, Kiltz 2019), und Patienten mit axSpA sind je nach untersuchter Kohorte im Mittel mit ca. 80-95% HLA-B27 positiv (betrachtet man neben der r-axSPA auch die nr-axSPA Patienten fällt der Wert auf 60-85%) (Rudwaleit, Haibel et al. 2009, Sampaio-Barros, Bortoluzzo et al. 2010).

Um hohe und niedrige Krankheitsaktivität voneinander zu trennen, legte man willkürlich vor Jahren einen BASDAI von 4 fest (Garrett, Jenkinson et al. 1994, Brandt, Haibel et al. 2000, Kiltz 2019). Eine Studie eines großen europäischen Vergleichskollektivs von 2846 axSPA erkrankten Patienten aus dem Jahr 2019 hielt einen BASDAI-MW von $5,5 \pm 2,0$ fest (Garrido-Cumbrera, Poddubnyy et al. 2019). Ein BASDAI Wert von ≥ 4 ist ein empfohlenes ASAS-Kriterium zur Anwendung von bDMARDs bei Patienten mit axSPA (Kiltz, Braun et al. 2019).

Für den BASFI-Score als Index der funktionalen Einschränkung betroffener Patienten, der 1994 entwickelt wurde (Calin, Garrett et al. 1994), konnte in der Vergangenheit ein Median-Wert von 2,0, mit Clusterbildung im unteren Bereich der Skala von 0 bis 10 (wobei 0 keiner funktionalen Einschränkung und 10 einer maximalen funktionalen Einschränkung entspricht)

festgehalten werden (Ruof, Sangha et al. 1999, Zochling 2011). Man nimmt für einen BASFI Score ab 6 Punkten eine hohe funktionale Einschränkung an (Haywood 2010). In einer Studie aus dem Jahr 2012, die ein europäisches Kollektiv von 2356 axSpA-Patienten mit einem latein-amerikanischen Kollektiv von 1083 axSpA-Probanden verglich, wurde für europäische axSpA-Patienten ein BASFI-MW von $4,3 \pm 2,7$ und für lateinamerikanische axSpA-Patienten ein BASFI-MW von $4,8 \pm 2,8$ festgehalten (Benegas, Muñoz-Gomariz et al. 2012).

Der 1995 veröffentlichte BASMI-Score zur Erfassung der axialen Beweglichkeit betroffener axSpA-Patienten hat eine Skala von 0 bis 10 Punkten (wobei ein höherer Score einer höheren Einschränkung entspricht) (van der Heijde, Landewé et al. 2008). Eine multinationale Studie aus dem Jahr 2016 gibt für 413 axSpA Patienten einen mittleren BASMI-Score von $4,09 \pm 2,06$ an und für 188 nr-axSPA Patienten einen BASMI-MW von $2,41 \pm 1,54$ (Burgos-Vargas, Wei et al. 2016). Zur Interpretation des BASMI-Scores sei noch erwähnt, dass für diesen mittlerweile angenommen wird, dass dieser mit zunehmendem Alter auch bei Gesunden von selbst, aufgrund abnehmender spinaler Beweglichkeit, ansteigt. In einem Vergleichskollektiv aus England wiesen so z.B. nur 1,2% gesunder Individuen einen BASMI Score von 0 auf, während gesunde 25-Jährige einen Median von 0,9, 35-Jährige von 1,1 und mit 65 Jahren von 2,1 aufwiesen (Chilton-Mitchell, Martindale et al. 2013). Das Alter ist somit als mögliche Störvariable zu betrachten.

Das CRP ist nur bei 40-60% der axSPA Patienten im Verlauf überhaupt erhöht (Dougados, Gueguen et al. 1999, Spoorenberg, van der Heijde et al. 1999, Rudwaleit, Haibel et al. 2009, Benhamou, Gossec et al. 2010) und ist bei axSPA-Patienten, genauso wie die BSG, im Schnitt höher als bei nr-axSPA-Patienten (Rudwaleit, Haibel et al. 2009). Die Prävalenzen extraartikulärer Begleitmanifestationen werden bei axSpA-Patienten für die Uveitis mit 25,8%, die Psoriasis mit 9,3% und die CED mit 6,8% angegeben (Stolwijk, van Tubergen et al. 2015).

Die Geschlechterverteilung unserer Blut spendenden Probanden war annähernd symmetrisch und das mediane Alter betrug 34,0 Jahre. Die HLA-B27 Positivität betrug 82,76%, was in Analogie mit bereits veröffentlichten Studien als repräsentativ gelten kann.

Die von uns ermittelten Mittelwerte des BASDAI, CRP und BSG spiegeln eine leicht bis max. mittelgradig erhöhte Krankheitsaktivität zum Studieneinschlusszeitpunkt wider. In der Altersklasse unserer Probanden lag der BASFI-MW in einem Bereich, der auf eine geringe funktionelle Einschränkung hinweist. Dies könnte auf einen bisher geringen Krankheitsprogress und eine gute Krankheitskontrolle hindeuten. Diese Beobachtung deckt sich mit dem von uns beobachteten BASMI-MW, welcher für eine geringe Beeinträchtigung der spinalen Mobilität

spricht (man bedenke jedoch, dass gesunde 65-Jährige einen BASMI-Median von 2,1 aufweisen (Chilton-Mitchell, Martindale et al. 2013)) (vgl. Tabelle 4.1).

Die von uns untersuchten Probanden befanden sich somit tendenziell noch in der Anfangsphase des Krankheitsverlaufs der axSpA oder hatten einen eher milden Verlauf, was sich mit dem Umstand erklären lassen könnte, dass wir aufgrund unserer Einschlusskriterien (v.a. Ausschluss von Biologika-Therapien) vorwiegend neudiagnostizierte, noch nicht vorbehandelte Patienten einschlossen. Wir konnten für unsere eingeschlossenen axSpA-Probanden ein mittleres Zeitintervall von 10,94 Jahren ($\pm 11,72$ Jahre [SD], im Median 9 Jahre, $n = 19$) seit erstmalig gestellter Diagnose und dem Studieneinschlusszeitpunkt festhalten, sowie ein mittleres Zeitintervall von 10,83 Jahren ($\pm 8,27$ Jahre [SD], im Median 11,24 Jahre, $n = 12$) seit den ersten aufgetretenen Symptomen. Hieraus ergab sich für einen Teil der axSpA-Patienten, für die wir beide Zeitintervalle bestimmen konnten ($n = 8$), ein mittlerer Zeitraum von 5 Jahren (± 5 Jahre [SD], im Median 5,63 Jahre) zwischen Auftreten der ersten Symptome und der gestellten Diagnose. Eine vergleichbare europäische axSpA-Kohorte aus dem Jahr 2019 wies eine mittlere Krankheitsdauer von $17,2 \pm 12,4$ Jahren ($n = 2722$) und eine diagnostische Verzögerung von $7,4 \pm 8,4$ Jahren ($n = 2652$) auf (Garrido-Cumbrera, Poddubnyy et al. 2019).

So erhielten auch nur 13,79% der axSpA-Patienten zum Einschlusszeitpunkt DMARDs und 82,76% überhaupt keine immunmodulatorische Therapie (NSAR-Gebrauch wurde hier nicht einzeln erfasst). Dies könnte sich jedoch auch durch eine durchschnittlich geringe Krankheitsaktivität zum Studieneinschlusszeitpunkt erklären lassen, die eine unzureichende Notwendigkeit einer intensivierten immunmodulatorischen Therapie bei einem Großteil unserer Probanden bedingte. Auch die von uns erfassten Prävalenzen extraartikulären Begleitmanifestationen lassen sich mit den Literaturangaben vergleichen (s. Tabelle 4.1).

Zusammenfassend lässt sich für die Blutproben der axSpA-Kohorte somit festhalten, dass diese eine repräsentative Stichprobe, mit adäquater Geschlechterverteilung und gering bis maximal mäßig erhöhter Krankheitsaktivität, bei mutmaßlich durchschnittlich kurzer Krankheitsdauer oder milder Verlaufsform im Vergleich zu den erwähnten Vergleichsdaten zur axSpA darstellt.

Für die Gruppe der axSpA-Probanden, welche Synoviaprobe spendeten, lässt sich ein vergleichbares Fazit ziehen, jedoch mit der Einschränkung einer sehr kleinen Stichprobenmenge ($n = 9$). Zudem lagen hier die Mittelwerte der akuten Krankheitsaktivitätsparameter zum Einschlusszeitpunkt (BASDAI, CRP, BSG), sowie die Indizes des Krankheitsprogress (BASFI, BASMI) um ein Vielfaches höher. Dies lässt sich am ehesten im Kontext des Probengewinns erklären: Patienten, die Gewebeproben spendeten, taten dies im Rahmen einer notwendigen,

operativen Intervention einer bereits weiter fortgeschrittenen Krankheit und somit bei länger vorherrschender, entzündlicher Arthritis (ggf. als „ultima ratio“). Auch das mediane Alter lag somit höher (s. Tabelle 4.2).

5.1.2 Deskriptive Beobachtungen innerhalb unserer PsA und RA-Kohorten

Sowohl Angaben zur Inzidenz, als auch zu vorherrschenden Prävalenzen bei der PsA, variieren je nach Studie und untersuchtem Land (Liu, Yeh et al. 2014). Während die Prävalenz der Psoriasis alleine je nach Studie und Land zwischen geschätzten 0,6 – 4,8% liegt (Naldi 2004), variiert die Prävalenz der PsA alleine innerhalb Europas, von 0,17 – 0,35% in Griechenland (Trontzas, Andrianakos et al. 2005, Anagnostopoulos, Zinzaras et al. 2010), über 0,24 – 0,32% in Deutschland (Albrecht, Binder et al. 2023) bis zu 0,42% in Italien (De Angelis, Salaffi et al. 2007), und es wird angenommen, dass bis zu 20-30% aller Psoriasis Erkrankten eine PsA ausweisen oder im Verlauf entwickeln (Mease 2006, Radtke 2009, Reich, Krüger et al. 2009, Scotti, Franchi et al. 2018). Das Geschlechterverhältnis (m : w) beträgt 0,7:1 bis ca. 2,1:1 (Torre Alonso, Rodriguez Perez et al. 1991) und die Erkrankung tritt normalerweise erstmalig zwischen dem 40. – 50. Lebensjahr auf (Gladman, Shuckett et al. 1987). Während axSpA-Patienten mit bis zu 80-95% HLA-B27 positiv sind, reicht die Rate HLA-B27 positiver PsA-Patienten gerade einmal von ca. 20 bis 35%, je nach Studie und ethnischer Abstammung, und die Rolle von HLA-B27 als unabhängiger Risikofaktor für die PsA wird weiterhin diskutiert (Queiro, Morante et al. 2016). Die Erkrankung an sich ist, anders als die RA, in der Regel „seronegativ“, was die Bestimmung von RF und anti-CCP AK angeht.

Die Angaben zur Prävalenz der RA variieren von 0,3% bis zu 1,0% (Hense, Luque Ramos et al. 2016) und wird für Deutschland mit ca. 0,8 – 1,2% geschätzt (Albrecht, Binder et al. 2023). Die Erkrankung tritt in der Regel zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr auf (Harris 1992), mit einer geschätzten Inzidenz von 0,1 – 0,5 ‰. Der Häufigkeitsgipfel liegt hierbei für Frauen bei 55-64 und für Männer bei 65 bis 75 Jahren, und Frauen sind etwa dreimal so häufig betroffen wie Männer (Schneider, Baseler et al. 2020). Als Serummarker findet man den IgM-RF bei ca. 65-80% der RA-Patienten (und bei bis zu 5% Gesunden) und den sehr viel spezifischeren anti-CCP AK (> 95% Spezifität) bei etwa 60% (Meyer, Labarre et al. 2003, Schneider, Baseler et al. 2020). Da der DAS28-CRP oft die Krankheitsaktivität gegenüber dem DAS28-BSG unterschätzt (Hensor, Emery et al. 2010), wurden die korrespondierenden DAS28-CRP cut-off Werte für die Aktivitätskategorien „Remission“, „niedrige“ und „hohe“ Aktivität anhand eines Kollektivs japanischer RA-Patienten angepasst (respektive 2,3/2,7/4,1) (Inoue, Yamanaka et al. 2007).

Somit lässt sich für unsere PsA-Patienten, welche für unser Projekt Blut spendeten, eine annähernd repräsentative Geschlechterverteilung mit einem medianen Alter von 52,5 Jahren vorfinden, was sich mit den beschriebenen demografischen Daten deckt. Auch die Rate HLA-B27 positiver Patienten liegt annähernd innerhalb des Erwartungswertes. Überträgt man die oben beschriebenen DAS28-CRP cut-off Werte für die RA, auf das PsA-Kollektiv (hier 2,66 von 10 Punkten) und betrachtet zudem den CRP-, sowie den BSG-MW, lässt sich von einer moderaten Krankheitsaktivität sprechen. So erhielten auch bereits 40,0% der Patienten zum Studienzeitpunkt DMARDs. Interessanterweise wiesen lediglich 55,0% der eingeschlossenen Patienten nachweislich eine Psoriasis auf, was einen Teil der Patienten formal der Kategorie „PsA sine psoriasis“ zuweist (s. Tabelle 4.1). PsA-Patienten, die nur Synovia spendeten, waren im Median mit 47,0 Jahren etwas jünger. Aufgrund der hier sehr geringen Fallzahl ($n = 3$), lassen sich aus den anderen deskriptiven Daten nur bedingt Rückschlüsse ziehen (s. Tabelle 4.2).

Mit einem deutlich überrepräsentierten Frauenanteil sind die Blut spendenden Probanden der RA-Kohorte, wie zu erwarten, überwiegend weiblich. Hier könnte jedoch ein Gender-Bias vorliegen, der mit 100% Frauenanteil innerhalb der Synoviaspender, noch stärker zum Ausdruck kommt. Unsere vorwiegend weiblichen Probandinnen lagen mit 57,0 Jahren im Median innerhalb des geschlechterspezifischen Häufigkeitsgipfels, womit von einem bereits weiter voran geschrittenen Krankheitsprogress bei einem Teil der Patienten auszugehen ist. Der Großteil unserer Patienten konnte eine Seropositivität vorweisen. Die Krankheitsaktivität der teilnehmenden Probanden ist als hoch zu verorten, was sich in der Zusammenschau des DAS28-CRP, dem grenzwertig erhöhtem BSG-MW und v.a. dem CRP-MW widerspiegelt. Dies ist im Kontext von 53,33% mit DMARDs vorbehandelten Probanden für die Einordnung der nachfolgenden Diskussionsthemen im Kontext einer ausgeprägteren Krankheitsaktivität als bei den anderen Kohorten, zu berücksichtigen (s. Tabelle 4.1). Für die kleinere Gruppe weiblicher Synoviaspenderinnen ($n = 7$) sei noch erwähnt, dass diese einen höheren Altersmedian von 70 Jahren aufwies (s. Tabelle 4.2).

5.1.3 Systemische Inflammationsmarker stehen im Zusammenhang mit IL-26 Expressionsleveln

Die von uns erhobenen klinisch deskriptiven Parameter, sind im Kontext unseres Primärendpunktes, dem Nachweis von IL-26 ELISA-Serumspiegeln im Kohortenvergleich von Relevanz (s. Abbildung 4.3).

So konnten wir zwar keinen signifikanten Unterschied der IL-26 Serumspiegel von axSpA-Patienten im Vergleich zu HCs festhalten, jedoch konnten wir im Vergleich der PsA- bzw. RA-Kohorte mit unseren HCs, jeweils signifikant höhere IL-26 Serumlevel nachweisen (s. 4.3.1).

Diese Kohortenunterschiede sind jedoch in Zusammenschau mit einer uns festgestellten Korrelation zu betrachten: Wir konnten zeigen, dass für axSpA-Patienten die IL-26 Serumlevel mit den zugehörigen CRP-Werten positiv korrelieren (s. 4.3.2). Zunächst sei erwähnt, dass unser RA-Kollektiv evtl. einem Alter- und Geschlechtsbias unterlag. So sind die untersuchten IL-26 Serumspiegel gemeinsam mit dem im Median erhöhten Patientenalter, sowie der stark verzerrten, primär weiblichen, Geschlechterverteilung zu sehen. So könnten diese Parameter als mögliche Störvariablen, einen Einfluss auf die IL-26 Serumspiegel genommen haben und das Gesamtbild unseres Kohortenvergleichs beeinflussen. Nimmt man an, dass unsere RA-Patienten, aufgrund des höheren Patientenalters und der höheren, von uns erfassten Entzündungs- und Aktivitätsparameter, bereits weiter in ihrem respektiven Krankheitsprogress vorangeschritten waren als unsere axSpA und PsA-Patienten, könnte dies die hohen IL-26 Serumwerte miterklären.

So wird in der Literatur bereits der diagnostische Nutzen der Bestimmung von IL-26 als Biomarker für verschiedene Krankheitsbilder und -stadien diskutiert, um den Krankheitsprogress hiermit korrelieren zu können (Luo, Jiang et al. 2020, Brilland, Bach-Bunner et al. 2021, Gowhari Shabgah, Abdelbasset et al. 2022). Für Patienten mit SLE konnte bereits gezeigt werden, dass IL-26 Level mit dem SLEDAI Score, als bewährtem SLE-Aktivitätsmarker, korrelieren und Patienten mit höheren IL-26 Serumspiegeln ein höheres klinisches und serologisch aktives Krankheitsstadium aufweisen (Brilland, Bach-Bunner et al. 2021). Für Patienten mit chronischer Hepatitis B wird angenommen, dass IL-26 als möglicher Indikator für den aktuellen Inflamationsgrad dienen könnte (Luo, Jiang et al. 2020). Corvaisier et al. konnten für ihr ebenfalls primär weibliches RA Kollektiv (58,1 Jahre im MW, m:w 8:23) gegenüber ihrer Vergleichskohorte „andere inflammatorische Arthritiden“ (n = 20, hiervon axSpA n = 5 und PsA n = 4) jedoch im Gegensatz zu uns, sowohl für den BSG-MW als auch CRP-MW, niedrigere Werte festhalten. So waren die gemessenen IL-26 Serumspiegel bei der Vergleichskohorte „andere inflammatorische Arthritiden“ im Schnitt höher als bei den untersuchten RA-Patienten (Corvaisier, Delneste et al. 2012). Sind IL-26 Serumspiegel von der aktuellen Krankheitsaktivität und dem bisherigen Krankheitsprogress beeinflusst?

Setzt man diese Annahme voraus, scheinen die im Vergleich zur PsA und RA-Kohorte von uns gemessenen, deutlich niedrigeren IL-26 Serumspiegel, erklärbar. Da diese nachweislich positiv mit den gemessenen CRP-Serumlevel bei unseren axSpA-Patienten korrelieren (s. 4.3.2), lässt dies den Schluss zu, dass unsere axSpA-Kohorte eine insgesamt niedrigere Krankheitsaktivität und einen kürzeren bisherigen Krankheitsprogress, als unsere anderen beiden

Vergleichsgruppen aufwies. So ist das Mediane Alter unserer axSpA-Patienten im Gruppenvergleich das Jüngste und der CRP-MW mit 6,79 mg/l der Niedrigste (und zugleich nur knapp oberhalb des pathologischen Grenzwertes von 5 mg/l (Herold 2018)). Interessanterweise konnte für eine deutsche Kohorte gezeigt werden, dass initial erhöhte CRP-Werte bei axSPA Patienten das Risiko der Röntgenprogression erhöhen (Poddubnyy, Rudwaleit et al. 2011, Kroon, Landewé et al. 2012, Poddubnyy, Rudwaleit et al. 2012). Im Kontext der beschriebenen osteoproliferativen Funktion von IL-26 scheint dieser Zusammenhang für die axSpA von pathophysiologischem Interesse (Heftdal, Andersen et al. 2017).

Dieses Missverhältnis könnte durch die nachträgliche Erweiterung unserer Rekrutierungsbemühungen zustande gekommen sein (s. 2.1.7). Die fehlende Anbindung extern angeworbener und in Praxen rekrutierter Patienten, an unsere Rheumaambulanz, könnte dazu beigetragen haben, dass axSpA-Patienten zu für uns „ungünstigen“ Zeitpunkten, niedriger Krankheitsaktivität, eingeschlossen wurden

Zusammenfassend lässt sich somit die Hypothese in den Raum stellen, dass für die Aufrechterhaltung systemischer IL-26 Expressionslevel und einem hieraus resultierenden, gesteigerten osteoanabolen Krankheitsprogress der axSpA, anscheinend aktive inflammatorische Faktoren und Prozesse notwendig sind. Lassen sich jedoch für diese Hypothese Belege innerhalb unserer experimentellen Daten finden?

5.2 Diskrepanz zwischen lokaler und systemischer Expressionslevel von IL-26

Betrachtet man die von uns gewonnenen quantitativen Daten zu umgebungsabhängigen IL-26 Leveln, fällt auf, dass sich die Kohorten-spezifischen Beobachtungen an Synovia (= lokale Expression) und Serum (= systemische Expression) bzgl. IL-26 zum Teil nicht decken (vgl. 4.2 mit 4.3). So konnten wir zwar für IL-26 im Synovialgewebe von betroffenen axSpA-Patienten mittels Immunhistochemie eindeutig signifikant mehr IL-26 nachweisen (s. Abbildung 4.1 & Abbildung 4.2), in den untersuchten Serumproben jedoch nicht (s. Abbildung 1.2). Für Patienten mit RA wiederum traf das Gegenteil zu, denn hier konnten wir lokal kein signifikant erhöhtes IL-26 festhalten, systemisch jedoch schon. Patienten der Entität PsA konnten als einzige sowohl lokal (jedoch eher fokal im Vergleich zur axSpA, s. Abbildung 4.2 C), als auch systemisch signifikant erhöhte IL-26 Werte aufweisen. Diese Diskrepanz zwischen lokalen und systemischen IL-26-Leveln, scheint durch die jeweilige Krankheitsentität pathophysiologisch verankert zu sein. Doch wie lässt sich dies erklären?

5.2.1 Gewebsständige CD68+ makrophagenähnliche Synoviozyten und andere Leukozyten produzieren vermehrt IL-26 in entzündlichem Synovialgewebe, in Abhängigkeit zu ihrer Krankheitsentität

In Abhängigkeit zur untersuchten Krankheitsentität, scheinen unterschiedliche Zellpopulationen lokale Produzenten von IL-26 in betroffener Synovia zu sein.

In der Literatur konnten bereits mehrere Krankheitsentitäten mit unterschiedlichen, teils gewebsspezifischen, primären IL-26 Produzenten in Verbindung gebracht werden, z.B. vaskuläre, glatte Muskelzellen bei der ANCA-assoziierten Vaskulitis (Poli, Augusto et al. 2017) oder alveoläre Makrophagen und Lungen-ständige Fibroblasten bei der COPD (Che, Tufvesson et al. 2018, Savchenko and Kaidashev 2018, Che, Sun et al. 2019). So beschrieben Corvaisier et al. beispielshalber für RA-Patienten CD68+ makrophagenähnliche und Synoviolin+ fibroblastenähnliche Synoviozyten, sowie synoviale Myofibroblasten als IL-26 Quelle und wiesen eine Kolo-kalisation zwischen IL-26 und CD3 sowie ROR γ t nach (Corvaisier, Delneste et al. 2012).

Durch die von uns durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen an Synovialgewebe konnten wir zeigen, dass bei axSpA und PsA-Patienten eine Kolo-kalisation von IL-26 und CD68 zu beobachten ist (s. Abbildung 4.1 C & Abbildung 7.4). Wie bereits oben erwähnt konnte eine derartige Kolo-kalisaton auch in hyperplastischem Synovialgewebe bei RA-Patienten nachgewiesen werden (Corvaisier, Delneste et al. 2012). Patienten mit axSpA, PsA und RA (belegt durch die Literatur) scheinen somit innerhalb ihrer chronisch, entzündlich veränderten Synovia,

betroffener Gelenke, gewebsständige CD68+ Makrophagen zu besitzen, die ebenfalls IL-26 aufweisen.

Dies ist im klinischen Kontext von Interesse, da für das (gegen IL-17A gerichtete) Biologikum Secukinumab im Rahmen der Wirksamkeit nach 12 Wochen eine Reduktion CD68+ Makrophagen und CD15+ neutrophiler Granulozyten in der sub-synovialen Auskleidung bei SpA festgehalten werden konnte (van Mens, van de Sande et al. 2018). Für SpA Patienten gibt es noch keine konklusiven Daten synovialgewebsständige Makrophagen (STM) betreffend, anders als für RA-Patienten: Hier konnte man bereits MerTK-CD206- STM (welche proinflammatorische Antworten in synovialen Fibroblasten auslösen) und MerTK+CD206+ STM (welche Inflamationsresolution und Reparaturmechanismen induzieren) in humanen Gelenken nachweisen (Alivernini, MacDonald et al. 2020). MerTK+CD206+ STM sind in RA während einer Remission vermehrt nachweisbar und ein verringerter Anteil von 47,5% ist ein unabhängiger Risikofaktor für ein akutes Aufflammen der Erkrankung nach Dosisreduktion oder Unterbrechung der Therapie. Bisher unklar ist, ob IL-26+CD68+ synoviale Makrophagen von systemisch zirkulierenden Monozyten abstammen oder von synovialgewebsständigen Makrophagen, welche beide im Rahmen des K/BxN Serum-Transfer Arthritis Modell demonstriert wurden (Culemann, Grüneboom et al. 2019). Eine ex-vivo Studie an synovialer Flüssigkeit von PsA-Patienten zeigte eine Expansion einer Zwischenstufe von Monozyten und Makrophagen: Diese Zellen wiesen eine Expression von *MRC1*, dem Gen, das für CD206 kodiert auf, welches einen zentralen Marker von STMs in RA-Patienten darstellt (Yager, Cole et al. 2021).

Potentielle Induktoren von IL-26 in CD68+ makrophagenähnlichen Synoviozyten könnten DAMPs sein, wie z.B. HMGB1, welches nach dem (inflammationsbedingten) Zelltod freigesetzt oder aktiv sezerniert wird und in Folge TLR4 aktiviert und somit den NF-kB-Signalweg in Gang setzt (Erlandsson Harris and Andersson 2004). Für diesen Signalweg konnte bereits gezeigt werden, dass dieser für die IL-1 β induzierte IL-26 Produktion in humanen CD4+ T-Zellen verantwortlich ist (Weiss, Ma et al. 2019).

Da wir leider nicht dazu in der Lage waren, genügend Synovialflüssigkeit betroffener Patient:innen zu sammeln, gelang uns die genauere Untersuchung der Kompartiment abhängigen IL-26 induzierenden Faktoren nicht. Es lässt sich somit nicht kategorisch ausschließen, dass, nicht evtl. doch einige der IL-26+ synovialen myeloischen Zellen gar nicht wirklich IL-26 Produzenten sind, sondern viel mehr Positivität aufweisen, da sie IL-26-DNA-Komplexshuttels nach exzessivem inflammatorischen Zelltod in ihr Zytosol aufgenommen haben (Poli, Augusto

et al. 2017), oder IL-26 gar in Folge seiner komplementähnlichen lytischen Eigenschaften nach intrazellulär gelangen konnte (Meller, Di Domizio et al. 2015).

Betrachtet man die lokale Expression von IL-26 in der IHC genauer, so fällt auf, dass ein zellspezifisches zytoplasmatisches/oberflächliches Färbungsmuster vor allem in Bereichen (unterhalb) der synovialen Auskleidung stark ausgeprägt ist. Daneben findet man jedoch auch ein diffuses, unspezifisches, extrazelluläres Signal, welches Probenweise stärker bzw. schwächer ausgeprägt ist und auf extrazelluläre IL-26-DNA-Komplexe hinweisen könnte.

In diesem Zusammenhang ist bisher unklar, ob diffuses extrazelluläres IL-26 in peripheren Gelenken einen „Fallenmechanismus“ darstellt, wie er bei NETs beobachtet werden kann und in Folge dieses Mechanismus chronische Entzündungen vorantreibt. Es konnte gezeigt werden, dass IL-26 die NET induzierte Sekretion von IL-6 ausgehend von humanen Monozyten, und von CXCL8, ausgehend von humanen neutrophilen Granulozyten, verstärkt (Poli, Augusto et al. 2017). Ebenso lässt sich nicht ausschließen, dass ein Teil der von uns beobachteten immunhistochemisch „IL-26+ Zellen“ nicht einfach durch reine Bindung von IL-26 an der Zelloberfläche zustande gekommen sind. So weist IL-26 aufgrund seiner biophysikalischen Eigenschaften und stark positiven Ladung eine hohe Affinität zu Zelloberflächen und Proteoglykanen auf, die bekanntermaßen Bestandteil der Glykokalyx sind (Hör, Pirzer et al. 2004)

Die in der Literatur beschriebene Produktion von IL-26 in SMA+ Myofibroblasten bei SPA Patienten (Heftdal, Andersen et al. 2017) konnten wir jedoch nicht bestätigen. Auch die bereits beschriebene Expression von IL-26 durch CD163+ M2 Makrophagen in Tumoren bei Mamma-Ca Patienten (Itoh, Hatano et al. 2021) konnten wir nicht nachweisen. Für IL-1-R1+ Th17-Zellen konnte bereits beschrieben werden, dass diese mittels IL-1 β Stimulus vermehrt IL-26 produzieren (Weiss, Ma et al. 2019). Eine Kolokalisation von IL-1-R1 und IL-26 konnten wir für die von uns untersuchten axSpA-Proben jedoch nicht nachweisen. Auch CD3+-T-Zellen von axSpA und PsA Patienten kolokalisierten bei uns nicht mit IL-26, was die von Heftdal et al. gemachten Beobachtungen bei SpA Patienten untermauert (Heftdal, Andersen et al. 2017) und die Kolokalisation von IL-26 und CD3 sowie ROR γ t bei RA Patienten kontrastiert (Corvaisier, Delneste et al. 2012).

Die Unterschiede zwischen lokalen und systemischen IL-26-Leveln beruhen somit wahrscheinlich auf verschiedenen Zellpopulationen, die sich zudem je nach Krankheitsentität auch noch gewebsspezifisch zu unterscheiden scheinen. Aufgrund des zudem äußerst geringen Anteils IL-26+ CD68+ makrophagenähnlicher Synoviozyten an dem gemessenen IL-26+ Signal in den von uns untersuchten Proben, sollten weitere potentielle gewebständige lokale IL-26

produzierende Zellpopulationen näher untersucht werden. Mögliche interessante Kandidaten bei der SpA in diesem Zusammenhang könnten u.A. $\gamma\delta$ T-Zellen (welche auch Produzenten von IL-17 sind (Umemura, Kawabe et al. 2004)), ILC3 (Cols, Rahman et al. 2016), fibroblasten ähnliche Synoviozyten (Corvaisier, Delneste et al. 2012, Lee, Kim et al. 2019), neutrophile Granulozyten und MAIT-Zellen (Meermeier, Zheng et al. 2022, Mehta, Lett et al. 2022, Garner, Amini et al. 2023) sein.

Gegen MAIT-Zellen als für unsere Beobachtungen in Frage kommende synoviale IL-26 Produzenten spricht jedoch, dass wir keine Kolo-kalisation von CD3 mit IL-26 in der Immunfluoreszenz sahen. Diese könnten dennoch zur systemischen IL-26 Produktion ihren Beitrag leisten, da die Arbeitsgruppe von Garner et al. nachweisen konnte, dass sowohl IL-17A- als auch IL-17+ MAIT-Zellen ein ähnliches, stimulationsabhängiges Transkriptionsprofil aufweisen, welches u.A. durch *IL26* gekennzeichnet ist (Garner, Amini et al. 2023). Sie postulieren, dass es sich bei IL-17+ MAIT-Zellen, mit dem zugehörigen (*IL26*+) Transkriptionsprofil, um einen funktionellen Zustand, unter hierfür induzierenden Stimulationsbedingungen, handelt.

Interessanterweise konnten, entgegen der ursprünglichen Annahme, dass diese weder CD4 noch CD8 exprimieren (Porcelli, Yockey et al. 1993), CD8+ TRAV1-2+ funktionelle MAIT-Zellen, welche MR1 abhängig proinflammatorische Zytokine, IFN- γ und TNF produzieren, nachgewiesen werden (Gold, Cerri et al. 2010, Le Bourhis, Martin et al. 2010, Kjer-Nielsen, Patel et al. 2012, Napier, Adams et al. 2015, Sharma, Wong et al. 2015). Diese können zudem durch eine hohe Expression von CD161 (Martin, Treiner et al. 2009) beschrieben werden. Außerdem wurden humane TRAV1-2+CD161+ MAIT-Zellen mit weiteren Zelloberflächenmarkern assoziiert, unter anderem CD26 und CCR6 (Dusseaux, Martin et al. 2011). Für beide Marker CD26+ und CD161+ konnten wir für CD8+ T-Zellen im Blut unserer Probanden IL26 Transkripte nachweisen (wenn auch nicht signifikant unterschiedlichem Maße zwischen den Kohorten) (s. Abbildung 4.6 B). Somit könnten CD8+ MAIT-Zellen als systemische und lokale Produzenten von IL-26 bei der SpA dennoch theoretisch in Frage kommen.

5.2.2 Systemische IL-26 Serumspiegel lassen sich durch lokale IL-26 Expression bei SpA Patienten nicht hinreichend erklären – Ein Erklärungsversuch

Unter der Annahme, dass eine lokal erhöhte IL-26 Expression unmittelbar auch einen systemisch messbaren Anstieg von IL-26 bedingt, müssten sich die von uns an humaner Synovia gemachten Beobachtungen zu IL-26 direkt auch auf unsere Serumproben übertragen lassen. Dies trifft jedoch nicht zu. axSpA-Patienten weisen die höchste, messbare Synovia spezifische IL-26 Expression bei den am niedrigsten, messbaren IL-26 Serumspiegeln auf. Bei RA-

Patienten verhält es sich anders rum und PsA-Patienten können sowohl signifikant mehr (stark) IL-26 exprimierende Zellen in der Synovia, als auch hohe IL-26 Serumspiegel systemisch nachweisen.

