

Interleukin 36 α
in der Pathogenese entzündlicher Arthritiden

Medizinische Klinik 3 – Rheumatologie und Immunologie

Direktor: Prof. Dr. med. Georg Schett

Der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur Erlangung des Doktorgrades Dr. med.

vorgelegt von
Maria-Elena Meßbacher
aus Forchheim

Als Dissertation genehmigt
von der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2015

Vorsitzender des Promotionsorgans: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Jürgen Schüttler

Gutachter/in: Prof. Dr. med. Georg Schett
Prof. Dr. med. Bernhard Manger

Abstract

Background:

Interleukin (IL)-36 α is one of the novel IL-1 cytokine family members, whose pro-inflammatory properties have already been proven for psoriasis¹². Own data on IL-36 α expression in lymphoid tissue led us to the hypothesis that it could also play an important role in inflammatory arthritis.

Objective:

Aim of this study was to determine the IL-36 α expression in psoriatic arthritis (PsA) compared to rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) and to identify which cells express IL-36 α .

Methods:

Immunohistochemical and immunofluorescent staining was performed for IL-36 α , IL-36 receptor (IL-36R) and IL-36R antagonist (IL-36Ra) on synovial tissues obtained from arthritis patients.

Results:

IL-36R and its ligands IL-36 α and IL-36Ra were expressed in the synovial lining layer as well as in cellular infiltrates of the arthritis tissues. However, IL-36 α expression was significantly higher in PsA and RA than in OA synovium. Via immunofluorescence, we could identify CD138-positive plasma cells as the main cellular source of IL-36 α , but also B cells were co-stained for both CD20 and IL-36 α . Interestingly, the expression of IL-36R and IL-36Ra showed no differences between PsA, RA and OA. The results of this study were published by Frey et al.³⁸

Conclusion:

The cytokine IL-36 α is up-regulated in PsA and RA synovium and predominantly expressed by plasma cells. Future studies will address if the IL-36 family plays a critical role in the pathogenesis of RA and PsA.

Zusammenfassung

Hintergrund:

Interleukin (IL)-36 α ist ein neues Mitglied der Interleukin-1 Familie, dessen pro-entzündliche Eigenschaften in der Psoriasis bereits erwiesen sind¹². Dies in Kombination mit dem Ergebnis unserer Vorprüfungen, in denen wir das neue Zytokin in Lymphgewebe nachweisen konnten, führte zu der Hypothese, dass IL-36 α auch für die Pathogenese entzündlicher Arthritiden von Bedeutung sein dürfte.

Zielsetzung:

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, inwieweit IL-36 α in Psoriasisarthritis (PsA) im Vergleich zu rheumatoider Arthritis (RA) und Osteoarthritis (OA) exprimiert wird und welche Zellen dieses Zytokin produzieren.

Methoden:

Synovialgewebe von Arthritis-Patienten wurde mit Hilfe von Immunhistochemie und Immunfluoreszenz zur Detektion von IL-36 α , IL-36 Rezeptor (IL-36R) und IL-36R Antagonist (IL-36Ra) angefärbt.

Ergebnisse:

Die Expression des IL-36R und seiner Liganden IL-36 α und IL-36Ra wurde im Bereich der ersten Zellschicht der Synovialmembran und in zellulären Infiltraten der Arthritisgewebe beobachtet. Die IL-36 α -Expression war in PsA- und RA- signifikant höher als in OA-Synovium. Durch Immunfluoreszenz konnten wir CD-138-positive Plasmazellen als wesentlichen zellulären Ursprung von IL-36 α identifizieren, aber auch B-Zellen ließen sich mit CD20 und IL-36 α doppelfärben. Interessanterweise wurden keine Unterschiede in der Expression von IL-36R und IL-36Ra zwischen PsA, RA und OA beobachtet. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden durch Frey et al publiziert.³⁸

Schlussfolgerungen:

Das neu entdeckte Zytokin IL-36 α wird in PsA- und RA-Synovium hochreguliert und in erster Linie von Plasmazellen exprimiert. Ob die IL-36 Familie als potentielle Angriffstelle in der Therapie entzündlicher Arthritiden fungieren kann, muss in weiterführenden Studien getestet werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vorstellung der arthritischen Krankheitsbilder	1
1.1.1	Rheumatoide Arthritis	2
1.1.2	Psoriasisarthritis	5
1.1.3	Osteoarthritis	7
1.2	Interleukin-1 Familie	9
1.2.1	Biologische Aktivität	9
1.2.2	Nomenklatur	9
1.2.3	Signaltransduktion	11
1.2.4	IL-1 in RA und klinische Bedeutung	12
1.3	Interleukin-36-Zytokinfamilie	12
1.4	Fragestellung/ Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	15
2	Patienten, Material und Methoden	16
2.1	Patientenmaterial	16
2.2	Material	18
2.2.1	Laborgeräte und Hilfsmittel	18
2.2.2	Pufferlösungen	18
2.2.3	Primäre Antikörper	19
2.2.4	Sekundäre Antikörper	19
2.2.5	Färbesubstrate	20
2.3	Methoden	20
2.3.1	Gewebepräparation	20
2.3.2	Immunhistochemie (IHC)	21
2.3.2.1	Einzelfärbung für Lichtmikroskopie	21
2.3.2.2	Doppelfärbung für Lichtmikroskopie	23
2.3.2.3	Doppelfärbung für Fluoreszenzmikroskopie	23
3	Ergebnisse	25
3.1	Ergebnisse der Einzelfärbungen	25
3.2	Ergebnisse der Doppelfärbungen	29
4	Diskussion	34

4.1	Diskussion der Patientencharakteristika	34
4.2	Diskussion der Ergebnisse der Einzelfärbungen	35
4.3	Diskussion der Ergebnisse der Doppelfärbungen	37
5	Literaturverzeichnis	39
6	Abkürzungsverzeichnis	48
7	Verzeichnis der Vorveröffentlichungen	50
8	Abbildungsverzeichnis	51
9	Danksagung	53

1 Einleitung

1.1 Vorstellung der arthritischen Krankheitsbilder

Entzündliche Gelenkerkrankungen wie die rheumatoide Arthritis (RA) und die Schuppenflechtearthritis (auch: Psoriasisarthritis, PsA) stellen eine wichtige medizinische Herausforderung dar, die zum einen auf ihrer noch weitgehend ungeklärten Ätiologie und Pathogenese und den damit einhergehenden therapeutischen Problemen beruht.

Zum anderen ist ihre Differentialdiagnose und damit auch eine möglichst zeitige Diagnosestellung oft schwierig – obwohl, oder vielleicht gerade weil Gelenkerkrankungen so häufig vorkommen.

Prinzipiell wird zwischen den bereits erwähnten entzündlichen Arthropathien und den nicht entzündlichen unterschieden: Bei ersteren steht die Synovitis, also die Entzündung der normalerweise ein- bis zweilagigen Synovialmembran, im Vordergrund, die bei chronischen Verläufen zur sogenannten Pannusbildung führt. Dabei wächst fibröses Granulationsgewebe getriggert durch proinflammatorische Zytokine von der Gelenkkapsel ausgehend in den Gelenkspalt vor, was die Destruktion von Knorpel und Knochen und somit komplette Funktionseinbußen zur Folge haben kann.⁸⁷

Im akuten Schub ist das arthritische Gelenk an den fünf klassischen lokalen Entzündungszeichen nach Galen erkennbar: Rötung („rubor“), Schwellung („tumor“), Schmerz („dolor“), Überwärmung („calor“) und eingeschränkte Funktion („functio laesa“).⁷²

Bei nicht entzündlichen Arthropathien wie der Arthrose wird der Knorpel im Wesentlichen durch Über- oder Fehlbelastung geschädigt, wobei jedoch die Übergänge zu den Arthritiden fließend sein können, nämlich wenn sich beispielsweise am primär arthrotischen Gelenk überlastungsbedingt ein Erguss im Sinne einer sekundären Entzündungsreaktion bildet.⁵

Speziell im Fokus dieser Arbeit stehen die Krankheitsbilder rheumatoide Arthritis (RA), Psoriasisarthritis (PsA) und Osteoarthritis (OA), die nun im Folgenden vorgestellt werden.

1.1.1 Rheumatoide Arthritis

Die am weitesten verbreitete unter den primär entzündlichen Gelenkerkrankungen ist die rheumatoide Arthritis (Synonym: chronische Polyarthritis), welche gleichzeitig auch zu den häufigsten Autoimmunerkrankungen der kaukasischen Bevölkerung zählt.¹⁷ Die weltweite Inzidenz liegt bei 0,5% bis 1%.³⁵ RA kann sich in jedem Alter manifestieren, der Gipfel liegt jedoch zwischen dem 35. und dem 45. Lebensjahr. Frauen sind außerdem bis zu dreimal häufiger betroffen als Männer.⁶⁵

Die Klinik der RA wird zu Krankheitsbeginn oft zunächst von unspezifischen Symptomen wie Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit, subfebrilen Temperaturen und/ oder Nachtschweißigkeit eingeläutet.^{19, 20} Im Verlauf zeigt sich dann das typische Gelenkbefallsmuster mit symmetrischer Schwellung, Überwärmung und Schmerzhaftigkeit der kleinen Gelenke an Händen und Füßen, wobei am häufigsten die Grundgelenke betroffen sind, während die distalen Interphalangealgelenke in der Regel ausgespart bleiben.⁴² Obwohl die Gelenke den Hauptmanifestationsort der RA darstellen, sind extraartikuläre Organmanifestationen infolge einer sekundären Immunkomplexvaskulitis nicht selten.^{80, 105} Diese Systembeteiligung ist auch der Grund für diverse Endorganschäden und die damit verbundene erhöhte Mortalität der RA Patienten, allen voran durch kardiovaskuläre Komplikationen wie Herzinfarkt und Schlaganfall.⁵⁹

Eine spezifische Ursache für die Krankheitsentstehung lässt sich bislang nicht festmachen. Vielmehr lieferte eine Reihe von Studien experimentelle Belege für die Hypothese, dass erst das Zusammenspiel vieler Faktoren zur permanenten Stimulation des Immunsystems führt, wobei autoreaktive T- und B-Zellen sicher eine Hauptrolle spielen.^{35, 37, 95} Solche fehlgesteuerten B-Zellen richten sich beispielsweise gegen körpereigenes IgG und bilden den sogenannten Rheumafaktor (RF), der sich jedoch auch bei 5 – 30% der rheumagesunden Bevölkerung nachweisen lässt.^{10, 102} Trotzdem war der RF lange Zeit der einzige Antikörper, der in die Kriterien zur Diagnosestellung der RA eingegangen ist, obwohl man weiß, dass auch andere und vor allem spezifischere Autoantigene als IgG für die RA relevant sind. Dazu zählen BiP, Citrullin, das Sa-Antigen, Calpastatin, Kollagen und das HLA-DR Shared Epitope.¹⁰ Bei letzterem handelt es sich um bestimmte Allele der HLA-DR Region, welche für die RA genetisch prädisponieren. Über 80% der kaukasischen RA-Patienten tragen wenigstens eines dieser Allele, wobei die Krankheitsschwere mit Subtypen des Transplantationsantigens HLA-DR4 korreliert, d.h. bei homozygoten Genträgern ist eine ausgeprägt destruktive Arthritis zu erwarten.^{34,}

Diese HLA- Moleküle sind außerdem an Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung beteiligt. Bei der RA wandern Unmengen an T-Lymphozyten in die arthritischen Gelenke ein und triggern dort durch massive Sekretion pro-inflammatorischer Mediatoren wie TNF α , Interleukin (IL-)1 und IL-6 entzündliche Prozesse und lokale Gewebeschädigung, weil das fehlregulierte Immunsystem der Patienten nicht in der Lage ist, die autoreaktiven Zellen auszubremsen.¹⁰

Die daraus entstehenden sozioökonomischen Folgen der Erkrankung sind beachtlich: Unbehandelt führt die RA bei etwa der Hälfte der Patienten innerhalb von zwei Jahren zu irreversiblen Gelenkschäden, weshalb nach diesem Zeitraum knapp 20% nicht mehr in ihrem ursprünglichen Beruf beschäftigt sind. Nach weiteren 8 Jahren sind fast 50% erwerbsunfähig.^{39, 88} Allein schon aus diesem Grund ist ein zügiges therapeutisches Eingreifen unabdingbar.

Voraussetzung dafür ist, dass die Diagnose frühestmöglich gestellt wird. Um dies zu ermöglichen, wurden die Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) zur internationalen Standardisierung der Klassifikation der RA 2010 revidiert und durch die neuen ACR/EULAR Kriterien (siehe Tabelle 1) ersetzt. Ab einem Punktwert von 6 oder mehr auf einer Skala von 0 bis 10 ist ein Patient eindeutig als RA-Patient klassifiziert, wobei die definitive Diagnose von einem Rheumatologen gestellt wird. Als wichtige Neuerung fallen serologische Parameter wie ein hochpositiver Rheumafaktor und die für die Erkrankung noch spezifischeren ACPA (auch: Anti-CCP-Antikörper, Antikörper gegen zyklisches citrulliniertes Peptid) nun stärker ins Gewicht. Da diese Antikörper bereits Jahre vor der Krankheitsmanifestation in den Patientenseren nachweisbar sind, sind sie für eine frühe Diagnosestellung besonders bedeutsam. Radiologische Gelenkveränderungen hingegen, die in den Klassifikationskriterien von 1987 noch als entscheidend galten, haben als Langzeitfolge chronischer Entzündung bei etablierter RA an Bedeutung verloren.^{1, 4}

Gelenkbeteiligung	0-5
1 großes Gelenk	0
2-10 große Gelenke	1
1-3 kleine Gelenke (ungeachtet großer Gelenke)	2
4-10 kleine Gelenke (ungeachtet großer Gelenke)	3
> 10 Gelenke (darunter mindestens 1 kleines Gelenk)	5
Serologie	0-3
RF <u>und</u> ACPA negativ	0
schwach positiver RF <u>oder</u> ACPA	2
hoch positiver RF <u>oder</u> ACPA	3
Symptombdauer	0-1
< 6 Wochen	0
≥ 6 Wochen	1
Akute-Phase-Reaktion	0-1
CRP <u>und</u> BSG normal	0
CRP <u>oder</u> BSG erhöht	1

Tabelle 1: 2012 ACR/EULAR-Klassifikationskriterien für die RA ¹

Das primäre Ziel in der Therapie der RA ist den Zustand kompletter klinischer Remission zu erreichen. Als Medikamente der ersten Wahl werden dazu die sogenannten Basistherapeutika oder „disease modifying antirheumatic drugs“ (DMARDs) wie Methotrexat (MTX) oder alternativ - bei Kontraindikation, Unverträglichkeit beziehungsweise Wirkungslosigkeit von MTX - Leflunomid (LEFL) oder Sulfasalazin (SASP) eingesetzt. Stellt sich nach 3 bis 6 Monaten kein ausreichender Erfolg ein, wird die bisherige Medikation durch Biologika, die auf die spezifische Inhibition von pro-entzündlichen Zytokinen (TNF α - und IL-6-Rezeptorblockade) sowie B- und T-Lymphozyten abzielen, ergänzt. ⁸⁶

1.1.2 Psoriasisarthritis

Die Psoriasis Arthritis (PsA) zählt wie die RA zu den chronisch entzündlichen Gelenkerkrankungen. Mit einer Inzidenz von 0,05 bis 0,15% unter der Allgemeinbevölkerung tritt sie deutlich seltener auf als die RA, für Psoriasis vulgaris-Patienten ist sie jedoch von besonderer Bedeutung: 6 bis 20% entwickeln – meist etliche Jahre nach den ersten Hautsymptomen – periphere und/oder axiale Gelenkveränderungen sowie Enthesitis.⁷⁶ Vor allem für Psoriatiker mit Nagelbefall ist es wahrscheinlich im Verlauf auch an PsA zu erkranken.^{54, 55} Seltener können die Gelenkveränderungen auch schon vor der Dermatose in Erscheinung treten, bzw. die Hautbeteiligung kann sogar ganz fehlen; man spricht dann von einer Psoriasisarthritis sine psoriase.⁵⁰ Speziell in diesen Fällen ist die klinische Abgrenzung der PsA gegenüber der RA erschwert. Dennoch gibt es einige für die PsA spezifische Charakteristika, welche sie von anderen Arthropathien unterscheidet:

Das Gelenkbefallsmuster der PsA ist typischerweise asymmetrisch, das heißt die Symptome sind meist auf eine Körperhälfte beschränkt. An Händen und Füßen sind am ehesten die distalen Interphalangealgelenke betroffen, oft imponieren auch „Wurstfinger“, wenn ein kompletter Strahl im Sinne einer Daktylitis mit Enthesitis befallen ist.⁶² Bei etwa einem Viertel der Patienten kommt es zu einer Beteiligung des Achsenskeletts mit chronischer Entzündung und zunehmender Versteifung der Wirbelsäule und zu charakteristischerweise unilateraler Sakroiliitis, weshalb man die PsA zur Gruppe der Spondylarthropathien zählt.^{47, 63} Betroffene dieser Erkrankungen sind für gewöhnlich seronegativ bezüglich des Rheumafaktors und außerdem häufig Genträger von HLA-B27.^{15, 100} Röntgenaufnahmen von PsA-Gelenken illustrieren zudem die Dysregulation des Knochenstoffwechsels durch unter anderem deutliche Gelenkspaltverschmälerungen, Osteolysen, subchondrale Zysten und mitunter extensive Resorption an den Endphalangen der Finger und Zehen, was im Fachjargon als pencil-in-cup Deformität bezeichnet wird. Auch Knochenneuanbau vor allem im Bereich der Sehnenansätze zählt zu den charakteristischen röntgenologischen Auffälligkeiten bei PsA, was im Vergleich dazu für die RA völlig untypisch ist.^{48, 108}

Aufgrund des variablen Phänotyps der Erkrankung wird ähnlich wie für die RA versucht, Klassifikationskriterien zu etablieren, mit deren Hilfe möglichst viele Patienten eindeutig erfasst werden können. In aktuellen Studien werden derzeit die CASPAR-Kriterien (**CIAS**sification Criteria for **P**soriatic **AR**thritis) verwendet, da sie zum einen einfach auf die Patienten übertragbar sind und zum anderen die höchste Spezifität (98,7% versus 96,0%

der Vasey und Espinosa Kriterien) bei ausreichend hoher Sensitivität (91,4%) im Vergleich zu co-existenten Kriterien besitzen.⁹⁶

Um nach den CASPAR-Kriterien als PsA-Patient klassifiziert zu werden, muss eine entzündliche Erkrankung an Gelenken, Wirbelsäule oder Enthesen vorliegen und zusätzlich müssen mindestens 3 Punkte in den folgenden 5 Kategorien erreicht werden:

1. Psoriasis: entweder aktuell mit Befall der Haut und/oder der Kopfhaut (diagnostiziert durch einen Dermatologen oder Rheumatologen), Psoriasis in der Vorgeschichte (laut Eigenanamnese des Patienten, Hausarzt, Dermatologe, Rheumatologe oder anderweitig qualifiziertem Leistungserbringer im Gesundheitswesen) oder Psoriasis bei Verwandten 1. oder 2. Grades (laut Patientenbericht)
2. Psoriatische Nageldystrophie mit Onycholysen, Tüpfelnägeln und Hyperkeratosen in der aktuellen körperlichen Untersuchung
3. Negativer Rheumafaktor
4. Daktylitis (im Sinne von Schwellung eines kompletten Fingers): entweder aktuell oder in der Vorgeschichte durch einen Rheumatologen erfasst
5. Juxtaartikuläre Knochenneubildung im konventionellen Röntgen von Hand oder Fuß (jedoch keine Osteophyten!)

