

**Die Expression der Nervenwachstumsfaktor-
Rezeptoren TrkA und p75 auf einem erhöhten Anteil
dendritischer Zellen und peripheren Leukozyten bei
Patienten mit systemischem Lupus erythematodes
in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Stefanie Irmine Katharina Welle, geb. Moßmann

aus Ludwigshafen am Rhein

2021

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Matthias Seidel
2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Wenzel

Tag der Mündlichen Prüfung: 04.05.2021

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III – Innere Medizin (Onkologie)

Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Peter Brossart

Für Jan, Lucas und Jakob

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung.....	10
1.1 Systemischer Lupus erythematoses	10
1.1.1 Epidemiologie	10
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese.....	10
1.1.3 Klinische Manifestation und Diagnostik	16
1.1.4 Medikamentöse Therapie	19
1.2 Der Nervenwachstumsfaktor und seine Rezeptoren.....	19
1.2.1 Nervenwachstumsfaktor	19
1.2.2 Tropomyosin-Rezeptor-Kinase A	20
1.2.3 p75 Neurotrophin-Rezeptor	22
1.3 Neurogene Entzündung	23
1.4 Zelloberflächenmarker für Leukozytensubpopulationen.....	25
1.5 Ziel der Arbeit.....	27
2. Material und Methoden.....	29
2.1 Patienten- und Kontrollgruppe	29
2.2 Durchflusszytometrie	31
2.2.1 Prinzip der Durchflusszytometrie	31
2.2.2 Probenvorbereitung für die Durchflusszytometrie.....	33
2.2.3 Färbeschemata	35
2.2.4 Vorgehensweise bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten.....	36
2.3 Statistische Auswertung.....	39
3. Ergebnisse.....	41
3.1 Patienten- und Kontrollgruppe	41
3.2 Blutbild	43
3.3 TrkA- und p75 ^{NTR} -Rezeptorexpression auf peripheren Leukozyten im Blut von SLE-Patienten und Kontrollpersonen.....	43
3.4 Subgruppenanalyse: TrkA- und p75 ^{NTR} -Rezeptorexpression auf peripheren Leukozyten in Abhängigkeit von der SLE-Krankheitsaktivität	46
3.5 CD11c positive Leukozyten im Blut von SLE-Patienten und Kontrollpersonen	48

3.6	TrkA positive CD11b-Population im Blut von SLE-Patienten und Kontrollpersonen	50
4.	Diskussion	52
5.	Zusammenfassung	59
6.	Tabellenverzeichnis	61
7.	Abbildungsverzeichnis	62
8.	Literaturverzeichnis	64
9.	Danksagung	74
10.	Publikation	75

Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
ANA	Antinukleäre Antikörper
Anti-dsDNA-Ak	Antikörper gegen doppelsträngige DNA
APC	Allophycocyanin
BAFF	B-Zell-Aktivierungsfaktor
BCR	B-Zell-Rezeptor
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CD	Cluster of differentiation
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CRP	C-reaktives Protein
DCs	Dendritische Zellen
ERK	Extrazellulär signalregulierte Kinasen
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HAQ	Health Assessment Questionnaire
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HNPs	Humane neutrophile Peptide
IL	Interleukin(e)
INF	Interferon(e)
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
LBP	Lipopolysaccharidbindendes Protein
LDGs	Granulozyten mit geringer Zelldichte
LPS	Lipopolysaccharid
mDCs	Myeloische dendritische Zellen

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MW	Mittelwert
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
NETs	Neutrophile extrazelluläre Traps
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NGFi	Nervenwachstumsfaktor-Inhibitoren
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NLR	NOD-like Rezeptor
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
NT	Neurotrophin(e)
p75 ^{NTR}	p75 Neurotrophin-Rezeptor
pDCs	Plasmazytoide dendritische Zellen
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyaninfarbstoff 7
PerCP/Cy5.5	PerCP/Cyaninfarbstoff 5.5
PI3K	Phosphatidylinositol3-Kinase
PLC	Phospholipase C
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SLEDAI	Systemic Lupus erythematoses disease activity index
SLICC	Systemic Lupus International Collaborating Clinics
SP	Substanz P
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th	T-Helferzellen
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tregs	Regulatorische T-Zellen

TrkA

Tropomyosin-Rezeptor-Kinase A

1. Einleitung

1.1 Systemischer Lupus erythematoses

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine heterogene systemische Autoimmunerkrankung, die nahezu alle Organsysteme betrifft und mit vielfältigen klinischen Erscheinungsformen einhergehen kann.

1.1.1 Epidemiologie

In Deutschland betrug die Prävalenz des SLE im Jahr 2002 36,7/100 000 Einwohner mit einem Verhältnis von Frauen zu Männern von 4:1. Dabei betrifft die Erkrankung typischerweise Frauen im gebärfähigen Alter (Kuhn et al., 2015). Die Inzidenz des SLE hat sich in den letzten Jahrzehnten aufgrund vermehrter Diagnosestellung von milden SLE-Formen verdreifacht (Bertsias et al., 2012).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie des SLE ist weitgehend unbekannt. Es wird von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen. Hierbei spielen Umweltfaktoren, hormonelle Faktoren, genetische Veränderungen und eine gestörte Immunregulation eine Rolle, auf welche hier schwerpunktmäßig eingegangen wird. Letztendlich führen vielschichtige Mechanismen zu einer systemischen Entzündungsreaktion mit klinisch manifesten Endorganschäden.

Umweltfaktoren

Zu den beteiligten Umweltfaktoren gehören Sonnenlicht bzw. UVB-Strahlung, Viren- und Virenbestandteile (z.B. Epstein-Barr-Virus) und Medikamente wie Procainamid und Hydralazin (Bertsias et al., 2012).

Hormonelle Faktoren

SLE betrifft deutlich mehr Frauen als Männer. Dies wird ursächlich teilweise dem Östrogen-Rezeptor-1 und immunmodulatorischen Genen auf dem X-Chromosom zugeschrieben (Zharkova et al., 2017).

Genetische Veränderungen

Bislang ist eine große Anzahl an genetischen Veränderungen beim Menschen identifiziert worden, welche mit einer erhöhten Disposition verbunden sind, an SLE zu erkranken (Übersichtsarbeit von Saeed, 2017). Diese steuern eine Vielzahl verschiedenster Mechanismen sowohl im angeborenen als auch im erworbenen Immunsystem. So werden bestimmte genetische Veränderungen in der HLA (Humanes Leukozytenantigen)-Region wie beispielsweise HLA-DRB1 als am stärksten mit SLE assoziierte Genveränderungen angesehen. Daneben begünstigen auch epigenetische Veränderungen die Entstehung von SLE. Es konnte beispielweise gezeigt werden, dass T-Zell-DNA von SLE-Patienten hypomethyliert ist, was zu einer erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine beitragen kann. Ursächlich für eine Hypomethylierung können unter anderem UV-B-Strahlen und die oben genannten Medikamente sein (Ghodke-Puranik und Niewold, 2015).

Gestörte Regulation des Immunsystems

Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass neben dem erworbenen auch dem angeborenen Immunsystem eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese des SLE zukommt (Dema und Charles, 2014). Tab. 1 gibt einen Überblick über bislang bekannte, wichtige Veränderungen im Immunsystem bei SLE, welche im Anschluss näher erläutert werden. Aufgrund der komplexen Pathogenese des SLE mit einer Vielzahl an Veränderungen im Immunsystem wird kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben.

Tab. 1: Zentrale pathogene Mechanismen, Zellen und Moleküle bei SLE.

B-Lymphozyten	Autoreaktive B-Zellen ↑, Plasmazellen ↑ Autoantikörper Produktion ↑ T-Zell-Costimulation
T-Lymphozyten	CD40L-CD40-Interaktion mit B-Lymphozyten Ungleichgewicht zwischen Tregs und Th17-Zellen IL-17 ↑
Dendritische Zellen	pDCs: INF- α ↑ durch Immunkomplexe/DNA mDCs: Immunogene Antigenpräsentation an T-Lymphozyten
Neutrophile Granulozyten	NETose ↑
Apoptose	Gestörte Apoptose Clearance apoptotischer und nekrotischer Zellen durch Phagozyten ↓
Komplementsystem	Eliminierung apoptotischer Zellen ↓ Entzündungsreaktion ↑ durch Ablagerung von Komplementfaktoren
Inflammasom	Aktivierung

Im Folgenden wird zunächst die Bedeutung peripherer Leukozytenpopulationen, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, bei der Pathogenese des SLE beschrieben.

SLE ist charakterisiert durch das Vorhandensein eines breiten Spektrums von pathogenen Autoantikörpern, die über die Bildung von Immunkomplexen Entzündungsprozesse hervorrufen und zu Organmanifestationen beitragen. Folglich kommt den Autoantikörper produzierenden Plasmazellen und den B-Lymphozyten als deren Vorläufer eine besondere Bedeutung zu, weshalb SLE traditionell als eine B-Zell-Erkrankung angesehen wurde (Mak und Kow, 2014). Darüber hinaus tragen B-Lymphozyten auch als autoantigenpräsentierende Zellen über die Stimulation von T-Zellen zu SLE-Manifestationen bei (Tsokos, 2011).

In zahlreichen Untersuchungen konnten bei SLE-B-Lymphozyten an verschiedensten Kontrollpunkten der zentralen und peripheren Toleranzentwicklung Veränderungen nachgewiesen werden, wodurch autoreaktive B-Zellen entstehen können. So findet beispielsweise in den Keimzentren während des B-Zell-Reifungsprozesses eine unzureichende negative Selektion autoreaktiver B-Zellen statt. Dieser Prozess ist von der Interaktion mit folliculären T-Helferzellen abhängig, sodass vermutet wird, dass diesen hier eine bedeutende Rolle zukommt (reviewed in Blanco et al., 2016). Bestimmte Zytokine, wie der B-Zell-Aktivierungsfaktor (BAFF), welcher unter anderem von dendritischen Zellen (DCs) als Folge einer Stimulation durch Typ-I-Interferon (INF), oder Interleukin (IL)-21 aus aktivierten T-Zellen freigesetzt wird, können die Selbsttoleranz an bestimmten Kontrollpunkten brechen und eine B-Zell-Differenzierung hin zu Plasmazellen stimulieren (Alexander et al., 2015). Bei SLE-Patienten finden sich erhöhte BAFF-Level, welche mit der Krankheitsaktivität korrelieren (Dema und Charles, 2014). Die Neutralisierung von BAFF mit dem humanen monoklonalem Antikörper Belimumab ist die derzeit einzige zugelassene Biologikatherapie bei SLE. Unter einer Therapie mit Belimumab werden zirkulierende Plasmablasten und Antikörper gegen doppelsträngige DNA (Anti-dsDNA-Ak) reduziert, während die Komplementspiegel steigen (Alexander et al., 2015).

SLE-T-Lymphozyten weisen phänotypische und funktionelle Charakteristika chronisch aktivierter T-Lymphozyten auf, welche insbesondere durch die Aktivierung von autoreaktiven B-Zellen zur Pathogenese des SLE beitragen. Bei SLE-T-Lymphozyten findet sich eine Überexpression des co-stimulatorischen Oberflächenmoleküls CD40L, was über eine Bindung an CD40 auf B-Lymphozyten zu deren Differenzierung, Proliferation und Antikörperproduktion und über eine Hochregulierung von CD80 auf antigenpräsentierenden Zellen zu einer vermehrten Stimulation der T-Zellen selbst führt (Mak und Kow, 2014).

Bei SLE konnten außerdem Veränderungen bei T-Zell-Subtypen festgestellt werden. So finden sich eine Expansion der T-Helferzell(Th)17-Population und eine Erhöhung des proinflammatorischen IL-17 im Serum von SLE-Patienten, und dies insbesondere bei Nierenmanifestation und in Abhängigkeit von der SLE-Krankheitsaktivität (Moulton und Tsokos, 2015). Bei SLE-Patienten wurde eine Reduktion der Anzahl regulatorischer T-Zellen (Tregs) nachgewiesen. Tregs tragen zur Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz

durch B- und T-Lymphozyten bei. Die Ergebnisse aus Studien zur immunsuppressiven Aktivität der Tregs bei SLE sind widersprüchlich. Letztlich wird vermutet, dass ein Ungleichgewicht zwischen Th17-Zellen und Tregs bei SLE den Verlust der Selbsttoleranz begünstigen könnte (Wahren-Herlenius und Dörner, 2013).

Bei den dendritischen Zellen wird hauptsächlich in plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) und myeloische dendritische Zellen (mDCs) unterschieden, wobei auf die Rolle Letzterer in der Diskussion genauer eingegangen wird. pDCs gelten unter den peripheren Blutzellen als Hauptproduzenten von Typ-I-IFN, insbesondere INF- α (Dema und Charles, 2014). Bei SLE-Patienten konnten hohe Konzentrationen an INF- α gemessen werden. pDCs steigern ihre Typ-I-IFN-Produktion nach Bindung von Immunkomplexen an Toll-like Rezeptoren (TLR), insbesondere TLR 9 (Alexander et al., 2015, Fransen et al., 2010). Zudem konnte man bei SLE-Patienten eine Hochregulierung von IFN-induzierten Genen, die sogenannte IFN-Signatur, nachweisen und eine Korrelation mit der Krankheitsaktivität feststellen. Typ-I-IFN hat Einfluss auf B-Zell-Aktivierung, Antikörperproduktion, Proliferation von DCs und Überleben und Expansion von T-Zellen (Dema und Charles, 2014). So induziert INF- α beispielsweise BAFF, wodurch die B-Zell-Differenzierung angeregt wird (Alexander et al., 2015).

Neutrophile Granulozyten setzen zur Abwehr pathogener Mikroorganismen sogenannte neutrophile extrazelluläre Traps (NETs) frei, die durch eine besondere Art des Zelltods, der sogenannten NETose entstehen. NETs stellen Netzwerke extrazellulärer Fasern dar, die mit der Pathogenese von SLE assoziierte immunogene Komponenten wie Histone, humane neutrophile Peptide (HNPs) und Kathelicidin LL37 enthalten. NET-bildende neutrophile Granulozyten konnten in Nieren- und Hautbiopsien von SLE-Patienten nachgewiesen werden (Dema und Charles, 2014). Granulozyten mit geringer Zelldichte (low density granulocytes, LDGs) finden sich vermehrt bei SLE-Patienten und entwickeln in vitro eine spontane NETose, was eine gesteigerte Kapazität zur Freisetzung von NETs in vivo vermuten lässt. NET-Komponenten wie LL37 und HNPs können in Komplexen mit DNA und Anti-DNA-Ak durch Freisetzung von IL-17 direkt zu Endothelzellschäden und damit Endorganschäden führen und gelten zudem als potente Stimulatoren einer IFN- α -Sekretion durch pDCs. Dabei stimuliert IFN- α selbst neutrophile Granulozyten zur Freisetzung von NETs, woraus potentiell ein positiver Feedback-Loop resultiert. Es gibt

zudem Hinweise darauf, dass eine gestörte Clearance von NETs zur Entwicklung von Autoimmunprozessen beiträgt (Knight und Kaplan, 2012).

Eine gestörte Apoptose und eine verminderte Clearance apoptotischer und nekrotischer Zellen durch Phagozyten gelten als bedeutsam bei der Entstehung von SLE. So ist beispielsweise die Expression des am Phagozytoseprozess beteiligten Oberflächenrezeptors CD44 auf Monozyten aus dem Blut von SLE-Patienten vermindert. Nicht phagozytierte nukleäre Zellkomponenten werden in den Keimzentren der Lymphknoten an der Oberfläche follikulärer DCs präsentiert, was wiederum das Überleben autoreaktiver B-Zellen begünstigt. Bei einer Störung der Clearance von früh-apoptotischen Zellen kommt es zu einer sekundären Nekrose der Zellen, was eine gesteigerte Immunogenität zur Folge hat (Alexander et al. 2015).

Die Rolle des Komplementsystems bei der Pathogenese des SLE ist komplex und erscheint teilweise paradox. Einerseits sind genetische Defekte bei frühen Faktoren des klassischen Wegs des Komplementsystems, insbesondere C1q, stark mit der Entstehung von SLE assoziiert. Dies erklärt man sich dadurch, dass dem Komplementfaktor C1q eine bedeutende Rolle bei der Eliminierung apoptotischer Zellen zukommt und dieser die INF- α -Produktion durch pDCs inhibieren kann. Andererseits können Komplementfaktoren im klassischen Weg über Bindung an Autoantikörper enthaltende Immunkomplexe aktiviert werden und in der Folge eine Entzündungsreaktion mit Organschäden hervorrufen. SLE-Patienten zeigen zumeist C3-Ablagerungen in entzündeten Geweben wie beispielweise in den Glomeruli bei Lupusnephritis. Als Ausdruck des gesteigerten Komplementumsatzes sind die Komplementfaktoren im Blut erniedrigt, wobei üblicherweise C3 und C4 gemessen werden (Trouw et al., 2017).

Das Inflammasom ist ein Multiprotein-Komplex, der in Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten vorkommt. Eine Aktivierung erfolgt zumeist über NLR (NOD-like) Rezeptoren, insbesondere NLRP3, was zu einer vermehrten Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-18 und IL-1 β führt. SLE-typische Immunkomplexe, Komplementfaktoren wie C3a und NETs können das NLRP3-Inflammasom aktivieren. In Nierenbiopsien von SLE-Patienten mit Lupusnephritis fand sich eine erhöhte Expression von Inflammasom-Komponenten wie NLRP3, was die

Vermutung stützt, dass das Inflammasom bei SLE aktiviert ist (Kahlenberg und Kaplan, 2014).

1.1.3 Klinische Manifestation und Diagnostik

Häufige unspezifische Allgemeinsymptome von SLE sind Fieber, Müdigkeit und Abgeschlagenheit. Bei etwa 75 % der Patienten treten im Krankheitsverlauf Manifestationen an der Haut wie ein Schmetterlingserythem, Photosensitivität und Alopezie auf, die in einem Viertel der Fälle sogar Erstsymptome sind. Bei etwa 90 % der Patienten mit SLE sind das Muskel- und Skelettsystem mit Myalgien, Arthralgien und nicht-erosiven Arthritiden kleiner und großer Gelenke betroffen. Weitere schwerwiegende Organbeteiligungen können Manifestationen am Zentralnervensystem wie Depressionen und epileptische Anfälle, eine Nierenbeteiligung in Form einer Glomerulonephritis, kardio-pulmonale Erkrankungen und aseptische Serositiden sein. Dabei zählen kardiovaskuläre Ereignisse und schwere bakterielle Infektionen zu den Haupttodesursachen bei SLE-Patienten (Kuhn et al., 2015).