Unterschiede zwischen gemessenen Zytokin-Serumleveln und lokaler Expression sind zunächst nicht grundsätzlich ungewöhnlich und wurden z.B. bei RA-Patienten für IL-20 beschrieben (Hsu, Li et al. 2006). Derartige lokal-systemische Diskrepanzen konnten auch bei Patienten mit CED beobachtet werden, bei denen erhöhte Protein und mRNA Expression von IL-26 im Magen-Darm Trakt gegenüber gesunden Kontrollprobanden festgehalten wurden, während die gemessenen IL-26 Serumlevel und die *IL26* Expression für PBMCs geringer ausfielen (Song, Lai et al. 2022). Dies würde mit unserer Beobachtung einer IL-26 Produktion durch CD68+ makrophagenähnliche Synoviozyten in SpA-Patienten zusammenpassen, im Gegensatz zur These von z.B. nach extravasal migrierten CD3+ T-Zellen. Diese Beispiele zeigen, dass nicht zwangsläufig IL-26 produzierende gewebsständige Zellpopulationen von ursprünglich systemisch zirkulierenden IL-26-Produzenten abstammen müssen, bzw. auch nach ihrem Eintritt in lokales Gewebe Ihre Fähigkeit zur IL-26 Produktion erneut verlieren könnten.

In diesem Kontext sei zudem eine wichtige Limitation innerhalb unserer Methodik erwähnt, welche einen Teil dieser Diskrepanzen ebenfalls erklären könnte: Die ungleiche Verteilung gemessener IL-26 Serumlevel bei RA-Patienten hin zu sehr hohen bis außerhalb des Messbereichs liegenden Konzentrationen im Rahmen unseres IL-26 ELISAs (vgl. Abbildung 4.4). Diese könnte auf unspezifisch gebundenen Antikörpern (positive Interferenz) bzw. unserer Modifikation des Assays beruhen. So war es uns Eingangs nicht möglich, IL-26 Serumlevel durch das kommerziell zu erwerbende IL-26 ELISA ELAB-Kit zu detektieren, woraufhin wir eine Signalamplifikation mittels Tyramid vornahmen (vgl. 3.6.1). Diese Amplifikation, zusammen mit dem Umstand, dass bekanntermaßen Plasmabestandteile bei RA-Patienten, wie der RF, *anti-animal* IgG Antikörper und sonstige heterophile Antikörper, ELISA-Assays stören können (Kragstrup, Vorup-Jensen et al. 2013), könnte zu einem falsch (hoch) positivem IL-26 Serumsignal bei dieser Patientengruppe geführt haben.

So zeigen PsA-Patienten bezüglich der lokalen und systemischen IL-26 Expression ein kongruenteres Bild, was wieder mit der Beobachtung höherer systemischer Inflammationsmarker (CRP, vgl. 5.1.3 und Tabelle 4.1) gegenüber der axSpA Kohorte im Einklang steht, wenngleich für die PsA Kohorte hier formal kein positiv korrelierender Zusammenhang zu gemessenen IL-26 Serumleveln festgehalten werden konnte (s. Abbildung 4.4).

Eine These, die eine derartige Diskrepanz zwischen gemessenen, systemischen und lokalen IL-26-Konzentrationen bei SpA-Patienten hinreichend erklären könnte, möchte ich an dieser Stelle gerne vorstellen:

Bei SpA-Patienten könnten systemisch zirkulierende, zunächst nur „potentielle“ IL-26 Produzenten im Rahmen Ihrer Migration hin zu einem lokalen (präexistenten) synovialen Milieu, die „pathogene“ Eigenschaft erhöhter IL-26 Expression erlangen. Hierbei könnte es sich um „prä“-pathogene, bisher nicht ausreichend geprimte (IL-1-R1+) Th17-Zellen bzw. nicht hinreichend zu einem Th17-Phänotyp hin induzierte CD4⁺CD45RO⁺ Gedächtnis-T-Zellen handeln. Diese könnten in Abhängigkeit zum aktuellen systemischen Inflamationsgrad, unterschiedlich stark ausgeprägt zur IL-26 Produktion in der Lage sind (vgl. CRP-Niveau und IL-26 Serumlevel axSpA und PsA, s. Tabelle 4.1 und Abbildung 4.3).

In einer derartigen, bereits ggf. zuvor inflammatorisch veränderten synovialen Umgebung (aufgrund für SpA prädisponierender genetischer und bestimmter Umweltfaktoren, vgl. 1.1.3) sorgen vor der stattfindenden, beschriebenen Migration, bereits zuvor gewebsständige IL26⁺CD68⁺ makrophagenähnliche Synoviozyten (neben anderen potentiellen Produzenten) dafür, dass lokal IL-26-DNA-Komplexe (aufgrund eines inflammatorischen Zelluntergangs) vorliegen. Diese Komplexe aus IL-26 und DNA erzeugen ähnlich der für Keratinozyten beschriebenen TGF- β 1 abhängigen Feedbackschleife in psoriatischen Hautläsionen (Fries, Saidoune et al. 2023) eine parakrine Rückkopplungsschleife. Diese Rückkopplungsschleife bewegt die anderen lokal vorhandenen Inflammationsteilnehmer dazu, die für die Ausdifferenzierung von pathogenen Th-17 Zellen notwendigen Zytokine (IL-1 β , IL-23, IL-6) zu bilden (Meller, Di Domizio et al. 2015, Poli, Augusto et al. 2017, Larochette, Miot et al. 2019). In NETs gefangenes IL-26, wie es bei tumorabhängigen Mikromilieus z.B. bereits postuliert wurde (Trotter, Shuptrine et al. 2020), könnte zur lokalen Aufrechterhaltung der erhöhten synovialen IL-26 Level (auch bei zwischenzeitlich reduzierter systemischer Inflammation) beitragen, während systemisches IL-26 u.A. aufgrund seiner Bindungseigenschaften und Fähigkeit zur bakteriellen Clearance (Tu, Lai et al. 2019, Song, Lai et al. 2022) schneller nicht mehr messbar ist.

Auf diesen lokalen Ausdifferenzierungsreiz hin verlieren die zuvor (z.T.) doppelt IL-26-IL17A-positiven, nicht vollständig ausdifferenzierten Th17-Zellen teilweise Ihre Fähigkeit zur IL-26 Produktion (Fries, Saidoune et al. 2023). Unter der Annahme, dass systemisch zirkulierende IL-26⁺ Th-17 Zellen nur eine „Differenzierungsstufe“ hin zu pathogenen Th17-Zellen darstellen (Fries, Saidoune et al. 2023), die ihre Ausdifferenzierungsfaktoren in einer lokalen,

chronisch inflammatorischen Umgebung erhalten und daraufhin erneut systemisch wirksam werden können, lassen sich verschiedene von uns beobachtete Diskrepanzen erklären.

So ließen sich bei SpA Patienten systemisch *IL26* mRNA Transkripte nur in einem Bruchteil der Th17-Zellen (rare cells) nachweisen, da diese nur einen „Spiegel“ der stattfindenden Ausdifferenzierung pathogener Th-17 Zellen im lokalen, synovialen IL-26+ Milieu darstellen könnten. Erst bei erhöhter entzündlicher systemischer Aktivität (vgl. erhöhte PsA- vs. niedrigere axSpA-CRP-Werte, s. Tabelle 4.1 und 5.1.3) kommt der „Differenzierungsmotor“ in Gang. Sobald SpA-Patienten erhöhte systemische Entzündungswerte aufweisen (welche aus den chronischen entzündlichen Vorgängen im Gelenk resultieren), lassen sich erhöhte IL-26 Serumspiegel nachweisen, da mehr zuvor nicht pathogene (homöostatische) Th-17 Zellen auf einmal bei Ihrer Zirkulation durch den Körper mit einem IL-26 induzierenden entzündlichen synovialen Milieu in Kontakt kommen. Anschließend werden diese zu IL-26+IL17+, systemisch wirksamen, nicht vollständig ausdifferenzierten pathogenen Th17-Zellen. Diese schütten daraufhin im Serum messbares IL-26 aus (als Spiegel der stattfindenden „Pathogenisierung“ von Th17-Zellen). Sollte es zu diesem Zeitpunkt durch therapeutische Intervention nicht gelingen, dieses, durch IL-26 in den betroffenen Gelenken getriebene, Differenzierungssignal zu unterbrechen, entsteht eine Vielzahl pathogener Th-17-Zellen, die den weiteren Krankheitsprogress bedingen.

Ein Punkt, der diese These eines „lokalen/gewebsständigen IL-26 getriebenen Phänotypisierungsmotors“ hin zu einem pathologischen (Th17-)Phänotyp weiter stützt, ist eine weitere Beobachtung, die wir bezüglich aus PBMCs gewonnenen CD14+ Monozyten machen konnten: Diese produzieren weder initial, noch nach einem LPS-Stimulus IL-26 (vgl. Abbildung 4.9 und 4.5.1), während CD68+ makrophagenähnliche Synoviozyten anscheinend zur Produktion von IL-26 bei der SpA in der Lage zu sein scheinen, welche ursprünglich von CD14+, aus dem Blut stammenden, nicht spezifizierten Monozyten abstammen.

Der Prozess synovialer Inflammation ist charakterisiert durch: Verbreiterung der Synovia (Hypertrophie und Hyperplasie) und Zellinfiltration (von Lymphozyten und Makrophagen), wobei Makrophagen den größten Teil der infiltrierenden Zellen darstellen (Goldenberg, Egan et al. 1982, Benito, Veale et al. 2005). Bei Patienten mit Osteoarthritis setzen sich die synovialen Schichten aus synovialen Fibroblasten (SF) und inflammatorischen Zellen zusammen (De Bari, Dell'Accio et al. 2001). SF exprimieren konstitutionell IL-6, CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, TGF- β und fibroblastären Wachstumsfaktor (Bartok and Firestein 2010). Synoviale makrophagenähnliche Zellen bei OA-Patienten zeigen einen Phänotyp, der ähnlich zu gewebsspezifischen/residenten Makrophagen ist, nämlich neben CD14 u.A. CD11b, CD16 und CD68.

Zudem produzieren sie die primären inflammatorischen Mediatoren, IL-1, IL-6, TNF- α , neben MMPs und ADAMTs, welche zur Matrixdegradierung beitragen (Bondeson, Blom et al. 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Depletion CD14⁺ synovialer makrophagenähnlicher Zellen in einer Abnahme von IL-1 β und TNF- α resultiert (Bondeson, Wainwright et al. 2006, Manferdini, Paoletta et al. 2016).

Diese Beobachtungen zeigen, dass CD14⁺ im Blut zirkulierende Monozyten in einem von Th17-Zellen im Gelenkgewebe angebotenen proinflammatorischen Milieu (z.B. IL-6, TGF- β , IL-1, TNF- α) die Fähigkeit zur Produktion von IL-26 erlangen können. Nicht nur das: Neben dem Erwerb eines CD68⁺ Phänotyps scheinen sie zudem dazu in der Lage zu sein, als gewebsständige makrophagenähnliche Synoviozyten selbst auch die Fähigkeit zur Produktion von IL-1, IL-6 und TNF- α zu erwerben. Faktoren, die wiederum dazu beitragen, dass pathogene Th17-Zellen entstehen können.

Wenn zirkulierende CD14⁺ Monozyten durch den Kontakt zu einem synovialen proinflammatorischen Mikromilieu zu CD68⁺IL-26⁺ Zellen differenzieren können, warum dann nicht auch zirkulierende Th17-Zellen, hin zu einem pathogenen (intermediär IL-26⁺) Phänotypen?

Einen Nachweis dieses Differenzierungsvorgangs mittels z.B. *fate mapping* zu führen wird jedoch aufgrund der Tatsache, dass das *IL26*-Gen in Mäusen und Ratten nicht konserviert ist (Collins, Henderson et al. 2012), nur über ein *IL26* transgenes Tiermodell möglich sein.

Lassen sich für diese These, „lokaler, synovialer IL-26 Produktion als Motor zytokinabhängiger Ausdifferenzierung pathogener Th-17 Zellen, über einen systemisch wirksamen IL26+IL17A⁺ Th-17-Zwischentyp bei SpA Patienten“ jedoch evtl. innerhalb unserer Daten genügend Anhaltspunkte finden?

5.2.3 Pathologische Th17-Zellen verändern ihren Phänotyp und ihre IL-26 Expressionsfähigkeit in Abhängigkeit zu ihrer inflammatorischen Umgebung

Man geht davon aus, dass das Zytokinmikromilieu, das durch angeborene Immunzellen im Gewebe generiert wird, maßgeblich die Plastizität bzw. Transdifferenzierung von Th17-Zellen beeinflusst (Mills 2022). Die Zytokine IL-1 β (welches aus z.T. durch IL-26 induzierten myeloiden Zellen, Epithelien und NK-Zellen stammt (Meller, Di Domizio et al. 2015, Miot, Beaumont et al. 2015, Poli, Augusto et al. 2017, Larochette, Miot et al. 2019) und IL-23 (als Produkt aktivierter Monozyten, Makrophagen und dendritischer Zellen (Oppmann, Lesley et al. 2000)) (mit/ohne IL-6) induzieren die Entwicklung von pathogenen Th17-Zellen, die

vermehrt IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26, IFN- γ , und ROR γ t exprimieren (Wilson, Boniface et al. 2007, Corvaisier, Delneste et al. 2012).

IL-23 ist für die Stabilisierung des (pathologischen) Th17-Phänotyps, im Kontext der IL-17/23 Achse auch bei der SPA essentiell (Jethwa and Bowness 2016). Für Patienten mit axSpA konnte man eine erhöhte Inzidenz IL-23+ Zellen im subchondralen Knochenmark, erhöhte IL-17 und IL-23 Serumspiegel sowie erhöhte Werte von IL-23 in Synovialflüssigkeit nachweisen (Ciccia, Bombardieri et al. 2009, Wang, Lin et al. 2009, Davidson, Liu et al. 2011, Mei, Pan et al. 2011, Jethwa and Bowness 2016). Bei Patienten mit axSpA korrelieren systemische IL-23 Serumspiegel positiv mit Aktivitätsparametern, was für RA-Patienten nicht zutrifft, und auf Differenzen in der Regulation von Th17-Zellen hinweisen könnte (Melis, Vandooren et al. 2010).

Auch PBMCs von gesunden Probanden haben das Potential IL-26 auf einen IL-1 β Stimulus hin zu bilden. So exprimieren IL-1-R1+CD4+ T-Gedächtniszellen von gesunden Individuen in Dosisabhängigkeit zu IL-1 β vermehrt IL-26, während durch die Stimulation mit IL-6 oder IL-23 alleine keine IL-26 Produktion in-vitro beobachtet werden konnte. Betrachtet man zusätzlich durch Oberflächenmarker identifizierte Th17 (CD4+CD45RO+CD161+CCR6+CCR4+CXCR3+-T-Zellen) und Th1- bzw. Th2-Zellen, so produzieren in-vitro lediglich Th17-Zellen auf IL-1 β hin vermehrt IL-26. In-vitro Inkubation mit IL-2 führt in CD4+ T-Gedächtniszellen zur vermehrten Expression von IL-1-R1, welcher über IL-1 β die Induktion von IL-26 bedingt. Im Gegensatz hierzu hat IL-1 β bei IL-1-R1- Th17-Zellen nicht diesen Effekt. Durch die Aktivierung von IL-1-R1 wird ein NF- κ B abhängiges Gen-Programm in Th17-Zellen aktiviert. Diese Beobachtungen legen nahe, dass innerhalb der möglichen Th17 Zellpopulationsphänotypen, die Produktion von IL-26 durch die Expression von IL-1-R1 (mit)bedingt ist (Weiss, Ma et al. 2019).

Bei Patienten mit RA konnte man zeigen, dass konstitutionell IL-26 produzierende Synoviozyten, mittels IL-26 die Produktion von IL-1 β und CCL20 in myeloischen Zellen induzieren, welche wiederum die Polarisierung von Gedächtnis CD4+-T-Zellen hin zu einem Th17-Phänotyp bewirken und zudem durch Produktion von CCL20 weitere CCR6+-Th17-Zellen (aus der Peripherie) rekrutieren. Zudem bedingt die Produktion von IL-1 β (durch Monozyten) und IL-17A (durch Th17-Zellen) eine Zunahme der Produktion von IL-26 durch die gewebständigen Synoviozyten. Derart induzierte Th17-Zellen könnten so ebenfalls durch die Produktion von IL-26 die proinflammatorische Rückkopplung über lokale Monozyten fördern (Corvaisier, Delneste et al. 2012).

Über diese Rückkopplungsschleife generierte pathologische Th17-Zellen haben das Potential bei der RA als systemische IL-26 Produzenten wirksam zu werden. Es bestehen von der Krankheitsentität abhängige Unterschiede in den pathophysiologischen Prozessen, der Entstehung und Unterhaltung derartiger Zellen. Lassen sich derartige Beobachtungen jedoch auch auf den peripheren Phänotyp, von uns untersuchter PBMCs übertragen, die im Verdacht stehen, systemische IL-26 Serumspiegel zu bedingen?

Zunächst konnten wir zeigen, dass die von uns untersuchten und mittels PMA/Ionomycin *in vitro* unspezifisch stimulierten PBMCs der Entitäten axSpA und PsA, sowie der gesunden Kontrollen grundsätzlich dazu im Stande sind, im Blut *IL26* zu transkribieren (s. 4.4.1). Die absoluten, sowie relativen Populationsgrößen klassifizierten diese peripheren IL-26 Produzenten jedoch als „rare cells“ (Radbruch and Recktenwald 1995), also Zellen für die man weniger als 1000 Einheiten pro Milliliter untersuchten Probenmaterials nachweisen kann (Dharmasiri, Witek et al. 2010). Wie bereits in der Literatur dargestellt, waren die von uns untersuchten CD4⁺-T-Zellen grundsätzlich fähig auch ohne spezifischen Stimulus *IL26* zu transkribieren (Wolk, Kunz et al. 2002), taten dies jedoch nur in begrenztem Umfang und für axSpA und PsA-Patienten nur geringfügig mehr, als für gesunde Probanden (s. Abbildung 4.5 B). Spezifiziert man jedoch den Phänotyp der CD4⁺ T-Zellen weiter, indem man zusätzlich CD26 und CD161 als Surrogat-Marker für Th17-Zellen verwendet (Maggi, Santarasci et al. 2010, Bengsch, Seigel et al. 2012), erhöht sich nicht nur der Anteil *IL26* transkribierender T-Zellen, sondern der Unterschied von axSpA und PsA-Patienten gegenüber HCs wird auch deutlicher (s. Abbildung 4.5 B).

Man kann zudem sowohl für allein CD26⁺, als auch für allein CD161⁺ CD4⁺ T-Zellen beobachten, dass der Anteil *IL26* transkribierender Zellen bei axSpA und PsA-Patienten größer ist als bei HCs. Dies ist vor allem interessant, da der Anteil CD26⁺CD161⁺CD4⁺ T-Zellen an allen CD4⁺ Zellen zwischen HC und axSpA-Patienten relativ gleich und bei PsA-Patienten sogar geringfügig niedriger ist. Betrachtet man nun noch die parallele Expression von IL-17A, fällt auf, dass auch IL-17A⁺ T-Zellen systemisch als „rare cells“ mit <1% Anteil an allen CD4⁺ Zellen in allen Kohorten vorkommen, jedoch von den CD4⁺IL-17A⁺ PBMCs ein Anteil von über 20% *IL26* transkribiert, unabhängig zur untersuchten Entität. *IL26*⁺IL-17A⁺-Zellen machen insgesamt bei allen Kohorten weniger als 0,2% der lebenden CD4⁺ Zellen aus. Der Anteil IFN- γ exprimierender PBMCs an CD4⁺ T-Zellen ist für alle Kohorten deutlich höher, als für IL-17A. Der Anteil *IL26*⁺ Zellen an CD4⁺IFN- γ ⁺ PBMCs wiederum ist deutlich niedriger als bei CD4⁺IL-17A⁺ Leukozyten, und auch *IL26*⁺IFN- γ ⁺ Zellen sind gemessen an allen CD4⁺

Zellen, „rare cells“. In Zusammenschau lässt sich somit festhalten, dass vor allem für Th17-Zellen spezifische Phänotypenmerkmale, mit der messbaren Rate *IL26* transkribierender Zellpopulationen innerhalb CD4⁺ PBMCs in Zusammenhang stehen (s. Abbildung 4.6 A).

Anders ausgedrückt: Bei näherer Spezifizierung der untersuchten *IL26*⁺ Phänotypen innerhalb CD4⁺ PBMCs hin zu einem, wie in der Literatur beschriebenen (intermediär doppelt für IL-26 und IL-17A positiven (Fries, Saidoune et al. 2023)) „pathogenen“ Th17-Phänotyp, zeichnet sich für SpA Patienten ein Trend hin zu einem systemisch erhöhten Anteil derartiger „potentiell pathologischer Th17-Zellen“ gegenüber HCs ab.

Ebenso konnten wir für CD8⁺-T-Zellen nachweisen, dass diese grundsätzlich *IL26* im Blut transkribieren können und axSpA und PsA-Patienten zudem jeweils einen höheren Anteil derartiger Zellen besitzen als HCs. Auch hier scheinen die Oberflächenmarker CD26 und CD161 zur näheren Beschreibung des Phänotyps geeignet. So reichern sich *IL26* transkribierende Zellen in den so charakterisierten Populationen vermehrt an (vgl. Ausführungen zur Charakterisierung von CD8⁺ MAIT-Zellen als potentielle IL-26 Produzenten mittels CD26 und CD161 unter Punkt 5.2.1) (s. Abbildung 4.6 B).

Für PBMCs lässt sich somit zunächst festhalten: Diese sind Kohorten unabhängig grundsätzlich in der Lage *IL26* zu transkribieren und in Folge zu exprimieren. CD4⁺ T-Zellen stehen hierbei im Mittelpunkt. IL-26 produzierende CD4⁺ Zellen sind jedoch systemisch gesehen „rare cells“. Betrachtet man Phänotypenmerkmale, die für Th17-Zellen typisch sind, wie IL-17A, CD26 und CD161, wirkt sich dies positiv auf den %-Anteil detektierbarer *IL26*⁺ Zellen aus. Dies trifft für axSpA und PsA-Patienten mehr zu, als für HCs. Th17-Zellen scheinen somit systemisch für die Produktion von IL-26 bei den SPA Entitäten axSpA und PsA relevant zu sein.

Betrachtet man nun den Phänotyp dieser IL-26 produzierenden Th17-Zellen in einem von Weiss et. al vorgeschlagenen Prozess der spezifischen Phänotypisierung genauer (Weiss, Ma et al. 2019), kann man beobachten, dass bei den von uns untersuchten PsA-Patienten tatsächlich signifikant mehr IL-1-R1⁺Th17-Zellen nach einem IL-2 Stimulus vorzufinden waren, als bei HCs. Dies galt auch für den Anteil IL-1-R1⁺CD26⁺CD161⁺ Gedächtniszellen an allen CD4⁺ T-Zellen für diese Kohorte und ebenso für den generellen Anteil von Th17-Zellen an allen CD4⁺ Zellen. Auch der Anteil CD26⁺CD161⁺ Gedächtniszellen an allen CD4⁺ Zellen war für PsA-Patienten höher, als bei HCs. Bei CD8⁺ Gedächtniszellen verhält sich dieser Zusammenhang andersrum, sodass die Anteile CD26⁺CD161⁺, sowie IL-1-R1⁺CD26⁺CD161⁺ Gedächtniszellen an allen CD8⁺ T-Zellen von axSpA und PsA-Patienten niedriger und für RA-Patienten sogar signifikant niedriger als bei HCs ausfielen (s. Abbildung 4.6 D & Abbildung 4.7).

Interessanterweise verhält sich der Anteil IL-1-R1+ Th17-Zellen an allen CD4+ T-Zellen prozentual gesehen ähnlich bei den PsA-Patienten, wie der Anteil *IL26* transkribierender Leukozyten an allen CD4+ Zellen (vgl. Abbildung 4.5 B & D).

Dies lässt die folgenden Annahmen zu: IL-1-R1+ Th17-Zellen, die nachweislich auf IL-1 β hin in-vitro IL-26 produzieren (Weiss, Ma et al. 2019), liegen bei PsA-Patienten deutlich vermehrt vor. Zudem scheinen ausgeprägtere inflammatorische Prozesse bei den untersuchten PsA-Patienten (vgl. moderat erhöhte Krankheitsaktivität gemessen mittels DAS28-CRP, CRP und BSG bei PsA gegenüber geringer Aktivität bei axSpA, wie unter 5.1.2 dargestellt) evtl. dafür zu sorgen, dass peripher generell vermehrt Th17-Zellen generiert werden, was für unsere axSpA und RA-Kohorte nicht zutrifft. Der signifikante Phänotypen-Unterschied, IL-1-R1 betreffend, bleibt auch durch die alternative Färbung von CD26 und CD161, als Th17 Surrogat-Marker, erhalten. CD26 und CD161 eignen sich somit zur Beschreibung pathologischer Th17-Zellen und potentieller IL-26 Produzenten.

Anscheinend sorgen v.a. pathologische, in ihrem Phänotyp veränderte IL-1-R1+ Th17-Zellen bei PsA-Patienten dafür, dass IL-26 vermehrt im Serum vorzufinden ist. Bei unseren axSpA-Patienten scheinen die weniger aktiven Umgebungsbedingungen (vgl. 5.1.1) dafür zu sorgen, dass der IL-1-R1+ Th17 Phänotyp nicht aufrecht erhalten bleibt und somit auch keine statistisch signifikant erhöhten IL-26 Serumlevel erreicht werden, trotz des messbaren Potentials *IL26* transkribierender (CD26+/CD161+) CD4+ T-Zellen.

Alternativ wäre es noch vorstellbar, dass gänzlich andere (T-)Zellen primäre Produzenten von IL-26 sind, die vor allem bei der axSpA in der Synovia vorzufinden sind, von uns jedoch nicht untersucht wurden. So fällt auf, dass wir zwar IL-1-R1+ Th17-Zellen als potentielle systemische IL-26 Produzenten für PsA-Patienten ausweisen konnten, in unserer Immunfluoreszenz jedoch keine Kolo-kalisation von IL-26 und IL-1-R1 festhielten (vgl. Abbildung 4.1 C & Abbildung 7.4). Diese Diskrepanz könnte jedoch auch aus einem transienten IL-1-R1+ Th17-Phänotypen resultieren.

Auch für RA-Patienten scheinen die systemischen IL-26 Serumspiegel sich nicht durch den IL-1-R1+ Th17 Phänotyp hinreichend erklären zu lassen, da hier keine erhöhten Populationsanteile gemessen werden konnten. Hier könnten neuere Beobachtungen bezüglich IL-26 exprimierender MAIT-Zellen einen Erklärungsansatz leisten (Garner, Amini et al. 2023).

5.3 Gewebsabhängige Zytokine IL-1 β & IL-23 primen Gedächtnis-CD4 Th-Zellen in-vitro zur vermehrten Expression von IL26 und assoziierter Gene

Erneut zusammengefasst: Wir konnten zeigen, dass für axSpA-Patienten die IL-26 Serumspiegel mit dem CRP-Level im Blut positiv korrelieren. Unsere Blut spendenden axSpA-Patienten wiesen bei dem niedrigsten CRP-MW unserer untersuchten Kohorten zugleich auch die niedrigsten IL-26 Serumwerte auf. Innerhalb unserer Synoviaspender wiesen axSpA-Patienten den höchsten systemischen CRP-MW auf und konnten in der IHC ausgeprägte IL-26 Expression in den untersuchten peripheren Gelenken nachweisen. Für PsA-Patienten konnten wir zwar keine derartigen Korrelationen nachweisen, jedoch sahen wir hier, dass erhöhte systemische CRP-Werte (als Aktivitätsmarker) sich auf hohe, messbare IL-26 Serumspiegel übertrugen und auch lokal die IL-26 Expression in der Synovia mit erhöhten (präoperativ routinemäßig gemessenen) CRP-Werten verbunden schien. Unsere RA-Patienten wiesen wiederum bei den höchsten CRP-Werten auch systemisch die höchsten IL-26 Serumspiegel auf, konnten jedoch in der untersuchten Synovia, bei dem niedrigsten gemessenen CRP-MW, keine signifikant erhöhte Expression von IL-26 aufweisen (wobei bestimmte methodische Störgrößen, sowie ein Geschlechter- und Altersbias nicht auszuschließen sind).

Könnte es daher sein, dass die zu Beginn der Erkrankung im Rahmen der hoch aktiven Arthritis und durch entsprechende pro-inflammatorische Faktoren generierten pathologischen Th17 Zellen langfristig in ihrem Phänotyp (incl. IL-26 Expressionsfähigkeit) durch eine erhöhte Krankheitsaktivität erhalten werden können? Können Th17-Zellen ein derartiges Expressionsmuster auch bei veränderter Umgebung wieder verlieren? Welche Zytokine sind hierfür primär verantwortlich? Tragen bei RA-Patienten evtl. gewebsständige, konstitutionell IL-26 exprimierende Synoviozyten (Corvaisier, Delneste et al. 2012) einen größeren Anteil an den systemisch messbaren IL-26 Serumspiegeln, als bei Patienten mit SpA?

5.3.1 Verlust der systemischen IL-26 Expressionsfähigkeit erklärt durch Wegfall autoinduktiver Th17 favorisierender Zytokine

Es konnte bereits belegt werden, dass Th17-Zellen sowohl in-vivo, als auch in-vitro einen transienten Phänotyp aufweisen und somit keine klassische T-Zell Subpopulation mit finaler Ausdifferenzierung darstellen, sondern von ihrem Mikromilieu abhängig sind (Kurschus, Croxford et al. 2010). Gleichzeitig fand man ebenfalls Belege dafür, dass Th17-Zellen sich zwar die Expression zelllinienfremder Signatur-Zytokine aneignen können, jedoch gegenüber epigenetischen Veränderungen stabil sind und somit keinen wirklichen „Zelllinien“ Transfer vollziehen. Sie weisen eine epigenetische Stabilität bezüglich ihrer Signatur-Zytokine und

Transkriptionsfaktoren auf, können jedoch in-vivo zusätzliche Zytokine als Antwort auf spezifische Mikroumgebungen transient exprimieren (Cohen, Crome et al. 2011). So konnte für Th17-Zellen in einem Mausmodell gezeigt werden, dass diese, anders als Th1-Zellen, ihr Expressionsmuster in Abhängigkeit bestimmter Zytokine von primär IFN- γ hin zu IFN- γ /IL-17 (bzw. umgekehrt) in-vitro wechseln. In-vivo weisen Th17-Zellen im Gegensatz zu Th1-Zellen keinen stabilen Phänotyp bei wechselnden Umgebungsbedingungen auf (Shi, Cox et al. 2008).

In unseren qPCR-Daten können wir sehen, dass unsere aus PBMCs negativ selektierten CD4⁺ T-Zellen bereits vor ihrer in-vitro Stimulation, in Abhängigkeit zu ihrer Krankheitsabstammung, unterschiedlich ausgeprägt dazu in der Lage sind, an D0 *IL26* mRNA Transkripte nachzuweisen (Abbildung 4.8 A). So wiesen 63,16% der axSpA und 77,78% der PsA-Patientenproben an D0 *IL26* Transkripte in den CD4 Zelllysaten auf, jedoch „nur“ 53,85% der RA-Patienten und bei den HCs sogar nur 45,00% (s. Abbildung 4.8 A). Ex-vivo sind somit bereits unterschiedliche IL-26 Expressionsfähigkeiten bei nicht selektierten CD4⁺-T-Zellen festzuhalten. Für *IL17A* sehen wir an D0, dass für CD4⁺ T-Zellen, mit Ausnahme der RA-Kohorte, bei allen Patientengruppen Transkripte in >80% der Lysate nachweisbar sind (Abbildung 4.8 A). Somit scheinen bei axSpA und PsA-Patienten, sowie für unsere HCs ein Großteil der untersuchten Proben bereits ex-vivo IL-17A Produzenten aufzuweisen.

Induziert man nun in-vitro diese nicht naiven CD4⁺ T-Zellen für sechs Tage mit T-Zell-Aktivierungs-Beads und einem Zytokin-Cocktail aus IL-2/ IL-1 β /IL-23, fällt auf, dass in Relation zur HC-Kohorte vor allem CD4⁺ Leukozyten von axSpA-Patienten vermehrt *IL26*, sowie *IL17A* auf diesen Stimulus hin transkribieren (vgl. Abbildung 4.8 C). Auch die Transkription von *IL22*, als häufig gemeinsam mit IL-26 koexprimiertes Zytokin (Donnelly, Sheikh et al. 2010), wird durch diesen Stimulus v.a. bei axSpA-Patienten beeinflusst. Ein Anstieg von *RORC* mRNA Transkripten als Korrelat zum Transkriptionsfaktor ROR γ t, der als zentraler Regulator im Differenzierungsprogramm proinflammatorischer IL-17 produzierender T-Helferzellen gilt (Ivanov, McKenzie et al. 2006), lässt sich ebenfalls vor allem bei induzierten CD4⁺ T-Zellen von axSpA-Patienten nachweisen (vgl. Abbildung 4.8 C).