Das aktuelle Vorliegen einer Psoriasis wird dabei mit 2 Punkten bewertet, alle anderen Merkmale mit einem Punkt.

In der Pathogenese der PsA scheinen anders als bei der RA autoreaktive B-Zellen keine allzu große Rolle zu spielen, da spezifische Antikörper gegen körpereigene Proteine wie der RF oder ACPA in der Regel fehlen. Es existieren zwar einige Antikörper gegen nukleäre Antigene, Zytokeratine und Hitze-Schock-Proteine, die für eine gewisse humorale Komponente in der Krankheitsentstehung sprechen, jedoch ist ihre Funktion noch weitgehend ungeklärt.^{22, 46} Daher wird die Erkrankung weniger als autoimmun vermittelt eingestuft, sondern vielmehr als vorwiegend T-Zell- mediiert verstanden: Unter dem Einfluss von Produkten dendritischer Zellen differenzieren naive CD4+ T-Zellen (vermittelt durch IL-12) zum einen zu Th1-Zellen, welche zahlreiche proinflammatorische Zytokine, allen voran TNF α , produzieren. Daneben induziert IL-23, ein ebenfalls von dendritischen Zellen ausgeschütteter Botenstoff, die Differenzierung von CD4+ Zellen zu Th17 T-Zellen, welche auch TNF α und außerdem IL-17 und IL-22 produzieren. Eine Reihe von Studien

zeigt für alle genannten Zytokine erhöhte Levels in Serum und Synovialflüssigkeit von PsA- Patienten und nicht zuletzt der immense Erfolg von Inhibitoren dieser entzündungsfördernden Mediatoren in der PsA-Therapie belegt ihre zentrale Rolle in der Pathogenese der Krankheit.^{60, 61, 69, 101}

1.1.3 Osteoarthritis

Osteoarthritis, im allgemeinen Sprachgebrauch besser bekannt als Arthrose, ist die letzte der in dieser Arbeit betrachteten Gelenkerkrankungen und gleichzeitig die häufigste überhaupt. 10 bis 15% der Weltbevölkerung leiden an OA, vor allem mit dem Alter steigt die Inzidenz stark an – bei den über 65-Jährigen beträgt sie mehr als 60%.⁵⁸

Grundsätzlich kann jedes Gelenk von arthrotischen Veränderungen betroffen sein. In Deutschland ist die häufigste Lokalisation das Kniegelenk.⁹⁰

Die Patienten berichten typischerweise vom sogenannten „Startschmerz“ zu Beginn der körperlichen Belastung, in fortgeschrittenen Stadien auch von Dauerschmerzen mit rascher Ermüdbarkeit unter Bewegung bis hin zum Ruheschmerz.^{16, 45} Als weitere häufige klinische Symptome treten Gelenkergüsse im Rahmen der aktivierten Arthrose (entzündliche OA) auf, sowie Deformationen und Fehlstellungen der Gelenke, resultierend in Funktionseinbußen. Daneben lassen sich oft schon frühzeitig Krepitationen durch zunehmende Unebenheiten der Knorpeloberfläche bei passiver Bewegung tasten.¹⁶

Auf Grund ihrer Häufigkeit und erheblichen sowohl physischen als auch psychischen Morbidität gilt die OA als eine der führenden Ursachen für Arbeitsunfähigkeit, womit sie einen großen, stetig wachsenden Kostenfaktor für das Gesundheitssystem darstellt.⁷¹

Umso wichtiger ist es deshalb, ihre Pathogenese möglichst vollständig zu explorieren, so dass neue Therapieansätze entwickelt werden können, um in das Krankheitsgeschehen einzugreifen.

Das strukturelle Korrelat der OA stellt im Wesentlichen die Zerstörung des Gelenkknorpels dar, wofür in erster Linie eine Imbalance zwischen katabolen und anabolen Mechanismen im Knorpelumbau durch Chondrozyten verantwortlich ist. Dabei werden zunächst Kollagenfibrillen demaskiert, später fasert sich der Knorpel auf bis er praktisch vollständig abgebaut ist und der Knochen frei liegt. Man spricht in diesem Endstadium auch von der sogenannten „Knorpelglätze“.^{33, 98} An den Gelenkrändern kommt es zur Bildung von Osteophyten, die auch radiologisch nachgewiesen werden können. Gleiches gilt für „Geröllzysten“, die durch fokale Knochennekrosen entstehen. Solche röntgenologische

Arthrosezeichen müssen allerdings nicht zwangsweise mit der Klinik korrelieren, d. h. ein ausgeprägter Befund im Röntgen kann durchaus mit geringer Symptomatik (Schmerzen) einhergehen und umgekehrt.¹⁶

Betrachtet man die pathophysiologischen Vorgänge am Gelenk auf zellulärer und molekularer Ebene, stellt man fest, dass in der Synovialflüssigkeit der OA - anders als bei den klassischen entzündlichen Arthropathien RA und PsA - die typische Neutrophilenvermehrung fehlt. Dennoch lassen sich bei sekundär aktivierter Arthrose synoviale B- und T- Zellinfiltrate mit Überexpression proinflammatorischer Mediatoren und kataboler Enzyme nachweisen. Wie genau dabei die Chondrozytenfunktion aus dem Gleichgewicht gerät, ist noch nicht abschließend geklärt. Jedenfalls produzieren diese Zellen und mitunter auch aktivierte Synoviozyten und Makrophagen während der Synovitis proentzündliche Zytokine wie IL-1 β und TNF α , die ihrerseits wiederum die PGE₂- (Prostaglandin E₂) und NO-Synthese stimulieren. IL-1 ist außerdem für die Induktion von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und Aggrecanasen, sowie weiterer kataboler Gene verantwortlich.⁴⁰

Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen placebokontrollierter Studien bereits therapeutische Versuche mit intraartikulären Anakinra-Injektionen (einem humanisierten Interleukin-1-Rezeptorantagonisten, der zum Beispiel zur Behandlung der RA zugelassen ist) bei Arthrosepatienten unternommen, welche – gemessen an Schmerz- und Steifigkeitsskalen – zwar in Abhängigkeit von der verwendeten Dosis (50mg oder 150mg) Wirkung zeigten, jedoch hielt die Symptomlinderung nicht länger als einen Monat an.²⁸ Auch krankheitsmodifizierende Medikamente wie in der RA und PsA fanden noch keinen Einzug in die Therapie der OA.⁷¹ Als fester Bestandteil der medikamentösen Arthrosetherapie hingegen werden nach wie vor Paracetamol (zur reinen Analgesie) und NSAR, bzw. in Einzelfällen bei Aktivierung auch Glukokortikoide intraartikulär eingesetzt.

110

In fortgeschrittenen Stadien ist eine operative Therapie allerdings meist unumgänglich, nicht umsonst rangieren laut Gesundheitsberichterstattung des Bundes arthroskopische Gelenkoperationen (Platz 2) und der künstliche Gelenkersatz von Hüfte und Knie (Plätze 7 und 18) unter den häufigsten Eingriffen, die in Deutschland durchgeführt werden.⁹²

1.2 Interleukin-1 Familie

1.2.1 Biologische Aktivität

Die Zytokine der Interleukin-1 (IL-1)–Familie sind eine Gruppe von Signalmolekülen, mit denen sich die Zellen der Immunantwort koordinieren: Bei lokalen Entzündungsreaktionen aktivieren sie Endothelzellen und Lymphozyten, außerdem triggern sie systemische Reaktionen wie Fieber, Hypotonie und Akute-Phase-Reaktion und übernehmen damit eine zentrale Rolle bei der Infektionsabwehr.²⁹ Entsprechend wurde IL-1, als es in den 1970er Jahren entdeckt wurde, zunächst als lymphozyten-aktivierender Faktor (LAF) oder leukozytäres Pyrogen (LP) bezeichnet.³¹ Heute weiß man, dass neben B-Lymphozyten⁵² und NK-Zellen⁷⁷ auch Makrophagen,⁶⁴ Monozyten,⁶⁶ Fibroblasten,⁷⁸ dendritische¹⁰⁶ und Epithelzellen²⁹ für die IL-1- Produktion verantwortlich sind.

1.2.2 Nomenklatur

Während die ursprüngliche IL-1 Familie nur aus den beiden Isoformen IL-1 α und IL-1 β und ihrem gemeinsamen Antagonisten IL-1Ra bestand, welche 450kb auf Chromosom 2q14–q21 umspannen, sind mittlerweile 11 Mitglieder (IL-1 family members, IL-1Fx) bekannt, die nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung beziffert wurden (IL-1, IL-18, IL-33, IL-36, IL-37 und IL-38, bzw. IL-1F1 bis IL-1F11).^{81, 82, 93}

Name	Familienna me	Weiterer Name	Rezeptor	Co- Rezeptor	Eigenschaft	Chromosomale Lokation
IL-1 α	IL-1F1		IL-1RI	IL-1RAcP	proentzündlich	2q14
IL-1 β	IL-1F2		IL-1RI	IL-1RAcP	proentzündlich	2q14
IL-1Ra	IL-1F3		IL-1RI		Antagonist zu IL-1 α und IL-1 β , anti- entzündlich	2q14.2
IL-18	IL-1F4	IFN- γ - induzier- ender Faktor	IL-18R α	IL-18R β	proentzündlich	2q23.1
IL- 36Ra	IL-1F5	FIL1 δ	IL-36R		Antagonist zu IL-36 α , IL-36 β und IL-36 γ	2q14
IL-36 α	IL-1F6	FIL-1 ϵ	IL-36R	IL-1RAcP	proentzündlich	2q12 - q14.1
IL-37	IL-1F7	IL-1H4, IL-1 ζ	IL-18R α ?		anti- entzündlich	2q12 – q14.1
IL-36 β	IL-1F8	IL-1H2	IL-36R	IL-1RAcP	proentzündlich	2q14
IL-36 γ	IL1-F9	IL-1 ϵ	IL-36R	IL-1RAcP	proentzündlich	2q12 – q21
IL-38	IL-1F10	IL-1Hy2	IL-36R		Antagonist zu IL-36 α , IL-36 β und IL-36 γ	2q13
IL-33	IL-1F11		ST2	IL-1RAcP	Th2 Antwort, proentzündlich	9p24.1

Tabelle 2: IL-1 Familie, adaptiert nach Dinarello, Sims, Yuan und Zhao et al.^{29, 79, 82, 99, 109, 111}

Genauso weitete sich auch die IL-1 Rezeptor-Familie auf inzwischen 10 verschiedene Gene aus, die auch für Co-Rezeptoren, Bindeproteine, Decoy- und inhibitorische Rezeptoren kodieren.¹⁹

1.2.3 Signaltransduktion

Ein komplexes System aus IL-1 Familienmitgliedern und ihren Rezeptoren reguliert gleichsam ihre Expression und Funktion. Im Folgenden wird der Mechanismus der Signaltransduktion für IL-1 β dargestellt, dem, wie wir später sehen werden, das Signaling der kürzlich entdeckten Zytokine IL-36 α , - β und - γ stark ähnelt:

IL-1 β bindet an den membranständigen IL-1 Rezeptor Typ I (IL-1RI), der auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert wird, wodurch die Rekrutierung des Co-Rezeptors IL-1 Rezeptor Akzessorisches Protein (IL-1RAcP) getriggert wird. Außerdem gibt es noch einen zweiten Rezeptor für IL-1 β , IL-1 Rezeptor Typ II (IL-1RII), der zwar mit IL-1RI um das Zytokin konkurriert, aber nicht an der Signalübertragung beteiligt ist und daher als Decoy-Rezeptor bezeichnet wird.³⁰ Bildet sich ein sogenannter „aktiver Signaling Komplex“ aus IL-1, IL-1RI und IL-1RAcP wird die intrazelluläre Signaltransduktion über die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) - Kaskade in Gang gesetzt, wodurch die Translokation verschiedener Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, AP-1 und CCAAT/enhancer- binding Protein (C/EBP) in den Zellkern vermittelt wird.^{24, 70, 111}

IL-1Ra, der natürliche Antagonist von IL-1, bindet ebenfalls sowohl IL-1RI als auch IL-1RII, jedoch verhindert er das Andocken des akzessorischen Proteins (IL-1RAcP) und damit die Signalübertragung.^{30, 43}

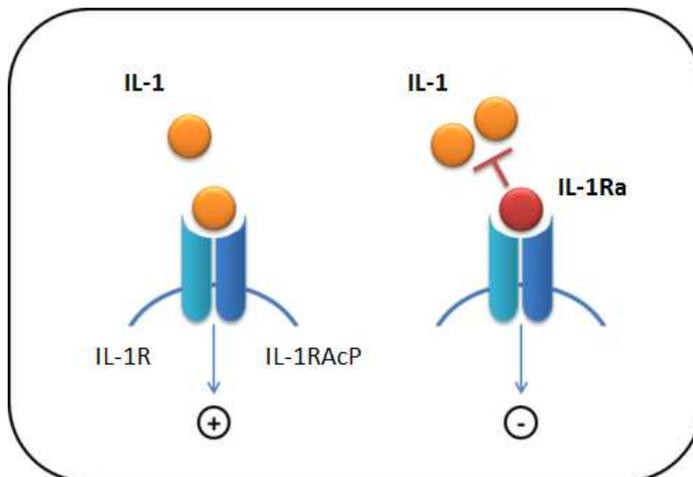


Abbildung 1: Signaltransduktion von IL-1 durch IL-1R und IL-1RAcP. IL-1Ra verhält sich gegenüber IL-1 als kompetitiver Antagonist am IL-1R und verhindert die Anlagerung von IL-1RAcP und damit die Signalübertragung.

1.2.4 IL-1 in RA und klinische Bedeutung

Während das Immunsystem mit Hilfe seiner Botenstoffe einerseits dazu beiträgt vor Infektionen zu schützen, kann es andererseits versehentlich auch körpereigene Zellen angreifen, wodurch Autoimmunerkrankungen, wie die in 1.1.1 vorgestellte rheumatoide Arthritis, entstehen. Bei RA- Patienten lassen sich erhöhte Serum-Level von IL-1 nachweisen, deren Höhe mit Krankheitsprogress und –schweregrad korreliert.³² In den Gelenken lagert sich IL-1 in Chondrozyten ab, die zur Sekretion von MMPs und Aggrecanasen (analog zur aktiven OA, vergleiche 1.1.3) angeregt werden, wodurch die umliegende Knorpelmatrix zerstört wird. Außerdem stimuliert IL-1 die Differenzierung Makrophagen zu Osteoklasten und aktiviert synoviale Fibroblasten, die bei der RA den sogenannten Pannus bilden, welcher die durch Osteoklasten- und Chondrozytenaktivität lädierten Spalträume überwuchert und bei fortgeschrittener Erkrankung für Funktionseinbußen wesentlich verantwortlich ist.⁸⁷

Entsprechend werden in der Therapie der RA mittlerweile standardmäßig, beziehungsweise im Rahmen klinischer Studien, Medikamente eingesetzt, die dem proentzündlichen und destruktiven Effekt von proinflammatorischen Zytokinen entgegenwirken. Mit dem rekombinanten IL-1Ra Anakinra können Patienten mit moderater bis schwerer RA behandelt werden, welche kein Ansprechen auf die konventionelle Therapie mit DMARDs zeigen.²⁶ Bei relativ guter Verträglichkeit kann Anakinra das Fortschreiten radiologischer Gelenkveränderungen verzögern, nichtsdestotrotz sind TNF α -Blocker hinsichtlich ihrer Wirksamkeit überlegen.⁸³ Obwohl der Einsatz von Biologika die Therapie der RA gewissermaßen revolutioniert hat, gibt es auch unter diesen Medikamenten Therapieversager. Ziel der Forschung ist daher, weitere für die RA bedeutsame Zytokine ausfindig zu machen, gegen die neue, potente Inhibitoren entwickelt werden können.

