

# Diplomarbeit

## **B-Zell Depletion unter Rituximabtherapie bei Patienten mit rheumatoider Arthritis**

eingereicht von

**Stefanie Genger**

Mat.Nr.: 0311905

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Innere Medizin

Klinische Abteilung für Rheumatologie und Immunologie

unter der Anleitung von

**Univ.-Prof. Dr. Hans-Peter Brezinschek**

Graz, am .....

Unterschrift: .....

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am .....

Unterschrift

*Es wird darauf hingewiesen, dass in dieser Arbeit aus Gründen der Übersichtlichkeit und besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet wird, welches beide Geschlechter in gleichem Maße einschließt.*

## **Danksagungen**

Mein Dank gilt hier vor allem Univ.-Prof. Dr. Hans-Peter Brezinschek. Erst durch Ihn wurde die Immunologie für mich zu einem sehr interessanten und faszinierenden Fach, das mich sicher mein Leben lang begleiten wird. Durch seine stetige Motivation und seine eigene Begeisterung für die Materie, wurde meine Arbeit auf der Immunologie zu einer der spannendsten Zeiten während meines Studiums.

Auch möchte ich mich beim ganzen Team des Immunologielabors unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Winfried Graninger, bedanken. Besonders BA Irene Holzer und BA Karin Gründl haben unendliche Geduld bewiesen während sie uns in die Basics der Laborarbeit einführten. Dankeschön!

Von Herzen möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ihnen verdanke ich das Rüstzeug zu einem guten Menschen und hoffentlich auch zu einem fähigen Mediziner.

# Zusammenfassung

## Hintergrund und Ziele

Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine systemische Autoimmunerkrankung bei der die B-Zellen eine große Rolle spielen. Die Beobachtung dieser Zelle ist ein wichtiges Instrument um B Zell depletierende Therapien (z.B. Rituximab) zu überwachen. Mittels der HS-FACS Analyse konnte demonstriert werden, dass Patienten mit einer kompletten B Zell Depletion an Tag 15 nach der ersten Infusion mit Rituximab ein besseres klinisches Ansprechen zeigen. In unserer Studie untersuchten wir, ob diese Beobachtung wiederholt werden kann. Des Weiteren wurde kürzlich gezeigt, dass die Expression von CD95+ auf B-Zellen mit der Krankheitsaktivität von SLE Patienten korreliert. Ob dies auf Patienten mit RA zutrifft, ist bis jetzt unbekannt. Deswegen testeten wir, ob eine Korrelation zwischen den CD95+ B Zell Subpopulationen und dem Disease activity score 28 (DAS28) besteht.

## Material und Methoden

29 Patienten mit aktiver RA, die unzureichend auf TNF-Blocker reagierten, wurden nach ausführlicher Aufklärung und Zustimmung in die Studie inkludiert. Der DAS28 wurde bei 29 Patienten 2 Wochen nach Therapiebeginn und bei 19 Patienten 24 Wochen nach Therapiebeginn gemessen. Zum selben Zeitpunkt wurden Zellen aus dem peripheren Blut isoliert und mit dem 7 Kanal Flow Cytometer (BD Canto II, Software FACSDIVA) untersucht. Die B-Zellen wurden unterteilt in Naive B-Zellen (CD19+, IgD+, CD27-), IgD Memory B-Zellen (CD19+, IgD+, CD27+), Post Switch Memory B-Zellen (CD19+, IgD-, CD27+) und die Doppelt Negative B-Zelle (CD19+, IgD-, CD27-). Zur weiteren Charakterisierung der B-Zelle wurden die Oberflächenmarker CD95+ und CD80+ verwendet. Komplette B Zell Depletion wurde mit 0,002% oder  $\leq 10$  B-Zellen / 500.000 CD45+ Leukozyten festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS (Version 18.0). Die Verteilung der Daten wurde mit dem Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt.

## Ergebnisse

Von den 19 Patienten, die sich in Woche 24 befanden, zeigten 7 Patienten (37%) eine gute EULAR Ansprechrates, 4 (21%) zeigten eine moderate EULAR Ansprechrates und 8 Patienten (42%) zeigten keine EULAR Ansprechrates. Keiner der Patienten mit einer guten Ansprechrates wies eine komplette B Zell Depletion auf. Im Gegensatz dazu wurde jeweils bei der Gruppe mit der moderaten Ansprechrates und bei den Therapieversagern ein Patient

mit kompletter B Zell Depletion gefunden. Interessanterweise waren bei den Therapieversagern vor Behandlungsbeginn die Post Switch Memory B-Zellen erhöht, sowohl CD95+ (MW: 1423,29 ± SD: 842,98) als auch CD80+ (MW: 1280,71 ± SD: 509,55).

Bei 29 untersuchten Patienten konnte keine signifikante Korrelation zwischen den CD95+ B Zell Subpopulationen sowie den CD80+ B Zell Subpopulationen und dem DAS28 gefunden werden.

### Konklusion

Unsere Daten legen nahe, dass die komplette Depletion der B-Zelle 15 Tage nach Rituximabinfusion kein Hinweis für ein gutes Ansprechen auf diese Behandlung ist. Jedoch scheinen Patienten, die gut auf Rituximab ansprechen, eine verminderte Anzahl an CD80- und CD95-positiven Post Switch Memory B-Zellen vor Therapiebeginn zu haben (<1000 Post Switch Memory B-Zellen / 500.000 Events).

Im Gegensatz zu den SLE Patienten, konnte bei den RA Patienten keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von CD95+ und der Krankheitsaktivität gefunden werden.

## **Abstract**

### Background and Purpose

Rheumatoid Arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease characterized by chronic immune activation and production of autoantibodies. Interestingly, in RA B cells are not only responsible for the production of these autoantibodies but also activate T cells and produce proinflammatory cytokines. B cell monitoring has been extensively used to assess the effect of B cell depleting therapies (e.g. Rituximab). Using highly flow cytometry it was possible to determine whether RA patients might benefit from therapy with this monoclonal antibody. Using this method showed that RA patients treated with Rituximab have a better outcome when B cells are completely depleted 15 days after the first infusion. It was proposed that this would allow the identification of patients who will respond worse to current dosing regimens of Rituximab. The purpose of this study was to show if this is also true for our patients and to test whether B cell subsets would further help to recognize early patients that have a poor outcome.

Recently it has been shown that CD95 expression on B cells in SLE patients correlates with disease activity. Whether this is true in RA patients or not is unknown. Thus our second aim was to verify the correlation between the CD95 expression on different B cell subsets and the disease activity score 28 (DAS28) in RA patients.

### Material and Methods

29 RA patients with active disease despite therapy with TNF-antagonists were included in the study after signing informed consent. DAS28 was determined in 29 patients 2 weeks after Rituximab application and in 19 patients DAS28 was determined 24 weeks after Rituximab application. Peripheral blood cells were isolated at the same points. 500.000 cells were acquired and analyzed using a seven-channel flow cytometry (BD Canto II cytometer, Software FACSDiva). According to their surface staining B cells were divided in naïve B cells ( CD19+, IgD+, CD27-), IgD Memory B cells (CD19+, IgD+, CD27+), Post Switch Memory B cells (CD19+, IgD-, CD27+) and Double Negative B cells (CD19+, IgD-, CD27-). In addition, B cells were further characterized using CD95 and CD80. Complete depletion was defined as 0,002%, i.e. 10 events or less in 500.000 CD45+ cells. Statistical analysis was performed using SPSS (Version18.0). Mean and SD values were used.

## Results

Seven out of 19 patients (37%) who have finished week 24 showed a good EULAR response, 4 patients (21%) had a moderate EULAR response and 8 patients (42%) showed no EULAR response. Interestingly, none of the patients with a good EULAR response showed complete B cell depletion at day 15. In contrast, 1 of the patients with moderate response and 1 of the non-responders showed a complete B cell depletion. Before therapy the non-Responders had the highest elevated frequency of Post Switch Memory B cells expressing CD95 (Mean: 1423,29  $\pm$  SD: 842,98) or CD80 (Mean: 1280,71  $\pm$  SD: 509,55 ). In 29 patients no significant correlation between the frequency of CD95+ B cells and the DAS28 was demonstrated. Also no significant correlation between the frequency of CD80+ B cells and the DAS28 could be shown.

## Conclusion

The results suggest that RA patients do not benefit from a complete B cell depletion 15 days after treatment with Rituximab. Interestingly, patients with a low number of Post Switch Memory B cells before therapy, expressing CD95 or CD80 (<1000/500.000 events) will benefit more profoundly from B cell depleting therapy.

## Inhalt

<b>Danksagungen</b> .....	<b>ii</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>ix</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>xi</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Rheumatoide Arthritis.....	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Epidemiologie.....	1
1.1.3 Pathophysiologie .....	2
1.1.4 Symptome.....	6
1.1.5 Diagnosestellung .....	8
1.1.6 Dokumentation der chronischen RA .....	11
1.1.7 Therapie der Rheumatoiden Arthritis .....	16
1.2 Zielsetzung.....	24
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>25</b>
2.1 Patienten und Studienablauf .....	25
2.2 Durchflusszytometrie.....	26
2.2.1 HS-FACS-Analyse .....	27
2.3 Auswertung.....	31
<b>3 Ergebnisse – Resultate</b> .....	<b>32</b>
3.1 Hypothese 1 .....	32
3.1.1 Gute EULAR Ansprechrate.....	33
3.1.2 Moderate EULAR Ansprechrate .....	37
3.1.3 Keine EULAR Ansprechrate.....	41
3.2 Hypothese 2 .....	44
3.2.1 Korrelation nach Spearman – Erkrankungsaktivität und B-Zell- Subpopulationen .....	44
3.2.2 Verteilung der Subpopulationen.....	49
3.2.3 Korrelation nach Spearman – CD95+ Subpopulationen und CD80+ Subpopulationen.....	55

<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>58</b>
4.1	Hypothese 1 .....	58
4.2	Hypothese 2 .....	59
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>62</b>

## Abkürzungen

<b>ACPA</b>	Anti citrullinated peptide antibody
<b>ACR</b>	American College of Rheumatology
<b>AG</b>	Antigen
<b>AK</b>	Antikörper
<b>ANA</b>	antinukleäre Antikörper
<b>ASAT</b>	Aspartat-Aminotransferase
<b>BAFF</b>	B cell activating factor
<b>BSG</b>	Blutsenkungsgeschwindigkeit
<b>CD</b>	Cluster of differentiation
<b>CDAI</b>	Clinical Disease Activity Index
<b>CLL</b>	chronisch lymphatische Leukämie
<b>CRF</b>	Case Report Form
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein
<b>DAS28</b>	Disease Activity Index 28
<b>DMARD</b>	Disease modifying antirheumatic drug
<b>EULAR</b>	European League against Rheumatology
<b>Fc</b>	constant Fragment
<b>HAQ</b>	Health Assessment Questionnaire
<b>HLA-DR-Lokus</b>	humane Leukozyten Antigene D-related-Lokus
<b>HS-FACS</b>	High Sensitive-Fluorescence Acitvated Cell Sorting
<b>Ig</b>	Immunglobulin der Klasse G, M, A, D
<b>IL</b>	Interleukin
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>M</b>	männlich
<b>MCP</b>	Metacarpophalangealgelenk
<b>MHC</b>	Haupthistokompatibilitätsantigene
<b>MTX</b>	Methotrexat
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>n.s.</b>	nicht signifikant
<b>NSAR</b>	nichtsteroidales Antirheumatikum
<b>PIP</b>	proximales Interphalangealgelenk

<b>RA</b>	rheumatoide Arthritis
<b>RADAI</b>	Rheumatoid Arthritis Disease Activity Index
<b>RF</b>	Rheumafaktor
<b>s.c.</b>	subcutan
<b>SACRAH</b>	Score of Assessment and Quantification of Chronic Rheumatic Affections
<b>SDAI</b>	Simplified Disease Activity Index
<b>SJ</b>	Swollen Joints
<b>TJ</b>	Tender Joints
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor-alpha
<b>VAS</b>	visuelle Analogskala
<b>W</b>	weiblich

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4 Gating der CD19 B-Lymphozyten. a. CD45+ Zellen werden selektiert. b. T-Zellen und Monozyten werden exkludiert. c. restlichen B-Zellen werden ausgewählt. ....	29
Abbildung 5 Einstellung der Grenzen für die spezifische AK Bindung. Die Fluoreszenzen außerhalb von Q3 werden durch die Negativkontrolle hervorgerufen. ....	30
Abbildung 6 Tube 2. a. CD27 versus IgD. b. Gating von T1 und T2 .....	30
Abbildung 7 Datenausgabe.....	31
Abbildung 8 EULAR Response 24 Wochen nach Therapiebeginn .....	32
Abbildung 9 Verteilung des DAS28 vor Therapiebeginn und 6 Monate nach Therapiebeginn (*p≤0,001). ....	33
Abbildung 10 B-Zell Depletion bei guter EULAR Ansprechrate (*p≤0,001). ....	34
Abbildung 11 Verhalten der Post Switch Memory CD80+ B-Zelle bei guter EULAR Ansprechrate (*p≤0,001). ....	35
Abbildung 12 Verhalten der Post Switch Memory CD95+ B-Zelle bei guter EULAR Ansprechrate (*p≤0,001).....	36
Abbildung 13 Verhalten der B-Zelle bei moderater EULAR Ansprechrate (*p≤0,001). ...	38
Abbildung 14 Verteilung der Post Switch Memory CD80+ B-Zelle bei moderater EULAR Ansprechrate (*p≤0,001). ....	39
Abbildung 15 Verteilung der Doppelt Negativen CD95+ B-Zelle bei moderater EULAR Ansprechrate (*p≤0,001). ....	40
Abbildung 16 Verhalten der B-Zelle bei fehlender EULAR Ansprechrate (*p≤0,001). ....	41
Abbildung 17 Verhalten der Post Switch Memory CD80+ B-Zelle bei fehlender EULAR Ansprechrate (*p≤0,001). ....	42
Abbildung 18 Verhalten der Post Switch Memory CD95+ B-Zelle bei fehlender EULAR Ansprechrate (*p≤0,001). ....	43
Abbildung 19 Korrelation DAS28 und Doppelt Negative CD95+ B-Zelle .....	45
Abbildung 20 Korrelation DAS28 und Naive CD95+ B-Zelle .....	45
Abbildung 21 Korrelation DAS28 und IgD Memory CD95+ B-Zelle.....	46
Abbildung 22 Korrelation DAS28 und Post Switch Memory CD95+ B-Zelle.....	46
Abbildung 23 Korrelation DAS28 und Doppelt Negative CD80+ B-Zelle .....	47
Abbildung 24 Korrelation DAS28 und Naive CD80+ B-Zelle .....	48
Abbildung 25 Korrelation DAS28 und IgD Memory CD80+ B-Zelle.....	48
Abbildung 26 Korrelation DAS28 und Post Switch Memory CD80 B-Zelle .....	49

Abbildung 27 Verteilung der Subpopulationen vor Therapie mittels Boxplot .....	50
Abbildung 28 Verteilung der CD95+ Subpopulation vor Therapiebeginn .....	51
Abbildung 29 Verteilung der CD80+ Subpopulationen vor Therapiebeginn.....	52
Abbildung 30 Verteilung der Subpopulationen 14 Tage nach Therapiebeginn .....	53
Abbildung 31 Verteilung der CD95+ Subpopulation 14 Tage nach Therapiebeginn .....	54
Abbildung 32 Verteilung der CD80+ Subpopulationen 14 Tage nach Therapiebeginn .....	55
Abbildung 33 Korrelation Doppelt Negative CD95+ B-Zelle und Doppelt Negative CD80+ B-Zelle .....	56
Abbildung 34 Korrelation IgD Memory CD95+ B-Zelle und IgD Memory CD80+ B-Zelle .....	56
Abbildung 35 Korrelation Naive CD95+ B-Zelle und Naive CD80+ B-Zelle .....	57
Abbildung 36 Korrelation Post Switch Memory CD95+ B-Zelle und Post Switch Memory CD80+ B-Zelle .....	57

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Röntgenstadien nach Steinbrocker [6].....	9
Tabelle 2 Diagnosekriterien des ACR für die RA [5] .....	10
Tabelle 3 ACR/EULAR Kriterien der RA 2010 .....	11
Tabelle 4: EULAR Ansprechrate .....	12
Tabelle 5 Einteilung der Biologika.....	20
Tabelle 6 Verhalten der CD80+ B-Zell Subpopulationen bei guter EULAR Ansprechrate	35
Tabelle 7 Verhalten der CD95+ B-Zell Subpopulationen bei guter EULAR Ansprechrate	37
Tabelle 8 Verteilung der CD80+ Subpopulationen bei moderater EULAR Ansprechrate .	39
Tabelle 9 Verhalten der CD95+ Subpopulationen bei moderater EULAR Ansprechrate...	40
Tabelle 10 Verhalten der CD80+ Subpopulationen bei nicht vorhandener EULAR Ansprechrate .....	42
Tabelle 11 Verhalten der CD95+ B-Zell Subpopulationen bei nicht vorhandener EULAR Ansprechrate.....	43
Tabelle 12: Korrelation nach Spearman zwischen DAS28 und B-Zell-Subpopulationen CD95+ .....	44
Tabelle 13 Korrelation DAS28 und CD80+ B-Zell Subpopulationen .....	47

# 1 Einleitung

## 1.1 Rheumatoide Arthritis

### 1.1.1 Definition

Die rheumatoide Arthritis ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung, welche durch eine Autoimmunreaktion induziert wird. Gekennzeichnet durch Synovialitis, Arthritis, Bursitis und Tendovaginitis, verläuft die Erkrankung schubweise progredient und kann zu Gelenksdestruktion und Invalidität führen. Extraartikuläre Manifestationen sind möglich.

### 1.1.2 Epidemiologie

Meist beginnt die Erkrankung jenseits des 40. Lebensjahres und betrifft überwiegend Frauen (m:w=1:3) [5].

Die Prävalenz im Erwachsenenalter beträgt 1%, ab einem Alter von über fünfzig Jahren steigt die Prävalenz auf 2%. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 55. und 75. Lebensjahr. Die Prävalenz der RA ist geographischen Unterschieden unterlegen. In Nord- und Mitteleuropa sowie in Nordamerika kommt die Erkrankung häufig vor, in Entwicklungsländern hingegen selten. Dies lässt auf unterschiedliche genetische Risikofaktoren und Umwelteinflüsse, die für die Entstehung der Erkrankung eine Rolle zu spielen scheinen, zurückschließen [21].

Rauchen konnte als Risikofaktor für die Entstehung einer RA identifiziert werden. In einer Studie wurde gezeigt, dass Raucher ein doppelt so hohes Risiko haben an RA zu erkranken wie Nichtraucher [59].

Andere Risikofaktoren wie Alkohol- und Kaffeekonsum, orale Antikontrazeption, Vitamin D Status und niedriger sozioökonomischer Standard werden in der Literatur genannt. Allerdings ist der Zusammenhang zwischen diesen Faktoren und der Erkrankung wenig aussagekräftig [58].

### 1.1.3 Pathophysiologie

Rheumatoide Arthritis entsteht durch viele verschiedene Entzündungskaskaden, die alle in einem gemeinsamen finalen Ergebnis, falls dem nicht entgegengewirkt wird, nämlich der persistierenden Entzündung der Synovia und damit einhergehender Gelenkszerstörung, enden [21].

Zwillingstudien und andere genetische Untersuchungen haben gezeigt, dass die erbliche Komponente der RA im HLA-DR-Locus liegt. Die Funktion dieses Moleküls stellt die Präsentation von Peptiden an CD4-positive-T-Zellen dar [48]. Dieses arthritogene Peptid wird von synovialen Zellen, die aberrant HLA-Klasse II-Antigene und Ko-Stimulationsmoleküle tragen, präsentiert. Die T-Zelle bindet an dieses Antigen und wird aktiviert. Sie sezerniert nun Zytokine, unter anderem IL-2, die weitere T-Zellen anlocken und auch auf die B-Zelle wirken, die ebenfalls aktiviert wird und Immunglobuline, insbesondere Rheumafaktoren, sezerniert. Diese RF schließen sich zu Immunkomplexen zusammen und aktivieren das Komplementsystem [5].

Die aktivierten T-Zellen führen zu einer Einwanderung von Makrophagen in das Gewebe. Diese sezernieren TNF $\alpha$  und IL-1, welche ihrerseits Osteoklasten und Chondrozyten aktivieren, sodass Knochen und Knorpel zerstört werden. Außerdem kommt es zur Einwanderung weiterer Fibroblasten und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion [5].

Durch diese eingeleiteten Entzündungsprozesse kommt es zur Verbreiterung und zottigen Auftreibung der Synovialmembran. Die Zellen der Deckzellschicht, die normalerweise hauptsächlich aus Makrophagen und aktivierten synovialen Fibroblasten bestehen, vermehren sich. Es kommt zu T-Zell Infiltration, wobei sich die CD4-positiven T-Zellen in lymphfollikelähnlichen Strukturen mit dem Charakter eines Keimzentrums sammeln und die CD8-positiven T-Zellen infiltrieren diffus das Bindegewebe [5].

### 1.1.3.1 Die Rolle der B-Zelle

#### Die B-Zelle unter gesunden Bedingungen

Die Hauptaufgabe der B-Zelle ist die Entwicklung der antikörperproduzierenden Plasmablastzelle und Plasmazelle und der Memory-B-Zell mit der Fähigkeit Antigene bei erneutem Kontakt schneller zu erkennen [31].

Im Knochenmark entwickelt sich eine B-Zelle aus einer Stammzelle über viele Precursorstadien. Hier werden die verschiedenen Immunglobulingene neu arrangiert um eine große Bandbreite an einzigartigen Antigenbindungsspezifitäten möglich zu machen. Unreife CD10-positive-Transitional-B-Zellen, die an ihrer Oberfläche IgM / IgD exprimieren, verlassen das Knochenmark und entwickeln sich im peripheren Blut zu naiven B-Zellen. Nach Antigenkontakt und mit T-Zell Hilfe, unterzieht sich die naive B-Zelle im Follikel sekundärer lymphatischer Organe, Keimzentrumsreaktionen. Dies führt zu ihrer klonalen Variabilität, nämlich Änderungen der Ig Gene durch somatische Hypermutation und Neuordnung der schweren Ketten der Immunglobuline durch *class switch* und Affinitätsreifung. Während dieser Keimzentrumsreaktionen werden aus naiven, antigenspezifischen B-Zellen entweder Memory B-Zellen oder Ig-sezernierende Plasmazellen [2,31]. Die unterschiedlichen B-Zellen kann man an ihren Oberflächenmarkern und der unterschiedlichen Expression der einzigartigen Ig-heavy chain Isotypen (z.B. IgM, IgD, IgG, IgA) erkennen [57].

Eine weitere Aufgabe der B-Zelle ist es, genau wie T-Zellen und Makrophagen, proinflammatorische Zytokine zu produzieren. Sie haben Rezeptoren für Chemokine an ihrer Oberfläche, erzeugen diese aber auch selbst. B-Zellen können nicht nur antigenpräsentierende Zellen aktivieren, sondern auch selbst als solche agieren. Sie sind involviert in die T-Zell Aktivierung und Ausbreitung. Sie organisieren und entwickeln lymphatisches Gewebe [49]. Erfahrungen zeigen, dass bei Verlust oder Beschädigung der B-Zellen, lymphatisches Gewebe schlecht organisiert ist und, dass das Immunsystem gestört ist [50].

## Die B-Zelle bei RA

### *Produktion von Autoantikörpern.*

B-Zellen produzieren Rheumafaktoren, die gegen das Fc-Fragment von IgG gerichtet sind und Immunkomplexe bilden. Diese wiederum aktivieren über das Komplementsystem weitere B-Zellen und folliculäre dendritische Zellen. Durch diese Prozesse werden angeborenes und adaptives Immunsystem aktiviert und lokale Entzündungsprozesse in Gang gesetzt [5,49].

### Rheumafaktoren

RF werden von B-Zellen produziert. Es sind Immunglobuline der Klasse M, A und der Klasse G. Sie richten sich gegen den Fc Teil des IgG-Moleküls. Besonders RF der Ig Klasse G schließen sich zu Immunkomplexen zusammen, die sich im Gewebe ablagern können oder das Komplementsystem aktivieren. RF kommen physiologisch als unspezifische Verstärkung von AK-Reaktionen bei Infektionen vor, meistens in der Frühphase, wenn noch nicht genügend Immunglobuline vorhanden sind.

Bei der RA kommt es zu einer unphysiologischen Vermehrung dieser RF.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass ein hoher Titer an RF, vor allem die Isotypen IgG-RF und IgA-RF, mit fortschreitender Gelenksdestruktion und extraartikulären Manifestationen vergesellschaftet ist. Allerdings konnten Yazdani-Biuki et al. in ihrer Arbeit über den TNF- $\alpha$  Blocker Etanercept eine signifikante Erhöhung von IgG-RF und IgA-RF im Serum der untersuchten Patienten nachweisen, trotz verbesserten ACR Ansprechkriterien und signifikanter Verringerung des DAS28 Wertes [61].

Auch bei anderen autoimmunologischen Erkrankungen, Tuberkulose und chronischen Hepatitiden können erhöhte Werte von RF beobachtet werden.