Dies zeigt, dass CD4⁺ T-Zellen, die von axSpA Probanden abstammen, im direkten Kohortenvergleich am ausgeprägtesten auf einen in-vitro Stimulus Ansprechen, der Faktoren enthält, für die bereits die Induktion (durch IL-1 β) und Aufrechterhaltung (durch IL-23) pathologischer Th17 Zellfunktionen nachgewiesen werden konnte (Cua, Sherlock et al. 2003, Awasthi, Riolo-Blanco et al. 2009, McGeachy, Chen et al. 2009, Zielinski, Mele et al. 2012, Jethwa and Bowness 2016). Das resultierende Transkriptionsmuster weist auf eine vermehrte Induktion IL-

26 exprimierender, pathologischer Th17-Zellen hin, die bei axSpA-Patienten für den gewählten Stimulus stärker ausgeprägt ist, als bei den Vergleichsgruppen. Hypothetisch könnte man hieraus umgekehrt bezüglich der Plastizität von Th17-Zellen ggf. ableiten, dass ein Wegfall derartiger Stimulationsbedingungen zu einer Reduktion der IL-26 Expressionsfähigkeit induzierter CD4⁺ T-Zellen beiträgt und sich der entsprechende Phänotyp der resultierenden Th17-Zellen erneut wandelt.

Sind die für die Induktion pathologischer Th17 Zellfunktion notwendigen Faktoren jedoch auch spezifisch für axSpA-Patienten? Gibt es unterschiedliche Transkriptionsmuster im direkten Kohortenvergleich? Welche Faktoren weisen den stärksten additiven Effekt, bzgl. der Induktion Th17 spezifischer Genprodukte auf?

5.3.2 Mit IL26 assoziierte Gene teilen sich Induktionsfaktoren, unabhängig von ihrer Abstammung, unterscheiden sich jedoch in ihrer Korrelation zu IL26

Betrachtet man Abbildung 4.8 B, fällt auf, dass für alle untersuchten Kohorten dasselbe Muster zutrifft: In Relation zur basalen Stimulation mit lediglich T-Zell-Aktivierungsbeads + IL-2, bewirkt in-vitro die Zugabe von IL-1 β & IL-23 innerhalb jeder Kohorte einen signifikanten, relativen Anstieg der Transkriptionsraten von *IL26* und *IL17A*. Die weitere Zugabe von TNF- α zum verwendeten Zytokinstimulationscocktail bewirkt zwar ebenso eine signifikante, Kohorten-unabhängige, relative Zunahme der Transkriptionsraten dieser Gene, jedoch gegenüber dem Zusatz von IL-1 β & IL-23 nur in geringem Maße. Für die PsA- und RA-Kohorte fallen die relativen Transkriptionsraten nach Zugabe von TNF- α sogar marginal geringer aus, als für die Zugabe von IL-1 β & IL-23 zur basalen Stimulationskondition mit IL-2.

Wirft man nun noch einen Blick auf die relativen Transkriptionsraten weiterer mit IL-26 und pathologischen Th17-Zellen assoziierter Gene, wird das Bild noch deutlicher. Abbildung 4.8 B zeigt, dass derselbe beschriebene Effekt durch die Zugabe von IL-1 β & IL-23 zu IL-2, auch für *IL22* und *IFNG*, unabhängig zur Kohorte, beobachtet werden kann. Lediglich das Ausmaß des relativen Transkriptionsanstiegs innerhalb der einzelnen Kohorten unterscheidet sich voneinander, nicht jedoch der zu beobachtende Effekt auf die gewählten Ziel-Gene.

Die in-vitro kultivierten CD4⁺ Th-Zellen teilen sich bezüglich der Expression von IL-26 und hiermit in Verbindungstehender Gene, somit anscheinend Induktionsfaktoren. Den stärksten induktiven Effekt konnten wir für die Zugabe von IL-1 β & IL-23 beobachten, zwei Zytokine, die zur Differenzierung und Aufrechterhaltung des Phänotyps pathologischer, IL-26 exprimierender Th17-Zellen einen zentralen Beitrag leisten (Wilson, Boniface et al. 2007, Corvaisier, Delneste et al. 2012, Zielinski, Mele et al. 2012, Jethwa and Bowness 2016, Heftdal, Andersen

et al. 2017). Das resultierende Transkriptionsmuster der von uns untersuchten Gene ist durch die Hochregulierung von Genprodukten wie *IL17A*, *IL22* und *IFNG*, unabhängig zur untersuchten Kohorte, Th17 Zell-spezifisch und in der Literatur auch bereits beschrieben (Wilson, Boniface et al. 2007).

Für PsA-Patienten konnten wir zudem zeigen, dass die Zugabe von IL-1 β & IL-23 zur in-vitro Stimulation von CD4⁺ T-Zellen eine signifikante Zunahme der relativen Transkriptionsrate von *RORC* bewirkt, dessen Expressionsprodukt ROR γ t als Zelllinien definierender Transkriptionsfaktor von Th17-Zellen gilt (Capone and Volpe 2020). Die Zytokine IL-1 β & IL-23 scheinen somit für PsA-Patienten in-vitro einen wesentlichen Beitrag zur Ausdifferenzierung CD4⁺, nicht-naiver T-Zellen hin zu IL-26 exprimierenden, pathologischen Th17-Zellen zu leisten.

Betrachtet man nun jedoch noch zusätzlich die von uns untersuchten, korrelativen Zusammenhänge der Transkription von *IL26* und Th17 assoziierter Genprodukte für die in-vitro Stimulationskondition IL-2 + IL-1 β + IL-23, wird deutlich, dass dennoch Unterschiede in den resultierenden Transkriptionsmustern innerhalb der Kohorten bestehen (s. Abbildung 4.10).

Während man für *IL17A* und *IL22* innerhalb der PsA, RA und HC-Kohorte jeweils einen deutlichen, positiv mit *IL26* korrelierenden Zusammenhang beobachten konnte, galt dies für axSpA-Patienten nicht. Für RA-Patienten wiederum korrelierten alleinig die Transkriptionsraten von *IL26* jeweils mit *IL4* und *IL1R1* positiv, für axSpA und PsA-Patienten, sowie für HCs jedoch nicht (vgl. 4.5.2).

Leider gelang es uns in diesem Kontext nicht, einen Nachweis, wie er von Weiss et al. geführt wurde, bezüglich der essenziellen Funktion von IL-1 β in der Induktion von IL-26 in IL-1-R1⁺ Th-17 Zellen zu erbringen (Weiss, Ma et al. 2019). Sie postulieren einen neuartigen IL-1 β abhängigen Signalweg für die rapide Induktion und Sekretion von IL-26 in Th17-Zellen gegenüber der klassischen TCR-abhängigen Aktivierung. Die Arbeitsgruppe um Weiss et al. konnten beobachten, dass IL-1 β für die von mikrobiellen Liganden (mittels Präinkubation mit *Mycobacterium leprae*) abhängige Induktion von IL-26 in humanen Th17-Zellen alleine ausreichend ist und nur durch IL-1-R1 gekennzeichnete Th17 Zellen auf einen IL-1 β Stimulus mit einer IL-26 Sekretion und einem NF- κ B regulierten Transkriptom antworteten.

Uns gelang es leider nicht in diversen (nicht dargestellten) Vorversuchen, mittels IL-1 β Präinkubation, ein ausreichend hohes *IL26* Signal im Vergleich zur Induktion mit IL-2 und PMA-Ionomycin in unserem PFA-FACS-Assay zu generieren, weshalb wir uns für einen unspezifischen Stimulus mittels PMA-Ionomycin entschieden.

Auch in den dargestellten qPCR-Untersuchungen an (nicht naiven) CD4⁺ T-Zellen gemessenen Transkriptomen, in Abhängigkeit unterschiedlicher Stimulationskombinationen, gelang uns eine Induktion von *IL26* mittels einem reinen, von IL-1 β abhängigen Stimulus nicht. Wir konnten zwar eine Induktion von *IL26* in einem primär von IL-23 und IL-1 β abhängigen Kontext demonstrieren, jedoch wurden hierdurch auch weitere Transkripte „pathogener Th17 Zellen“ (die nicht zwangsläufig IL-26⁺ sein müssen) wie *IL22* hochreguliert.

Ein alternativer Ansatz, den wir leider nicht verfolgten, wäre ggf. noch der Vergleich des von uns durchgeführten qPCR-Experiments mit einem 2-Stufen-Modell gewesen. Hier hätte man z.B. initial in einer weiteren Stimulationskondition nur einen IL-1 β Stimulus an D0 applizieren können und anschließend an D1 oder D2 den IL-23 Stimulus. Somit hätte man die zentrale Rolle der IL-26 Induktion durch IL-1 β , wie von Weiss et al. postuliert, evtl. hervorheben können.

Trotz der geteilten Induktionsfaktoren IL-1 β & IL-23, die innerhalb aller untersuchten Kohorten zu einem pathologischen Th17 Transkriptionsmuster führten (vgl. Abbildung 4.8 B & Abbildung 4.8 C), scheint für Patienten mit axSpA der Pathomechanismus der systemischen IL-26 Expression noch andere Faktoren zu beinhalten. Auffällig ist hierbei, dass CD4⁺ T-Zellen von axSpA-Patienten auf einen IL-2/ IL-1 β /IL-23 Stimulus, in Relation zu gesunden Probanden, am stärksten mit einer Steigerung der IL26 Transkriptionsrate und assoziierter Gene, zu reagieren scheinen (wenn auch nicht signifikant) (vgl. Abbildung 4.8 C & Tabelle 4.6). Lassen sich hierfür innerhalb unserer Daten Erklärungsansätze finden?

5.3.3 Mittels IL-1 β /IL-23 induzierte Gedächtnis-CD4⁺ Th-Zellen von axSpA-Patienten werden zu einem pathogenen Th17 Transkriptionsmuster hin „geprimed“

Interessanterweise konnten wir für keine der Krankheitsentitäten, im Vergleich zu unseren HCs, einen signifikanten Anstieg der relativen Transkriptionsraten von *IL1R1* für den gewählten IL-2/ IL-1 β /IL-23 Stimulus verzeichnen (Abbildung 4.8 C). Im Gegenteil, die relativen Transkriptionsraten von *IL1R1* schienen sogar bei Patienten mit axSpA und PsA in Relation negativ beeinflusst zu werden. Diese Beobachtung passt jedoch nicht mit den von uns erworbenen FACS-Daten zusammen, mittels derer wir für Patienten mit PsA signifikant mehr IL-1-R1⁺-Th17-Zellen, unter den CD4⁺-T-Zellen im peripheren Blut finden konnten (vgl. Abbildung 4.5 D). Als Schlussfolgerung hieraus könnte man in Erwägung ziehen, dass die in-vitro kultivierten CD4⁺ T-Zellen von axSpA und PsA-Patienten evtl. bereits einen ausgeprägteren IL-1-R1 spezifischen Phänotyp in-vivo besitzen und daher weniger auf die gewählten Induktionsfaktoren ansprechen. So sieht man auch in Abbildung 4.8 B, dass die Zugabe weiterer Zytokine zur in-

vitro Stimulationskondition mit lediglich IL-2, keinen wesentlichen Anstieg der hierzu relativen Transkriptionsraten bewirkt und zudem in Abbildung 4.8 C, dass die zur HC-Kohorte relativen Transkriptionsraten von *IL1R1* der axSpA- und PsA-Kohorte gegenüber der RA-Kohorte verringert sind. Tatsächlich kann man in den untersuchten *IL1R1* qPCR-Daten beobachten, dass für die Stimulationskondition mit lediglich IL-2 in Relation zur HC-Kohorte Patienten mit axSpA und PsA ebenfalls eine im geometrischen Mittel reduzierte Bioexpression zeigen (nicht in den Abbildungen dargestellt), welche ähnlich ausfällt wie für die in Abbildung 4.8 C dargestellte relative Expression gegenüber der HC-Vergleichskohorte bei zusätzlicher Stimulation mit IL-23 und IL-1 β . Selbiges gilt interessanterweise nicht für die RA-Kohorte, die auch für eine alleinige IL-2 Induktion eine leicht erhöhte relative *IL1R1* Bioexpression gegenüber den HCs zeigt, analog zur Darstellung für Abbildung 4.8 C bei zusätzlicher Gabe von IL-23 und IL-1 β .

Ein einfacher alternativer Erklärungsansatz für diese Diskrepanz könnte sich auch in der Zellbiologie des IL-1-R1 finden lassen: Der auf der Zelloberfläche befindliche IL-1-R1 durchläuft nach Ligandenbindung einen konstanten *turn-over* inklusive Endozytose und endolysosomaler Verschmelzung (Mizel, Kilian et al. 1987). Zudem besitzen sowohl IL-1 als auch IL-1R sogenannte nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS) und konnten somit auch im Zellkern gefunden werden (Mizel, Kilian et al. 1987, Curtis, Widmer et al. 1990, Weitzmann and Savage 1992, Blanco, Perez-Arago et al. 2008).

Ebenfalls relevant in diesem Zusammenhang scheint die RA spezifische, in Relation zur HC-Kohorte signifikant erhöhte *IL4* Transkriptionsrate CD4⁺ T-Zellen zu sein (Abbildung 4.8 C). Scheinbar erhöhen CD4⁺-Th-Zellen auf einen IL-2/ IL-1 β /IL-23 Stimulus hin ihre Produktion von IL-4.

Dieses Zytokin inhibiert nachweislich die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β , während es gleichzeitig die Synthese eines IL-1-Rezeptor Antagonisten durch aktivierte humane Mononzyten hochreguliert (Fenton, Buras et al. 1992). Chomarat et al. konnten 1995 zudem belegen, dass dieser IL-1-Rezeptor Antagonist, belegt mittels in-vitro kultivierter Synovia von RA-Patienten, primär durch synoviale Monozyten/Makrophagen gebildet wird. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass IL-4, gewonnen aus RA Synovia und peripherem Blut, einen stärkeren induktiven Effekt auf die Bildung dieses Antagonisten hat, als IL-10. Sie zogen hieraus den Schluss, dass IL-4 in RA Synovia eine Balance-Shift, hin zu einer eher anti-inflammatorischen Umgebung bewirkt (Chomarat, Vannier et al. 1995).

IL-4 könnte somit einen protektiven Faktor als Gegenmechanismus zur IL-1 β und IL-23 abhängigen Induktion pathogener, (intermediär IL-26+) Th17-Zellen bei der RA darstellen. Dies würde bedeuten, dass sich die synoviale Generierung pathogener Th17-Zellen bei RA-Patienten durch einen protektiven Faktor von der SpA unterscheidet.

So konnten Wallis et al. zeigen, dass ein bei der RA vererbter Polymorphismus des IL-4R dazu in der Lage ist, die Fähigkeit des menschlichen Immunsystems zur Regulation der IL-17 Produktion zu kontrollieren. Dieser SNP (I50V) in der für IL-4R kodierenden Region steht mit der Entwicklung einer besonders raschen und stark erosiven Form der RA in Verbindung (Wallis, Cooney et al. 2011).

Auch Leipe et al. konnten zeigen, dass ein SNP des IL-4R Gens (rs1805010) zu einer eingeschränkten IL-4 Signalkaskade führt und in Folge zu einer erhöhten Th17-Zellfrequenz, erhöhten klinischen Aktivität und akzelerierter radiographischer Progression bei RA-Patienten beiträgt. Dies geschieht indem CD4⁺ T-Zellen gegenüber dem abmildernden Effekt von IL-4 bei der Generierung von Th-17 Zellen durch diesen Polymorphismus weniger sensitiv werden (Leipe, Schramm et al. 2014)

Somit lässt sich festhalten, dass in Relation zu HCs, CD4⁺ Th-Zellen von axSpA-Patienten auf einen IL-2/ IL-1 β /IL-23 Stimulus hin, ein vermehrt pathogenes Th17 spezifisches Transkriptionsmuster aufweisen. Verstärkend zu dieser Beobachtung kommt hinzu, dass in Relation zur alleinigen Stimulation mit T-Zell-Aktivierungsbeads und IL-2, eine zusätzliche Stimulation mit IL-1 β und IL-23 (+/- TNF- α) eine signifikante Abnahme der relativen Transkriptionsrate von *IL4* bei axSpA-Patienten bewirkt, die man bei den anderen Kohorten nicht beobachten kann (vgl. Abbildung 4.8 B), einem Faktor, der bei RA-Patienten bezüglich der Generierung pathogener Th17-Zellen protektiv wirkt.

Betrachtet man die von uns gemachten Beobachtungen bezüglich lokaler und systemischer Unterschiede im Phänotyp und Transkriptionsmuster in Zusammenschau, könnte man hieraus für axSpA (bzw. SpA Patienten im Allgemeinen) folgende Schlussfolgerung ziehen:

Weiterentwicklung IL-26 abhängiger pathophysiologischer Prozesse bei der SpA

Systemisch zirkulierende CD4⁺ (Gedächtnis) T-Zellen werden durch inflammatorische Vorgänge innerhalb der betroffenen peripheren Gelenke zur synovialen Migration bewegt. Vor Ort

kommen diese T-Zellen mit einem inflammatorischen, durch IL-26 geprägten Mikromilieu in Kontakt, welches durch bereits gewebsständige CD68+ makrophagenähnliche Synoviozyten primär gebildet wird.

Diese könnten aus initial CD14+ systemischen Monozyten entstanden sein. IL-26 kann in den betroffenen Gelenken aufgrund verringerter Clearance und aufgrund des inflammatorischen Zelltods gebunden in IL-26-DNA-Komplexen (welche zudem in NETs gefangen vorliegen) auch bei vorübergehender geringerer systemischer Inflammation lange wirksam bleiben. Dieses IL-26 wiederum induziert in myeloischen und synovialen (Immun)Zellen und Fibroblasten für die Generierung pathogener Th17-Zellen notwendige Faktoren, wie IL-1 β , IL-23, TNF- α (Larochette, Miot et al. 2019). Auch IL-26+CD68+ makrophagenähnliche Synoviozyten erzeugen selbst IL-1 β , IL-6, TNF- α .

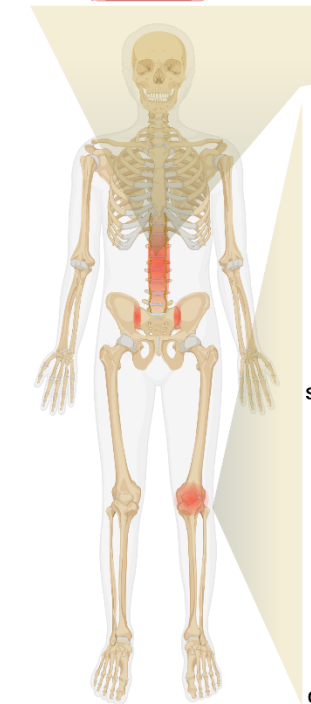
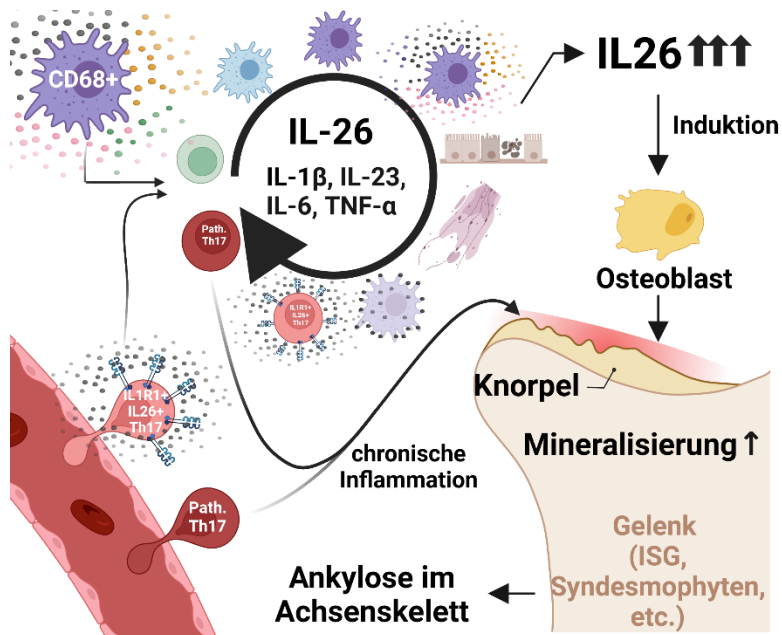
Die durch Chemotaxis angelockten zunächst nicht zwangsläufig pathogenen, systemischen CD4+ T-Zellen treffen nun in entzündlich veränderten Gelenken zudem auf, durch synoviale Fibroblasten gebildetes, TGF- β (Bartok and Firestein 2010). Diese Faktoren bewirken, dass sich diese CD4+ T-Zellen hin zu einem intermediären IL-26+IL17-A+ Th17-Phänotypen differenzieren (Fries, Saidoune et al. 2023), bevor diese wieder systemisch zu zirkulieren beginnen. Auf diese Art kommt ein systemisches IL-26 Serumlevel zu Stande, als „Spiegel“ des hiermit korrelierenden aktuellen Inflamationsgrads (s. Korrelation zu CRP).

In diesem Kontext erwerben diese Zellen zudem als Phänotyp den IL-1-R1, welcher als pathogenes Merkmal die weitere primär von IL-1 β abhängige Induktion von IL-26 bedingt. Bei fehlender Unterbrechung der chronischen Inflamationsvorgänge in den betroffenen Gelenken, können sich diese Zellen zu einem „finalen“ pathogenen Th17 Phänotypen hin ausdifferenzieren, der nicht zwangsläufig IL-26+ ist. Im selben Maße verlieren die beschriebenen, zuvor hin zu einem IL-26+ pathogenen Phänotyp geprimeten, Th17-Zellen bei der Inflamationsresolution (z.B. nach einer systemischen antiinflammatorischen Therapie) ggf. wieder ihre Fähigkeit zur IL-26 Produktion, im Rahmen ihrer Plastizität.

Bei der RA, als Vergleichskohorte chronischer Arthritiden, scheinen protektive Faktoren, wie die Produktion von IL-4, die Ausdifferenzierung hin zu einem nicht mehr IL-26+, rein IL-17A produzierenden Th17-Phänotypen zu verhindern. Dies könnte als Erklärungsansatz für den sehr hohen systemischen IL-26 Serumspiegel bei dieser Entität dienen: Th17-Zellen verbleiben bei diesem Krankheitsbild tendenziell in einem IL-26 produzierenden „prä-finalen“ Phänotypen und können hierdurch eher systemisch messbare IL-26 Spiegel bewirken.

Die bei der SpA auf diese, die Produktion von IL-26 favorisierende Art, geprimeten Th17-Zellen schütten nun im Achsenskelett den osteoanabolen Faktor IL-26 aus (Peng, Wang et al. 2016, Heftdal, Andersen et al. 2017, Larochette, Miot et al. 2019), der die pathognomonische Verknöcherung mitbedingt und seinerseits wiederum eine Rückkopplungsschleife bewirkt: Durch das im Achsenskelett ausgeschüttete IL-26 wird wiederum ein pathogene Th17 Zellen favorisierendes Mikromilieu erzeugt.

Diese positive Feedbackschleife sorgt für einen „pathogenen IL-26 getriebenen Th17 Differenzierungsantrieb“, welchen es durch gezielte Therapie unter Erhalt der homöostatischen Th17-Zellfunktion zu durchbrechen gilt.



Patient mit beginnender axSpA

Multifaktorielle Genese:

- Genetische Prädisposition
- Barrierschäden: Exposition gegenüber Pathogenen
- Mechanischer Stress

→ Induktion: Chronische Inflammation & Osteoproliferation

→ Generierung pathologischer Th-17 Zellen

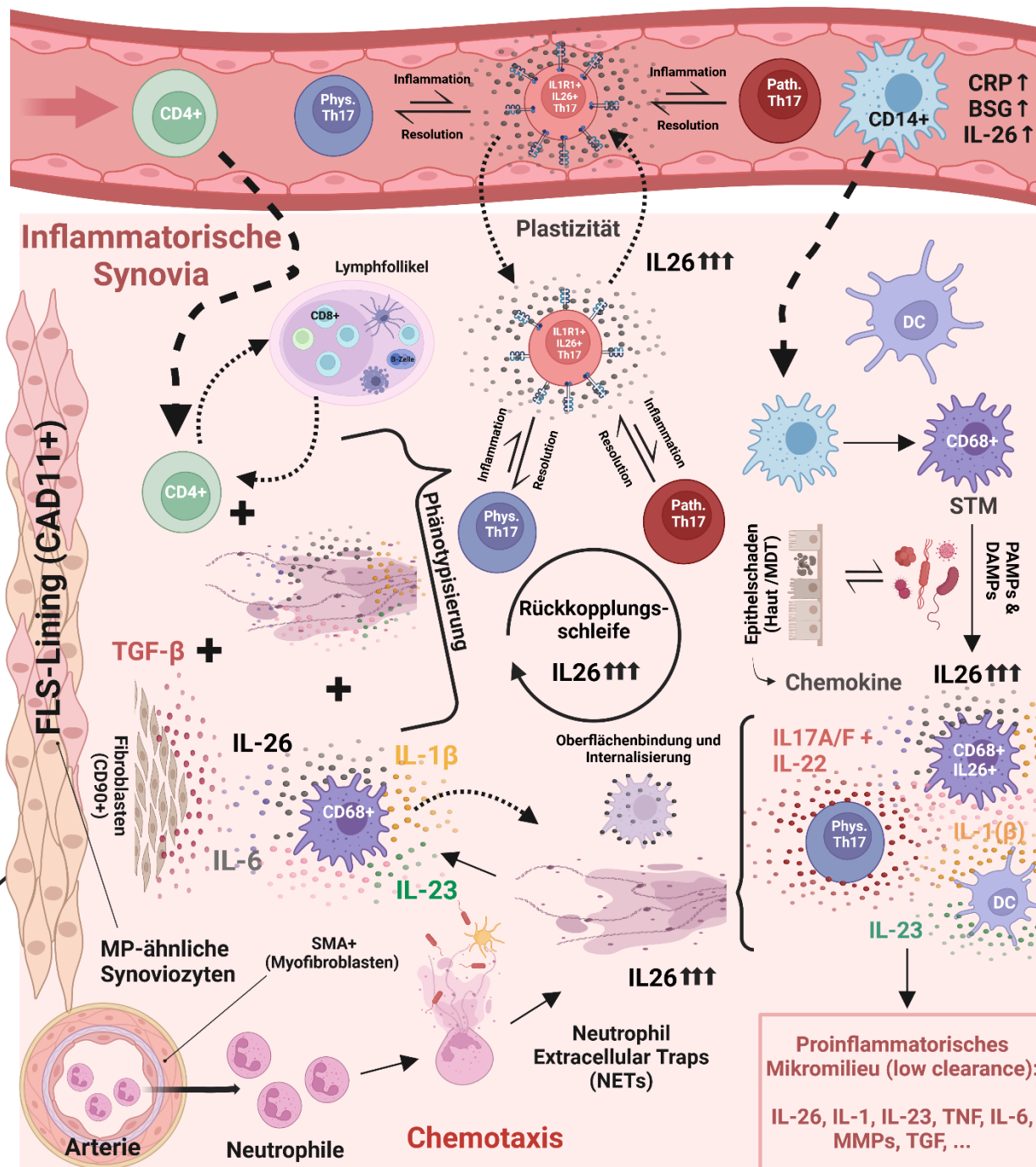
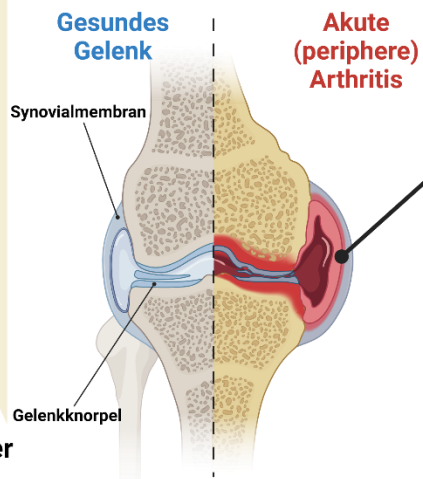


Abbildung 5.1 Grafisches Abstrakt zur von uns vorgeschlagenen Weiterentwicklung der wissenschaftlich diskutierten IL-26 abhängigen Pathogenese chronisch entzündlicher Arthritis innerhalb des Formenkreises der SpA (© Ossadnik & Hammitzsch, April 2024, erstellt mittels BioRender.com)

Legende: CD (Cluster of differentiation), Phys. (Physiologisch), Path. (Pathologisch), Th (T-Helferzelle), IL (Interleukin), CRP (C-reaktives Protein), BSG (Blutsenkungsgeschwindigkeit), STM (Synovial tissue macrophage), PAMP (Pathogen associated molecular pattern), DAMP (Danger associated molecular pattern), MDT (Magen-Darm-Trakt), MMPs (Matrix-Metalloproteasen), TGF (Transforming growth factor), NETs (Neutrophil Extracellular Traps), SMA (Smooth muscle antigen), MP (Makrophagen), FLS (Fibroblast like synoviocytes), DC (Dendritische Zelle), CAD (Cadherin), ISG (Illiosakralgelenk), axSpA (axiale Spondyloarthritis)

5.4 Potentielle translationale Aspekte unserer Studie

5.4.1 Ableitbare therapeutische Ansätze

Die IL-23/17 Achse hat sich in den letzten Jahren als wichtiges therapeutisches Ziel bei den verschiedenen Formen der SPA herauskristallisiert (Jethwa and Bowness 2016). Jedoch verbleibt trotz stetiger Neuentwicklungen wie z.B. von selektiveren JAK-Inhibitoren oder anti-IL-17A und -F-Antikörpern eine Gruppe von Patienten, die nicht zufriedenstellend therapiert werden kann. Da diese unter den akuten Auswirkungen der Erkrankung (Schmerzen, Fatigue), als auch den Folgen einer chronischen Entzündung (Ankylose) leiden, besteht hoher Bedarf an alternativen Therapieoptionen.

Vorteil eines gegen IL-26 gerichteten Therapieansatzes wäre der Erhalt protektiver Th17-Zellfunktionen, wie z.B. der Abwehr von bakteriellen und viralen Erregern (Mills 2022), bei gleichzeitiger Unterbrechung chronisch inflammatorischer Prozesse. Diese führen gerade bei axSpA-Patienten u.a. durch IL-26 induzierte Knochenmatrixneubildung durch Osteoblasten zur Verknöcherung (Heftdal, Andersen et al. 2017). Am Achsenskelett kann dies zu massiven funktionalen Einschränkungen im weiteren Krankheitsprogress führen. Die Verhinderung dieser Knochenneubildung ist als therapeutisches Ziel insbesondere relevant, da bisherige Therapien diese nicht sicher verhindern.

Eine zielgerichtete Therapie auf Grundlage der Pathophysiologie der SpA ist dringend notwendig, um Nebenwirkungen zu minimieren. Ein besseres Verständnis der pathologischen Funktion und Expression von IL-26 als „Master Regulator inflammatorischer Prozesse“ (Larochette, Miot et al. 2019) scheint somit von Nöten. Diese Kenntnisse könnten auch zu einem Voranschreiten therapeutischer Optionen bei anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose (Broux, Zandee et al. 2020), der Psoriasis ((Hatano, Itoh et al. 2019, Itoh, Hatano et al. 2019) oder der GVHD (Ohnuma, Hatano et al. 2015) führen.

Für die chronische GVHD konnte erst vor Kurzem ein humanisierter anti-IL-26 mAB im Rahmen einer Studie einen therapeutischen Nutzen beweisen (Hatano, Itoh et al. 2022), was als „proof of principle“ gesehen werden kann. Die Arbeitsgruppe von Hatano et al. geht aktuell davon aus, dass der von Ihnen entwickelte anti-IL-26 mAB das Potential zur Therapie vielfältiger chronisch inflammatorischer Erkrankungen, inklusive der Psoriasis, hat (Hatano, Itoh et al. 2022). So konnten sie auch bereits 2019 zeigen, dass die von ihnen entwickelte anti-humanen IL-26 mAbs die Angiogenese und Inflammation in Hautläsionen (im Rahmen eines IMQ-induzierten Psoriasis-ähnlichen transgenen Mausmodell) supprimieren konnten (Hatano, Itoh et al. 2019).

Der mögliche Einsatz von anti-IL-26 Antikörpertherapien bei Patienten mit SpA wurde zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch nicht untersucht und gilt daher als noch zu evaluierende therapeutische Strategie.

5.4.2 Ableitbare diagnostische Ansätze

Zudem gilt es IL-26 als potentiellen Biomarker weiter zu erforschen. In der Literatur wird die Verwendbarkeit von IL-26 nicht nur als Marker für inflammatorische Erkrankungen diskutiert, sondern auch für Tumorerkrankungen (Gowhari Shabgah, Abdelbasset et al. 2022). Zudem gibt es Daten, die die Nutzbarkeit von IL-26 Serumleveln zur Evaluation der Krankheitsaktivität bei SLE Patienten als Biomarker nahelegt (Brilland, Bach-Bunner et al. 2021).

Da die frühzeitige korrekte Diagnose von Erkrankungen aus dem Formenkreis der SpA zur Einleitung einer gezielten Therapie notwendig ist, könnte IL-26 zur Einschätzung des bisherigen Krankheitsprogress einen Beitrag leisten. Da, wie ich oben dargestellt habe, IL-26 im Kontext pathogener Th17-Zellen, als Ausdruck einer akut stattfindenden SpA spezifischen Pathogenese gesehen werden kann, könnte IL-26 für aktive Formen der SpA ggf. als Biomarker zur Erkennung eines erneuten oder beginnenden Krankheitsprogress, oder zur Evaluation einer erfolgreichen gegen z.B. IL-17 gerichteten Biologikatherapie eingesetzt werden.

Die Evaluation der IL-26 Expression und Produktion in verschiedenen Zellen und Körperflüssigkeiten könnte nicht nur für weitere klinische Studien wertvoll sein (besonders im Kontext von Follow-Up Untersuchungen), sondern auch für die Vorhersage der Prognose inflammatorischer Erkrankungen (Gowhari Shabgah, Abdelbasset et al. 2022). Unsere Daten zeigen ebenfalls Anhaltspunkte für eine mögliche Assoziation von IL-26 mit verschiedenen Krankheitsaktivitätsstadien, wie sie auch in der Literatur für IL-26 Gewebeexpression und entzündlicher Aktivität bei RA-Patienten bereits beschrieben werden konnte (Corvaisier, Delneste et al. 2012).