1.3 Interleukin-36-Zytokinfamilie

Die zuletzt beschriebenen Mitglieder der IL-1-Familie, IL-1F5 bis IL-1F9, werden aufgrund ihrer Gemeinsamkeiten bezüglich Struktur und Funktion als eigenständige Zytokinfamilie zusammengefasst und mittlerweile als IL-36Ra (F5), IL-36 α (F6), IL-36 β (F8) und IL-36 γ (F9) bezeichnet (siehe 1.2.2 Tabelle: IL-1 Familie). IL-1F7, heute IL-37 genannt, wurde zwar etwa zeitgleich mit eben genannten Zytokinen entdeckt, zählt aber nicht zur IL-36-Familie.¹⁴

Aufgrund ausgeprägter struktureller Ähnlichkeiten mit den ursprünglichen IL-1-Zytokinen wird die neue IL-36-Familie dennoch als der IL-1-Superfamilie untergeordnete Subgruppe gehandelt. Die Aminosäuresequenzen von IL-36 α , -36 β und -36 γ stimmen zu 21 - 37% mit denen von IL-1 und IL-1Ra überein¹⁰⁴, während die beiden Isoformen von IL-1, also IL-1 α und IL1 β , im Vergleich dazu nur zu 22% sequenzhomolog sind.²¹ Die Antagonisten IL-36Ra und IL-1Ra gleichen sich in ihrer β -Faltblattstruktur sogar zu 52%, weshalb vermutet wird, dass IL-36Ra als endogener Rezeptorantagonist agiert.¹⁰⁴

Auch die Signaltransduktion von IL-36 verläuft analog zu der von IL-1 β . Sie wird im Folgenden für IL-36 α illustriert, da sich die vorliegende Arbeit speziell mit Expression und Funktion dieses Zytokins beschäftigt: IL-36 α bindet an seinen Rezeptor IL-36R (alte Bezeichnung: IL1RL2/IL1Rrp2), der, wie der IL-1-Rezeptor (IL-1R/IL-1RI), zunächst mit IL-1RAcP einen heterodimeren Komplex ausbildet, damit die NF- κ B-Signalkaskade via MAPKs aktiviert werden kann. IL-36Ra übernimmt analog zu IL-1Ra die Rolle des kompetitiven Antagonisten um IL-36R und verhindert gleichermaßen die Anlagerung des Co-Rezeptors IL-1RAcP und damit die Signalübertragung.⁹⁷

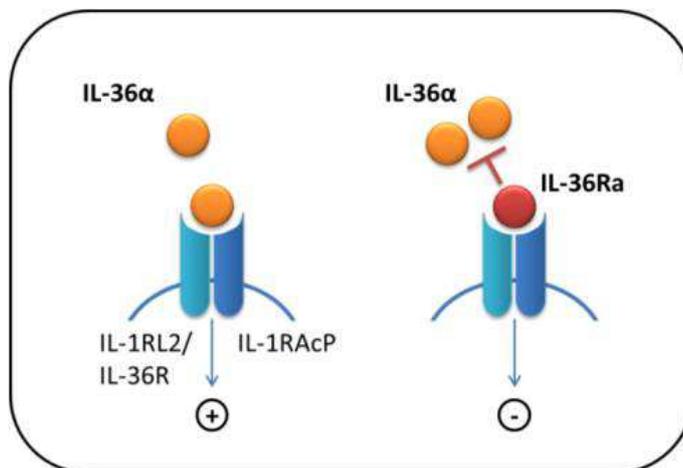


Abbildung 2: Signaltransduktion von IL-36 α durch IL-36R und IL-1RAcP. IL-36Ra verhält sich gegenüber IL-36 α als kompetitiver Antagonist am IL-36R und verhindert die Signalübertragung(rechts).

Über das Expressionsverhalten des neu entdeckten Zytokins ist bislang nur wenig bekannt. IL-36 α scheint jedenfalls deutlich rarer exprimiert zu werden als sein Rezeptor IL-36R, wobei IL-36 α mRNA bisher in Leukozyten, epithelialen Geweben und Keratinozyten nachgewiesen wurde.⁸⁵ IL-36R wird vorwiegend von Stromazellen wie Fibroblasten, aber

auch von Keratinozyten, dendritischen Zellen und T-Lymphozyten exprimiert.^{56, 104}

Aktuellen Studien zufolge ist IL-36 α für die Pathogenese der Psoriasis bedeutsam: Blumberg et al transplantierten Haut von Schuppenflechtepatienten auf immundefiziente Mäuse und konnten zeigen, dass die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-17A und IL-23, welche im Entzündungsgeschehen der Psoriasis eine wesentliche Rolle spielen, von IL-36 α induziert werden, beziehungsweise auch umgekehrt die IL-36 α -Produktion im Mausmodell stimulieren. Durch IL-36-Rezeptorblockade bildeten sich die plaqueartigen Läsionen in der Mäusehaut zurück, was für die Zukunft auch auf eine neue Behandlungsmöglichkeit der humanen Psoriasis hoffen lässt.¹²

Vigne et al fanden außerdem heraus, dass die IL-36-Zytokine die Produktion weiterer pro-inflammatorischer Botenstoffe wie IL-1 β , IL-6 und IL-12 durch dendritische Zellen, sowie IFN γ und IL-4 durch T-Helferzellen in höherem Ausmaß als andere Zytokine aus der IL-1-Familie stimulieren. Darüber hinaus konnte in In-vitro-Assays bei 100- bis 1000-fachem molarem Überschuss von IL-36Ra eben diese Zytokininduktion unterdrückt werden, was nochmals die Rolle von IL-36Ra als anti-entzündlicher Gegenspieler illustriert.¹⁰⁴

Dazu passend wurde in neun tunesischen Familien mit autosomal-rezessiv vererbter Psoriasis pustulosa generalisata eine homozygote missense-Mutation im IL-36Rn-Gen festgestellt, die eine verminderte Expression von IL-36Ra - mit zudem funktionellen Einbußen - zur Folge hat. Entsprechend produzieren die Keratinozyten der Patienten übermäßig viel an pro-inflammatorischen Zytokinen, durch die der generalisierte Hautausschlag mit disseminierten Pusteln ausgelöst wird.⁵⁷

1.4 Fragestellung/ Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die proinflammatorischen Eigenschaften des kürzlich entdeckten Zytokins IL-36 α und seine pathogene Funktion in der Psoriasis wurden in 1.3 beschrieben. Bei sowohl der Entstehung der Plaques als auch der entzündlichen Gelenkbeteiligung spielen außerdem Zytokine wie IL-1, TNF α und IL-17 eine entscheidende Rolle.^{41, 68, 73} Dank des Wissens um den Einfluss dieser Entzündungsmediatoren in chronischen autoimmun vermittelten Erkrankungen wie der Psoriasis, der PsA und der RA, kann ein Großteil der Patienten seit knapp zwei Jahrzehnten von Therapien, die auf Zytokininhibition abzielen, profitieren.¹⁰⁷ Dennoch verbleiben genügend Patienten, deren Beschwerden sich trotz dieser modernen Therapieformen nicht zurückbilden. Aus diesem Grund muss die Pathogenese der Krankheiten weiter erforscht werden, um das komplexe Zusammenspiel zwischen Zytokinen und Effektorzellen besser begreifen und, darauf aufbauend, neue Therapieoptionen ausschöpfen zu können.

Da in kürzlich veröffentlichten Studien (siehe 1.3) gezeigt wurde, dass IL-36 α und IL-36Ra für die Krankheitsentstehung und auch den Ausprägungsgrad der Psoriasis von Bedeutung sind, ist Ziel der vorliegenden Arbeit, die Expression von IL-36-Familienmitgliedern im Synovium entzündlicher Gelenkerkrankungen zu untersuchen. Dementsprechend sollen im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

1. Sind IL-36 α , IL-36Ra und IL-36R im Synovium von Psoriasisarthritis Patienten exprimiert?
2. Zeigt sich bei PsA-Patienten im Vergleich zu Patienten mit rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis ein anderes Expressionsverhalten von IL-36 α ?
3. Welche Zellen exprimieren IL-36 α ?

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patientenmaterial

In drei verschiedenen europäischen Zentren (Academic Medical Center Amsterdam, Universitätsklinikum Pavia und Universitätsklinikum Erlangen-Nürnberg) wurde Patienten mit RA (n=29), PsA (n=17) und OA (n=22) – nach entsprechender Aufklärung und schriftlicher Einwilligung – Synovialgewebe aus Kniegelenken entnommen, wobei die italienischen Patienten Ultraschall-gesteuert biopsiert und die niederländischen arthroskopiert wurden und den deutschen Patienten Synovium im Rahmen von Knieendoprothesenimplantationen entnommen wurde. Die Patienten erfüllten die CASPAR- Kriterien (PsA) (Taylor et al. 2006) beziehungsweise die Kriterien des ACR zur Klassifikation der RA (Arnett et al. 1988) und entsprechende Kriterien für die OA (Altman et al. 1986).^{2, 4, 96}

Tonsillengewebe, das vor allem in den Etablierungsphasen als Kontrollpräparat mitgefärbt wurde, stammte aus der HNO- Klinik Erlangen. Alle Proben wurden in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet, ihre Verwendung für die Forschung wurde von den jeweiligen Ethikkommissionen genehmigt.

Die nachfolgende Tabelle beschreibt die Patientencharakteristika nach Geschlecht, Alter und Entzündungsaktivität (CRP-Level) zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme, Krankheitsdauer, Therapie mit DMARDs und Steroiden sowie Art der Gewebegewinnung. Der p-Wert wurde für die Parameter Alter, CRP-Level und Steroid-Medikation nach Mann-Whitney mit der GraphPad Prism 4 Software berechnet. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden ab einem p-Wert von weniger als 0,05 als signifikant gewertet.

	RA	PsA	OA	p-Wert
Patienten (n)	29	17	22	
Geschlecht (m/w (% weiblich))	9/20 (69)	8/14 (64)	9/8 (47)	
Alter (Jahre)	58	46	73	0.003 (RA vs. PsA)
Krankheitsdauer (Monate)	47	32	Unbekannt	Ns
CRP (mg/L)	15,2	3,4	7,9	0.0007 (RA vs. PsA/OA)
DMARDs (%)				
keine	28	47	N/A	Ns
MTX	55	32	N/A	Ns
SASP	17	11	N/A	Ns
LEFL	10	0	N/A	
Steroide (%)	52	5	N/A	0.001 (RA vs. PsA)
Form der Gewebegewinnung (n)				
Arthroskopie	14	7	-	
US-gesteuerte Biopsie	9	10	-	
Endoprothese	6	-	22	

Tabelle 3: Patientencharakteristika

2.2 Material

2.2.1 Laborgeräte und Hilfsmittel

<u>Laborgerät/Hilfsmittel</u>	<u>Firma</u>
Brutschrank	Heraeus
Floureszenzmikroskop Eclipse 80i	Nikon
Lichtmikroskop Eclipse 55i	Nikon
Mikroliterpipetten	Gilson, Nichiryo
Wasserbad WNB7	Memmert

2.2.2 Pufferlösungen

10 x PBS: bestehend aus 80g NaCl, 2g KCl, 2,4g KHPO₄ und 16g Na₂HPO₄ x 2H₂O. Der Puffer wurde zur Anwendung 1:10 mit dH₂O verdünnt.

TBS Tween (TBST): 10x TBS Puffer wurde aus 876,6g NaCl, 121,1g Tris und 40ml HCl angemischt und auf pH 8 eingestellt. Zum Gebrauch wurde die 10x Lösung 1:10 mit dH₂O verdünnt und 0,05% Tween wurde zugegeben.

Citratpuffer: Zur Herstellung des Citratpuffers wurden zu 800ml dH₂O 2,01g Citronensäure-Monohydrat zugegeben. Anschließend wurde der pH-Wert mit Hilfe von etwa 4-5 NaOH Pellets auf pH 6 eingestellt und das Volumen mit dH₂O auf 1000ml aufgefüllt.

2.2.3 Primäre Antikörper

1° Antikörper	Hersteller und Klon	Quelle	Arbeitskonzentration
CD138	AbD Serotec	Maus monoklonal	1 µg/ml
CD3	Abcam	Maus monoklonal	1:10
CD3	Linaris	Maus monoklonal	1:20
CD4	Dako	Maus monoklonal	1:20 – 1:40
CD20cy	Dako, Klon L26, MO755	Maus monoklonal	1:200
CD68	Dako, Klon PG-M1	Maus monoklonal	1 µg/ml
IL-36α	Atlasantibodies	Kaninchen monoklonal	1-2,5 µg/ml
IL-36R	Atlasantibodies	Kaninchen monoklonal	1 µg/ml
IL-36Ra	Atlasantibodies	Kaninchen monoklonal	1 µg/ml

Tabelle 4: Primäre Antikörper für IHC

Als Isotypkontrollen wurden Maus (Dako) und Kaninchen (Vector) verwendet.

2.2.4 Sekundäre Antikörper

2° Antikörper	Hersteller und Klon	Quelle	Verdünnung
Maus Alexa 488	Invitrogen	Ziege	1:500
Maus biotinyliert	Vector, BA9200	Ziege	1:200
Maus Cy3	Jackson Lab	Kaninchen	1:200
Kaninchen biotinyliert	Vector, BA5000	Ziege	1:200

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper für IHC

2.2.5 Färbesubstrate

<u>Färbesubstrat</u>	<u>Firma</u>
<u>Peroxidase-Substrate</u>	
Histogreen	Linaris
DAB	Dako
ImmPACT DAB	Vektor
ImmPACT VIP	Vektor
<u>Floureszenz</u>	
DAPI	Vector
Streptavidin-APC, 1:600	Biolegend

2.3 Methoden

2.3.1 Gewebepreparation

Die Gewebeproben wurden 24 Stunden lang bei Raumtemperatur in 4%-igem Formalin inkubiert und anschließend in 70% Ethanol überführt, um den Fixierungsprozess hinauszuzögern. Nach ihrer Einbettung in Paraffin wurden sie von den medizinisch-technischen Assistenten mit dem Mikrotom 3 - 5 µm dünn geschnitten und je zwei solcher Gewebeschnitte, von denen später jeweils einer angefärbt und der andere als Isotypkontrolle mitgeführt wurde, wurden nebeneinander auf einen Objektträger aufgebracht.

2.3.2 Immunhistochemie (IHC)

Die Expression von IL-36 α , IL-36 β und IL-36R wurde mittels Immunhistochemie (IHC) in den Patientensynovia untersucht. Als Kontrollpräparat diente Tonsillengewebe, welches sich bereits in unseren ersten Testfärbungen erfolgreich für IL-36R anfärben ließ und daher in allen Versuchen mitgefärbt wurde.