Bei 70 bis 80% der betroffenen Patienten findet man erhöhte RF. Bei 60 bis 70 Jährigen können in 20% der Fälle erhöhte RF gefunden werden ohne Vorliegen einer RA. Deswegen sind Rheumafaktoren zwar ein wichtiger Parameter in der Diagnostik und Verlaufskontrolle der RA, aber keinesfalls beweisend für das Vorliegen einer RA, noch kann bei ihrem Fehlen die Diagnose RA ausgeschlossen werden [5].

### Antikörper gegen cyclische citrullinierte Peptide

ACPA sind Antikörper gegen cyclische citrullinierte Peptide. Sie sind gegen Proteine gerichtet, die die Aminosäure Citrullin enthalten. Diese Aminosäure entsteht aus Arginin und ihre Umwandlung findet bei vielen Synovia-Proteinen, wie zum Beispiel Fibrin und Fillagrin, statt. Studien konnten zeigen, dass das Vorhandensein dieser AK mit radiologisch schwerwiegenden Gelenksschädigungen bei RA Patienten korreliert. Diese Autoantikörper können oft schon 10 Jahre vor Krankheitsbeginn entdeckt werden [32].

ACPA kann bei 80% der RA Patienten im Frühstadium nachgewiesen werden. Sie zeigen eine Sensitivität von 70-80% und eine Spezifität von > 90%. Dies macht sie zu einem wichtigen und verlässlichen Parameter in der Diagnostik der RA [5].

Brickmann et al. untersuchten das Verhalten von RF und ACPA bei Patienten mit CLL mit oder ohne RA. Sie zeigten, dass RF bei 50% der Patienten ohne RA nachgewiesen werden konnten. Davon handelte es sich bei 41% um IgM-RF, bei 20% um IgG-RF und bei 3% um IgA-RF. Bei keinem dieser Patienten konnten ACPA nachgewiesen werden. In der Gruppe der Patienten mit chronischer lymphatischer B-Zell Leukämie und diagnostizierter rheumatoider Arthritis, konnte bei 100% der untersuchten Probanden ACPA und bei 49% IgM-RF nachgewiesen werden. Dies macht erneut ACPA, aber nicht IgM-, IgG- oder IgA-RF, zu einem sicheren Laborparameter für die Diagnosestellung der RA bei CLL [60].

### *Produktion von Zytokinen*

Studien konnten zeigen, dass B-Zellen, genau wie T-Zellen und Makrophagen, Zytokine produzieren, vor allem TNF $\alpha$ , IL-6 und Lymphotoxin, die als Wachstumsfaktoren und Differenzierungsfaktoren fungieren aber auch die Immunantwort verstärken. Sie produzieren IL-10, das folliculäre dendritische Zellen aktiviert und die B-Zelle wird erneut stimuliert und die Entzündungsreaktion erneut vorangetrieben [49].

### *Interaktion mit Chemokinen und ihren Rezeptoren*

Chemokine sind in die Formation von ektopen lymphatischen Geweben involviert. CXCL21 ist mitverantwortlich für die Rekrutierung von B-Zellen. In Studien konnte vermehrte Expression von Chemokinrezeptoren im Blut von RA Patienten nachgewiesen werden [49,51].

### *Antigenpräsentation und T-Zell Aktivierung*

Es konnte gezeigt werden, dass B-Zellen Antigene verinnerlichen und verarbeiten können. Diese Antigen-Peptide werden von B-Zellen nun über MHC-Klasse-II Moleküle den CD4+ antigenspezifischen T-Zellen präsentiert. Dadurch werden T-Zellen aktiviert, produzieren erneut  $TNF\alpha$ , was wiederum die Makrophagen aktiviert und zu weiteren proinflammatorischen Mechanismen führt [5,49]. Durch die Interaktion von CD40 auf den B-Zellen mit dem CD145 Ligand auf den T-Zellen kommt es zu Produktion von Transkriptionsfaktoren für die Bildung von Keimzentren, Veränderung der Oberflächenmoleküle, Proliferation und somatischer Hypermutation [57].

## **1.1.4 Symptome**

Rheumatoide Arthritis beschreibt ein weites Spektrum an Symptomen, die in ihrer Ausprägung stark variieren. Diese können das Leben der Betroffenen in den verschiedensten Aspekten stark beeinflussen. Die Erkrankung ist assoziiert mit Schmerzen, Gelenksteifigkeit, Müdigkeit, Erschöpfung, dem fortschreitenden Unvermögen den täglichen Aufgaben des Alltags nachzukommen, Arbeitsunfähigkeit, die unweigerlich zum Verlust der Arbeitsstelle und des Einkommens führt. Der Verlust der Lebensqualität ist eine logische Konsequenz. Nicht zuletzt kann die Erkrankung zu verfrühtem Tod führen [7].

Umso wichtiger ist es, über die genauen Symptome Bescheid zu wissen und diese auch frühzeitig zu erkennen.

### **1.1.4.1 Artikuläre Manifestation**

Die Symptome beginnen schleichend und breiten sich symmetrisch, polyartikulär aus. Bevorzugt sind kleine Gelenke in der Peripherie. Es kommt zu synovitischen Kapselverdickung mit spindelförmiger Gelenksschwellung vor allem an den Fingergrund- und Mittelgelenken, an Hand- und Zehengelenken. Die Patienten beschreiben Bewegungsschmerzen, einen schmerzhaften Händedruck (= Querdruckschmerz; Gaenslen-Zeichen) und anhaltende Morgensteifigkeit über dreißig Minuten. Die Ausbreitung der Erkrankung in den betroffenen Gelenken entwickelt sich zentripetal.

Im Laufe der Erkrankung kommt es zu deformierenden, irreversiblen Veränderungen an den kleinen Gelenken, verbunden mit starken Funktionseinschränkungen. Diese Veränderungen präsentieren sich in Form von Knopfloch-Schwanenhals Deformitäten. Hierbei handelt es sich um eine Luxation der Streck-oder Beugesehnen aus den entzündlich geschädigten Sehnengleitlagern. Weiter kommt es zu destruierenden Knochenprozessen, beginnend an den Ansatzstellen der Gelenkkapseln, welche man Usuren nennt.

Im Endstadium der RA kommt es zu einer bindegewebigen und knöchernen Überbrückung der Gelenkkörper und damit zu völligem Verlust der Bewegungsfähigkeit. Ausgespart von chronisch, destruierenden Prozessen sind die Fingerendgelenke, Brustwirbelsäule und Lendenwirbelsäule [5].

#### **1.1.4.2 Extraartikuläre Manifestation**

Außer den Gelenken sind viele weitere Gewebe und Organe betroffen. Diese Vorkommnisse sind für die Patienten mit einer zusätzlichen Belastung und Erschwernis der Erkrankung verbunden. Sie verlangen nach einer frühen Erkennung und promptem Management.

Extraartikuläre Manifestationen der RA umfassen Vaskulitis, Neuropathie, Perikartitis, Pleuritis, Felty Syndrom, opthalmologische Manifestationen wie Sicca Syndrom, Skleritis, Episkleritis, Glomerulonephritis, rheumatoide Lungenerkrankungen, Amyloidose und Rheumaknoten [9].

Neben den klassischen Manifestationen kann es auch zu extraartikulären Komplikationen kommen. Diese können sich in Form von chronischen Beinulcera, normochromer, normozytärer Anämie, osteoporotischen Frakturen, Karpaltunnelsyndrom, ischämischer Herzerkrankung, Non-Hodgkin Lymphomen und Infektionen äußern[10].

Mit einem Vorkommen von 30 % findet man Rheumaknoten als häufigste Form der extra-artikulären Manifestation[10]. Klassische Rheumaknoten sind bewegliche Knoten, meistens aufgelagert an den Streckseite der Sehnen, am Ellbogen, Olecranon, an den kurzen Sehnen der Hände, an der proximalen Ulna, am Sakrum, am Os occipitale und an den Fußsohlen. All dies sind Positionen, die einer erhöhten mechanischen Belastung ausgesetzt sind. Manchmal kommen RK in tieferem Gewebe vor, wie zum Beispiel dem Periost, Muskelfaszien oder in der entzündlich veränderten Synovia. Sie können auch die Wirbelsäule, Lunge, Herz, Herzklappen und den Gastrointestinaltrakt befallen [8].

Die Beteiligung der Lunge ist ebenfalls häufig und kann entweder durch die Erkrankung selbst oder die angewendete Therapie verursacht werden. Tatsache ist, dass Lungenerkrankungen die zweithäufigste Todesursache, gleich nach Infektionen, bei Patienten mit RA darstellen. Lungenbeteiligung betrifft zwischen 1% und 40% der Patienten [11].

Sekundäres Sjögren Syndrom und Anämie sind relativ häufig mit einem Vorkommen von 6 bis 10%.

Sie präsentieren sich oft im frühen Krankheitsstadium und sind mit erhöhter Morbidität und Mortalität verbunden[10].

Es sind keine wirklichen Prädiktoren für diese extra-artikularen Vorkommnisse bekannt aber man konnte einen Zusammenhang mit Männern, Rauchern, erhöhter Krankheitsaktivität, hohen Entzündungsparametern und dem Vorhandensein von RF, ANA zeigen [10].

### **1.1.5 Diagnosestellung**

Studien konnten zeigen, dass ein früher Therapiebeginn das klinische Outcome der RA deutlich verbessern kann. Gelenkszerstörung und Behinderung kann vorgebeugt werden [45, 46, 47]. Um möglichst früh mit einer adäquaten Therapie beginnen zu können, muss die Diagnose rheumatoide Arthritis gestellt werden:

- Labor

Unspezifische Entzündungsparameter wie erhöhtes BSG und CRP, erhöhte  $\alpha$ -/ $\beta$ -Globuline, erniedrigtes Eisen und erhöhtes Ferritin im Serum, Entzündungsanämie, selten leicht Thrombozytose und Leukozytose können Hinweise auf eine RA sein.

Rheumafaktoren, Anti-CCP, ANA und zirkulierende Immunkomplexe können bei Patienten mit RA nachgewiesen werden.

- Nachweis von Knorpel- und Gelenkveränderungen

Durch eine Sonographie der Gelenke können Synovialitis, Tendinitis, Tendovaginitis und Bursaergüsse nachgewiesen werden.

In einem Röntgen der betroffenen Gelenke können Knochenveränderungen beobachtet werden. Hierzu wurden die Röntgenstadien für die RA nach Steinbrocker entwickelt (siehe Tab. 1).

<b>Röntgenstadien der RA nach Steinbrocker</b>	
Stadium I	Eventuell gelenknahe Osteoporose
Stadium II	Zusätzlich beginnende Knorpel und Knochendestruktion
Stadium III	Zusätzlich beginnende Subluxationen und/oder Fehlstellungen
Stadium IV	Gelenkszerstörung und –deformierung, Gelenksluxation, Ankylosen

**Tabelle 1 Röntgenstadien nach Steinbrocker [6]**

In einem MRT können Inflammation, Knorpel- und Knochenerosionen bis zu 2 Jahre früher nachgewiesen werden als im Röntgen.

In der Frühphase der Erkrankung besteht die Möglichkeit ein Weichteilszintigramm zu machen, um den Nachweis einer Gelenksentzündung zu erbringen. Für den fortgeschrittenen Krankheitszustand empfiehlt sich ein Frühphase-Skelettszintigramm.

- Synovialanalyse

Hier findet man eine erhöhte Zellzahl (2000-10000 Leukozyten/ $\mu$ l). Allerdings gibt es keine typischen Veränderungen, die die RA von anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen (z.B. Psoriasis Arthritis) abgrenzt.

Als Hilfe zur Diagnosestellung für den Rheumatologen dienen hier die Kriterien des American College of Rheumatology (ACR).

<b>Diagnosekriterien des American College of Rheumatology</b>
1. Morgensteifigkeit der Gelenke von mindestens 1 h Dauer seit 6 Wochen oder länger
2. Arthritis von 3 oder mehr Gelenken: Weichteilschwellung oder Erguss gleichzeitig an mindestens 3 Gelenkbereiche seit 6 Wochen oder länger
3. Arthritis der Hand- oder Fingergelenke: Schmerzen und Schwellung von Handwurzelgelenken, PIP's oder MCP's seit 6 Wochen oder länger
4. Symmetrische Arthritis: gleichzeitiger Befall desselben Gelenkbereiches beider Körperhälften seit 6 Wochen oder länger
5. Rheumaknoten: Subkutane Knoten über Knochenvorsprüngen oder Extensorflächen oder im juxtaartikulären Bereich
6. Nachweis von Rheumafaktoren im Serum
7. Typische Röntgenveränderungen: gelenknahe Osteoporose, Erosionen

**Tabelle 2 Diagnosekriterien des ACR für die RA [5]**

Wenn ein Patient 4 der 7 Kriterien erfüllt, ist die Diagnose rheumatoide Arthritis erfüllt [5].

2010 wurden diese Kriterien neu überarbeitet in einer gemeinsamen Gruppenarbeit der ACR und der EULAR. Heraus kamen die Rheumatoide Arthritis Klassifikationskriterien 2010, die den Vorteil haben, dass RA auch in einem sehr frühen Stadium erkannt und somit auch behandelt werden kann[44].

Die Kriterien sollen eine Diagnose in einem möglichst frühen Stadium erlauben. Getestet werden sollten Patienten, die zumindest ein Gelenk mit klinisch relevanter Synovitis haben und Patienten, deren Synovitis durch keine andere Ursache erklärt werden kann.

Der Test setzt sich aus verschiedenen Fragen zusammen und für die unterschiedlichen Antwortmöglichkeiten bekommt man Punkte. Maximal sind 10 Punkte zu erreichen. Bei einer erlangten Punkteanzahl von 6 aus 10 spricht man von einer definitiven rheumatoiden Arthritis [44] (siehe Abb. 2).

Punkte	
<b>Gelenksbeteiligung</b>	
1 großes Gelenk	0
2-10 große Gelenke	1
1-3 kleine Gelenke (mit oder ohne Beteiligung großer Gelenke)	2
4-10 kleine Gelenke(mit oder ohne Beteiligung großer Gelenke)	3
>10 Gelenke (zumindest 1 kleines Gelenk)	5
<b>Serologie</b>	
Negative RF <i>und</i> negative ACPA	0
Niedrig-positive RF <i>oder</i> niedrig positive ACPA	2
Hoch-positive RF <i>oder</i> hoch-positive ACPA	3
<b>Akute Phase Reaktion</b>	
Normales CRP und normale BSG	0
Abnormales CRP oder abnormales BSG	1
<b>Dauer der Symptome</b>	
<6 Wochen	0
>6 Wochen	1

**Tabelle 3 ACR/EULAR Kriterien der RA 2010**

### 1.1.6 Dokumentation der chronischen RA

RA ist eine chronische, momentan unheilbare Krankheit. Das größte Ziel aller Beteiligten ist derzeit die Erkrankung in Remission, einen Zustand, in dem weder für den Patienten noch für den behandelnden Arzt eine Krankheitsaktivität erkennbar ist, zu führen[12]. Um dieses Ziel zu erreichen muss das komplexe Krankheitsgeschehen und jede versuchte Therapie mit ihren Erfolgen oder Misserfolgen ausführlich dokumentiert werden.

Hierzu wurden eine Vielzahl an Instrumenten entwickelt, die für die tägliche Praxis, genauso aber für große Medikamenten-Studien, verwendet werden können.

### 1.1.6.1 Zusammengesetzte Scores

Eine sehr häufig verwendete Variante ist der Disease Activity Score (DAS)28. Hierbei handelt es sich um eine kontinuierliche Skala von 0-10 mit einer kaukasischen Aufteilung, die klinisch interpretierbar und sensitiv genug ist um kleine Effekte zu detektieren[15].

22 Gelenke der Hände –beide Handgelenke, beidseits die MCP- und PIP-Gelenke-, beide Ellbogen-, beide Schulter- und beide Kniegelenke werden auf Druckschmerzhaftigkeit (TJ) und Schwellung (SJ) geprüft. Der Patient kann seine eigene Krankheitsaktivität anhand einer visuellen analog Skala (VAS 0-100) beurteilen und der Laborparameter Blutsenkungsgeschwindigkeit wird ebenfalls herangezogen. Mit einer Formel kann nun der DAS28 Wert berechnet werden.

$$\text{DAS28} = 0,56 \times \sqrt{\text{TJ}} + 0,28 \times \sqrt{\text{SJ}} + 0,7 \times \ln \text{BSG} + 0,0142 \times \text{VASPat}$$

Ein DAS28 Wert <2,6 wird als Remission definiert, die Grenze von milder zu moderater Krankheitsaktivität ist 3,2, die zu hohe Krankheitsaktivität beträgt 5,1[12].

Um den DAS28 als Therapiekontrolle interpretieren zu können, hat die European League against Rheumatism (EULAR) Ansprechkriterien entwickelt, welche die individuelle Veränderung des DAS28 Wertes und die erreichte Höhe des DAS28 Wertes verwenden[15]. Bei einem guten Ansprechen einer Therapie sollte der DAS28, bei einem bestehenden Wert von  $\leq 3,2$ , um  $> 1,2$  abnehmen. Sollte der DAS28 sich zwar um  $> 1,2$  verbessern, der DAS28 aber  $> 3,2$  zur Zeit der Untersuchung betragen, dann spricht man von einem moderaten Ansprechen. Moderat ist auch eine Verbesserung des DAS 28, falls der Score  $< 5,1$  ist und sich nur zwischen  $\geq 0,6$  und  $\leq 1,2$  verbessert hat. Als Non-Responder werden Patienten definiert, deren DAS28 sich um nur  $< 0,6$  verbessert [12].

Aktueller DAS28	DAS28 Verminderung		
	$> 1,2$	$> 0,6$ bis $\leq 1,2$	$\leq 0,6$
$\leq 3,2$	GUT	MODERAT	NON-RESPONDER
$> 3,2$ bis $\leq 5,1$	MODERAT		
$\geq 5,1$			

Tabelle 4: EULAR Ansprechräte

Ein vereinfachtes Instrument zur Beurteilung der Krankheitsaktivität ist der Simplified Disease Activity Index (SDAI). Auf Schwellung und Druckschmerz werden hier ebenfalls wieder 28 Gelenke untersucht. Die visuelle Analogskala des Patienten (0-10), CRP (mg/dl) und als neuer Parameter, die Krankheitsbeurteilung des Untersuchers (VAS Unt 0-10), werden in diesen Index mit einbezogen. Durch eine weitere Formel kann man nun die Krankheitsaktivität berechnen.

$$\text{SDAI}=\text{TJ}+\text{SJ}+\text{VASPat}+\text{CRP}(\text{mg/dl})+\text{VASUnt}$$

Die Remissionsgrenze ist bei  $\leq 3,3$  angesetzt, moderate Aktivität liegt bei dem SDAI Wert 11 und zu hohe Aktivität bei dem Wert 26.

Ganz ohne Laborparameter kommt der Clinical Disease Activity Index (CDAI) aus. Zur Berechnung der Krankheitsaktivität werden wieder druckschmerzhaft und geschwollene Gelenke zusammengezählt, außerdem werden die VASPat und die VASUnt herangezogen. Durch Addition aller Werte ergibt sich die Formel für den CDAI.

$$\text{CDAI}=\text{TJ}+\text{SJ}+\text{VASPat}+\text{VASUnt}$$

Der Remissionsgrenzwert liegt hier bei  $\leq 2,8$ , für milde zu moderater Krankheitsaktivität ist der Wert 10 und für hohe Aktivität 22 festgelegt.

Die Einfachheit dieser Instrumente ermöglicht es den Patienten, ihre eigene Krankheitsaktivität besser zu verstehen [13].

In Studien konnte gezeigt werden, dass SDAI und CDAI auf Gruppenniveau sehr gut miteinander korrelieren und auch Therapieänderungen und deren Auswirkungen gut nachvollzogen werden können. Weiter korrelieren die Kriterien von SDAI und CDAI signifikant mit dem DAS28, außer dem Kriterium der Remission. Hierbei sind CDAI und SDAI restriktiver als der DAS28 [12,13]. Aus diesem Grund wurde ein Grenzwert für Remission bei DAS28 postuliert, welcher bei  $< 2,4$  angesetzt ist [15].

### 1.1.6.2 Patientenzentrierte Instrumente

Um Krankheitsaktivität zu erfassen ist es wichtig neben Laborparametern, radiologischen Untersuchungen und Einschätzung der Untersucher, den Patienten und sein Krankheitsgefühl mit einzubeziehen. Aus diesem Grund gibt es Fragebögen, die vom Patienten alleine ausgefüllt werden.

Ein solcher Fragebogen ist der Rheumatoid Arthritis Disease Activity Index (RADAI). Der Patient beurteilt hier selbst die Krankheitsaktivität in den letzten 6 Monaten. Die momentane Krankheitsaktivität anhand seiner derzeit geschwollenen und druckschmerzhaften Gelenke, den derzeitigen Schmerz durch die RA, die Dauer der Morgensteifigkeit und die schmerzhaften Gelenke in ausgewählten Regionen werden mit einbezogen [14]. Der RADAI Score reicht von 0-10.

Es ist auch eine verkürzte Form verfügbar, der RADAI-5. Hier wird die Selbsteinschätzung der Gelenke weggelassen und eine Frage zum Allgemeinbefinden hinzugefügt. 5 Likert-Skalen von 0-10 werden addiert und das Ergebnis durch 5 dividiert. Ein Score von 0-10 ist möglich. Studien konnten auch hier eine gute Korrelation zum DAS28 zeigen. RADAI sagt mehr über die Krankheitsaktivität-Einschätzung aus, während DAS28 mehr die klinische Beurteilung betont. Insofern könnte ein RADAI nie einen DAS28 ersetzen. Dennoch stellt es ein gutes Instrument für den rheumatologisch nicht Geschulten dar und ist wesentlich Zeit sparer als DAS28, CDAI und SDAI [12,14].

Die Behinderung des Patienten im Alltag durch die rheumatoide Arthritis kann mittels dem Health Assessment Questionnaire (HAQ) erhoben werden. Er umfasst 20 Fragen, die in 8 Untergruppen unterteilt sind, wie z.B. Körperpflege, Gehen, Essen, Anziehen etc. Die Fragen werden beantwortet, ob die Tätigkeiten ohne, mit geringer oder großer Schwierigkeiten oder gar nicht ohne fremde Hilfe bewältigt werden können. 0-3 Punkte gibt es pro Antwort. Die am schlechtesten beantworteten Fragen werden zusammengezählt, das Ergebnis durch 8 dividiert. Danach ergibt sich ein Wert zwischen 0,0 und 3,0 [12]. Der HAQ ist abhängig von Krankheitsaktivität, Schmerz und psychosozialen Faktoren und viel weniger von strukturellen Veränderungen wie Gelenksdestruktion. Er verläuft chaotisch, erst geglättet auf die Jahre kann man Tendenzen in Richtung Steigerung der Lebensqualität oder Verschlechterung sehen [17].

Da die RA häufig zu starker Beeinträchtigung der Handfunktionen führt, gibt es auch hierfür ein Instrument um diese Einschränkung genau quantifizieren und dokumentieren zu können.

Der Score for Assessment and Quantification of Chronic Rheumatic Affections of the hands (SACRAH) umfasst drei Domänen: Handfunktion, Steifigkeit und Schmerz. Dieser Test ist auch validiert für die Hand-Osteoarthritis sowie sensitiv zu therapiebedingten Verbesserungen der RA [12].

### **1.1.6.3 Die Kriterien des American College of Rheumatology**

Neben den bekannten ACR Kriterien für die Diagnosesicherung einer Rheumatoiden Arthritis gibt es auch ACR Kriterien zur Bestimmung der Krankheitsaktivität und Remissionskriterien des ACR.

Zur Evaluierung der Krankheitsaktivität werden geschwollene Gelenke, druckschmerzhafte Gelenke, VASUnt, VASPat, VASSchmerz, der HAQ, sowie BSG oder CRP herangezogen. ACR 20%, 50% und 70% sagen aus, um wie viel Prozentpunkte sich der Zustand des Patienten verbessert hat. Die Anzahl der SJ und TJ müssen sich beide um den jeweiligen Prozentsatz verringert haben, von den übrigen 5 Parametern müssen sich zumindest 3 ebenfalls um den gleichen Prozentwert verbessert haben [16].

Klinisch relevant ist erst eine Verbesserung von ACR 50%. ACR 20% ist für den Patienten subjektiv kaum wahrnehmbar [12].

Die Remissionskriterien umfassen Morgensteifheit <15 min., keine Müdigkeit, anamnestisch kein Gelenkschmerz, kein Druck- und Bewegungsschmerz, keine Weichteilschwellung von Gelenken oder Sehnenscheiden und BSG <30 mm/h für Frauen oder <20 mm/h für Männer. Für totale Remission müssen 5 Kriterien in den 2 letzten aufeinander folgenden Monaten erfüllt sein [16].

Die ACR Kriterien wurden ursprünglich als Hilfsmittel für die Vergleichbarkeit der Patienten in klinischen Studien entwickelt und sind eigentlich nicht für das klinische Management gedacht [16].

Außerdem zeigt sich wiederum in Studien, wie auch schon beim DAS28, dass CDAI und SDAI in ihren Remissionskriterien restriktiver sind [12].