5.4.3 Notwendigkeit weiterer epigenetischer und gewebsspezifischer Untersuchungen zur Rolle von IL-26 als Motor inflammatorischer Rückkopplungsschleifen

Unsere Studie ist jedoch in letzter Konsequenz zur Evaluierung von IL-26 als potentielles therapeutisches und diagnostisches Ziel zur Behandlung der SpA nicht abschließend konklusiv. Wir konnten zwar bestimmte Einflussfaktoren der für die Entwicklung und Aufrechterhaltung notwendigen Pathomechanik diesbezüglich näher beleuchten, jedoch gilt es vor allem in Zukunft die genauen, lokalen IL-26 Produzenten in der betroffenen Synovia noch näher zu untersuchen. So kolokalisiert nur ein kleiner Teil des gemessenen IL-26 Signals in peripheren Gelenken mit CD68⁺ Zellen, was z.T. durch den inflammatorischen Zelltod (wie bereits mehrfach ausgeführt) und die folgende Komplexbildung von IL-26 und DNA (ggf. auch im Kontext von NETs) erklärt werden könnte, aber andere Produzenten nicht ausschließt. Auch die Option „falsch positiver“ CD68⁺IL26⁺ Zellen in Zusammenhang mit den lytischen und Shuttle-Eigenschaften von IL-26 (durch Internalisierung von IL-26 Komplexen) wurde von mir dargestellt.

Mögliche hierbei näher zu untersuchende Kandidaten wären u.A. $\gamma\delta$ T-Zellen (welche auch Produzenten von IL-17 sind (Umemura, Kawabe et al. 2004)), ILC3 (Cols, Rahman et al. 2016), fibroblasten ähnliche Synoviozyten (Corvaisier, Delneste et al. 2012, Lee, Kim et al. 2019), neutrophile Granulozyten und NK-Zellen (Cella, Fuchs et al. 2009) sein.

Zudem wäre noch die Charakterisierung frischer, nicht fixierter aus Synovia stammender Zellen interessant. Mit derartig gewonnen Zellen könnte man im Rahmen von *single-cell* RNA-Analysen tatsächlich die Produktion von IL-26 durch gewebständige Zellen beweisen (*Spatial Transcriptomics*).

Um der therapeutischen Nutzung von IL-26 näher zu kommen, muss die genauere Rolle von IL-26 bezüglich der Knochenneubildung am Gelenk und/oder Sehnenansatz noch geklärt werden. Hierfür gilt es u.a. auch die Rolle gewebsspezifischer Osteoblasten und deren Aktivierung bzw. Induktion durch Interaktion mit IL-26 näher zu untersuchen. Das Monitoring von IL-26 im Zusammenhang mit gesteigerter Krankheitsaktivität und einer hieraus resultierenden Ankylose könnte künftigen therapeutischen und diagnostischen Nutzen erweisen.

Diese weiteren Untersuchungen könnten nähere Einblicke in die durch IL-26 induzierte positive Rückkopplungsschleife zur Aufrechterhaltung chronischer Inflammation geben. Letztlich ist vor allem auch die IL-26 Region auf epigenetische Unterschiede zwischen den verschiedenen Krankheitsentitäten weiter zu untersuchen. Epigenetische Unterschiede in der Regulation der IL-26 Expression zwischen verschiedenen Krankheiten könnten zum besseren Verständnis und Therapie rheumatischer und generell chronisch inflammatorischer Krankheitsbilder beitragen.

Den Einfluss verschiedener Transkriptionsfaktoren auf die Regulation der IL-26 Produktion gilt es ebenfalls weiter zu erforschen.

Zusammenfassend möchten wir somit festhalten, dass IL-26 als Objekt der Grundlagenforschung der Pathogenese chronisch inflammatorischer Arthritiden viel Potential birgt und somit weitergehend, über diese Studie hinaus, untersucht werden sollte.

5.5 Weitere Limitationen

Im Folgenden möchte ich noch stichpunktartig auf weitere wesentliche Limitationen und potentielle Formen des Bias innerhalb unseres Studiendesigns und unserer Methodik zu sprechen kommen.

5.5.1 Limitationen im Rahmen des Studiendesigns und potentieller Selection-Bias

- Aufgrund der selbstständigen Rekrutierung von axSpA-Patienten über Online-Selbsthilfegruppen (s. 2.1.7), könnte es zu einer Stichprobenverzerrung (engl. Selection-Bias) gekommen sein. So wurden 15 von 29 axSpA-Patienten hierüber angeworben. Die besagten axSpA-Probanden wiesen wohlmöglich eine geringere Krankheitsaktivität auf, als Probanden die über unsere Rheumaambulanz rekrutiert wurden. Diese ist bei axSpA-Patienten (mittels CRP-MW Korrelation nachgewiesen) für die systemische Expression von IL-26 relevant. Zudem ist aufgrund der fehlenden längerfristigen Anbindung an unsere Rheumaambulanz eine Studienrekrutierung zu einem für uns „günstigen“ Zeitpunkt hoher Krankheitsaktivität so nicht möglich gewesen. Auch weitere Kenntnisse über den längerfristigen, bereits abgelaufenen Krankheitsprogress gingen so evtl. verloren.
- Die Studie wurde auf Basis von Annahmen, die auf Ergebnissen von Untersuchungen durch Corvaisier et al. an RA und anderen Arthritisentitäten bzgl. IL-26 basierten, gestaltet (Corvaisier, Delneste et al. 2012). Sie wurde für die axSpA-Kohorte, unter der Bedingung, dass mindestens 30 Probanden rekrutiert werden, auf 90% gepowert (s. 2.3.1). IL-26 Konzentrationsunterschiede innerhalb der axSpA, sowie PsA und RA-Kohorte könnten durch die zu geringe Fallzahl pro Kohorte verschleiert worden sein. Für PsA und RA-Patienten wurde die Anzahl von 30 Probanden, die Blut spenden sollten, nicht erreicht. Innerhalb der axSpA-Kohorte sind die Annahmen IL-26 Serumkonzentrationen betreffend von den gemischten anderen Arthritisentitäten abgeleitet worden. Evtl. war die notwendige Größe der axSpA-Kohorte für einen nachweisbaren Gruppenunterschied in den IL-26 Serumspiegeln zu klein geschätzt worden.
- Einzelne Bestandteile des ursprünglichen Studiendesigns wurden aufgrund fehlender Probengewinnung im Laufe der Studie aufgegeben. So war es uns nicht möglich Synovialflüssigkeit von 30 axSpA und PsA-Patienten zu gewinnen. Dies ist insbesondere bedauerlich, da dies zu einem besseren Verständnis der IL-26 bedingten Pathomechanismen beigetragen hätte. Wie wir in unserer Studie feststellen konnten, ist IL-26 vor allem lokal in betroffener Synovia überexprimiert, daher wäre eine Analyse der Synovialflüssigkeit von besonderem Interesse gewesen.

5.5.2 Methodische Limitationen im Rahmen durchgeführter Experimente

- Da sich die für die axSpA charakteristischen Verknöcherungen vor allem im Achsenskelett abspielen, haben die von uns gewonnen Gewebeproben aus peripheren Gelenken eine begrenzte Aussagekraft über IL-26 abhängige Prozesse im Bereich der WS und des ISG. Da operative Interventionen bei axSpA-Patienten im Bereich der WS weitaus seltener sind als für periphere Gelenke, ist die perioperative Gewinnung derartiger Proben limitiert und andere Formen der Probengewinnung aus ethischen Aspekten am lebenden Menschen nur schwer zu rechtfertigen. Die Untersuchung peripherer Gelenksproben auf single cell Ebene (s. 5.4.3) scheint ein notwendiger Kompromiss, den es zum besseren Verständnis pathophysiologischer Vorgänge im Achsenskelett noch näher zu untersuchen gilt. Alternativ wäre auch die Untersuchung von Gewebe aus dem Bereich des ISG oder der WS post mortem denkbar, jedoch müsste man hier eine zum Todeszeitpunkt des Patienten zuvor festgehaltene erhöhte Krankheitsaktivität im Bereich der Entnahmestelle gesichert haben, was die Probengewinnung wiederum weiter limitiert.
- Vier der axSpA, sowie eine der PsA-Gewebeproben stammten zudem aus einem Kollektiv aus England (Im Rahmen unserer Kooperation mit der Forschungsgruppe von Prof. Paul Bowness in Oxford (s. 2.1.7)). Inwieweit sich evtl. bestimmte, von uns gemessene Kohortenunterschiede auf eine andere Nationalität und Ursprung unserer Gewebespender zurückführen lässt, ist von uns nicht näher betrachtet worden.
- Die von uns gemachten Beobachtungen in-vitro, lassen sich nicht automatisch auf eventuell vorhandene Gegebenheiten in-vivo übertragen. Von uns in-vitro kultivierte Leukozyten, mittels derer wir Phänotypisierungen und Transkriptionsanalysen vornahmen, könnten in-vivo aufgrund vielfältigerer äußerer Einflussfaktoren anders reagieren, als sie es bei kontrollierten und standardisierten in-vitro Kulturbedingungen taten. Weiterreichende Untersuchungen der Übertragbarkeit unserer Forschungsergebnisse auf IL-26 exprimierende Leukozyten in-vivo sind von Nöten.
- Zudem wurden die in-vitro kultivierten CD4⁺ T-Zellen aus PBMCs negativ selektiert und durch T-Zell-Aktivierungsbeads in Gegenwart von IL-2 aktiviert. Die derart untersuchten CD4⁺ T-Zellen erlauben somit vor allem Aussagen über Memory und Effektor Subpopulationen und weniger über naive CD4⁺ T-Zellen und deren initialen Polarisierungsprozesse in-vivo. Krankheitsspezifische Aussagen über die Polarisierungsprozesse von Naiven hin zu IL-26 exprimierenden T-Zellpopulationen in-vivo lassen sich somit nur indirekt ableiten.

- Für die durch uns gemessenen IL-26 Serumspiegel wurde ein kommerziell erwerbliches IL-26 spezifisches ELISA Kit an unsere Zwecke angepasst (s. 3.6.1). Um niedrigere IL-26 Serumkonzentrationen bei axSpA-Patienten und HCs messbar zu machen, war eine Amplifizierung des Signals mittels Tyramid-Signalamplifikation nötig. Dies bewirkte jedoch für unsere RA-Patienten, dass die gemessenen IL-26 Konzentrationen regelhaft außerhalb der Standardkurve lagen. Etwaige Versuche unspezifische Signale zu blockieren scheiterten und höhere Verdünnungsstufen für RA Proben brachten ebenfalls nicht den gewünschten Erfolg. Somit mussten wir uns darauf einigen, dass wir für RA Proben, die IL-26 Konzentrationen außerhalb des messbaren Bereichs aufwiesen, diese auf den höchsten Wert unserer Standardkurve (2000 pg/ml) festlegten. Somit sind jedoch die IL-26 Serumkonzentrationen um den Bereich von 2000 pg/ml stark gepooled und evtl. die durchschnittliche IL-26 Serumkonzentration für unsere RA-Kohorte als Ganzes falsch bewertet oder gar gänzlich verzerrt.
- Unsere mittels IL-26 Prime Flow Assay und Th17-spezifischem Surface Stain ermittelten FACS-Daten (s. 4.4) sind nur begrenzt aufeinander übertragbar. So konnten wir zwar eine für PsA-Patienten signifikant erhöhte Menge an IL-1-R1+ Th17-Zellen nachweisen und für CD4+ T-Zellen die Transkription von *IL26* im Blut beweisen, jedoch haben wir keinen eindeutigen Nachweis, dass die von uns phänotypisierten IL-1-R1+ Th17-Zellen auch *IL26* transkribieren. Dies ist zwar in der Literatur beschrieben (Weiss, Ma et al. 2019) und wir verwendeten für unser PFA Panel Th17 Surrogat-Marker (CD26/161 und IL-17A), jedoch haben wir keinen Nachweis geführt, dass durch den gewählten Surface Stain phänotypisierte IL-1-R1+ Th17-Zellen auch im PFA Assay IL-26 Produzenten sind. Dies bleibt eine indirekte Schlussfolgerung aus der Zusammenschau aller vorhandenen FACS-Daten und der aktuellen Literatur.
- Eventuell wurden kleine vorhandene statistisch signifikante Gruppenunterschiede durch die auf 30 Probanden limitierte Kohortengröße verdeckt. Es könnte sein, dass z.B. systemische IL-26 Serumunterschiede zwischen axSpA-Patienten und HCs zu Beginn der Erkrankung oder zu einem Zeitpunkt geringer Aktivität derart gering ausfallen, dass diese zwar evtl. statistisch signifikant sind, jedoch nur wenn man eine größere Anzahl an Probanden betrachtet. Es könnte sein, dass die Effektstärke von systemischen IL-26 Konzentrationen von uns überschätzt wurde.
- Die von uns durchgeführten Versuchsreihen wurden sukzessive mit zunehmender Rekrutierung durchgeführt und nicht zu einem Zeitpunkt für alle Proben gleichzeitig. Dies könnte

trotz standardisierten Versuchsbedingungen zu Fehlern in der Messung geführt haben und die Daten verfälscht haben. Zudem wurden teilweise von uns Proben (Zellen und flüssige Blutbestandteile) frisch oder nach vorherigem Einfrieren und erneutem Auftauen untersucht. Wir konnten in Vorversuchen eine signifikante Beeinflussung der resultierenden Ergebnisse hierdurch zwar weitestgehend ausschließen, jedoch ist dies bei der Interpretation unserer Ergebnisse zu berücksichtigen. Teile unserer Daten könnten inkohärent aufgrund abweichender Rahmenbedingungen einzelner Datenpunkte sein.

- Insgesamt ist unser Studienkollektiv mit 120 eingeschlossenen Patienten relativ klein und somit die Aussagekraft unserer Untersuchungen eingeschränkt. Nichtsdestotrotz gibt es bisher in der Literatur keine vergleichbaren Daten für IL-26, die auf ähnlichen Kohortengrößen für differenzierte Krankheitsbilder der SpA basieren. Daher denken wir, dass unsere Daten dennoch von Relevanz sind.
- Die semiquantitativen Analysen an IL-26-IHC Whole Slide Scans wurden mit einem open source plugin für eine frei verfügbare Bilddarstellungssoftware durchgeführt, die nicht dazu in der Lage ist mittels moderner KI-Algorithmen individuelle Zellen zu detektieren und das gemessene Signal nur diesen zuzuweisen. Dies bedeutet, dass die von uns gemessene IL-26 Pixeldichte und -intensität auch Hintergrundsignal (also Pixel, welche keiner zellulären Struktur angehören und sich im Interstitium befinden) undifferenziert miterfasste. Somit lässt sich ohne unabhängige Beurteilung der IL-26 Immunhistochemie durch einen erfahrenen Pathologen nicht sicher sagen, ob das gemessene Signal primär Immunzellen zuzuweisen ist, oder es sich hierbei primär um ein Signal aus dem Interstitium („freies IL-26“) handelt. Zweiteres würde jedoch mit der bereits mehrfach erwähnten Hypothese einer reduzierten IL-26 Clearance in chronisch entzündlich veränderten Gelenken aufgrund der Bindung in NETs zusammenpassen. So gewannen wir auch bei der Betrachtung der Whole-Slide Scans, sowie der Immunfluoreszenz Slides den Eindruck, dass ein nicht unwesentliches Signal vom Interstitium auszugehen schien, welches in den durchgeführten negativ Kontrollen, sowie innerhalb der HC-Kohorte nicht fassbar schien.

6 Zusammenfassung

Zur Entwicklung zielgerichteter und möglichst nebenwirkungsarmer Therapien der SpA bedarf es genauer Kenntnisse der Pathophysiologie der Erkrankung.

Therapeutisch steht aktuell die IL-23/IL-17 Achse im Vordergrund (Shen, Goodall et al. 2009, Australo-Anglo-American Spondyloarthritis, Reveille et al. 2010, Bowness, Ridley et al. 2011, Poddubnyy, Hermann et al. 2014, Baeten, Sieper et al. 2015), wobei jedoch diese Zytokine nur indirekt in die pathophysiologischen Vorgänge der axSpA-typischen Osteoproliferation eingreifen. Erhöhte Spiegel von IL-26 in Serum- und Synovialflüssigkeit wurden bei RA-Patienten und einem Mischkollektiv inflammatorischer Arthritiden, inklusive 5 axSpA- und 4 PsA-Patienten, nachgewiesen (Corvaisier, Delneste et al. 2012). Auch in Gelenksflüssigkeit und Facetengelenken von SpA-Patienten ist IL-26 vorhanden und kann in humanen Osteoblasten Knochenmineralisierung induzieren (Heftdal, Andersen et al. 2017).

Somit könnte IL-26, welches vor allem von „pathogenen“ Th17-Zellen exprimiert wird, eine pathophysiologische Rolle bei der SpA spielen (Wolk, Kunz et al. 2002, Gowhari Shabgah, Abdelbasset et al. 2022). Als Induktoren von IL-26 gelten u.a. IL-23, IL-1 β und TNF α (Wilson, Boniface et al. 2007, Corvaisier, Delneste et al. 2012, Heftdal, Andersen et al. 2017). Setzt man myeloiden Zellen IL-26 aus, produzieren diese wiederum vermehrt IL-1 β , IL-6 und TNF α (Poli, Augusto et al. 2017). IL-26⁺ Th17-Zellen selbst können durch IL-1-R1 näher beschrieben werden (Weiss, Ma et al. 2019), sodass eine positive Feedbackschleife zur Aufrechterhaltung einer chronischen Inflammation vermutet wird (Larochette, Miot et al. 2019).

Wir konnten zeigen (Hammitzsch, Ossadnik et al. 2020, Hammitzsch, Ossadnik et al. 2023, Hammitzsch, Ossadnik et al. 2024), dass im peripheren Synovialgewebe von axSpA- und PsA-Patienten quantitativ mehr IL-26 exprimiert wird, als von HCs und RA-Patienten. Im Synovialgewebe kolokalisiert IL-26 bei axSpA- und PsA-Patienten mit CD68⁺ makrophagen-ähnlichen Synoviozyten. Paradoxerweise weisen jedoch im Vergleich mit HCs, PsA- und RA-Patienten signifikant erhöhte IL-26-Serumspiegel auf, jedoch nicht axSpA-Patienten. Dafür korrelieren bei axSpA-Patienten IL-26 Serumspiegeln und Serum-CRP-Werte positiv miteinander. Wir postulieren, dass sich lokale und systemische IL-26 Produzenten zwischen verschiedenen Krankheitsentitäten teilweise unterscheiden und zudem von dem jeweils vorherrschenden Milieu abhängig sind. Bei axSpA- und PsA-Patienten transkribieren systemisch zirkulierende CD4⁺ T-Zellen *IL26* und die Th17 Surrogat-Marker CD26/CD161 (Maggi, Santarlaschi et al. 2010, Bengsch, Seigel et al. 2012) präzisieren die Phänotypisierung *IL26* transkribierender T-Zellen weiter. Systemisch zirkulierende IL-26⁺ Th17-„rare cells“ sind nach neuesten

Erkenntnissen jedoch nur eine Zwischenstufe auf dem Weg hin zu einem ausdifferenzierten pathologischen Th17-Phänotyp (Fries, Saidoune et al. 2023). Bei PsA-Patienten finden sich im Blut signifikant erhöhte Anteile IL-1-R1+ Th17-Zellen, welche auf einen IL-1 β Stimulus hin IL-26 exprimieren können (Weiss, Ma et al. 2019). In vitro teilen sich CD4+ T-Zellen bzgl. *IL26* und assoziierter Gene Kohorten-unabhängig die zentralen Induktionsfaktoren IL-1 β und IL-23 und es entsteht ein pathologisches, Th17-spezifisches Transkriptionsmuster, während RA-Patienten auf diesen Reiz vermehrt *IL4* als protektiven Faktor zu bilden scheinen (Chomarat, Vannier et al. 1995, Wallis, Cooney et al. 2011, Leipe, Schramm et al. 2014).

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit bekräftigen die Rolle von IL-26 in der Pathophysiologie der Spondylarthritiden, insbesondere durch den erstmaligen Nachweis in peripherem Synovialgewebe von axSpA- und PsA-Patienten (Hammitzsch, Ossadnik et al. 2024). Zunächst bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen, um zu klären, in wieweit CD68+ Makrophagen-ähnliche Synoviozyten IL-26 selbst produzieren oder dieses nur anreichern. Letztlich können dann therapeutische Strategien entwickelt werden, die gezielt IL-26 getriebene Prozesse wie z.B. Osteoproliferation bei der axSpA blockieren.

7 Anhang

7.1 Ergänzende Abbildungen

Abb. 7.1

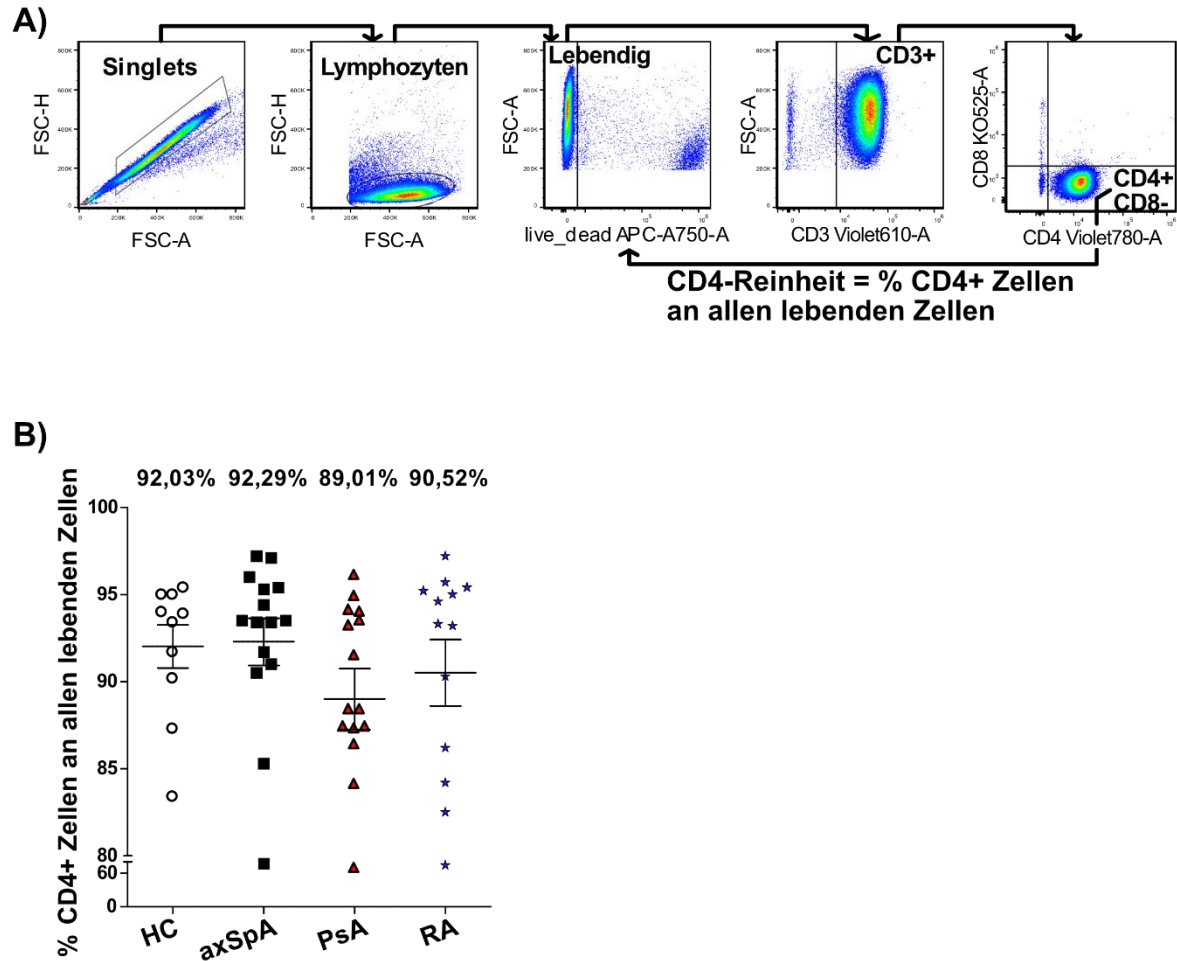


Abbildung 7.1: Aus PBMCs negativ selektierte CD4+ T-Zellen weisen einen hohen Reinheitsgrad auf

(A) Gating-Strategie zur Ermittlung des CD4+ Reinheitsgrades, nach negativer Selektion mittels magnetischer Beads für CD4+ T-Zellen, am Beispiel eines axSpA-Patienten. Der CD4-Reinheitsgrad ergab sich aus dem %-Anteil CD4+ Zellen an allen lebenden Zellen je Probe. (B) Grafische Darstellung der ermittelten CD4 Reinheitsgrade als MW $\pm$ SEM in %, je Kohorte (HC: n = 10; axSpA: n = 15; PsA: n = 15; RA: n = 13). Der grafisch dargestellte Mittelwert ist zudem über der jeweiligen Kohorte noch schriftlich notiert. Die durchschnittliche Reinheit über alle Kohorten hinweg betrug: $90,88 \pm 0,8$ %

Abb. 7.2

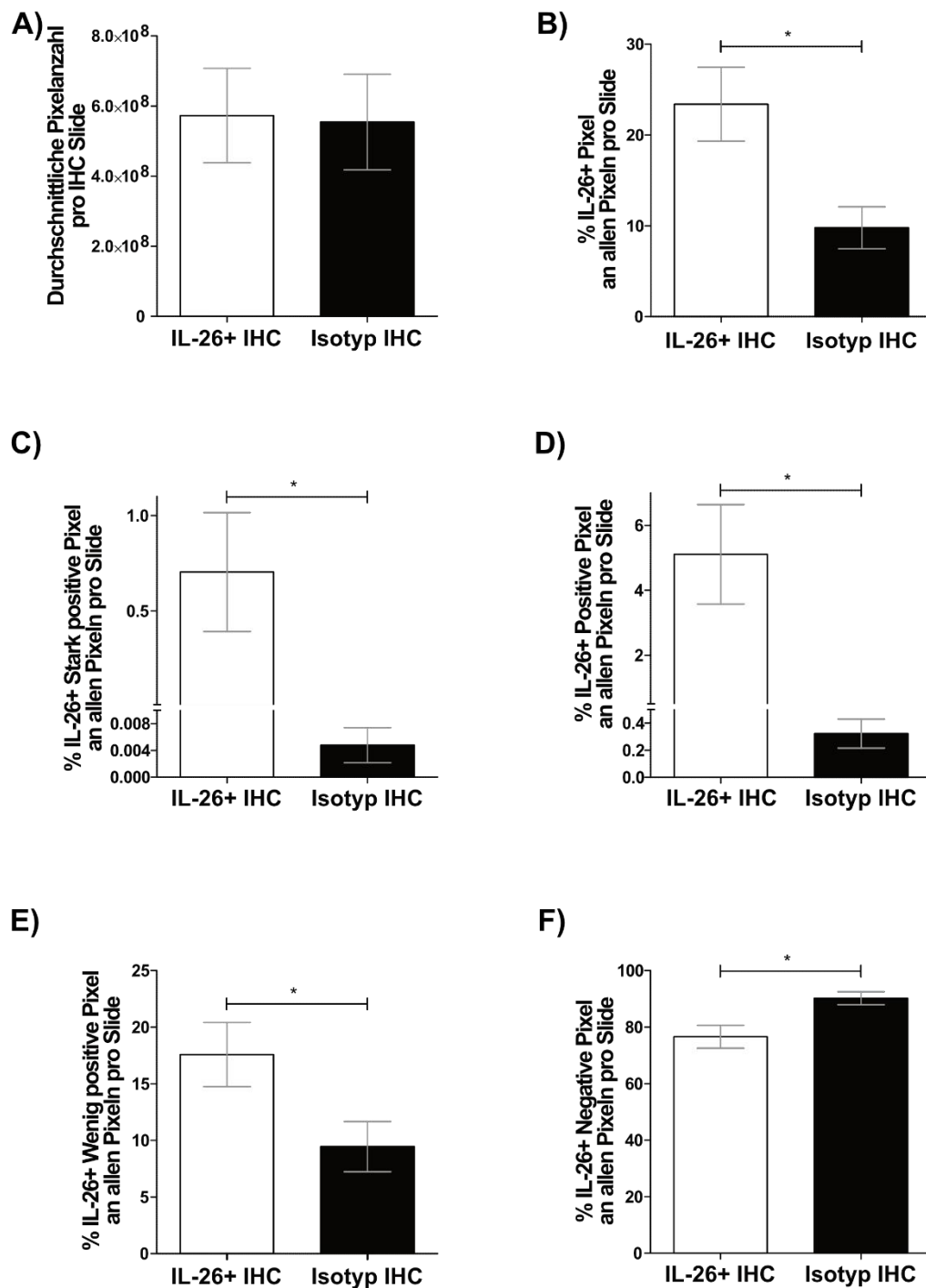


Abbildung 7.2: Überprüfung der Spezifität der IL-26 Färbung in der IHC-Profilier Analyse mittels Isotypkontrollen

(Gegenüberstellung IL-26+ IHC Slides vs. Isotypkontrollslides, jeweils n=6; axSpA: n=4; PsA: n=1; RA: n = 1)

(A) **Mittlere Größe der untersuchten Proben** als MW ± SEM der gesamten Pixelanzahl aller summierten Einzelbilder der jeweiligen Slides pro Gruppe ($p = ns$). (B) **Prozentwert aller IL-26+ Pixel** (Summe der Kategorien Stark positiv, positiv und wenig positiv) bezogen auf alle Pixel aller Einzelbilder der jeweils ausgehenden Whole-Slide Scans, als MW ± SEM ($p^* < 0,05$). (C) – (F) **Gruppenvergleich zwischen IL-26+ IHC und Isotypkontrollen**

aller Pixelintensitäten des IHC-Profilers ($p^ < 0,05$). Als statistischer Test wurde jeweils ein Wilcoxon matched-pairs signed rank Test verwendet.*

Abb. 7.3

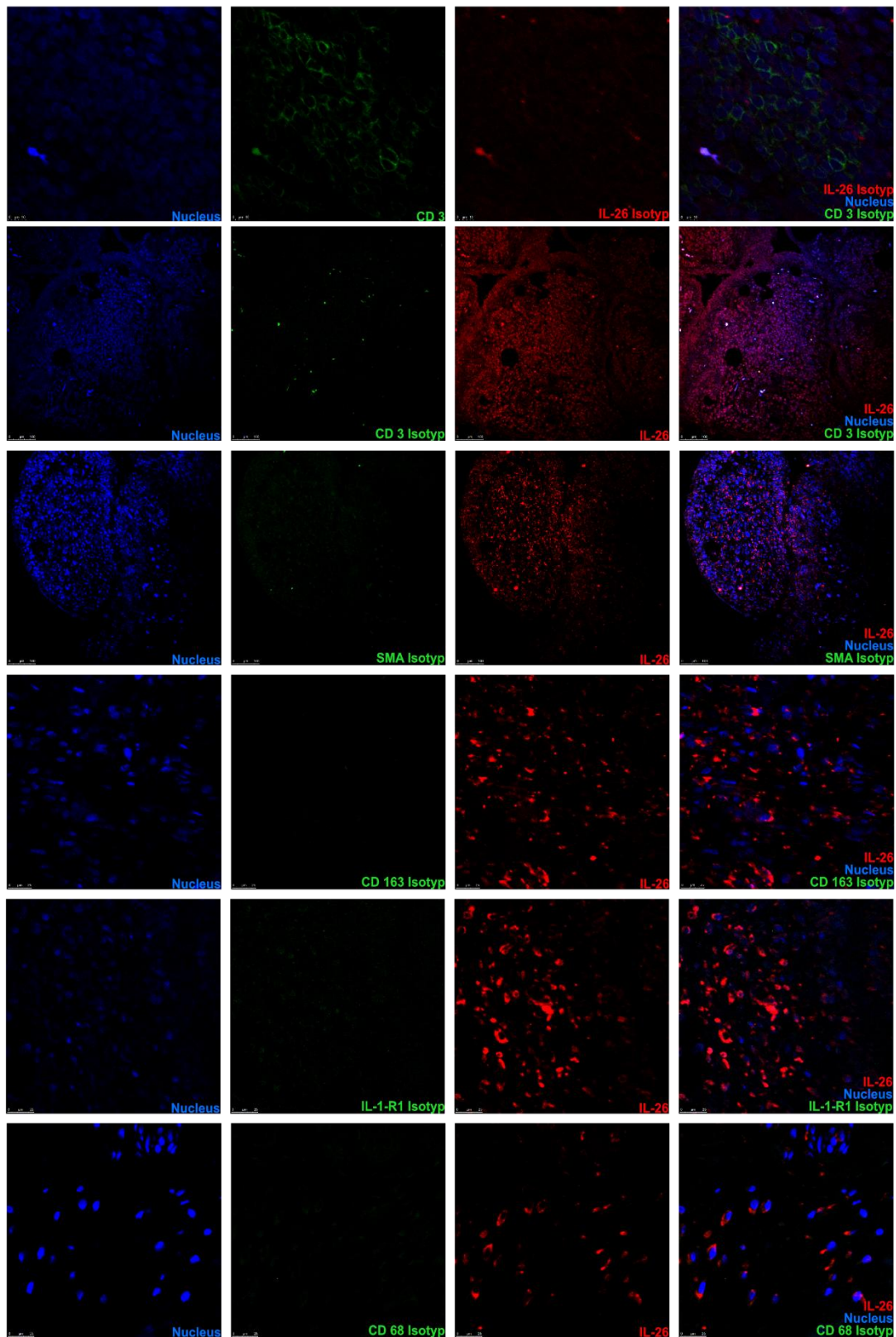


Abbildung 7.3: Nachweis der spezifischen Anfärbung in der Immunfluoreszenz durch Isotypkontrollen

Beispielhafte konzentrationsgleiche Isotypkontrollen aller primären Antikörper (von oben nach unten: anti-IL-26, anti-CD3, anti-SMA, anti-CD163, anti-IL-1-R1 und anti-CD68) an einer axSpA-Synoviaprobe. Es sind jeweils die einzelnen Farbkanäle und ein Overlay dargestellt (von links nach rechts: DAPI-blau, FITC-grün und AF594-rot, Overlay).