Das Prinzip der IHC beruht auf der spezifischen Erkennung von Antigenen durch Antikörper und der anschließenden Verstärkung des Signals durch weitere Brückenantikörper, die beispielsweise mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Enzymen markiert sind, um schließlich das Antigen mittels einer Farbreaktion sichtbar zu machen. Daneben besteht auch die Möglichkeit ein Antigen durch die Bindung nur eines einzigen enzym- oder fluoreszenzmarkierten Antikörpers direkt nachzuweisen, jedoch auf Kosten der Sensitivität. Daher wurde in dem im nächsten Abschnitt folgenden Protokoll für die Einzelfärbungen die zuerst beschriebene indirekte Methode angewandt, bei der ein unmarkierter primärer Antikörper das relevante Antigen bindet und anschließend selbst an seinem Fc-Fragment von einem zweiten markierten Antikörper (Sekundärantikörper) gebunden wird, welcher für die Nachweisreaktion verantwortlich ist.⁷⁵

2.3.2.1 Einzelfärbung für Lichtmikroskopie

Protokoll für DAB

Zur Reduzierung späterer Hintergrundfärbung und Überdeckung spezifisch gefärbter Zellen wurden die Objektträger zunächst im Brutschrank bei 60°C 40 Minuten lang erhitzt, um das Paraffin abzuschmelzen, und durchliefen im Anschluss die Alkoholreihe durch:

Xylol	2 x 5 min
Isopropanol abs.	2 x 2 min
Isopropanol 96%	2 x 2 min
Isopropanol 70%	2 x 2 min

Nach zweimaligem Waschen in TBST wurde die endogene Peroxidase durch H₂O₂ (5%) und Methanol (95%) blockiert. Darauf folgte ein weiterer Waschschrift in TBST, bevor die Schnitte im Wasserbad bei 90°C mit Citratpuffer (0,01M, pH 6) 20 Minuten lang behandelt wurden, um die relevanten Antigene zu exponieren. Damit unspezifische Proteinbindungen verhindert wurden, wurde im nächsten Schritt 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 2,5%igem Serum der Spezies, aus der der sekundäre Antikörper

gewonnen wurde, TBST und Avidin (1 Tropfen/ml) geblockt. Schließlich wurde der jeweilige primäre Antikörper in 2,5% Serum, TBST und Biotin auf die Gewebeschnitte pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag folgte nach zweimaligem Waschen in TBST die 30-minütige Behandlung mit dem sekundären Antikörper (in 2,5% Serum, TBST), danach wurde wieder gewaschen und dann eine weitere halbe Stunde mit Vector ABC (Vector) inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend noch einmal in TBST gewaschen, bevor sie in 3,3'-diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-dihydrat (DAB) unter dem Lichtmikroskop entwickelt wurden, bis sich eine braune Färbung zeigte, maximal jedoch 5 Minuten. Danach wurden die Schnitte in destilliertes Wasser gegeben und schließlich mit Hämalun nach Mayer gegengefärbt (20 Sekunden) und mit Leitungswasser nachgebläut. Zum Schluss durchliefen die Schnitte die Alkoholreihe zum Zweck der Entwässerung in umgekehrter Reihenfolge:

Isopropanol 70% 1 x 2 min

Isopropanol 96% 2 x 2 min

Isopropanol abs. 2 x 2 min,

wurden in Xylol gereinigt und schließlich eingedeckelt.

Eine alternative, zeitsparende Möglichkeit im Protokoll des zweiten Tages bot das ImmPress Kit (Vector), das den Inkubationsschritt mit dem sekundären Antikörper ersetzte. Anschließend wurden die Gewebeschnitte ebenfalls in TBST gewaschen und darauf mit ImmPact DAB (Vector) bis zu 5 Minuten lang entwickelt. Alle weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

In Hinblick auf die späteren Doppelfärbungen wurden zwei weitere Peroxidasesubstrate, Histogreen und VIP, zunächst als Einzelfärbung ausgetestet.

Protokoll für Histogreen

Das Protokoll entsprach im Wesentlichen dem für die DAB-Färbung, jedoch entfiel der Peroxidaseblock nach der Deparaffinisierung. Am zweiten Tag wurde vor der eigentlichen Färbung statt in TBST in PBS gewaschen und danach in TBS, pH 7,2, umgepuffert. Beim Entwickeln war zu beachten, dass das H₂O₂ dem Reagenz erst unmittelbar vor dem Pipettieren zugegeben werden durfte. Anschließend wurde erneut in TBS gewaschen und wie oben beschrieben weiter verfahren. Eingedeckt wurden die Schnitte ausschließlich in Isopropanol 100% (3 x 30 Sekunden) und zuletzt wurden sie in Xylol gereinigt und

eingedeckelt.

Protokoll für VIP

Alle Schritte wurden praktisch analog zum DAB-Protokoll durchgeführt, lediglich der Peroxidaseblock konnte wieder weggelassen werden.

2.3.2.2 Doppelfärbung für Lichtmikroskopie

Das Protokoll folgte am ersten Tag dem der Einzelfärbung, wobei als primärer Antikörper rabbit anti huIL-36 α verwendet wurde, um die Expression von IL-36 α darzustellen. Am zweiten Tag wurde zweimal in TBST gewaschen, bevor die Schnitte eine halbe Stunde lang mit dem ImmPress Kit (Vector) behandelt wurden. Nach erneutem Waschen wurde mit DAB gefärbt, anschließend wurden die Objektträger für 5 Minuten in dH₂O überführt.

Im zweiten Teil der Färbung wurde zunächst wieder dem Ausbilden unspezifischer Proteinbindungen mit TBST, 2,5%-igem Serum der Spezies, aus der der sekundäre Antikörper gewonnen wurde, und Avidin entgegengewirkt. Nach 5-minütigem Waschen in TBST wurde dann ein primärer Antikörper (mouse anti huCD20cy oder mouse anti huCD68) für 30 Minuten bei Raumtemperatur zugegeben. Nachdem dieser wieder abgewaschen war, wurde wie im obigen Protokoll der entsprechende sekundäre Antikörper auf die Gewebeschnitte pipettiert, anschließend in TBST gewaschen und mit Vector ABC inkubiert, bevor die Färbung mit VIP erfolgte. Um die durch VIP violett gefärbten Strukturen einwandfrei darzustellen, wurde diesmal nicht mit dem ähnlich bläulich-violetten Hämalaun gegengefärbt, sondern die Objektträger durchliefen direkt die Alkoholreihe von 70% Isopropanol, über 96% zu 100% und wurden in Xylol gereinigt und schließlich eingedeckelt.

2.3.2.3 Doppelfärbung für Fluoreszenzmikroskopie

Wie bereits mehrfach beschrieben wurden die Objektträger auch für die Immunfluoreszenz im Brutschrank abgeschmolzen, deparaffiniert und im Citratpuffer ins Wasserbad überführt. Nach dem Abkühlen und Waschen in dH₂O und TBST folgte der unspezifische Block mit TBST und diesmal 5%-igem Hasenserum und Avidin. 30 Minuten später wurde erneut gewaschen, anschließend wurde der primäre Antikörper (rabbit anti huIL-36 α , rabbit anti huIL-36 β oder rabbit anti huIL-36 γ) inklusive Biotinblock auf die

Gewebeschnitte pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger in TBST gewaschen, bevor der biotinylierte sekundäre Antikörper (goat anti rabbit, 1:200, Vector) für eine halbe Stunde aufgetragen wurde. Danach wurde wieder gewaschen und schließlich mit dem Fluoreszenzmarker Cy3 30 Minuten lang in der Dunkelkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Auch im folgenden Teil der Färbung musste darauf geachtet werden, die Objektträger mit den Gewebeschnitten stets vom Tageslicht abzuschirmen, damit der fluoreszierende Farbstoff nicht verblasste. Um die Ausbildung von unspezifischen Proteinbindungen zu verhindern, wurde wie zuvor TBST, 5%-iges Ziegen Serum und Avidin auf die Schnitte aufgetragen, anschließend wurde gewaschen und dann der zweite primäre Antikörper (mouse anti huCD20cy, mouse anti huCD68, mouse anti huCD138, mouse anti huCD3 oder mouse anti huCD4) mit Biotinblock 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen in TBST (2 x 5 Minuten) wurden die Gewebe, versetzt mit Alexa 488 in 2,5%-igem Ziegen Serum 1:500 verdünnt, wieder eine halbe Stunde in der Dunkelkammer belassen. Anschließend wurden sie ein letztes Mal in TBST gewaschen und nach Zugabe von je einem Tropfen DAPI eingedeckelt.

Zur Beurteilung der Fluoreszenzfärbung wurde das Mikroskop Eclipse 80i der Firma Nikon verwendet. Bilder wurden an diesem Mikroskop sowohl für die Fluoreszenz- als auch für die Chromogenfärbungen mit dem Programm NIS-Elements 3.1 aufgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Einzelfärbungen

Das Expressionsverhalten von IL-36 α wurde im Synovium von PsA-, RA- und OA-Patienten mittels immunhistochemischer Methoden bestimmt.

Zuvor wurde, um ein geeignetes IHC-Protokoll zu etablieren, Tonsillengewebe als Positivkontrolle für IL-36 α , IL-36Ra und IL-36R gefärbt. Dazu wurden zwei unterschiedliche Peroxidase-Färbesubstrate, DAB (in Abbildung 3 links, braun) und Histogreen (in Abbildung 3 rechts, hellgrün) ausprobiert, die anschließend jeweils mit Hämalaun (in Abbildung 3 blaue Zellkerne) gegengefärbt wurden. Zwar konnte mit beiden Substraten ein spezifisches Färbeergebnis erzielt werden (siehe schwarze Pfeile in Abbildung 3: Färbung der Zellmembranen in braun bzw. hellgrün), für die Färbungen der Arthritispräparate entschieden wir uns dennoch für DAB, da es in unseren Versuchen regelmäßiger als Histogreen zum gewünschten Ergebnis führte und sich zudem die braune Farbe besser vom Blau der Zellkerne abhob.

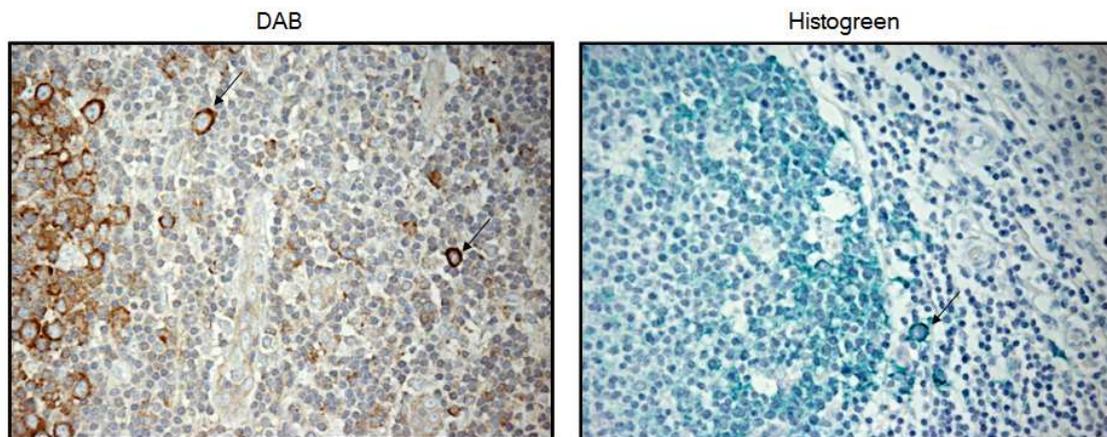


Abbildung 3: Tonsille 20x vergrößert: Jeweils am linken Bildrand Follikelanschnitt mit membranöser Färbung des IL-36R, vereinzelt auch außerhalb der Follikel kräftig membranös gefärbte Zellen (siehe Pfeil); Zellkerne blau (Hämalaun).

Nach erfolgreicher Etablierung der Einzelfärbung im Tonsillengewebe, wurde das Expressionsverhalten von IL-36 α , IL-36R und IL-36Ra schließlich in den Synovia der Arthritispatienten untersucht. Wie die unten stehenden Bilder zeigen, konnten die Antigene in allen drei Patientengruppen nachgewiesen werden. In Abbildung 4 sind IL-36 α + Zellen (braunes Zytoplasma) in Form von lymphozytären Infiltraten (oben links, PsA), im Bereich der äußeren Schichten der Synovialmembran (unten links, RA) und perifollikulär (unten rechts, OA) erkennbar.

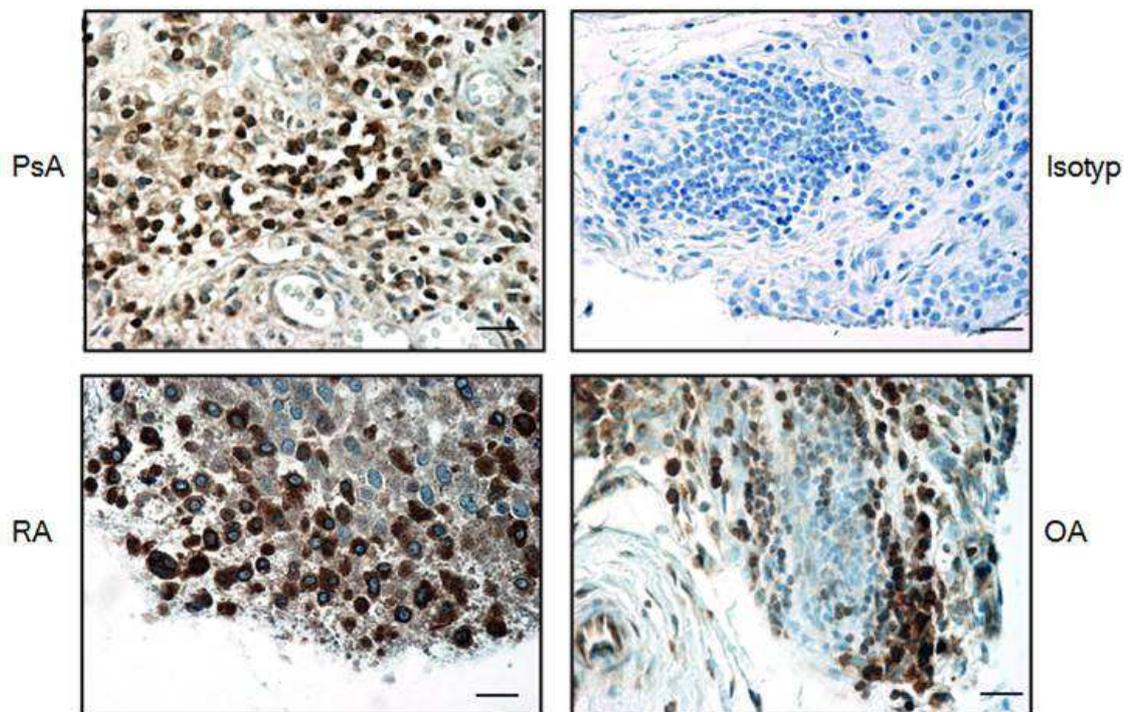


Abbildung 4: DAB-Färbungen für IL-36 α von Synovialgewebe von PsA- (oben links), RA- (unten links) und OA-Patienten (unten rechts) 40x vergrößert. Braun gefärbtes Zytoplasma der IL-36 α + Zellen, blaue Kernfärbung (Hämalaun). Oben rechts Isotypkontrolle. Publiziert in Frey et al.³⁸

Abbildung 5 zeigt die Färbung des IL-36R (braun membranös) und des IL-36Ra (braun zytosolisch und membranös) mit ähnlicher Lokalisation wie IL-36 α , nämlich vorwiegend im Bereich der im RA- und PsA- Gewebe hyperplastischen Synovialmembran und in vereinzelt Zellgruppen.

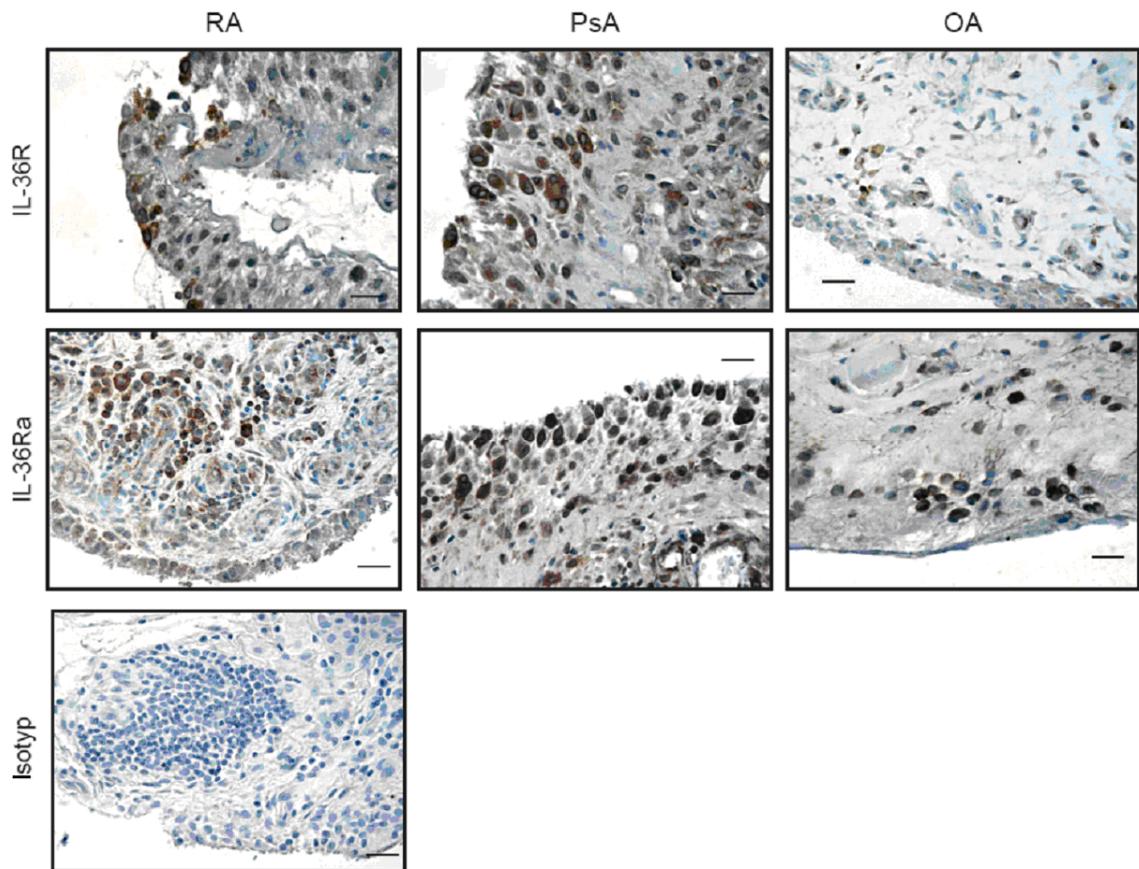


Abbildung 5: DAB-Färbungen für IL-36R (obere Zeile) und IL-36Ra (mittlere Zeile) in RA- (erste Spalte), PsA- (zweite Spalte) und OA- Synovium (dritte Spalte) 40x vergrößert. Isotyp-Kontrolle unten links. Publiziert in Frey et al.³⁸