Zahlreiche Scores lassen eine klinische und patientenorientierte Beurteilung des Einzelnen, aber auch den Vergleich in größeren Gruppen oder Studien zu.

Durch die Kombination unterschiedlicher Instrumente wird der eigentliche Experte der Erkrankung, der Patient selbst, in den Prozess gut eingebunden und gemeinsam kann man versuchen ein bestmögliches Ergebnis zu erzielen.

### **1.1.7 Therapie der Rheumatoiden Arthritis**

Das Ziel einer Therapie bei rheumatoider Arthritis ist es, den Krankheitsverlauf nachhaltig positiv zu beeinflussen. Entscheidend für den weiteren Krankheitsverlauf ist eine effektive, modifizierte Therapie sofort nach Diagnosestellung.

Hierfür gibt es verschiedene Herangehensweisen und für jeden Patienten muss individuell das bestmögliche Konzept zusammengestellt werden.

#### **1.1.7.1 Nicht pharmakologische Therapie**

Es gibt unzählige Medikamente um die RA zu behandeln. Trotz dieses Angebots bleibt bei manchen Patienten ein gewisses Maß an Krankheitsaktivität bestehen, das die Patienten im Alltag behindert und zu Schmerzen und Gelenksdestruktion führt.

Natürlich helfen die Medikamente speziell für die RA hervorragend, doch wie jedes andere Medikament haben auch diese, manchmal sogar erhebliche Nebenwirkungen. Um diesen entgegenzuwirken gibt es ein nicht pharmakologisches Management der RA[18].

##### **Aufklärung**

Hierbei wird die Natur der Erkrankung genauestens mit dem Patienten besprochen und es wird über alle möglichen Therapieoptionen diskutiert [18].

##### **Physiotherapie**

Ziel der Physiotherapie ist die Reduktion von Schmerzen, Entzündung und Erhaltung der Gelenksfunktion [18].

## Ernährung

Mit einer adäquaten Ernährung soll etwaiges Übergewicht reduziert werden außerdem werden Omega 3 Fettsäuren empfohlen. Diese führen zu einer Veränderung im Arachidonsäure- und Zytokinmetabolismus und führen zu einer Reduktion der Symptome der RA [18].

## Osteoporosevorsorge

Das Risiko für Osteoporose scheint bei RA erhöht zu sein und zusätzlich steigt es erheblich durch längere Glukokortikoidtherapie. Deswegen ist eine regelmäßige Zufuhr von Kalzium und Vitamin D äußerst wichtig [18].

## Vermeidung kardiovaskulärer Risikofaktoren

RA Patienten zeigen ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko, deswegen sollten bekannte Risikofaktoren wie Rauchen, Hypercholesterinämie, Hyperlipidämie, Hypertonie und Lebensstil beseitigt oder gut eingestellt werden [18].

## Impfungen

Totimpfstoffe sind bei immunsupprimierten Patienten eine präventive Maßnahme des Gesamtkonzepts. Oft ist mit einem verminderten Impfansprechen zu rechnen, deswegen sind Titerkontrollen empfohlen. Lebendimpfstoffe sind bei immunsupprimierter Therapie kontraindiziert [18]

### **1.1.7.2 Analgesie**

Es ist fast immer der Schmerz, der den Patienten zum Arzt bringt. Um dem Patienten kurzfristig zu helfen, müssen alle schmerztherapeutischen Möglichkeiten ausgeschöpft werden. Zur Verfügung stehen NSAR, Opioide, Antidepressiva, Antikonvulsiva und auch zunehmend topisch applizierte Analgetika [18].

### 1.1.7.3 Disease modifying antirheumatic drugs (DMARD'S)

Generell gilt, dass vor dem Einsatz von Biologica eines oder mehrere DMARD's ohne ausreichenden Erfolg zum Einsatz gekommen sein müssen [18].

#### Methotrexat

MTX ist ein Folsäureantagonist. Es wird als erstes konventionelles DMARD eingesetzt, falls keine Kontraindikationen bestehen. Diese wären vor allem vorbestehende Leber- und Lungenerkrankungen. Die Verabreichung erfolgt wöchentlich per os. Man beginnt mit 7,5 – 10 mg / Woche und steigert die Dosis schrittweise bis zu einem wöchentlichen Maximum von 25-30 mg. Die Wirkung tritt nach etwa 6 Wochen ein. Der Wirkmechanismus besteht in der Reduktion von Cytokinsynthese (z.B IL-1).

Als Nebenwirkungen können Störungen des Gastrointestinaltrakts auftreten. Es kann zu Leberschädigung, Leukopenie, Thrombozytopenie, Nierenschädigung, Impotenz, Depression und Antriebslosigkeit kommen. MTX wirkt teratogen, deswegen sollte bei Frauen im gebärfähigen Alter eine strikte Empfängnisverhütung erfolgen.

Bei MTX Therapie ist ein regelmäßiger Alkoholkonsum wegen der Hepatotoxizität zu vermeiden.

Wirkung und Nebenwirkungen sollten anfangs alle vier bis acht Wochen mittels Blutbild, Leberfunktionswerten und Anamnese kontrolliert werden.

Die Verabreichung von Folsäure (2,5-5 mg/Woche 24 h nach MTX Gabe) kann die hämatologischen und gastrointestinalen Nebenwirkungen vermindern [18].

Als Alternativen zu MTX stehen Antimalariamittel, wie Hydroxychloroquin, Sulfasalazin und Leflunomid zur Verfügung [18].

Hydroxychloroquin wird nur mehr in Kombination und vor allem bei älteren Patienten mit leichtem Krankheitsverlauf eingesetzt [18].

Sulfasalazin ist eine Molekülverbindung aus dem Sulfonamid Sulfapyridin und dem Salicylat Mesalazin, das antiphlogistisch wirksam ist. Es wird bei mittelschwerer Krankheitsaktivität eingesetzt. Die Dosierung beträgt 2-3x 1000 mg / Tag. Unerwünschte Wirkungen sind Übelkeit und Erbrechen, Hautallergien, Urticaria, Leukopenie und Megaloblastenanämie.

Leflunomid führt zu einer Verringerung der Proliferation der aktivierten T-Lymphozyten. Der aktive Metabolit wird als A771726 bezeichnet und zeichnet sich durch eine hohe Plasmaproteinbindung aus. Eine Tagesdosis von 20 mg ist bei der RA indiziert.

Unerwünschte Wirkungen wie Diarrhoe, Infektion der Atemwege, Übelkeit, Kopfschmerzen, Alopezie und Leberschäden können vorkommen. Wegen der teratogenen Wirkung ist auch hier eine strenge Empfängnisverhütung notwendig.

Bei Nichtansprechen einer Monotherapie, ist die Kombination aus 2 oder 3 DMARD's möglich und verspricht eine verbesserte Wirkung [18].

#### **1.1.7.4 Glukokortikoide**

Kurzzeitig angewandte Glukokortikoidtherapie führt zu einer Reduktion der Synovitis. Bei einer längerfristigen Anwendung kommt es zwar zu einer Abnahme der Gelenkszerstörung, andererseits treten unerwünschte Nebenwirkungen, wie Infektionen und Osteoporose auf. Aus diesem Grund sind Glukokortikoide bei der RA nur in 2 Fällen, unter strenger Kontrolle, indiziert. Zum einen kommen sie bei akuter Krankheitsprogression zum Einsatz, um die Zeitspanne bis zum Wirkungseintritt anderer, langsam wirkender Medikamente, wie z.B. DMARD's, zu überbrücken. Hier werden Glukokortikoide oral oder intramuskulär eingenommen. Zum Anderen werden sie intraartikulär verwendet, zur hocheffektiven lokal Therapie bei einzelnen aktivierten Gelenken [21].

#### **1.1.7.5 Biologika**

Bei den Biologika handelt es sich um spezifische Inhibitoren bestimmter Moleküle oder Signalübertragungsschritte (monoklonale Antikörper, Rezeptorantagonisten). Die Prinzipien hierbei sind die Hemmung von Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , Interleukin 1 und 6, die Kostimulationsblockade und die B-Zell Depletion[18].

Substanz	Wirkprinzip
Adalimumab	TNF- $\alpha$ -Blocker
Etanercept	
Infliximab	
Certolizumab	
Golimumab	
Tocilizumab	IL-6 Hemmer
Abatacept	Kostimulationsblockade
Rituximab	B-Zell Depletion
Anakinra	IL-1 Hemmer

**Tabelle 5 Einteilung der Biologika**

#### TNF- $\alpha$ -Blocker

TNF- $\alpha$  Blocker sind die ersten Biologika, die entwickelt und eingesetzt wurden. Sie sind seit 1998 zur Therapie der RA zugelassen. Zur Anwendung kommen sie bei ungenügendem Therapieansprechen auf Methotrexat und andere DMARD's. Sie werden oft in Kombination mit Methotrexat oder einem anderen Basistherapeutikum gegeben [20].

*Infliximab* ist ein chimerischer monoklonaler Antikörper gegen TNF  $\alpha$ . Das Medikament wird alle vier bis acht Wochen i.v. verabreicht.

*Etanercept* ist ein TNF-Rezeptor-2-Immunglobulin-Hybridmolekül, dessen Funktion darin besteht, TNF $\alpha$  zu binden, bevor es den körpereigenen TNF- Rezeptor erreicht. Die Substanz wird ein-bis zweimal wöchentlich s.c. verabreicht.

*Adalimumab* ist ein vollhumaner monoklonaler Antikörper, der alle zwei Wochen s.c. verabreicht wird.

*Certolizumab* ist ein pegylierter, vollhumaner Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, der sowohl membranständiges als auch zirkulierendes TNF $\alpha$  neutralisiert. Er besteht aus einem Fab-Teil eines humanisierten Antikörpers und Polyäthylenglycol. Die Gabe erfolgt ebenfalls alle zwei Wochen s.c..

*Golimumab* ist ein humaner Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, der wie Certolizumab, membranständiges und zirkulierendes TNF $\alpha$  neutralisiert. Er wird einmal im Monat s.c. verabreicht [18,20].

## Tocilizumab

Tocilizumab ist der erste humanisierte monoklonale Antikörper, der gegen den Interleukin-6 Rezeptor gerichtet ist. Er ist seit Anfang 2009 in Österreich zugelassen. Interleukin 6 ist ein stark proinflammatorisches Zytokin, das wesentlich an der Akute-Phase-Reaktion beteiligt ist. IL-6 steuert die Bildung von C-reaktivem Protein, hat direkten Einfluss auf T- und B-Zellen, auf Granulozyten und Monozyten sowie auf Endothelzellen und fördert somit den Entzündungsprozess und die Bildung von Autoantikörpern. Des Weiteren hemmt IL-6 die Aktivität der Osteoblasten und fördert die Ausbildung reifer Osteoklasten mit dem Endresultat von Usuren und generalisierter Osteoporose.

IL-6 wird bei RA Patienten in erhöhter Konzentration in der Synovialflüssigkeit und im peripheren Blut nachgewiesen [20].

Unter einer Therapie mit Tocilizumab konnte in 5 randomisierten doppelblinden multizentrischen Studien eine deutliche Verzögerung der radiographisch feststellbaren Gelenkerstörung gezeigt werden [33,34,35,36].

Tocilizumab kann als Monotherapie, ohne vorherige Anwendung eines TNF $\alpha$ -Blockers, bei der RA eingesetzt werden. Die Kombination mit MTX oder einem anderen Basistherapeutikum hat sich ebenfalls als wirksam erwiesen [20].

Bei der Verabreichung ist keine Prämedikation erforderlich. Es wird jeweils eine 1-stündige Infusion in einer Dosis von 8mg/kg KG im 4-wöchentlichen Abstand verabreicht. Die häufigsten Nebenwirkungen sind Infektionen, wobei jedoch die Rate von opportunistischen oder mykobakteriellen Infektionen nicht erhöht war. Transaminasenerhöhung und Neutropenien wurden häufig beobachtet [33,34,36]. Vor Beginn der Therapie wird ein Tuberkulosescreening empfohlen. Im Verlauf sind regelmäßige Kontrollen von Blutbild, Leber- und Fettwerten indiziert.

## Abatacept

Abatacept ist ein Hybridmolekül aus dem negativen kostimulatorischen Rezeptor CTLA-4 und Immunglobulin. Der Wirkungsmechanismus beruht darauf, dass es an den CD80/86-Rezeptor antigenpräsentierender Zellen bindet und somit die Interaktion von CD80/86 mit CD28 auf T-Zellen verhindert. Dadurch hemmt es selektiv das für die T-Zell-Aktivierung erforderliche zweite Signal bei Bindung des T-Zell-Rezeptors an im MHC-Rahmen präsentierenden Antigen. Der Einsatz von Abatacept unterstützt das Konzept, dass T-Zellen, genauso wie B-Zellen, entscheidend an der RA-Pathogenese beteiligt sind [20].

Abatacept ist seit Mai 2007 in Österreich zugelassen. Signifikant höhere ACR20-, ACR50- und ACR 70- Ansprechraten, nach Versagen einer TNF $\alpha$ -Blocker Therapie, auf Abatacept im Gegensatz zu Placebo konnten in der ATTAIN Studie nachgewiesen werden [38,39]. Unter der Therapie bessern sich die Symptome der RA und die radiographische Progression kann verzögert werden [37].

Der Kostimulationshemmer ist für den Einsatz in Kombination mit MTX zugelassen. Die Dosierung wird nach dem Gewicht berechnet. Patienten unter 60 kg erhalten 500 mg, zwischen 60 und 100 kg bekommt man 750 mg und wer über 100 kg wiegt, bekommt 1000 mg Abatacept. Die Substanz wird als Kurzinfusion über 30 Minuten infundiert und die zweite Gabe erfolgt nach zwei Wochen, danach wird auf einen 4 wöchigen Modus umgestellt. Abatacept hat einen langsamen Wirkungseintritt, der bis zu 6 Monaten dauern kann [20].

Bei dieser Substanz zeigt sich ein sehr günstiges Nebenwirkungsprofil. Neben klassischen Infusionsreaktionen kam es bei einer kleinen Gruppe zu Antikörperbildung, was zum Therapieabbruch führte, und einige schwerwiegende bakterielle Infektionen wurden dokumentiert. Deswegen empfiehlt sich ein aktuelles Tuberkulosescreening und Hepatitis screening vor Therapiebeginn. Regelmäßige Blutbildkontrollen mit BSG, CRP, ASAT und Kreatinin sollten durchgeführt werden [40].

#### Anakinra

Anakinra ist ein humaner Interleukin-1-Rezeptor Antagonist, der gentechnisch aus E.coli hergestellt wird. Die Wirkung von IL-1 $\alpha$  und IL-2 $\beta$  wird kompetitiv am Rezeptor gehemmt. Zur Therapie der RA wird Anakinra in Kombination mit MTX angewendet. Die Gabe erfolgt täglich mit 100 mg s.c. Nebenwirkungen sind hier häufig und zeigen sich vor allem in Reaktionen an der Einstichstelle, schweren Infektionen und Neutropenie. Kontraindiziert ist eine gleichzeitige Gabe von Anakinra und TNF- $\alpha$  Blockern [4].

#### Rituximab

Rituximab ist ein chimärer monoklonaler Anti-CD20-Antikörper, der selektiv B-Zellen, die den Oberflächenmarker CD20 tragen, depletiert. Er wird seit 1998 erfolgreich in der Hämatonkologie bei der Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen eingesetzt. Die Depletion der CD20 positiven Zellen erfolgt über drei Mechanismen, nämlich

komplementvermittelte Zytotoxizität, zellvermittelte Zytotoxizität und direkte Apoptoseinduktion [20].

Seit 2006 ist Rituximab für die Therapie der RA zugelassen. In der REFLEX Studie wurde gezeigt, dass nach Nichtansprechen auf TNF $\alpha$ -Blocker, Patienten, die eine Therapie mit Rituximab und MTX bekamen, ein signifikant häufigeres ACR20 Ansprechen aufwiesen als die Placebo Gruppe [41]. Weitere Studien konnten belegen, dass Krankheitssymptome wie Schmerzen, geschwollene, druckschmerzhaft Gelenke und ein Fortschreiten der Gelenkszerstörung signifikant reduziert werden konnten. Auch die Lebensqualität der Patienten konnte gesteigert werden [52, 54].

Keystone E. et al. und Cohen SB et al. konnten zeigen, dass Rituximab das einzige in der RA zugelassene Biologikum ist, das auch bei schwer und lange erkrankten Patienten, die unzureichend auf TNF-Blocker angesprochen haben, die Gelenkszerstörung aufhalten kann [56, 53].

In der Regel wird Rituximab heute in einer Dosis von 1000mg im 14 tägigen Abstand verabreicht. Das klinische maximale Ansprechen wird nach 3-5 Monaten erwartet, die Effekte halten dafür aber auch 6-12 Monate [20].

In Langzeitstudien konnten keine schweren bakteriellen Infektionen belegt werden [40,42]. Am ehesten kann es zu Infusionsreaktionen mit grippeähnlichen Symptomen kommen, was zu einem gewissen Teil auf den akuten Zerfall der B-Zellen zurückzuführen ist [20].

Vor der Gabe sollte eine Impfkontrolle erfolgen, da Schutzimpfungen unter B-Zell-Depletion nicht sicher wirksam sind [43].

## 1.2 Zielsetzung

Es gibt derzeit eine Vielzahl an Therapieoptionen für die RA. Bei unterschiedlichen Krankheitsmechanismen wird angesetzt um den Krankheitsverlauf zu verlangsamen oder gar zu stoppen. Leider gibt es bisher keine Kriterien, die ein optimales Therapeutikum schon vor Beginn der Therapie zuordnen können. Erst der Krankheitsverlauf entscheidet, ob ein Therapeutikum geeignet oder ungeeignet ist.

Diese Studie soll helfen, Rituximab als Therapieoption für die RA besser zu verstehen und eventuelle Charakteristika und Interaktionen aufzudecken. Des Weiteren soll die Rolle der B-Zelle bei der Pathogenese der RA und ihr Verhalten auf B-Zell depletierende Therapie untersucht werden.

Dass et al. beschrieben in ihrer Publikation zum ersten mal einen Zusammenhang zwischen kompletter B-Zell Depletion unter Rituximab Therapie und einem besseren EULAR Response. Hierzu wurden die Blutproben der Patienten mittels HS-FACS untersucht. B-Zellen unter  $0.0001 \times 10^9$  /Liter wurden als komplette Depletion definiert. Patienten, die dieses Merkmal aufwiesen, hatten einen besseren Krankheitsverlauf, als Patienten, die keine komplette B-Zell Depletion nach der ersten Infusion aufweisen konnten [1].

Hypothese 1, die im Rahmen der Studie überprüft wurde:

**Patienten, die nach der 1. Infusion mit Rituximab eine komplette B-Zell Depletion erreichen, erzielen einen besseren EULAR- Response.**

Jacobi et al. konnten eine Population von atypischen, aktivierten Memory B-Zellen charakterisieren, die bei SLE Patienten mit Exazerbation der Erkrankung erhöht sind. Hierbei handelt es sich um Doppelt Negative B-Zellen, die den Oberflächenmarker CD95 tragen. Dieser Marker könnte weiteren Aufschluss über die Rolle der B-Zelle bei Entstehung dieser Erkrankung geben und als Marker für die Krankheitsaktivität fungieren [3]. Interessant wäre, zu erfahren, ob diese aktivierte Memory B-Zelle bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen erhöht ist und eine wesentliche Rolle im Krankheitsmechanismus spielt. Deswegen die 2. Hypothese, die geklärt werden soll:

**Bei RA Patienten korreliert die Frequenz von CD95+ CD27- IgD- B-Zellen mit der Erkrankungsaktivität.**

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patienten und Studienablauf**

Erfasst wurden alle Patienten mit rheumatoider Arthritis an allen österreichischen Rheumazentren, bei denen die Behandlung mit Rituximab routinemäßig indiziert ist.

Bei unserem zeitlichen *cut off* im Juni 2010 hatten sich 29 Patienten dem ersten Zyklus mit Rituximab unterzogen (14 Tage nach Therapiebeginn) und 19 Patienten befanden sich in Woche 24 nach Therapiebeginn.

#### Einschlusskriterien

Die Diagnose einer rheumatoiden Arthritis musste von einem Rheumatologen gestellt werden und die Indikation für Rituximab musste bestehen. Diese sind unbefriedigend hohe Krankheitsaktivität trotz vorangegangener TNF-Blockade oder Kontraindikationen gegen TNF-Blocker.

#### Ausschlusskriterien

Patienten, die mit Rituximab aus einem anderen Grund als rheumatoide Arthritis behandelt wurden.

Das Behandlungsschema bestand zunächst aus einem 1. Zyklus. Die Patienten bekamen 1000 mg Rituximab am 1. Tag und 1000 mg an Tag 15. Bei Erfolg und guter Verträglichkeit bekamen sie den nächsten Zyklus frühestens nach 6 Monaten. Dieser bestand erneut aus 1000 mg Rituximab im Abstand von 14 Tagen.

Die Blutabnahmen erfolgten vor jeder Infusion mit Rituximab. Die Blutproben wurden an das Universitätsklinikum Graz geschickt und dort mittels HS-FACS analysiert. Besonderes Augenmerk wurde auf die Naive B-Zelle ( CD19+, IgD+, CD27-), die IgD Memory B-Zelle ( CD19+, IgD+, CD27+), die Post Switch Memory B-Zelle (CD19+, IgD-, CD27+) und die Doppelt Negative B-Zelle ( CD19+, IgD-, CD27-) gelegt. Zusätzlich wurden die einzelnen Subpopulationen durch ihre Oberflächenmarker CD95+ und CD80+ charakterisiert.

Um die Befunde der Blutproben mit dem klinischen Zustand eines jeden Patienten vergleichen zu können, bekamen die Patienten einen Fragebogen (*Case report form*) vor jeder Infusion, den sie gemeinsam mit ihrem behandelnden Arzt ausfüllen sollten.

Um Anonymität zu gewähren, bekam jeder Patient eine Fallnummer, die auf dem CRF und der HS-FACS aufschien.

Demographische Daten, wie Geburtsjahr und Geschlecht wurden eingetragen. Des Weiteren wurden die Diagnosekriterien der ACR ausgefüllt, bisherige Therapien mit anderen Biologika und DMARD's wurden dokumentiert. Am jeweiligen Tag der Infusion mit Rituximab wurde davor gemeinsam mit der Blutabnahme ein DAS28, ein CDAI und ein RADA I des Patienten erstellt. Dann wurde dokumentiert in welcher Dosis Rituximab verabreicht wurde und etwaige Prämedikationen oder Begleitmedikationen wurden notiert. Die genaue Infusionsdauer und Nebenwirkungen wurden festgehalten. Dieses Procedere wurde vor jeder weiteren Infusion durchgeführt und die ausgefüllten CRF's wurden an das LKH Graz, Abteilung für Rheumatologie und Immunologie gesandt.

So konnte der jeweilige Krankheitsverlauf während der Therapie überprüft werden. Hierzu wurden die EULAR – Ansprechkriterien zwischen den unterschiedlichen Therapiestadien als Marker herangezogen.

## **2.2 Durchflusszytometrie**

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen des Blutes oder des Knochenmarks durch Vibration in Einzelsuspension gebracht und in Tröpfchenform an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Photomultiplikatoren messen die Streuung des Laserlichtes. Vorwärts Lichtstreuung (FSC) korreliert mit der Größe der Zellen und seitliche Lichtstreuung (SSC) korreliert mit Granularität, bzw. der Kern/Plasma Relation der Zelle. So lassen sich große Zellen mit großer Plasma/Kern Relation und granuliertem Plasma (z.B. Granulozyten) von kleinen Zellen mit hohem Kernanteil (z.B. Lymphozyten) abgrenzen. Monozyten zeigen ein intermediäres Verhalten [5].

Zur weiteren Untersuchung können Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern markiert werden. So kann man charakteristische Oberflächenstrukturen auf den B-Zellen bestimmen. Grün-

fluoreszierende AK gegen T-Zellen (CD3-FITC) und gelbrot fluoreszierende AK gegen B-Zellen (CD19-PE) sind ein Beispiel hierfür. Die speziell gewonnenen Antikörper werden mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert, damit sie später im Durchflusszytometer detektiert werden können. Um die unspezifische Bindung von der spezifischen Bindung unterscheiden zu können, verwendet man Isotyp-Antikörper als Negativkontrolle. Bei diesem Antikörper handelt es sich um einen AK, der dem untersuchten AK möglichst ähnlich ist. Er wird mit dem gleichen Fluorchrom konjugiert, verfügt aber nicht über die jeweilige Bindungsstelle. So kann man ein Niveau für die Hintergrundfluoreszenz festlegen und Signale über diesem Level können als spezifische Bindung angesehen werden [22].

Um sich auf die richtigen Zellen konzentrieren zu können, besteht bei der Auswertung die Möglichkeit des „Gating“. Hierunter versteht man das Auswählen bestimmter Regionen und Zellpopulationen im Dot-Plot (Punktwolkendarstellungen), wodurch die selektierten Zellen einzeln betrachtet oder exkludiert werden können [26].