Abb. 7.4

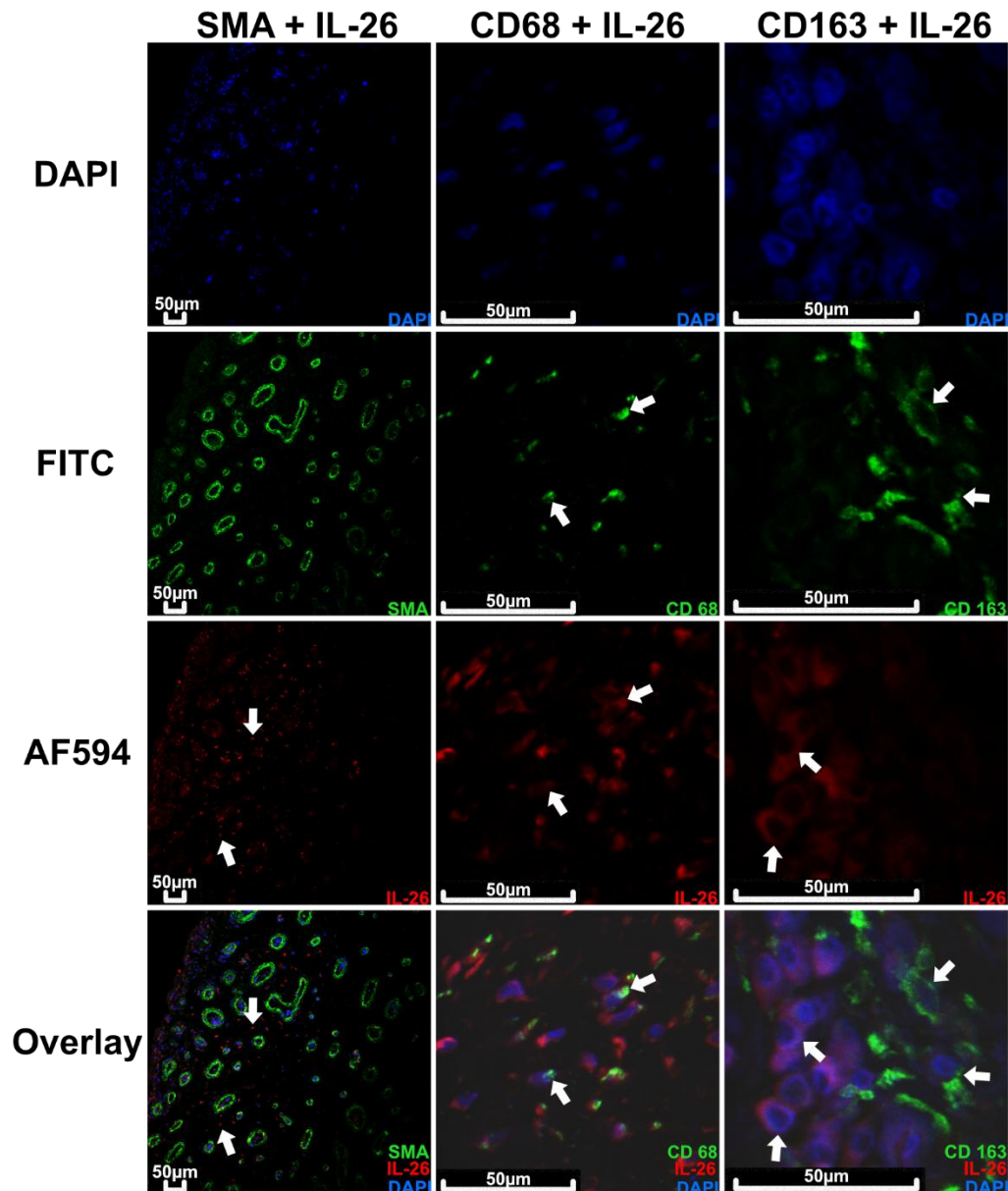


Abbildung 7.4: Beispielhafte Konfokale Immunfluoreszenz einer Synoviaprobe der Entität PsA

Dargestellt sind die Emissionen der markierten Antigene IL-26, SMA, CD163 und CD68 mit ihren zugehörigen Farbkanälen (FITC-grün für SMA/CD163/CD68; AF594-rot für IL26; DAPI-blau für Nuclei) mit Overlay. Weiße Pfeile weisen auf Bereiche von Interesse hin.

7.2 Verzeichnis verwendeter Einwegmaterialien

Verwendete Einwegmaterialien

5ml Polystyrene Round-Bottom Tube with Cell-Strainer Cap, steril
Acetate Folie für Mikrotest Well Platten
BD Vacutainer CPT Tube, NC 1,0ml, FICOLL 2,0ml, steril
BD Vacutainer Multiple Sample Luer Adapter
BD Vacutainer One Use Holder
Biosphere Filter Tips, steril, DNA-/DNase-/RNAse-/PCR inhibitor-/ATP-/Pyrogen-free, low retention, 0,1 - 10 µl
Biosphere Filter Tips, steril, DNA-/DNase-/RNAse-/PCR inhibitor-/ATP-/Pyrogen-free, low retention, 100 - 1000 µl
Biosphere Filter Tips, steril, DNA-/DNase-/RNAse-/PCR inhibitor-/ATP-/Pyrogen-free, low retention, 2 - 20 µl
Biosphere Filter Tips, steril, DNA-/DNase-/RNAse-/PCR inhibitor-/ATP-/Pyrogen-free, low retention, 20 - 200 µl
Biosphere Mikröhre 2,0ml, PP, steril, DNA/DNase/RNase/PCR Inhibitor-/ATP-/Pyrogen-/Endotoxin-frei
BRADY Schwarz auf Weiß Polyester 19,1mm, Etiketten-Rolle
BSG-Pipette mit Skalierung
Cell Strainer 70µm Nylon für Falcon Tubes
CELLSTAR 15ml TUBES, PP, graduert, konischer Boden, steril
CELLSTAR 50ml TUBES, PP, graduert, konischer Boden, steril
CELLSTAR Serologische Pipette, steril, 10ml
CELLSTAR Serologische Pipette, steril, 25ml
CELLSTAR Serologische Pipette, steril, 2ml
CELLSTAR Serologische Pipette, steril, 50ml
CELLSTAR Serologische Pipette, steril, 5ml
Comply Steam Indicator Tape
CryoPure Gefäß 1,6ml, weiß, pyrogenfrei, steril
Disposable Hemocytometer, C-Chip, Neubauer Improved DHC-N01
Disposable scalpel No. 10 pfm
ELISA-Platte, Medium Bind., K
Eppendorf Tubes 5,0 ml
Greiner CELLSTAR® 48 well plate, flat bottom with Lid, nonpyrogenic, steril
Greiner CELLSTAR® 96 well plate, round bottom with Lid, nonpyrogenic, Polystyrene, steril
Injekt Solo Einmalspritze (Luer Solo), 2ml
Kosmetiktücher Strong 100V
LightCycler 480 Multiwell Platte 384, clear
LS Columns
MICRO-TOUCH Coated Handschuhe, Latex, Größe M
MILLEX-GP Syringe Driven Filter Unit, PES 0,22µm, steril

Firma

BD, Heidelberg, Deutschland
Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
BD, Heidelberg, Deutschland
BD, Heidelberg, Deutschland
BD, Heidelberg, Deutschland
Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
BRADY, Egelsbach, Deutschland
Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
NanoEnTek Inc., Südkorea
Feather Safety Razor Co., LTD., Osaka, Japan
Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
Lucart Professional, Lucca, Italien
Roche Diagnostics GmbH, Unterhaching, Deutschland
Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
Ansell, Brüssel, Belgien
Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Omnifix Solo Einmalspritze (Luer Solo), 10ml	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
Original-Perfusor Syringe (Luer Lock), 50ml	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
Parafilm M Verschlussfolie	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Pasteurpipetten, graduert bis 1ml	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
PCR SoftTubes, 0,2ml farblich gemischt, DNA-/DNase-/RNase-frei	Biozym, Wien, Österreich
Probenröhre 75x12mm (FACS), Polystyrol	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,6 ml, farbl.gem., Druckverschluss, DNA-/DNase-/RNase-frei	Biozym, Wien, Österreich
Rotilabo Aluminiumfolie, Stärke 30µm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SafeSeal Gefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäß 1,5ml, PP	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäß 2ml, PP	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäß 2ml, PP	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Safety-Multifly 21G 200mm lang, steril	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette Kalium-EDTA 2,7ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette Membran Adapter, steril	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette Serum-Gel 4,7ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Sterican Standardkanülen, 20G x 2 3/4"	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
Sterican Standardkanülen, 24G x 1"	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
Sterican Standardkanülen, 30G x 1/2"	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
SurPhob Pipettenspitzen, farblos, Niedrig-bindend, DNA-/DNase-/RNase-frei, steril, 10µl kurz	Biozym, Wien, Österreich
SurPhob Pipettenspitzen, farblos, Niedrig-bindend, DNA-/DNase-/RNase-frei, steril, 10µl, extra lang	Biozym, Wien, Österreich
SurPhob Pipettenspitzen, farblos, Niedrig-bindend, DNA-/DNase-/RNase-frei, steril, 1000µl	Biozym, Wien, Österreich
SurPhob Pipettenspitzen, farblos, Niedrig-bindend, DNA-/DNase-/RNase-frei, steril, 1250µl	Biozym, Wien, Österreich
SurPhob Pipettenspitzen, farblos, Niedrig-bindend, DNA-/DNase-/RNase-frei, steril, 200µl	Biozym, Wien, Österreich
Thermo Scientific Menzel Deckgläser 24 x 60 mm, Medite, Stärke 1	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Thermo Scientific Menzel Objektträger 76x26 mm mit Mattrand (20mm), Stärke 1mm, Glas	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Tough Tags Label rolls	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Twist Röhrchen 20ml, 4% gepuffertes Formaldehyd	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Ultra Low Cluster Plate, 6 Well With Lid, Flat Bottom, Ultra Low Attachment, sterile, Polystyrene	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
Thermo Scientific™ Shandon™ Kassette für Gewebeeinbettung	Thermo Fisher Scientific, Deutschland

7.3 Verzeichnis verwendeter Kits

Verwendete Kits

Alexa Fluor 594 Tyramide SuperBoost Kit, Goat Anti-Mouse IgG, 50 Slides
 appliedbiosystems High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit
 DAKO Envision+ System HRP (DAB) (For Use with Mouse Primary Antibodies)
 Human IL-17A ELISA MAX Deluxe Kit
 Human IL-26 (Interleukin 26) ELISA Kit
 Luna Universal Probe qPCR Master Mix
 Miriad Rapid HBc/HIV/HCV Test Kits
 MojoSort Human CD14 Nanobeads, 200 tests
 MojoSort Human CD4 T Cell Isolation Kit, 100 tests
 Nucleospin RNA Isolations Kit

 PrimeFlow RNA Assay Kit
 Qubit RNA HS Assay Kit
 Qubit RNA IQ Assay Kit
 T Cell Activation/Expansion Kit, human

Firma

Thermo Fisher Scientific, Deutschland
 Thermo Fisher Scientific, Deutschland
 Agilent, Stevens Creek Blvd. Santa Clara CA, USA
 Biolegend, San Diego, USA
 Elabscience, Houston TX, USA
 New England Biolabs, Ipswich MA, USA
 medmira, Halifax Nova Scotia, Kanada
 Biolegend, San Diego, USA
 Biolegend, San Diego, USA
 MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
 Thermo Fisher Scientific, Deutschland
 Thermo Fisher Scientific, Deutschland
 Thermo Fisher Scientific, Deutschland
 Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland

7.4 Verzeichnis verwendeter Chemikalien, Reagenzien, Medien

Verwendete Chemikalien/Reagenzien/Medien

1x RBC Lysis Buffer
 2-Phenoxyethanol >99%, zur Synthese
 2-Phenoxyethanol, >99% zur Synthese
 2-Propanol (Isopropanol)
 80% Ethanol zur Desinfektion steriler Arbeitsflächen
 Alkopharm 70, Ethanol 70%, vergällt mit MEK
 Ampuwa Injektions-/infusionslösung
 Antigen Retrieval Puffer (100x Tris-EDTA Puffer, pH 9,0)
 Aqua, Braun Spüllösung
 Aquabator Clean 100x
 Arc negative beads, Compensation Beads
 Arc reactive beads, Compensation Beads
 BD Cytotfix/Cytoperm Fixation und Permeabilization Solution, 2% PFA
 BD Perm/Wash Buffer (10x Lösung)
 Biotinyl Tyramide, Reinheit >98%
 Bor-Säure 99%, p.a.
 Bovine Calf Serum, steril
 Bovine Serum Albumin, >98%
 Buffy Coats
 Cutasept F Haut-Desinfiziens, Propan-2-ol haltig
 CytotFLEX Daily QC Fluorospheres
 CytoFLEX Daily QC Fluorospheres
 CytoFLEX Sheath Fluid
 Dimethyl Sulfoxide >99,7%, steril-filtriert
 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), modifiziert, ohne Calciumchlorid und Magnesiumchlorid, steril, Endotoxin frei
 Essigsäure 100%
 Essigsäure 100%, p.a.
 Ethanol 100%
 Ethanol 96%, vergällt mit MEK
 Ethanol absolut (100%), vergällt mit MEK
 Ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA), ACS Reagenz
 FlowClean Cleaning Agent
 Flüssig Stickstoff für Stickstoff-Tank
 Formaldehyd 38%, wässrige Lösung
 Glycin 99%
 Heteroblock Blocking Lösung
 IC Fication Buffer
 Incidin Plus
 Incuwater Clean BC
 Invitrogen ProLong Diamond Antifade Mountant

Firma

eBioscience, San Diego, USA
 Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Apotheke, Klinikum München Rechts der Isar, Deutschland
 L. Brüggemann GmbH & Co. KG, Heilbronn, Deutschland
 Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Neufahrn bei Freising, Deutschland
 Abcam, Cambridge, UK
 B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
 AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
 Thermo Fisher Scientific, Deutschland
 Thermo Fisher Scientific, Deutschland
 BD, Heidelberg, Deutschland
 BD, Heidelberg, Deutschland
 Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
 Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Blutspendendienst des Bayerischen Roten Kreuzes gemeinnützige GmbH, München, Deutschland
 BODE CHEMIE HAMBURG, Hamburg, Deutschland
 Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
 Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
 Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Merck, Darmstadt, Deutschland
 Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
 Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
 Air Liquide, Paris, Frankreich
 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Omega Biologicals Inc., Bozeman MT, USA
 eBioscience, San Diego, USA
 ECOLAB Deutschland GmbH, Monheim am Rhein, Deutschland
 AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
 Thermo Fisher Scientific, Deutschland

Kohlendioxid 3.5, 99,95 Vol.%	Sauerstoffwerk Friedrichshafen GmbH, Friedrichshafen, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver, blotting-grade	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge 1M	Merck, Darmstadt, Deutschland
Normal Donkey Serum 60 µg/ml	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania, USA
Normal Goat Serum, 60 mg/ml	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania, USA
Normal Mouse Serum Control	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
NU Page MES/SDS Running Buffer	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
NU Page MOPS/SDS Running Buffer	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
NU Page Transfer Buffer	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Nuclease-Free Water	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
PBS, 10,2 g pH 7,2	Euroimmun, Lübeck, Deutschland
Penicillin-Streptomycin, steril-filtriert, 10,000IU Penicillin und 10mg Streptomycin/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Pierce High Sensitivity NeutrAvidin - HRP, Conc. 1 mg/ml	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Pierce Protein-Free Blocking Buffer (PBS)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
rDNase 90-100%	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
RNase-Free Water	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RNaseZap Lösung zur RNase-Dekontaminierung	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Roti-Histokott II, synthet. Einschlussmittel für die Histologie, Dichte 0,95	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI-1640 Medium, modifiziert mit 20mM HEPES and L-glutamine, ohne sodium bicarbonate, steril-filtriert	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salzsäure 25%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Saures Hämalaun nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Serum-Free Protein Block	Agilent, Stevens Creek Blvd. Santa Clara CA, USA
Sodium Hydroxid Lösung (Natronlauge) 2M	Merck, Darmstadt, Deutschland
Softaskin milde Waschlotion	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
Sterillium® classic pure Hände-Desinfektionsmittel	BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
TE Buffer pH 8.0, 0,2µl filtered	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
trend IT UP Double Volume & Shine Nail Polish	DM-Drogerie Markt, Karlsruhe, Deutschland
Tris Acetate -EDTA Puffer Lösung, 10x, nicht-steril	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris Acetate Puffer Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBST-10x)	Cell Signaling Technology, Danvers Massachusetts, USA
Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBST-10x)	Cell Signaling Technology, Danvers Massachusetts, USA
Tris EDTA Puffer Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypan Blau Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
UltraComp eBeads, Compensation Beads	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Vectashield Mounting Medium mit DAPI	VECTOR LABORATORIES, INC., Burlingame CA, USA
Wasser doppelt destilliert	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid, 50 Gew.% Lsg. In Wasser	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Xylol Pharm. Helv. VI (Isomeregemisch), 99,9%	Hedinger, Stuttgart, Deutschland

7.5 Verzeichnis verwendeter Primer für qPCR

Gen	Firma	Sequenz Probe (5'-3')	Sequenz Forward Primer (5'-3')	Sequenz Reverse Primer (5'-3')	Konzentration Probe	Konzentration Primer
<i>IL4</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	[6FAM]TGTGCCGGCAA CTTT- GTCCACGGA[OQA]	CCTCTGTT- CTT- CCTGCTAGC	GAGTCTT- CTGCTCTGT- GAGG	5µM	10µM
<i>RORC</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	[6FAM]AGCTTCG- GAGCCTGTG- TAGCCAGCA[OQA]	TCTCTGCAA GACTCA- TCGC	TTGTAG- AGTGGAGG- GAAAGC	5µM	10µM
<i>IL22</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	[6FAM]GGGTGGATT- CCAAATGAAC- CCCTGCGT[OQA]	CAATTAGAT- GCCCCAAAG CG	CAAAAGTGG CATTGGTT- TCC	5µM	10µM
<i>IL17A</i>	Integrated DNA Technologies, Inc., Iowa, USA	[6FAM]ACCTCA- TTG[ZEN]GTGTCA- CTGCTACTGC[3IAB- kFQ]	TCA- TCCATCCCC AGTTGATTG	TGATT- CCTGCCTT- CACTATGG	5µM	10µM
<i>ACTB</i>	Integrated DNA Technologies, Inc., Iowa, USA	[6FAM]TCA- TCCATG[ZEN]GTGAGC TGGCGG[3IABkFQ]	ACAGAGCCT CGCCTTTG	CCTT- GCACAT- GCCGGAG	5µM	10µM
<i>IFNG</i>	Integrated DNA Technologies, Inc., Iowa, USA	[6FAM]TCGG- TAACT[ZEN]GACTT- GAATGTCCAACGC[3I- ABkFQ]	GCAACAAAA AGAAACGA- GATGAC	CGACAGTT- CAGCCATCA- CTT	5µM	10µM
<i>RPL13A</i>	Integrated DNA Technologies, Inc., Iowa, USA	[6FAM]AG- GTCCTGG[ZEN]TGCTT- GATGGTCG[3IABkFQ]	CGAAGAT- GGCG- GAGGTG	TACTTCA- CTGTT- TAGCCACGA T	5µM	10µM
<i>IL26</i>	Integrated DNA Technologies, Inc., Iowa, USA	[6FAM]CCACTG- TAT[ZEN]TTCCTGTGC TTCATCAGCT[3IAB- kFQ]	ACGCTTT- GTGGAG- GACTTTC	TGGCTTTG- TAGATT- CCTTTGTTTC	5µM	10µM
<i>IL1RI</i>	Integrated DNA Technologies, Inc., Iowa, USA	[6FAM]TTGCCTGCT[ZE N]TGAAG- GAACAGTGC[3IABkFQ]	CCTTTCCAC- CTGCTTT- CTCC	CTGGCTG- TAGTCTGTGT GTC	5µM	10µM

7.6 Verzeichnis verwendeter Antikörper, Fluorophore und Sonden

Verwendete Antikörper, Fluorophore und Sonden

Alexa Fluor 488, anti-human CD196 (CCR6), Klon G034E3, Conc. 200µg/ml
 Alexa Fluor 700, anti-human IFN-γ, Klon B27, Conc. 200µg/ml
 anti-hIL-1-R1 (MAB 269), Purified Mouse Monoclonal igG, Clone 35730
 anti-hIL-26/AK155 (BAF1375), Biotinylated Affinity Purified Goat IgG
 anti-hIL26/AK155 (MAB 1375), Purified Mouse Monoclonal IgG, Clone 197505
 anti-hIL26/AK155 (MAB 13751), Purified Mouse Monoclonal IgG, Clone 510414
 APC, anti-human CD194 (CCR4), Klon L291H4, Conc. 50µg/ml
 Brilliant Violet 421, anti-human CD161, Klon HP-3G10, Conc. 100µg/ml
 Brilliant Violet 510, anti-human CD3, Klon SK7, Conc. 80µg/ml
 Brilliant Violet 510, anti-human CD8a, Klon RPA-T8, Conc. 100µg/ml
 Brilliant Violet 605, anti human CD4, Klon OKT4, Conc. 100µg/ml
 Brilliant Violet 605, anti-human CD3, Klon OKT3, Conc. 50µg/ml
 Brilliant Violet 605, anti-human CD4, Klon RPA-T4, Conc. 100µg/ml
 Brilliant Violet 785, anti-human CD183 (CXCR3), Klon G025H7, Conc. 160µg/ml
 Brilliant Violet 785, anti-human CD4, Klon RPA-T4, Conc. 80µg/ml
 CD163 monoclonal mouse-anti-human IgG1, Klon EDHU-1, Conc. 1mg/ml
 CD3D monoclonal rabbit-anti-human igG , Klon EP4426, Conc. 116µg/ml
 CD68 monoklonal rabbit-anti-human IgG, Klon D4B9C, Conc. 292,0µg/ml
 ChromePure Bovine IgG, whole molecule, Conc. 11,4 mg/ml
 eBioscience Fixable Viability Dye eFluor 780
 ECD, anti-human CD8, Klon SFC121Thy2D3
 FITC, anti-human IL17A, Klon eBio64DEC1, Conc. 25µg/ml
 Goat anti-mouse FITC Antikörper für IF
 Goat anti-rabbit FITC Antikörper für IF
 Interleukin 26 PrimeFlow Target Probe, human
 Monoclonal Mouse anti-human Smooth Muscle Actin IgG2A, Klon 1A4, 70 mg/L
 Monoclonal mouse-anti-human Isotype IgG1 (G3A1)
 Monoclonal mouse-anti-human Isotype IgG2b (MAB 0042), Clone: 73009
 Mouse IgG2a kappa Isotyp, Klon eBM2a, 0,5 mg/ml
 Normal Rabbit igG Control (AB-105-C), Purified Rabbit IgG
 PE, anti-human CD3, Klon UCHT1, Conc. 100µg/ml
 PE, anti-human IL-1-R1, Klon FAB269F
 PE/Cy7, anti-human CD26, Klon BA5b, Conc. 100µg/ml
 PerCP/Cyanine5.5, anti-human CD45RO, Klon UCHL1, Conc. 200µg/ml
 PrimeFlow Label Probes, Alexa Fluor 647
 PrimeFlow RNA Assay Compensation Control Alexa Fluor 647
 rhIL-26 (dimer), recombinant human (E coli-derived)

Firma

Biolegend, San Diego, USA
 BD, Heidelberg, Deutschland
 R&D Systems, Minneapolis, USA
 R&D Systems, Minneapolis, USA
 R&D Systems, Minneapolis, USA
 R&D Systems, Minneapolis, USA
 Biolegend, San Diego, USA
 Biolegend, San Diego, USA
 Biolegend, San Diego, USA
 Biolegend, San Diego, USA
 Biolegend, San Diego, USA
 Biolegend, San Diego, USA
 Biolegend, San Diego, USA
 Biolegend, San Diego, USA
 Biolegend, San Diego, USA
 Biolegend, San Diego, USA
 Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
 Abcam, Cambridge, UK
 Cell Signaling Technology, Danvers Massachusetts, USA
 Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Pennsylvania, USA
 Thermo Fisher Scientific, Deutschland
 Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
 Thermo Fisher Scientific, Deutschland
 Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
 Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
 Thermo Fisher Scientific, Deutschland
 Agilent, Stevens Creek Blvd. Santa Clara CA, USA
 Cell Signaling Technology, Danvers Massachusetts, USA
 R&D Systems, Minneapolis, USA
 Thermo Fisher Scientific, Deutschland
 R&D Systems, Minneapolis, USA
 Biolegend, San Diego, USA
 R&D Systems, Minneapolis, USA
 Biolegend, San Diego, USA
 Biolegend, San Diego, USA
 Thermo Fisher Scientific, Deutschland
 Thermo Fisher Scientific, Deutschland
 R&D Systems, Minneapolis, USA

7.7 Verzeichnis verwendeter Zytokine und Stimulantien

Verwendete Zytokine und Stimulantien

12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate (PMA), >98% Reinheit
 BD GolgiPlug, Brefeldin A -haltig, Protein Transport Inhibitor
 BD GolgiStop, Monensin Lösung, Protein Transport Inhibitor
 Ionomycin Calcium Salz, >98% Reinheit, Quelle: Streptomyces conglobatus
 LPS-B5 Ultrapure, TLR4 Aktivität: 100 pg - 1 µg/ml, Quelle_ E.coli
 Rekombinantes IFN-γ , human, >98% Reinheit, Quelle: E.coli
 Rekombinantes Interleukin 1β, human, >98% Reinheit, Quelle: E.coli
 Rekombinantes Interleukin 2, human, >98% Reinheit, Quelle: E.coli
 Rekombinantes Interleukin 23, human, >95% Reinheit, Quelle: (BTI-Tn-5B1-4)
 Hi-5 Insect cells
 Rekombinantes Interleukin 4, human, >98% Reinheit, Quelle: E.coli
 Rekombinantes Interleukin 6, human, >98% Reinheit, Quelle: E.coli
 Rekombinantes Interleukin 7, human, >98% Reinheit, Quelle: E.coli
 Rekombinantes TNFalpha, human, >98% Reinheit, Quelle: E.coli
 Staphylococcal enterotoxin B, >98% Reinheit, Quelle: Staphylococcus aureus

Firma

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 BD, Heidelberg, Deutschland
 BD, Heidelberg, Deutschland
 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 InvivoGen Europe, Toulouse, Frankreich
 PeproTech Germany, Hamburg, Deutschland
 PeproTech Germany, Hamburg, Deutschland
 PeproTech Germany, Hamburg, Deutschland
 PeproTech Germany, Hamburg, Deutschland
 PeproTech Germany, Hamburg, Deutschland
 PeproTech Germany, Hamburg, Deutschland
 PeproTech Germany, Hamburg, Deutschland
 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 PeproTech Germany, Hamburg, Deutschland
 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

7.8 Verzeichnis verwendeter Geräte

Verwendete Laborgeräte

Binokuläres Mikroskop, MOD.XDS-1
 Biologische Sicherheitswerkbank Klasse II, Typ HS12
 BRADY BMP 21-PLUS tragbarer Etikettendrucker
 C1000 Touch Thermal Cycler
 Corning Lambda Plus Multi-channel Pipettor, 12 Kanäle, 50-300µl
 Corning Lambda Plus Multi-channel Pipettor, 8 Kanäle, 50-300µl
 Corning Lambda Plus Multi-channel Pipettor, 8 Kanäle, 5-50µl
 Dräger X-am 5000 Gasmessgerät
 Dräger X-am 5000, Gasmessgerät
 Duomax 1030 (5° Neigungswinkel), Schüttel- & Mischgerät
 Durchflussszytometer CytoFLEX
 Durchflussszytometer CytoFLEX LX
 Durchflussszytometer CytoFLEX S
 Einhand Venenstauer
 eppendorf Mikrozentrifuge 5424 R
 eppendorf Research Pipette 10µl
 eppendorf Research Pipette 200µl
 Fisherbrand Traceable Pocket-Size Thermometer mit Type-K probe mit Beaded sensor
 Freezing container, Nalgene, "Mr. Frosty"
 GFL 1052 Paraffin-Streckbad
 H+p Varioklav Dampfsterilisator
 Hamamatsu C10730-12 Nanozoomer 2.0RS
 HERAcell 150, Inkubator
 Heraeus Multifuge 3L-R, Zentrifuge
 Heratherm IGS60 Inkubator
 IKA Janke & Kunkel RCO Magnetrührer
 Julabo SW 21 Wasserbad
 K SERIES Cryostorage Systems, Stickstofftank, Model 10K
 Kirsch Froster 520 -20°C Kühlschrank
 Konfokalmikroskop Leica SP5
 Leica RM2145 Mikrotom
 Liebherr Premium 4°C Kühlschrank
 MACS MultiStand für MACS Separationssysteme
 Manitowoc Flockeneisbereiter UFP0244A
 Mikroliter Pipette Corning 0,1 - 2 µl
 Mikroliter Pipette Corning 0,1-2 µl
 Mikroliter Pipette Corning 0,5 - 10 µl
 Mikroliter Pipette Corning 100-1000 µl
 Mikroliter Pipette Corning 10-100 µl
 Mikroliter Pipette Corning 2 - 20 µl

Firma

Exacta+Optech GmbH, München, Deutschland
 Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
 BRADY, Egelsbach, Deutschland
 Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
 Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
 Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
 Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
 Dräger Safety AG & Co. KGaA, Lübeck, Deutschland
 Dräger Safest AG & Co. KGaA, Lübeck, Deutschland
 Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Deutschland
 Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
 Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
 Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
 W.Söhngen GmbH, Taunusstein, Deutschland
 Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
 Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
 Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
 Thermo Fisher Scientific, Deutschland
 Thermo Fisher Scientific, Deutschland
 Lauda-Gesellschaft für Labortechnik GFL, Burgwedel, Deutschland
 HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
 Hamamatsu Photonics K.K., System Division, Hamamatsu City, Japan
 Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
 Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
 Thermo Fisher Scientific, Deutschland
 Janke & Kunkel KG, Staufen, Deutschland
 JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
 Worthington Industries, Columbus (Ohio), USA
 Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, Deutschland
 Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie, Wetzlar, Deutschland
 GMI, Bunker Lake Blvd. Ramsey MN, USA
 Liebherr, Bulle FR, Schweiz
 Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
 Kälte-Berlin, Berlin, Deutschland
 Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
 Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
 Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
 Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
 Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
 Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande

Mikroliter Pipette Corning 20-200 µl	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
Mikroliter Pipette Eppendorf 0,5-10µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Mikroliter Pipette eppendorf Research plus 0,5 - 10 µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Mikroliter Pipette eppendorf Research plus 100 - 1000 µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Mikroliter Pipette eppendorf Research plus 10-100 µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Mikroliter Pipette eppendorf Research plus 20 - 200 µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Minizentrifuge FVL-2400N Combi-Spin	biosan Medical-Biological Research & Technologies, Riga, Lettland
MojoSort Magnet (Zell-Separations-Magnet)	Biolegend, San Diego, USA
Multiskan FC Mikrotiterplatten-Photometer	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
neoLab Eisbad 1-6031	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
neoLab Vortex Mixer 7-2020	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Olympus BX40 Fluoreszenz Durchlichtmikroskop	Olympus Europa GmbH, München, Deutschland
pH-/mV-/°C-Messgerät, Tischmodell, pHenomenal® pH 1100L	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Phoenix Instrument RSM-10HP Heizplatte	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Pipettierhelfer FALCON, Motorisierte Pipette für serolog. Pipetten mit LCD Anzeige	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
Präzisionswaage Kern GS4100-2	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Qubit 4 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Sartorius Präzisionswaage 361F	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Simport M920 StainTray 20 Slides Staining System	Simport, Bernard-Pilon Beloeil QC, Kanada
Spectrafuge Mini	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Stripettor Ultra Pipetten Controller, Motorisierte Pipette für serolog. Pipetten	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
Stuart Mikroliter Platten Rüttler SSM5	Cole-Parmer, Staffordshire, England
Stuart Rotator SB2	Cole-Parmer, Staffordshire, England
Thriller Thermo-Inkubationsmischer	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ultra Low Temperature Freezer -86°C, Model 700 Series	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Vortex Mixer S1101233	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande

7.9 Verzeichnis verwendeter Programme

Affinity Designer	Ver. 1.10.5.1342	Serif, West Bridgeford, UK
CytExpert	Ver. 2.3.1.22	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Endnote X9	Build 13018	Clarivate Analytics, London, UK
FlowJo	Ver. 10.8.1	Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, USA
GraphPad Prism	Ver. 5.03	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ	Ver. 1.52a	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Leica Application Suite Advanced Fluorescence Lite	Ver. 2.6.0 Build 7266	Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Deutschland
LightCycler 480	Ver. 1.5.1.62 SP2	Roche Diagnostics GmbH, Unterhaching, Deutschland
Microsoft Office Excel	Ver. 2206	Microsoft Corporation, Redmond WA, USA
Microsoft Office Word	Ver. 2206	Microsoft Corporation, Redmond WA, USA
NDP.scan	Ver. 2.5.86	Hamamatsu Photonics K.K., System Division, Hamamatsu City, Japan
NDP.view	Ver. 2.3.1	Hamamatsu Photonics K.K., System Division, Hamamatsu City, Japan
nQuery Advisor	Ver. 7.0	Statcon GmbH, Witzenhausen, Deutschland
BioRender	Online-Programm	BioRender Customer Service 49 Spadina Ave. Ste 200, Toronto, Ontario M5V 2J1, https://www.biorender.com

7.10 Verzeichnis teilnehmender Rekrutierungsstandorte und Praxen

Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

Klinik für Nephrologie, Ismaninger Straße 22, 81675 München, Deutschland

Chefarzt Univ. Prof. Dr. med Dr. h.c. Uwe Heemann

Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Ismaninger Straße 22, 81675 München, Deutschland

Chefarzt Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger von Eisenhart-Rothe

Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

Gewebebank des Instituts für Pathologie und Pathologische Anatomie, Trogerstraße 18, 81675 München, Deutschland

Ärztliche Leiterin der Gewebebank PD Dr. Julia Slotta-Huspenina

Waldburg-Zeil Kliniken Oberammergau

Abteilung für Rheumaorthopädie und Handchirurgie, Hubertusstraße 40, 82487 Oberammergau, Deutschland

Chefarzt Dr. med Martin Arbogast

Endokrinologikum München

Zentrum für Hormon- und Stoffwechselerkrankungen, Promenadeplatz 12, 80333 München, Deutschland

Dr. med Franziska Wiesent, Dr. med. univ. Helga Merwald-Fraenk

Rheuma Zentrum Bad Aibling – Erding

Praxis Erding, Gestütring 19, 85435 Erding, Deutschland

PD Dr. med Matthias Witt

Botnar Research Centre, Nuffield - Bowness Group | Immunology of Ankylosing Spondylitis

Department of Orthopaedics, Rheumatology and Musculoskeletal Sciences, Windmill Road, Oxford OX3 7LD, United Kingdom

Group leader Prof. MD PhD Paul Bowness

7.11 Förderung der Promotion durch das Peter-Scriba Promotionsstipendium

Diese Dissertation wurde im Rahmen des Peter Scriba-Promotionsstipendiums durch die Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin von April 2020 bis April 2023 gefördert (DGIM 2024).