Um die Expression von IL-36 α , IL-36R und IL-36Ra in den Arthritiden zumindest semi-quantitativ genauer zu bezeichnen, wurden die mit DAB gefärbten Schnitte - dem Beispiel früherer Studien folgend - bezüglich der jeweiligen Proteinexpression von zwei verblindeten Untersuchern unabhängig voneinander auf einer 4-Punkteskala (von 0-3) bewertet. Bei unterschiedlichen Ergebnissen wurden diese diskutiert und man einigte sich entweder auf einen der beiden Werte oder es wurde der Mittelwert gebildet.^{6, 84, 94}

In den nachfolgenden statistischen Analysen nach Mann-Whitney wurden Unterschiede zwischen den betrachteten Gruppen (RA, PsA, OA, OA_i, OA_{ni}) ab einem p-Wert von 0,05 als signifikant bewertet. Wie in Abbildung 6 dargestellt, war IL-36 α in den RA- und PsA-Geweben im Vergleich zu OA hoch reguliert. Nach Unterteilung der OA-Präparate in Gewebe mit niedriger (OA_{ni}) und solche mit hoher Entzündungsaktivität (OA_i) – initial bewertet anhand des Ausmaßes an lymphozytären Infiltraten in den Nativpräparaten –

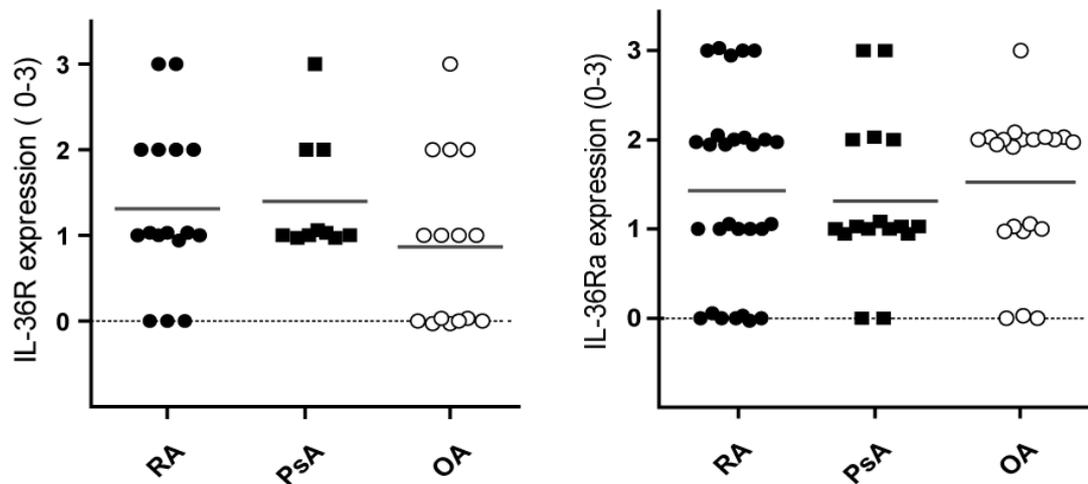


Abbildung 7: Quantifizierung der IHC-Ergebnisse: Vergleich der IL-36R-Expression (links) und der IL-36Ra-Expression (rechts) in RA (schwarze Kreise), PsA (schwarze Quadrate) und OA (offene Kreise) durch Bewertung der jeweiligen Proteinexpression auf einer Skala von 0 bis 3. IL-36R: RA (n=16), PsA (n=10), OA (n=15); IL-36Ra: RA (n=28), PsA (n=16), OA (n=21). Publiziert in Frey et al.³⁸

3.2 Ergebnisse der Doppelfärbungen

Zur Identifikation IL-36 α exprimierender Zellen wurden verschiedene Oberflächenmarker (antiCD20 für B-Lymphozyten, antiCD68 für Makrophagen, antiCD138 für Plasmazellen und antiCD3/antiCD4 für T-Lymphozyten) in Doppelfärbung mit antiIL-36 α ausprobiert.

Zunächst wurden mittels Substrat-Chromogen-Reaktion CD20- (DAB) und IL-36 α - (VIP) positive Zellen markiert, wodurch die Zellmembranen der B-Lymphozyten braun und die IL-36 α -positiven Zellen violett imponierten (ebenfalls membranös und in geringerer Intensität auch zytosolisch).

Wie aus Abbildung 8 ersichtlich, sind zwar zum Teil spezifisch für IL-36 α (rote Pfeile) und CD20 (grüner Pfeil) gefärbte Zellen erkennbar, jedoch können Zellen mit Expression beider Oberflächenmarker nicht eindeutig identifiziert werden, da die braune die violette Farbe im Bereich der Zellmembran möglicherweise überdeckt (schwarzer Pfeil). Mit dem Ziel die beiden Färbungen besser aufeinander abzustimmen, wurde das Protokoll schließlich dahingehend variiert, dass antiIL-36 α mit Vector ABC und VIP entwickelt wurde und umgekehrt antiCD20cy mit dem Vector ImmPress Kit und DAB, jedoch konnte durch diesen Tausch kein erkennbarer Unterschied erzielt werden.

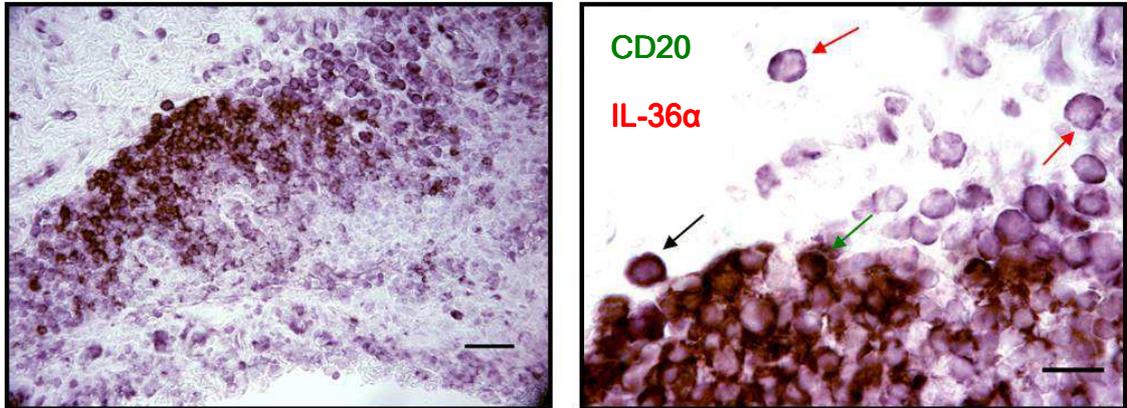


Abbildung 8: RA Synovium links 40x, rechts 100x vergrößert: Doppelfärbung mit DAB für CD20 (braune membranös gefärbte Zellen, siehe grüner Pfeil) und VIP für IL-36 α (violett ebenfalls membranös und schwächer zytosolisch gefärbte Zellen, siehe roter Pfeil).

Um eine potentielle Co-Expression der Oberflächenmarker eindeutig identifizieren zu können, wurden die gleichen Antikörper mit Fluoreszenzmarkern getestet. Nachdem sowohl IL-36 α als auch CD20 in Fluoreszenz-Einzelfärbungen erfolgreich angefärbt werden konnten, wurden beide direkt für die Doppelfärbung eingesetzt.

Dabei ließen sich zum einen spezifisch für IL-36 α gefärbte Zellen (Cy3, rot) deutlich von CD20 positiven Zellen (Alexa 488, grün) unterscheiden und zum anderen zeigten einige B-Lymphozyten neben der grünen Umrandung zusätzlich eine membranös rote Färbung für IL-36 α .

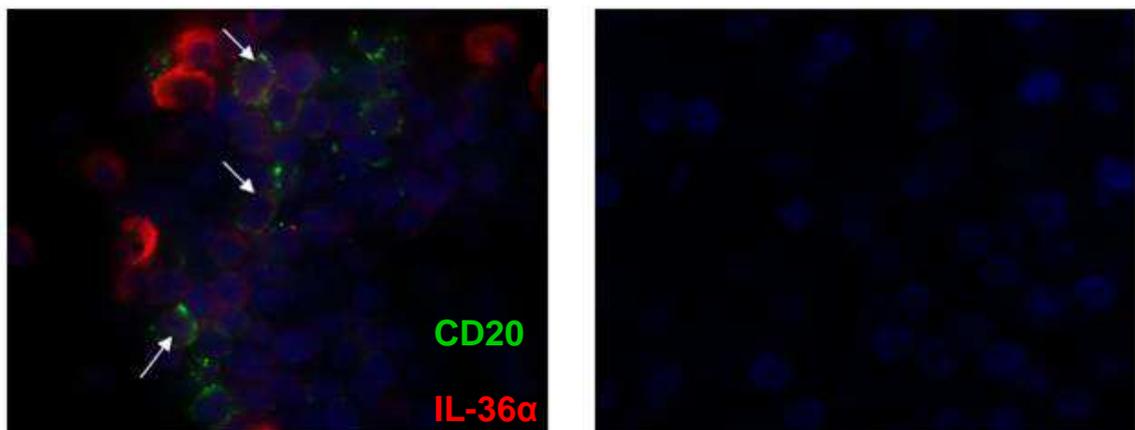


Abbildung 9: RA Synovium 100x vergrößert: Doppelfärbung mit Alexa488 für CD20 (grün membranös) und Cy3 für IL-36 α (rot zytosolisch/membranös), blaue Kernfärbung mit DAPI. Rechts Isotypkontrolle. Neben spezifisch nur für CD20

oder IL-36 α positiven Zellen finden sich einige doppelgefärbte Zellen (siehe weiße Pfeile).

Als nächstes wurden CD68 positive Makrophagen (Alexa 488, grün) auf Expression von IL-36 α untersucht (Abbildung 10), jedoch konnten dabei keine doppelgefärbten Zellen nachgewiesen werden.

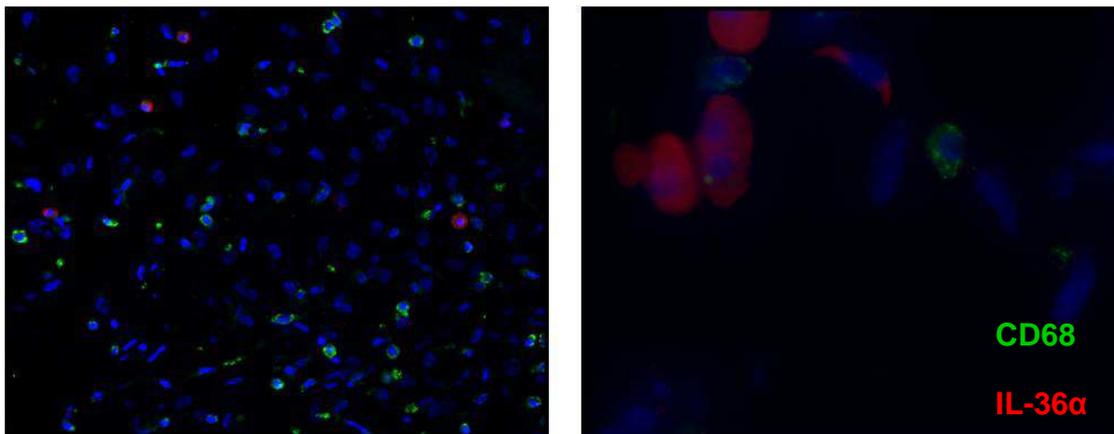


Abbildung 10: RA links 20x, rechts 100x vergrößert: Fluoreszenz-Doppelfärbung mit Alexa 488 für CD68 (grünes Zytoplasma) und Streptavidin-APC für IL-36 α (rotes Zytoplasma), blaue Kernfärbung mit DAPI. Kein Nachweis von doppelgefärbten Zellen.

In den nachfolgenden Färbungen für CD138+ Plasmazellen konnten diese schließlich als wesentlicher zellulärer Ursprung von IL-36 α identifiziert werden (Bilder A und C, Abbildung 11: membranös grün markierte Plasmazellen mit rotem Zytoplasma für IL-36 α). Bilder D und E zeigen, dass Plasmazellen auch IL-36Ra und IL-36R exprimieren.

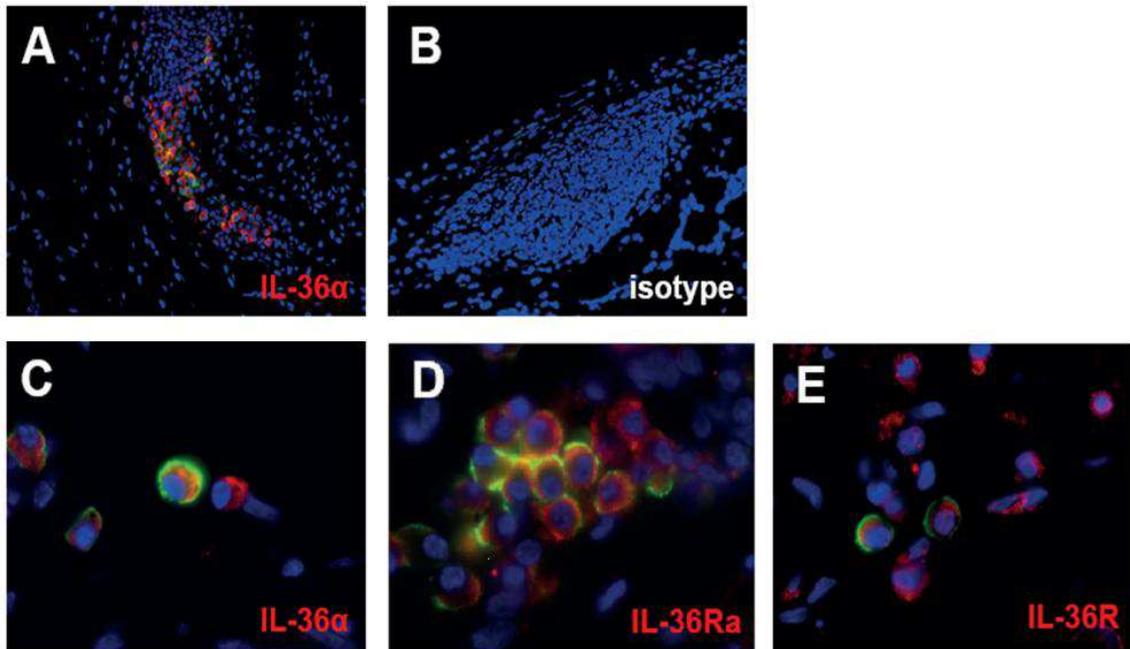


Abbildung 11: RA 20x (A, B) und 100x vergrößert(C-E): Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit Alexa 488 für CD138 (grün) und Cy3 für IL-36 α (A, C), IL-36Ra (D) und IL-36R (E) (rot). Blaue Gegenfärbung mit DAPI. Isotypkontrolle (B). Publiziert in Frey et al.³⁸

Allerdings waren einzelne IL-36 α + Zellen, wie die in Bild C mit dem weißen Pfeil markierte, noch nicht identifiziert. Daher wurden im nächsten Schritt Fluoreszenzdoppelfärbungen mit den T-Lymphozytenmarkern CD3 und CD4 durchgeführt, wie immer zuerst im Kontrollgewebe Tonsille, wo jedoch keine Co-Expression mit IL-36 α festgestellt werden konnte (siehe Abbildung 12).

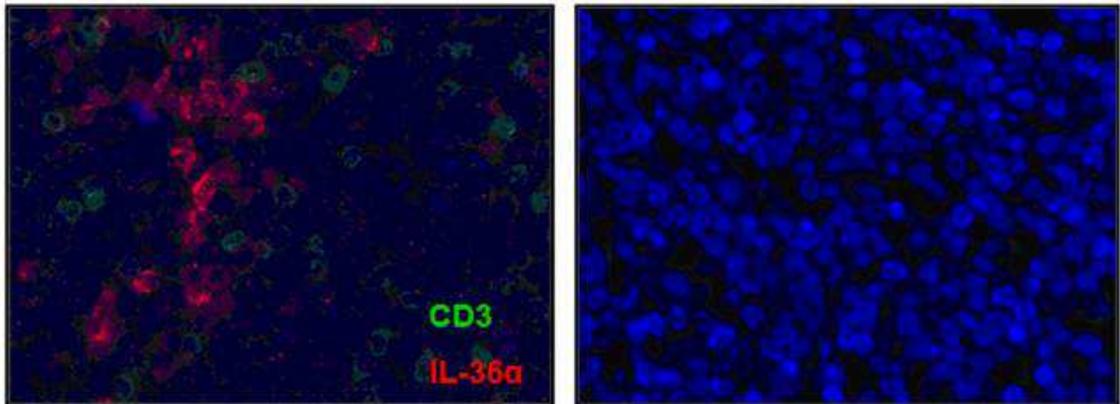


Abbildung 12: Tonsille 20x vergrößert: Fluoreszenz-Doppelfärbung mit Alexa488 für CD3 (grüne membranös gefärbte Zellen) und Cy3 für IL-36 α (rot membranös gefärbte Zellen), blaue Kernfärbung mit DAPI. Rechts Isotypkontrolle. Kein Nachweis von doppelgefärbten Zellen.