### **2.2.1 HS-FACS-Analyse**

Die Analyse der B-Zellen erfolgte mittels einer HS-FACS-Analyse. Hierbei wurden aus heparinisiertem Blut (2x 9ml) mittels Dichtegradientenzentrifugation die Zellen isoliert, mit unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern markiert und im Durchflussmeter analysiert. Es wurde der FACS-Cantor II verwendet, mit dem eine simultane 7-Farben Analyse möglich war.

Bei der HS-FACS werden 500.000 – 1.000.000 Zellen analysiert. Das unspezifische Bindungsverhalten wird durch Ko-Färbung mit Markern für T-Zellen (CD3) und Monozyten (CD14) bestimmt.

Die Zielpopulation sind CD45+, CD19+, CD3-, CD14-B-Zellen.

Das verwendete Antikörperpanel bestand aus:

Isotypen-Kontrollen

IgD-FITC, CD27-APC, CD38-PE/Cy7, CD45-APC/H7, CD19-HorizonBlue, CD24-PE, CD3-/CD14-PerCP.

IgD-FITC, CD27-APC, CD38-PE/Cy7, CD45-APC/H7, CD19-HorizonBlue, CD80-PE, CD3-/CD14-PerCP.

IgD-FITC, CD27-APC, CD38-PE/Cy7, CD45-APC/H7, CD19-HorizonBlue, CD95-PE, CD3-/CD14-PerCP.

Die B-Zell-Subpopulationen, die bestimmt wurden, sind:

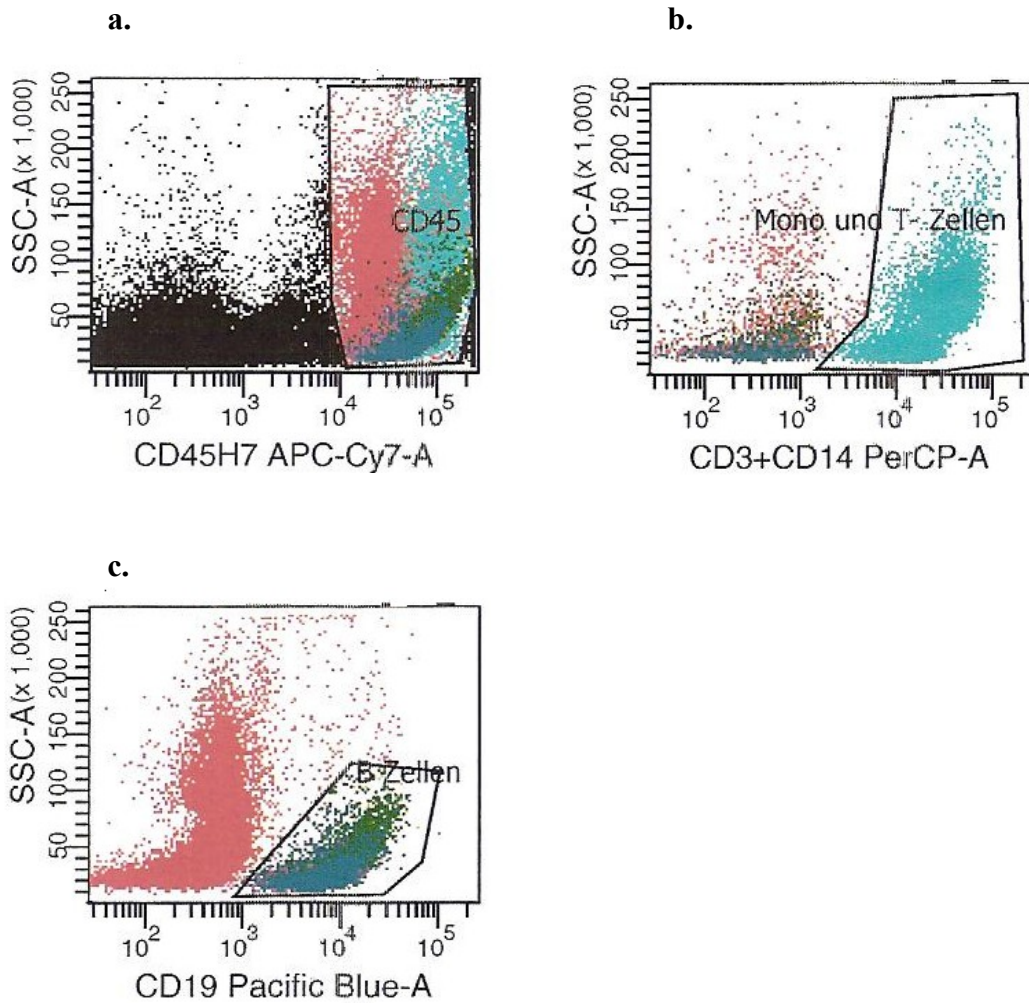
CD19+, CD45+ B-Zellen

Transitional-1:	CD38+++	CD24+++	IgD+
Transitional-2:	CD38++	CD24++	IgD+
Naive:	CD38+	CD24 low	IgD+
Pre-germinal center:	CD38++	CD24low	IgD+
Nonswitched memory:		CD27+	IgD+
Switched memory:		CD27+	IgD-
Doppelt Negative (DN) memory:		CD27-	IgD-

Durch die Verwendung von CD80 ist es möglich, die B-Zell-Subpopulationen zu charakterisieren, die in der Lage sind T-Zellen zu stimulieren.

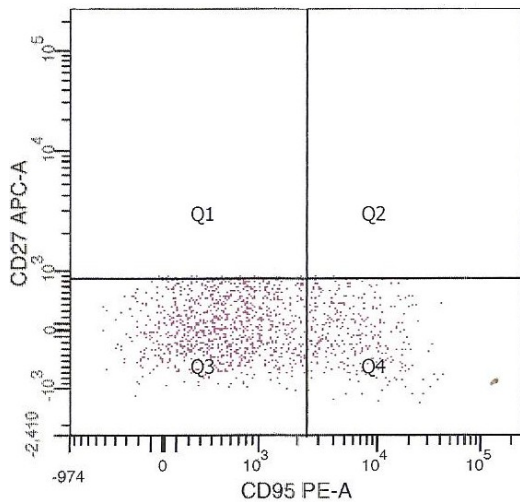
In insgesamt 4 Tubes wurden diese Zellen durch gating ausgewählt und untersucht.

Zunächst wurden alle CD45+ Zellen ausgewählt, danach wurden T-Zellen und Monozyten exkludiert. Zuletzt wurden in der Restpopulation die B-Zellen gated (siehe Abb. 3).



**Abbildung 1 Gating der CD19 B-Lymphozyten. a. CD45+ Zellen werden selektiert. b. T-Zellen und Monozyten werden exkludiert. c. restlichen B-Zellen werden ausgewählt.**

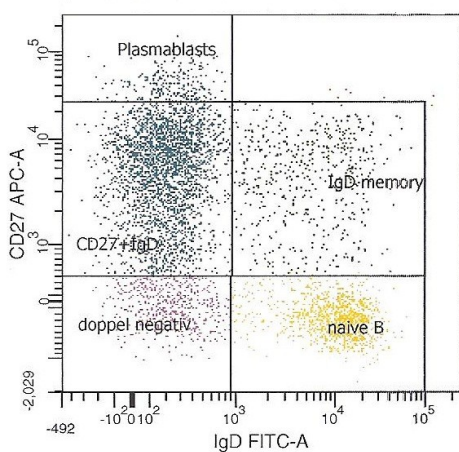
Tube 1 dient zur Isotypen Kontrolle und Festlegung der Grenzen zwischen spezifischer und unspezifischer Antikörperbindung. Hierzu wurden zwei Isotyp-Antikörper gegeneinander aufgetragen und die Grenzen, die für die nächsten 3 Tubes verwendet werden, wurden manuell festgelegt (siehe Abb. 4).



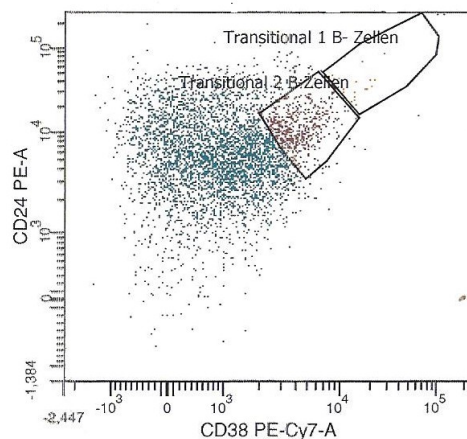
**Abbildung 2** Einstellung der Grenzen für die spezifische AK Bindung. Die Fluoreszenzen außerhalb von Q3 werden durch die Negativkontrolle hervorgerufen.

In Tube 2 können die Doppelt Negativen B-Zellen, die Naiven B-Zellen, die Post Switch Memory B-Zelle und die IgD Memory B-Zelle durch die Darstellung CD27 versus IgD, definiert werden. Außerdem können die T1 und T2 Zelle, spezielle Untergruppen der Naiven B-Zelle mit hoher Expression von CD38 und CD24, gated werden. Gezeigt wird das in Abbildung 5.

a.



b.



**Abbildung 3** Tube 2. a. CD27 versus IgD. b. Gating von T1 und T2

In Tube 3 und 4 spezialisierten wir uns weiter und untersuchten die jeweiligen Subpopulationen auf den Oberflächenmarker CD95 und CD80.

Als verwertbare Ausgabe erhält man einen Ausdruck auf dem absolut gezählte Events und prozentuelle Anteile tabellarisch aufgelistet sind (siehe Abb. 6).

Tube: D\_24\_3/14\_38\_27\_45\_19

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	500,000	####	100.0
CD45	322,206	64.4	64.4
Mono und T- Zellen	284,831	88.4	57.0
CD45 ohne Mono und T-Zellen	37,375	11.6	7.5
B Zellen	14,191	38.0	2.8
Plasmablasts	86	0.6	0.0
post switch memory	5,853	41.2	1.2
doppel negativ	1,311	9.2	0.3
P1	27	0.2	0.0
IgD memory	2,459	17.3	0.5
naive B	4,529	31.9	0.9
Transitional 1 B- Zellen	22	0.5	0.0
Transitional 2 B-Zellen	519	11.5	0.1

Abbildung 4 Datenausgabe

## 2.3 Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Statistikprogramm SPSS (Version 18.0) verwendet.

Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,001$  festgelegt.

Die Prüfung der Messwerte mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests ergab für einen Großteil der Daten eine Normalverteilung. Dementsprechend wurden parametrische und nicht parametrische Tests durchgeführt. Test auf Signifikanz wurde mit dem T-Test für gepaarte Stichproben und mit dem Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Korrelationen wurden mit dem Test nach Spearman und Pearson durchgeführt. Die Verteilung der Daten wurde mit dem Mittelwert und der Standardabweichung oder dem Median angegeben.

Zur graphischen Darstellung der Daten wurden Kreisdiagramme und Box-Plots verwendet.

## 3 Ergebnisse – Resultate

### 3.1 Hypothese 1

Von den 29 Patienten, die an der Studie bis zu unserem cut off teilgenommen haben, wurde bei 19 Patienten die Krankheitsaktivität nach 24 Wochen gemessen.

7 Patienten (37%) zeigten ein gutes Ansprechen laut EULAR-Ansprechrates, 4 Patienten ein moderates Ansprechen (21%) und bei 8 Patienten (42%) konnte keine EULAR-Ansprechrates festgestellt werden (siehe Abb. 3).

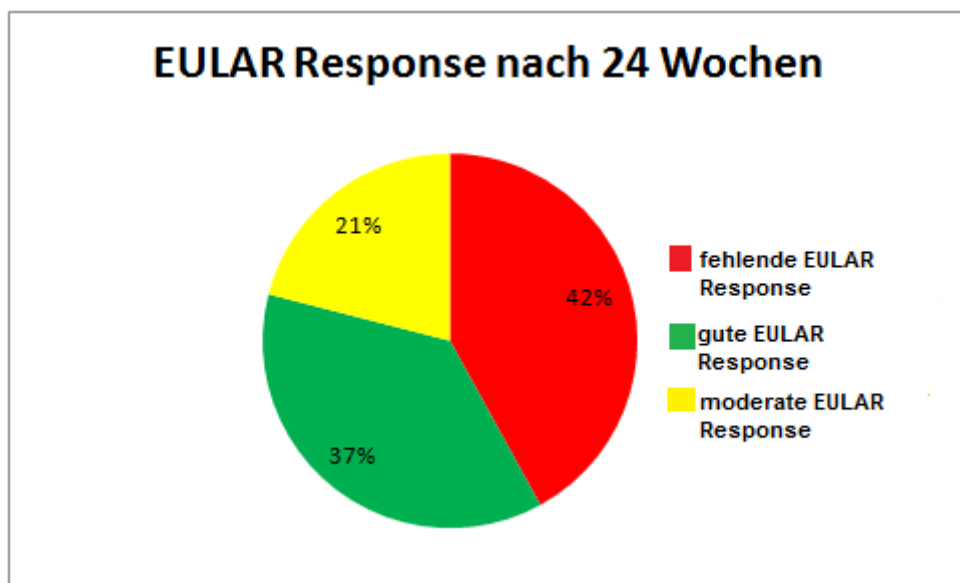


Abbildung 5 EULAR Response 24 Wochen nach Therapiebeginn

Keiner der Patienten mit einer guten EULAR-Ansprechrates zeigte eine komplette B-Zell-Depletion, welche mit einem Wert von 10 oder weniger Zellen der CD45+ B-Zell-Population (0,002%) definiert war.

1 Patient depletierte komplett in der Gruppe, die mit einer moderaten EULAR-Ansprechrates auf die Therapie reagierte. Ein weiterer Patient, der laut Krankheitsaktivität kein Ansprechen auf die Therapie mit Rituximab zeigte, depletierte ebenfalls komplett.

Auf Gruppenniveau konnte man eine allgemeine Verbesserung des DAS28 erkennen. Vor Therapiebeginn wies der DAS28 einen Mittelwert von 6,29 (SD±0,76) auf. 6 Monate nach

Therapiebeginn präsentierte sich der DAS28 der Patienten mit einem Mittelwert von 4,31 (SD±1,39).

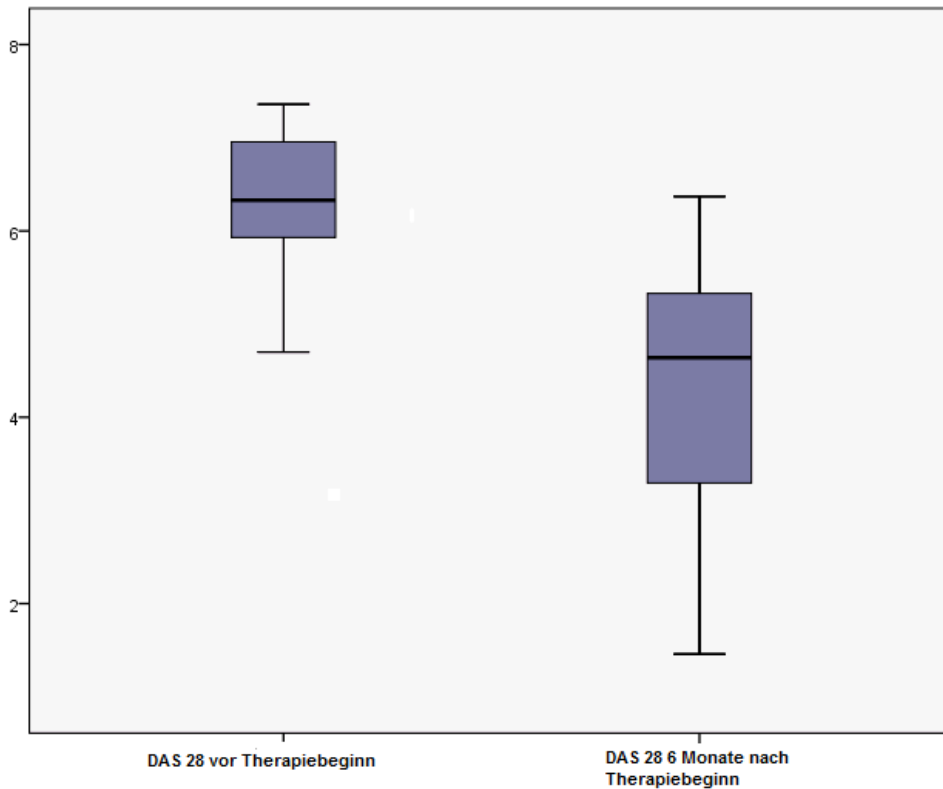
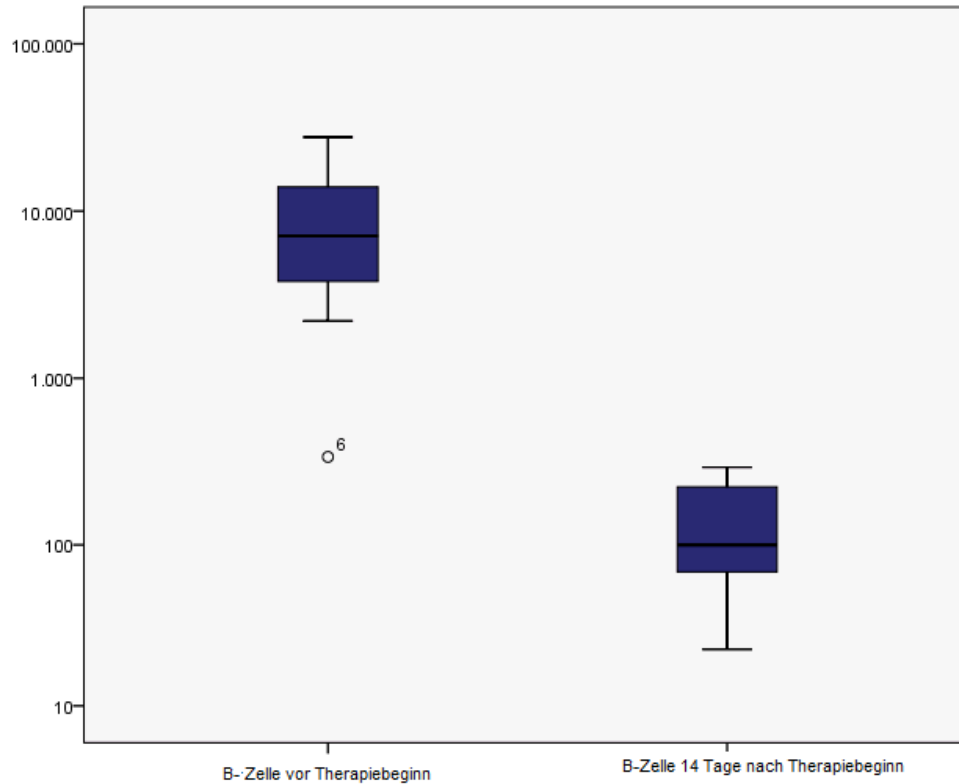


Abbildung 6 Verteilung des DAS28 vor Therapiebeginn und 6 Monate nach Therapiebeginn (\*p≤0,001).

### 3.1.1 Gute EULAR Ansprechrade

37 % (n=7) der Patientenkohorte reagierte auf die Rituximab Therapie mit einer guten EULAR Ansprechrade. Keiner von ihnen wies eine komplette B-Zell Depletion auf.

Die B-Zellen hatten vor Therapiebeginn einen Mittelwert von 10295,14 (SD±9389,52) und depletierten 14 Tage nach Therapiebeginn auf einen Mittelwert von 143,43 (SD±104,54) (siehe Abb. 5).



**Abbildung 7 B-Zell Depletion bei guter EULAR Ansprechrate (\* $p \leq 0,001$ ).**

Bei Analyse der CD80+ B-Zell Subpopulationen zeigte sich, dass die Post Switch Memory B-Zelle die größte Zellpopulation mit einem Mittelwert von 632,28 (SD±526,82) darstellte. Selbst nach depletierender Therapie zeigte sie den höchsten Mittelwert von 21,86 (SD±41,89) (siehe Abb. 6).

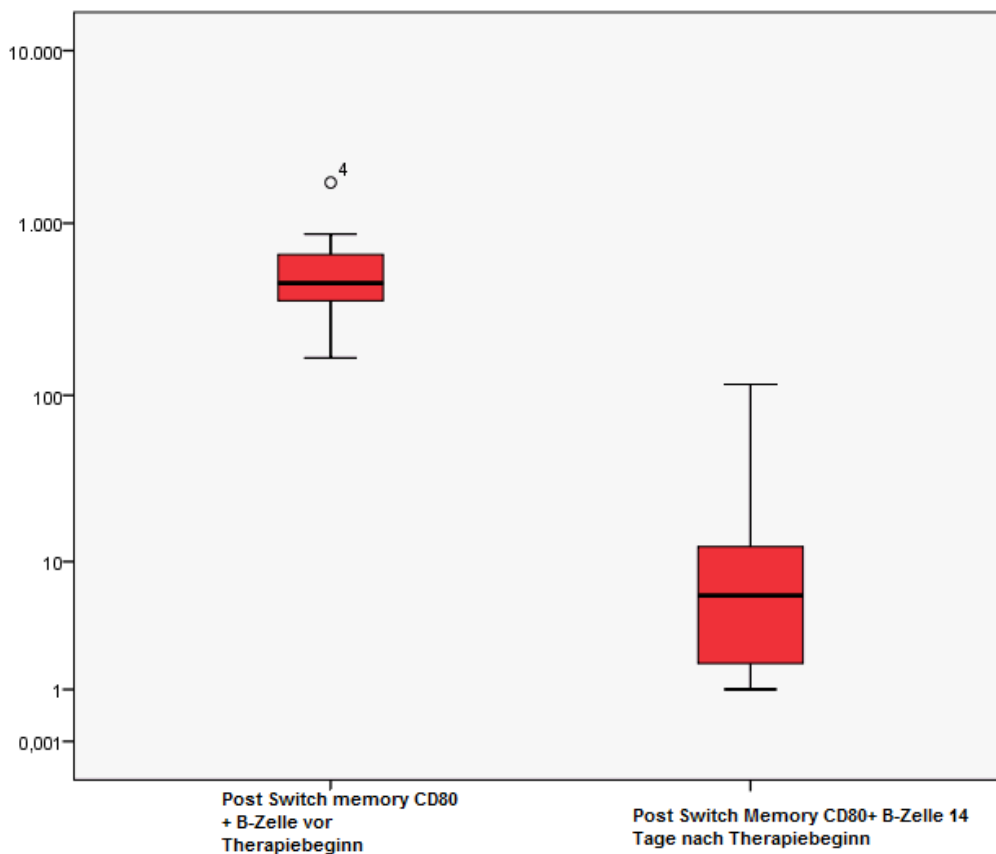


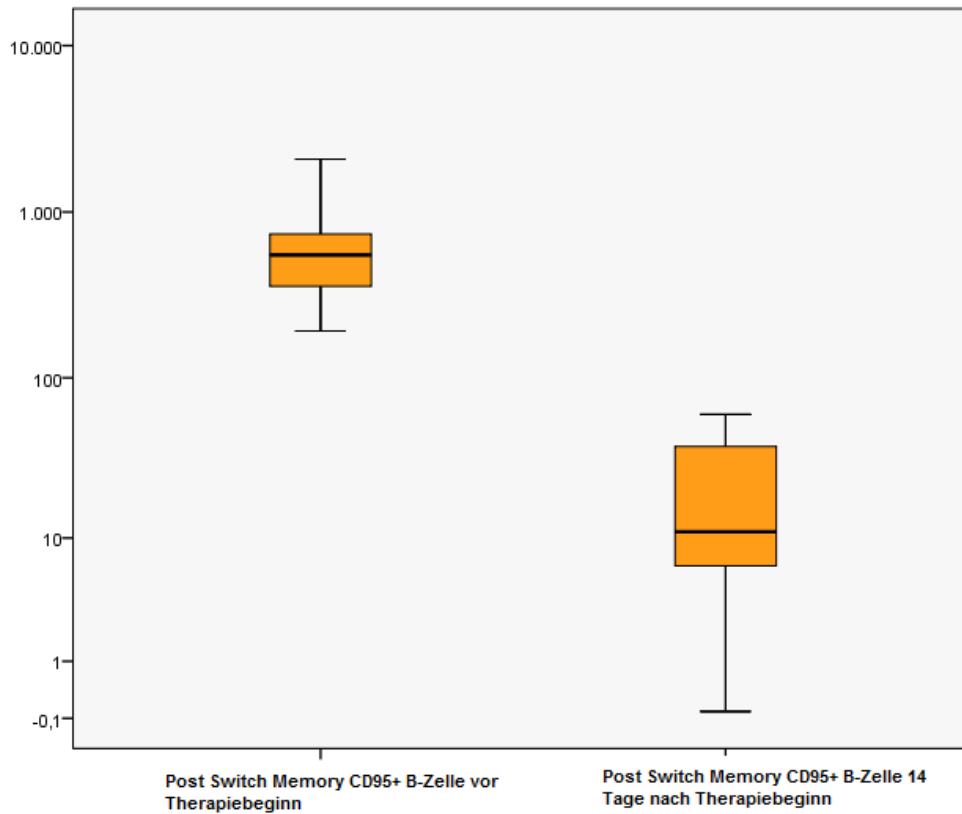
Abbildung 8 Verhalten der Post Switch Memory CD80+ B-Zelle bei guter EULAR Ansprechrte (\*p≤0,001).