Die Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin e.V. (DGIM) fördert den wissenschaftlichen Nachwuchs jährlich mit bis zu 10 Peter-Scriba-Promotionsstipendien. Unter Berücksichtigung aller Schwerpunkte aus der Inneren Medizin werden anspruchsvolle, arbeitsintensive und wissenschaftlich hochwertige (experimentelle) Promotionsarbeiten mit klinisch orientiertem Bezug unterstützt.

Der Förderumfang beträgt hierbei 1.000€ monatlich, über den Zeitraum eines Semesters (April - September 2020). Zudem wird eine finanzielle Unterstützung für Teilnahme(n) an Kongressen, die in unmittelbarem Zusammenhang mit der Präsentation von Ergebnissen der Promotionsarbeit stehen oder die für die Bearbeitung der Promotionsarbeit einen belegbaren Mehrwert darstellen, geleistet. Die Gesamtförderung beträgt max. 10.000€.

Alle Promotionsstipendiaten präsentieren ihre Abschlussarbeit nach 2-3 Jahren im Rahmen der "Best of DGIM-Symposien" auf dem Jahreskongress der DGIM in einem max. 15-minütigen Vortrag. Zudem ist eine Posterpräsentation im Rahmen des Kongresses vorgesehen.

Eine live Powerpoint-Präsentation der Ergebnisse dieser Arbeit fand am 23.04.2023 im Rahmen des 129. DGIM-Kongress in Wiesbaden während der Sitzung „Best of DGIM – Spitzenforschung in der Inneren Medizin (Promotionsstipendien)“ unter der ID-Nr. 55672 statt. Zudem wurden Teile diese Arbeit in diesem Zuge auch im Rahmen eines Posterbeitrages unter der Nr. BoD11 während der „Best-of-DGIM-Sitzungen“ in abgewandelter Form temporär ausgestellt.

7.12 Publikationen im Rahmen dieser Dissertation

Teile dieser Doktorarbeit sind bereits im Rahmen zweier Poster- und Livebeiträge in abgewandelter Form veröffentlicht worden. Zudem erfolgte, nach Einreichung am 14.12.2023 und anschließendem Peer-Review Prozess bis zum 01.04.2024, am 10.05.2024 eine Publikation der Ergebnisse dieser Arbeit im Open-Access Journal *Frontiers in Immunology* als Original research article mit geteilter Erstautorenschaft.

Originalposter und Live-Vortrag

Lokale Produktion von Interleukin-26 in ankylosierender Spondylitis und Psoriasisarthritis

Hammitzsch A., Ossadnik A.*, Merwald-Fraenk H., Witt M., Wiesent F., Mühlhofer H., Bowness P., Arbogast M., Schmaderer C., Moog P.*

48. Deutscher Rheumatologiekongress 09. September, 2020 (DOI: 10.3205/20dgrh033)

* geteilte Erstautorenschaft

Originalposter und Live-Vortrag

Die Rolle von Interleukin 26 in der angeborenen und adaptiven Immunität bei der Spondylarthritis

Ossadnik A., Hammitzsch A.*, Merwald-Fraenk H., Witt M., Wiesent F., Mühlhofer H., Bowness P., Arbogast M., Schmaderer C., Moog P.*

129. DGIM-Kongress 23. April, 2023 (Powerpoint-Vortrag und temporäre Poster-Ausstellung)

* geteilte Erstautorenschaft

Wissenschaftlicher Originalartikel

Increased interleukin-26 in the peripheral joints of patients with axial spondyloarthritis and psoriatic arthritis, co-localizing with CD68-positive synoviocytes

Hammitzsch A.#, Ossadnik A.*, Bachmann Q., Merwald-Fraenk H., Lorenz G., Witt M., Wiesent F., Mühlhofer H., Simone D., Bowness P., Heemann U., Arbogast M., Moog P.* and Schmaderer C.**

* geteilte Erst- bzw. Letztautorenschaft

korrespondierender Autor

Frontiers in Immunology, Original Research Article, Vol. 15 – 2024, Publiziert am 10.05.2024
(Doi: 10.3389/fimmu.2024.1355824)

8 Publikationslizenz Grafisches Abstrakt



49 Spadina Ave. Suite 200
Toronto ON M5V 2J1 Canada
www.biorender.com

Confirmation of Publication and Licensing Rights

April 8th, 2024
Science Suite Inc.

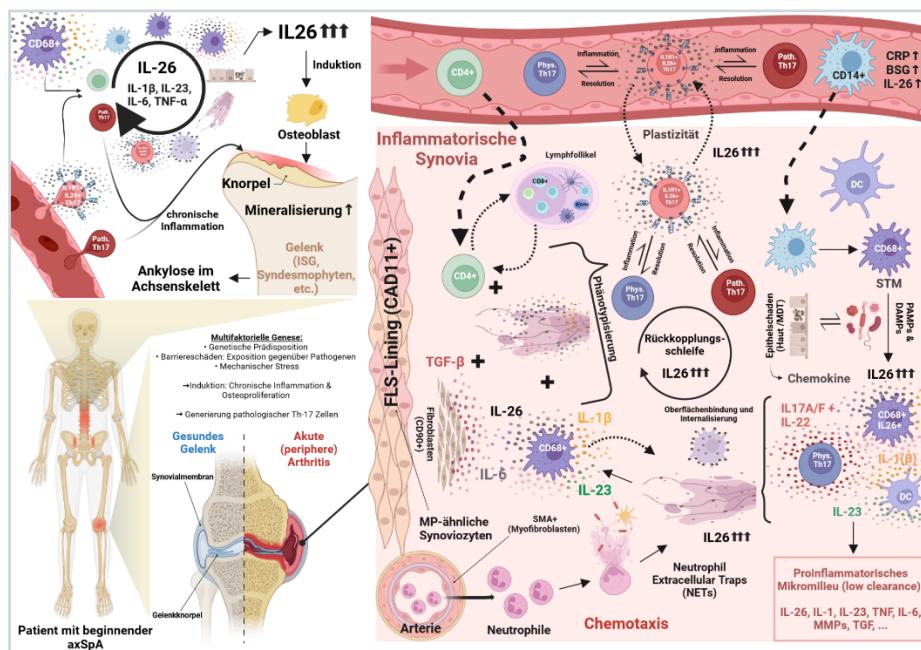
Subscription: Individual
Agreement number: UX26OBSF77
Journal name: Die Rolle von Interleukin 26 in der angeborenen und adaptiven Immunität bei der Spondylarthritis - Dissertationsschrift TUM MGC

To whom this may concern,

This document is to confirm that Andreas Ossadnik has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

9 Literaturverzeichnis

Aggarwal, S., N. Ghilardi, M. H. Xie, F. J. de Sauvage and A. L. Gurney (2003). "Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17." *J Biol Chem* **278**(3): 1910-1914.

Ahern, P. P., C. Schiering, S. Buonocore, M. J. McGeachy, D. J. Cua, K. J. Maloy and F. Powrie (2010). "Interleukin-23 Drives Intestinal Inflammation through Direct Activity on T Cells." *Immunity* **33**(2): 279-288.

Albrecht, K., S. Binder, K. Minden, D. Poddubnyy, A. C. Regierer, A. Strangfeld and J. Callhoff (2023). "Systematisches Review zur Schätzung der Prävalenz entzündlich rheumatischer Erkrankungen in Deutschland." *Zeitschrift für Rheumatologie*.

Alivernini, S., L. MacDonald, A. Elmesmari, S. Finlay, B. Tolusso, M. R. Gigante, L. Petricca, C. Di Mario, L. Bui, S. Perniola, M. Attar, M. Gessi, A. L. Fedele, S. Chilaka, D. Somma, S. N. Sansom, A. Filer, C. McSharry, N. L. Millar, K. Kirschner, A. Nerviani, M. J. Lewis, C. Pitzalis, A. R. Clark, G. Ferraccioli, I. Udalo, C. D. Buckley, E. Gremese, I. B. McInnes, T. D. Otto and M. Kurowska-Stolarska (2020). "Distinct synovial tissue macrophage subsets regulate inflammation and remission in rheumatoid arthritis." *Nat Med* **26**(8): 1295-1306.

Anagnostopoulos, I., E. Zinzaras, I. Alexiou, A. A. Papathanasiou, E. Davas, A. Koutroumpas, G. Barouta and L. I. Sakkas (2010). "The prevalence of rheumatic diseases in central Greece: a population survey." *BMC Musculoskelet Disord* **11**: 98.

Anuradha, R., P. J. George, L. E. Hanna, P. Kumaran, V. Chandrasekaran, T. B. Nutman and S. Babu (2014). "Expansion of parasite-specific CD4+ and CD8+ T cells expressing IL-10 superfamily cytokine members and their regulation in human lymphatic filariasis." *PLoS Negl Trop Dis* **8**(4): e2762.

Appel, H., R. Maier, J. Bleil, A. Hempfing, C. Loddenkemper, U. Schlichting, U. Syrbe and J. Sieper (2013). "In situ analysis of interleukin-23- and interleukin-12-positive cells in the spine of patients with ankylosing spondylitis." *Arthritis Rheum* **65**(6): 1522-1529.

Asquith, M., D. Elewaut, P. Lin and J. T. Rosenbaum (2014). "The role of the gut and microbes in the pathogenesis of spondyloarthritis." *Best Pract Res Clin Rheumatol* **28**(5): 687-702.

Australo-Anglo-American Spondyloarthritis, C., J. D. Reveille, A. M. Sims, P. Danoy, D. M. Evans, P. Leo, J. J. Pointon, R. Jin, X. Zhou, L. A. Bradbury, L. H. Appleton, J. C. Davis, L. Diekmann, T. Doan, A. Dowling, R. Duan, E. L. Duncan, C. Farrar, J. Hadler, D. Harvey, T. Karaderi, R. Mogg, E. Pomeroy, K. Pryce, J. Taylor, L. Savage, P. Deloukas, V. Kumanduri, L. Peltonen, S. M. Ring, P. Whittaker, E. Glazov, G. P. Thomas, W. P. Maksymowych, R. D. Inman, M. M. Ward, M. A. Stone, M. H. Weisman, B. P. Wordsworth and M. A. Brown (2010). "Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci." *Nat Genet* **42**(2): 123-127.

Awasthi, A., L. Riolo-Blanco, A. Jäger, T. Korn, C. Pot, G. Galileos, E. Bettelli, V. K. Kuchroo and M. Oukka (2009). "Cutting edge: IL-23 receptor gfp reporter mice reveal distinct populations of IL-17-producing cells." *J Immunol* **182**(10): 5904-5908.

Baeten, D., J. Sieper, J. Braun, X. Baraliakos, M. Dougados, P. Emery, A. Deodhar, B. Porter, R. Martin, M. Andersson, S. Mpofo and H. B. Richards (2015). "Secukinumab, an Interleukin-17A Inhibitor, in Ankylosing Spondylitis." *New England Journal of Medicine* **373**(26): 2534-2548.

Baraliakos, X., F. Heldmann, J. Callhoff, J. Listing, T. Appelboom, J. Brandt, F. Van den Bosch, M. Breban, G. Burmester, M. Dougados, P. Emery, H. Gaston, M. Grunke, I. E. Van Der Horst-Bruinsma, R. Landewé, M. Leirisalo-Repo, J. Sieper, K. De Vlam, D. Pappas, U. Kiltz, D. Van Der Heijde and J. Braun (2014). "Which spinal lesions are associated with new bone formation in patients with ankylosing spondylitis treated with anti-TNF agents? A long-term observational study using MRI and conventional radiography." *Ann Rheum Dis* **73**(10): 1819-1825.

Bartok, B. and G. S. Firestein (2010). "Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis." *Immunol Rev* **233**(1): 233-255.

Benegas, M., E. Muñoz-Gomariz, P. Font, R. Burgos-Vargas, J. Chaves, D. Palheiro, J. Maldonado Cocco, M. Gutiérrez, R. Sáenz, I. Steckmen, O. Rillo, J. Mulero, P. Sampaio-Barros, A. Barcelos, B. Vander Cruyssen, J. Vazquez-Mellado and E. Collantes Estevez (2012). "Comparison of the clinical expression of patients with ankylosing spondylitis from Europe and Latin America." *J Rheumatol* **39**(12): 2315-2320.

Bengsch, B., B. Seigel, T. Flecken, J. Wolanski, H. E. Blum and R. Thimme (2012). "Human Th17 cells express high levels of enzymatically active dipeptidylpeptidase IV (CD26)." *J Immunol* **188**(11): 5438-5447.

Benhamou, M., L. Gossec and M. Dougados (2010). "Clinical relevance of C-reactive protein in ankylosing spondylitis and evaluation of the NSAIDs/coxibs' treatment effect on C-reactive protein." *Rheumatology* **49**(3): 536-541.

Benito, M. J., D. J. Veale, O. FitzGerald, W. B. van den Berg and B. Bresnihan (2005). "Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis." *Ann Rheum Dis* **64**(9): 1263-1267.

Bettelli, E., M. Oukka and V. K. Kuchroo (2007). "T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity." *Nat Immunol* **8**(4): 345-350.

BioLegend (2018). MojoSort Isolation Kits Protocol - 1. Aufgerufen am 21. Juli, 2022, von <https://www.biolegend.com/protocols/mojosort-isolation-kits-protocol-1/4599/>, biolegend.com.

BioLegend (2018). MojoSort Selection Kits Protocol - 1. Aufgerufen am 21. Juli, 2022, von <https://www.biolegend.com/protocols/mojosort-selection-kits-protocol-1/4657/>, biolegend.com.

- Blanco, A. M., A. Perez-Arago, S. Fernandez-Lizarbe and C. Guerri (2008). "Ethanol mimics ligand-mediated activation and endocytosis of IL-1RI/TLR4 receptors via lipid rafts caveolae in astroglial cells." *Journal of Neurochemistry* **106**(2): 625-639.
- Bondeson, J., A. B. Blom, S. Wainwright, C. Hughes, B. Caterson and W. B. van den Berg (2010). "The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis." *Arthritis Rheum* **62**(3): 647-657.
- Bondeson, J., S. D. Wainwright, S. Lauder, N. Amos and C. E. Hughes (2006). "The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis." *Arthritis Res Ther* **8**(6): R187.
- Bowness, P. (2016). OVERVIEW OF ANKYLOSING SPONDYLITIS GENETICS AND PATHOGENESIS. **51**: 18-18.
- Bowness, P., A. Ridley, J. Shaw, A. T. Chan, I. Wong-Baeza, M. Fleming, F. Cummings, A. McMichael and S. Kollnberger (2011). "Th17 Cells Expressing KIR3DL2⁺ and Responsive to HLA-B27 Homodimers Are Increased in Ankylosing Spondylitis." *The Journal of Immunology* **186**(4): 2672-2680.
- Brandt, J., H. Haibel, D. Cornely, W. Golder, J. Gonzalez, J. Reddig, W. Thriene, J. Sieper and J. Braun (2000). "Successful treatment of active ankylosing spondylitis with the anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody infliximab." *Arthritis Rheum* **43**(6): 1346-1352.
- Brewerton, D., F. D. Hart, A. Nicholls, M. Caffrey, D. James and R. Sturrock (1973). "Ankylosing spondylitis and HL-A 27." *The Lancet* **301**(7809): 904-907.
- Brilland, B., M. Bach-Bunner, C. N. Gomes, V. Laroche, E. Foucher, M. Plaisance, P. Saulnier, N. Costedoat-Chalumeau, P. Ghillani, C. Belizna, Y. Delneste, J.-F. Augusto and P. Jeannin (2021). "Serum Interleukin-26 Is a New Biomarker for Disease Activity Assessment in Systemic Lupus Erythematosus." *Frontiers in Immunology* **12**.
- Broux, B., S. Zandee, E. Gowing, M. Charabati, M. A. Lécuyer, O. Tastet, L. Hachehouche, L. Bourbonnière, J. P. Ouimet, F. Lemaitre, S. Larouche, R. Cayrol, A. Bouthillier, R. Moumdjian, B. Lahav, J. Poirier, P. Duquette, N. Arbour, E. Peelen and A. Prat (2020). "Interleukin-26, preferentially produced by T(H)17 lymphocytes, regulates CNS barrier function." *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* **7**(6).
- Brüstle, A., S. Heink, M. Huber, C. Rosenplänter, C. Stadelmann, P. Yu, E. Arpaia, T. W. Mak, T. Kamradt and M. Lohoff (2007). "The development of inflammatory TH-17 cells requires interferon-regulatory factor 4." *Nature Immunology* **8**(9): 958-966.
- Burgos-Vargas, R., J. C.-C. Wei, M. U. Rahman, N. Akkoc, S. A. Haq, M. Hammoudeh, E. Mahgoub, E. Singh, L. J. Llamado, K. Shirazy, S. Kotak, C. Hammond, R. Pedersen, Q. Shen and B. Vlahos (2016). "The prevalence and clinical characteristics of nonradiographic axial spondyloarthritis among patients with inflammatory back pain in rheumatology practices: a multinational, multicenter study." *Arthritis Research & Therapy* **18**(1): 132.
- Burton, P. R., D. G. Clayton, L. R. Cardon, N. Craddock, P. Deloukas, A. Duncanson, D. P. Kwiatkowski, M. I. McCarthy, W. H. Ouwehand, N. J. Samani, J. A. Todd, P. Donnelly, J. C. Barrett, D. Davison, D. Easton, D. M. Evans, H. T. Leung, J. L. Marchini, A. P. Morris, C. C. Spencer, M. D. Tobin, A. P. Attwood, J. P. Boorman, B. Cant, U. Everson, J. M. Hussey, J. D. Jolley, A. S. Knight, K. Koch, E. Meech, S. Nutland, C. V. Prowse, H. E. Stevens, N. C. Taylor, G. R. Walters, N. M. Walker, N. A. Watkins, T. Winzer, R. W. Jones, W. L. McArdle, S. M. Ring, D. P. Strachan, M. Pembrey, G. Breen, D. St Clair, S. Caesar, K. Gordon-Smith, L. Jones, C. Fraser, E. K. Green, D. Grozeva, M. L. Hamshire, P. A. Holmans, I. R. Jones, G. Kirov, V. Moskvina, I. Nikolov, M. C. O'Donovan, M. J. Owen, D. A. Collier, A. Elkin, A. Farmer, R. Williamson, P. McGuffin, A. H. Young, I. N. Ferrier, S. G. Ball, A. J. Balmforth, J. H. Barrett, T. D. Bishop, M. M. Iles, A. Maqbool, N. Yuldasheva, A. S. Hall, P. S. Braund, R. J. Dixon, M. Mangino, S. Stevens, J. R. Thompson, F. Bredin, M. Tremelling, M. Parkes, H. Drummond, C. W. Lees, E. R. Nimmo, J. Satsangi, S. A. Fisher, A. Forbes, C. M. Lewis, C. M. Onnie, N. J. Prescott, J. Sanderson, C. G. Matthew, J. Barbour, M. K. Mohiuddin, C. E. Todhunter, J. C. Mansfield, T. Ahmad, F. R. Cummings, D. P. Jewell, J. Webster, M. J. Brown, M. G. Lathrop, J. Connell, A. Dominiczak, C. A. Marciano, B. Burke, R. Dobson, J. Gungadoo, K. L. Lee, P. B. Munroe, S. J. Newhouse, A. Onipinla, C. Wallace, M. Xue, M. Caulfield, M. Farrall, A. Barton, I. N. Bruce, H. Donovan, S. Eyre, P. D. Gilbert, S. L. Hilder, A. M. Hinks, S. L. John, C. Potter, A. J. Silman, D. P. Symmons, W. Thomson, J. Worthington, D. B. Dunger, B. Widmer, T. M. Frayling, R. M. Freathy, H. Lango, J. R. Perry, B. M. Shields, M. N. Weedon, A. T. Hattersley, G. A. Hitman, M. Walker, K. S. Elliott, C. J. Groves, C. M. Lindgren, N. W. Rayner, N. J. Timpson, E. Zeggini, M. Newport, G. Sirugo, E. Lyons, F. Vannberg, A. V. Hill, L. A. Bradbury, C. Farrar, J. J. Pointon, P. Wordsworth, M. A. Brown, J. A. Franklyn, J. M. Heward, M. J. Simmonds, S. C. Gough, S. Seal, M. R. Stratton, N. Rahman, M. Ban, A. Goris, S. J. Sawcer, A. Compston, D. Conway, M. Jallow, M. Newport, G. Sirugo, K. A. Rockett, S. J. Bumpstead, A. Chaney, K. Downes, M. J. Ghoris, R. Gwilliam, S. E. Hunt, M. Inouye, A. Keniry, E. King, R. McGinnis, S. Potter, R. Ravindrarajah, P. Whittaker, C. Widdens, D. Withers, N. J. Cardin, D. Davison, T. Ferreira, J. Pereira-Gale, I. B. Hallgrimsdottir, B. N. Howie, Z. Su, Y. Y. Teo, D. Vukcevic, D. Bentley, M. A. Brown, A. Compston, M. Farrall, A. S. Hall, A. T. Hattersley, A. V. Hill, M. Parkes, M. Pembrey, M. R. Stratton, S. L. Mitchell, P. R. Newby, O. J. Brand, J. Carr-Smith, S. H. Pearce, R. McGinnis, A. Keniry, P. Deloukas, J. D. Reville, X. Zhou, A. M. Sims, A. Dowling, J. Taylor, T. Doan, J. C. Davis, L. Savage, M. M. Ward, T. L. Leach, M. H. Weisman and M. Brown (2007). "Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants." *Nat Genet* **39**(11): 1329-1337.
- Calin, A., S. Garrett, H. Whitelock, L. G. Kennedy, J. O'hea, P. Mallorie and T. Jenkinson (1994). "A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index." *J rheumatol* **21**(12): 2281-2285.
- Capone, A., C. Naro, M. Bianco, M. De Bardi, F. Noël, P. Macchi, L. Battistini, V. Soumelis, E. Volpe and C. Sette (2021). "Systems analysis of human T helper17 cell differentiation uncovers distinct time-regulated transcriptional modules." *iScience* **24**(5): 102492.
- Capone, A. and E. Volpe (2020). "Transcriptional Regulators of T Helper 17 Cell Differentiation in Health and Autoimmune Diseases." *Frontiers in Immunology* **11**.

- Cella, M., A. Fuchs, W. Vermi, F. Facchetti, K. Otero, J. K. Lennerz, J. M. Doherty, J. C. Mills and M. Colonna (2009). "A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity." *Nature* **457**(7230): 722-725.
- Chatzikyriakidou, A., P. V. Voulgari and A. A. Drosos (2011). "What is the role of HLA-B27 in spondyloarthropathies?" *Autoimmunity Reviews* **10**(8): 464-468.
- Che, K. F., R. Kaarteenaho, E. Lappi-Blanco, B. Levänen, J. Sun, Å. Wheelock, L. Palmberg, C. M. Sköld and A. Lindén (2017). "Interleukin-26 Production in Human Primary Bronchial Epithelial Cells in Response to Viral Stimulation: Modulation by Th17 cytokines." *Mol Med* **23**: 247-257.
- Che, K. F., J. Sun and A. Linden (2019). "Pharmacological Modulation of Endotoxin-Induced Release of IL-26 in Human Primary Lung Fibroblasts." *Front Pharmacol* **10**: 956.
- Che, K. F., S. Tengvall, B. Levänen, E. Silverpil, M. E. Smith, M. Awad, M. Vikström, L. Palmberg, I. Qvarfordt, M. Sköld and A. Lindén (2014). "Interleukin-26 in Antibacterial Host Defense of Human Lungs. Effects on Neutrophil Mobilization." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **190**(9): 1022-1031.
- Che, K. F., E. Tufvesson, S. Tengvall, E. Lappi-Blanco, R. Kaarteenaho, B. Levänen, M. Ekberg, A. Brauner, M. Wheelock Å, L. Bjermer, C. M. Sköld and A. Lindén (2018). "The neutrophil-mobilizing cytokine interleukin-26 in the airways of long-term tobacco smokers." *Clin Sci (Lond)* **132**(9): 959-983.
- Chen, B., J. Li, C. He, D. Li, W. Tong, Y. Zou and W. Xu (2017). "Role of HLA-B27 in the pathogenesis of ankylosing spondylitis (Review)." *Mol Med Rep* **15**(4): 1943-1951.
- Chilton-Mitchell, L., J. Martindale, A. Hart and L. Goodacre (2013). "Normative values for the Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index in a UK population." *Rheumatology (Oxford)* **52**(11): 2086-2090.
- Chomarat, P., E. Vannier, J. Dechanet, M. C. Rissoan, J. Banchereau, C. A. Dinarello and P. Miossec (1995). "Balance of IL-1 receptor antagonist/IL-1 beta in rheumatoid synovium and its regulation by IL-4 and IL-10." *The Journal of Immunology* **154**(3): 1432-1439.
- Ciccia, F., M. Bombardieri, A. Principato, A. Giardina, C. Tripodo, R. Porcasi, S. Peralta, V. Franco, E. Giardina, A. Craxi, C. Pitzalis and G. Triolo (2009). "Overexpression of interleukin-23, but not interleukin-17, as an immunologic signature of subclinical intestinal inflammation in ankylosing spondylitis." *Arthritis & Rheumatism* **60**(4): 955-965.
- Cohen, C. J., S. Q. Crome, K. G. MacDonald, E. L. Dai, D. L. Mager and M. K. Levings (2011). "Human Th1 and Th17 Cells Exhibit Epigenetic Stability at Signature Cytokine and Transcription Factor Loci." *The Journal of Immunology* **187**(11): 5615-5626.
- Collins, P. L., M. A. Henderson and T. M. Aune (2012). "Lineage-specific adjacent IFNG and IL26 genes share a common distal enhancer element." *Genes Immun* **13**(6): 481-488.
- Cols, M., A. Rahman, P. J. Maglione, Y. Garcia-Carmona, N. Simchoni, H.-B. M. Ko, L. Radigan, A. Cerutti, D. Blankenship, V. Pascual and C. Cunningham-Rundles (2016). "Expansion of inflammatory innate lymphoid cells in patients with common variable immune deficiency." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **137**(4): 1206-1215.e1206.
- Cortes, A., J. Hadler, J. P. Pointon, P. C. Robinson, T. Karaderi, P. Leo, K. Cremin, K. Pryce, J. Harris, S. Lee, K. B. Joo, S.-C. Shim, M. Weisman, M. Ward, X. Zhou, H.-J. Garchon, G. Chiocchia, J. Nossent, B. A. Lie, Ø. Førre, J. Tuomilehto, K. Laiho, L. Jiang, Y. Liu, X. Wu, L. A. Bradbury, D. Elewaut, R. Burgos-Vargas, S. Stebbings, L. Appleton, C. Farrah, J. Lau, T. J. Kenna, N. Haroon, M. A. Ferreira, J. Yang, J. Mulero, J. L. Fernandez-Sueiro, M. A. Gonzalez-Gay, C. Lopez-Larrea, P. Deloukas, P. Donnelly, P. Bowness, K. Gafney, H. Gaston, D. D. Gladman, P. Rahman, W. P. Maksymowych, H. Xu, J. B. A. Crusius, I. E. van der Horst-Bruinsma, C.-T. Chou, R. Valle-Oñate, C. Romero-Sánchez, I. M. Hansen, F. M. Pimentel-Santos, R. D. Inman, V. Videm, J. Martin, M. Breban, J. D. Reveille, D. M. Evans, T.-H. Kim, B. P. Wordworth, M. A. Brown, C. International Genetics of Ankylosing Spondylitis, C. Australo-Anglo-American Spondyloarthritis, S. Groupe Française d'Etude Génétique des, S. Nord-Trøndelag Health, C. Spondyloarthritis Research Consortium of and C. Wellcome Trust Case Control (2013). "Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci." *Nature Genetics* **45**(7): 730-738.
- Corvaisier, M., Y. Delneste, H. Jeanvoine, L. Preisser, S. Blanchard, E. Garo, E. Hoppe, B. Barré, M. Audran, B. Bouvard, J. P. Saint-André and P. Jeannin (2012). "IL-26 is overexpressed in rheumatoid arthritis and induces proinflammatory cytokine production and Th17 cell generation." *PLoS Biol* **10**(9): e1001395.
- Cosmi, L., L. Maggi, V. Santarlasci, M. Capone, E. Cardilicchia, F. Frosali, V. Querci, R. Angeli, A. Matucci, M. Fambrini, F. Liotta, P. Parronchi, E. Maggi, S. Romagnani and F. Annunziato (2010). "Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4." *J Allergy Clin Immunol* **125**(1): 222-230.e221-224.
- Costantino, F., H. Mambu Mambuani, R. Said-Nahal, H.-J. Garchon and M. Breban (2021). "What Have We Learned From Family-Based Studies About Spondyloarthritis?" *Frontiers in Genetics* **12**.
- Costello, M. E., F. Ciccia, D. Willner, N. Warrington, P. C. Robinson, B. Gardiner, M. Marshall, T. J. Kenna, G. Triolo and M. A. Brown (2015). "Brief Report: Intestinal Dysbiosis in Ankylosing Spondylitis." *Arthritis Rheumatol* **67**(3): 686-691.
- Crome, S. Q., A. Y. Wang and M. K. Levings (2010). "Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease." *Clin Exp Immunol* **159**(2): 109-119.