Bei klinischem Verdacht unterstützt die Labordiagnostik, insbesondere die Antikörperdiagnostik, die Diagnose eines SLE. Häufig weisen SLE-Patienten Blutbildveränderungen in Form einer Anämie, Leukozytopenie und Thrombozytopenie auf. Als Nierenparameter sollten Kreatinin im Serum, Urinstatus und –sediment untersucht werden. Charakteristisch für eine aktive SLE-Erkrankung ist eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) bei normwertigem oder leicht erhöhtem C-reaktivem Protein (CRP) (Kuhn et al., 2015). Die Bestimmung des Titers der antinukleären Antikörper (ANA) mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz (Hep2-Zellen) eignet sich aufgrund der hohen Sensitivität von 95 % als Screeningmethode. Anti-dsDNA-Ak können bei etwa 70 % der SLE-Patienten nachgewiesen werden und sind hochspezifisch für SLE. Anti-Sm-Antikörper sind pathognomonisch für SLE, finden sich jedoch nur bei 10-30 % der Patienten (Bertsias et al., 2012). Als Hinweis auf einen Komplementverbrauch sollten die Komplementfaktoren C3 und C4 bestimmt werden. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Anti-dsDNA-Ak und Komplementfaktoren und der Krankheitsaktivität. Häufig steigen Anti-dsDNA-Ak Monate vor einem Krankheitsschub an,

parallel zu einem Abfall der Komplementfaktoren (Kuhn et al., 2015). Zur weiteren Antikörperdiagnostik können unter anderem Anti-Ro- und Antiphospholipid-Antikörper bestimmt werden, wobei Letztere unter anderem mit einer schweren Lupusnephritis und einem Antiphospholipid-Syndrom assoziiert sind, das mit einer erhöhten Inzidenz thrombotischer Ereignisse einhergeht (Bertsias et al., 2012).

Als diagnostische Kriterien können die Klassifikationskriterien des American College of Rheumatology (ACR) von 2019 herangezogen werden (Aringer et al., 2019). Dabei kann ein Patient als SLE klassifiziert werden, wenn ≥ 10 Punkte erreicht werden (Tab. 2). In unserer Studie erfolgte die Diagnosestellung anhand der alten ACR-Klassifikationskriterien von 1971, zuletzt 1997 revidiert (Hochberg, 1997, Tan et al., 1982).

Tab. 2: ACR-Klassifikationskriterien zum SLE 2019.

Eingangskriterium: ANA-Titer $\geq 1:80$ auf Hep2-Zellen		
Zusätzliche Kriterien:		
<ul style="list-style-type: none"> • Mindestens ein Kriterium muss aktuell gegeben sein. • Die gewerteten Kriterien müssen nicht gleichzeitig vorliegen, sollen aber wenigstens einmal dokumentiert bestanden haben. • Ein Kriterium soll nicht gewertet werden, wenn andere Gründe dies auch bzw. besser erklären. • Innerhalb jeder Domäne geht nur die höchste Punktzahl in die Gesamtpunktzahl ein. 		
Haut	Nicht vernarbende Alopezie	2
	Orale Ulzera	2
	Subakut-kutaner oder diskoider LE	4
	Aktuer kutaner LE	6
Konstitutionell	Fieber	2
Arthritis	Synovitis/Druckschmerz in ≥ 2 Gelenken und Gelenke mit Morgensteifigkeit ≥ 30 Minuten	6
Neurologie	Delirium	2
	Psychose	3
	Anfälle	5
Serositis	Pleura- oder Perikarderguss	5
	Akute Perikarditis	6
Hämatologie	Leukopenie	3
	Thrombopenie	4

	Autoimmunhämolyse	4
Nieren	Proteinurie >0,5g/24 Stunden	4
	Lupusnephritis (histolog.) Typ II, V	8
	Lupusnephritis (histolog.) Typ III, IV	10
Antiphospholipid-Antikörper	Anti-Cardiolipin IgG >40 GPL oder Anti-β2GP1 IgG >40 GPL oder Lupus-Antikoagulanz +	2
Komplement	C3 oder C4 vermindert	3
	C3 und C4 vermindert	4
Spezifische Autoantikörper	Anti-dsDNA-Antikörper	6
	Anti-Smith-Antikörper	6

Zur standardisierten Erfassung der Krankheitsaktivität wurden mehrere Indizes entwickelt, die die Basis für eine Therapieentscheidung darstellen. So zum Beispiel der SLE Disease Activity Index (SLEDAI), welcher in unserer Studie eingesetzt wurde. Der SLEDAI enthält 24 Parameter, 9 potentiell von einer SLE-Erkrankung betroffene Organsysteme (u.a. Zentralnervensystem, Gefäßsystem, renales und muskuloskelettales System, immunologisches System, kutanes/mukokutanes System, hämatologisches System) und Gewichtungsfaktoren zur umfassenden Beurteilung der Krankheitsaktivität. Es können Werte von minimal null bis maximal 105 Punkten erreicht werden, wobei bereits Werte größer 10 einer stärkeren Krankheitsaktivität entsprechen (Nossent, 1993, Bombardier et al., 1992). Zur ergänzenden Einschätzung der Krankheitsaktivität kann der Health assessment questionnaire (HAQ) eingesetzt werden, mit dessen Hilfe die Fähigkeiten des Patienten im alltäglichen Leben, wie Anziehen, Körperpflege oder Gegenstände erreichen, bewertet und der Grad seiner Behinderung eingeschätzt werden kann. Es können Werte von null bis maximal drei Punkten erreicht werden (Bruce und Fries, 2005).

Von der Krankheitsaktivität abzugrenzen ist der Schaden an Organen oder Systemen, welcher jährlich mit dem Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR)-Schadensindex erfasst werden sollte (Kuhn et al., 2015).

1.1.4 Medikamentöse Therapie

Hier soll lediglich ein kurzer Überblick über die Möglichkeiten der medikamentösen Therapie bei SLE gegeben werden.

Bei jedem SLE-Patienten besteht die Indikation zu einer medikamentösen Therapie mit Antimalariamitteln, sofern keine Kontraindikation vorliegt. Antimalariamittel fördern die Remissionserhaltung, reduzieren die Schubfrequenz und Organschäden im Verlauf der Erkrankung und zeigen eine gute Effektivität bei Arthritiden und kutanen Manifestationen. Für die SLE-Therapie sind Hydroxychloroquin und Chloroquin zugelassen, wobei Hydroxychloroquin bevorzugt eingesetzt wird. Ohne spezifische Organbeteiligung ist eine Therapie mit Antimalariamitteln in der Regel ausreichend. Zur akuten Kontrolle von SLE-Organmanifestationen eignen sich Glukokortikoide. Ist mit maximal 5-7,5 mg Prednisolon-Äquivalent langfristig keine ausreichende Krankheitskontrolle möglich, sollten auch ohne Organbeteiligung Immunsuppressiva wie Azathioprin, Methotrexat oder Mycophenolat-Mofetil zum Einsatz kommen. Methotrexat wirkt besonders bei entzündlichen Manifestationen an den Gelenken und der Haut und ist bei Nierenfunktionsstörungen absolut kontraindiziert. Besteht bei Autoantikörper positivem SLE trotz Standardtherapie eine hohe Krankheitsaktivität, sollte als Zusatztherapie Belimumab eingesetzt werden. Liegen aktive Organbeteiligungen, insbesondere von Niere und Zentralnervensystem vor, ist die nächste Stufe der Therapie indiziert. Abgesehen von den eigens für neuropsychiatrische Manifestationen entwickelten Therapieempfehlungen, basiert die immunsuppressive Therapie bei aktiver Organbeteiligung im Wesentlichen auf Erfahrungen, die bei der Lupusnephritis gewonnen wurden. Hier können neben den oben genannten Immunsuppressiva auch Cyclophosphamid, Calcineurininhibitoren und Rituximab zum Einsatz kommen (Kuhn et al., 2015).

1.2 Der Nervenwachstumsfaktor und seine Rezeptoren

1.2.1 Nervenwachstumsfaktor

Der Nervenwachstumsfaktor (Nerve Growth Factor, NGF) wurde 1951 erstmalig als Polypeptid beschrieben, welches Proliferation und Differenzierung von sympathischen

und sensorischen Nerven in der Embryogenese reguliert. Mittlerweile weiß man, dass NGF auch im Immunsystem und im endokrinen System eine wichtige Rolle spielt (Skaper, 2017). NGF wird von unterschiedlichen Zelltypen, insbesondere Neuronen, Fibroblasten, Epithelzellen, glatten Muskelzellen, Mastzellen und Lymphozyten, sezerniert (Freund-Michel und Frossard, 2008).

NGF gehört zur Familie der Neurotrophine, zu denen aufgrund ihrer NGF-ähnlichen Struktur und Funktion unter anderem auch der brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Neurotrophin(NT)-3 und NT-4/5 zählen (Freund-Michel und Frossard, 2008). NGF ist ein 140 kDa Polypeptid, bestehend aus α -, β - und γ -Untereinheiten, wobei die β -Untereinheit für die biologische Funktion verantwortlich ist. NGF wird in den Zellen zunächst als präpro-NGF synthetisiert und im endoplasmatischen Retikulum zu pro-NGF verändert (Frossard et al., 2004). Pro-NGF kann intra- oder extrazellulär durch Proteasen zu reifem β -NGF modifiziert werden. NGF als auch pro-NGF sind biologisch aktiv und unterscheiden sich in ihrer Rezeptoraffinität (Schor, 2005).

Im Immunsystem reguliert NGF über die Bindung an seine Rezeptoren eine Vielzahl von Prozessen mit pro- als auch antiinflammatorischem Effekt. So führt NGF in vitro beispielsweise zu einer Überexpression proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor(TNF)- α oder IL-6 und begünstigt die Differenzierung von B-Zellen zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen (reviewed in Minnone et al., 2017).

NGF bindet an zwei Typen von Rezeptoren, die Tropomyosin-Rezeptor-Kinase A (TrkA) und den p75 Neurotrophin-Rezeptor (p75^{NTR}) (siehe Kapitel 1.2.2 und 1.2.3).

1.2.2 Tropomyosin-Rezeptor-Kinase A

Der TrkA-Rezeptor bildet mit den Rezeptoren TrkB und TrkC die Familie der Tropomyosin-Rezeptor-Kinasen. Diese weisen alle eine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität auf, binden Neurotrophine jedoch mit unterschiedlicher Spezifität. So bindet NGF an TrkA, BDNF und NT-4/5 an TrkB und NT-3 an TrkC, wobei NT-3 mit geringer Affinität auch an TrkA und TrkB binden kann (Freund-Michel und Frossard, 2008). Pro-NGF scheint nicht an TrkA zu binden und zu keiner Aktivierung des TrkA-Rezeptors zu führen (Schor, 2005). Der TrkA-Rezeptor ist ein 140 kDa Glykoprotein mit einer einzigen

Transmembrandomäne. Intrazellulär weist TrkA eine Tyrosinkinase-Aktivität auf und extrazellulär 5 verschiedene Domänen (D1-D5), wobei D5 eine Immunglobulin-ähnliche Domäne ist und für die Bindung von NGF verantwortlich ist (Abb. 1) (Freund-Michel und Frossard, 2008).

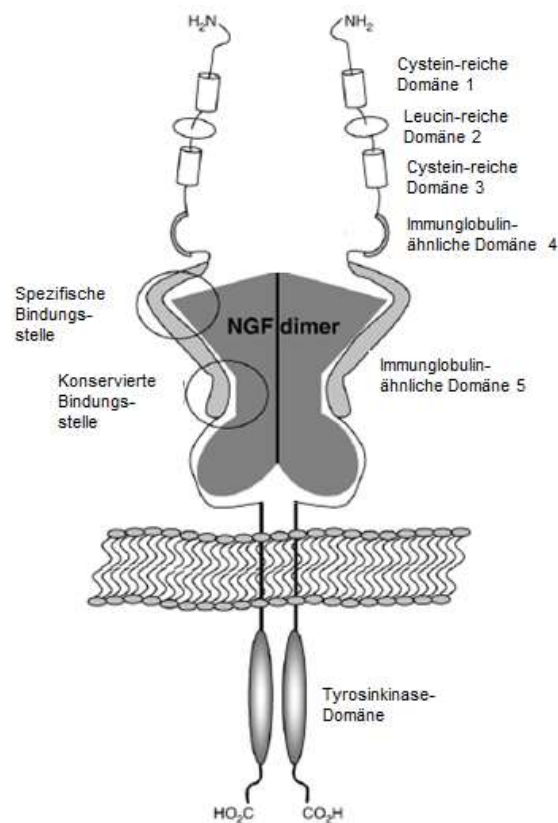


Abb. 1: Die Struktur des TrkA-Rezeptors. Extrazellulär besteht TrkA aus 5 verschiedenen Domänen (D1-D5). D5 ist für die Bindung von NGF verantwortlich und enthält eine spezifische Bindungsstelle für die N-terminale Sequenz von NGF und eine konservierte Bindungsstelle (bei allen Neurotrophin-Trk-Bindungen vorhanden) für den zentralen Teil von NGF. TrkA weist eine einzige Transmembrandomäne auf, gefolgt von einer intrazellulär gelegenen Tyrosinkinase-Domäne (angelehnt an Freund-Michel und Frossard, 2008).

NGF bindet mit hoher Affinität an TrkA. Die Bindung von NGF an den TrkA-Rezeptor führt zur Dimerisierung des Rezeptors und einer Aktivierung der intrazellulär gelegenen Tyrosinkinase-Domänen durch Autophosphorylierung. In der Folge können über verschiedene Enzyme und Signalmoleküle vermittelt Signalkaskaden ausgelöst werden, dazu gehören die Signalkaskaden über PLC(PhospholipaseC)- γ , PI3K

(Phosphatidylinositol-3-Kinase)/Akt-Kinase und Ras/ERK (extrazellulär Signal-regulierte Kinasen), welche die Transkription beeinflussen (Freund-Michel und Frossard, 2008).

1.2.3 p75 Neurotrophin-Rezeptor

Der p75^{NTR}-Rezeptor gehört zur Familie der Todesrezeptoren und kann alle Neurotrophine und pro-Neurotrophine binden. Der p75^{NTR}-Rezeptor ist ein 75 kDa Glykoprotein, das extrazellulär aus 4 Cystein-reichen Domänen besteht, welche Neurotrophin-Anteile binden können. P75^{NTR} trägt eine einzige Transmembrandomäne und intrazellulär eine Todesdomäne, über die eine apoptotisch wirkende Signalkaskade ausgelöst werden kann (Abb. 2) (Freund-Michel und Frossard, 2008).

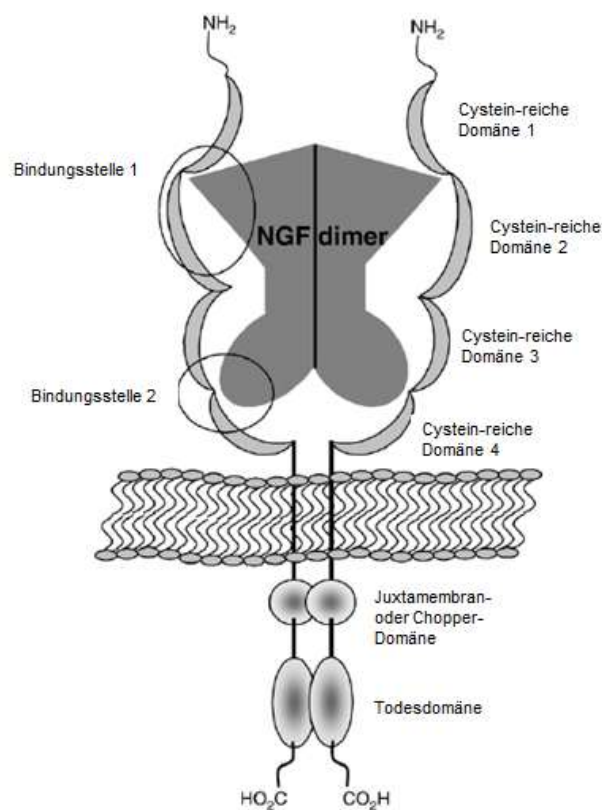


Abb. 2: Die Struktur des p75^{NTR}-Rezeptors. Extrazellulär besteht p75^{NTR} aus 4 Cystein-reichen Domänen, welche für die Bindung der Neurotrophine verantwortlich sind. Es gibt zwei spezifische Bindungsstellen für NGF (Bindungsstelle 1 und 2). P75^{NTR} weist eine einzige Transmembrandomäne auf, gefolgt von den intrazellulär gelegenen Domänen Juxtamembran- oder Chopper-Domäne und Todesdomäne (angelehnt an Freund-Michel und Frossard, 2008).

Die Bindung von Neurotrophinen an den p75^{NTR}-Rezeptor führt zur Dimerisierung des Rezeptors und der Aktivierung verschiedener Signalkaskaden in der Zelle. So kann über eine Aktivierung von JNK (c-Jun N-terminalen Kinasen) Apoptose ausgelöst werden oder im Gegensatz dazu eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB zum Überleben der Zelle beitragen. Darüber hinaus ist p75^{NTR} als Corezeptor in der Lage auch eine Vielzahl anderer Zellfunktionen zu beeinflussen (Freund-Michel und Frossard, 2008).

NGF bindet mit niedriger Affinität an p75^{NTR}. p75^{NTR} wird als Corezeptor für TrkA angesehen, denn durch die Interaktion mit TrkA erhöht sich die Affinität des TrkA-Rezeptors für NGF. Hier werden verschiedene Mechanismen diskutiert, wie die Bildung eines p75^{NTR}-TrkA-Heterodimers mit Konformationsänderung des TrkA-Rezeptors hin zu einer höher affinen Konformation und die Beeinflussung intrazellulär ausgelöster Signalkaskaden (Freund-Michel und Frossard, 2008, Toni et al., 2014).

1.3 Neurogene Entzündung

Degenerative und entzündliche rheumatische Erkrankungen sind durch lokale und/oder systemische entzündliche Aktivität charakterisiert. Es wird auch eine Beteiligung des Nervensystems beobachtet. Beispielhaft seien chronische Schmerzzustände bei rheumatoider Arthritis und das Köbner-Phänomen bei Psoriasis-Arthritis genannt. Dabei beschreibt das oberflächliche Köbner-Phänomen ein Auftreten von Psoriasis-Entzündungsherden an zuvor gesunden Hautstellen nach mechanischer, thermischer oder chemischer Reizung und das tiefe Köbner-Phänomen ein Auftreten einer Arthritis beispielsweise nach Stoßverletzungen (Tiwari und Brent 2020). Die Modulierung entzündlicher Vorgänge durch das Nervensystem wird als neurogene Entzündung bezeichnet. Es wird vermutet, dass eine neurogen bedingte Entzündung bei der Entstehung und/oder Aufrechterhaltung rheumatischer Erkrankungen eine bedeutende Rolle spielt (Seidel et al., 2013).

Dabei gilt NGF als zentraler Vermittler neurogener Entzündung. Bei einigen rheumatischen Erkrankungen finden sich am Ort der Entzündung erhöhte NGF-Konzentrationen, wie beispielweise in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis oder Osteoarthritis (Seidel et al., 2010). NGF kann auf zwei Arten

immunmodulatorisch wirken, und zwar direkt über die beiden Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} auf Immunzellen und indirekt über die Regulation neuronaler Innervation und Aktivität im Gewebe. Dabei stimuliert NGF in peripheren Nervenendigungen die Freisetzung proinflammatorischer Neuropeptide wie Substanz P (SP) oder Calcitonin gene-related peptide (CGRP) (Inaishi et al., 1992). Diese Neuropeptide können wiederum Immunzellen aktivieren und eine Entzündungsreaktion mit typischen Entzündungszeichen wie Rötung und Ödembildung auslösen (Hafstrom et al., 1989). Gleichzeitig vermitteln die genannten Neuropeptide eine periphere und zentrale Hyperalgesie. Umgekehrt wird die Freisetzung von NGF aus verschiedenen Zelltypen wie Neuronen, Epithelzellen, Muskelzellen oder Immunzellen in entzündlichem oder geschädigtem Gewebe durch Entzündungsmediatoren getriggert (Abb. 3) (Minnone et al., 2017).