Das Verhalten aller anderen CD80+ B-Zellsubpopulationen wird in Tab.6 gezeigt:

	Vor Therapiebeginn		14 Tage nach Therapiebeginn		p
	MW	SD	MW	SD	
<b>Doppelt Negative CD80+ B-Zelle</b>	303,71	338,91	3,14	3,44	*p≤0,001
<b>IgD Memory CD80+ B-Zelle</b>	286,57	280,18	17,86	25,71	*p≤0,001
<b>Naïve CD80+ B-Zelle</b>	204,29	302,82	4,0	5,45	*p≤0,001

Tabelle 6 Verhalten der CD80+ B-Zell Subpopulationen bei guter EULAR Ansprechrte

Bei den CD95+ B-Zell Subpopulationen verhielt es sich ebenso, dass die Post Switch Memory CD95+ B-Zelle die größte Gruppe repräsentierte mit einem Mittelwert von 719,71 (SD±639,64). Nach depletierender Therapie bestand ein Mittelwert von 23,29 (SD±23,63) (siehe Abb. 7).



**Abbildung 9 Verhalten der Post Switch Memory CD95+ B-Zelle bei guter EULAR Ansprechrade (\*p≤0,001)**

Das Verhalten der übrigen CD95+ B-Zell Subpopulationen ist in Tab.7 zusammengefasst.

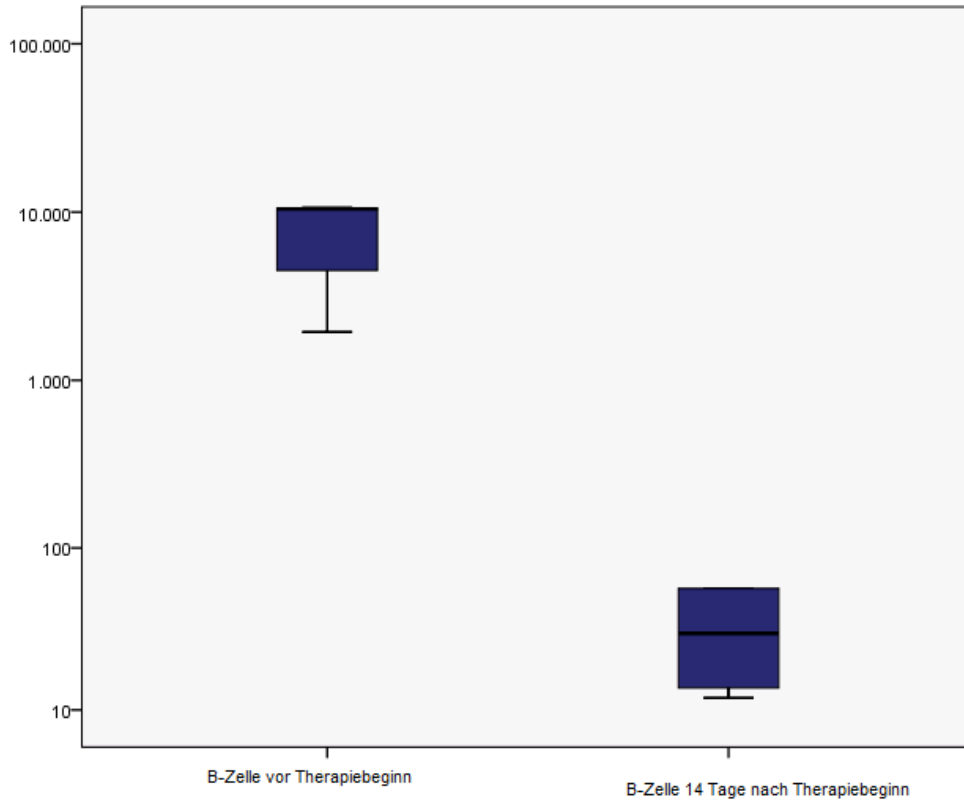
	<b>Vor Therapiebeginn</b>		<b>14 Tage nach Therapiebeginn</b>		<b>P</b>
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	
<b>Doppelt Negative CD95+ B-Zelle</b>	326,57	402,78	17,71	16,54	*p≤0,001
<b>IgD Memory CD95+ B-Zelle</b>	306,14	335,08	43,86	59,48	*p≤0,001
<b>Naive CD95+ B-Zelle</b>	189,86	109,91	32,86	28,26	*p≤0,001

**Tabelle 7** Verhalten der CD95+ B-Zell Subpopulationen bei guter EULAR Ansprechrade

### **3.1.2 Moderate EULAR Ansprechrade**

21 % der Patienten (n=4) zeigten eine moderate EULAR Ansprechrade auf die Therapie mit Rituximab. In dieser Kohorte konnte eine komplette B-Zell Depletion bei 25% (n=1) festgestellt werden.

Der Mittelwert der B-Zellen vor Therapiebeginn war etwas geringer als in der Kohorte der Patienten mit einer guten EULAR Ansprechrade, er betrug 8370,75 (SD±4289,64). 14 Tage nach Therapiebeginn fiel der Mittelwert auf einen Wert von 35,50 (SD±24,88) ab (siehe Abb. 8).



**Abbildung 10 Verhalten der B-Zelle bei moderater EULAR Ansprechrate (\* $p \leq 0,001$ ).**

Bei den CD80+ B-Zell Subpopulationen präsentierte sich ebenfalls die Post Switch Memory CD80+ B-Zelle mit einem Mittelwert von 947,0 (SD±1199,56) als prominente Population. Nach depletierender Therapie konnte hier kaum eine Post Switch Memory CD80+ B-Zelle detektiert werden (siehe Abb. 9).

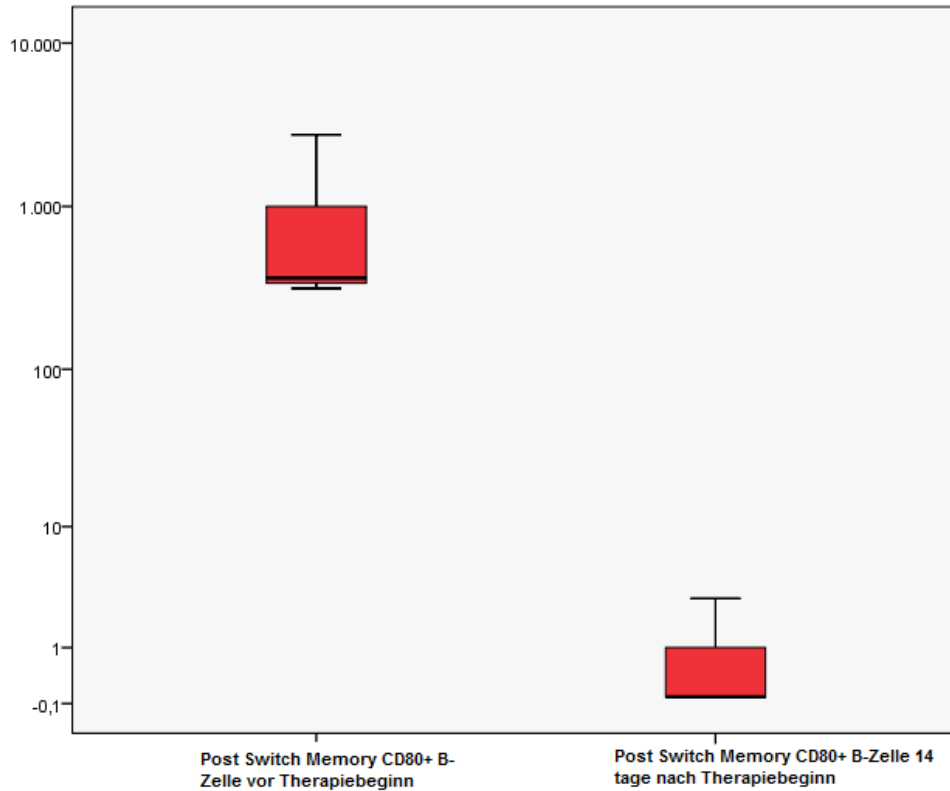


Abbildung 11 Verteilung der Post Switch Memory CD80+ B-Zelle bei moderater EULAR Ansprechrade (\* $p \leq 0,001$ ).

Die Verteilung der restlichen 3 CD80+ Subpopulationen zeigt Tab. 8.

	Vor Therapiebeginn		14 Tage nach Therapiebeginn		P
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	
<b>Doppelt Negative CD80+ B-Zelle</b>	609,50	563,77	1,25	0,95	* $p \leq 0,001$
<b>IgD Memory CD80+ B-Zelle</b>	177,0	240,02	5,50	4,36	* $p \leq 0,001$
<b>Naive CD80+ B-Zelle</b>	188,75	277,03	0,25	0,50	* $p \leq 0,001$

Tabelle 8 Verteilung der CD80+ Subpopulationen bei moderater EULAR Ansprechrade

Bei den CD95+ B-Zell- Subpopulationen zeigte sich die Doppelt Negative CD95+ B-Zelle mit dem höchsten Mittelwert 783.75 (SD $\pm$ 420,43). Nach Therapie fiel dieser Mittelwert auf einen Wert von 2 (SD $\pm$ 1,41) ab (siehe Abb. 10).

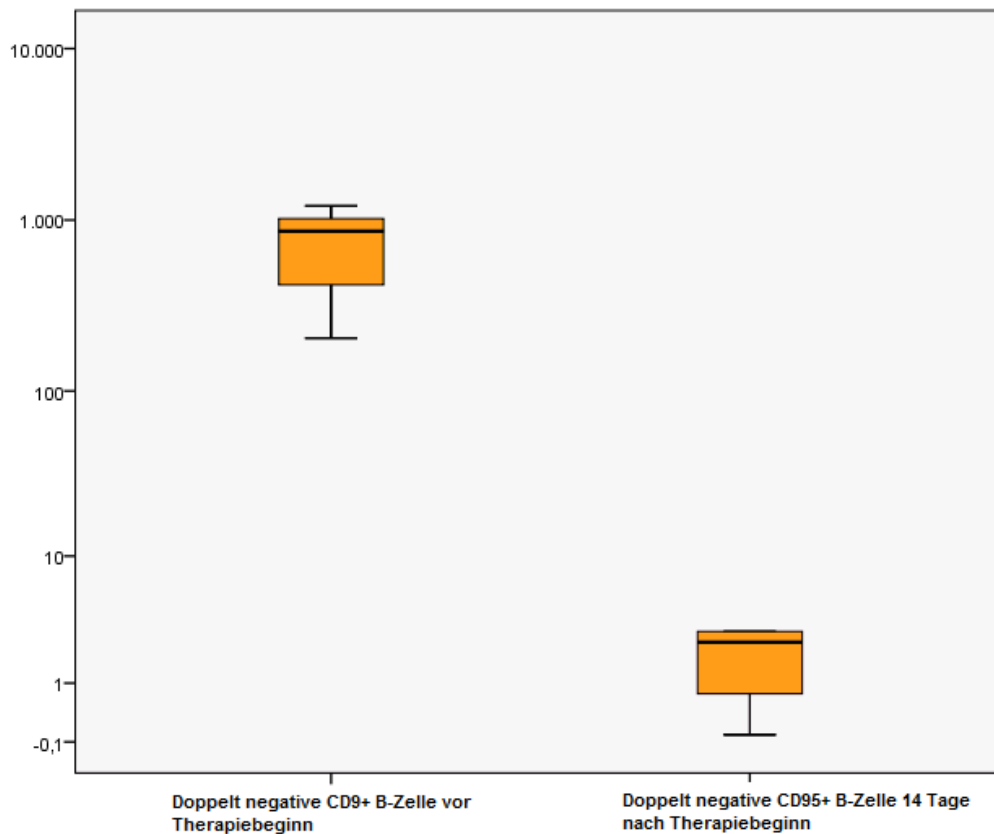


Abbildung 12 Verteilung der Doppelt Negativen CD95+ B-Zelle bei moderater EULAR Ansprechrade (\* $p \leq 0,001$ ).

In Tabelle 9 werden die restlichen Mittelwerte der CD95+ B-Zell Subpopulationen aufgezeigt.

	Vor Therapiebeginn		14 Tage nach Therapiebeginn		P
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	
<b>Post Switch Memory CD95+ B-Zelle</b>	610,75	429,977	11,25	10,31	* $p \leq 0,001$
<b>IgD Memory CD95+ B-Zelle</b>	234,75	295,11	330,25	380,76	* $p \leq 0,001$
<b>Naive CD95+ B-Zelle</b>	638,25	1050,52	18,25	18,30	* $p \leq 0,001$

Tabelle 9 Verhalten der CD95+ Subpopulationen bei moderater EULAR Ansprechrade

### 3.1.3 Keine EULAR Ansprechrade

Bei 42% (n=8) konnte unter Rituximab Therapie keine Verbesserung der EULAR Ansprechrade festgestellt werden. 12,5 % (N=1) zeigten in der MRD-FACS Analyse eine komplette B-Zell Depletion.

Der Mittelwert der B-Zellen war mit einem Wert von 13334,86 (SD±12033,26) in allen Kohorten am höchsten. 14 Tage nach Therapie zeigte er einen Mittelwert von 64,86 (SD±45,85) (siehe Abb.11).

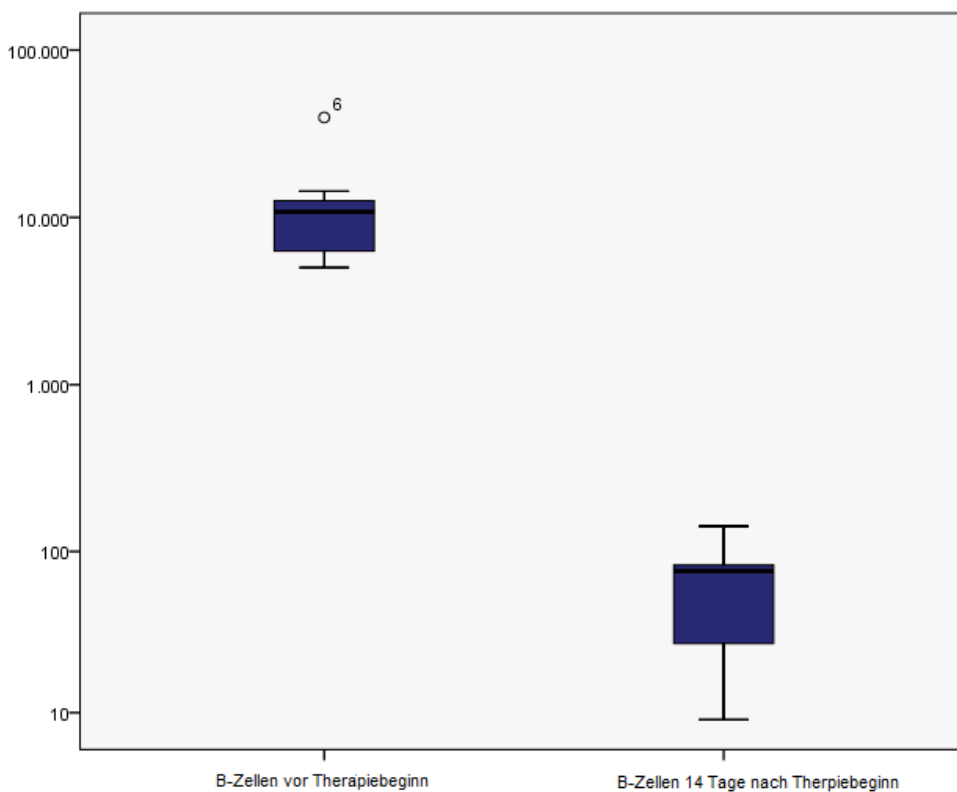


Abbildung 13 Verhalten der B-Zelle bei fehlender EULAR Ansprechrade (\*p≤0,001).

Nach Differenzierung in die einzelnen Subpopulationen zeigte sich, dass bei den CD80+ B-Zellen wiederum die Post Switch Memory CD80+ B-Zelle den höchsten Mittelwert (Mittelwert=1280,71; SD±509,55) aufwies. Nach depletierender Therapie fiel dieser auf einen Wert von 6,86 (SD±5,87) (siehe Abb. 12).

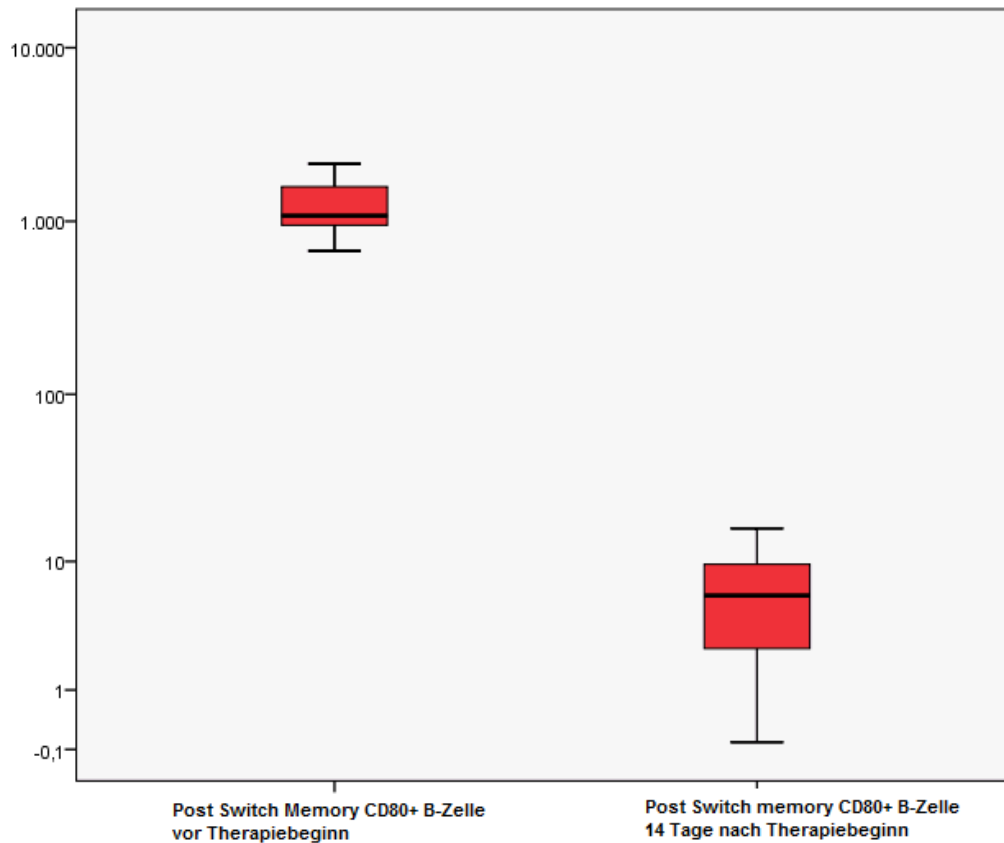


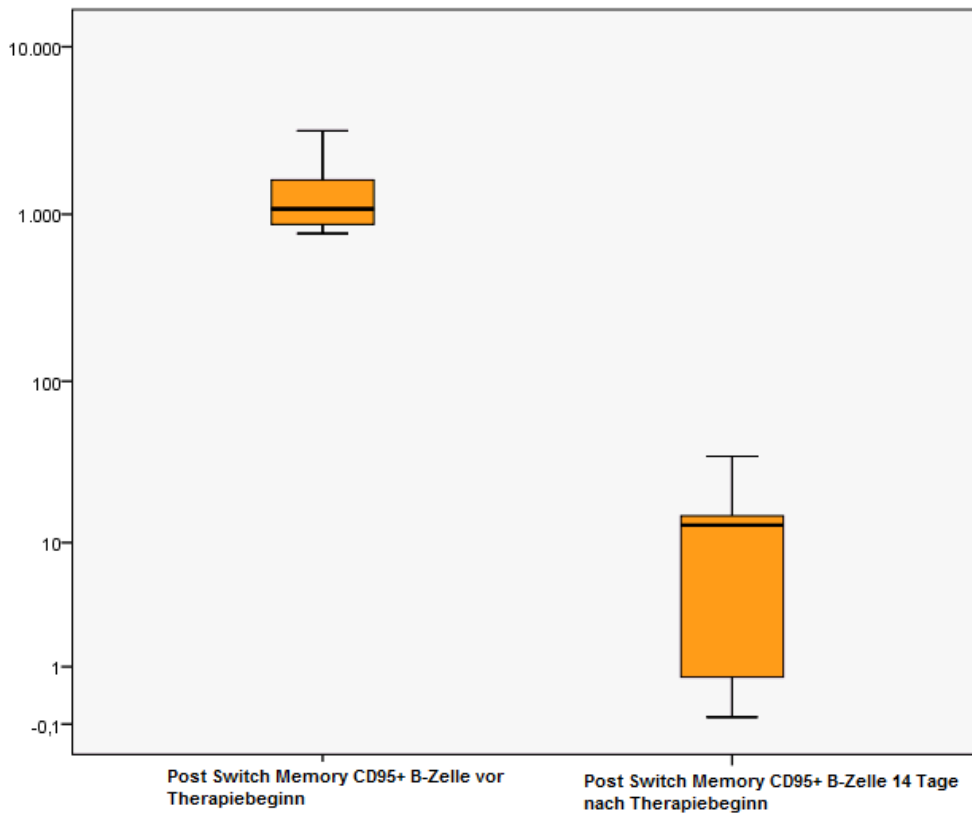
Abbildung 14 Verhalten der Post Switch Memory CD80+ B-Zelle bei fehlender EULAR Ansprechrare (\*p≤0,001).

Die übrigen CD80+ Subpopulationen verhielten sich, wie in Tabelle 10 gezeigt:

	Vor Therapiebeginn		14 Tage nach Therapiebeginn		P
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	
<b>Doppelt Negative CD80+ B-Zelle</b>	338,0	183,65	2,15	2,91	*p≤0,001
<b>IgD Memory CD80+ B-Zelle</b>	433,14	379,61	12,29	15,54	*p≤0,001
<b>Naive CD80+ B-Zelle</b>	195,43	139,99	3,0	3,51	*p≤0,001

Tabelle 10 Verhalten der CD80+ Subpopulationen bei nicht vorhandener EULAR Ansprechrare

Auch bei den CD95+ B-Zell Subpopulationen zeigte sich die Post Switch Memory CD95+ B-Zelle mit dem höchsten Mittelwert von 1423,29 (SD±842,98), der 14 Tage nach Therapiebeginn auf einen Wert von 11,43 (SD±12,53) abfiel (siehe Abb.13).



**Abbildung 15** Verhalten der Post Switch Memory CD95+ B-Zelle bei fehlender EULAR Ansprechrte (\*p≤0,001).

Das Verhalten der anderen CD95+ Subpopulationen wird in Tabelle 11 zusammengefasst.

	Vor Therapiebeginn		14 Tage nach Therapiebeginn		P
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	
<b>Doppelt Negative CD95+ B-Zelle</b>	316,71	234,9	4,29	4,96	*p≤0,001
<b>IgD Memory CD95+ B-Zelle</b>	533,14	503,08	14,14	16,57	*p≤0,001
<b>Naive CD95+ B-Zelle</b>	532,14	618,60	7,86	8,78	*p≤0,001

**Tabelle 11** Verhalten der CD95+ B-Zell Subpopulationen bei nicht vorhandener EULAR Ansprechrte

## 3.2 Hypothese 2

### 3.2.1 Korrelation nach Spearman – Erkrankungsaktivität und B-Zell-Subpopulationen

Die lineare Korrelation wurde mit dem Spearman Test gerechnet. Eine Korrelation von +1 spricht für einen vollkommenen positiven Zusammenhang, -1 bedeutet einen vollkommenen negativen Zusammenhang und 0 bedeutet keinen linearen Zusammenhang. Signifikanz wurde mit  $p \leq 0,001$  erreicht.

Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität (DAS28) und der Doppelt Negativen CD95+ B-Zelle gefunden werden. Weitere Subpopulationen wurden auf Korrelation mit DAS28 untersucht: Naive CD95+ B-Zelle, IgD Memory CD95+ B-Zelle, Post Switch Memory CD95+ B-Zelle. Auch hier konnte keine signifikante Korrelation gezeigt werden (siehe Tab. 4).