Dennoch wurde abschließend versucht, die T-Zellfärbung in den Patientensynovia zu etablieren, was leider aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht gelang. Entsprechend kann nur vermutet werden, dass CD3⁺ beziehungsweise CD4⁺ Zellen auch in RA, PsA und OA keine Doppelfärbung mit IL-36 α zeigen würden.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Patientencharakteristika

Um aus einem möglichst repräsentativen Patientenkollektiv schöpfen zu können, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Synovialgewebe aus drei unterschiedlichen europäischen Zentren rekrutiert. Während die RA- und PsA-Patienten vorwiegend arthroskopiert und Ultraschall-gesteuert biopsiert wurden, wurden die OA-Proben ausschließlich in Knie-TEP-Operationen gewonnen. Die Teststatistik nach Mann-Whitney ergab, dass sich RA- und PsA-Patienten signifikant in den Punkten Alter und Steroidmedikation unterschieden, außerdem waren die CRP-Level der RA-Patienten gegenüber denen der PsA- und OA-Patienten signifikant erhöht.

Hohe Entzündungswerte sind für RA nicht ungewöhnlich: In den 70er Jahren wurden bei einem Normwert von maximal 5 mg/L CRP-Werte von weniger als 40 mg/L als niedrig und erst Werte über 100 mg/L als hoch beschrieben.³ Natürlich liegen durchschnittliche CRP-Werte von RA-Patienten bei heute besseren Therapiemöglichkeiten in der Regel in dem damals als niedrig bezeichneten Bereich. In einer kürzlich veröffentlichten Studie untersuchten Kim et al die CRP-Expression in RA und OA Synovia mittels IHC und konnten eine deutlich stärkere Expression in den RA Geweben feststellen.⁴⁹ Darüber hinaus wurde sowohl für die RA als auch für die OA durch verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt, dass entzündliche Biomarker wie CRP und COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) mit dem Fortschreiten struktureller Veränderungen korrelieren.^{3, 25, 89}

In diesem Zusammenhang ermittelten Raza et al die Zytokinprofile von Patienten mit früher sowie etablierter RA und OA, wobei festgestellt wurde, dass die Level der proinflammatorischen Mediatoren innerhalb der ersten drei Monate nach Beginn der Symptome am höchsten waren und mit zunehmender Krankheitsdauer abnahmen.⁷⁴ Da die Entzündungswerte unserer RA-Patienten mit einem mittleren CRP-Wert von 15,2 mg/L vergleichsweise eher geringfügig erhöht waren und außerdem bei immerhin knapp 21% der künstliche Gelenkersatz indiziert war, ist anzunehmen, dass sie sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme größtenteils in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium befanden.

Die höheren CRP-Levels der RA-Patienten sind wohl auch der Grund dafür, dass mehr RA- als PsA-Patienten zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme mit immunsupprimierenden Steroiden behandelt wurden. Analog zu der höheren Entzündungsaktivität bei den von uns untersuchten RA-Patienten zeigen IHC-Färbungen verschiedener Forschungsgruppen,

dass die Synovialmembran in RA im Vergleich zu PsA-Biopsien stärker hyperplastisch ist und in RA außerdem mehr dendritische Zellen vorhanden sind, welche zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems befähigt sind und somit die proinflammatorische Zytokinkaskade in Gang setzen.^{51, 103}

Zudem zeigen Röntgenbilder von PsA-Patienten seltener Zeichen erosiver Gelenkdestruktion, beziehungsweise schreitet das Auftreten neuer Erosionen langsamer voran als bei RA-Patienten.³⁶ Vermutlich war unter anderem deswegen bei immerhin 6 unserer 29 RA-Patienten der künstliche Gelenkersatz indiziert, während kein einziger PsA-Patient mit einer Knie-TEP versorgt wurde. Zusätzlich spielte dabei sicherlich auch das jüngere Alter der PsA-Patienten eine Rolle.

Gleiches gilt für den Zusammenhang zwischen Knie-TEP-Implantation und dem hohen Durchschnittsalter der OA-Patienten: Laut Statistischem Bundesamt wurden 2010 die meisten solcher Operationen an Arthrosepatienten der Altersgruppe der 60- bis 79-Jährigen durchgeführt (71,5%).⁹¹

4.2 Diskussion der Ergebnisse der Einzelfärbungen

Die Versuche zu den Einzelfärbungen zeigten, dass IL-36 α in den Synovia aller drei untersuchten Patientengruppen exprimiert wird, jedoch in RA und PsA signifikant stärker im Vergleich zu OA. Rezeptor (IL-36R) und Antagonist (IL-36Ra) von IL-36 α hingegen waren in den drei Arthropathien interessanterweise gleich hoch reguliert.

Die Hochregulation des neuen proinflammatorischen Zytokins in RA und PsA ist durch die entzündlichen Infiltrate in deren Synovialgewebe bedingt, welche bereits von einer ganzen Reihe an Forschungsgruppen beschrieben wurden und mitunter auch in OA-Synovium vorkommen.^{27, 84, 101} Obwohl keine Entzündungszelle spezifisch für eine der drei Arthropathien ist, versuchten Kruithof et al die Krankheiten auf Zellebene voneinander zu unterscheiden. Während in RA dendritische Zellen signifikant häufiger nachgewiesen werden konnten, waren es in PsA mehr Neutrophile und CD163+ Makrophagen.⁵¹ In OA-Biopsaten wurden entzündliche Infiltrate aus vorwiegend CD68+ und CD4+ Zellen beschrieben, jedoch finden sich dort insgesamt deutlich weniger Lymphozyten im Vergleich zu RA-Geweben.^{11, 13} Entsprechend zeigten die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten OA-Gewebe mit zahlreichen zellulären Infiltraten (OAi) mehr IL-36 α + Zellen in den IHC-Färbungen als die Präparate, welche als gering entzündlich verändert eingestuft wurden (OAni). Auch Bondeson et al beschrieben unterschiedlich stark

ausgeprägte Synovitiden in OA, wobei Patienten, die durch Adipositas oder andere mechanische Faktoren für die Erkrankung prädisponiert waren, in geringerem Ausmaß entzündliche synoviale Infiltrate aufwiesen.¹³ Andere Studien zeigen, dass gerade bei histologischen Präparaten früher OA im Vergleich zu fortgeschrittenen Krankheitsstadien vermehrt mononukleäre Zellinfiltrate auffallen und dort auch die proentzündlichen Zytokine TNF α und IL-1 β überexprimiert werden.⁸

Die Tatsache, dass IL-36 α in den Geweben mit der höchsten Zellzahl am stärksten exprimiert wurde, erhärtet den Verdacht, dass das neu entdeckte Zytokin an entzündlichen Prozessen im Gelenk beteiligt ist, beziehungsweise dass es generell dort exprimiert wird, wo sich leukozytäre Infiltrate in Geweben befinden.

Blumberg et al beschrieben jedenfalls bereits die Rolle von IL-36 α im Zytokinnetzwerk der Psoriasis, einer durch T-Lymphozyten getriggerten Krankheit, wo es einerseits von TNF α , IL-17A und IL-23 hochreguliert wird und andererseits die genannten Zytokine selbst induziert.¹²

Anders als IL-36 α wurden IL-36R und IL-36Ra in den drei Geweben mit unterschiedlicher Entzündungsaktivität gleich stark exprimiert, was darauf hindeutet, dass kein spezifischer Zusammenhang zwischen ihrer Funktion und dem Ausmaß leukozytärer Infiltrate besteht.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Lamacchia et al bestätigt diese Beobachtung: Die Kollegen untersuchten Expression und Funktion von IL-36R und seiner Liganden IL-36Ra und IL-36 γ in experimentell induzierter Arthritis und stellten fest, dass die Krankheitsschwere nicht mit der Höhe der mRNA-Levels der Antigene korreliert. Auch die Behandlung mit anti-IL36R zeigte keinen Einfluss auf das Fortschreiten und den Ausprägungsgrad der Arthritis im Mausmodell, während Injektionen von IL-1R-Inhibitor den Krankheitsprogress aufhalten konnten.⁵³

Bezüglich der Funktion von IL-36Ra fanden Onoufriadis et al heraus, dass Patienten mit einer Missense-Mutation in dem Gen, das für IL-36Ra kodiert, an generalisierter Psoriasis pustulosa erkranken, weil der proentzündliche Stimulus IL-36 α nicht ausreichend antagonisiert werden kann.⁶⁷ Daneben bildeten sich im Mausmodell bei IL-36Ra Defizienz der basalen Keratinozyten entzündliche Plaques, ähnlich denen bei humaner Psoriasis vulgaris.¹² Daher ist anzunehmen, dass auch PsA Synovitiden durch eine Imbalance aus einem zu viel an IL-36 α bei zu wenig beziehungsweise inaktivem IL-36Ra entstehen.

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Daten von Van de Veerdonk et al. Sie erforschten die biologische Funktion eines weiteren neuen Mitgliedes der IL-1 Familie,

nämlich IL-38 (IL-1F10). Dieses bindet ebenfalls an den IL-36R und inhibiert dadurch, analog zu IL-36Ra, proinflammatorische Stimuli anderer Zytokine: In Blutproben gesunder Spender wurden mit Hilfe von *Candida albicans* Th17-Zellen zur Produktion von IL-17 und IL-22 stimuliert, wobei die Zytokintiter nach Zugabe von rekombinanten IL-38 wieder abfielen.⁹⁹ Neben dieser funktionellen Ähnlichkeit sind IL-38 und IL-36Ra zu 43% homolog bezüglich ihrer Aminosäuresequenz.⁹ Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten liegt es nahe, die Expression von IL-38 auch in arthritischen Synovia zu untersuchen. Derzeit ist jedoch noch kein Antikörper gegen IL-38 auf dem Markt.

4.3 Diskussion der Ergebnisse der Doppelfärbungen

Die bisherige Forschung konzentrierte sich darauf, das Expressionsverhalten von IL-36 α in epithelialen (Haut, Trachea, Gastrointestinaltrakt) und lymphatischen Geweben zu untersuchen, wobei Keratinozyten, T- und B- Zellen sowie Monozyten als sein zellulärer Ursprung identifiziert wurden.⁸⁵ Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Doppelfärbungen an den Synovia entzündlicher Arthritiden zeigten, dass IL-36 α hauptsächlich von CD138+ Plasmazellen exprimiert wird, und konnten bestätigen, dass auch B-Zellen das neue Zytokin produzieren. Dagegen wurde für Makrophagen (als Zellen monozytären Ursprungs) und T-Lymphozyten keine Expression nachgewiesen. Diesbezüglich ist zwar festzuhalten, dass in den Arthritisgeweben leider aufgrund technischer Schwierigkeiten keine adäquate Doppelfärbung für T-Zellen mit IL-36 α etabliert werden konnte, jedoch zeigte die funktionierende Doppelfärbung in der Tonsille keine Co-Expression. Da die Versuche mit allen anderen Oberflächenmarkern (CD138/Plasmazellen, CD20/B-Zellen und CD68/Makrophagen) für lymphatisches und Synovialgewebe stets kongruente Ergebnisse lieferten, ist anzunehmen, dass auch bei Färberefolg keine Co-Expression festgestellt worden wäre. Mit letzteren Daten hatten wir ursprünglich nicht gerechnet, da erstens - wie bereits erwähnt - T-Zellen in anderen Geweben IL-36 α -Expression zeigten und zweitens sowohl T-Zellen als auch Makrophagen viele andere Synovitis-relevante proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-1 und IL-6 produzieren.^{10, 23} Andererseits korreliert die fehlende Co-Expression mit der therapeutischen Problematik, dass TNF α -Blocker, Anakinra und Tocilizumab eben nicht bei allen Patienten wirksam sind.

Dagegen deuten unsere Daten bezüglich der Plasmazellen als Hauptexpressionsort von IL-36 α mit ihrer gleichzeitigen Rolle als Antikörper-sezernierende Effektorzellen des adaptiven Immunsystems darauf hin, dass IL-36 α einen entscheidenden Zusammenhang

zwischen Autoimmunität und den Entzündungszellinfiltraten in RA- und PsA-Geweben herstellen könnte. Plasmazellen dürften jedenfalls einen maßgeblichen Entzündungstrigger zumindest für die RA darstellen, da bei den Patienten ein hochpositiver Rheumafaktor mit dem Ausmaß der klinischen Synovitis korreliert.¹⁸ Bei persistierender Entzündung resultiert der für die RA charakteristische Pannus, der vergleichbar mit einem invasiven Tumor den Knorpel infiltriert. Neben Makrophagen und Osteoklasten sind FLS (Fibroblast-like Synoviocytes) diejenigen Zellen, die zahlmäßig am häufigsten im Pannusgewebe vorkommen und durch ihre massive Ausschüttung von Proteasen die Destruktion des Knorpels bewirken.⁷

Als kernhaltige Zellen exprimieren sie zudem den IL-36R, an den das von den Plasmazellen sezernierte IL-36 α binden kann. Dadurch repräsentiert IL-36 α also ein wichtiges Kommunikationsmedium zwischen FLS und Plasmazellen im Gelenkspalt. Daneben kann außerdem eine gewisse autokrine Stimulation zur kontinuierlichen Zytokinproduktion durch FLS beitragen, da interessanterweise auch IL-36 α und sein Antagonist IL-36Ra auf Fibroblasten exprimiert werden. Zu jenen Zytokinen, welche nach Stimulation durch IL-36 α von FLS ausgeschüttet werden, zählen IL-6 und IL-8.³⁸ Wenn man bedenkt, dass IL-6 als wichtigster Stimulus für die TNF α -Produktion gilt und IL-8 durch seinen chemotaktischen Effekt die Leukozytenmigration ins Gelenk bewirkt, muss IL-36 α tatsächlich einen ganz entscheidenden proinflammatorischen Mediator für entzündlich-destruktive Gelenkveränderungen darstellen.

Dennoch ist die Funktion von IL-36 α gerade in Hinblick auf seine Bedeutung für menschliche Krankheiten noch weitgehend unerforscht. Towne et al. zeigten, dass IL-36 α und IL-36Ra, um in ihre biologisch aktive Form überführt zu werden, am N-Terminus ihrer Aminosäurenkette prozessiert werden müssen.⁹⁷ Ob diese Alternation auch in vivo relevant ist, muss in zukünftigen Studien erst noch geprüft werden. Jedenfalls deuten sowohl das Expressionsmuster von IL-36 α in Plasmazellen arthritischer Synovia als auch sein Einfluss auf die Zytokinsynthese synovialer Fibroblasten auf ein Zusammenspiel zwischen adaptiver Immunantwort und Entzündung in menschlichen Arthropathien hin.