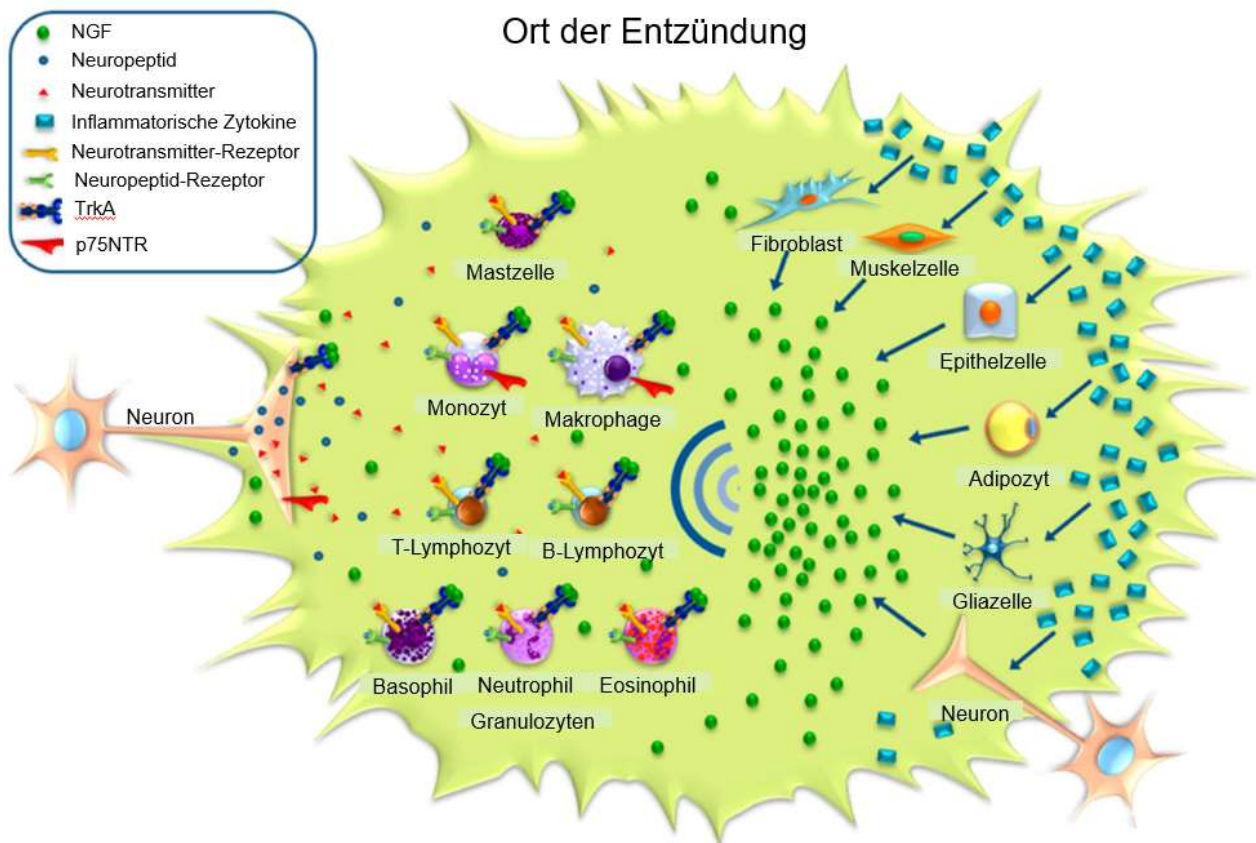


Abb. 3: Neurogene Entzündung und direkte und indirekte immunmodulatorische Effekte von NGF als zentraler Vermittler neurogener Entzündung (modifiziert nach Minnone et al., 2017).

1.4 Zelloberflächenmarker für Leukozytensubpopulationen

Leukozyten tragen bestimmte phänotypische Oberflächenmoleküle, sogenannte Cluster of Differentiation (CD). Bei den CD-Molekülen handelt es sich zumeist um membrangebundene Glykoproteine, die teilweise zellspezifisch und abhängig von Funktion und Entwicklungs- und Differenzierungszustand einer Zelle exprimiert werden. Diese erlaubt eine Einteilung der Zellen anhand der Expression der CD-Marker in verschiedene Subpopulationen. Ein Nachweis der CD-Marker ist durch monoklonale Antikörper möglich. Im Folgenden wird auf die in dieser Arbeit mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbten CD-Marker eingegangen, und zwar CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD45, CD56 und CD66b.

CD3 bildet zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) den CD3-TCR-Komplex. CD3 wird auf T-Lymphozyten exprimiert und ist für die Aktivierung der T-Lymphozyten nach Antigenbindung an den TCR verantwortlich (Cruse und Lewis, 2009).

CD4 dient bei der durchflusszytometrischen Analyse als Marker für T-Helferzellen. CD4 ist Corezeptor für den TCR zur Erkennung und Bindung von an Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex, MHC)-II gebundenen Antigenen auf antigenpräsentierenden Zellen (Cruse und Lewis, 2009).

CD8 findet sich auf der Zelloberfläche von zytotoxischen T-Zellen. CD8 ist Corezeptor für den TCR zur Erkennung und Bindung von an MHC-I gebundenen Antigenen auf antigenpräsentierenden Zellen (Cruse und Lewis, 2009).

CD11b und CD11c werden vor allem auf Monozyten, Makrophagen und DCs exprimiert (Schittenhelm et al., 2017). CD11c ist ein häufig verwendeter Marker für mDCs (Ziegler-Heitbrock et al., 2010, Schittenhelm et al., 2017).

CD11-Rezeptoren gehören zur β_2 -Integrin-Familie, bestehend aus zwei Polypeptidketten mit einer gemeinsamen β_2 -Kette CD18 und einer α -Kette, in der sich die β_2 -Integrin-Rezeptoren voneinander unterscheiden. Die α_M -Kette von CD11b bildet zusammen mit der β_2 -Kette CD18 den heterodimeren Komplementrezeptor 3 (CD11b/CD18). CD11c besteht aus α_X - und β_2 -Kette und bildet den heterodimeren Komplementrezeptor 4 (CD11c/CD18). β_2 -Integrine vermitteln als Zelladhäsionsmoleküle wichtige Mechanismen im Immunsystem und können dabei pro- als auch antiinflammatorische Aktivität

aufweisen. Neben vielen anderen Liganden binden CD11b und CD11c das Komplementspaltprodukt iC3b und vermitteln dadurch die Phagozytose opsonierter Partikel, wie beispielweise apoptotischer Zellen (Schittenhelm et al., 2017).

CD14 findet sich vor allem auf Monozyten, wird aber auch von Makrophagen und Granulozyten exprimiert. CD14 ist Rezeptor für den Komplex aus Lipopolysaccharid (LPS) und lipopolysaccharidbindendem Protein (LBP), dessen Bindung unter anderem zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und antimikrobiellen Produkten führt (Cruse und Lewis, 2009).

CD16 ist Bestandteil des Fc-Rezeptors FcγRIII, ein Rezeptor für IgG. CD16 wird auf Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen und Granulozyten exprimiert. Dabei unterscheiden sich Struktur und Funktion des CD16-Rezeptors auf den genannten Zellen. Bei NK-Zellen weist CD16 eine Transmembranform, wohingegen CD16 bei Granulozyten durch einen Phosphatidylinositol-Anker in der Zellmembran verankert ist. Bei NK-Zellen löst CD16 eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität aus und unterstützt bei Monozyten, Makrophagen und Granulozyten insbesondere die Phagozytose von antikörpergebundenen Immunkomplexen und anderen Partikeln (Cruse und Lewis, 2009).

CD19 dient in der Durchflusszytometrie als Marker für B-Lymphozyten. CD19, CD21 und CD81 bilden den B-Zell-Corezeptor-Komplex. Erkennt der B-Zell-Rezeptor (BCR) ein mit dem Komplementfaktor C3d beladenes Antigen, bindet das Antigen an den BCR und C3d an CD21 des B-Zell-Corezeptor-Komplexes, was wiederum zu einer Aktivierung von CD19 führt. Letztendlich kann das antigenabhängige Signal des BCR verstärkt, aber auch anderweitig moduliert werden. Die Funktion von CD81 innerhalb des Corezeptor-Komplexes ist noch unbekannt (Kruse, 2015).

CD45, das humane Leukozyten-Antigen, wird auf allen Leukozyten exprimiert. CD45 reguliert verschiedene zelluläre Prozesse, wie Zellwachstum und Zelldifferenzierung und spielt bei T- und B-Lymphozyten eine bedeutende Rolle bei deren antigenvermittelten Aktivierung (Cruse und Lewis, 2009).

CD56 ist eine Isoform des neuralen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) und ein durchflusszytometrisch genutzter Marker für NK-Zellen (Cruse und Lewis, 2009). NK-Zellen sind CD3-negative Lymphozyten. Als Bestandteil des angeborenen Immunsystems

vermitteln sie zellvermittelte Zytotoxizität virusinfizierter Zellen in den frühen Phasen einer Infektion. Sie sind jedoch auch in der Lage bei mit Antikörpern bedeckten Zellen eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität auszulösen. NK-Zellen sezernieren außerdem Zytokine, insbesondere INF- γ (Schepis et al., 2009).

CD66b wird auf allen Granulozyten exprimiert (Cruse und Lewis, 2009). Die Funktion von CD66b ist weitgehend unbekannt. Bei eosinophilen Granulozyten reguliert CD66b Zelladhäsion und -aktivierung (Murphy und Weaver, 2017).

1.5 Ziel der Arbeit

Rheumatische Erkrankungen sind durch lokale und/oder systemische entzündliche Aktivität charakterisiert, häufig einhergehend mit Endorganschäden und Schmerzen. Die Aktivierung des Nervensystems mit konsekutiver Schmerzsymptomatik lässt vermuten, dass eine neurogene Entzündung ursächlich beteiligt ist. NGF gilt hierfür als zentraler Vermittler.

Die bedeutende Beteiligung von NGF bei chronischen Schmerzen führte in den letzten Jahren zu medikamentösen Therapiestrategien mit monoklonalen Antikörpern gegen NGF (NGFi). Diese zeigten in klinischen Studien bei verschiedenen Schmerzsyndromen wie Arthrose und chronischem Rückenschmerz eine deutliche analgetische Wirkung (Dimitroulas et al., 2017, Wise et al., 2021). Bisherige Daten geben keinen Hinweis, dass eine Behandlung mit NGFi zu einer systemischen Immunsuppression mit erhöhtem Infektionsrisiko führt, obgleich NGF eine Vielzahl proinflammatorischer Mechanismen steuert (Chang et al., 2016). Daher könnte der Einsatz von NGFi ein möglicher Therapieansatz zur Behandlung nicht nur degenerativer Schmerzsyndrome, sondern auch entzündlicher rheumatischer Erkrankungen mit vermuteter neurogener Beteiligung sein.

Bekanntermassen induziert UV-Licht häufig die Exazerbation einer Dermatose beim SLE, was als neurogener Stimulus bewertet werden kann. Im peripheren Blut von SLE-Patienten konnte sowohl eine Erhöhung der NGF-Konzentration als auch eine Korrelation zwischen NGF-Konzentration und der durch den SLEDAI bestimmten Krankheitsaktivität

nachgewiesen werden (Aalto et al., 2002, Bracci-Laudiero et al., 1993, Fauchais et al., 2013, Xu und Chen, 2005).

Ziel dieser Arbeit war die systematische Untersuchung der Expression der NGF-Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} auf Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten im Blut von SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen und in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität. Bisher liegt keine Studie zur Expression der beiden NGF-Rezeptoren auf Immunzellen im Blut bei SLE vor. Mit den Ergebnissen sollten weitere Hinweise auf eine NGF-vermittelte neurogen-entzündliche Aktivität im peripheren Blut von SLE-Patienten gewonnen werden und eventuell eine Rationale für eine Behandlung mit NGFi geschaffen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten- und Kontrollgruppe

Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Bonn genehmigt (158/11) und auf der Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes von 1983 und entsprechend der gesetzlichen Grundlagen durchgeführt. 13 Patienten mit systemischem Lupus erythematoses wurden aus dem ambulanten Routinebetrieb des Fachbereichs Internistische Rheumatologie des Universitätsklinikums Bonn rekrutiert und nach erfolgter Aufklärung und schriftlicher Einwilligung in die Studie aufgenommen. Bei allen Patienten wurde die Diagnose nach den 1997 revidierten Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) für systemischen Lupus erythematoses von den Ärzten der Internistischen Rheumatologie des Universitätsklinikums Bonn gestellt oder überprüft. Die 13 gesunden Kontrollpersonen ohne rheumatische Grunderkrankung wurden entsprechend Geschlecht und Alter der Patienten aus dem Bekannten- und Freundeskreis ausgewählt und nach schriftlicher Einwilligung in die Studie eingeschlossen. Ausschlusskriterien für beide Gruppen waren ein Alter unter 18 Jahre, ein akuter Infekt, eine Tumorerkrankung, fehlende Zustimmung oder eine bestehende Schwangerschaft.

Nach Einschluss in die Studie wurde den Patienten und Kontrollpersonen in der rheumatologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Bonn Blut entnommen. Beiden Gruppen wurden je 7,5 mL Lithium-Heparin-Blut für die Zelloberflächenfärbung mit anschließender durchflusszytometrischer Untersuchung, sowie 2,7 mL EDTA-Blut für die Bestimmung des großen Blutbildes und den Patienten 7,5 mL Serum für die Bestimmung von Anti-dsDNA-Ak, ANA-Titer, CRP, Komplementfaktoren C3/C4 und Rheumafaktoren entnommen. Außerdem wurde die Blutsenkungsgeschwindigkeit bestimmt. Die klinische Krankheitsaktivität wurde mit Hilfe der Fragebögen SLEDAI und HAQ erfasst. Außerdem schätzten Patient (Patient global assessment) und behandelnder Arzt (Physician global assessment) die Krankheitsaktivität auf einer Skala von 0 (keine Krankheitsaktivität) bis 10 (höchstmögliche Krankheitsaktivität) ein. Alle Patienten beurteilten zudem ihre Schmerzen auf der Visuellen Analog-Skala von 0 (keine Schmerzen) bis 10 (größtmögliche Schmerzen). Bei allen Patienten wurde eine Ganzkörperuntersuchung

durchgeführt. Die Patienten erhielten typische SLE-Medikation wie Prednison, Methotrexat, Mycophenolat-Mofetil, Azathioprin, Antimalariamittel, Belimumab oder keine Medikation.

Die Auswertung der Daten wurde im Hinblick auf Unterschiede zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe durchgeführt. Zudem erfolgte innerhalb der Patientengruppe eine Subgruppenanalyse mit Einteilung der Patienten je nach Krankheitsaktivität in Leicht- und Schwererkrankte, entsprechend der folgenden Kriterien: SLEDAI, Anti-dsDNA-Ak, ANA-Titer, BSG, CRP und Komplement C3/C4 (Tab. 3). Aufgrund der geringen Patientenanzahl wurden nicht mehr als zwei Subgruppen gebildet. Bei der Subgruppenanalyse wurden zwischen leicht- und schwererkrankten Patienten innerhalb der Patientengruppe und zwischen schwer- bzw. leichterkrankten Patienten und ihren geschlechts- und altersadaptierten Kontrollpersonen verglichen.

Tab. 3: Einteilung der Patientengruppe nach SLEDAI und laborchemischen Parametern in schwer- und leichterkrankte Patienten.

	SLEDAI-Score	Anti-dsDNA-Ak	ANA-Titer	CRP	BSG	Komplement-faktoren C3/C4
Schwererkrankt	≥8	≥100 IU/mL	>1:320	≥3 mg/L	≥10 mm/h	C3 >1,8 g/L und/oder C4 >0,4 g/L
Leichterkrankt	<8	<100 IU/mL	≤1:320	<3 mg/L	<10 mm/h	C3 ≤1,8 g/L und C4 ≤0,4 g/L

2.2 Durchflusszytometrie

2.2.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting, FACS) ermöglicht sowohl die qualitative Differenzierung von Blutzellpopulationen als auch die quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen auf einzelnen Blutzellen durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper. Dabei durchfließen die Zellen aus den Probenröhrchen eine dünne Messkapillare und passieren einen Laserstrahl. Die Zellen streuen einen Teil des Laserstrahllichts, das durch Detektoren in bestimmten Kanälen nachgewiesen werden kann. Dabei ist das Vorwärtsstreulicht (forward scatter) ein Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (sideward scatter) ein Maß für die Granularität einer Zelle. Dies erlaubt eine Differenzierung zwischen Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Zelltrümmern. Durch die Vorbereitung der Proben mit Lyse-Puffer ist eine Trennung von Erythrozyten und Leukozyten möglich, da sich die lysierten Erythrozyten als Zelltrümmer mit geringer Größe und geringer Granularität zeigen. Die Darstellung der gemessenen Daten erfolgt in unserer Arbeit als Dotplot. Bei einem Dotplot werden zwei Parameter gleichzeitig auf einem zweidimensionalen Streudiagramm nach ihrer Signalintensität dargestellt, wobei jeder Punkt einer Zelle und Punktwolken Populationen entsprechen (Abb. 4).

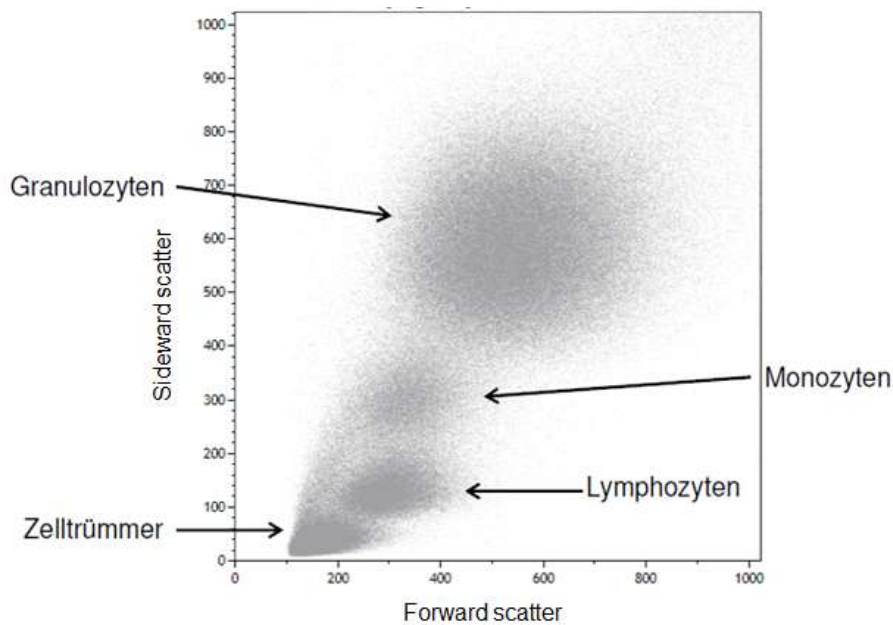


Abb. 4: Repräsentative Dotplot-Darstellung der FACS-Daten. Durchflusszytometrische Auftrennung von Vollblut (nach erfolgter Erythrozyten-Lyse) im forward scatter/sideward scatter in Populationen von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten und Zelltrümmer.