		DNCD95+	NaiveCD95+	IgDMCD95+	PSMCD95+
DAS28	Korrelationskoeffizient	-0,13	-0,45	-0,147	-0,2
	Signifikanz * $p \leq 0,001$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

**Tabelle 12: Korrelation nach Spearman zwischen DAS28 und B-Zell-Subpopulationen CD95+**

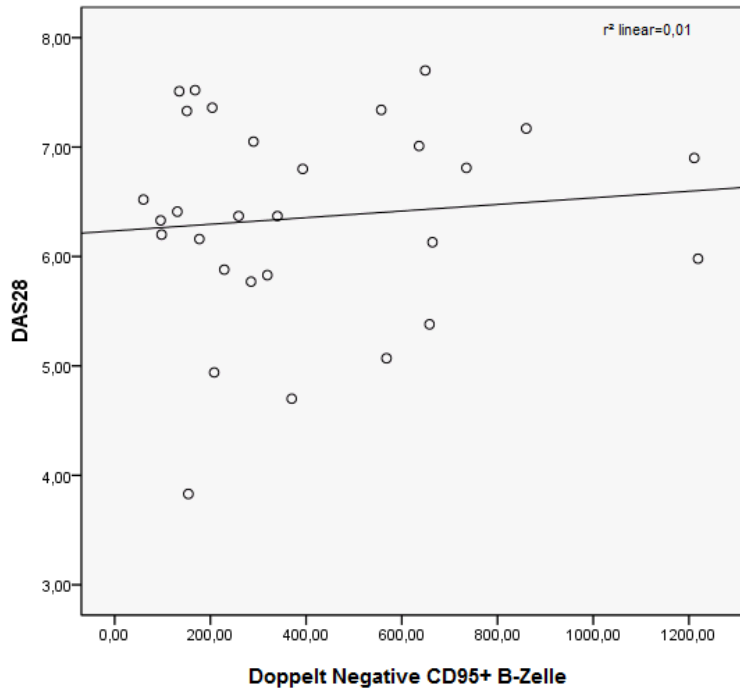


Abbildung 16 Korrelation DAS28 und Doppelt Negative CD95+ B-Zelle

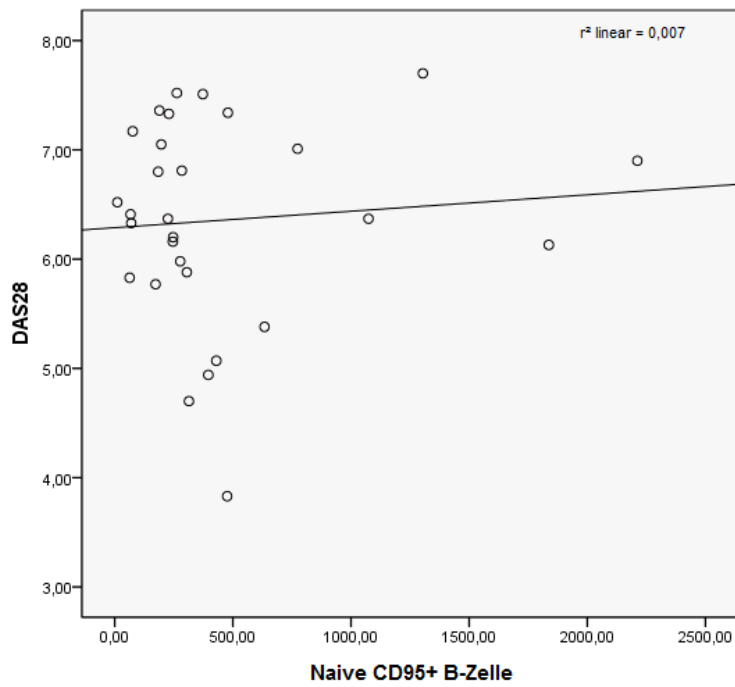


Abbildung 17 Korrelation DAS28 und Naive CD95+ B-Zelle

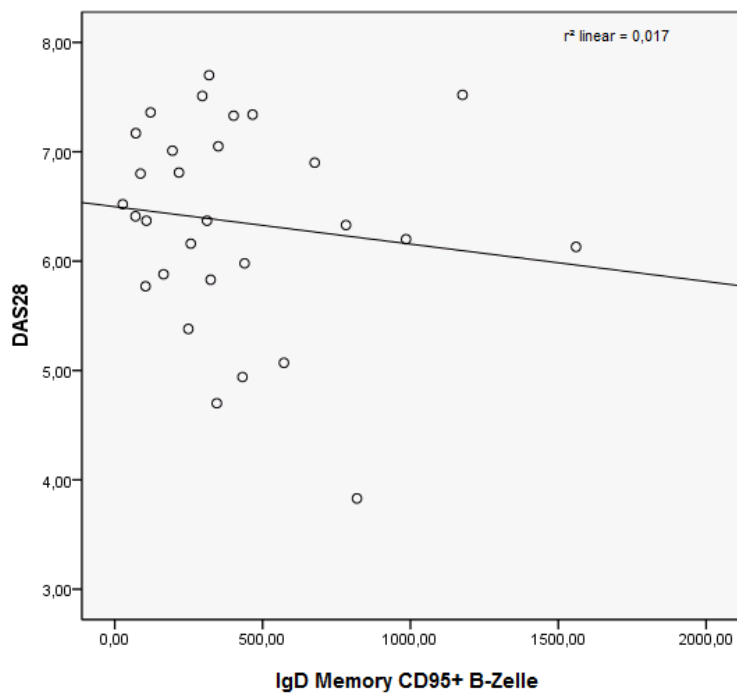


Abbildung 18 Korrelation DAS28 und IgD Memory CD95+ B-Zelle

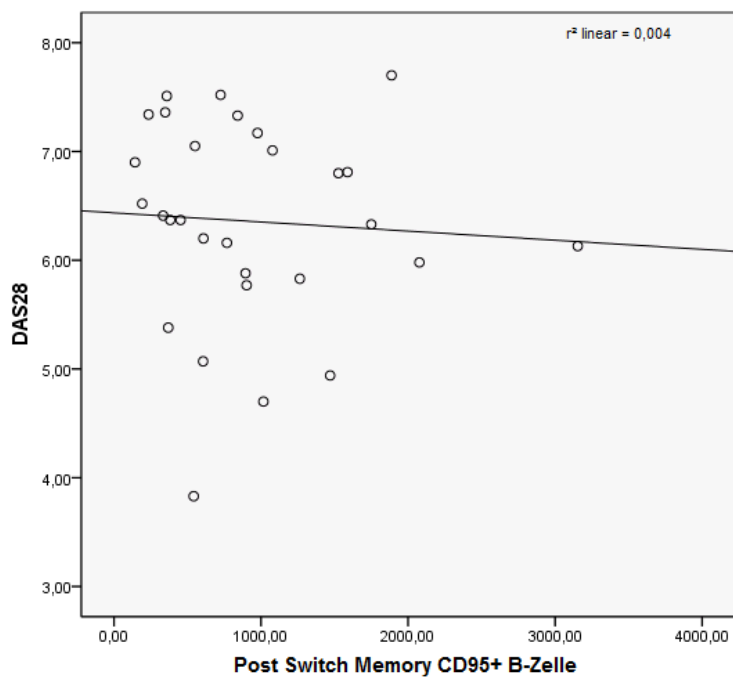


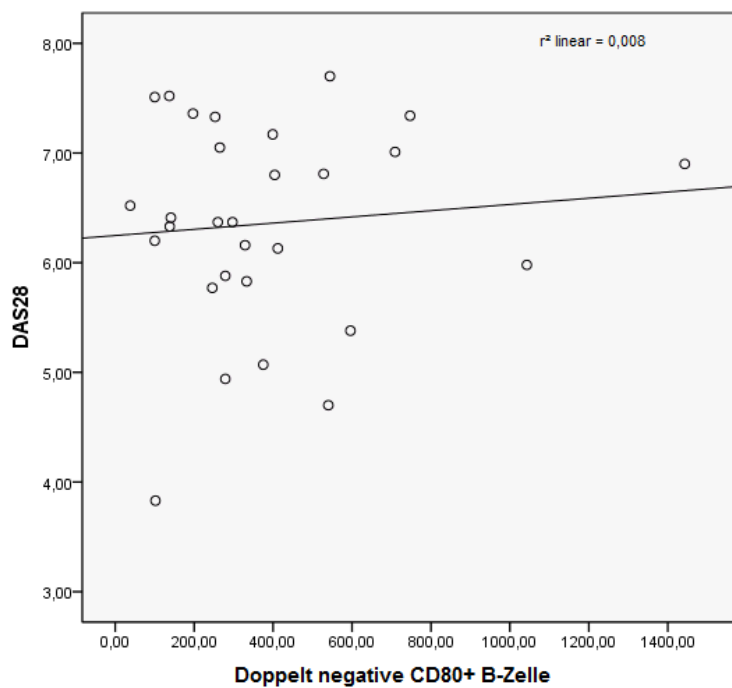
Abbildung 19 Korrelation DAS28 und Post Switch Memory CD95+ B-Zelle

Im MRD-FACS wurden die B-Zellsubpopulationen auch auf den Oberflächenmarker CD80 untersucht. Genau wie bei CD95 versuchten wir, eine Korrelation der einzelnen Zelltypen und der Krankheitsaktivität nachzuweisen (siehe Tab. 5).

		DNCD80+	NaiveCD80+	IgDMCD80+	PSMCD80+
DAS28	Korrelationskoeffizient	-0,036	-0,183	-0,219	-0,109
	Signifikanz * $p \leq 0,001$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

**Tabelle 13 Korrelation DAS28 und CD80+ B-Zell Subpopulationen**

Auch hier konnte keine signifikante Korrelation gefunden werden.



**Abbildung 20 Korrelation DAS28 und Doppelt Negative CD80+ B-Zelle**

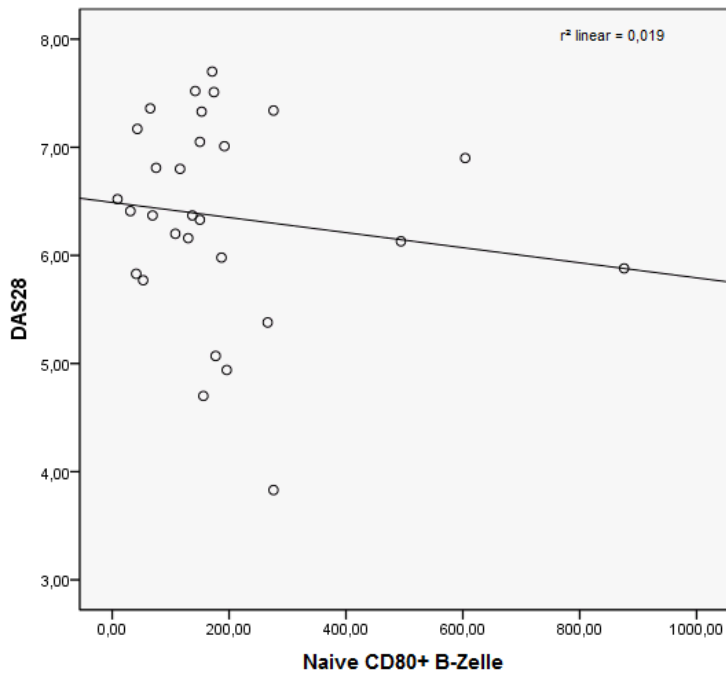


Abbildung 21 Korrelation DAS28 und Naive CD80+ B-Zelle

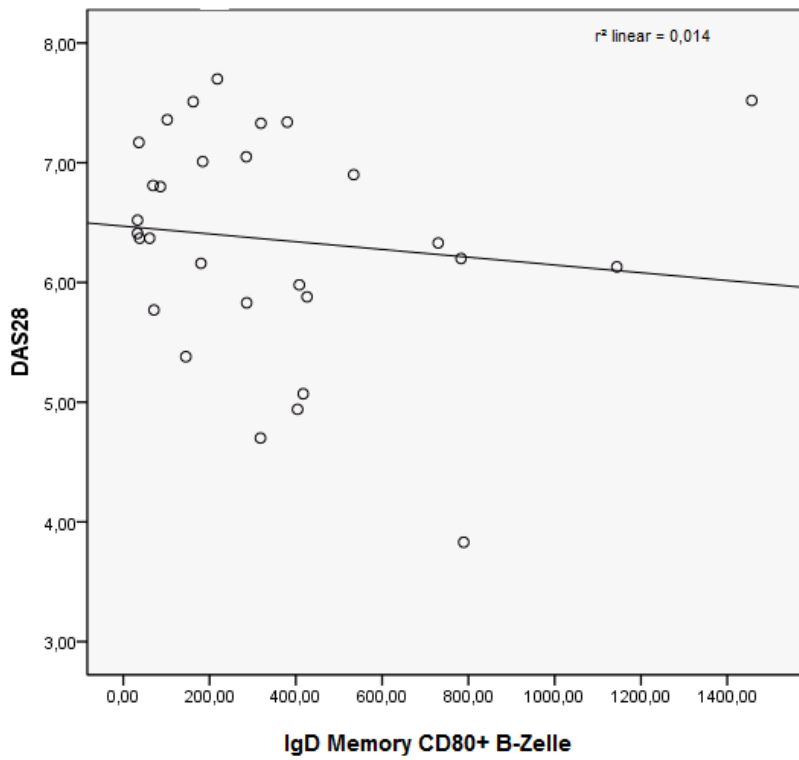


Abbildung 22 Korrelation DAS28 und IgD Memory CD80+ B-Zelle

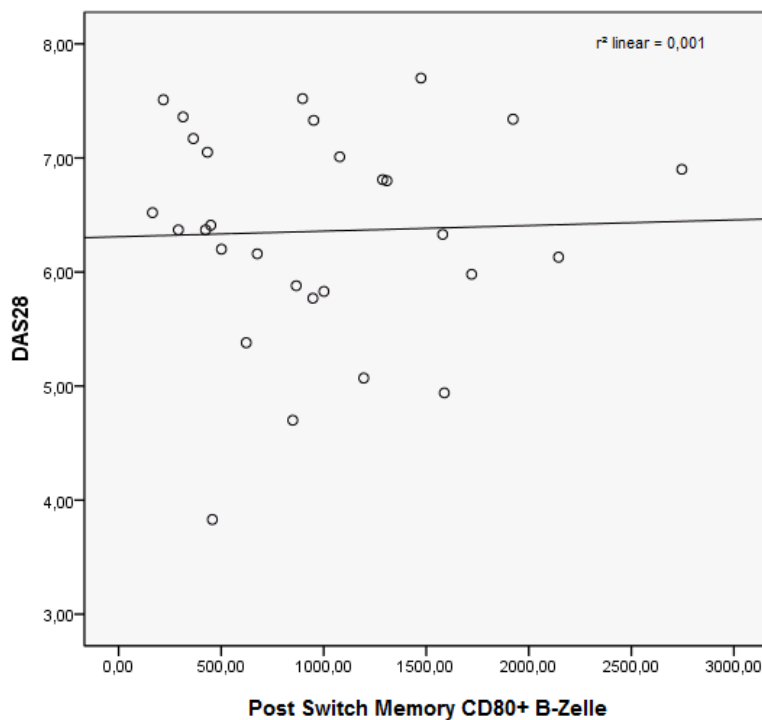
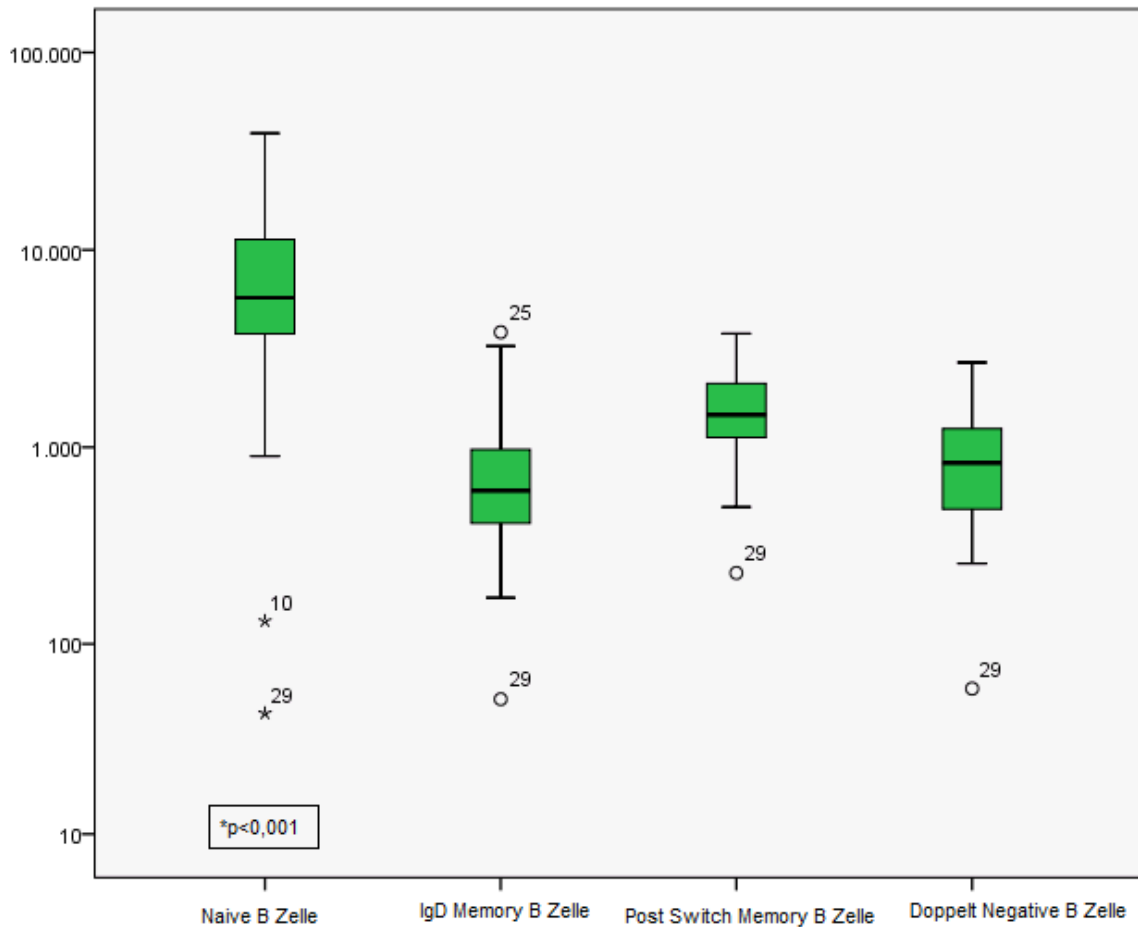


Abbildung 23 Korrelation DAS28 und Post Switch Memory CD80 B-Zelle

### 3.2.2 Verteilung der Subpopulationen

#### 3.2.2.1 Ergebnisse vor Therapiebeginn

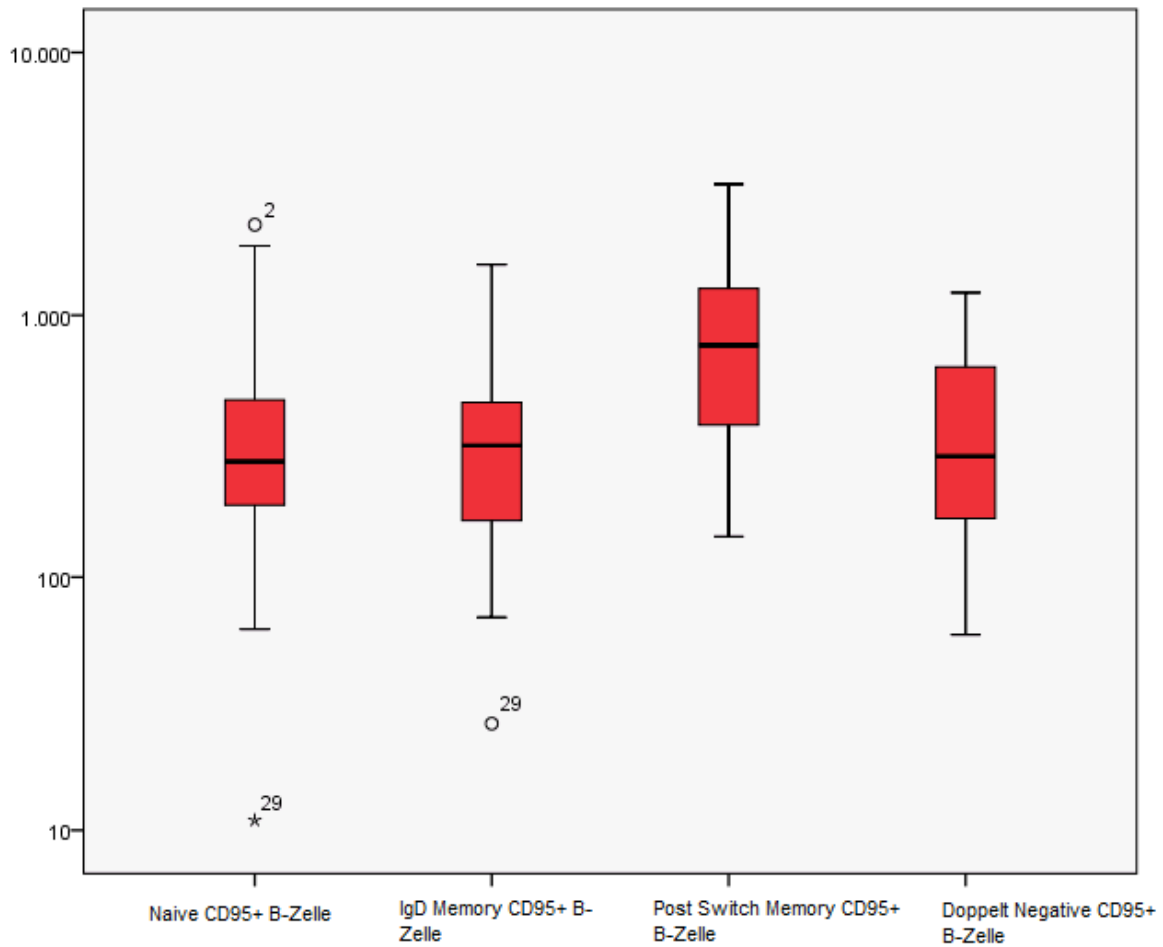
Vor Therapiebeginn mit Rituximab konnte gezeigt werden, dass die Naive B-Zelle mit einem Mittelwert von 10292,24 (SD±10550,51) (\*p≤ 0,001), die am häufigsten vorkommende Subpopulation war. Gefolgt wurde sie von der Post Switch Memory B-Zelle mit einem Mittelwert von 1666, 14 (SD±898,01), dann die IgD Memory B-Zell mit einem Mittelwert von 1008,62 (SD±977,72) und die kleinste Subpopulation war die Doppelt Negative B-Zell mit einem Mittelwert von 940,38 (SD± 606,33).



**Abbildung 24** Verteilung der Subpopulationen vor Therapie mittels Boxplot

Die einzelnen Subpopulationen wurden dann wieder mit dem Oberflächenmarker CD95 und CD80 markiert und analysiert.

Vor Therapiebeginn präsentierte sich die Post Switch Memory CD95+ B-Zelle mit einem Mittelwert von 932,38 (SD±685,70) als größte Subpopulation. Die Naive CD95+ B-Zelle hatte einen Mittelwert von 462,38 (SD±523,03), die IgD Memory CD95+ B-Zelle zeigte einen Mittelwert von 411,21 (SD±360,38) und die Doppelt Negative CD95+ B-Zelle war mit einem Mittelwert von 407,72 (SD±315,45) die kleinste Subpopulation.



**Abbildung 25 Verteilung der CD95+ Subpopulation vor Therapiebeginn**

Bei den CD80 + B-Zellen zeigte sich ebenfalls die Post Switch Memory CD80+ B-Zelle mit einem Mittelwert von 981,72 (SD±636,44) als zahlenmäßig überlegen, die Doppelt Negative CD80+ B-Zelle hatte einen Mittelwert von 387,39 (SD±303,96), die IgD Memory CD80+ B-Zelle wies einen Mittelwert von 348,21 (SD±346,49) auf und die Naive CD80+ B-Zelle bildete das Schlusslicht mit einem Mittelwert von 190,24 (SD±183,86).