- Cua, D. J., J. Sherlock, Y. Chen, C. A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S. A. Lira, D. Gorman, R. A. Kastelein and J. D. Sedgwick (2003). "Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain." *Nature* **421**(6924): 744-748.
- Culemann, S., A. Grüneboom, J. Nicolás-Ávila, D. Weidner, K. F. Lämmle, T. Rothe, J. A. Quintana, P. Kirchner, B. Krljanac, M. Eberhardt, F. Ferrazzi, E. Kretzschmar, M. Schicht, K. Fischer, K. Gelse, M. Faas, R. Pfeifle, J. A. Ackermann, M. Pachowsky, N. Renner, D. Simon, R. F. Haseloff, A. B. Ekici, T. Bäuerle, I. E. Blasig, J. Vera, D. Voehringer, A. Kleyer, F. Paulsen, G. Schett, A. Hidalgo and G. Krönke (2019). "Locally renewing resident synovial macrophages provide a protective barrier for the joint." *Nature* **572**(7771): 670-675.
- Curtis, B. M., M. B. Widmer, P. deRoos and E. E. Qvarnstrom (1990). "IL-1 and its receptor are translocated to the nucleus." *The Journal of Immunology* **144**(4): 1295-1303.
- Dagur, P. K., A. Biancotto, L. Wei, H. N. Sen, M. Yao, W. Strober, R. B. Nussenblatt and J. P. McCoy, Jr. (2011). "MCAM-expressing CD4(+) T cells in peripheral blood secrete IL-17A and are significantly elevated in inflammatory autoimmune diseases." *J Autoimmun* **37**(4): 319-327.
- Dambacher, J., F. Beigel, K. Zitzmann, E. N. De Toni, B. Göke, H. M. Diepolder, C. J. Auernhammer and S. Brand (2009). "The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation." *Gut* **58**(9): 1207-1217.
- Dang, A. T., R. M. Teles, D. I. Weiss, K. Parvatiyar, E. N. Sarno, M. T. Ochoa, G. Cheng, M. Gilliet, B. R. Bloom and R. L. Modlin (2019). "IL-26 contributes to host defense against intracellular bacteria." *J Clin Invest* **129**(5): 1926-1939.
- Danve, A. and A. Deodhar (2019). "Axial spondyloarthritis in the USA: diagnostic challenges and missed opportunities." *Clin Rheumatol* **38**(3): 625-634.
- Davidson, L., J. van den Reek, M. Bruno, F. van Hunsel, R. M. C. Herings, V. Matzaraki, C. K. Boahen, V. Kumar, H. M. M. Groenewoud, F. L. van de Veerdonk, M. G. Netea, E. de Jong and B. J. Kullberg (2022). "Risk of candidiasis associated with interleukin-17 inhibitors: A real-world observational study of multiple independent sources." *Lancet Reg Health Eur* **13**: 100266.
- Davidson, S. I., Y. Liu, P. A. Danoy, X. Wu, G. P. Thomas, L. Jiang, L. Sun, N. Wang, J. Han, H. Han, P. M. Visscher, M. A. Brown and H. Xu (2011). "Association of STAT3 and TNFRSF1A with ankylosing spondylitis in Han Chinese." *Ann Rheum Dis* **70**(2): 289-292.
- De Angelis, R., F. Salaffi and W. Grassi (2007). "Prevalence of spondyloarthropathies in an Italian population sample: a regional community-based study." *Scand J Rheumatol* **36**(1): 14-21.
- De Bari, C., F. Dell'Accio, P. Tylzanowski and F. P. Luyten (2001). "Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane." *Arthritis Rheum* **44**(8): 1928-1942.
- de Boer, O. J., J. J. van der Meer, P. Teeling, C. M. van der Loos, M. M. Idu, F. van Maldegem, J. Aten and A. C. van der Wal (2010). "Differential expression of interleukin-17 family cytokines in intact and complicated human atherosclerotic plaques." *J Pathol* **220**(4): 499-508.
- De Vos, M., H. Mielants, C. Cuvelier, A. Elewaut and E. Veys (1996). "Long-term evolution of gut inflammation in patients with spondyloarthropathy." *Gastroenterology* **110**(6): 1696-1703.
- DGIM, D. G. f. I. M. (2024). "Peter-Scriba-Promotionsstipendien." Retrieved 12.05.2024, 2020-2024, from <https://www.dgim.de/foerderprogramme/stipendencsp/peter-scriba-promotionsstipendien/>.
- Dharmasiri, U., M. A. Witek, A. A. Adams and S. A. Soper (2010). "Microsystems for the capture of low-abundance cells." *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* **3**: 409-431.
- Donnelly, R. P., F. Sheikh, H. Dickensheets, R. Savan, H. A. Young and M. R. Walter (2010). "Interleukin-26: An IL-10-related cytokine produced by Th17 cells." *Cytokine & Growth Factor Reviews* **21**(5): 393-401.
- Dougados, M. and D. Baeten (2011). "Spondyloarthritis." *The Lancet* **377**(9783): 2127-2137.
- Dougados, M., A. Gueguen, J. P. Nakache, P. Velicitat, H. Zeidler, E. Veys and A. Calin (1999). "Clinical relevance of C-reactive protein in axial involvement of ankylosing spondylitis." *J Rheumatol* **26**(4): 971-974.
- Dougados, M. and R. Landewé (2009). "Spondyloarthritides: pathogenesis, clinical aspect and diagnosis." *EULAR compendium on rheumatic diseases. London: BMJ Publishing Group*: 92-116.
- Dudakov, J. A., A. M. Hanash and M. R. van den Brink (2015). "Interleukin-22: immunobiology and pathology." *Annu Rev Immunol* **33**: 747-785.
- Dusseaux, M., E. Martin, N. Serriari, I. Péguillet, V. Premel, D. Louis, M. Milder, L. Le Bourhis, C. Soudais, E. Treiner and O. Lantz (2011). "Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells." *Blood* **117**(4): 1250-1259.
- Elabscience (2021). Human IL-26(Interleukin26) ELISA Kit User Manual, Catalog No. E-EL-H2580, Rev. 6. Aufgerufen am 19. Juli, 2022, von <https://u2.elabscience.com/PDF/Cate61/E-EL-H2580-Elabscience.pdf>, elabscience.com.

- Erlandsson Harris, H. and U. Andersson (2004). "Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator." *Eur J Immunol* **34**(6): 1503-1512.
- Esplugues, E., S. Huber, N. Gagliani, A. E. Hauser, T. Town, Y. Y. Wan, W. O'Connor, Jr., A. Rongvaux, N. Van Rooijen, A. M. Haberman, Y. Iwakura, V. K. Kuchroo, J. K. Kolls, J. A. Bluestone, K. C. Herold and R. A. Flavell (2011). "Control of TH17 cells occurs in the small intestine." *Nature* **475**(7357): 514-518.
- Evans, D. M., C. C. Spencer, J. J. Pointon, Z. Su, D. Harvey, G. Kochan, U. Oppermann, A. Diltthey, M. Pirinen, M. A. Stone, L. Appleton, L. Moutsianas, S. Leslie, T. Wordsworth, T. J. Kenna, T. Karaderi, G. P. Thomas, M. M. Ward, M. H. Weisman, C. Farrar, L. A. Bradbury, P. Danoy, R. D. Inman, W. Maksymowych, D. Gladman, P. Rahman, A. Morgan, H. Marzo-Ortega, P. Bowness, K. Gaffney, J. S. Gaston, M. Smith, J. Bruges-Armas, A. R. Couto, R. Sorrentino, F. Paladini, M. A. Ferreira, H. Xu, Y. Liu, L. Jiang, C. Lopez-Larrea, R. Diaz-Peña, A. López-Vázquez, T. Zayats, G. Band, C. Bellenguez, H. Blackburn, J. M. Blackwell, E. Bramon, S. J. Bumpstead, J. P. Casas, A. Corvin, N. Craddock, P. Deloukas, S. Dronov, A. Duncanson, S. Edkins, C. Freeman, M. Gillman, E. Gray, R. Gwilliam, N. Hammond, S. E. Hunt, J. Jankowski, A. Jayakumar, C. Langford, J. Liddle, H. S. Markus, C. G. Mathew, O. T. McCann, M. I. McCarthy, C. N. Palmer, L. Peltonen, R. Plomin, S. C. Potter, A. Rautanen, R. Ravindrarajah, M. Ricketts, N. Samani, S. J. Sawcer, A. Strange, R. C. Trembath, A. C. Viswanathan, M. Waller, P. Weston, P. Whittaker, S. Widaa, N. W. Wood, G. McVean, J. D. Reveille, B. P. Wordsworth, M. A. Brown and P. Donnelly (2011). "Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility." *Nat Genet* **43**(8): 761-767.
- Feldtkeller, E., J. Bruckel and M. A. Khan (2000). "Scientific contributions of ankylosing spondylitis patient advocacy groups." *Curr Opin Rheumatol* **12**(4): 239-247.
- Fenton, M. J., J. A. Buras and R. P. Donnelly (1992). "IL-4 reciprocally regulates IL-1 and IL-1 receptor antagonist expression in human monocytes." *The Journal of Immunology* **149**(4): 1283-1288.
- Fitzgerald-Bocarsly, P., J. Dai and S. Singh (2008). "Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history." *Cytokine Growth Factor Rev* **19**(1): 3-19.
- Fries, A., F. Saidoune, F. Kuonen, I. Dupanloup, N. Fournier, A. C. Guerra de Souza, M. Haniffa, F. Ma, J. E. Gudjonsson, L. Roesner, Y. Li, T. Werfel, C. Conrad, R. Gottardo, R. L. Modlin, J. Di Domizio and M. Gilliet (2023). "Differentiation of IL-26(+) T(H)17 intermediates into IL-17A producers via epithelial crosstalk in psoriasis." *Nat Commun* **14**(1): 3878.
- Gaffen, S. L., R. Jain, A. V. Garg and D. J. Cua (2014). "The IL-23–IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing." *Nature Reviews Immunology* **14**(9): 585-600.
- Gagliani, N., M. C. Amezcua Vesely, A. Iseppon, L. Brockmann, H. Xu, N. W. Palm, M. R. de Zoete, P. Licona-Limón, R. S. Paiva, T. Ching, C. Weaver, X. Zi, X. Pan, R. Fan, L. X. Garmire, M. J. Cotton, Y. Drier, B. Bernstein, J. Geginat, B. Stockinger, E. Esplugues, S. Huber and R. A. Flavell (2015). "Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation." *Nature* **523**(7559): 221-225.
- Garner, L. C., A. Amini, M. E. B. FitzPatrick, M. J. Lett, G. F. Hess, M. Filipowicz Sinnreich, N. M. Provine and P. Klenerman (2023). "Single-cell analysis of human MAIT cell transcriptional, functional and clonal diversity." *Nat Immunol* **24**(9): 1565-1578.
- Garrett, S., T. Jenkinson, L. G. Kennedy, H. Whitelock, P. Gaisford and A. Calin (1994). "A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index." *The Journal of rheumatology* **21**(12): 2286-2291.
- Garrido-Cumbrera, M., D. Poddubnyy, L. Gossec, D. Gálvez-Ruiz, C. Bundy, R. Mahapatra, S. Makri, L. Christen, C. J. Delgado-Domínguez, S. Sanz-Gómez, P. Plazuelo-Ramos, V. Navarro-Compán and E. W. G. on behalf of the (2019). "The European Map of Axial Spondyloarthritis: Capturing the Patient Perspective—an Analysis of 2846 Patients Across 13 Countries." *Current Rheumatology Reports* **21**(5): 19.
- Ghoreschi, K., A. Laurence, X.-P. Yang, C. M. Tato, M. J. McGeachy, J. E. Konkel, H. L. Ramos, L. Wei, T. S. Davidson, N. Bouladoux, J. R. Grainger, Q. Chen, Y. Kanno, W. T. Watford, H.-W. Sun, G. Eberl, E. M. Shevach, Y. Belkaid, D. J. Cua, W. Chen and J. J. O'Shea (2010). "Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- β signalling." *Nature* **467**(7318): 967-971.
- Gladman, D. D., R. Shuckett, M. L. Russell, J. C. Thorne and R. K. Schachter (1987). "Psoriatic arthritis (PSA)--an analysis of 220 patients." *Q J Med* **62**(238): 127-141.
- Gold, M. C., S. Cerri, S. Smyk-Pearson, M. E. Cansler, T. M. Vogt, J. Delepine, E. Winata, G. M. Swarbrick, W. J. Chua, Y. Y. Yu, O. Lantz, M. S. Cook, M. D. Null, D. B. Jacoby, M. J. Harrieff, D. A. Lewinsohn, T. H. Hansen and D. M. Lewinsohn (2010). "Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells." *PLoS Biol* **8**(6): e1000407.
- Goldenberg, D. L., M. S. Egan and A. S. Cohen (1982). "Inflammatory synovitis in degenerative joint disease." *J Rheumatol* **9**(2): 204-209.
- Goris, A., M. G. Marrosu and K. Vandebroek (2001). "Novel polymorphisms in the IL-10 related AK155 gene (chromosome 12q15)." *Genes Immun* **2**(5): 284-286.
- Gowhari Shabgah, A., W. K. Abdelbasset, H. Sulaiman Rahman, D. O. Bokov, W. Suksatan, L. Thangavelu, M. Ahmadi, M. Malekhamadi, Seyed M. Gheibihayat and J. Gholizadeh Navashenaq (2022). "A comprehensive review of IL-26 to pave a new way for a profound understanding of the pathobiology of cancer, inflammatory diseases and infections." *Immunology* **165**(1): 44-60.
- Gracey, E., L. Vereecke, D. McGovern, M. Fröhling, G. Schett, S. Danese, M. De Vos, F. Van den Bosch and D. Elewaut (2020). "Revisiting the gut–joint axis: links between gut inflammation and spondyloarthritis." *Nature Reviews Rheumatology* **16**(8): 415-433.

- Guerra-Laso, J. M., S. Raposo-García, S. García-García, C. Díez-Tascón and O. M. Rivero-Lezcano (2015). "Microarray analysis of Mycobacterium tuberculosis-infected monocytes reveals IL26 as a new candidate gene for tuberculosis susceptibility." *Immunology* **144**(2): 291-301.
- Guglani, L. and S. A. Khader (2010). "Th17 cytokines in mucosal immunity and inflammation." *Curr Opin HIV AIDS* **5**(2): 120-127.
- Hammitzsch, A. (2018). Die Rolle von Interleukin 26 in der angeborenen und adaptiven Immunität bei der Spondylarthritis. Aufgerufen am 18. Juli, 2022, von https://www.drks.de/drks_web/PdfDownstreamServlet?ID=DRKS00014672&LOCALE=de, Deutsches Register Klinischer Studien; p. 1-6.
- Hammitzsch, A., A. Ossadnik, Q. Bachmann, H. Merwald-Fraenk, G. Lorenz, M. Witt, F. Wiesent, H. Mühlhofer, D. Simone, P. Bowness, U. Heemann, M. Arbogast, P. Moog and C. Schmaderer (2024). "Increased interleukin-26 in the peripheral joints of patients with axial spondyloarthritis and psoriatic arthritis, co-localizing with CD68-positive synoviocytes." *Frontiers in Immunology* **15**.
- Hammitzsch, A., A. Ossadnik, Q. Bachmann, H. Merwald-Fraenk, G. Lorenz, M. Witt, F. Wiesent, H. Mühlhofer, D. Simone, P. Bowness, U. Heemann, M. Arbogast, P. Moog and C. Schmaderer (2024). "Increased interleukin-26 in the peripheral joints of patients with axial spondyloarthritis and psoriatic arthritis, co-localizing with CD68-positive synoviocytes." *Frontiers in Immunology* **Vol. 15 - 2024**.
- Hammitzsch, A., A. Ossadnik, H. Merwald-Fraenk, M. Witt, F. Wiesent, H. Mühlhofer, P. Bowness, M. Arbogast, C. Schmaderer and P. Moog (2020). "Lokale Produktion von Interleukin-26 in ankylosierender Spondylitis und Psoriasisarthritis" *Deutscher Rheumatologiekongress 2020*.
- Hammitzsch, A., A. Ossadnik, H. Merwald-Fraenk, M. Witt, F. Wiesent, H. Mühlhofer, P. Bowness, M. Arbogast, C. Schmaderer and P. Moog (2023). Die Rolle von Interleukin 26 in der angeborenen und adaptiven Immunität bei der Spondylarthritis. *DGIM Kongress 2023 - Best of DGIM - Spitzenforschung in der Inneren Medizin (Promotionsstipendien)*. Wiesbaden, Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy and C. T. Weaver (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." *Nat Immunol* **6**(11): 1123-1132.
- Harris, E. (1992). "Clinical features of rheumatoid arthritis." *Text book of rheumatology*: 874-911.
- Hatano, R., T. Itoh, H. Otsuka, S. Okamoto, E. Komiya, S. Iwata, T. M. Aune, N. H. Dang, K. Kuwahara-Arai, K. Ohnuma and C. Morimoto (2019). "Characterization of novel anti-IL-26 neutralizing monoclonal antibodies for the treatment of inflammatory diseases including psoriasis." *MAbs* **11**(8): 1428-1442.
- Hatano, R., T. Itoh, H. Otsuka, H. Saeki, A. Yamamoto, D. Song, Y. Shirakawa, S. Iyama, T. Sato, N. Iwao, N. Harada, T. M. Aune, N. H. Dang, Y. Kaneko, T. Yamada, C. Morimoto and K. Ohnuma (2022). "Humanized anti-IL-26 monoclonal antibody as a novel targeted therapy for chronic graft-versus-host disease." *American Journal of Transplantation* **n/a**(n/a).
- Haywood, K. L. (2010). Chapter 4 - The measurement of patient-reported outcome in the rheumatic diseases. *Rheumatology*. K. Dziedziec and A. Hammond. Edinburgh, Churchill Livingstone: 35-62.
- Hefdal, L. D., T. Andersen, D. Jæger, A. Woetmann, R. Østgård, E. E. Kennigott, U. Syrbe, J. Sieper, M. Hvid, B. Deleuran and T. W. Kragstrup (2017). "Synovial cell production of IL-26 induces bone mineralization in spondyloarthritis." *J Mol Med (Berl)* **95**(7): 779-787.
- Hense, S., A. Luque Ramos, J. Callhoff, K. Albrecht, A. Zink and F. Hoffmann (2016). "Prävalenz der rheumatoiden Arthritis in Deutschland auf Basis von Kassendaten." *Zeitschrift für Rheumatologie* **75**(8): 819-827.
- Hensor, E. M. A., P. Emery, S. J. Bingham, P. G. Conaghan and Y. C. the (2010). "Discrepancies in categorizing rheumatoid arthritis patients by DAS-28(ESR) and DAS-28(CRP): can they be reduced?" *Rheumatology* **49**(8): 1521-1529.
- Hernández-Santos, N. and S. L. Gaffen (2012). "Th17 cells in immunity to Candida albicans." *Cell Host Microbe* **11**(5): 425-435.
- Herold, G. e. a. (2018). Innere Medizin Herold, Gerd: 1004.
- Hinks, T. S. C. and X.-W. Zhang (2020). "MAIT Cell Activation and Functions." *Frontiers in Immunology* **11**.
- Hör, S., H. Pirzer, L. Dumoutier, F. Bauer, S. Wittmann, H. Sticht, J.-C. Renauld, R. de Waal Malefyt and H. Fickenscher (2004). "The T-cell Lymphokine Interleukin-26 Targets Epithelial Cells through the Interleukin-20 Receptor 1 and Interleukin-10 Receptor 2 Chains *." *Journal of Biological Chemistry* **279**(32): 33343-33351.
- Hsu, Y. H., H. H. Li, M. Y. Hsieh, M. F. Liu, K. Y. Huang, L. S. Chin, P. C. Chen, H. H. Cheng and M. S. Chang (2006). "Function of interleukin-20 as a proinflammatory molecule in rheumatoid and experimental arthritis." *Arthritis Rheum* **54**(9): 2722-2733.
- Huber, M. and M. Lohoff (2014). "IRF4 at the crossroads of effector T-cell fate decision." *European Journal of Immunology* **44**(7): 1886-1895.
- Hue, S., P. Ahern, S. Buonocore, M. C. Kullberg, D. J. Cua, B. S. McKenzie, F. Powrie and K. J. Maloy (2006). "Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation." *J Exp Med* **203**(11): 2473-2483.

- Hughes, T., B. Becknell, S. McClory, E. Briercheck, A. G. Freud, X. Zhang, H. Mao, G. Nuovo, J. Yu and M. A. Caligiuri (2009). "Stage 3 immature human natural killer cells found in secondary lymphoid tissue constitutively and selectively express the TH 17 cytokine interleukin-22." *Blood* **113**(17): 4008-4010.
- Hummelshoj, L., L. P. Ryder and L. K. Poulsen (2006). "The role of the interleukin-10 subfamily members in immunoglobulin production by human B cells." *Scand J Immunol* **64**(1): 40-47.
- INCYTO (2004). Instructions C-Chip DHC-N01 Disposable Hemocytometer System Neubauer Improved. Aufgerufen am 19. Juli, 2022 von https://archive-resources.coleparmer.com/Manual_pdfs/79003-00.pdf, incyto.com.
- Inoue, E., H. Yamanaka, M. Hara, T. Tomatsu and N. Kamatani (2007). "Comparison of Disease Activity Score (DAS)28- erythrocyte sedimentation rate and DAS28- C-reactive protein threshold values." *Annals of the Rheumatic Diseases* **66**(3): 407-409.
- Itoh, T., R. Hatano, Y. Horimoto, T. Yamada, D. Song, H. Otsuka, Y. Shirakawa, S. Mastuoka, N. Iwao, T. M. Aune, N. H. Dang, Y. Kaneko, K. Okumura, C. Morimoto and K. Ohnuma (2021). "IL-26 mediates epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor resistance through endoplasmic reticulum stress signaling pathway in triple-negative breast cancer cells." *Cell Death Dis* **12**(6): 520.
- Itoh, T., R. Hatano, E. Komiya, H. Otsuka, Y. Narita, T. M. Aune, N. H. Dang, S. Matsuoka, H. Naito, M. Tominaga, K. Takamori, C. Morimoto and K. Ohnuma (2019). "Biological Effects of IL-26 on T Cell-Mediated Skin Inflammation, Including Psoriasis." *J Invest Dermatol* **139**(4): 878-889.
- Ivanov, I. I., B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua and D. R. Littman (2006). "The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." *Cell* **126**(6): 1121-1133.
- Ivanov, I. I., B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua and D. R. Littman (2006). "The Orphan Nuclear Receptor ROR γ Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17⁺ T Helper Cells." *Cell* **126**(6): 1121-1133.
- Jacques, P., S. Lambrecht, E. Verheugen, E. Pauwels, G. Kollias, M. Armaka, M. Verhoye, A. Van der Linden, R. Achten, R. J. Lories and D. Elewaut (2014). "Proof of concept: enthesitis and new bone formation in spondyloarthritis are driven by mechanical strain and stromal cells." *Ann Rheum Dis* **73**(2): 437-445.
- Jethwa, H. and P. Bowness (2016). "The interleukin (IL)-23/IL-17 axis in ankylosing spondylitis: new advances and potentials for treatment." *Clinical and Experimental Immunology* **183**(1): 30-36.
- Jiang, T. T., T. Y. Shao, W. X. G. Ang, J. M. Kinder, L. H. Turner, G. Pham, J. Whitt, T. Alenghat and S. S. Way (2017). "Commensal Fungi Recapitulate the Protective Benefits of Intestinal Bacteria." *Cell Host Microbe* **22**(6): 809-816.e804.
- Kaabachi, W., E. Bouali, A. Berraïes, I. B. Dhifallah, B. Hamdi, K. Hamzaoui and A. Hamzaoui (2017). "Interleukin-26 is overexpressed in Behçet's disease and enhances Th17 related -cytokines." *Immunol Lett* **190**: 177-184.
- Kamijo, H., T. Miyagaki, Y. Hayashi, T. Akatsuka, S. Watanabe-Otobe, T. Oka, N. Shishido-Takahashi, H. Suga, M. Sugaya and S. Sato (2020). "Increased IL-26 Expression Promotes T Helper Type 17- and T Helper Type 2-Associated Cytokine Production by Keratinocytes in Atopic Dermatitis." *J Invest Dermatol* **140**(3): 636-644.e632.
- Kay, J. and K. S. Upchurch (2012). "ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria." *Rheumatology (Oxford)* **51 Suppl 6**: vi5-9.
- Kiltz, B., et al. (2019). Langfassung zur S3- Leitlinie Axiale Spondyloarthritis inklusive Morbus Bechterew und Frühformen. Aufgerufen am 18. Juli, 2022, von https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/060-0031_S3_Axiale-Spondyloarthritis-Morbus-Bechterew-Fruehformen-2019-10.pdf, AWMF online: p. 38.
- Kiltz, U., J. Braun, A. Becker, J. F. Chenot, M. Dreimann, L. Hammel, A. Heiligenhaus, K. G. Hermann, R. Klett, D. Krause, K. F. Kreitner, U. Lange, A. Lauterbach, W. Mau, R. Mössner, U. Oberschelp, S. Philipp, U. Pleyer, M. Rudwaleit, E. Schneider, T. L. Schulte, J. Sieper, A. Stallmach, B. Swoboda, M. Winking, Dgrh, Degam, Dwg, Dvmb, Dog, Drg, Dgmm, Dgpmr/Dgrw, D. Physio, Ddg, Dgooc, Dgim, Dgooc/Dgorh and Dgnc (2019). "Langfassung zur S3-Leitlinie Axiale Spondyloarthritis inklusive Morbus Bechterew und Frühformen, Update 2019." *Zeitschrift für Rheumatologie* **78**(1): 3-64.
- Kjer-Nielsen, L., O. Patel, A. J. Corbett, J. Le Nours, B. Meehan, L. Liu, M. Bhati, Z. Chen, L. Kostenko, R. Reantragoon, N. A. Williamson, A. W. Purcell, N. L. Dudek, M. J. McConville, R. A. O'Hair, G. N. Khairallah, D. I. Godfrey, D. P. Fairlie, J. Rossjohn and J. McCluskey (2012). "MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells." *Nature* **491**(7426): 717-723.
- Knappe, A., S. Hör, S. Wittmann and H. Fickenscher (2000). "Induction of a novel cellular homolog of interleukin-10, AK155, by transformation of T lymphocytes with herpesvirus saimiri." *J Virol* **74**(8): 3881-3887.
- Konradsen, J. R., B. Nordlund, B. Levänen, G. Hedlin and A. Linden (2016). "The cytokine interleukin-26 as a biomarker in pediatric asthma." *Respir Res* **17**: 32.
- Kragstrup, T. W., T. Vorup-Jensen, B. Deleuran and M. Hvid (2013). "A simple set of validation steps identifies and removes false results in a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay caused by anti-animal IgG antibodies in plasma from arthritis patients." *Springerplus* **2**(1): 263.

- Kroon, F., R. Landewé, M. Dougados and D. van der Heijde (2012). "Continuous NSAID use reverts the effects of inflammation on radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis." *Ann Rheum Dis* **71**(10): 1623-1629.
- Kurschus, F. C., A. L. Croxford, A. P. Heinen, S. Wörtge, D. Ielo and A. Waisman (2010). "Genetic proof for the transient nature of the Th17 phenotype." *European Journal of Immunology* **40**(12): 3336-3346.
- Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein and D. J. Cua (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." *J Exp Med* **201**(2): 233-240.
- Larochette, V., C. Miot, C. Poli, E. Beaumont, P. Roingeard, H. Fickenscher, P. Jeannin and Y. Delneste (2019). "IL-26, a Cytokine With Roles in Extracellular DNA-Induced Inflammation and Microbial Defense." *Front Immunol* **10**: 204.
- Le Bourhis, L., E. Martin, I. Péguillet, A. Guihot, N. Froux, M. Coré, E. Lévy, M. Dusseaux, V. Meyssonier, V. Premel, C. Ngo, B. Riteau, L. Duban, D. Robert, S. Huang, M. Rottman, C. Soudais and O. Lantz (2010). "Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells." *Nat Immunol* **11**(8): 701-708.
- Lee, C., J. H. Song, Y. E. Cha, D. K. Chang, Y. H. Kim and S. N. Hong (2022). "Intestinal Epithelial Responses to IL-17 in Adult Stem Cell-derived Human Intestinal Organoids." *J Crohns Colitis* **16**(12): 1911-1923.
- Lee, J. Y., J. A. Hall, L. Kroehling, L. Wu, T. Najar, H. H. Nguyen, W. Y. Lin, S. T. Yeung, H. M. Silva, D. Li, A. Hine, P. Loke, D. Hudesman, J. C. Martin, E. Kenigsberg, M. Merad, K. M. Khanna and D. R. Littman (2020). "Serum Amyloid A Proteins Induce Pathogenic Th17 Cells and Promote Inflammatory Disease." *Cell* **180**(1): 79-91.e16.
- Lee, K.-A., K.-W. Kim, B.-M. Kim, J.-Y. Won, H. K. Min, D. W. Lee, H.-R. Kim and S.-H. Lee (2019). "Promotion of osteoclastogenesis by IL-26 in rheumatoid arthritis." *Arthritis Research & Therapy* **21**(1): 283.
- Lee, Y., A. Awasthi, N. Yosef, F. J. Quintana, S. Xiao, A. Peters, C. Wu, M. Kleinewietfeld, S. Kunder, D. A. Hafler, R. A. Sobel, A. Regev and V. K. Kuchroo (2012). "Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells." *Nature Immunology* **13**(10): 991-999.
- Lee, Y. K., H. Turner, C. L. Maynard, J. R. Oliver, D. Chen, C. O. Elson and C. T. Weaver (2009). "Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage." *Immunity* **30**(1): 92-107.
- Leipe, J., M. A. Schramm, I. Prots, H. Schulze-Koops and A. Skapenko (2014). "Increased Th17 cell frequency and poor clinical outcome in rheumatoid arthritis are associated with a genetic variant in the IL4R gene, rs1805010." *Arthritis Rheumatol* **66**(5): 1165-1175.
- Liang, S. C., X. Y. Tan, D. P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins and L. A. Fouser (2006). "Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides." *J Exp Med* **203**(10): 2271-2279.
- Lin, Y. H., Y. H. Wang, Y. J. Peng, F. C. Liu, G. J. Lin, S. H. Huang, H. K. Sytwu and C. P. Cheng (2020). "Interleukin 26 Skews Macrophage Polarization Towards M1 Phenotype by Activating cJUN and the NF-κB Pathway." *Cells* **9**(4).
- Linden, S. V. D., H. A. Valkenburg and A. Cats (1984). "Evaluation of Diagnostic Criteria for Ankylosing Spondylitis." *Arthritis & Rheumatism* **27**(4): 361-368.
- Linehan, J. L., O. J. Harrison, S. J. Han, A. L. Byrd, I. Vujkovic-Cvijin, A. V. Villarino, S. K. Sen, J. Shaik, M. Smelkinson, S. Tamoutounour, N. Collins, N. Bouladoux, A. Dzutsev, S. P. Rosshart, J. H. Arbuckle, C. R. Wang, T. M. Kristie, B. Rehmann, G. Trinchieri, J. M. Brenchley, J. J. O'Shea and Y. Belkaid (2018). "Non-classical Immunity Controls Microbiota Impact on Skin Immunity and Tissue Repair." *Cell* **172**(4): 784-796.e718.
- Liu, J. T., H. M. Yeh, S. Y. Liu and K. T. Chen (2014). "Psoriatic arthritis: Epidemiology, diagnosis, and treatment." *World J Orthop* **5**(4): 537-543.
- Lories, R. (2011). "The balance of tissue repair and remodeling in chronic arthritis." *Nat Rev Rheumatol* **7**(12): 700-707.
- Louhaichi, S., M. Mlika, B. Hamdi, K. Hamzaoui and A. Hamzaoui (2020). "Sputum IL-26 Is Overexpressed in Severe Asthma and Induces Proinflammatory Cytokine Production and Th17 Cell Generation: A Case-Control Study of Women." *J Asthma Allergy* **13**: 95-107.
- Luo, L., L. Jiang, Z. Tian and X. Zhang (2020). "The serum interleukin-26 level is a potential biomarker for chronic hepatitis B." *Medicine (Baltimore)* **99**(1): e18462.
- Ma, X., Y. Liu, H. Zhang, R. Qiu, H. Zhao, Q. Xin, S. Shan, J. Dang, J. Li, Z. Yang, Y. Gong and Q. Liu (2014). "Evidence for Genetic Association of CARD9 and SNAPC4 with Ankylosing Spondylitis in a Chinese Han Population." *The Journal of Rheumatology* **41**(2): 318-324.
- MACHEREY-NAGEL (2022). Macherey-Nagel User manual RNA Isolation Nucleospin RNA Rev.20. Aufgerufen am 19. Juli, 2022, von <https://www.mn-net.com/media/pdf/b0/51/ee/Instruction-NucleoSpin-RNA.pdf>, mn-net.com.
- Maggi, L., V. Santarlasci, M. Capone, A. Peired, F. Frosali, S. Q. Crome, V. Querci, M. Fambrini, F. Liotta, M. K. Levings, E. Maggi, L. Cosmi, S. Romagnani and F. Annunziato (2010). "CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC." *Eur J Immunol* **40**(8): 2174-2181.