Die weitere Differenzierung einzelner Subpopulationen von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten wird durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper erreicht. Fluorochrome sind Fluoreszenzfarbstoffe, die nach Anregung durch das Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge Licht einer charakteristischen höheren Wellenlänge emittieren, das von den Detektoren erfasst wird. Dafür wurden bei der Probenvorbereitung mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper verwendet, die an bestimmte Oberflächenantigene der Zellen binden und somit in der Durchflusszytometrie erfasst werden können. In unserer Arbeit wurden die Fluorochrome FITC (Fluoresceinisothiocyanat), PE (Phycoerythrin), PE-Cy7 (Kombination aus PE und einem Cyaninfarbstoff Cy7), APC (Allophycocyanin) und PerCP/Cy5.5 (Kombination aus PerCP und dem Cyaninfarbstoff Cy5.5) verwendet. Die Anzahl der im Durchflusszytometer detektierten Fluoreszenzsignale ist proportional zur Anzahl der Fluorochrommoleküle, die durch Antikörper auf der Zelle gebunden sind. Durch den Einsatz von fünf verschiedenen Fluorochromen in einem Probenröhrchen und fünf Detektoren für die von den Fluorochromen emittierten Wellenlängen ist eine detaillierte Charakterisierung von Subpopulationen mit einer einzigen durchflusszytometrischen Messung möglich. Zudem

kommen bei der Durchflusszytometrie Isotypkontrollen zum Einsatz, welche als Negativkontrollen dienen. Sie zeigen das Ausmaß unspezifischer Bindung der Antikörper an die untersuchten Zellen. Dabei werden Isotyp-Antikörper gewählt, die dem Ig-Isotyp des Testantikörpers entsprechen und mit dem gleichen Fluorochrom wie der Testantikörper gekoppelt sind.

In Tab. 4 sind alle verwendeten Antikörper mit Antigen-spezifität, gekoppeltem Fluorochrom, Klon, Isotypkontrolle und Hersteller aufgeführt.

Tab. 4: Verwendete Antikörper zur Oberflächenfärbung, sortiert nach Fluorochrom.

Fluorochrom	Antigen-spezifität	Klon	Isotypkontrolle	Hersteller
APC	CD3	HIT3a	Mouse IgG2a, κ	BioLegend®
APC	CD11c	3.9	Mouse IgG1, κ	BioLegend®
APC	CD56	MEM-188	Mouse IgG2a, κ	BioLegend®
FITC	CD8	RPA-T8	Mouse IgG1, κ	BD Pharmingen™
FITC	CD14	M5E2	Mouse IgG2a, κ	BD Pharmingen™
FITC	CD45	HI30	Mouse IgG1, κ	BD Pharmingen™
FITC	CD66b	G10F5	Mouse IgGM, κ	BD Pharmingen™
PE	p75 ^{NTR} (CD271)	C40-1457	Mouse IgG1, κ	BD Pharmingen™
PE	TrkA	165131	Mouse IgG1, κ	R&D Systems®
PE-Cy 7	CD4	SK3	Mouse IgG1, κ	BD Pharmingen™
PE-Cy 7	CD19	H1B19	Mouse IgG1, κ	BioLegend®
PerCP/Cy5.5	CD11b	ICRF44	Mouse IgG1, κ	BioLegend®
PerCP/Cy5.5	CD16	3G8	Mouse IgG1, κ	BioLegend®

2.2.2 Probenvorbereitung für die Durchflusszytometrie

Die von Patienten und Kontrollpersonen gewonnenen Blutproben wurden jeweils am selben Tag im Labor für die Messung am Durchflusszytometer vorbereitet. Dabei wurden die gewünschten Zelloberflächenantigene der Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten und die Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} durch fluoreszenzmarkierte Antikörper gefärbt. In jedem Probenröhrchen wurden 100 µL Lithium-Heparin-Vollblut mit jeweils 5 µL mehrerer fluoreszenzmarkierter Antikörper nach einem bestimmten Färbeschema (siehe Kapitel 2.2.3) bei 4 °C auf Eis gemischt. Nach 15 Minuten Inkubation bei

Raumtemperatur im Dunkeln wurden alle Proben mit 1:10 verdünntem BD Lyse-Puffer (BD Pharm Lyse™ Lysing Buffer von BD Biosciences, #555899) versetzt und direkt nach Zugabe des Puffers jedes Probenröhrchen für 10 Sekunden gevortext. Der Lyse-Puffer dient der Lyse der Erythrozyten. Für ein optimales Ergebnis wurde darauf geachtet, dass der Lyse-Puffer Raumtemperatur hat. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden alle Probenröhrchen mit 2 mL IsoFlow (IsoFlow™ Sheath Fluid von Beckman Coulter, #8546859) aufgefüllt, um die Lyse zu stoppen. Bei längerer Einwirkzeit des Lyse-Puffers würden neben den Erythrozyten auch Leukozyten lysiert. Alle Proben wurden bei 2000 Umdrehungen pro Minute 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift. Dazu wurden die Probenröhrchen erneut mit 2 mL IsoFlow versetzt, bei 2000 Umdrehungen pro Minute 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das aus den Blutzellen bestehende Sediment wurde in 250 µL Fixations-Lösung (BD Cytifix™ Fixation Buffer von BD Biosciences, #554655) resuspendiert. Die Fixations-Lösung soll die Lichtstreuungseigenschaften und Fluoreszenzintensitäten nach erfolgter fluoreszenzmarkierter Oberflächenfärbung der Blutzellen für durchflusszytometrische Messungen bewahren. Um eine Zellaggregation zu verhindern, wurde das Sediment vor Zugabe des Fixations-Puffers gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 25 Minuten bei 4 °C erfolgte ein weiterer Waschschrift mit IsoFlow wie oben beschrieben. Das Sediment wurde mit 500 µL einer Lösung aus 50 mL IsoFlow, 0,1 % NaN₃ und 1 % hitze-inaktiviertem fetalem Kälberserum resuspendiert und bis zur Messung am Durchflusszytometer bei 4 °C dunkel aufbewahrt. IsoFlow dient als Trägermaterial für die folgende durchflusszytometrische Messung.

Die FACS-Messungen wurden innerhalb einer Woche nach der Oberflächenfärbung und Fixierung der Proben durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit dem Durchflusszytometer Navios™ von Beckman Coulter. Die gemessenen Daten wurden mit der Software Kaluza® Version 1.2 von Beckman Coulter ausgewertet.

2.2.3 Färbeschemata

Zur Färbung von verschiedenen Leukozytensubpopulationen und der Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} wurde zunächst das Basis-Schema verwendet (Tab. 5). Die Zusammenstellung der Oberflächenmarker in den Probenröhrchen wurde entsprechend der Fragestellung und der im Labor vorhandenen Antikörper-Fluorochrom-Kombinationen gewählt. Alle Färbungen wurden jeweils als Doppelfärbungen mit TrkA oder p75^{NTR} und entsprechender Isotypkontrolle durchgeführt.

Tab. 5: Oberflächenfärbung - Basis-Schema

Isotyp-Färbungen			TrkA-Färbungen			p75NTR -Färbungen		
Probenröhrchen	Antigen-spezifität	Fluorochrom	Probenröhrchen	Antigen-spezifität	Fluorochrom	Probenröhrchen	Antigen-spezifität	Fluorochrom
1	IgG1, κ	FITC	2	CD8	FITC	3	CD8	FITC
	IgG1, κ	PE-Cy7		CD4	PE-Cy7		CD4	PE-Cy7
	IgG1, κ	PE		TrkA	PE		p75NTR	PE
4	IgM, κ	FITC	5	CD66b	FITC	6	CD66b	FITC
	IgG1, κ	PE-Cy7		CD19	PE-Cy7		CD19	PE-Cy7
	IgG1, κ	PE		TrkA	PE		p75NTR	PE
7	IgG2, κ	FITC	8	CD14	FITC	9	CD14	FITC
	IgG2a, κ	APC		CD56	APC		CD56	APC
	IgG1, κ	PerCP/Cy5.5		CD16	PerCP/Cy5.5		CD16	PerCP/Cy5.5
	IgG1, κ	PE		TrkA	PE		p75NTR	PE

Das Blut von vier Patienten und drei Kontrollen wurde nach dem Basis-Schema gefärbt und anschließend mittels Durchflusszytometrie ausgewertet. Nach einer Zwischenauswertung wurde das Färbeschema bei weiteren neun Patienten und zehn Kontrollpersonen um die Antikörper gegen CD11b und CD11c erweitert. Die Veränderungen des erweiterten Färbeschemas im Vergleich zum Basis-Färbeschema sind grau hinterlegt (Tab. 6).

Tab. 6: Oberflächenfärbung - Erweitertes Schema

Isotyp-Färbungen			TrkA-Färbungen			p75NTR-Färbungen		
Probenröhrchen	Antigen-spezifität	Fluorochrom	Probenröhrchen	Antigen-spezifität	Fluorochrom	Probenröhrchen	Antigen-spezifität	Fluorochrom
1	IgG1, κ	FITC	2	CD8	FITC	3	CD8	FITC
	IgG1, κ	PE-Cy7		CD4	PE-Cy7		CD4	PE-Cy7
	IgG1, κ	APC		CD11c	APC		CD11c	APC
	IgG1, κ	PerCP/Cy5.5		CD11b	PerCP/Cy5.5		CD11b	PerCP/Cy5.5
	IgG1, κ	PE		TrkA	PE		p75NTR	PE
4	IgM, κ	FITC	5	CD66b	FITC	6	CD66b	FITC
	IgG1, κ	PE-Cy7		CD19	PE-Cy7		CD19	PE-Cy7
	IgG1, κ	APC		CD11c	APC		CD11c	APC
	IgG1, κ	PerCP/Cy5.5		CD11b	PerCP/Cy5.5		CD11b	PerCP/Cy5.5
	IgG1, κ	PE		TrkA	PE		p75NTR	PE
7	IgG2, κ	FITC	8	CD14	FITC	9	CD14	FITC
	IgG2a, κ	APC		CD56	APC		CD56	APC
	IgG1, κ	PerCP/Cy5.5		CD16	PerCP/Cy5.5		CD16	PerCP/Cy5.5
	IgG1, κ	PE		TrkA	PE		p75NTR	PE

2.2.4 Vorgehensweise bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Kompensation

Bei der Kombination mehrerer fluoreszenzmarkierter Antikörper in einem Proberöhrchen kann es zu einer spektralen Überlappung der Fluoreszenzspektren der einzelnen Fluorochrome kommen. So strahlen zum Beispiel FITC-gefärbte Zellen in den PE-Kanal und erscheinen dort als falsch positive Zellen. Durch Kompensation kann diese spektrale Überlappung der beiden Fluorochrome korrigiert werden. Für jedes verwendete Fluorochrom wurde eine Einzelfärbung zur Kompensation vor jeder Messung durchgeführt. In Abb. 5 sind FITC- und PE-gefärbte Zellen im Dotplot vor und nach Kompensation dargestellt.

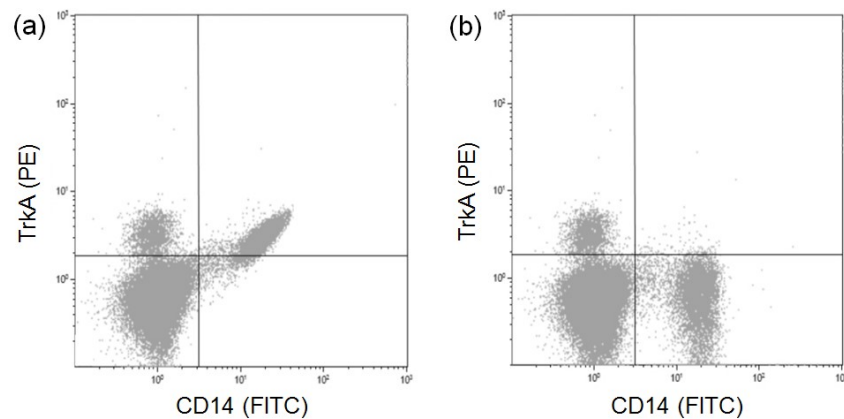


Abb. 5: Repräsentative Dotplot-Darstellung von FITC- und PE-gefärbten Zellen (a) vor Kompensation mit falsch doppeltpositiver Population und (b) nach Kompensation.

Gating

Zunächst wurden im forward scatter/sideward scatter-Dotplot ein Gate für Granulozyten und ein gemeinsames Gate für Monozyten und Lymphozyten gesetzt. Ein gemeinsames Monozyten-Lymphozytengate wurde gewählt, da aufgrund einer nicht ausreichenden Auftrennung nicht bei allen Färbungen eine Abgrenzung der Populationen möglich war und zudem in einem alleinigen Lymphozytengate aktivierte, vergrößerte Lymphozyten nicht erfasst worden wären. Anschließend erfolgte eine Betrachtung der Zellen im Granulozytengate oder im Monozyten-Lymphozytengate. Dabei wurden Zellen mit dem Oberflächenmarker CD66b im Granulozytengate und CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD45 und CD56 exprimierende Zellen im Monozyten-Lymphozytengate betrachtet.

In Abb. 6 wird beispielhaft das Vorgehen beim Gating von TrkA positiven CD66b-Zellen im Granulozytengate und TrkA positiven CD14-Zellen im Monozyten-Lymphozytengate dargestellt.

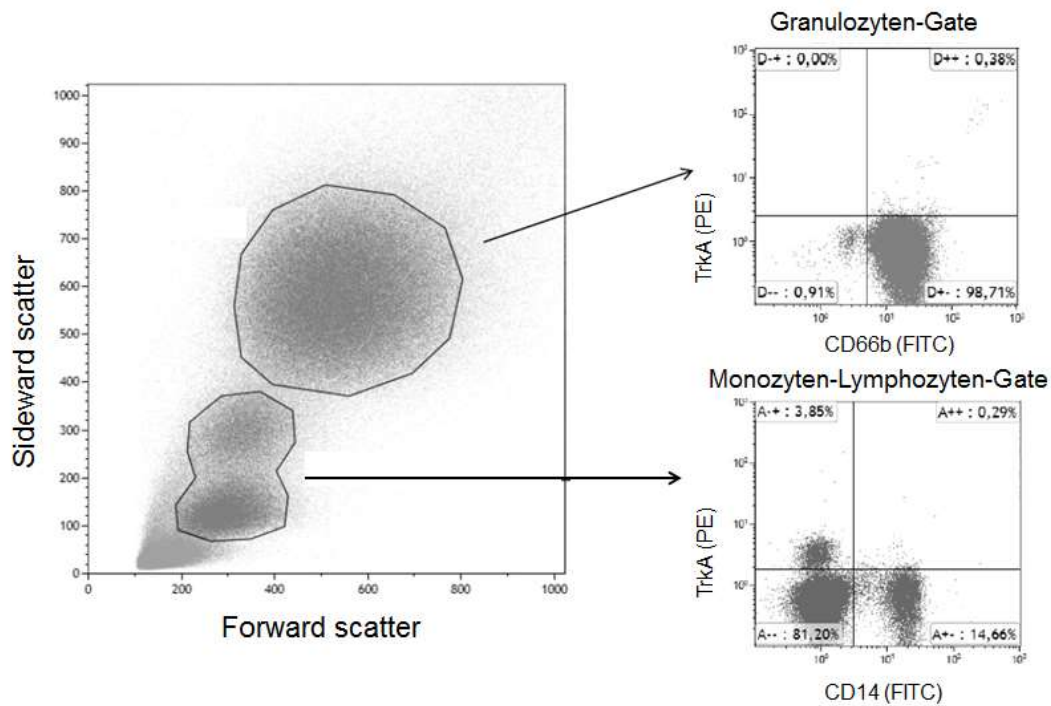


Abb. 6: Repräsentative Definition eines Granulozyten- und eines Monozyten-Lymphozytengates im forward scatter/sideward scatter mit anschließender Betrachtung der CD66b-Zellen im Granulozytengate und CD14-Zellen im Monozyten-Lymphozytengate, jeweils gegen TrkA, nach erfolgter durchflusszytometrischer Analyse.

Es ist anzumerken, dass CD16 positive Zellen in unserer Arbeit den Monozyten zuzuordnen sind. Dies liegt daran, dass zunächst Granulozyten durch Betrachtung der CD16 positiven Zellen im Monozyten-Lymphozytengate und anschließend auch CD56 positive, den NK-Zellen zuzuordnende Zellen durch entsprechendes Gating „rausgated“ wurden.

Auswertung der durchflusszytometrischen Daten bezogen auf das Blutbild

Die in der Durchflusszytometrie gewonnenen und in Dotplots dargestellten Daten wurden zusammen mit Werten aus dem großen Blutbild in eine Tabelle eingetragen und miteinander verrechnet.

Aus dem großen Blutbild wurden die folgenden Werte entnommen: Absolute Anzahl an Leukozyten, Lymphozyten und Monozyten und der prozentuale Anteil an Lymphozyten, Monozyten und neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten. Daraus wurden

die Anzahl und der prozentuale Anteil an Gesamt-Granulozyten errechnet. Alle prozentualen Werte an Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten beziehen sich auf die Gesamtleukozytenzahl im Blut.

Das weitere Vorgehen wird hier beispielhaft mit dem Oberflächenmarker CD14 für Monozyten und der Doppelfärbung von CD14 mit TrkA erläutert. Zur Berechnung der Anzahl an CD14-Zellen im Blut wurde der Prozentsatz der CD14 positiven Zellen im Monozyten-Lymphozytengate multipliziert mit der summierten absoluten Anzahl an Monozyten und Lymphozyten aus dem Blutbild. Dabei entspricht der Prozentsatz der CD14 positiven Zellen an allen Monozyten und Lymphozyten im Blutbild dem Prozentsatz der CD14 positiven Zellen im Monozyten-Lymphozytengate. Die Berechnung der Anzahl doppelpositiver TrkA-CD14-Zellen im Blut erfolgte im Prinzip wie für CD14-Zellen beschrieben über den Prozentsatz der TrkA-CD14-Zellen im Monozyten-Lymphozytengate multipliziert mit der summierten Anzahl an Monozyten und Lymphozyten aus dem Blutbild. Dabei wurde dann die Anzahl der doppelpositiven TrkA-CD14-Zellen im Blut auf die Anzahl der CD14 positiven Zellen im Blut bezogen, um den Prozentsatz der TrkA-CD14-Zellen an allen CD14-Zellen im Blut zu erlangen.