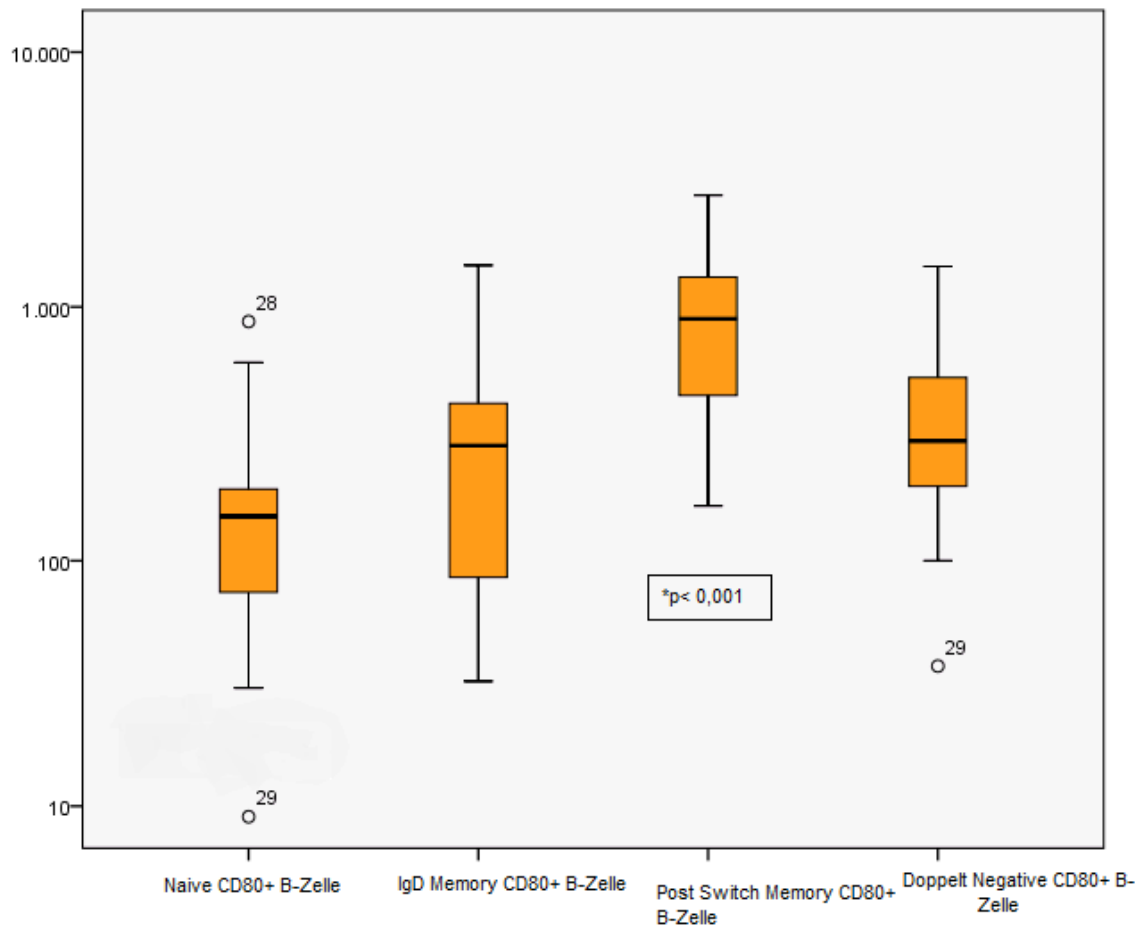
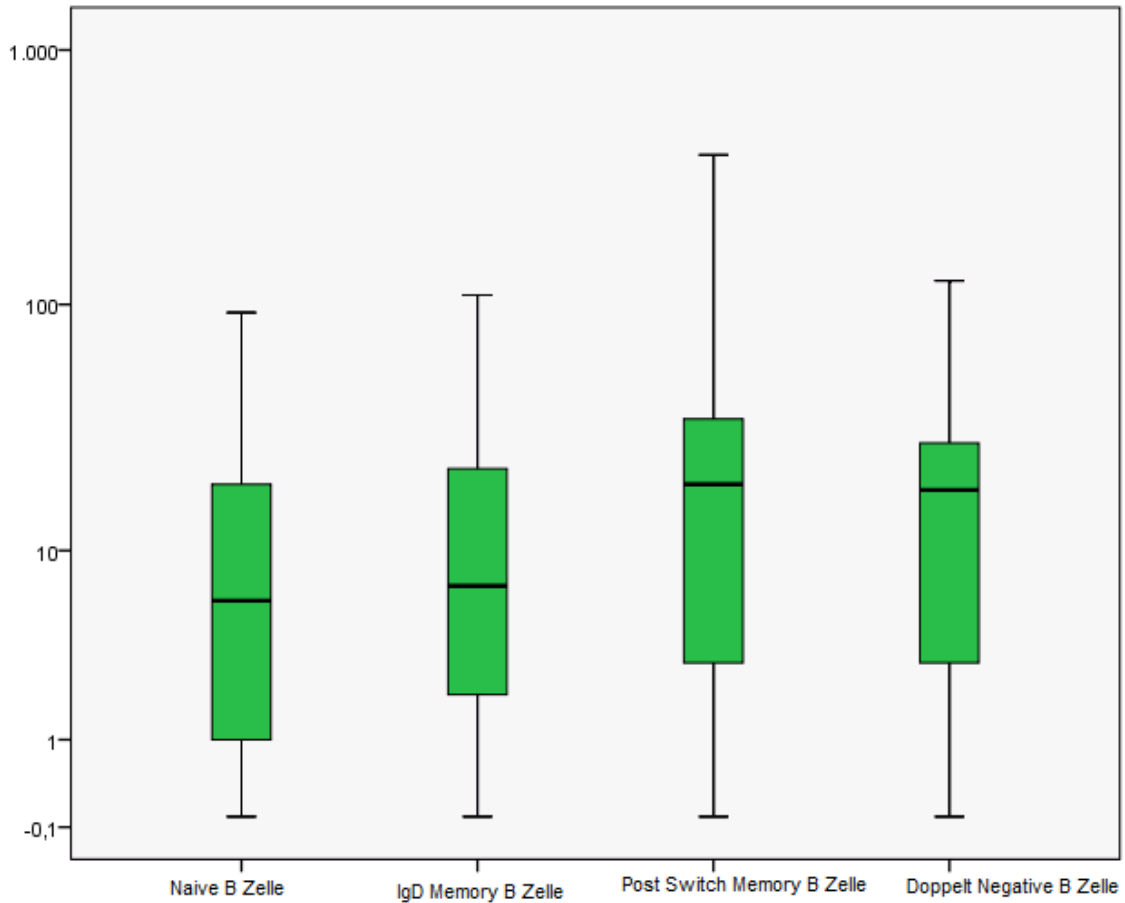


Abbildung 26 Verteilung der CD8+ Subpopulationen vor Therapiebeginn

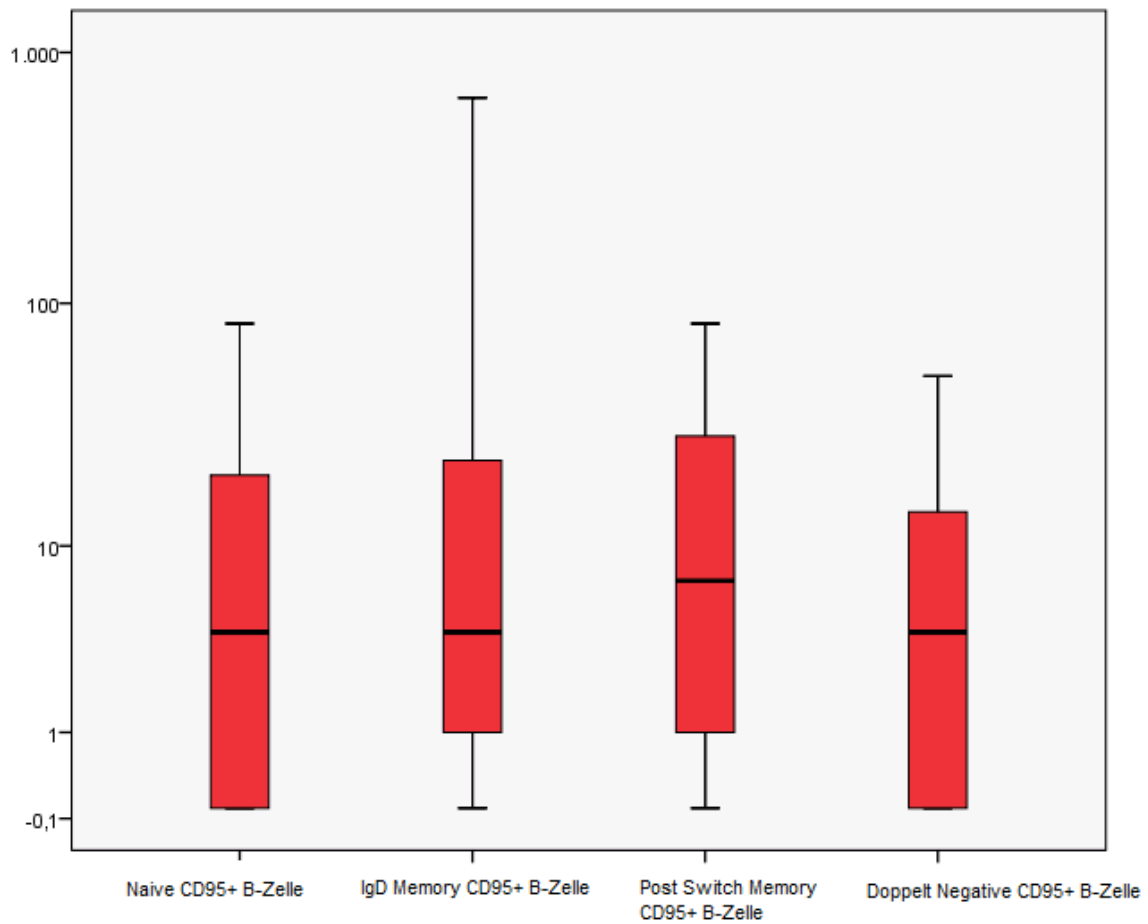
### 3.2.2.2 Ergebnisse 14 Tage nach Therapiebeginn

14 Tage nach der ersten Infusion mit Rituximab änderte sich die Verteilung der B-Zell Subpopulationen. Die größte Population bildete die Post Switch Memory B-Zelle mit einem Mittelwert von 35,14 (SD±72,49), gefolgt von der Doppelt Negativen B-Zelle mit einem Mittelwert von 21,66 (SD±25,86). Die IgD Memory B-Zelle zeigte einen Mittelwert von 21,0 (SD±30,5) und die kleinste Subpopulation war die Naive B-Zelle mit einem Mittelwert von 15,45 (SD±21,52).



**Abbildung 27** Verteilung der Subpopulationen 14 Tage nach Therapiebeginn

Die CD95+ Subpopulationen wurden von der IgD Memory CD95+ B-Zelle mit einem Mittelwert von 39,62 (SD±123,93) angeführt. Gefolgt wurden sie von der Post Switch Memory CD95+ B-Zelle mit einem Mittelwert von 17,89 (SD±21,94). Die Naive CD95+ B-Zelle zeigte einen Mittelwert von 12,83 (SD±19,16), die Doppelt Negative CD95+ B-Zelle einen Mittelwert von 9,03 (SD±11,59).



**Abbildung 28** Verteilung der CD95+ Subpopulation 14 Tage nach Therapiebeginn

Bei den CD80+ Subpopulationen zeigte die Post Switch Memory CD80+ B-Zelle einen Mittelwert von 10,28 (SD±22,12), die IgD Memory CD80+ B-Zelle einen Mittelwert von 8,79 (SD±15,67). Bei der Doppelt Negativen CD80+ B-Zelle präsentierte sich ein Mittelwert von 2,97 (SD±3,95) und bei der Naiven CD80+ B-Zelle ein Mittelwert von 1,97 (SD±3,47).

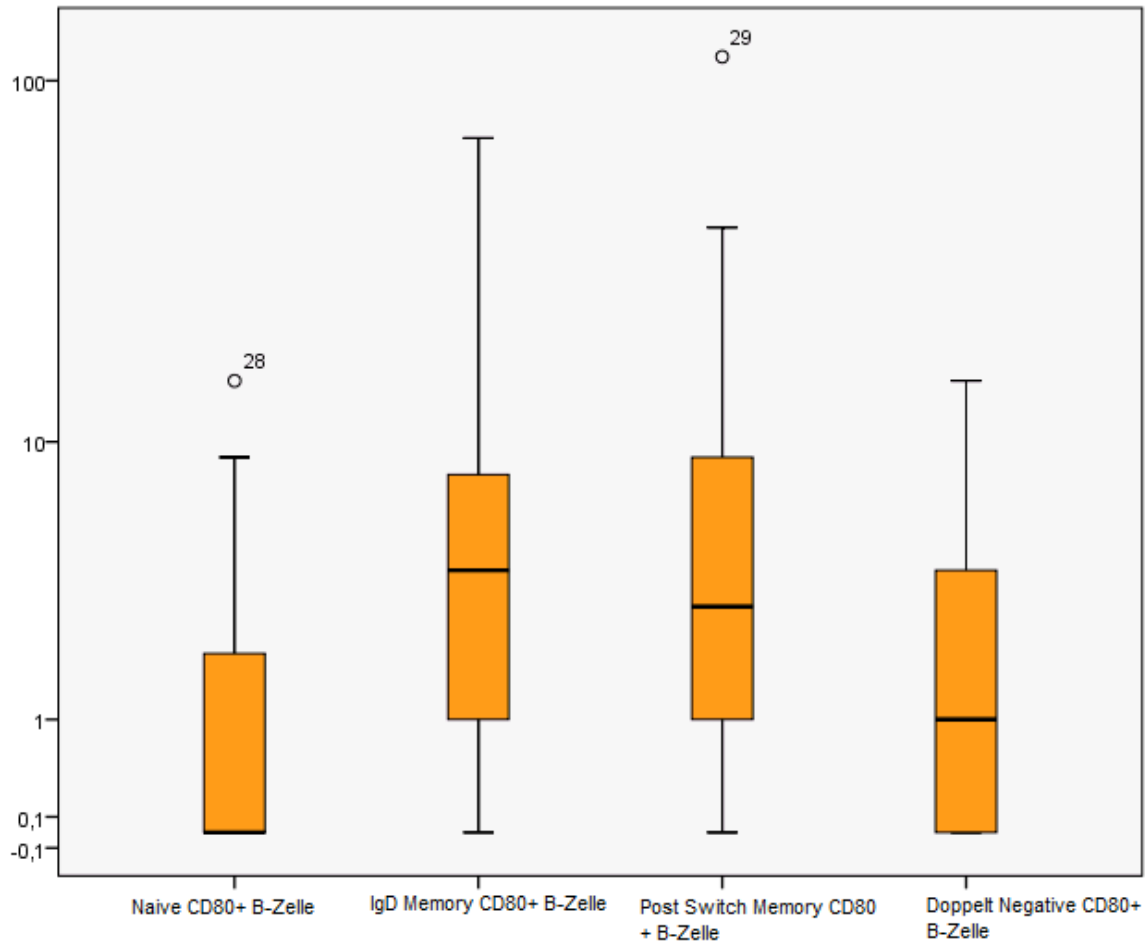
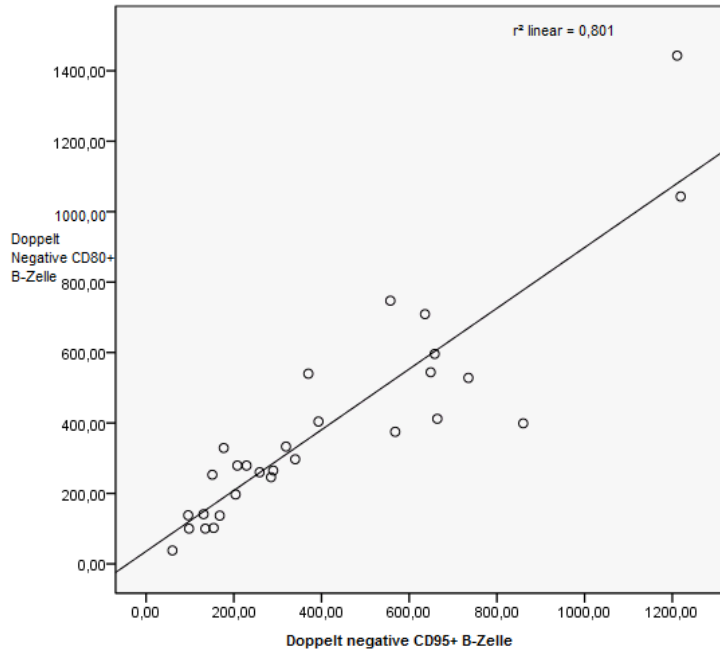


Abbildung 29 Verteilung der CD80+ Subpopulationen 14 Tage nach Therapiebeginn

### 3.2.3 Korrelation nach Spearman – CD95+ Subpopulationen und CD80+ Subpopulationen

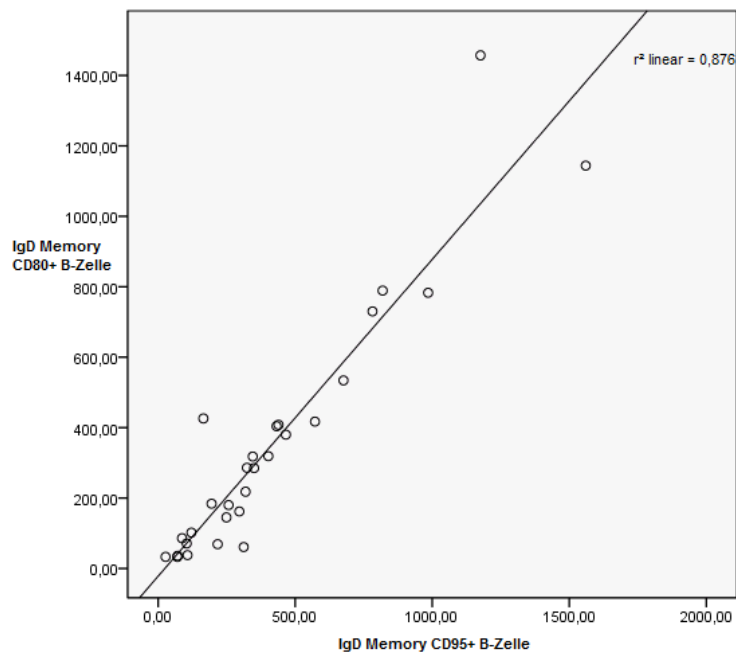
Die Korrelation wurde mit dem Spearman Test gerechnet und Signifikanz wurde für  $p \leq 0,001$  angenommen.

Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Doppelt Negativen CD95+ B-Zelle und der Doppelt Negativen CD80+ B-Zelle gefunden werden. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,909 (siehe Abb. 17).



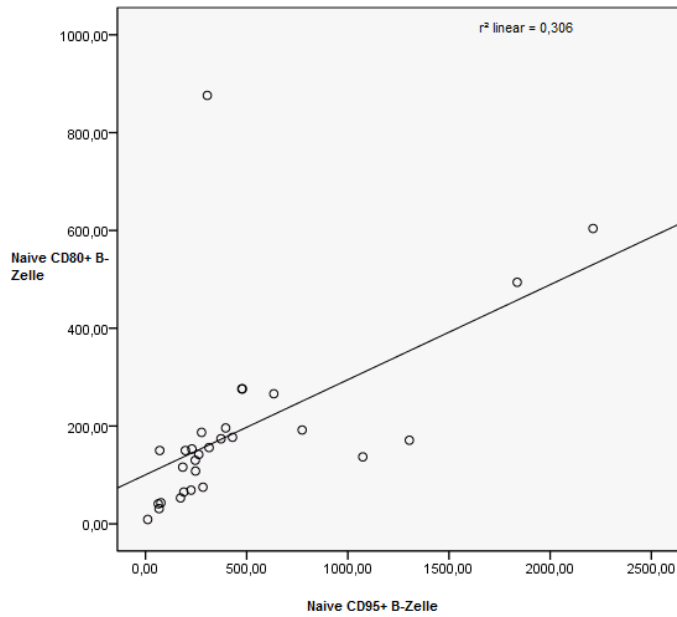
**Abbildung 30 Korrelation Doppelt Negative CD95+ B-Zelle und Doppelt Negative CD80+ B-Zelle**

Eine signifikante Korrelation ( $r=0,909$ ) wurde auch bei der IgD Memory CD95+ B-Zelle und der IgD Memory CD80+ B-Zelle gefunden (siehe Abb. 18).



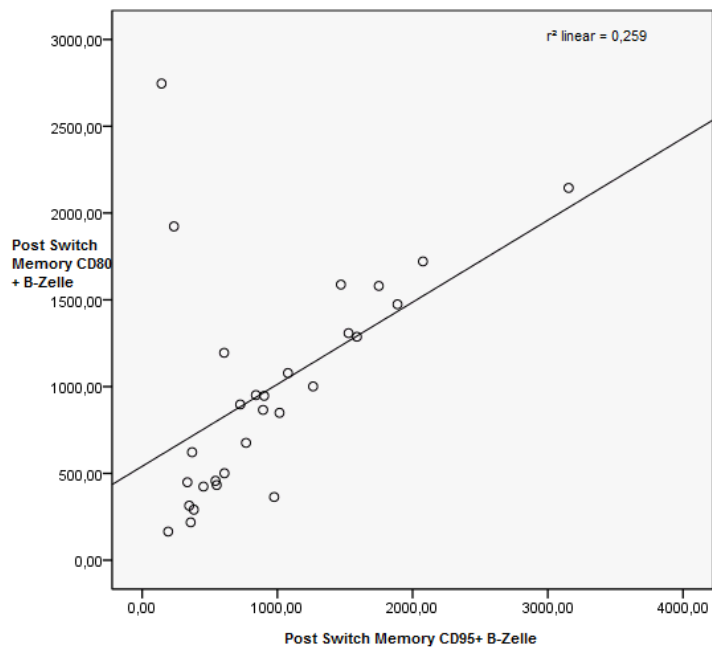
**Abbildung 31 Korrelation IgD Memory CD95+ B-Zelle und IgD Memory CD80+ B-Zelle**

Ebenfalls signifikant, bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,810, korrelierte die Naive CD95+ B-Zelle mit der Naiven CD80+ B-Zelle (siehe Abb. 19).



**Abbildung 32 Korrelation Naive CD95+ B-Zelle und Naive CD80+ B-Zelle**

Die Post Switch Memory CD95+ B-Zelle korrelierte signifikant mit der Post Switch Memory CD80+ B-Zelle ( $r=0,539$ ) (siehe Abb. 20).



**Abbildung 33 Korrelation Post Switch Memory CD95+ B-Zelle und Post Switch Memory CD80+ B-Zelle**

## 4 Diskussion

### 4.1 Hypothese 1

Durch die HS-FACS Analyse war es möglich genauere Einblicke in das Verhalten der B-Zelle unter Rituximab Therapie zu erhalten.

Wie bei Dass et al. zuvor, konnte gezeigt werden, dass bei fast allen Patienten auch nach Therapiebeginn weiterhin B-Zellen im peripheren Blut nachweisbar waren. Bei normalen FACS-Analysen wären diese restlichen B-Zellen nicht gefunden worden.

Dass et al. machten in ihrer Studie die Entdeckung, dass komplette B-Zell Depletion auf Gruppenniveau mit einem besseren EULAR Response vergesellschaftet ist [1].

In unserer Studie zeigte kein Patient mit einer guten EULAR Ansprechrate nach den ersten 6 Monaten unter Rituximab Therapie eine komplette B-Zell Depletion in der HS-FACS Analyse 2 Wochen nach Therapiebeginn. Hingegen wurden unter den Patienten mit moderater oder fehlender EULAR Ansprechrate komplette B-Zell Depletionen beobachtet. Es scheint, dass die komplette Depletion der B-Zelle kein Hinweis für einen guten Therapieerfolg ist.

Bei genauerer Betrachtung der einzelnen B-Zell Subpopulationen zeigte sich dass die Naive B-Zelle vor Therapiebeginn die dominante Population darstellt. Unterteilt man diese Populationen weiter in CD95+ und CD80+, präsentiert sich jeweils die Post Switch Memory B-Zelle mit dem höchsten Mittelwert und Median. Der höchste Mittelwert der Post Switch Memory B-Zelle, sowohl CD95 positiv als auch bei den Zellen, die CD80 exprimierten, wurde bei den Patienten mit fehlender EULAR Ansprechrate gefunden. Daraus lässt sich schließen, je weniger Post Switch Memory Zellen im Blut von RA Patienten nachgewiesen werden, desto besser wirkt eine Therapie mit Rituximab und desto besser die EULAR Ansprechrate.

Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Memory B-Zelle eine besondere Rolle bei der RA unter Rituximab Therapie spielt. Roll et al. zeigten, dass die IgD+, CD27+ Memory B-Zelle bei den Therapieversagern signifikant erhöht war [55].

Die Post Switch Memory B-Zelle ( CD19+, IgD-, CD27+ B-Zelle) trägt den Oberflächenmarker CD27+, der beim Menschen eine Identifikation als Memory B- Zelle zulässt. Nach Aktivierung durch Antigenkontakt werden die naiven B-Zellen in das Keimzentrum rekrutiert. Dort wird durch Keimzentrumsreaktionen das Antigenprofil

verändert. Daraus entstehen unter anderem Plasmazellen und Memory B-Zellen [29]. Die IgD+, CD27+ B-Zellen repräsentieren die B-Zellen der Marginal Zone und die IgD-, CD27+ B-Zelle ist die post germinal center Memory B-Zelle [28].

In weiteren Studien wurde gezeigt, dass auch bei anderen Erkrankungen (SLE) die Post Switch Memory B-Zelle im Vergleich zu gesunden Menschen erhöht ist [31]. Dieser Sachverhalt zeigt die besondere Bedeutung der Post Switch Memory B-Zelle bei zumindest 2 Autoimmunerkrankungen (SLE, RA) auf.

Kürzlich untersuchte Sellam et al. in einer Studie den Zusammenhang zwischen Therapieerfolg mit Rituximab gemessen am EULAR Response nach 24 Wochen und den B-Zell Biomarkern RF, ACPA, IgG, IgA, IgM und BAFF vor Therapiebeginn. Patienten mit einem EULAR Response konnten mit dem Vorhandensein von RF oder ACPA und IgG Konzentration > ULN in Verbindung gebracht werden. Das Vorhandensein einer dieser Parameter erhöhte die Wahrscheinlichkeit einer guten oder moderaten EULAR Ansprechrate. Wenn alle Parameter nachgewiesen werden konnten, hatten die Patienten eine 85% Chance auf eine gute oder moderate EULAR Ansprechrate [62].

Die Beobachtung der verschiedenen Memory B Zell-Typen, mit genauem Augenmerk auf die Post Switch Memory B-Zelle könnte zusätzlich zu diesen bereits vorhandenen Parametern eine zukünftige Aussage über einen möglichen Therapieerfolg mit Rituximab zulassen.