5 Literaturverzeichnis

- 1 D. Aletaha, T. Neogi, A. J. Silman, J. Funovits, D. T. Felson, C. O. Bingham, 3rd, N. S. Birnbaum, G. R. Burmester, V. P. Bykerk, M. D. Cohen, B. Combe, K. H. Costenbader, M. Dougados, P. Emery, G. Ferraccioli, J. M. Hazes, K. Hobbs, T. W. Huizinga, A. Kavanaugh, J. Kay, T. K. Kvien, T. Laing, P. Mease, H. A. Menard, L. W. Moreland, R. L. Naden, T. Pincus, J. S. Smolen, E. Stanislawska-Biernat, D. Symmons, P. P. Tak, K. S. Upchurch, J. Vencovsky, F. Wolfe, G. Hawker, '2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria: An American College of Rheumatology/European League against Rheumatism Collaborative Initiative', *Ann Rheum Dis*, 69 (2010), 1580-8.
- 2 R. Altman, E. Asch, D. Bloch, G. Bole, D. Borenstein, K. Brandt, W. Christy, T. D. Cooke, R. Greenwald, M. Hochberg, 'Development of Criteria for the Classification and Reporting of Osteoarthritis. Classification of Osteoarthritis of the Knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association', *Arthritis Rheum*, 29 (1986), 1039-49.
- 3 R. S. Amos, T. J. Constable, R. A. Crockson, A. P. Crockson, B. McConkey, 'Rheumatoid Arthritis: Relation of Serum C-Reactive Protein and Erythrocyte Sedimentation Rates to Radiographic Changes', *Br Med J*, 1 (1977), 195-7.
- 4 F. C. Arnett, S. M. Edworthy, D. A. Bloch, D. J. McShane, J. F. Fries, N. S. Cooper, L. A. Healey, S. R. Kaplan, M. H. Liang, H. S. Luthra, 'The American Rheumatism Association 1987 Revised Criteria for the Classification of Rheumatoid Arthritis', *Arthritis Rheum*, 31 (1988), 315-24.
- 5 'Arthritis; Arthrose', *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, 266. Auflage, De Gruyter GmbH, Berlin/Boston (2014), 170;175-176
- 6 D. Baeten, P. Demetter, C. Cuvelier, F. Van Den Bosch, E. Kruithof, N. Van Damme, G. Verbruggen, H. Mielants, E. M. Veys, F. De Keyser, 'Comparative Study of the Synovial Histology in Rheumatoid Arthritis, Spondyloarthropathy, and Osteoarthritis: Influence of Disease Duration and Activity', *Ann Rheum Dis*, 59 (2000), 945-53.
- 7 B. Bartok, G. S. Firestein, 'Fibroblast-Like Synoviocytes: Key Effector Cells in Rheumatoid Arthritis', *Immunol Rev*, 233 (2010), 233-55.
- 8 M. J. Benito, D. J. Veale, O. FitzGerald, W. B. van den Berg, B. Bresnihan, 'Synovial Tissue Inflammation in Early and Late Osteoarthritis', *Ann Rheum Dis*, 64 (2005), 1263-7.
- 9 J. T. Bensen, P. A. Dawson, J. C. Mychaleckyj, D. W. Bowden, 'Identification of a Novel Human Cytokine Gene in the Interleukin Gene Cluster on Chromosome 2q12-14', *J Interferon Cytokine Res*, 21 (2001), 899-904.
- 10 S. Blass, J. M. Engel, G. R. Burmester, '[The Immunologic Homunculus in Rheumatoid Arthritis. A New Viewpoint of Immunopathogenesis in Rheumatoid Arthritis and Therapeutic Consequences]', *Z Rheumatol*, 60 (2001), 1-16.
- 11 A. B. Blom, W. van den Berg, 'The Synovium and Its Role in Osteoarthritis',

- M. C. Farach-Carson, F. Bronner F., *Bone and Osteoarthritis*, 4. Auflage, Springer Verlag, New York (2007), 65-79
- 12 H. Blumberg, H. Dinh, C. Dean, Jr., E. S. Trueblood, K. Bailey, D. Shows, N. Bhagavathula, M. N. Aslam, J. Varani, J. E. Towne, J. E. Sims, 'Il-1 β and Its Ligands Contribute to the Cytokine Network in Psoriasis', *J Immunol*, 185 (2010), 4354-62.
- 13 J. Bondeson, A. B. Blom, S. Wainwright, C. Hughes, B. Caterson, W. B. van den Berg, 'The Role of Synovial Macrophages and Macrophage-Produced Mediators in Driving Inflammatory and Destructive Responses in Osteoarthritis', *Arthritis Rheum*, 62 (2010), 647-57.
- 14 D. Boraschi, D. Lucchesi, S. Hainzl, M. Leitner, E. Maier, D. Mangelberger, G. J. Oostingh, T. Pfaller, C. Pixner, G. Posselt, P. Italiani, M. F. Nold, C. A. Nold-Petry, P. Bufler, C. A. Dinarello, 'Il-37: A New Anti-Inflammatory Cytokine of the Il-1 Family', *Eur Cytokine Netw*, 22 (2011), 127-47.
- 15 D. A. Brewerton, F. D. Hart, A. Nicholls, M. Caffrey, D. C. James, R. D. Sturrock, 'Ankylosing Spondylitis and Hl-a 27', *Lancet*, 1 (1973), 904-7.
- 16 H.P. Brezinschek, G. Herold, 'Degenerative Gelenkerkrankungen (Arthrosen)', G. Herold (Hrsg), *Innere Medizin*, Köln (2015), 696
- 17 S. L. Bridges, Jr., J. M. Kelley, L. B. Hughes, 'The Hla-Drb1 Shared Epitope in Caucasians with Rheumatoid Arthritis: A Lesson Learned from Tic-Tac-Toe', *Arthritis Rheum*, 58 (2008), 1211-5.
- 18 E. Bruder, T. Aigner, 'Chronisch-Entzündliche Gelenkerkrankungen', W. Böcker, H. Denk, P. Heitz, H. Moch (Hrsg), *Pathologie*, 4. Auflage, Elsevier Verlag, München (2008), 1093
- 19 E. Bruder, T. Aigner, 'Chronisch-Entzündliche Gelenkerkrankungen', W. Böcker, H. Denk, P. Heitz, H. Moch (Hrsg), *Pathologie*, 4. Auflage, Elsevier Verlag, München (2008), 1091
- 20 J. Brunner, G. Herold, 'Rheumatoide Arthritis (RA)', G. Herold (Hrsg), *Innere Medizin*, Köln (2015), 659
- 21 D. Burger, J. M. Dayer, G. Palmer, C. Gabay, 'Is Il-1 a Good Therapeutic Target in the Treatment of Arthritis?', *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 20 (2006), 879-96.
- 22 P. G. Calzavara, R. Cattaneo, F. Franceschini, C. Tosoni, M. Martinelli, A. Carlino, 'Antinuclear Antibodies in Psoriatic Arthritis and Its Subgroups', *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*, 146 (1989), 31-2.
- 23 J. M. Cavillon, 'Cytokines and Macrophages', *Biomed Pharmacother*, 48 (1994), 445-53.
- 24 J. Chun, R. J. Choi, S. Khan, D. S. Lee, Y. C. Kim, Y. J. Nam, D. U. Lee, Y. S. Kim, 'Alantolactone Suppresses Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 Expression by Down-Regulating Nf-Kappab, Mapk and Ap-1 Via the Myd88 Signaling Pathway in Lps-Activated Raw 264.7 Cells', *Int Immunopharmacol*, 14 (2012), 375-83.
- 25 A. G. Clark, J. M. Jordan, V. Vilim, J. B. Renner, A. D. Dragomir, G. Luta, V. B. Kraus, 'Serum Cartilage Oligomeric Matrix Protein Reflects Osteoarthritis

- Presence and Severity: The Johnston County Osteoarthritis Project', *Arthritis Rheum*, 42 (1999), 2356-64.
- 26 S. B. Cohen, 'The Use of Anakinra, an Interleukin-1 Receptor Antagonist, in the Treatment of Rheumatoid Arthritis', *Rheum Dis Clin North Am*, 30 (2004), 365-80, vii.
- 27 C. L. Danning, G. G. Illei, C. Hitchon, M. R. Greer, D. T. Boumpas, I. B. McInnes, 'Macrophage-Derived Cytokine and Nuclear Factor Kappab P65 Expression in Synovial Membrane and Skin of Patients with Psoriatic Arthritis', *Arthritis Rheum*, 43 (2000), 1244-56.
- 28 C. A. Dinarello, 'Blocking Interleukin-1beta in Acute and Chronic Autoinflammatory Diseases', *J Intern Med*, 269 (2011), 16-28.
- 29 C. A. Dinarello, 'Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family', *Annu Rev Immunol*, 27 (2009), 519-50.
- 30 C. A. Dinarello, 'Interleukin-1, Interleukin-1 Receptors and Interleukin-1 Receptor Antagonist', *Int Rev Immunol*, 16 (1998), 457-99.
- 31 C. A. Dinarello, I. Bishai, L. J. Rosenwasser, F. Coceani, 'The Influence of Lipoxygenase Inhibitors on the in Vitro Production of Human Leukocytic Pyrogen and Lymphocyte Activating Factor (Interleukin-1)', *Int J Immunopharmacol*, 6 (1984), 43-50.
- 32 J. A. Eastgate, J. A. Symons, N. C. Wood, F. M. Grinlinton, F. S. di Giovine, G. W. Duff, 'Correlation of Plasma Interleukin 1 Levels with Disease Activity in Rheumatoid Arthritis', *Lancet*, 2 (1988), 706-9.
- 33 H. G. Fassbender, 'Role of Chondrocytes in the Development of Osteoarthritis', *Am J Med*, 83 (1987), 17-24.
- 34 M. Feldmann, F. M. Brennan, R. N. Maini, 'Role of Cytokines in Rheumatoid Arthritis', *Annu Rev Immunol*, 14 (1996), 397-440.
- 35 G. S. Firestein, 'Evolving Concepts of Rheumatoid Arthritis', *Nature*, 423 (2003), 356-61.
- 36 O. Fitzgerald, R. Winchester, 'Psoriatic Arthritis: From Pathogenesis to Therapy', *Arthritis Res Ther*, 11 (2009), 214.
- 37 D. A. Fox, 'The Role of T Cells in the Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis: New Perspectives', *Arthritis Rheum*, 40 (1997), 598-609.
- 38 S. Frey, A. Derer, M. E. Messbacher, D. L. Baeten, S. Bugatti, C. Montecucco, G. Schett, A. J. Hueber, 'The Novel Cytokine Interleukin-36alpha Is Expressed in Psoriatic and Rheumatoid Arthritis Synovium', *Ann Rheum Dis*, 72 (2013), 1569-74.
- 39 H. A. Fuchs, J. J. Kaye, L. F. Callahan, E. P. Nance, T. Pincus, 'Evidence of Significant Radiographic Damage in Rheumatoid Arthritis within the First 2 Years of Disease', *J Rheumatol*, 16 (1989), 585-91.
- 40 M. B. Goldring, S. R. Goldring, 'Osteoarthritis', *J Cell Physiol*, 213 (2007), 626-34.
- 41 T. Gomi, T. Shiohara, T. Munakata, K. Imanishi, M. Nagashima, 'Interleukin 1 Alpha, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Interferon Gamma in Psoriasis', *Arch Dermatol*, 127 (1991), 827-30.

- 42 W. Grassi, R. De Angelis, G. Lamanna, C. Cervini, 'The Clinical Features of Rheumatoid Arthritis', *Eur J Radiol*, 27 Suppl 1 (1998), S18-24.
- 43 S. A. Greenfeder, P. Nunes, L. Kwee, M. Labow, R. A. Chizzonite, G. Ju, 'Molecular Cloning and Characterization of a Second Subunit of the Interleukin 1 Receptor Complex', *J Biol Chem*, 270 (1995), 13757-65.
- 44 P. K. Gregersen, J. Silver, R. J. Winchester, 'The Shared Epitope Hypothesis. An Approach to Understanding the Molecular Genetics of Susceptibility to Rheumatoid Arthritis', *Arthritis Rheum*, 30 (1987), 1205-13.
- 45 G. Greif-Higer, E. Märker-Hermann, 'Chronische Gelenkschmerzen', U. Egle, S. Hoffmann, K. Lehmann, W. Nix (Hrsg), *Handbuch Chronischer Schmerz - Grundlagen, Pathogenese, Klinik und Therapie aus bio-psycho-sozialer Sicht*, Schattauer Verlag, Stuttgart (2003), 236
- 46 W. N. Jarjour, B. D. Jeffries, J. S. th Davis, W. J. Welch, T. Mimura, J. B. Winfield, 'Autoantibodies to Human Stress Proteins. A Survey of Various Rheumatic and Other Inflammatory Diseases', *Arthritis Rheum*, 34 (1991), 1133-8.
- 47 F. Kainberger, 'Psoriasisarthritis', K. Bohndorf, H. Imhof, K. Wörtler (Hrsg), *Radiologische Diagnostik der Knochen und Gelenke*, 3. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart (2014), 466
- 48 D. Kane, L. Stafford, B. Bresnihan, O. FitzGerald, 'A Prospective, Clinical and Radiological Study of Early Psoriatic Arthritis: An Early Synovitis Clinic Experience', *Rheumatology (Oxford)*, 42 (2003), 1460-8.
- 49 K. W. Kim, B. M. Kim, H. W. Moon, S. H. Lee, H. R. Kim, 'Role of C-Reactive Protein in Osteoclastogenesis in Rheumatoid Arthritis', *Arthritis Res Ther*, 17 (2015), 41.
- 50 S. Kleinert, M. Feuchtenberger, C. Kneitz, H. P. Tony, 'Psoriatic Arthritis: Clinical Spectrum and Diagnostic Procedures', *Clin Dermatol*, 25 (2007), 519-23.
- 51 E. Kruihof, D. Baeten, L. De Rycke, B. Vandooren, D. Foell, J. Roth, J. D. Canete, A. M. Boots, E. M. Veys, F. De Keyser, 'Synovial Histopathology of Psoriatic Arthritis, Both Oligo- and Polyarticular, Resembles Spondyloarthropathy More Than It Does Rheumatoid Arthritis', *Arthritis Res Ther*, 7 (2005), R569-80.
- 52 E. A. Kurt-Jones, D. I. Beller, S. B. Mizel, E. R. Unanue, 'Identification of a Membrane-Associated Interleukin 1 in Macrophages', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82 (1985), 1204-8.
- 53 C. Lamacchia, G. Palmer, E. Rodriguez, P. Martin, S. Vigne, C. A. Seemayer, D. Talabot-Ayer, J. E. Towne, C. Gabay, 'The Severity of Experimental Arthritis Is Independent of Il-36 Receptor Signaling', *Arthritis Res Ther*, 15 (2013), R38.
- 54 A. Langenbruch, M. A. Radtke, M. Krensel, A. Jacobi, K. Reich, M. Augustin, 'Nail Involvement as a Predictor of Concomitant Psoriatic Arthritis in Patients with Psoriasis', *Br J Dermatol*, 171 (2014), 1123-8.
- 55 T. J. Love, J. E. Gudjonsson, H. Valdimarsson, B. Gudbjornsson, 'Psoriatic

- Arthritis and Onycholysis -- Results from the Cross-Sectional Reykjavik Psoriatic Arthritis Study', *J Rheumatol*, 39 (2012), 1441-4.
- 56 D. Magne, G. Palmer, J. L. Barton, F. Mezin, D. Talabot-Ayer, S. Bas, T. Duffy, M. Noger, P. A. Guerne, M. J. Nicklin, C. Gabay, 'The New Il-1 Family Member Il-1f8 Stimulates Production of Inflammatory Mediators by Synovial Fibroblasts and Articular Chondrocytes', *Arthritis Res Ther*, 8 (2006), R80.
- 57 S. Marrakchi, P. Guigue, B. R. Renshaw, A. Puel, X. Y. Pei, S. Fraitag, J. Zribi, E. Bal, C. Cluzeau, M. Chrabieh, J. E. Towne, J. Douangpanya, C. Pons, S. Mansour, V. Serre, H. Makni, N. Mahfoudh, F. Fakhfakh, C. Bodemer, J. Feingold, S. Hadj-Rabia, M. Favre, E. Genin, M. Sahbatou, A. Munnich, J. L. Casanova, J. E. Sims, H. Turki, H. Bachelez, A. Smahi, 'Interleukin-36-Receptor Antagonist Deficiency and Generalized Pustular Psoriasis', *N Engl J Med*, 365 (2011), 620-8.
- 58 J. Martel-Pelletier, J.P. Pelletier, 'Inflammatory Factors Involved in Osteoarthritis', J. Buckwalter, M. Lotz, J.F. Stoltz (Hrsg), *Osteoarthritis, Inflammation and Degradation: A Continuum*, IOS Press, Amsterdam (2007), 3-13
- 59 I. B. McInnes, G. Schett, 'The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis', *N Engl J Med*, 365 (2011), 2205-19.
- 60 P. J. Mease, B. S. Goffe, J. Metz, A. VanderStoep, B. Finck, D. J. Burge, 'Etanercept in the Treatment of Psoriatic Arthritis and Psoriasis: A Randomised Trial', *Lancet*, 356 (2000), 385-90.
- 61 P. Miossec, J. K. Kolls, 'Targeting Il-17 and Th17 Cells in Chronic Inflammation', *Nat Rev Drug Discov*, 11 (2012), 763-76.
- 62 J. M. Moll, 'The Clinical Spectrum of Psoriatic Arthritis', *Clin Orthop Relat Res* (1979), 66-75.
- 63 J. M. Moll, I. Haslock, I. F. Macrae, V. Wright, 'Associations between Ankylosing Spondylitis, Psoriatic Arthritis, Reiter's Disease, the Intestinal Arthropathies, and Behcet's Syndrome', *Medicine (Baltimore)*, 53 (1974), 343-64.
- 64 R. N. Moore, J. J. Oppenheim, J. J. Farrar, C. S. Carter, Jr., A. Waheed, R. K. Shaddock, 'Production of Lymphocyte-Activating Factor (Interleukin 1) by Macrophages Activated with Colony-Stimulating Factors', *J Immunol*, 125 (1980), 1302-5.
- 65 M. Neidhart, S. Kuchen, R. Gay, S. Gay, 'Rheumatoide Arthritis', D. Ganten, K. Ruckpaul, S. Gay, J. Kalden (Hrsg), *Molekularmedizinische Grundlagen von rheumatischen Erkrankungen*, Springer Verlag, Heidelberg (2003), 22
- 66 M. G. Netea, C. A. Nold-Petry, M. F. Nold, L. A. Joosten, B. Opitz, J. H. van der Meer, F. L. van de Veerdonk, G. Ferwerda, B. Heinhuis, I. Devesa, C. J. Funk, R. J. Mason, B. J. Kullberg, A. Rubartelli, J. W. van der Meer, C. A. Dinarello, 'Differential Requirement for the Activation of the Inflammasome for Processing and Release of Il-1beta in Monocytes and Macrophages', *Blood*, 113 (2009), 2324-35.
- 67 A. Onoufriadis, M. A. Simpson, A. E. Pink, P. Di Meglio, C. H. Smith, V. Pullabhatla, J. Knight, S. L. Spain, F. O. Nestle, A. D. Burden, F. Capon, R.