Bei der Berechnung der Prozentangaben bezieht sich der Anteil an Zellen mit den Oberflächenmarkern CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19 und CD56 auf alle Monozyten und Lymphozyten im Blut (Monozyten-Lymphozytengate) und der Anteil an Zellen mit CD66b auf alle Granulozyten im Blut (Granulozytengate).

2.3 Statistische Auswertung

Die Zusammensetzung von Patienten- und Kontrollgruppe hinsichtlich des Alters wurde mittels T-Test bei unabhängigen Stichproben verglichen. Bei dem Vergleich der Werte aus dem großen Blutbild, der Leukozytensubpopulationen und der NGF-Rezeptorexpression auf den Leukozytensubpopulationen zwischen Patienten- und Kontrollgruppe wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben durchgeführt. Zur Subgruppenanalyse erfolgte zunächst mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests bei unabhängigen Stichproben eine Testung über alle drei Gruppen, und zwar schwer erkrankte Patienten, leicht erkrankte Patienten und Kontrollpersonen.

Bei signifikanten Werten wurde anschließend für einen Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen der Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben durchgeführt. War der p-Wert aus dem Mann-Whitney-U-Test kleiner als aus dem Kruskal-Wallis-Test, erfolgte die Korrektur auf den p-Wert aus dem Kruskal-Wallis-Test. Es wurde von einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0.05=5\%$ ausgegangen. Die Nullhypothese wurde somit bei einem errechneten p-Wert von $p<0.05$ abgelehnt.

Die statistische Analyse erfolgte mit SPSS Statistics Version 22.0 für Windows. Die Graphiken wurden mit GraphPad Prism 8 erstellt.

Um einen Überblick über die gewonnenen Daten zu erlangen, wurden deskriptive Kenngrößen wie Mittelwert (MW), Standardabweichung (standard deviation, SD), Standardfehler (standard error of the mean, SEM) und Median bestimmt. Dabei werden im Text $MW\pm SD$ und in den Graphiken $MW\pm SEM$ angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Patienten- und Kontrollgruppe

In beiden Gruppen befanden sich jeweils zwölf Frauen und ein Mann. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme waren die Patienten zwischen 29 und 69 Jahre alt ($47,0 \pm 13,5$ Jahre) und die gesunden Kontrollpersonen zwischen 30 und 71 Jahre alt ($46,5 \pm 13,8$ Jahre). Beide Gruppen waren im Alter vergleichbar ($p=0,93$) (Abb. 7).

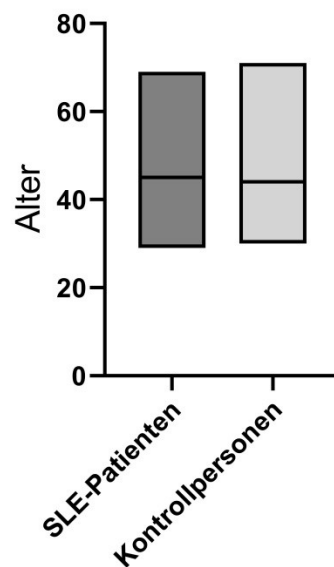


Abb. 7: Altersverteilung in Patienten- und Kontrollgruppe. $p=0,93$.

In der SLE-Gruppe erhielten 7 Patienten Prednison ($6,8 \pm 2,4$ mg/Tag), 7 Patienten Antimalariamittel (Chloroquin, Hydroxychloroquin), 3 Patienten Mycophenolat-Mofetil, ein Patient den monoklonalen Antikörper Belimumab, ein Patient Azathioprin und 2 Patienten keine medikamentöse SLE-Therapie. Der SLEDAI-Score lag bei $10,6 \pm 15,5$ Punkten mit einem Median von 6 Punkten.

Tab. 7 gibt eine Übersicht über demographische und klinische Charakteristika der SLE-Gruppe zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie.

Tab. 7: Übersicht über demographische und klinische Baseline-Charakteristika der SLE-Gruppe. Angabe der Mittelwerte in der untersten Zeile. Referenzwerte: Anti-dsDNA-Ak 0-<100 IU/ml, ANA-Titer <1:80, Komplementfaktor C3 0.9-1.8 g/l, Komplementfaktor C4 0.1-0.4 g/l, CRP <3 mg/l, Rheumafaktoren 0-15 IU/ml. N/A= Not applicable (Nicht verfügbar) (modifiziert nach Welle et al., 2020).

Patient	Geschlecht	Alter	Medikation	Prednison (mg/d)	SLEDAI Score	HAQ Score	Physician global assessment	Patient global assessment	Schmerzen	Anti-dsDNA (IU/ml)	ANA (Titer)	Komplement C3 (g/l)	Komplement C4 (g/l)	BSG (mm/h)	CRP (mg/l)	Rheumafaktoren (IU/ml)
01	W	40	Belimumab Azathioprin	10,0	6	N/A	N/A	N/A	N/A	10000	1:10240	1,05	0,14	N/A	80,10	N/A
02	W	45	Hydroxychloroquin	Nein	16	N/A	N/A	N/A	N/A	1992	1:320	0,65	0,14	10	8,70	<10,0
03	W	34	Mycophenolat-Mofetil	5,0	6	N/A	N/A	N/A	N/A	462	1:3200	0,55	0,10	13	0,02	<10,0
04	W	29	Chloroquin	Nein	0	0,125	0	0	0	80	1:80	1,00	0,16	5	0,40	<10,0
05	W	46	Mycophenolat-Mofetil Chloroquin	5,0	4	0	0	1	0	245	1:640	1,16	0,17	28	0,60	<10,0
06	W	60	Methotrexat	Nein	6	1,875	2	6	3	238	1:640	1,09	0,16	9	1,90	10,5
07	M	62	Chloroquin	5,0	0	0	1	2	2	37	1:320	1,32	0,17	15	12,50	<10,0
08	W	32	Hydroxychloroquin	Nein	2	0	3	3	5	249	1:320	1,33	0,20	N/A	2,50	<10,0
09	W	45	Keine	Nein	10	0	1	1	3	402	1:2560	0,58	0,06	41	0,10	27,7
10	W	68	Keine	10,0	12	0	3	5	5	76	1:640	1,37	0,36	5	12,20	<10,0
11	W	43	Mycophenolat-Mofetil Hydroxychloroquin	7,5	60	1,75	2	7	9	5	1:80	1,16	0,25	12	1,00	<10,0
12	W	69	Keine	Nein	8	0,125	7	3	0	335	1:5120	1,38	0,17	47	6,20	22,9
13	W	38	Chloroquin	5,0	8	0	5	3	0	664	1:2560	0,71	0,10	23	0,60	<10,0
		47		6,8	11	0,387	2	3	3	1137	1:640	1,03	0,17	19	9,76	

3.2 Blutbild

Bei keinem der Patienten lag eine Leukozytopenie vor. Es konnte kein Unterschied bei der absoluten Leukozytenanzahl zwischen Patienten- und Kontrollgruppe gefunden werden. Jedoch waren im Blut der Patienten die Anzahl an Lymphozyten (1238 ± 633 / μ L vs. 1892 ± 493 / μ L, $p=0,003$), der prozentuale Anteil an Lymphozyten ($22,2 \pm 11,6$ % vs. $29,5 \pm 8,1$ %, $p=0,022$) und die Gesamtanzahl an Lymphozyten und Monozyten (1610 ± 678 / μ L vs. 2465 ± 490 / μ L, $p=0,004$) im Vergleich zu den Kontrollpersonen verringert. Bei der absoluten Anzahl an Monozyten (481 ± 169 / μ L vs. 572 ± 177 / μ L, $p=0,125$) und Granulozyten (3990 ± 1262 / μ L vs. 4280 ± 1757 / μ L, $p=1,00$) zeigten sich im Gruppenvergleich keine Unterschiede. Dahingegen war bei den Patienten eine Erhöhung des prozentualen Anteils der neutrophilen Granulozyten ($65,5 \pm 12,9$ % vs. $58,4 \pm 8,3$ %, $p=0,034$) und der Gesamt-Granulozyten ($69,1 \pm 12,7$ % vs. $61,6 \pm 8,3$ %, $p=0,029$) nachweisbar.

Erwähnenswert ist außerdem, dass bei keinem der Patienten eine Anämie oder Thrombozytopenie vorlag. In der Patientengruppe fanden sich aber geringere Hämoglobinwerte als in der Kontrollgruppe ($13,2 \pm 0,9$ g/dL vs. $14,0 \pm 0,8$ g/dL, $p=0,029$). Bei den Thrombozyten zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (231 ± 49 G/L vs. 262 ± 63 G/L, $p=0,139$).

3.3 TrkA- und p75^{NTR}-Rezeptorexpression auf peripheren Leukozyten im Blut von SLE-Patienten und Kontrollpersonen

In der Patienten- als auch der Kontrollgruppe konnte eine Expression beider NGF-Rezeptoren auf allen mit den CD-Markern untersuchten peripheren Leukozyten nachgewiesen werden. Dabei findet sich bei den SLE-Patienten der höchste Anteil TrkA positiver Zellen bei den CD14-Monozyten ($15,53 \pm 20,64$ %) und der höchste Anteil p75^{NTR} positiver Zellen bei den CD4-T-Lymphozyten ($10,82 \pm 17,23$ %).

Im Folgenden soll ein Überblick über die FACS-Daten aus den Doppelfärbungen mit TrkA und p75^{NTR} gegeben werden. In Tab. 8 wird der prozentuale Anteil an TrkA oder p75^{NTR} positiven Zellen an den Leukozyten mit den Oberflächenmarkern CD4, CD8, CD11b,

CD11c, CD14, CD16, CD19, CD56 und CD66b im Blut der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe angegeben.

Tab. 8: Überblick über die FACS-Ergebnisse nach Doppelfärbungen mit TrkA bzw. p75^{NTR}, im Vergleich Patienten- vs. Kontrollgruppe (ns= nicht signifikant).

	% -Anteil an TrkA+ Zellen bezogen auf Leukozytensubpopulation im Blut			% -Anteil an p75NTR+ Zellen bezogen auf Leukozytensubpopulation im Blut		
	MW±SD	Median	p-Wert	MW±SD	Median	p-Wert
CD4	6,54±10,48 vs. 8,74±15,47	1,07 vs. 0,72	ns	10,82±17,23 vs. 5,33±9,10	2,20 vs. 0,68	ns
CD8	3,70±3,97 vs. 4,30±4,83	2,08 vs. 1,27	ns	3,33±4,32 vs. 2,24±3,36	0,99 vs. 0,50	ns
CD11b	11,52±5,52 vs. 15,43±10,44	10,16 vs. 14,68	ns	7,64±16,86 vs. 1,86±1,59	1,22 vs. 1,24	ns
CD11c	13,23±10,85 vs. 16,17±14,37	9,05 vs. 9,84	ns	7,22±15,76 vs. 3,13±3,43	2,30 vs. 2,29	ns
CD14	15,53±20,64 vs. 12,02±13,44	7,47 vs. 7,93	ns	8,95±12,48 vs. 4,28±6,76	2,38 vs. 1,47	ns
CD16	6,68±8,20 vs. 7,83±8,23	4,78 vs. 3,78	ns	2,44±2,96 vs. 0,94±0,61	1,13 vs. 0,67	0,044
CD19	5,65±9,15 vs. 3,51±3,20	2,29 vs. 3,17	ns	6,17±12,75 vs. 3,39±2,45	1,43 vs. 2,46	ns
CD56	1,27±1,12 vs. 0,67±0,42	0,78 vs. 0,61	ns	1,45±1,65 vs. 0,35±0,25	0,89 vs. 0,38	0,022
CD66b	0,42±0,32 vs. 0,27±0,16	0,38 vs. 0,19	ns	0,42±0,35 vs. 0,24±0,11	0,33 vs. 0,26	ns

Die Expression von TrkA auf den peripheren Leukozytensubpopulationen unterschied sich zwischen Patienten- und Kontrollgruppe nicht (Abb. 8a). Im Gegensatz dazu war der prozentuale Anteil an p75^{NTR} positiven CD16-Monozyten (2,44±2,96 % vs. 0,94±0,61 %, p=0,044) und CD56-NK-Zellen (1,45±1,65 % vs. 0,35±0,25 %, p=0,022) im Blut von SLE-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen signifikant erhöht. Bei den Zellen mit den Oberflächenmarkern CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD14, CD19 oder CD66b bestand kein signifikanter Unterschied in der Expression von p75^{NTR} zwischen den beiden Gruppen (Abb. 8b).

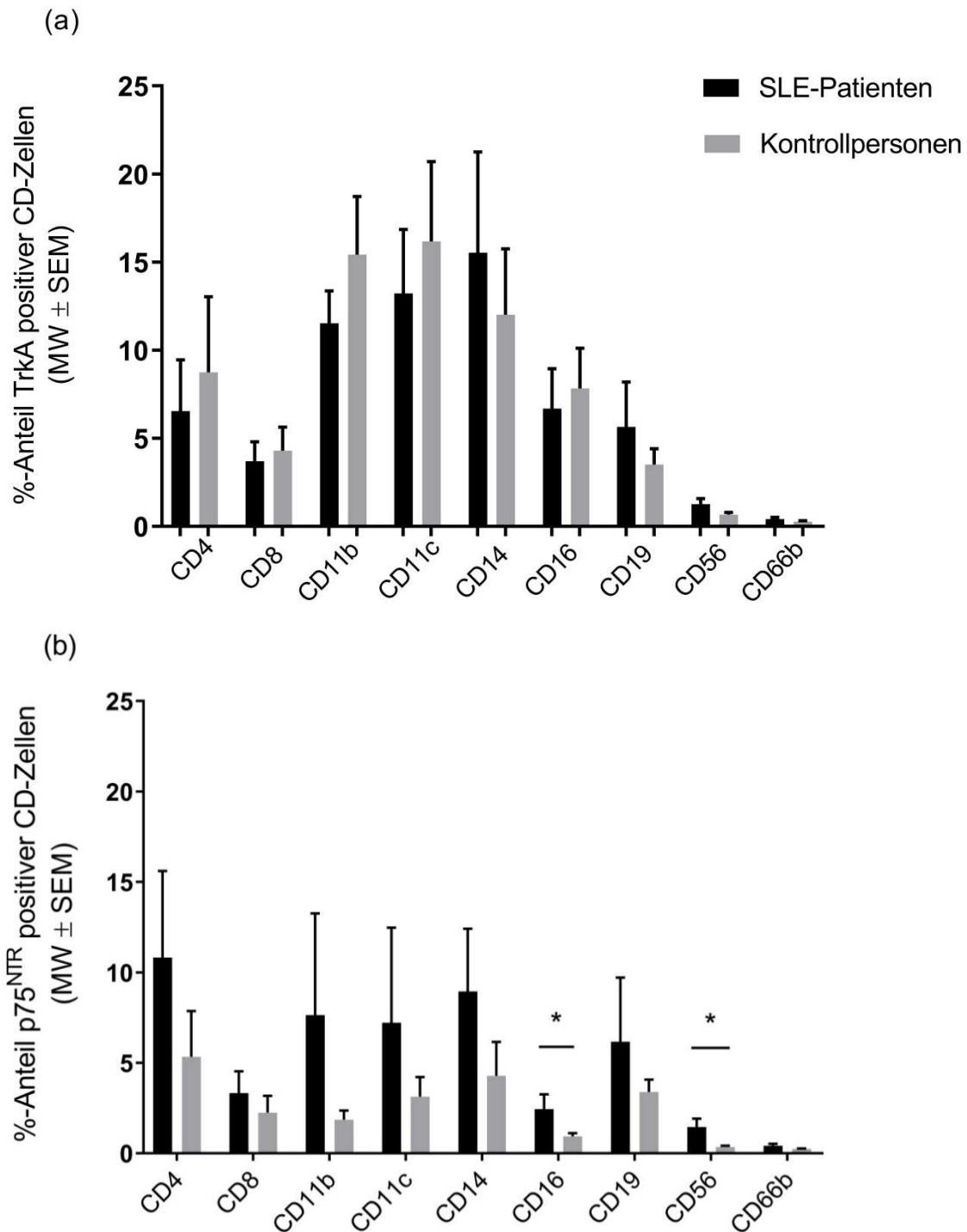


Abb. 8: Prozentualer Anteil (a) TrkA und (b) p75^{NTR} positiver Leukozytensubpopulationen im Blut der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Doppelfärbung der Leukozytensubpopulationen mit TrkA oder p75^{NTR} nach oben beschriebenem Schema mit anschließender FACS-Analyse. * $p < 0,05$.

3.4 Subgruppenanalyse: TrkA- und p75^{NTR}-Rezeptorexpression auf peripheren Leukozyten in Abhängigkeit von der SLE-Krankheitsaktivität

Bei der Subgruppenanalyse konnten Unterschiede in der Expression der NGF-Rezeptoren in Abhängigkeit von der SLE-Krankheitsaktivität festgestellt werden. Abb. 9 und 10 geben einen Überblick auf die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse.

Eine signifikant unterschiedliche p75^{NTR} Expression waren bei einer Subgruppierung der SLE-Patienten nach SLEDAI-Score oder ANA-Titer auf CD16-Monozyten, CD19-B-Lymphozyten und CD56-NK-Zellen nachweisbar. So fand sich eine signifikant erhöhte Expression von p75^{NTR} im Vergleich leichterkrankter Patienten zu Kontrollpersonen bei einer Subgruppierung nach ANA-Titer auf CD16+ Zellen ($4,09 \pm 4,19$ % vs. $0,94 \pm 0,61$ %, $p=0,032$) und CD56+ Zellen ($2,09 \pm 1,91$ % vs. $0,35 \pm 0,25$ %, $p=0,026$) und nach SLEDAI auf CD56+ Zellen ($2,33 \pm 1,85$ % vs. $0,35 \pm 0,25$ %, $p=0,007$). Eine signifikante Verringerung von p75^{NTR} konnte beim Vergleich von schwer- und leichterkrankten Patienten nach ANA-Titer auf CD16+ Zellen ($1,40 \pm 1,35$ % vs. $4,09 \pm 4,19$ %, $p=0,030$) und nach SLEDAI auf CD19+ Zellen ($0,80 \pm 0,71$ % vs. $10,78 \pm 16,47$ %, $p=0,018$) und CD56+ Zellen ($0,42 \pm 0,33$ % vs. $2,33 \pm 1,85$ %, $p=0,014$) festgestellt werden. Eine signifikante Reduktion von p75^{NTR} zeigte sich ebenfalls beim Vergleich von schwererkrankten Patienten mit Kontrollpersonen nach SLEDAI auf CD19+ Zellen ($0,80 \pm 0,71$ % vs. $3,39 \pm 2,45$ %, $p=0,026$). Im Gegensatz dazu fanden sich bei der Auswertung der Subgruppenanalysen bei anhand von Anti-dsDNA-Ak, BSG, CRP und Komplement C3/C4 subgruppierten SLE-Patienten und auf CD4+, CD8+, CD11b+, CD11c+, CD14+ und CD66b+ Zellen keine signifikanten Unterschiede in der Expression von p75^{NTR}.