- Majumder, S. and M. J. McGeachy (2021). "IL-17 in the Pathogenesis of Disease: Good Intentions Gone Awry." *Annu Rev Immunol* **39**: 537-556.
- Maksymowych, W. P., R. Landewé, B. Conner-Spady, M. Dougados, H. Mielants, H. van der Tempel, A. R. Poole, N. Wang and D. van der Heijde (2007). "Serum matrix metalloproteinase 3 is an independent predictor of structural damage progression in patients with ankylosing spondylitis." *Arthritis Rheum* **56**(6): 1846-1853.
- Manferdini, C., F. Paoletta, E. Gabusi, Y. Silvestri, L. Gambari, L. Cattini, G. Filardo, S. Fleury-Cappellesso and G. Lisignoli (2016). "From osteoarthritic synovium to synovial-derived cells characterization: synovial macrophages are key effector cells." *Arthritis Res Ther* **18**: 83.
- Martin, E., E. Treiner, L. Duban, L. Guerri, H. Laude, C. Toly, V. Premel, A. Devys, I. C. Moura, F. Tilloy, S. Cherif, G. Vera, S. Latour, C. Soudais and O. Lantz (2009). "Stepwise development of MAIT cells in mouse and human." *PLoS Biol* **7**(3): e54.
- McGeachy, M. J., K. S. Bak-Jensen, Y. Chen, C. M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan and D. J. Cua (2007). "TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology." *Nat Immunol* **8**(12): 1390-1397.
- McGeachy, M. J., K. S. Bak-Jensen, Y. Chen, C. M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan and D. J. Cua (2007). "TGF-β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology." *Nature Immunology* **8**(12): 1390-1397.
- McGeachy, M. J., Y. Chen, C. M. Tato, A. Laurence, B. Joyce-Shaikh, W. M. Blumenschein, T. K. McClanahan, J. J. O'Shea and D. J. Cua (2009). "The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo." *Nat Immunol* **10**(3): 314-324.
- Mease, P. (2006). "Management of psoriatic arthritis: the therapeutic interface between rheumatology and dermatology." *Curr Rheumatol Rep* **8**(5): 348-354.
- MedMira (2017). miriad rapid HBc/HIV/HCV antibody test. Aufgerufen am 19. Juli, 2022, von https://medmira.com/wp-content/uploads/2018/01/ADAICUVZIS0001EN-Rev-0_1-8-x-14-Miriad-HBcHIVHCV-Package-Insert-English.pdf, medmira.com.
- Meermeier, E. W., C. L. Zheng, J. G. Tran, S. Soma, A. H. Worley, D. I. Weiss, R. L. Modlin, G. Swarbrick, E. Karamooz, S. Khuzwayo, E. B. Wong, M. C. Gold and D. M. Lewinsohn (2022). "Human lung-resident mucosal-associated invariant T cells are abundant, express antimicrobial proteins, and are cytokine responsive." *Communications Biology* **5**(1): 942.
- Mehta, H., M. J. Lett, P. Klenerman and M. Filipowicz Sinnreich (2022). "MAIT cells in liver inflammation and fibrosis." *Seminars in Immunopathology* **44**(4): 429-444.
- Mei, Y., F. Pan, J. Gao, R. Ge, Z. Duan, Z. Zeng, F. Liao, G. Xia, S. Wang, S. Xu, J. Xu, L. Zhang and D. Ye (2011). "Increased serum IL-17 and IL-23 in the patient with ankylosing spondylitis." *Clinical Rheumatology* **30**(2): 269-273.
- Melis, L., B. Vandooren, E. Kruithof, P. Jacques, M. De Vos, H. Mielants, G. Verbruggen, F. De Keyser and D. Elewaut (2010). "Systemic levels of IL-23 are strongly associated with disease activity in rheumatoid arthritis but not spondyloarthritis." *Annals of the Rheumatic Diseases* **69**(3): 618-623.
- Meller, S., J. Di Domizio, K. S. Voo, H. C. Friedrich, G. Chamilos, D. Ganguly, C. Conrad, J. Gregorio, D. Le Roy, T. Roger, J. E. Ladbury, B. Homey, S. Watowich, R. L. Modlin, D. P. Kontoyiannis, Y. J. Liu, S. T. Arold and M. Gilliet (2015). "T(H)17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26." *Nat Immunol* **16**(9): 970-979.
- Meyer, O., C. Labarre, M. Dougados, P. Goupille, A. Cantagrel, A. Dubois, P. Nicaise-Roland, J. Sibilia and B. Combe (2003). "Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage." *Ann Rheum Dis* **62**(2): 120-126.
- Mielants, H., E. M. Veys, C. Cuvelier and M. de Vos (1988). "Ileocolonoscopy Findings in Seronegative Spondylarthropathies." *Rheumatology* **XXVII**(suppl_2): 95-105.
- Mills, K. H. G. (2022). "IL-17 and IL-17-producing cells in protection versus pathology." *Nat Rev Immunol*: 1-17.
- Miot, C., E. Beaumont, D. Duluc, H. Le Guillou-Guillemette, L. Preisser, E. Garo, S. Blanchard, I. Hubert Fouchard, C. Créminon, P. Lamourette, I. Fremaux, P. Calès, F. Lunel-Fabiani, J. Boursier, O. Braum, H. Fickenscher, P. Roingeard, Y. Delneste and P. Jeannin (2015). "IL-26 is overexpressed in chronically HCV-infected patients and enhances TRAIL-mediated cytotoxicity and interferon production by human NK cells." *Gut* **64**(9): 1466-1475.
- Mizel, S. B., P. L. Kilian, J. C. Lewis, K. A. Paganelli and R. A. Chizzonite (1987). "The interleukin 1 receptor. Dynamics of interleukin 1 binding and internalization in T cells and fibroblasts." *The Journal of Immunology* **138**(9): 2906-2912.
- Moll, J. M. H., I. Haslock, I. F. Macrae and V. Wright (1974). "ASSOCIATIONS BETWEEN ANKYLOSING SPONDYLITIS, PSORIATIC ARTHRITIS, REITER'S DISEASE, THE INTESTINAL ARTHROPATHIES, AND BEHCET'S SYNDROME." *Medicine* **53**(5): 343-364.
- Moran, E., C. Ng, J. McCormack, R. Heydrich, H. Appel, U. Fearon and D. Veale (2010). IL-17A expression is upregulated in the hypoxic joint and correlates with IL-6 production, inflammatory cell infiltrate and oxidate damage. IRISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCE, SPRINGER LONDON LTD 236 GRAYS INN RD, 6TH FLOOR, LONDON WC1X 8HL, ENGLAND.

- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." *Annu Rev Immunol* **7**: 145-173.
- Muls, N., Z. Nasr, H. A. Dang, C. Sindic and V. van Pesch (2017). "IL-22, GM-CSF and IL-17 in peripheral CD4+ T cell subpopulations during multiple sclerosis relapses and remission. Impact of corticosteroid therapy." *PLoS One* **12**(3): e0173780.
- Nagalakshmi, M. L., E. Murphy, T. McClanahan and R. de Waal Malefyt (2004). "Expression patterns of IL-10 ligand and receptor gene families provide leads for biological characterization." *International Immunopharmacology* **4**(5): 577-592.
- Naldi, L. (2004). "Epidemiology of psoriasis." *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **3**(2): 121-128.
- Napier, R. J., E. J. Adams, M. C. Gold and D. M. Lewinsohn (2015). "The Role of Mucosal Associated Invariant T Cells in Antimicrobial Immunity." *Front Immunol* **6**: 344.
- Ohnuma, K., R. Hatano, T. M. Aune, H. Otsuka, S. Iwata, N. H. Dang, T. Yamada and C. Morimoto (2015). "Regulation of pulmonary graft-versus-host disease by IL-26+CD26+CD4 T lymphocytes." *J Immunol* **194**(8): 3697-3712.
- Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J. C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J. S. Abrams, K. W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J. F. Bazan and R. A. Kastelein (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." *Immunity* **13**(5): 715-725.
- Ouyang, W. and A. O'Garra (2019). "IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation." *Immunity* **50**(4): 871-891.
- Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y.-H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian and C. Dong (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." *Nature Immunology* **6**(11): 1133-1141.
- Parkes, M., A. Cortes, D. A. van Heel and M. A. Brown (2013). "Genetic insights into common pathways and complex relationships among immune-mediated diseases." *Nature Reviews Genetics* **14**(9): 661-673.
- Pène, J., S. Chevalier, L. Preisser, E. Vénereau, M. H. Guilleux, S. Ghannam, J. P. Molès, Y. Danger, E. Ravon, S. Lesaux, H. Yssel and H. Gascan (2008). "Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes." *J Immunol* **180**(11): 7423-7430.
- Peng, Y. J., C. Y. Wang, Y. H. Lin, G. J. Lin, S. H. Huang, J. F. Shyu, H. K. Sytwu and C. P. Cheng (2016). "Interleukin 26 suppresses receptor activator of nuclear factor κ B ligand induced osteoclastogenesis via down-regulation of nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1 and nuclear factor κ B activity." *Rheumatology (Oxford)* **55**(11): 2074-2083.
- Perrotta, F. M., R. Lories and E. Lubrano (2021). "To move or not to move: the paradoxical effect of physical exercise in axial spondyloarthritis." *RMD Open* **7**(1): e001480.
- Poddubnyy, D., K.-G. A. Hermann, J. Callhoff, J. Listing and J. Sieper (2014). "Ustekinumab for the treatment of patients with active ankylosing spondylitis: results of a 28-week, prospective, open-label, proof-of-concept study (TOPAS)." *Annals of the Rheumatic Diseases* **73**(5): 817-823.
- Poddubnyy, D., M. Rudwaleit, H. Haibel, J. Listing, E. Märker-Hermann, H. Zeidler, J. Braun and J. Sieper (2011). "Rates and predictors of radiographic sacroiliitis progression over 2 years in patients with axial spondyloarthritis." *Ann Rheum Dis* **70**(8): 1369-1374.
- Poddubnyy, D., M. Rudwaleit, H. Haibel, J. Listing, E. Märker-Hermann, H. Zeidler, J. Braun and J. Sieper (2012). "Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on radiographic spinal progression in patients with axial spondyloarthritis: results from the German Spondyloarthritis Inception Cohort." *Ann Rheum Dis* **71**(10): 1616-1622.
- Pointon, J. J., D. Harvey, T. Karaderi, L. H. Appleton, C. Farrar, M. A. Stone, R. D. Sturrock, M. A. Brown and B. P. Wordsworth (2010). "Elucidating the chromosome 9 association with AS; CARD9 is a candidate gene." *Genes & Immunity* **11**(6): 490-496.
- Poli, C., J. F. Augusto, J. Dauvé, C. Adam, L. Preisser, V. Larochette, P. Pignon, A. Savina, S. Blanchard, J. F. Subra, A. Chevailler, V. Procaccio, A. Croué, C. Crémion, A. Morel, Y. Delneste, H. Fickenscher and P. Jeannin (2017). "IL-26 Confers Proinflammatory Properties to Extracellular DNA." *The Journal of Immunology* **198**(9): 3650-3661.
- Porcelli, S., C. E. Yockey, M. B. Brenner and S. P. Balk (1993). "Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- α / β T cells demonstrates preferential use of several V β genes and an invariant TCR α chain." *J Exp Med* **178**(1): 1-16.
- Queiro, R., I. Morante, I. Cabezas and B. Acasuso (2016). "HLA-B27 and psoriatic disease: a modern view of an old relationship." *Rheumatology* **55**(2): 221-229.
- Rachitskaya, A. V., A. M. Hansen, R. Horai, Z. Li, R. Villasamil, D. Luger, R. B. Nussenblatt and R. R. Caspi (2008). "Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and ROR γ and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion." *J Immunol* **180**(8): 5167-5171.

- Radbruch, A. and D. Recktenwald (1995). "Detection and isolation of rare cells." *Current Opinion in Immunology* 7(2): 270-273.
- Radtke, M., Reich, K., Blome, C., Rustenbach, S. and Augustin, M. (2009). "Prevalence and clinical features of psoriatic arthritis and joint complaints in 2009 patients with psoriasis: results of a German national survey." *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 23(6): 683-691.
- Redeker, I., J. Callhoff, F. Hoffmann, H. Haibel, J. Sieper, A. Zink and D. Poddubnyy (2019). "Determinants of diagnostic delay in axial spondyloarthritis: an analysis based on linked claims and patient-reported survey data." *Rheumatology* 58(9): 1634-1638.
- Reich, K., K. Krüger, R. Mössner and M. Augustin (2009). "Epidemiology and clinical pattern of psoriatic arthritis in Germany: a prospective interdisciplinary epidemiological study of 1511 patients with plaque-type psoriasis." *Br J Dermatol* 160(5): 1040-1047.
- Reveille, J. D., A.-M. Sims, P. Danoy, D. M. Evans, P. Leo, J. J. Pointon, R. Jin, X. Zhou, L. A. Bradbury, L. H. Appleton, J. C. Davis, L. Diekman, T. Doan, A. Dowling, R. Duan, E. L. Duncan, C. Farrar, J. Hadler, D. Harvey, T. Karaderi, R. Mogg, E. Pomeroy, K. Pryce, J. Taylor, L. Savage, P. Deloukas, V. Kumanduri, L. Peltonen, S. M. Ring, P. Whittaker, E. Glazov, G. P. Thomas, W. P. Maksymowych, R. D. Inman, M. M. Ward, M. A. Stone, M. H. Weisman, B. P. Wordsworth, M. A. Brown and C. The Australo-Anglo-American Spondyloarthritis (2010). "Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci." *Nature Genetics* 42(2): 123-127.
- Rudwaleit, M., H. Haibel, X. Baraliakos, J. Listing, E. Märker-Hermann, H. Zeidler, J. Braun and J. Sieper (2009). "The early disease stage in axial spondylarthritis: Results from the german spondyloarthritis inception cohort." *Arthritis & Rheumatism* 60(3): 717-727.
- Rudwaleit, M., D. van der Heijde, R. Landewé, J. Listing, N. Akkoc, J. Brandt, J. Braun, C. T. Chou, E. Collantes-Estevez, M. Dougados, F. Huang, J. Gu, M. A. Khan, Y. Kirazli, W. P. Maksymowych, H. Mielants, I. J. Sørensen, S. Ozgocmen, E. Roussou, R. Valle-Oñate, U. Weber, J. Wei and J. Sieper (2009). "The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection." *Annals of the Rheumatic Diseases* 68(6): 777-783.
- Ruiz-Heiland, G., A. Horn, P. Zerr, W. Hofstetter, W. Baum, M. Stock, J. H. Distler, F. Nimmerjahn, G. Schett and J. Zwerina (2012). "Blockade of the hedgehog pathway inhibits osteophyte formation in arthritis." *Ann Rheum Dis* 71(3): 400-407.
- Ruof, J., O. Sangha and G. Stucki (1999). "Comparative responsiveness of 3 functional indices in ankylosing spondylitis." *The Journal of rheumatology* 26(9): 1959-1963.
- Sampaio-Barros, P. D., A. B. Bortoluzzo, R. A. Conde, L. T. Costallat, A. M. Samara and M. B. Bértolo (2010). "Undifferentiated spondyloarthritis: a longterm followup." *J Rheumatol* 37(6): 1195-1199.
- Savchenko, L. V. and I. P. Kaidashev (2018). "Individual approach to the treatment of obese copd patients can reduce anthropometric indicators, the level of systemic inflammation and improve the quality of life." *Wiad Lek* 71(3 pt 1): 451-459.
- Saxena, A., P. K. Dagur and A. Biancotto (2019). *Multiparametric Flow Cytometry Analysis of Naïve, Memory, and Effector T Cells. Immunophenotyping: Methods and Protocols*. J. J. P. McCoy. New York, NY, Springer New York: 129-140.
- Schlosstein, L., P. I. Terasaki, R. Bluestone and C. M. Pearson (1973). "High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis." *New England Journal of Medicine* 288(14): 704-706.
- Schneider, M., G. Baseler, O. Funken, S. Heberger, U. Kiltz, P. Klose, K. Krüger, J. Langhorst, W. Mau, R. Oltman, B. Richter, S. Seitz, P. Sewerin, R. Tholen, C. Weseloh, M. Witthöft and C. Specker (2020). "Management der frühen rheumatoiden Arthritis." *Zeitschrift für Rheumatologie* 79(1): 1-38.
- Schraml, B. U., K. Hildner, W. Ise, W.-L. Lee, W. A. E. Smith, B. Solomon, G. Sahota, J. Sim, R. Mukasa, S. Cemerski, R. D. Hatton, G. D. Stormo, C. T. Weaver, J. H. Russell, T. L. Murphy and K. M. Murphy (2009). "The AP-1 transcription factor Batf controls TH17 differentiation." *Nature* 460(7253): 405-409.
- Scotti, L., M. Franchi, A. Marchesoni and G. Corrao (2018). "Prevalence and incidence of psoriatic arthritis: A systematic review and meta-analysis." *Semin Arthritis Rheum* 48(1): 28-34.
- Sharma, P. K., E. B. Wong, R. J. Napier, W. R. Bishai, T. Ndung'u, V. O. Kasprowicz, D. A. Lewinsohn, D. M. Lewinsohn and M. C. Gold (2015). "High expression of CD26 accurately identifies human bacteria-reactive MR1-restricted MAIT cells." *Immunology* 145(3): 443-453.
- Sheikh, F., V. V. Baurin, A. Lewis-Antes, N. K. Shah, S. V. Smirnov, S. Anantha, H. Dickensheets, L. Dumoutier, J.-C. Renauld, A. Zdanov, R. P. Donnelly and S. V. Kotenko (2004). "Cutting Edge: IL-26 Signals through a Novel Receptor Complex Composed of IL-20 Receptor 1 and IL-10 Receptor 2." *The Journal of Immunology* 172(4): 2006-2010.
- Shen, H., J. C. Goodall and J. S. Hill Gaston (2009). "Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis." *Arthritis & Rheumatism* 60(6): 1647-1656.
- Sherlock, J. P., B. Joyce-Shaikh, S. P. Turner, C.-C. Chao, M. Sathe, J. Grein, D. M. Gorman, E. P. Bowman, T. K. McClanahan and J. H. Yearley (2012). "IL-23 induces spondyloarthropathy by acting on ROR- γ t⁺ CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ enthesal resident T cells." *Nature medicine* 18(7): 1069-1076.
- Shi, G., C. A. Cox, B. P. Vistica, C. Tan, E. F. Wawrousek and I. Gery (2008). "Phenotype Switching by Inflammation-Inducing Polarized Th17 Cells, but Not by Th1 Cells." *The Journal of Immunology* 181(10): 7205-7213.

- Shin, H. C., N. Benbernou, S. Esnault and M. Guenounou (1999). "Expression of IL-17 in human memory CD45RO+ T lymphocytes and its regulation by protein kinase A pathway." *Cytokine* **11**(4): 257-266.
- Sieper, J. and D. Poddubnyy (2017). "Axial spondyloarthritis." *The Lancet* **390**(10089): 73-84.
- Sieper, J., D. van der Heijde, R. Landewé, J. Brandt, R. Burgos-Vagas, E. Collantes-Estevez, B. Dijkmans, M. Dougados, M. A. Khan, M. Leirisalo-Repo, S. van der Linden, W. P. Maksymowych, H. Mielants, I. Olivieri and M. Rudwaleit (2009). "New criteria for inflammatory back pain in patients with chronic back pain: a real patient exercise by experts from the Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS)." *Annals of the Rheumatic Diseases* **68**(6): 784-788.
- Singh, B., J. A. Schwartz, C. Sandrock, S. M. Bellemore and E. Nikoospour (2013). "Modulation of autoimmune diseases by interleukin (IL)-17 producing regulatory T helper (Th17) cells." *Indian J Med Res* **138**(5): 591-594.
- Song, D., L. Lai, J. Lu, J. Tong and Z. Ran (2022). "Interleukin-26 Expression in Inflammatory Bowel Disease and Its Immunoregulatory Effects on Macrophages." *Front Med (Lausanne)* **9**: 797135.
- Song, I. H., D. A. Poddubnyy, M. Rudwaleit and J. Sieper (2008). "Benefits and risks of ankylosing spondylitis treatment with nonsteroidal antiinflammatory drugs." *Arthritis Rheum* **58**(4): 929-938.
- Spoorenberg, A., D. van der Heijde, E. de Klerk, M. Dougados, K. de Vlam, H. Mielants, H. van der Tempel and S. van der Linden (1999). "Relative value of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in assessment of disease activity in ankylosing spondylitis." *J Rheumatol* **26**(4): 980-984.
- Stephen-Victor, E., H. Fickenscher and J. Bayry (2016). "IL-26: An Emerging Proinflammatory Member of the IL-10 Cytokine Family with Multifaceted Actions in Antiviral, Antimicrobial, and Autoimmune Responses." *PLoS Pathog* **12**(6): e1005624.
- Stolwijk, C., M. van Onna, A. Boonen and A. van Tubergen (2016). "Global Prevalence of Spondyloarthritis: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis." *Arthritis Care Res (Hoboken)* **68**(9): 1320-1331.
- Stolwijk, C., A. van Tubergen, J. D. Castillo-Ortiz and A. Boonen (2015). "Prevalence of extra-articular manifestations in patients with ankylosing spondylitis: a systematic review and meta-analysis." *Ann Rheum Dis* **74**(1): 65-73.
- Takagi, R., T. Higashi, K. Hashimoto, K. Nakano, Y. Mizuno, Y. Okazaki and S. Matsushita (2008). "B cell chemoattractant CXCL13 is preferentially expressed by human Th17 cell clones." *J Immunol* **181**(1): 186-189.
- Takatori, H., Y. Kanno, W. T. Watford, C. M. Tato, G. Weiss, Ivanov, II, D. R. Littman and J. J. O'Shea (2009). "Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22." *J Exp Med* **206**(1): 35-41.
- Taylor, S. C., K. Nadeau, M. Abbasi, C. Lachance, M. Nguyen and J. Fenrich (2019). "The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time." *Trends in Biotechnology* **37**(7): 761-774.
- Taylor, W., D. Gladman, P. Helliwell, A. Marchesoni, P. Mease and H. Mielants (2006). "Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study." *Arthritis Rheum* **54**(8): 2665-2673.
- ThermoFisher, S. I. (2018). High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit User Guide Pub. No. MAN0017977 Rev. A.0. Aufgerufen am 19. Juli, 2022, von https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017977_highcap_cDNA_RT_UG.pdf, Thermofisher.com.
- ThermoFisher, S. I. (2019). PrimeFlow RNA Assay Kit User Guide Catalog No. MAN0019788 Rev. B.0. Aufgerufen am 21. Juli, 2022, von https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0019788_PrimeFlowRNAAssay_UG.pdf, thermofischer.com.
- ThermoFisher, S. I. (2022). Qubit RNA HS Assay Kit User Guide Pub. No. MAN0002327 Rev. B.0. Aufgerufen am 19. Juli, 2022, von https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Qubit_RNA_HS_Assay_UG.pdf, Thermofisher.com.
- ThermoFisher, S. I. (2022). Qubit RNA IQ Assay Kits User Guide Pub. No. MAN0017405 Rev. B0. Aufgerufen am 19. Juli, 2022, von https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/manuals/MAN0017405_Qubit_RNA_IQ_Assay_Kit_UG.pdf, Thermofisher.com.
- Thomas, G. P. and M. A. Brown (2010). "Genetics and genomics of ankylosing spondylitis." *Immunological Reviews* **233**(1): 162-180.
- Torre Alonso, J. C., A. Rodriguez Perez, J. M. Arribas Castrillo, J. Ballina Garcia, J. L. Riestra Noriega and C. Lopez Larrea (1991). "Psoriatic arthritis (PA): a clinical, immunological and radiological study of 180 patients." *Br J Rheumatol* **30**(4): 245-250.
- Trontzas, P., A. Andrianakos, S. Miyakis, K. Pantelidou, E. Vafiadou, V. Garantziotou and C. Voudouris (2005). "Seronegative spondyloarthropathies in Greece: a population-based study of prevalence, clinical pattern, and management. The ESORDIG study." *Clin Rheumatol* **24**(6): 583-589.
- Trotter, T. N., C. W. Shuptrine, L. C. Tsao, R. D. Marek, C. Acharya, J. P. Wei, X. Y. Yang, G. Lei, T. Wang, H. K. Lyerly and Z. C. Hartman (2020). "IL26, a Noncanonical Mediator of DNA Inflammatory Stimulation, Promotes TNBC Engraftment and Progression in Association with Neutrophils." *Cancer Res* **80**(15): 3088-3100.

- Tu, H., X. Lai, J. Li, L. Huang, Y. Liu and J. Cao (2019). "Interleukin-26 is overexpressed in human sepsis and contributes to inflammation, organ injury, and mortality in murine sepsis." *Crit Care* **23**(1): 290.
- Umemura, M., T. Kawabe, K. Shudo, H. Kidoya, M. Fukui, M. Asano, Y. Iwakura, G. Matsuzaki, R. Imamura and T. Suda (2004). "Involvement of IL-17 in Fas ligand-induced inflammation." *Int Immunol* **16**(8): 1099-1108.
- van der Heijde, D., R. Landewé and E. Feldtkeller (2008). "Proposal of a linear definition of the Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI) and comparison with the 2-step and 10-step definitions." *Annals of the Rheumatic Diseases* **67**(4): 489-493.
- van der Heijde, D., S. Ramiro, R. Landewé, X. Baraliakos, F. Van den Bosch, A. Sepriano, A. Regel, A. Ciurea, H. Dagfinrud, M. Dougados, F. van Gaalen, P. G  her, I. van der Horst-Bruinsma, R. D. Inman, M. Jongkees, U. Kiltz, T. K. Kvien, P. M. Machado, H. Marzo-Ortega, A. Molto, V. Navarro-Comp  n, S. Ozgocmen, F. M. Pimentel-Santos, J. Reveille, M. Rudwaleit, J. Sieper, P. Sampaio-Barros, D. Wiek and J. Braun (2017). "2016 update of the ASAS-EULAR management recommendations for axial spondyloarthritis." *Annals of the Rheumatic Diseases* **76**(6): 978-991.
- van Mens, L. J. J., M. G. H. van de Sande, S. Menegatti, S. Chen, I. C. J. Blijdorp, H. M. de Jong, I. A. Fluri, T. E. Latuhihin, A. W. R. van Kuijk, L. Rogge, N. G. Yeremenko and D. L. P. Baeten (2018). "Brief Report: Interleukin-17 Blockade With Secukinumab in Peripheral Spondyloarthritis Impacts Synovial Immunopathology Without Compromising Systemic Immune Responses." *Arthritis Rheumatol* **70**(12): 1994-2002.
- Vandenbroeck, K., S. Cunningham, A. Goris, I. Alloza, S. Heggarty, C. Graham, A. Bell and M. Rooney (2003). "Polymorphisms in the interferon-gamma/interleukin-26 gene region contribute to sex bias in susceptibility to rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* **48**(10): 2773-2778.
- Vander Cruyssen, B., C. Ribbens, A. Boonen, H. Mielants, K. de Vlam, J. Lenaerts, S. Steinfeld, F. Van den Bosch, L. Dewulf and N. Vastesaeger (2007). "The epidemiology of ankylosing spondylitis and the commencement of anti-TNF therapy in daily rheumatology practice." *Ann Rheum Dis* **66**(8): 1072-1077.
- Varghese, F., A. B. Bukhari, R. Malhotra and A. De (2014). "IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples." *PLoS One* **9**(5): e96801.
- Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley and B. Stockinger (2006). "TGF  beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." *Immunity* **24**(2): 179-189.
- Volpe, E., M. Touzot, N. Servant, M. A. Marloie-Provost, P. Hup  , E. Barillot and V. Soumelis (2009). "Multiparametric analysis of cytokine-driven human Th17 differentiation reveals a differential regulation of IL-17 and IL-22 production." *Blood* **114**(17): 3610-3614.
- Wallis, S. K., L. A. Cooney, J. L. Endres, M. J. Lee, J. Ryu, E. C. Somers and D. A. Fox (2011). "A polymorphism in the interleukin-4 receptor affects the ability of interleukin-4 to regulate Th17 cells: a possible immunoregulatory mechanism for genetic control of the severity of rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* **13**(1): R15.
- Walsh, J. A. and M. Magrey (2021). "Clinical Manifestations and Diagnosis of Axial Spondyloarthritis." *J Clin Rheumatol* **27**(8): e547-e560.
- Wang, X., Z. Lin, Q. Wei, Y. Jiang and J. Gu (2009). "Expression of IL-23 and IL-17 and effect of IL-23 on IL-17 production in ankylosing spondylitis." *Rheumatology International* **29**(11): 1343-1347.
- Weaver, C. T., C. O. Elson, L. A. Fouser and J. K. Kolls (2013). "The Th17 Pathway and Inflammatory Diseases of the Intestines, Lungs, and Skin." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **8**(1): 477-512.
- Weisman, M. H. (2012). "Inflammatory Back Pain: The United States Perspective." *Rheumatic Disease Clinics* **38**(3): 501-512.
- Weiss, D. I., F. Ma, A. A. Merleev, E. Maverakis, M. Gilliet, S. J. Balin, B. D. Bryson, M. T. Ochoa, M. Pellegrini, B. R. Bloom and R. L. Modlin (2019). "IL-1   Induces the Rapid Secretion of the Antimicrobial Protein IL-26 from Th17 Cells." *J Immunol* **203**(4): 911-921.
- Weitzmann, M. N. and N. Savage (1992). "Nuclear internalisation and DNA binding activities of interleukin-1, interleukin-1 receptor and interleukin-1/receptor complexes." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **187**(2): 1166-1171.
- Wilson, N. J., K. Boniface, J. R. Chan, B. S. McKenzie, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, B. Basham, K. Smith, T. Chen, F. Morel, J.-C. Lecron, R. A. Kastelein, D. J. Cua, T. K. McClanahan, E. P. Bowman and R. de Waal Malefyt (2007). "Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells." *Nature Immunology* **8**(9): 950-957.
- Wolk, K., S. Kunz, K. Asadullah and R. Sabat (2002). "Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members?" *J Immunol* **168**(11): 5397-5402.
- Wolk, K., K. Witte, E. Witte, S. Proesch, G. Schulze-Tanzil, K. Nasilowska, J. Thilo, K. Asadullah, W. Sterry, H. D. Volk and R. Sabat (2008). "Maturing dendritic cells are an important source of IL-29 and IL-20 that may cooperatively increase the innate immunity of keratinocytes." *J Leukoc Biol* **83**(5): 1181-1193.
- Wu, B. and Y. Wan (2020). "Molecular control of pathogenic Th17 cells in autoimmune diseases." *Int Immunopharmacol* **80**: 106187.

- Yager, N., S. Cole, A. Lledo Lara, A. Maroof, F. Penkava, J. C. Knight, P. Bowness and H. Al-Mossawi (2021). "Ex vivo mass cytometry analysis reveals a profound myeloid proinflammatory signature in psoriatic arthritis synovial fluid." *Ann Rheum Dis* **80**(12): 1559-1567.
- Yeaman, M. R., D. Cheng, B. Desai, L. I. Kupferwasser, Y. Q. Xiong, K. D. Gank, J. E. Edwards, Jr. and A. S. Bayer (2004). "Susceptibility to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with increased fluconazole efficacy against experimental endocarditis due to *Candida albicans*." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(8): 3051-3056.
- Yeaman, M. R. and N. Y. Yount (2007). "Unifying themes in host defence effector polypeptides." *Nat Rev Microbiol* **5**(9): 727-740.
- Yen, D., J. Cheung, H. Scheerens, F. Poulet, T. McClanahan, B. McKenzie, M. A. Kleinschek, A. Owyang, J. Mattson, W. Blumenschein, E. Murphy, M. Sathe, D. J. Cua, R. A. Kastelein and D. Rennick (2006). "IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6." *J Clin Invest* **116**(5): 1310-1316.
- Zheng, Y., D. M. Danilenko, P. Valdez, I. Kasman, J. Eastham-Anderson, J. Wu and W. Ouyang (2007). "Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis." *Nature* **445**(7128): 648-651.
- Zhou, L., I. I. Ivanov, R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, D. E. Levy, W. J. Leonard and D. R. Littman (2007). "IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways." *Nature Immunology* **8**(9): 967-974.
- Zhou, Y., W. Hou, K. Xu, D. Han, C. Jiang, K. Mou, Y. Li, L. Meng and S. Lu (2015). "The elevated expression of Th17-related cytokines and receptors is associated with skin lesion severity in early systemic sclerosis." *Hum Immunol* **76**(1): 22-29.
- Zielinski, C. E., F. Mele, D. Aschenbrenner, D. Jarrossay, F. Ronchi, M. Gattorno, S. Monticelli, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2012). "Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β ." *Nature* **484**(7395): 514-518.
- Zochling, J. (2011). "Measures of symptoms and disease status in ankylosing spondylitis: Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS), Ankylosing Spondylitis Quality of Life Scale (ASQoL), Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI), Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI), Bath Ankylosing Spondylitis Global Score (BAS-G), Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI), Dougados Functional Index (DFI), and Health Assessment Questionnaire for the Spondylarthropathies (HAQ-S)." *Arthritis Care & Research* **63**(S11): S47-S58.

10 Danksagung

Die vorliegende Dissertation wäre ohne die Unterstützung und Hilfe zahlreicher Personen nicht möglich gewesen.

An erster Stelle möchte ich daher Frau Dr. med. Ariane Hammitzsch meinen persönlichen und aufrichtigen Dank aussprechen. Sie war nicht nur als projektverantwortliche Studienärztin, sondern auch als Mentorin und wahre Freundin, stets für mich, sowohl im Privaten als auch Beruflichen, ein direktes Vorbild und wird dies auch in Zukunft bleiben. Ihre fachliche Kompetenz, ihre, trotz oft herausfordernder Vereinbarkeit von Familie, Wissenschaft und Beruf, dennoch aufopfernde Unterstützung sowie ihre immer ermutigenden Worte haben mich maßgeblich auf meinem Weg begleitet und vor allem geprägt.

Ein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. med. Christoph Schmaderer, meinem Doktorvater und Betreuer des Promotionsvorhabens. Seine fachliche Expertise, sein Engagement und seine Geduld haben mir ermöglicht, meine Forschung voranzutreiben und zu vertiefen.

Ebenfalls möchte ich PD Dr. med. Philipp Moog danken, der mich als fachspezifischer Mentor für chronisch rheumatische Erkrankungen in meinem Werdegang unterstützte, sowie Dr. med. Jan Stassek für seine externe, fachunabhängige und wertvolle Mentorschaft und Förderung.

Ein herzlicher Dank geht auch an PD Dr. med. Georg Lorenz, als sehr geschätzten Laborkollegen und Förderer, dessen fachlicher Rat und Unterstützung entscheidend für den Erfolg dieser Arbeit waren.

Besonderer Dank gebührt zudem Univ. Prof. Dr. med. Dr. h. c. Uwe Heemann, dem Klinikdirektor der Nephrologischen Klinik am Klinikum München Rechts der Isar der TUM. Seine großzügige Unterstützung und die Möglichkeit, innerhalb seiner Abteilung zu promovieren, haben meinen wissenschaftlichen Werdegang maßgeblich zum Positiven beeinflusst.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch allen anderen, teils auch externen, Kolleginnen, Kollegen und auch Patienten aller an unserem Projekt mitwirkenden Abteilungen und Praxen sowie des nephrologisch-rheumatologischen Forschungslabors am Klinikum MRI. Ohne eure Hilfe und euer Engagement wäre die Umsetzung dieses Projekts nicht möglich gewesen.

Abschließend möchte ich meine Eltern Detlef und Petra Ossadnik, sowie meine Lebensgefährtin Julie Gansel und meine Großmutter Gisela Engelmann ebenfalls explizit hervorheben und mich auch bei ihnen für ihre bedingungslose Unterstützung bedanken. Ohne euch hätte ich weder Studium, geschweige denn mein Promotionsvorhaben jemals realisieren oder gar zu Ende führen können.

Für eure bedingungslose Liebe, Fürsorge und euer uneingeschränktes Verständnis werde ich wohl nie passende Worte finden, die zu fassen im Stande sein könnten, was Ihr mir und nicht nur im Kontext dieser Arbeit, bedeutet. Dankeschön.

Für all die genannten Personen und für all jene, die hier unerwähnt bleiben sollten, aber dennoch einen Beitrag geleistet haben, möchte ich meinen tiefsten Dank aussprechen.