## **4.2 Hypothese 2**

Durch die Antikörpermarkierung der B-Zellen in der HS-FACS-Analyse war es möglich die einzelnen B-Zell Subpopulationen genauer zu untersuchen. Jacobi et al. beschrieben in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und der CD27- IgD- CD95+ B-Zelle (Doppelt Negative CD95+ B-Zelle) bei SLE. Die Doppelt Negative CD95+ B-Zelle weist Kriterien einer Memory B-Zelle auf, dennoch präsentiert sie sich durch den Oberflächenmarker CD95+ als ein aktivierter Phänotyp mit einer größeren Heterogenität bei Autoimmunerkrankungen als bei Gesunden [3]. Der Oberflächenmarker CD95 (=FAS) ist ein Marker für die Apoptose. Zellen, die CD95 auf ihrer Oberfläche exprimieren, werden normalerweise durch einen FAS- abhängigen Mechanismus eliminiert [27]. Ein starkes B-Zell-Signal kann vor so einem Todesmechanismus schützen. Der Komplement Rezeptor

CD21 ist ein Beispiel für ein solches Signal und kann die Apoptose der B-Zelle durch Bindung an seinen Liganden verhindern [23,24,25].

In unserer Studie untersuchten wir, ob sich eine Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und einer speziellen B-Zell-Subpopulation, ähnlich wie bei SLE, ergibt.

Wir konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der CD95 Expression und der Krankheitsaktivität bei der rheumatoiden Arthritis feststellen.

Des Weiteren untersuchten wir alle CD80+ Subpopulationen auf eine Korrelation mit der Krankheitsaktivität, doch auch hier konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Jacobi et al. schlossen aus der Entdeckung der Korrelation, dass die Doppelt Negative CD95+ B-Zelle in Zukunft als ein Marker für die Krankheitsaktivität fungieren könnte [3]. Therapieerfolge können zukünftig bei SLE an der Expression von CD95 auf der Doppelt Negativen B-Zelle gemessen werden, bei RA gilt dieser Zusammenhang nicht.

Zusätzlich untersuchten wir die Korrelation zwischen den CD80+ Subpopulationen und den CD95+ Subpopulationen. Hier konnte zwischen allen Populationen ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Das heißt, wenn die B-Zelle einen CD95+ Marker, einen Marker für die Apoptose, auf ihrer Oberfläche exprimiert, exprimiert sie auch CD80+. CD80 ist ein Kostimulationsmolekül für die T-Zell Aktivierung durch die B-Zelle. Es dockt an seinem Gegenspieler, CD28, auf der T-Zelle an. Bereits in früheren Studien konnte eine vermehrte Frequenz von CD80+, CD27+ Memory B-Zellen bei der RA festgestellt werden [30].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine FACS Analyse der B-Zellen vor Therapiebeginn sinnvoll ist. Hierbei kann besonderes Augenmerk auf die Post Switch Memory B-Zelle, die entweder CD80 oder CD95 exprimiert, in Bezug auf ein mögliches Therapieansprechen gelegt werden.

Die B Zell Analyse 14 Tage nach Therapiebeginn verspricht wenig Aufschluss über Ansprechen oder Nichtansprechen der Therapie und ist deswegen eher abzulehnen. Die Expression des Oberflächenmarker CD95 lässt zu diesem Zeitpunkt keinen Schluss über einen Therapieerfolg zu.

Im Allgemeinen ist die HS-FACS-Analyse ein Gewinn für die Kontrolle der CD20 depletierenden Therapie bei der RA. Durch weitere Erforschung der B-Zelle wird ihre Rolle nicht nur bei der rheumatoiden Arthritis, sondern in der ganzen Immunologie an Wichtigkeit

zunehmen. Ein kleines Puzzlestück konnten wir mit unserer Analyse der Oberflächenmarker CD80 und CD95 beisteuern.

## 5 Literaturverzeichnis

[1] Dass, Shouvik; Rawstron, Andy C.; Vital, Edward M.; Henshaw, Karen; McGonagle, Dennis; Emery, Paul (2008): Highly sensitive B cell analysis predicts response to rituximab therapy in rheumatoid arthritis. In: *Arthritis and rheumatism*, Jg. 58, H. 10, S. 2993–2999. Online verfügbar unter doi:10.1002/art.23902.

[2] Schmidlin H, Diehl SA, Blom B. New insights into the regulation of human B-cell differentiation. *Trend Immunol.* 2009 Jun;30(6):277-285.

[3] Jacobi, Annett M.; Reiter, Karin; Mackay, Meggan; Aranow, Cynthia; Hiepe, Falk; Radbruch, Andreas et al. (2008): Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. In: *Arthritis and rheumatism*, Jg. 58, H. 6, S. 1762–1773. Online verfügbar unter doi:10.1002/art.23498.

[4] Aktories, Klaus; Forth, Wolfgang (2005): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker ; mit 303 Tabellen.* 9., völlig überarb. Aufl. München [u.a.]: Elsevier Urban & Fischer.

[5] Pezzutto, Antonio; Ulrichs, Timo; Burmester, Gerd-Rüdiger (2007): *Taschenatlas der Immunologie. Grundlagen, Labor, Klinik.* 2., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme.

[6] Herold, Gerd (2008): *Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Stichwortverzeichnis.* Köln: Eigenverl.

[7] Machold, Klaus P. (2010): Prevention and cure of rheumatoid arthritis: is it possible? In: *Best practice & research. Clinical rheumatology*, Jg. 24, H. 3, S. 353–361. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.berh.2009.12.014.

- [8] Yamamoto, T. (2009): Cutaneous manifestations associated with rheumatoid arthritis. In: *Rheumatology international*, Jg. 29, H. 9, S. 979–988. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00296-009-0881-z.
- [9] Turesson, C.; Jacobsson, L. T. H. (2004): Epidemiology of extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. In: *Scandinavian journal of rheumatology*, Jg. 33, H. 2, S. 65–72.
- [10] Young, Adam; Koduri, Gouri (2007): Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. In: *Best practice & research. Clinical rheumatology*, Jg. 21, H. 5, S. 907–927. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.berh.2007.05.007.
- [11] Habib, Hisham M.; Eisa, Ashraf A.; Arafat, Waleed R.; Marie, Mohamed A. (2010): Pulmonary involvement in early rheumatoid arthritis patients. In: *Clinical rheumatology*. Online verfügbar unter doi:10.1007/s10067-010-1492-5.
- [12] Rintelen B.; Leeb BF.: Krankheitsaktivitätsindizes für die rheumatoide Arthritis in der täglichen Praxis. In: *Journal für Mineralstoffwechsel*, Jg. 16 (2009), H. 1, S. 20-23.
- [13] Aletaha, Daniel; Smolen, Josef S. (2007): The Simplified Disease Activity Index (SDAI) and Clinical Disease Activity Index (CDAI) to monitor patients in standard clinical care. In: *Best practice & research. Clinical rheumatology*, Jg. 21, H. 4, S. 663–675. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.berh.2007.02.004.
- [14] Fransen, J.; Langenegger, T.; Michel, B. A.; Stucki, G. (2000): Feasibility and validity of the RADAI, a self-administered rheumatoid arthritis disease activity index. In: *Rheumatology (Oxford, England)*, Jg. 39, H. 3, S. 321–327.
- [15] Fransen, J.; van Riel, P. L. C. M.: The Disease Activity Score and the EULAR response criteria. In: *Clinical and experimental rheumatology*, Jg. 23, H. 5 Suppl 39, S. S93-99.

[16] Ranganath, V. K.; Khanna, D.; Paulus, H. E.: ACR remission criteria and response criteria. In: *Clinical and experimental rheumatology*, Jg. 24, H. 6 Suppl 43, S. S-14-21.

[17] Wolfe, F. (2000): A reappraisal of HAQ disability in rheumatoid arthritis. In: *Arthritis and rheumatism*, Jg. 43, H. 12, S. 2751–2761. Online verfügbar unter doi:10.1002/1529-0131(200012)43:12<2751::AID-ANR15>3.0.CO;2-6.

[18] Erlacher, L.: Die Therapie der rheumatoiden Arthritis. In: *ÄrzteMagazin*, 2010, Nr. 16, S. 12-14.

[19] Machold, C.: TNF-Blocker switching vs. Rituximab (MabThera). In: *Journal für Mineralstoffwechsel*, 2009, Nr. 9, S. 206-207.

[20] Georgi, A.; Aringer, M.: Therapiemöglichkeiten nach Nichtansprechen von TNF-Blockern bei rheumatoider Arthritis. In: *Journal für Mineralstoffwechsel*, 2010, Nr. 17, S. 15-20.

[21] Scott, David L.; Wolfe, Frederick; Huizinga, Tom W. J. (2010): Rheumatoid arthritis. In: *Lancet*, Jg. 376, H. 9746, S. 1094–1108. Online verfügbar unter doi:10.1016/S0140-6736(10)60826-4.

[22] O’Gorman, M. R.; Thomas, J. (1999): Isotype controls--time to let go? In: *Cytometry*, Jg. 38, H. 2, S. 78–80.

[23] Mongini, Patricia K. A.; Jackson, Anna E.; Tolani, Sonia; Fattah, Rasem J.; Inman, John K. (2003): Role of complement-binding CD21/CD19/CD81 in enhancing human B cell protection from Fas-mediated apoptosis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, Jg. 171, H. 10, S. 5244–5254.

[24] Rothstein, T. L.; Wang, J. K.; Panka, D. J.; Foote, L. C.; Wang, Z.; Stanger, B. et al. (1995): Protection against Fas-dependent Th1-mediated apoptosis by antigen receptor engagement in B cells. In: *Nature*, Jg. 374, H. 6518, S. 163–165. Online verfügbar unter

doi:10.1038/374163a0.

[25] Schram, Brian R.; Rothstein, Thomas L. (2003): NF-kappa B is required for surface Ig-induced Fas resistance in B cells. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), Jg. 170, H. 6, S. 3118–3124.

[26] Sach U. *Zelluläre Diagnostik Grundlagen, Methoden und klinische Anwendung der Durchflusszytometrie*. Basel: Karger; 2007.

[27] Moir, Susan; Malaspina, Angela; Pickeral, Oxana K.; Donoghue, Eileen T.; Vasquez, Joshua; Miller, Natalie J. et al. (2004): Decreased survival of B cells of HIV-viremic patients mediated by altered expression of receptors of the TNF superfamily. In: *The Journal of experimental medicine*, Jg. 200, H. 7, S. 587–599.

[28] Warnatz, Klaus; Schlesier, Michael (2008): Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. In: *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, Jg. 74, H. 5, S. 261–271. Online verfügbar unter doi:10.1002/cyto.b.20432.

[29] Rajewsky, K. 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*. 381:751-758.

[30] Amu S, Tarkowski A, Dorner T, Boharewa M, Brisslert M. The human immunomodulatory CD25+ B cell population belongs to the memory B cell pool. *Scand J Immunol*. 2007 Jul.66(1):77-86.

[31] Dörner, Thomas; Jacobi, Annett M.; Lipsky, Peter E. (2009): B cells in autoimmunity. In: *Arthritis research & therapy*, Jg. 11, H. 5, S. 247. Online verfügbar unter doi:10.1186/ar2780.

[32] Jacobi, Annett M.; Dörner, Thomas (2010): Current aspects of anti-CD20 therapy in rheumatoid arthritis. In: *Current opinion in pharmacology*, Jg. 10, H. 3, S. 316–321. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.coph.2010.02.002

[33] Emery, P.; Keystone, E.; Tony, H. P.; Cantagrel, A.; van Vollenhoven, R.; Sanchez, A. et al. (2008): IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumour necrosis factor biologicals: results from a 24-week multicentre randomised placebo-controlled trial. In: *Annals of the rheumatic diseases*, Jg. 67, H. 11, S. 1516–1523. Online verfügbar unter doi:10.1136/ard.2008.092932.

[34] Genovese, Mark C.; McKay, James D.; Nasonov, Evgeny L.; Mysler, Eduardo F.; da Silva, Nilzio A.; Alecock, Emma et al. (2008): Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: the tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study. In: *Arthritis and rheumatism*, Jg. 58, H. 10, S. 2968–2980. Online verfügbar unter doi:10.1002/art.23940.

[35] Nishimoto, Norihiro; Hashimoto, Jun; Miyasaka, Nobuyuki; Yamamoto, Kazuhiko; Kawai, Shinichi; Takeuchi, Tsutomu et al. (2007): Study of active controlled monotherapy used for rheumatoid arthritis, an IL-6 inhibitor (SAMURAI): evidence of clinical and radiographic benefit from an x ray reader-blinded randomised controlled trial of tocilizumab. In: *Annals of the rheumatic diseases*, Jg. 66, H. 9, S. 1162–1167. Online verfügbar unter doi:10.1136/ard.2006.068064.

[36] Smolen, Josef S.; Beaulieu, Andre; Rubbert-Roth, Andrea; Ramos-Remus, Cesar; Rovensky, Josef; Alecock, Emma et al. (2008): Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. In: *Lancet*, Jg. 371, H. 9617, S. 987–997. Online verfügbar unter doi:10.1016/S0140-6736(08)60453-5.

[37] Genant, H. K.; Peterfy, C. G.; Westhovens, R.; Becker, J-C; Aranda, R.; Vratsanos, G. et al. (2008): Abatacept inhibits progression of structural damage in rheumatoid arthritis: results from the long-term extension of the AIM trial. In: *Annals of the rheumatic diseases*, Jg. 67, H. 8, S. 1084–1089. Online verfügbar unter doi:10.1136/ard.2007.085084.

[38] Genovese, M. C.; Schiff, M.; Luggen, M.; Becker, J-C; Aranda, R.; Teng, J. et al. (2008): Efficacy and safety of the selective co-stimulation modulator abatacept following 2 years of treatment in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to anti-tumour necrosis factor therapy. In: *Annals of the rheumatic diseases*, Jg. 67, H. 4, S. 547–554. Online verfügbar unter doi:10.1136/ard.2007.074773.

[39] Genovese, Mark C.; Becker, Jean-Claude; Schiff, Michael; Luggen, Michael; Sherrer, Yvonne; Kremer, Joel et al. (2005): Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. In: *The New England journal of medicine*, Jg. 353, H. 11, S. 1114–1123. Online verfügbar unter doi:10.1056/NEJMoa050524.

[40] Salliot, C.; Dougados, M.; Gossec, L. (2009): Risk of serious infections during rituximab, abatacept and anakinra treatments for rheumatoid arthritis: meta-analyses of randomised placebo-controlled trials. In: *Annals of the rheumatic diseases*, Jg. 68, H. 1, S. 25–32. Online verfügbar unter doi:10.1136/ard.2007.083188.

[41] Cohen, Stanley B.; Emery, Paul; Greenwald, Maria W.; Dougados, Maxime; Furie, Richard A.; Genovese, Mark C. et al. (2006): Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. In: *Arthritis and rheumatism*, Jg. 54, H. 9, S. 2793–2806. Online verfügbar unter doi:10.1002/art.22025.

[42] Keystone, Edward; Fleischmann, Roy; Emery, Paul; Furst, Daniel E.; van Vollenhoven, Ronald; Bathon, Joan et al. (2007): Safety and efficacy of additional courses of rituximab in

patients with active rheumatoid arthritis: an open-label extension analysis. In: *Arthritis and rheumatism*, Jg. 56, H. 12, S. 3896–3908. Online verfügbar unter doi:10.1002/art.23059.

[43] Oren, S.; Mandelboim, M.; Braun-Moscovici, Y.; Paran, D.; Ablin, J.; Litinsky, I. et al. (2008): Vaccination against influenza in patients with rheumatoid arthritis: the effect of rituximab on the humoral response. In: *Annals of the rheumatic diseases*, Jg. 67, H. 7, S. 937–941. Online verfügbar unter doi:10.1136/ard.2007.077461.

[44] Aletaha, Daniel; Neogi, Tuhina; Silman, Alan J.; Funovits, Julia; Felson, David T.; Bingham, Clifton O. et al. (2010): 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. In: *Annals of the rheumatic diseases*, Jg. 69, H. 9, S. 1580–1588. Online verfügbar unter doi:10.1136/ard.2010.138461.

[45] Bukhari, M. A. S.; Wiles, N. J.; Lunt, M.; Harrison, B. J.; Scott, D. G. I.; Symmons, D. P. M.; Silman, A. J. (2003): Influence of disease-modifying therapy on radiographic outcome in inflammatory polyarthritis at five years: results from a large observational inception study. In: *Arthritis and rheumatism*, Jg. 48, H. 1, S. 46–53. Online verfügbar unter doi:10.1002/art.10727.

[46] van der Heide, A.; Jacobs, J. W.; Bijlsma, J. W.; Heurkens, A. H.; van Booma-Frankfort, C.; van der Veen, M. J. et al. (1996): The effectiveness of early treatment with "second-line" antirheumatic drugs. A randomized, controlled trial. In: *Annals of internal medicine*, Jg. 124, H. 8, S. 699–707.

[47] van Dongen, Henrike; van Aken, Jill; Lard, Leroy R.; Visser, Karen; Roday, H. Karel; Hulsmans, Harry M. J. et al. (2007): Efficacy of methotrexate treatment in patients with probable rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. In: *Arthritis and rheumatism*, Jg. 56, H. 5, S. 1424–1432. Online verfügbar unter doi:10.1002/art.22525.

[48] Burkhardt, Harald; Möller, Burkhard (2003): [The pathologic basis: pathogenesis of rheumatoid arthritis]. In: Pharmazie in unserer Zeit, Jg. 32, H. 5, S. 368–374. Online verfügbar unter doi:10.1002/pauz.200300035.

[49] Martinez-Gamboa, Lorena; Brezinschek, Hans-Peter; Burmester, Gerd R.; Dörner, Thomas (2006): Immunopathologic role of B lymphocytes in rheumatoid arthritis: rationale of B cell-directed therapy. In: Autoimmunity reviews, Jg. 5, H. 7, S. 437–442. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.autrev.2006.02.004.

[50] Matsumoto, M.; Lo, S. F.; Carruthers, C. J.; Min, J.; Mariathasan, S.; Huang, G. et al. (1996): Affinity maturation without germinal centres in lymphotoxin-alpha-deficient mice. In: Nature, Jg. 382, H. 6590, S. 462–466. Online verfügbar unter doi:10.1038/382462a0.

[51] Henneken, Maren; Dörner, Thomas; Burmester, Gerd-Rüdiger; Berek, Claudia (2005): Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. In: Arthritis research & therapy, Jg. 7, H. 5, S. R1001-13. Online verfügbar unter doi:10.1186/ar1776.

[52] Cohen, Stanley B.; Emery, Paul; Greenwald, Maria W.; Dougados, Maxime; Furie, Richard A.; Genovese, Mark C. et al. (2006): Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. In: Arthritis and rheumatism, Jg. 54, H. 9, S. 2793–2806. Online verfügbar unter doi:10.1002/art.22025.

[53] Cohen, Stanley B.; Keystone, Edward; Genovese, Mark C.; Emery, Paul; Peterfy, Charles; Tak, Paul Peter et al. (2010): Continued inhibition of structural damage over 2 years in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab in combination with methotrexate. In: Annals of the rheumatic diseases, Jg. 69, H. 6, S. 1158–1161. Online verfügbar unter doi:10.1136/ard.2009.119222.

[54] Emery, Paul; Fleischmann, Roy; Filipowicz-Sosnowska, Anna; Schechtman, Joy; Szczepanski, Leszek; Kavanaugh, Arthur et al. (2006): The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. In: *Arthritis and rheumatism*, Jg. 54, H. 5, S. 1390–1400. Online verfügbar unter doi:10.1002/art.21778.

[55] Roll, Petra; Dörner, Thomas; Tony, Hans-Peter (2008): Anti-CD20 therapy in patients with rheumatoid arthritis: predictors of response and B cell subset regeneration after repeated treatment. In: *Arthritis and rheumatism*, Jg. 58, H. 6, S. 1566–1575. Online verfügbar unter doi:10.1002/art.23473.

[56] Keystone, E.; Emery, P.; Peterfy, C. G.; Tak, P. P.; Cohen, S.; Genovese, M. C. et al. (2009): Rituximab inhibits structural joint damage in patients with rheumatoid arthritis with an inadequate response to tumour necrosis factor inhibitor therapies. In: *Annals of the rheumatic diseases*, Jg. 68, H. 2, S. 216–221. Online verfügbar unter doi:10.1136/ard.2007.085787.

[57] Perez-Andres, M.; Paiva, B.; Nieto, W. G.; Caraux, A.; Schmitz, A.; Almeida, J. et al. (2010): Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. In: *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, Jg. 78 Suppl 1, S. S47-60. Online verfügbar unter doi:10.1002/cyto.b.20547.

[58] Liao, Katherine P.; Alfredsson, Lars; Karlson, Elizabeth W. (2009): Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. In: *Current opinion in rheumatology*, Jg. 21, H. 3, S. 279–283. Online verfügbar unter doi:10.1097/BOR.0b013e32832a2e16.

[59] Carlens, Cecilia; Hergens, Maria-Pia; Grunewald, Johan; Ekbom, Anders; Eklund, Anders; Höglund, Caroline Olgart; Askling, Johan (2010): Smoking, use of moist snuff, and risk of chronic inflammatory diseases. In: *American journal of respiratory and critical care*

medicine, Jg. 181, H. 11, S. 1217–1222. Online verfügbar unter doi:10.1164/rccm.200909-1338OC.

[60] Brickmann, Kerstin; Brezinschek, Ruth I.; Yazdani-Biuki, Babak; Graninger, Winfried B.; Brezinschek, Hans-Peter: Superior specificity of anti-citrullinated peptide antibodies in patients with chronic lymphocytic leukemia and arthritis. In: Clinical and experimental rheumatology, Jg. 28, H. 6, S. 888–891.

[61] Yazdani-Biuki, B.; Stadlmaier, E.; Mulabecirovic, A.; Brezinschek, R.; Tilz, G.; Demel, U. et al. (2005): Blockade of tumour necrosis factor {alpha} significantly alters the serum level of IgG- and IgA-rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis. In: Annals of the rheumatic diseases, Jg. 64, H. 8, S. 1224–1226. Online verfügbar unter doi:10.1136/ard.2004.030262.

[62] Sellam, Jérémie; Hendel-Chavez, Houria; Rouanet, Stéphanie; Abbed, Karim; Combe, Bernard; Le Loët, Xavier et al. (2011): B-cell activation biomarkers as predictive factors of the response to rituximab in rheumatoid arthritis. In: Arthritis and rheumatism. Online verfügbar unter doi:10.1002/art.30233.

# Lebenslauf

Name Stefanie Genger  
Adresse Kastelfeldgasse 27  
8010 Graz  
E-Mail [Stefanie.Genger@yahoo.com](mailto:Stefanie.Genger@yahoo.com)  
Mobil 0043 676 9263588



## Persönliches

Geburtsdatum 27.09.1984  
Geburtsort Leoben, Steiermark  
Staatsbürgerschaft Österreich

## Ausbildung

1990 – 1995 Volksschule Leoben, Steiermark  
1995 – 2003 Gymnasium BG/BRG Leoben I  
2003 – 2011 Humanmedizinstudium Medizinische Universität Graz

## Arbeitserfahrung

Ferienjob Sommer 2002 – Hilfswerk Steiermark, Leoben  
Ferienjob Sommer 2003 – Allgemeinpraxis Fr. Dr. med. Barbara Genger, Leoben  
Geringfügige Arbeitskraft 2004 – 2009, erneut ab 11/2010 – Allgemeinpraxis Fr. Dr. med. Barbara Genger, Leoben

## Famulaturen und medizinische Erfahrungen

4 Wochen Chirurgie, LKH Bad Aussee  
2 Wochen Orthopädie, Uniklinikum Graz  
3 Wochen Frauenheilkunde und Geburtshilfe, LKH Feldbach  
4 Wochen Innere Medizin, KH Mariahilf Hamburg, Deutschland  
4 Wochen Innere Medizin, Elisabeth KH Berlin, Deutschland  
2 malige Mitarbeit als Teddydoc 2005 und 2008

Organisation des Teddybär Krankenhauses 2009

### **Spezielle Studienmodule (SSM)**

Klinisch topographische Anatomie der Extremitäten

Grundlagen der Ernährung, oxydativer Stress und Sport

Bindegewebserkrankungen, Diagnose und Therapie

Wissenschaftlich fundierte Krankheitsprävention

Case-based Learning in Klinik und Praxis

### **6. Studienjahr**

Fächergruppe I – Anästhesie und operative Intensivmedizin am Klinikum Passau

Fächergruppe II – Innere Medizin, LKH Bruck an der Mur, Steiermark

Fächergruppe III – Gynäkologie, KH Barmherzige Brüder I, Graz

Pflichtfamulatur Allgemeinmedizin – Praxis und Ambulanz Justizanstalt Karlau Dr. med. Klaus Gstirner

### **Wissenschaftliche Arbeit**

S. Genger, K. Gründl, I. Holzer, W.B. Graninger, H.-P. Brezinschek. Expression von CD95+ auf B-Zellen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis. „Rheuma Plus“ der Ärzte Woche. 2010;9(2):15-16.

### **Sprachkenntnisse**

Englisch in Wort und Schrift sehr gut

Italienisch Basiskenntnisse

Spanisch Basiskenntnisse