Bei der Subgruppenanalyse zu TrkA zeigte sich eine signifikant erniedrigte Expression des TrkA-Rezeptors auf CD56-NK-Zellen bei nach SLEDAI schwer- verglichen mit leichterkrankten Patienten ($0,48 \pm 0,39$ % vs. $1,85 \pm 1,25$ %, $p=0,035$).

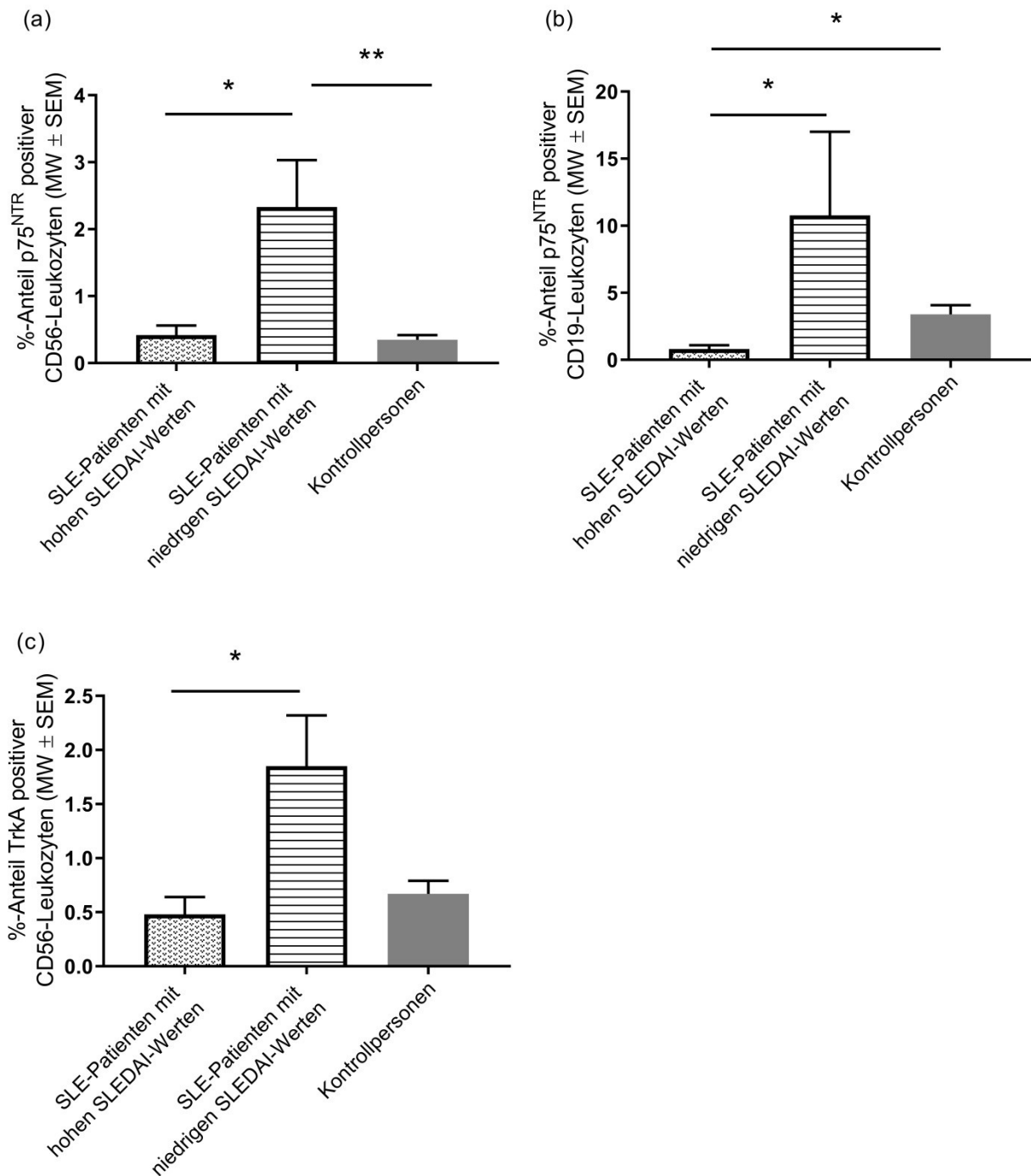


Abb. 9: Prozentualer Anteil (a) p75^{NTR} positiver CD56-NK-Zellen, (b) p75^{NTR} positiver CD19-B-Lymphozyten und (c) TrkA positiver CD56-NK-Zellen im Blut, Vergleich SLEDAI-Subgruppen und Kontrollpersonen. Doppelfärbung der Leukozytensubpopulationen mit TrkA oder p75^{NTR} nach oben beschriebem Schema mit anschließender FACS-Analyse und statistischer Subgruppenanalyse. *p<0,05, **p<0,01.

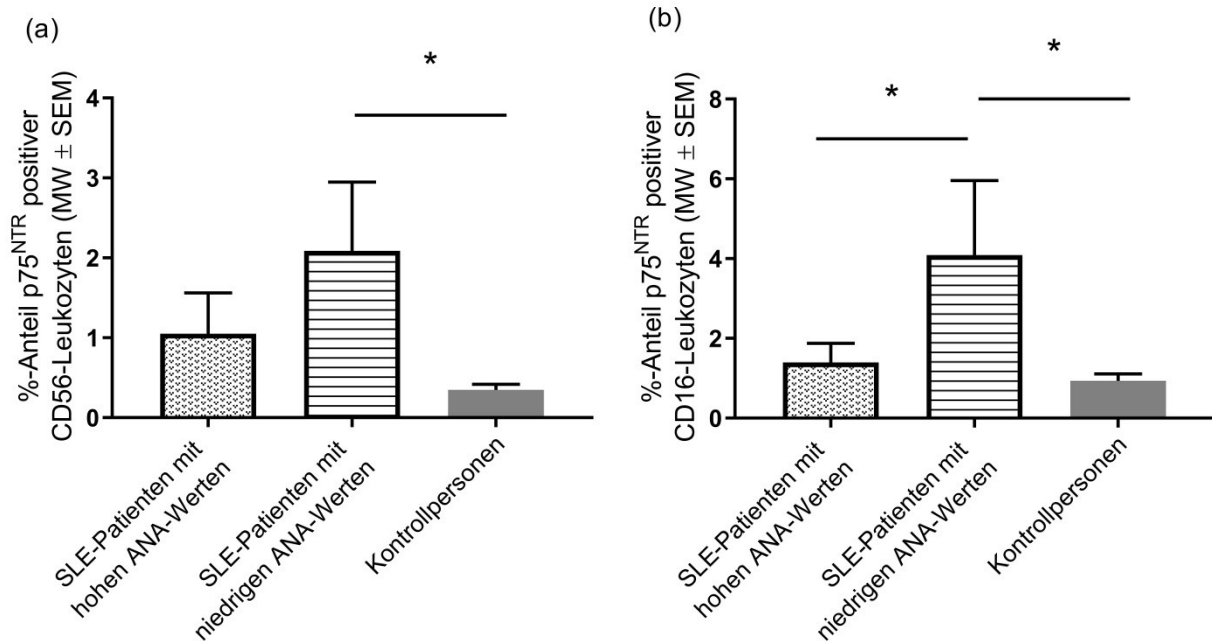


Abb. 10: Prozentualer Anteil (a) p75^{NTR} positiver CD56-NK-Zellen und (b) p75^{NTR} positiver CD16-Monozyten im Blut, Vergleich ANA-Subgruppen und Kontrollpersonen. Doppelfärbung der Leukozytensubpopulationen mit p75^{NTR} nach oben beschriebem Schema mit anschließender FACS-Analyse und statistischer Subgruppenanalyse. *p<0,05.

3.5 CD11c positive Leukozyten im Blut von SLE-Patienten und Kontrollpersonen

Als Marker für mDCs untersuchten wir auf das Vorhandensein von CD11c auf den Zellen im gemeinsamen Gate für Monozyten und Lymphozyten. Da die Auswertung der bei der FACS-Analyse gewonnenen Daten bezogen auf das Blutbild erfolgte, wird der Anteil an CD11c positiven Zellen als Prozentsatz an der Gesamtanzahl an Lymphozyten und Monozyten angegeben.

Bei den Doppelfärbungen von CD11c mit TrkA und CD11c mit p75^{NTR} zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression des CD11c-Rezeptors auf den Blutzellen in der SLE-Gruppe verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe (TrkA-Färbung: 5,61±2,68 % vs. 2,35±0,95 %, p=0,001 und p75^{NTR}-Färbung: 5,42±2,50 % vs. 2,53±0,62 %, p<0,001) (Abb. 11). Es soll nochmals angemerkt werden, dass sich kein signifikanter Unterschied in der

NGF-Rezeptorexpression auf CD11c+ mDCs zwischen den beiden Gruppen fand (siehe Kapitel 3.3).

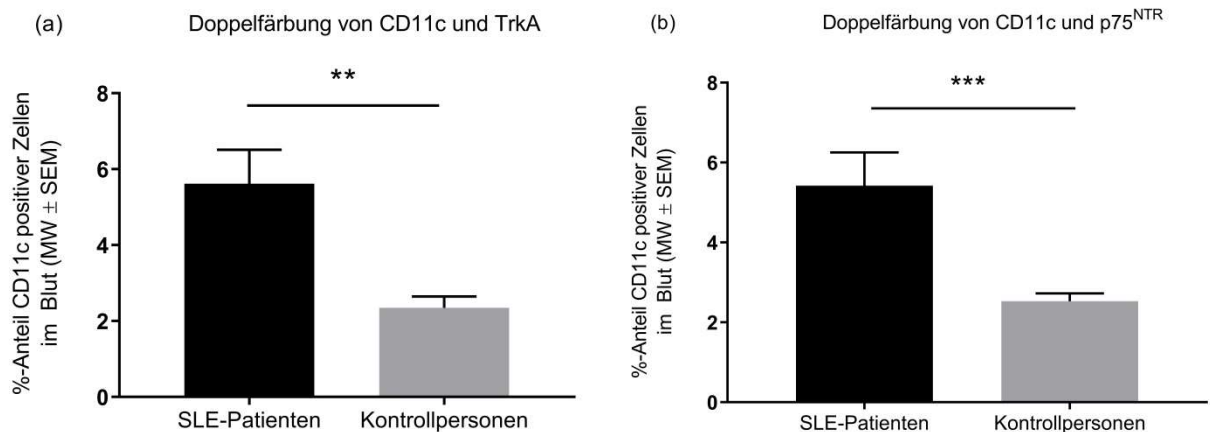


Abb. 11: Prozentualer Anteil CD11c+ mDCs im Blut der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Doppelfärbung mit (a) TrkA oder (b) p75^{NTR}. Doppelfärbung der CD11c-Leukozyten mit TrkA oder p75^{NTR} nach oben beschriebenem Schema mit anschließender FACS-Analyse. **p<0,01, ***p<0,001.

Der Vergleich von schwer- oder leichterkrankten SLE-Patienten mit den Kontrollpersonen ergab die gleichen Resultate (Abb. 12). So war auch die CD11c-Rezeptorexpression bei Patienten, welche nach Anti-dsDNA-Ak, ANA-Titer, BSG oder SLEDAI in schwererkrankt und nach CRP, Komplement C3/C4 oder SLEDAI als leichterkrankt eingruppiert wurden, im Vergleich zu Kontrollpersonen signifikant erhöht. Beim Vergleich von schwer- und leichterkrankten Patienten konnten hingegen in keiner Subgruppierung Unterschiede festgestellt werden.

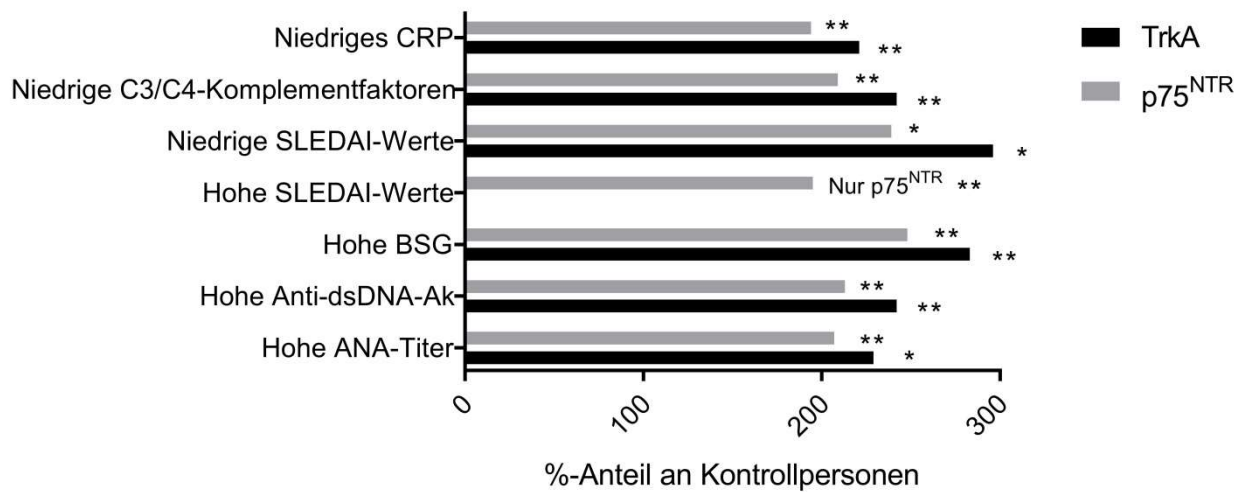


Abb. 12: CD11c+ mDCs im Blut der SLE-Subgruppen als prozentualer Anteil der CD11c+ mDCs im Blut der Kontrollgruppe, nach Doppelfärbung mit TrkA oder p75^{NTR}. Doppelfärbung der CD11c-Zellen mit TrkA oder p75^{NTR} nach oben beschriebem Schema mit anschließender FACS-Analyse. *p<0,05, **p<0,01.

3.6 TrkA positive CD11b-Population im Blut von SLE-Patienten und Kontrollpersonen

Bei einer Zwischenauswertung zeigte sich sowohl in der Patienten- als auch der Kontrollgruppe eine stark positive TrkA-Population im Monozyten-Lymphozytengate. Diese Population war für alle nach dem Basisschema gefärbten Oberflächenmarker (siehe Tab. 5 in Kapitel 2.2.3) negativ. Zur Identifizierung und Charakterisierung der unbekanntenen TrkA-positiven Population wurden zunächst einzelne ergänzende Färbungen mit den Antikörpern für die Oberflächenmarker CD45, CD3, CD11b und CD11c durchgeführt.

CD45 als Leukozytenmarker wurde gefärbt, um auszuschließen, dass es sich bei der TrkA positiven Population um bei der Probenvorbereitung nicht ausreichend lysierte Erythrozyten oder Thrombozytenaggregate handelt. In der Dotplot-Auswertung zeigte sich die TrkA positive Population positiv für CD45. Der Oberflächenmarker CD3 wurde ergänzend gefärbt, um auszuschließen, dass es sich bei der TrkA positiven Population um CD4 und CD8 doppeltnegative T-Lymphozyten handelt. Diesen Zellen wird eine immunregulatorische Funktion zugesprochen (Hillhouse und Lesage, 2013). Es wird vermutet, dass sie zur SLE-Pathogenese beitragen (Crispin und Tsokos, 2009). In der

Dotplot-Auswertung zeigte sich die TrkA positive Population negativ für CD3. Durch die Färbung des Oberflächenmarkers CD11b konnte die TrkA positive Population identifiziert werden, die sich in ihrer Lage als intermediate TrkA positive CD11b Population darstellte (Abb. 13). Das Basis-Färbeschema wurde um CD11b und CD11c erweitert (siehe Tab. 6 in Kapitel 2.2.3). CD11c wurde auch in das erweiterte Färbeschema aufgenommen, da sich erst nach mehreren Färbungen herausstellte, dass die TrkA positive Population negativ für CD11c war.

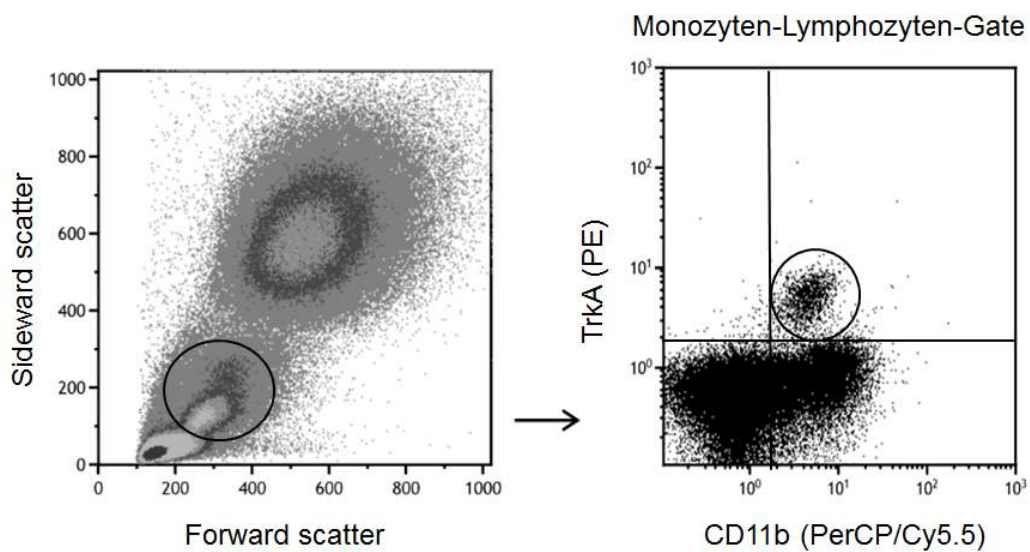


Abb. 13: Repräsentativer Dotplot mit der stark TrkA positiven Population, die sich in ihrer Lage als intermediate CD11b-Population darstellte (modifiziert nach Welle et al., 2020).

4. Diskussion

NGF gilt als der zentrale Vermittler neurogener Entzündung (Seidel et al., 2010). Eine pathogene Rolle der Interaktion zwischen NGF und seiner Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} wurde bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen, wie in der Synovialflüssigkeit bei rheumatoider Arthritis und in Hautbiopsien bei Psoriasis und atopischer Dermatitis, beschrieben (Barthel et al., 2009, Raychaudhuri und Raychaudhuri, 2004, Dou et al., 2006). Auf welchen Immunzellen im Blut die Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} bei entzündlich-rheumatischen Erkrankungen exprimiert werden und in welchem Ausmaß, ist dagegen weitgehend unbekannt. Das Ziel dieser Arbeit war daher, systematisch die wichtigsten Leukozytensubpopulationen im Blut von Patienten mit SLE auf die Expression der NGF-Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} im Vergleich zu alters- und geschlechtsgleichen Kontrollen zu untersuchen. Dies könnte Rückschlüsse auf die Rolle von NGF und seiner Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} bei SLE ermöglichen.

TrkA- und p75^{NTR}-Rezeptorexpression auf menschlichen Immunzellen im Blut: In der Literatur und in unserer Arbeit

In den letzten Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass Zellen und Zelllinien des Immunsystems von gesunden und unterschiedlich erkrankten Personen die Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} exprimieren (reviewed in Minnone et al., 2017). Jedoch sind die Ergebnisse von Studien zur Expression der beiden NGF-Rezeptoren bei verschiedenen Immunzellen im Blut größtenteils widersprüchlich, da TrkA und p75^{NTR} nicht immer nachweisbar waren.

In Studien zur TrkA- und p75^{NTR}-Rezeptorexpression bei T-Lymphozyten zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse (Ehrhard et al., 1994, Lambiase et al., 1997, Kittur et al., 1992, Nassenstein et al., 2006, Raychaudhuri et al., 2011, Rogers et al., 2010, Torcia et al., 1996). Gleiches gilt für Studien zur NGF-Rezeptor-Expression bei B-Lymphozyten (D'Onofrio et al., 2000, Melamed et al., 1996, Nassenstein et al., 2006, Rogers et al., 2010, Schenone et al., 1996, Torcia et al., 1996). Zwei Studien zeigten übereinstimmend, dass NK-Zellen TrkA exprimieren (Nassenstein et al., 2006, Rogers et al., 2010). Zur p75^{NTR}-Expression bei NK-Zellen ergaben diese Studien hingegen widersprüchliche

Ergebnisse. Einige Studien berichten übereinstimmend, dass Monozyten TrkA exprimieren (Caroleo et al., 2001, Ehrhard et al., 1993, Nassenstein et al., 2006, Torcia et al., 1996). Die Ergebnisse zur Expression von p75^{NTR} bei Monozyten sind wiederum unterschiedlich (Caroleo et al., 2001, Nassenstein et al., 2006, Torcia et al., 1996). Eine Expression von TrkA und p75^{NTR} durch periphere DCs ist nicht vorbeschrieben. Eine Studie untersuchte von Monozyten abstammende DCs auf das Vorhandensein der beiden NGF-Rezeptoren. Dabei wurden diese Zellen aus CD14 positiven Monozyten aus dem Blut der Studienteilnehmer in vitro generiert und exprimierten unstimuliert weder p75^{NTR} noch TrkA und nach LPS-Stimulation p75^{NTR}, aber kein TrkA (Jiang et al., 2007). Bisher untersuchte keine Studie das Vorhandensein der beiden NGF-Rezeptoren bei neutrophilen Granulozyten. Dahingegen konnte gezeigt werden, dass basophile Granulozyten TrkA und p75^{NTR} exprimieren (Bürgi et al., 1996). Zur Expression von TrkA und p75^{NTR} bei eosinophilen Granulozyten liegen widersprüchliche Ergebnisse vor (Nassenstein et al., 2003, Noga et al., 2002, Raap et al., 2005, Raap et al., 2008).

Unsere Arbeit konnte erstmalig das Vorhandensein der NGF-Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} auf der Oberfläche aller untersuchten Leukozyten CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD56 und CD66b im Blut von SLE-Patienten und gesunden Kontrollpersonen nachweisen. Dabei zeigte sich eine unterschiedlich starke Expression der beiden Rezeptoren auf den verschiedenen Leukozytensubpopulationen. Bei SLE-Patienten konnte ein prozentual höchster Anteil an TrkA-Rezeptoren auf CD14-Monozyten und p75^{NTR}-Rezeptoren auf CD4-T-Lymphozyten nachgewiesen werden.

Letztendlich könnten konzeptionelle und methodische Unterschiede zwischen den Studien für die größtenteils widersprüchlichen Ergebnisse zur Expression der Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} auf den peripheren Immunzellen verantwortlich sein. Hierzu gehören unter anderem Unterschiede bei der Auswahl von CD-Markern zur Identifizierung von Leukozytensubpopulationen, den Zellkulturbedingungen, der Untersuchung auf intrazelluläre und/oder zelloberflächliche Expression der NGF-Rezeptoren und der Auswahl von gesunden und/oder unterschiedlich erkrankten Studienteilnehmern. Im Hinblick auf die in unserer Arbeit angewandte Methode der Durchflusszytometrie ist zu bedenken, dass diese aufgrund fehlender Standardisierung in ihrer Aussagekraft limitiert ist. Dies betrifft neben der Probenvorbereitung und der Geräteeinstellung

insbesondere die Analyse der anfallenden großen Datenmenge anhand eines vom Untersucher abhängigen Gateings. So können verschiedene Untersucher bei der Analyse der gleichen durchflusszytometrischen Daten zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Weiterhin lassen sich die nicht übereinstimmenden Ergebnisse durch die dynamische Regulation der NGF-Rezeptor-Expression auf den Immunzellen erklären, welche vom Reifungs- und Aktivitätszustand der Zellen abhängig ist. So konnte beispielsweise bei einer Aktivierung von B- und T-Lymphozyten und undifferenzierten Monozyten durch antigene oder inflammatorische Stimulation *in vitro* eine starke Hochregulierung der TrkA-Expression festgestellt werden (Minnone et al., 2017). In unserer Arbeit wurde eine phänotypische Analyse zur Oberflächenexpression der NGF-Rezeptoren durchgeführt. Um die komplexe Interaktion und Funktion der NGF-TrkA/p75^{NTR}-Achse auf den verschiedenen Immunzellen aufzuklären, sind weiterführende experimentelle Studien mit Zellstimulation bei SLE-Patienten notwendig.

Erhöhte p75^{NTR}-Rezeptorexpression auf CD56+ NK-Zellen und CD16+ Monozyten bei SLE-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen

In unserer Arbeit fand sich im Blut der SLE-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen eine signifikant erhöhte Expression von p75^{NTR} auf der Zelloberfläche von CD56+ NK-Zellen und CD16+ Monozyten.

NK-Zellen lassen sich anhand ihrer CD56- und CD16-Expression auf der Zelloberfläche in verschiedene Untergruppen einteilen. Die beiden Hauptuntergruppen sind NK-Zellen mit einer niedrigen CD56- und einer hohen CD16-Expression (CD56+CD16++ NK-Zellen), welche etwa 90 % der im Blut zirkulierenden NK-Zellen darstellen, und NK-Zellen mit einer hohen CD56- und keinerlei CD16-Expression (CD56++CD16- NK-Zellen), welche insbesondere in sekundär lymphatischen Organen und Lymphknoten vorkommen (Fogel et al., 2013, Poli et al., 2009). Die in unserer Arbeit als CD56 positiv beschriebenen NK-Zellen umfassen diese beiden hauptsächlich auftretenden NK-Zellsubpopulationen. In vorhergehenden Studien konnten im Blut von SLE-Patienten zelluläre Veränderungen von NK-Zellen nachgewiesen werden. So fielen ein Ungleichgewicht zwischen CD56++ und CD56+ NK-Zellen mit einer erhöhten Zytokin-Produktion und eine verminderte Anzahl an NK-Zellen mit einer eingeschränkten zytotoxischen Aktivität, korrelierend mit der

Krankheitsaktivität und dem Auftreten einer Lupusnephritis, auf (Fogel et al., 2013, Poggi und Zocchi, 2014). In unserer Arbeit fand sich kein signifikanter Unterschied im prozentualen Anteil an CD56+ NK-Zellen im Blut der SLE-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen (Daten nicht gezeigt).

Das Monozyten-Makrophagen-System ist insbesondere für Phagozytose, Antigenpräsentation und Zytokin-Produktion verantwortlich. Monozyten lassen sich anhand ihrer Expression von CD14 und CD16 in Subpopulationen unterteilen. CD14+CD16- Monozyten stellen 90 % aller im Blut zirkulierenden Monozyten dar und zeigen eine höhere phagozytotische Aktivität und eine geringere Zytokin-Produktion als CD14+CD16+ Monozyten. 10 % der Monozyten im Blut sind CD14+CD16+ Monozyten, die aufgrund ihrer hohen Produktion von TNF- α und IL-1 als proinflammatorisch angesehen werden (Auffray et al., 2009). Eine Erhöhung des Anteils an CD14+CD16+ Monozyten im Blut wurde im Rahmen entzündlicher Erkrankungen und Prozesse wie rheumatoider Arthritis, koronarer Herzkrankheit und Sepsis nachgewiesen. Studien zum Anteil an CD14+CD16+ Monozyten im Blut von SLE-Patienten ergaben unterschiedliche Ergebnisse, wobei sich kein Unterschied oder ein erhöhter Anteil an CD14+CD16+ Monozyten bei SLE zeigte (Li et al., 2010). In unserer Arbeit fand sich kein signifikanter Unterschied im prozentualen Anteil an CD16+ Monozyten im Vergleich von SLE-Patienten und gesunden Kontrollpersonen (Daten nicht gezeigt). Monozyten sind bei SLE in Phänotyp und Funktion verändert, was zur SLE-Pathogenese beitragen könnte (reviewed in Katsiari et al., 2010 und Li et al., 2010).

Die Expression von Fc γ -Rezeptoren auf Leukozyten ist bei SLE verändert. Diese sind unter anderem an Phagozytose, Zytolyse und Produktion von inflammatorischen Zytokinen beteiligt (Li et al., 2010). Bei SLE zirkulierende Autoantikörper binden an Fc γ -Rezeptoren wie CD16, welche unter anderem auf NK-Zellen und Monozyten exprimiert werden. Möglicherweise entsteht hierdurch intrazellulär ein aktivierendes Signal, welches letztendlich zur Produktion inflammatorischer Zytokine und Schädigung der Zellen führt (Poggi und Zocchi, 2014).

Monozyten gehören ebenso wie NK-Zellen zum angeborenen Immunsystem. Forschungsergebnisse der letzten Jahre deuten im Gegensatz zu früheren Vermutungen darauf hin, dass eher das angeborene als das erworbene Immunsystem die

entscheidende Rolle bei der autoimmunologischen Pathogenese des SLE spielt (Li et al., 2010).

Es bleibt zu klären, ob und wie die erhöhte Expression von p75^{NTR} auf Monozyten und NK-Zellen zur Krankheitsentstehung und -aktivität von SLE beiträgt. Gleichwohl kann diese Erkenntnis als Hinweis auf eine NGF-vermittelte Modulation von peripheren Leukozyten bei SLE gewertet werden.

SLE-Krankheitsaktivität reguliert die Expression von TrkA und p75^{NTR} auf peripheren Leukozyten

In unserer Arbeit fand sich bei SLE-Patienten mit niedriger Krankheitsaktivität im Vergleich zu hoher Krankheitsaktivität (SLEDAI und/oder ANA-Titer) eine erhöhte Expression von TrkA und p75^{NTR} auf CD56-NK-Zellen und p75^{NTR} auf CD16-Monozyten und CD19-B-Lymphozyten. Allerdings korrelieren die Höhe des ANA-Titers und des SLEDAI-Scores nicht mit der SLE-Krankheitsaktivität.

Es wird vermutet, dass eine erhöhte TrkA-Expression über einen negativen Feedback-Mechanismus eine verstärkte Aktivierung anti-inflammatorischer Signalwege vermittelt (Minnone et al., 2017). So könnte eine verminderte TrkA-Expression zu einer erhöhten SLE-Krankheitsaktivität beitragen. Entsprechend dieser Annahme konnte auf mononukleären Zellen aus peripherem Blut und Synovialflüssigkeit bei Patienten mit chronischer Arthritis eine Herabregulation von TrkA festgestellt werden (Prencipe et al., 2014).

Die Ergebnisse unserer Studie lassen insgesamt vermuten, dass Unterschiede in der Expression von TrkA und p75^{NTR} auf peripheren Leukozyten mit der Krankheitsaktivität bei SLE-Patienten assoziiert sein könnten.

Erhöhter Anteil CD11c+ mDCs im Blut von SLE-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen

In unserer Arbeit fiel in der SLE-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ein deutlich erhöhter Anteil an CD11c+ mDCs im Blut auf. Dies konnte auch im Subgruppenvergleich

zwischen SLE-Patienten mit hoher oder niedriger Krankheitsaktivität und den gesunden Kontrollpersonen beobachtet werden.

DCs stellen eine Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem her. Als wichtigste antigenpräsentierende Zellen mit der Fähigkeit zur Stimulation von T-Zellen spielen sie im menschlichen Körper eine Schlüsselrolle bei der Balance zwischen Selbsttoleranz und Autoimmunität (Fransen et al., 2010). Bei MRL-MpJ-Fas^{lpr}-Mäusen, einem Lupus-anfälligen Mausmodell, konnte durch das Entfernen der DCs eine Verbesserung des Krankheitszustandes mit Reduktion der inflammatorischen T-Zellen sowie Plasmablasten sowie eine Verringerung der Autoantikörper-Produktion beobachtet werden (Teichmann et al., 2010).

Bei SLE besteht ein Zusammenhang zwischen dem erhöhten Vorkommen von apoptotischem und nekrotischem Zellmaterial und der Krankheitsentstehung und -aktivität. mDCs sind im Gegensatz zu pDCs dazu in der Lage, auch nicht in Immunkomplexen gebundenes apoptotisches und nekrotisches Zellmaterial zu phagozytieren. Es wird angenommen, dass die bei SLE vermehrt vorliegenden modifizierten apoptotischen Antigene bei mDCs zu einer vermehrten Freisetzung von IL-6 führen und durch mDCs in einer mehr immunogenen Weise an T-Zellen präsentiert werden, wodurch es zur vermehrten Differenzierung in Th17-Zellen mit einer erhöhten Produktion von IL-17 kommt (Fransen et al., 2010).

Unsere Arbeitsergebnisse bestätigen die meisten Studien, die ebenfalls eine erhöhte Anzahl an CD11c⁺ mDCs im Blut von SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen nachweisen konnten. Jedoch gibt es auch Studien, bei denen eine normale oder sogar erniedrigte Anzahl an CD11⁺ mDCs bei SLE gefunden wurde (Klarquist et al., 2016). Letztlich könnte eine veränderte Anzahl an mDCs eine Änderung des Aktivierungszustands der Zellen bei SLE widerspiegeln.

TrkA positive CD11b-Population im Blut von SLE-Patienten und Kontrollpersonen

Interessanterweise fand sich in unserer Arbeit eine neue Erkenntnis für CD11b positive periphere Blutzellen. Es zeigte sich eine intermediate CD11b⁺ Population mit einer

starken TrkA-Expression, sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe. In der Literatur ist keine solche TrkA positive Population vorbeschrieben.

CD11b vermittelt als Teil des Komplementrezeptors 3 wichtige Mechanismen im Immunsystem. Dazu gehören die Phagozytose von apoptotischem Zellmaterial und Immunkomplexen und die Leukozytenmigration an den Ort der Entzündung. Des Weiteren beeinflusst der Komplementrezeptor 3 die Funktion von DCs, indem er eine durch DCs vermittelte Aktivierung von T-Zellen und Differenzierung in Th17-Zellen inhibiert (Fagerholm et al., 2013).

Die starke TrkA-Expression auf peripheren CD11b+ Leukozyten könnte eine bedeutende NGF-vermittelte Modulation dieser Leukozytensubpopulation vermuten lassen. Daher ist eine weitere Charakterisierung dieser Population notwendig.

Bei SLE gilt ein Polymorphismus im ITGAM-Gen, welches die Polypeptidkette CD11b kodiert, als einer der stärksten genetischen Risikofaktoren für die Entstehung der Erkrankung. Möglicherweise sind CD11b-Rezeptoren bei Vorliegen dieses Polymorphismus in ihrer Funktion verändert. Über eine Verminderung der Clearance von apoptotischem Zellmaterial und T-Zellaktivierung könnte es zu einer gesteigerten systemischen Entzündungsreaktion kommen (Fagerholm et al., 2013). Überraschenderweise fanden sich in unserer Arbeit weder beim prozentualen Anteil CD11b positiver Zellen noch bei deren NGF-Rezeptorexpression Unterschiede zwischen SLE-Patienten und Kontrollpersonen. Möglicherweise ist der CD11b-Rezeptor bei SLE nur in seiner Funktion, aber nicht phänotypisch verändert oder die in unsere Studie eingeschlossenen SLE-Patienten weisen keinen Polymorphismus im ITGAM-Gen auf. Letzteres wäre anhand genetischer Untersuchungen zu klären.

5. Zusammenfassung

Rheumatische Erkrankungen sind durch lokale und/oder systemische entzündliche Aktivität charakterisiert, häufig einhergehend mit Endorganschäden und Schmerzen. Eine Aktivierung des Nervensystems legt die Vermutung nahe, dass eine neurogen bedingte Entzündung bei der Entstehung und/oder Aufrechterhaltung rheumatischer Erkrankungen eine bedeutende Rolle spielt. Der Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor, NGF) gilt als ein zentraler Vermittler neurogener Entzündung. NGF bindet an die hoch-affine Tropomyosin-Rezeptor-Kinase-A (TrkA) und den niedrig-affinen p75 Neurotrophin-Rezeptor (p75^{NTR}), welcher als Corezeptor für den TrkA-Rezeptor angesehen wird.

Auf welchen Immunzellen die Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} bei entzündlich-rheumatischen Erkrankungen exprimiert werden und in welchem Ausmaß, ist weitgehend unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die Expression der Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} auf Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten im peripheren Blut von Patienten mit SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen systematisch zu untersuchen. Dazu erfolgte nach Färbung verschiedener Leukozytenoberflächenmarker und der NGF-Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} eine durchflusszytometrische Analyse. Es wurde das Blut von 13 SLE-Patienten mit dem von 13 geschlechts- und altersadaptierten gesunden Kontrollpersonen verglichen. Zudem erfolgte eine Auswertung der NGF-Rezeptorexpression in Abhängigkeit von der SLE-Krankheitsaktivität.

Unsere Arbeit zeigt erstmalig das Vorhandensein der NGF-Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} auf der Oberfläche aller untersuchten Leukozytensubpopulationen (CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD56, CD66b) im Blut von SLE-Patienten. Beim Vergleich zwischen SLE- und Kontrollgruppe fand sich kein Unterschied in der TrkA-Expression auf peripheren Leukozyten. Dahingegen zeigte sich bei SLE-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erhöhte Expression des p75^{NTR}-Rezeptors auf CD16-Monozyten und CD56-NK-Zellen. Diese Erkenntnis kann als Hinweis auf eine NGF-vermittelte Modulation von peripheren Leukozyten bei SLE gewertet werden. Weiterführende experimentelle Studien mit Zellstimulationen bei SLE-Patienten sind anzustreben.

Darüber hinaus zeigte sich in unserer Arbeit ein erhöhter Anteil an CD11c positiver myeloischer dendritischer Zellen im Blut der SLE-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, was eine Änderung des Aktivierungszustandes der Zellen bei SLE widerspiegeln könnte.

Außerdem fand sich eine in der Literatur nicht vorbeschriebene TrkA positive CD11b-Population im Blut von SLE-Patienten und gesunden Personen. Eine weitere Charakterisierung dieser Population ist notwendig.

6. Tabellenverzeichnis

Tab.1: Zentrale pathogene Mechanismen, Zellen und Moleküle bei SLE.	12
Tab.2: ACR-Klassifikationskriterien zum SLE 2019.	17
Tab.3: Einteilung der Patientengruppe nach SLEDAI und laborchemischen Parametern in schwer- und leichterkrankte Patienten.	30
Tab.4: Verwendete Antikörper zur Oberflächenfärbung, sortiert nach Fluorochrom.	33
Tab.5: Oberflächenfärbung - Basis-Schema	35
Tab.6: Oberflächenfärbung - Erweitertes Schema	36
Tab.7: Übersicht über demographische und klinische Baseline-Charakteristika der SLE-Gruppe (modifiziert nach Welle et al., 2020)..	42
Tab.8: Überblick über die FACS-Ergebnisse nach Doppelfärbungen mit TrkA bzw. p75 ^{NTR} , im Vergleich Patienten- vs. Kontrollgruppe.	44

7. Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Die Struktur des TrkA-Rezeptors.....	21
Abb.2: Die Struktur des p75 ^{NTR} -Rezeptors.....	22
Abb.3: Neurogene Entzündung und direkte und indirekte immunmodulatorische Effekte von NGF als zentraler Vermittler neurogener Entzündung (modifiziert nach Minnone et al., 2017).....	24
Abb.4: Repräsentative Dotplot-Darstellung der FACS-Daten.....	32
Abb.5: Repräsentative Dotplot-Darstellung von FITC- und PE-gefärbten Zellen (a) vor Kompensation mit falsch doppeltpositiver Population und (b) nach Kompensation.	37
Abb.6: Repräsentative Definition eines Granulozyten- und eines Monozyten-Lymphozytengates im forward scatter/sideward scatter mit anschließender Betrachtung der CD66b-Zellen im Granulozytengate und CD14-Zellen im Monozyten-Lymphozytengate, jeweils gegen TrkA, nach erfolgter durchflusszytometrischer Analyse	38
Abb.7: Altersverteilung in Patienten- und Kontrollgruppe.....	41
Abb.8: Prozentualer Anteil (a) TrkA und (b) p75 ^{NTR} positiver Leukozytensubpopulationen im Blut der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	45
Abb.9: Prozentualer Anteil (a) p75 ^{NTR} positiver CD56-NK-Zellen, (b) p75 ^{NTR} positiver CD19-B-Lymphozyten und (c) TrkA positiver CD56-NK-Zellen im Blut, Vergleich SLEDAI-Subgruppen und Kontrollpersonen.....	47
Abb.10: Prozentualer Anteil (a) p75 ^{NTR} positiver CD56-NK-Zellen und (b) p75 ^{NTR} positiver CD16-Monozyten im Blut, Vergleich ANA-Subgruppen und Kontrollpersonen..	48

Abb.11: Prozentualer Anteil CD11c+ mDCs im Blut der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Doppelfärbung mit (a) TrkA oder (b) p75^{NTR}..... 49

Abb.12: CD11c+ mDCs im Blut der SLE-Subgruppen als prozentualer Anteil der CD11c+ mDCs im Blut der Kontrollgruppe, nach Doppelfärbung mit TrkA oder p75^{NTR}. 50

Abb.13: Repräsentativer Dotplot mit der stark TrkA positiven Population, die sich in ihrer Lage als intermediate CD11b-Population darstellte (modifiziert nach Welle et al., 2020).
..... 51

8. Literaturverzeichnis

Aalto K, Korhonen L, Lahdenne P, Pelkonen P, Lindholm D. Nerve growth factor in serum of children with systemic lupus erythematosus is correlated with disease activity. *Cytokine* 2002; 20: 136-139

Alexander T, Radbruch A, Hiepe F. Pathogenese des systemischen Lupus erythematoses. *Z Rheumatol* 2015; 74: 183-190

Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, Smolen JS, Wofsy D, Boumpas DT, Kamen DL, Jayne D, Cervera R, Costedoat-Chalumeau N, Diamond B, Gladman DD, Hahn B, Hiepe F, Jacobsen S, Khanna D, Lerstrøm K, Massarotti E, McCune J, Ruiz-Irastorza G, Sanchez-Guerrero J, Schneider M, Urowitz M, Bertsias G, Hoyer BF, Leuchten N, Tani C, Tedeschi SK, Touma Z, Schmajuk G, Anic B, Assan F, Chan TM, Clarke AE, Crow MK, Czirják L, Doria A, Graninger W, Halda-Kiss B, Hasni S, Izmirly PM, Jung M, Kumánovics G, Mariette X, Padjen I, Pego-Reigosa JM, Romero-Diaz J, Fernández IR, Seror R, Stummvoll GH, Tanaka Y, Tektonidou MG, Vasconcelos C, Vital EM, Wallace DJ, Yavuz S, Meroni PL, Fritzler MJ, Naden R, Dörner T, Johnson SR. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2019; 78: 1151-1159

Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: Development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 669-692

Bannwarth B, Kostine M. Targeting nerve growth factor (NGF) for pain management: What does the future hold for NGF antagonists? *Drugs* 2014; 74: 619-626

Barthel C, Yeremenko N, Jacobs R, Schmidt RE, Bernateck M, Zeidler H, Tak PP, Baeten D, Rühl M. Nerve growth factor and receptor expression in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R82

Bertsias G, Cervera R, Boumpas D. Systemic lupus erythematosus: Pathogenesis and clinical features. In: Bijlsma J, Hrsg. EULAR textbook on rheumatic diseases. London: BMJ Group, 2012; 476–505

Blanco P, Ueno H, Schmitt N. T follicular helper (Tfh) cells in lupus: Activation and involvement in SLE pathogenesis. *Eur J Immunol* 2016; 46: 281-290

Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 630-640

Bracci-Laudiero L, Aloe L, Levi-Montalcini R, Galeazzi M, Schilter D, Scully JL, Otten U. Increased levels of NGF in sera of systemic lupus erythematosus patients. *Neuroreport* 1993; 4: 563-565.

Bruce B, Fries JF. The Health Assessment Questionnaire (HAQ). *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23: 14-18

Bürgi B, Otten UH, Ochensberger B, Rihs S, Heese K, Ehrhard PB, Ibanez CF, Dahinden CA. Basophil priming by neurotrophic factors. Activation through the trk receptor. *J Immunol* 1996; 157: 5582-5588

Caroleo MC, Costa N, Bracci-Laudiero L, Aloe L. Human monocyte/macrophages activate by exposure to LPS overexpress NGF and NGF receptors. *J Neuroimmunol* 2001; 113: 193-201

Chang DS, Hsu E, Hottinger DG, Cohen SP. Anti-nerve growth factor in pain management: Current evidence. *J Pain Res* 2016; 9: 373-383

Crispín JC, Tsokos GC. Human TCR-alpha beta+ CD4- CD8- T cells can derive from CD8+ T cells and display an inflammatory effector phenotype. *J Immunol* 2009; 183: 4675-4681

Cruse JM, Lewis RE. Illustrated dictionary of immunology. Boca Raton – London – New York: Taylor & Francis, 2009

Dema B, Charles N. Advances in mechanisms of systemic lupus erythematosus. *Discov Med.* 2014; 17: 247-255

Dimitroulas T, Lambe T, Klocke R, Kitas GD, Duarte RV. Biologic drugs as analgesics for the management of osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2017; 46: 687-691

D'Onofrio M, de Grazia U, Morrone S, Cuomo L, Spinsanti P, Frati L, Gulino A, Ragona G.. Expression of neurotrophin receptors in normal and malignant B lymphocytes. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11: 283-291

Dou YC, Hagströmer L, Emtestam L, Johansson O. Increased nerve growth factor and its receptors in atopic dermatitis: An immunohistochemical study. *Arch Dermatol Res* 2006; 298: 31-37

Ehrhard PB, Ganter U, Stalder A, Bauer J, Otten U. Expression of functional trk protooncogene in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5423-5427

Ehrhard PB, Erb P, Graumann U, Schmutz B, Otten U. Expression of functional trk tyrosine kinase receptors after T cell activation. *J Immunol* 1994; 152: 2705-2709

Fagerholm SC, MacPherson M, James MJ, Sevier-Guy C, Lau CS. The CD11b-integrin (ITGAM) and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2013; 22: 657-663

Fauchais AL, Lise MC, Marget P, Lapeybie FX, Bezanahary H, Martel C, Dumonteil S, Sparsa A, Lalloué F, Ly K, Essig M, Vidal E, Jauberteau MO. Serum and lymphocytic neurotrophins profiles in systemic lupus erythematosus: A case-control study. *PLoS One* 2013; 8: e79414

Fogel LA, Yokoyama WM, French AR. Natural killer cells in human autoimmune disorders. *Arthritis Res Ther* 2013; 15: 216

Fransen JH, van der Vlag J, Ruben J, Adema GJ, Berden JH, Hilbrands LB. The role of dendritic cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2010; 12: 207

Freund-Michel V, Frossard N. The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases. *Pharmacol Ther* 2008; 117: 52-76

Frossard N, Freund V, Advenier C. Nerve growth factor and its receptors in asthma and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2004; 500: 453-465

Ghodke-Puranik Y, Niewold TB. Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *J Autoimmun* 2015; 64: 125-136

Hafstrom I, Gyllenhammar H, Palmblad J, Ringertz B. Substance P activates and modulates neutrophil oxidative metabolism and aggregation. *J Rheumatol* 1989; 16: 1033-1037

Hillhouse EE, Lesage S. A comprehensive review of the phenotype and function of antigen-specific immunoregulatory double negative T cells. *J Autoimmun* 2013; 40: 58-65

Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725

Inaishi Y, Kashihara Y, Sakaguchi M, Nawa H, Kuno M. Cooperative regulation of calcitonin gene-related peptide levels in rat sensory neurons via their central and peripheral processes. *J Neurosci* 1992; 12: 518-524

Jiang Y, Chen G, Zhang Y, Lu L, Liu S, Cao X. Nerve growth factor promotes TLR4 signaling-induced maturation of human dendritic cells in vitro through inducible p75^{NTR} 1. *J Immunol* 2007; 179: 6297-6304

Kahlenberg JM, Kaplan MJ. The inflammasome and lupus: Another innate immune mechanism contributing to disease pathogenesis? *Curr Opin Rheumatol* 2014; 26: 475-481

Katsiari CG, Liossis SN, Sfikakis PP. The pathophysiologic role of monocytes and macrophages in systemic lupus erythematosus: a reappraisal. *Semin Arthritis Rheum* 2010; 39: 491-503

Kittur SD, Song L, Endo H, Adler WH. Nerve growth factor receptor gene expression in human peripheral blood lymphocytes in aging. *J Neurosci Res* 1992; 32: 444-448

Klarquist J, Zhou Z, Shen N, Janssen EM. Dendritic cells in systemic lupus erythematosus: From pathogenic players to therapeutic tools. *Mediators Inflamm* 2016; 2016: 5045248

Knight JS, Kaplan MJ. Lupus neutrophils: 'NET' gain in understanding lupus pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol* 2012; 24: 441-450

Kuhn A, Bonsmann G, Anders HJ, Herzer P, Tenbrock K, Schneider M. Diagnostik und Therapie des systemischen Lupus erythematoses. *Dtsch Arztebl Int.* 2015; 112: 423-432

Kruse A. Die Immunantwort durch Lymphocyten. In: Rink L, Kruse A, Haase H, Hrsg. *Immunologie für Einsteiger*. Berlin – Heidelberg: Springer, 2015: 75-76

Lambiase A, Bracci-Laudiero L, Bonini S et al. Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 408-414

Li Y, Lee PY, Reeves WH. Monocyte and macrophage abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2010; 58: 355-364

Mak A, Kow NY. The pathology of T cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol Res.* 2014; 2014: 419029

Melamed I, Kelleher CA, Franklin RA, Brodie C, Hempstead B, Kaplan D, Gelfand EW. Nerve growth factor signal transduction in human B lymphocytes is mediated by gp140trk. *Eur J Immunol* 1996; 26: 1985-1992

Minnone G, De Benedetti F, Bracci-Laudiero L. NGF and its receptors in the regulation of inflammatory response. *Int J Mol Sci* 2017; 18

Moulton VR, Tsokos GC. T cell signaling abnormalities contribute to aberrant immune cell function and autoimmunity. *J Clin Invest* 2015; 125: 2220-2227

Murphy K, Weaver C. *Janeway's Immunobiology*. New York: Garland Science/Taylor & Francis, 2017

Nassenstein C, Braun A, Erpenbeck VJ, Lommatzsch M, Schmidt S, Krug N, Luttmann W, Renz H, Virchow JC Jr. The neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 are survival and activation factors for eosinophils in patients with allergic bronchial asthma. *J Exp Med* 2003; 198: 455-467

Nassenstein C, Möhring UH, Luttmann W, Virchow JC Jr, Braun A. Differential expression of the neurotrophin receptors p75NTR, TrkA, TrkB and TrkC in human peripheral blood mononuclear cells. *Exp Toxicol Pathol* 2006; 57 Suppl 2: 55-63

Noga O, Englmann C, Hanf G, Grützkau A, Guhl S, Kunkel G. Activation of the specific neurotrophin receptors TrkA, TrkB and TrkC influences the function of eosinophils. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1348-1354

Nossent JC. Course and prognostic value of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index in black Caribbean patients. *Semin Arthritis Rheum* 1993; 23: 16-21

Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, Bruce IN, Isenberg D, Wallace DJ, Nived O, Sturfelt G, Ramsey-Goldman R, Bae SC, Hanly JG, Sánchez-Guerrero J, Clarke A, Aranow C, Manzi S, Urowitz M, Gladman D, Kalunian K, Costner M, Werth VP, Zoma A, Bernatsky S, Ruiz-Irastorza G, Khamashta MA, Jacobsen S, Buyon JP, Maddison P, Dooley MA, van Vollenhoven RF, Ginzler E, Stoll T, Peschken C, Jorizzo JL, Callen JP, Lim SS, Fessler BJ, Inanc M, Kamen DL, Rahman A, Steinsson K, Franks AG Jr, Sigler L, Hameed S, Fang H, Pham N, Brey R, Weisman MH, McGwin G Jr, Magder LS. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 2677-2686

Poggi A, Zocchi MR. NK cell autoreactivity and autoimmune diseases. *Front Immunol* 2014; 5: 27

Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: An important NK cell subset. *Immunology* 2009; 126: 458-465

Prencipe G, Minnone G, Strippoli R, De Pasquale L, Petrini S, Caiello I, Manni L, De Benedetti F, Bracci-Laudiero L. Nerve growth factor downregulates inflammatory response in human monocytes through TrkA. *J Immunol* 2014; 192: 3345-54

Raap U, Goltz C, Deneka N, Bruder M, Renz H, Kapp A, Wedi B. Brain-derived neurotrophic factor is increased in atopic dermatitis and modulates eosinophil functions compared with that seen in nonatopic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 1268-1275

Raap U, Deneka N, Bruder M, Kapp A, Wedi B. Differential up-regulation of neurotrophin receptors and functional activity of neurotrophins on peripheral blood eosinophils of patients with allergic rhinitis, atopic dermatitis and nonatopic subjects. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 1493-1498

Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK. Role of NGF and neurogenic inflammation in the pathogenesis of psoriasis. *Prog Brain Res* 2004; 146: 433-437

Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK, Atkuri KR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Nerve growth factor: A key local regulator in the pathogenesis of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 3243-3252

Rogers ML, Bailey S, Matusica D, Nicholson I, Muyderman H, Pagadala PC, Neet KE, Zola H, Macardle P, Rush RA.. ProNGF mediates death of natural killer cells through activation of the p75NTR-sortilin complex. *J Neuroimmunol* 2010; 226: 93-103

Saeed M. Lupus pathobiology based on genomics. *Immunogenetics* 2017; 69: 1-12

Schenone A, Gill JS, Zacharias DA, Windebank AJ. Expression of high- and low-affinity neurotrophin receptors on human transformed B lymphocytes. *J Neuroimmunol* 1996; 64: 141-149

Schepis D, Gunnarsson I, Eloranta ML, Lampa J, Jacobson SH, Kärre K, Berg L. Increased proportion of CD56bright natural killer cells in active and inactive systemic lupus erythematosus. *Immunology* 2009; 126: 140-146

Schittenhelm L, Hilkens CM, Morrison VL. β 2 integrins as regulators of dendritic cell, monocyte, and macrophage function. *Front Immunol* 2017; 8: 1866

Schor NF. The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Prog Neurobiol* 2005; 77: 201-214

Seidel MF, Herguijuela M, Forkert R, Otten U. Nerve growth factor in rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 2010; 40: 109-126

Skaper SD. Nerve growth factor: A neuroimmune crosstalk mediator for all seasons. *Immunology* 2017; 151: 1-15

Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271-1277

Teichmann LL, Ols ML, Kashgarian M, Reizis B, Kaplan DH, Shlomchik MJ. Dendritic cells in lupus are not required for activation of T and B cells but promote their expansion, resulting in tissue damage. *Immunity* 2010; 33: 967-978

Tiwari V, Brent LH, 2020: Psoriatic Arthritis. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547710/> (Zugriffsdatum 16.08.2020)

Toni T, Dua P, van der Graaf PH. Systems pharmacology of the NGF signaling through p75 and TrkA receptors. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 2014; 3: e150

Torcia M, Bracci-Laudiero L, Lucibello M et al. Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell* 1996; 85: 345-356

Trouw LA, Pickering MC, Blom AM. The complement system as a potential therapeutic target in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* 2017; 13: 538-547

Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2011; 365: 2110-2121

Wahren-Herlenius M, Dörner T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. *Lancet* 2013; 382: 819-831

Wise BL, Seidel MF, Lane NE. The evolution of nerve growth factor inhibition in clinical medicine. *Nat Rev Rheumatol* 2021; 17: 34-46

Xu Z, Chen Y. Determination of serum interleukin-13 and nerve growth factor in patients with systemic lupus erythematosus and clinical significance. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2005; 25: 360-361

Zharkova O, Celhar T, Cravens PD, Satterthwaite AB, Fairhurst AM, Davis LS. Pathways leading to an immunological disease: Systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2017; 56: i55-i66

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010; 116: e74-80

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Matthias Seidel, der mir bei dieser Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Seine Anregungen und kritischen Kommentare haben zum guten Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen.

Ich möchte mich auch besonders bei Frau Privatdozentin Anna-Maria Wolf bedanken, die ihre wertvollen fachspezifischen Kenntnisse mit in diese Arbeit eingebracht hat und mir ebenfalls als Ansprechpartnerin für jegliche Fragen zur Verfügung stand.

Außerdem bedanke ich mich bei Frau Dr. Ute Klarmann-Schulz für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Stephanie Ebbinghaus bedanken, die mir insbesondere bei technischen Fragestellungen während der Durchführung der Arbeit unterstützend zur Seite stand.

Ich danke der Arbeitsgruppe von Herr Professor Peter Brossart der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der Inneren Medizin, die mir durch die Bereitstellung der technischen Geräte die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte und mich stets freundlich empfangen hat.

Mein besonderer Dank gilt auch den Patienten und Kontrollpersonen, die bereit waren an dieser Studie teilzunehmen. Ohne diese Bereitschaft wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, die mich stets in jeglicher Hinsicht bestens unterstützt haben.

10. Publikation

Welle S, Wolf AM, Dernbach C, Klarmann-Schulz U, Seidel MF. Disease activity-dependent expression of nerve growth factor TRKA and P75 receptors on elevated dendritic cells and peripheral leucocytes in patients with systemic lupus erythematosus.

Lupus 2020; 29: 970-975

DOI: 10.1177/0961203320919489