- C. Trembath, J. N. Barker, 'Mutations in IL36rn/IL1f5 Are Associated with the Severe Episodic Inflammatory Skin Disease Known as Generalized Pustular Psoriasis', *Am J Hum Genet*, 89 (2011), 432-7.
- 68 G. Partsch, G. Steiner, B. F. Leeb, A. Dunky, H. Broll, J. S. Smolen, 'Highly Increased Levels of Tumor Necrosis Factor-Alpha and Other Proinflammatory Cytokines in Psoriatic Arthritis Synovial Fluid', *J Rheumatol*, 24 (1997), 518-23.
- 69 J. Pene, S. Chevalier, L. Preisser, E. Venereau, M. H. Guilleux, S. Ghannam, J. P. Moles, Y. Danger, E. Ravon, S. Lesaux, H. Yssel, H. Gascan, 'Chronically Inflamed Human Tissues Are Infiltrated by Highly Differentiated Th17 Lymphocytes', *J Immunol*, 180 (2008), 7423-30.
- 70 T. Persichini, N. Maio, M. C. di Patti, G. Rizzo, S. Toscano, M. Colasanti, G. Musci, 'Interleukin-1beta Induces Ceruloplasmin and Ferroportin-1 Gene Expression Via Map Kinases and C/EBPbeta, Ap-1, and Nf-Kappab Activation', *Neurosci Lett*, 484 (2010), 133-8.
- 71 J. Racine, R. K. Aaron, 'Pathogenesis and Epidemiology of Osteoarthritis', *R I Med J* (2013), 96 (2013), 19-22.
- 72 L. J. Rather, 'Disturbance of Function (Functio Laesa): The Legendary Fifth Cardinal Sign of Inflammation, Added by Galen to the Four Cardinal Signs of Celsus', *Bull N Y Acad Med*, 47 (1971), 303-22.
- 73 S. P. Raychaudhuri, 'Role of IL-17 in Psoriasis and Psoriatic Arthritis', *Clin Rev Allergy Immunol*, 44 (2013), 183-93.
- 74 K. Raza, F. Falciani, S. J. Curnow, E. J. Ross, C. Y. Lee, A. N. Akbar, J. M. Lord, C. Gordon, C. D. Buckley, M. Salmon, 'Early Rheumatoid Arthritis Is Characterized by a Distinct and Transient Synovial Fluid Cytokine Profile of T Cell and Stromal Cell Origin', *Arthritis Res Ther*, 7 (2005), R784-95.
- 75 A. Reininger, M. Gratzl, B. Höhne-Zell, H. Adelsberger, U. Heinzmann, 'Histochemie und Zytochemie', L.C. Junqueira, J. Carneiro, M. Gratzl (Hrsg), *Histologie*, 6. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg (2005), 447
- 76 T. Ruzicka, 'Psoriatic Arthritis. New Types, New Treatments', *Arch Dermatol*, 132 (1996), 215-9.
- 77 G. Scala, P. Allavena, J. Y. Djeu, T. Kasahara, J. R. Ortaldo, R. B. Herberman, J. J. Oppenheim, 'Human Large Granular Lymphocytes Are Potent Producers of Interleukin-1', *Nature*, 309 (1984), 56-9.
- 78 J. A. Schmidt, S. B. Mizel, D. Cohen, I. Green, 'Interleukin 1, a Potential Regulator of Fibroblast Proliferation', *J Immunol*, 128 (1982), 2177-82.
- 79 J. Schmitz, A. Owyang, E. Oldham, Y. Song, E. Murphy, T. K. McClanahan, G. Zurawski, M. Moshrefi, J. Qin, X. Li, D. M. Gorman, J. F. Bazan, R. A. Kastelein, 'IL-33, an Interleukin-1-Like Cytokine That Signals Via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines', *Immunity*, 23 (2005), 479-90.
- 80 D. G. Scott, P. A. Bacon, C. R. Tribe, 'Systemic Rheumatoid Vasculitis: A Clinical and Laboratory Study of 50 Cases', *Medicine (Baltimore)*, 60 (1981), 288-97.

- 81 J. E. Sims, M. J. Nicklin, J. F. Bazan, J. L. Barton, S. J. Busfield, J. E. Ford, R. A. Kastelein, S. Kumar, H. Lin, J. J. Mulero, J. Pan, Y. Pan, D. E. Smith, P. R. Young, 'A New Nomenclature for Il-1-Family Genes', *Trends Immunol*, 22 (2001), 536-7.
- 82 J. E. Sims, D. E. Smith, 'The Il-1 Family: Regulators of Immunity', *Nat Rev Immunol*, 10 (2010), 89-102.
- 83 J. A. Singh, R. Christensen, G. A. Wells, M. E. Suarez-Almazor, R. Buchbinder, M. A. Lopez-Olivo, E. T. Ghogomu, P. Tugwell, 'A Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials of Biologics for Rheumatoid Arthritis: A Cochrane Overview', *CMAJ*, 181 (2009), 787-96.
- 84 T. J. Smeets, R. J. Dolhain, F. C. Breedveld, P. P. Tak, 'Analysis of the Cellular Infiltrates and Expression of Cytokines in Synovial Tissue from Patients with Rheumatoid Arthritis and Reactive Arthritis', *J Pathol*, 186 (1998), 75-81.
- 85 D. E. Smith, B. R. Renshaw, R. R. Ketchem, M. Kubin, K. E. Garka, J. E. Sims, 'Four New Members Expand the Interleukin-1 Superfamily', *J Biol Chem*, 275 (2000), 1169-75.
- 86 J. S. Smolen, R. Landewe, F. C. Breedveld, M. Dougados, P. Emery, C. Gaujoux-Viala, S. Gorter, R. Knevel, J. Nam, M. Schoels, D. Aletaha, M. Buch, L. Gossec, T. Huizinga, J. W. Bijlsma, G. Burmester, B. Combe, M. Cutolo, C. Gabay, J. Gomez-Reino, M. Kouloumas, T. K. Kvien, E. Martin-Mola, I. McInnes, K. Pavelka, P. van Riel, M. Scholte, D. L. Scott, T. Sokka, G. Valesini, R. van Vollenhoven, K. L. Winthrop, J. Wong, A. Zink, D. van der Heijde, 'Eular Recommendations for the Management of Rheumatoid Arthritis with Synthetic and Biological Disease-Modifying Antirheumatic Drugs', *Ann Rheum Dis*, 69 (2010), 964-75.
- 87 J. S. Smolen, G. Steiner, 'Therapeutic Strategies for Rheumatoid Arthritis', *Nat Rev Drug Discov*, 2 (2003), 473-88.
- 88 T. Sokka, H. Kautiainen, T. Mottonen, P. Hannonen, 'Work Disability in Rheumatoid Arthritis 10 Years after the Diagnosis', *J Rheumatol*, 26 (1999), 1681-5.
- 89 M. Sowers, M. Jannausch, E. Stein, D. Jamadar, M. Hochberg, L. Lachance, 'C-Reactive Protein as a Biomarker of Emergent Osteoarthritis', *Osteoarthritis Cartilage*, 10 (2002), 595-601.
- 90 Statistisches Bundesamt, 'Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000 für die 10/20/50/100 häufigsten Diagnosen' (2012), Stand: 01.06.2013, www.gbe-bund.de
- 91 Statistisches Bundesamt, 'Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik). Aus dem Krankenhaus entlassene vollstationäre Patienten (einschl. Sterbe- ohne Stundenfälle). Operationen und Prozeduren bis zum kodierbaren Endpunkt nach Altersgruppen; Sonderauswertung' (2012), Stand: 01.06.2013, www.gbe-bund.de
- 92 Statistisches Bundesamt, 'Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik). Die 50 häufigsten Operationen der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern'(2012) Stand: 01.06.2013,

www.gbe-bund.de

- 93 A. Steinkasserer, N. K. Spurr, S. Cox, P. Jeggo, R. B. Sim, 'The Human Il-1 Receptor Antagonist Gene (Il1rn) Maps to Chromosome 2q14-Q21, in the Region of the Il-1 Alpha and Il-1 Beta Loci', *Genomics*, 13 (1992), 654-7.
- 94 P. P. Tak, T. J. Smeets, M. R. Daha, P. M. Kluin, K. A. Meijers, R. Brand, A. E. Meinders, F. C. Breedveld, 'Analysis of the Synovial Cell Infiltrate in Early Rheumatoid Synovial Tissue in Relation to Local Disease Activity', *Arthritis Rheum*, 40 (1997), 217-25.
- 95 S. Takemura, P. A. Klimiuk, A. Braun, J. J. Goronzy, C. M. Weyand, 'T Cell Activation in Rheumatoid Synovium Is B Cell Dependent', *J Immunol*, 167 (2001), 4710-8.
- 96 W. Taylor, D. Gladman, P. Helliwell, A. Marchesoni, P. Mease, H. Mielants, 'Classification Criteria for Psoriatic Arthritis: Development of New Criteria from a Large International Study', *Arthritis Rheum*, 54 (2006), 2665-73.
- 97 J. E. Towne, B. R. Renshaw, J. Douangpanya, B. P. Lipsky, M. Shen, C. A. Gabel, J. E. Sims, 'Interleukin-36 (Il-36) Ligands Require Processing for Full Agonist (Il-36alpha, Il-36beta, and Il-36gamma) or Antagonist (Il-36ra) Activity', *J Biol Chem*, 286 (2011), 42594-602.
- 98 S. Trattinig, K. Friedrich, K. Bohndorf, 'Knorpel', K. Bohndorf, H. Imhof, K. Wörtler (Hrsg), *Radiologische Diagnostik der Knochen und Gelenke*, 3. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart (2014), 214
- 99 F. L. van de Veerdonk, A. K. Stoeckman, G. Wu, A. N. Boeckermann, T. Azam, M. G. Netea, L. A. Joosten, J. W. van der Meer, R. Hao, V. Kalabokis, C. A. Dinarello, 'Il-38 Binds to the Il-36 Receptor and Has Biological Effects on Immune Cells Similar to Il-36 Receptor Antagonist', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (2012), 3001-5.
- 100 S. M. van der Linden, H. A. Valkenburg, B. M. de Jongh, A. Cats, 'The Risk of Developing Ankylosing Spondylitis in Hla-B27 Positive Individuals. A Comparison of Relatives of Spondylitis Patients with the General Population', *Arthritis Rheum*, 27 (1984), 241-9.
- 101 A. W. van Kuijk, P. Reinders-Blankert, T. J. Smeets, B. A. Dijkmans, P. P. Tak, 'Detailed Analysis of the Cell Infiltrate and the Expression of Mediators of Synovial Inflammation and Joint Destruction in the Synovium of Patients with Psoriatic Arthritis: Implications for Treatment', *Ann Rheum Dis*, 65 (2006), 1551-7.
- 102 D. van Schaardenburg, A. M. Lagaay, H. G. Otten, F. C. Breedveld, 'The Relation between Class-Specific Serum Rheumatoid Factors and Age in the General Population', *Br J Rheumatol*, 32 (1993), 546-9.
- 103 D. Veale, G. Yanni, S. Rogers, L. Barnes, B. Bresnihan, O. Fitzgerald, 'Reduced Synovial Membrane Macrophage Numbers, Elam-1 Expression, and Lining Layer Hyperplasia in Psoriatic Arthritis as Compared with Rheumatoid Arthritis', *Arthritis Rheum*, 36 (1993), 893-900.
- 104 S. Vigne, G. Palmer, C. Lamacchia, P. Martin, D. Talabot-Ayer, E. Rodriguez, F. Ronchi, F. Sallusto, H. Dinh, J. E. Sims, C. Gabay, 'Il-36r

- Ligands Are Potent Regulators of Dendritic and T Cells', *Blood*, 118 (2011), 5813-23.
- 105 A. E. Voskuyl, A. H. Zwinderman, M. L. Westedt, J. P. Vandenbroucke, F. C. Breedveld, J. M. Hazes, 'Factors Associated with the Development of Vasculitis in Rheumatoid Arthritis: Results of a Case-Control Study', *Ann Rheum Dis*, 55 (1996), 190-2.
- 106 K. Waalen, G. W. Duff, O. Forre, E. Dickens, L. Kvarnes, G. Nuki, 'Interleukin 1 Activity Produced by Human Rheumatoid and Normal Dendritic Cells', *Scand J Immunol*, 23 (1986), 365-71.
- 107 D. Wang, Y. Li, Y. Liu, G. Shi, 'The Use of Biologic Therapies in the Treatment of Rheumatoid Arthritis', *Curr Pharm Biotechnol*, 15 (2014), 542-8.
- 108 P. M. Welsing, A. M. van Gestel, H. L. Swinkels, L. A. Kiemeny, P. L. van Riel, 'The Relationship between Disease Activity, Joint Destruction, and Functional Capacity over the Course of Rheumatoid Arthritis', *Arthritis Rheum*, 44 (2001), 2009-17.
- 109 X. Yuan, X. Peng, Y. Li, M. Li, 'Role of Il-38 and Its Related Cytokines in Inflammation', *Mediators Inflamm*, 2015 (2015), 807976.
- 110 W. Zhang, M. Doherty, N. Arden, B. Bannwarth, J. Bijlsma, K. P. Gunther, H. J. Hauselmann, G. Herrero-Beaumont, K. Jordan, P. Kaklamanis, B. Leeb, M. Lequesne, S. Lohmander, B. Mazieres, E. Martin-Mola, K. Pavelka, A. Pendleton, L. Punzi, B. Swoboda, R. Varatojo, G. Verbruggen, I. Zimmermann-Gorska, M. Dougados, 'Eular Evidence Based Recommendations for the Management of Hip Osteoarthritis: Report of a Task Force of the Eular Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (Escisit)', *Ann Rheum Dis*, 64 (2005), 669-81.
- 111 R. Zhao, H. Zhou, S. B. Su, 'A Critical Role for Interleukin-1beta in the Progression of Autoimmune Diseases', *Int Immunopharmacol*, 17 (2013), 658-69.

6 Abkürzungsverzeichnis

ACPA	Antikörper gegen citrullinierte Peptide
ACR	American College of Rheumatology
AP-1	activator protein 1; Transkriptionsfaktor
BiP	binding immunoglobulin protein
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CASPAR	CIASsification criteria for the diagnosis of Psoriatic Arthritis
CCAAT	Cytosin-Cytosin-Adenosin-Adenosin-Thymidin
CD	cluster of differentiation; Oberflächenmolekül
C/EBP	CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine
CRP	C-reaktives Protein
DMARD	disease modifying antirheumatic drug
et al	et alumni
EULAR	European League Against Rheumatism
Fc-Fragment	franz. <i>fragment cristalline</i> ; konstante Region eines Antikörpers
HLA	humanes Leukozytenantigen
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie, immunhistochemisch
IL-	Interleukin-
AcP	akzessorisches Protein
IL-[X]R	Interleukin-[X]-Rezeptor
IL-[X]Ra	Interleukin-[X]-Rezeptorantagonist
kb	Kilobasen
LAF	Lymphozyten-aktivierender Faktor
LEFL	Leflunomid

LP	leukozytäres Pyrogen
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	messenger RNA
MTX	Metotrexat
N/A	Not applicable (nicht zutreffend)
NF- κ B	Nuclear Factor kappaB; Transkriptionsfaktor
NK-Zelle	nartürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
Ns	nicht signifikant
OA	Osteoarthritis
OAi	Osteoarthritis inflamed
OAni	Osteoarthritis non-inflamed
PGE2	Prostaglandin E2
PsA	Psoriasisarthritis
p-Wert	Signifikanzwert
RA	rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
RNA	Ribonucleinsäure
SASP	Sulfasalazin
Th1	T-Helfer-Zelle der Subgruppe 1
Th2	T-Helfer-Zelle der Subgruppe 2
TNF α	Tumornekrosefaktor α
US-gesteuert	Ultrasschall-gesteuert

7 Verzeichnis der Vorveröffentlichungen

„The novel cytokine interleukin-36 α is expressed in psoriatic and rheumatoid arthritis synovium.” Frey S, Derer A, **Messbacher ME**, Baeten DL, Bugatti S, Montecucco C, Schett G, Hueber AJ. Ann Rheum Dis. 2013 Sep 1;72(9):1569-74.

8 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Signaltransduktion von IL-1 durch IL-1R und IL-1RAcP. IL-1Ra verhält sich gegenüber IL-1 als kompetitiver Antagonist am IL-1R und verhindert die Anlagerung von IL-1RAcP und damit die Signalübertragung. 11
- Abbildung 2: Signaltransduktion von IL-36 α durch IL-36R und IL-1RAcP. IL-36Ra verhält sich gegenüber IL-36 α als kompetitiver Antagonist am IL-36R und verhindert die Signalübertragung(rechts). 13
- Abbildung 3: Tonsille 20x vergrößert: Jeweils am linken Bildrand Follikelanschnitt mit membranöser Färbung des IL-36R, vereinzelt auch außerhalb der Follikel kräftig membranös gefärbte Zellen (siehe Pfeil); Zellkerne blau (Hämalaun). 25
- Abbildung 4: DAB-Färbungen für IL-36 α von Synovialgewebe von PsA- (oben links), RA- (unten links) und OA-Patienten (unten rechts) 40x vergrößert. Braun gefärbtes Zytosol der IL-36 α + Zellen, blaue Kernfärbung (Hämalaun). Oben rechts Isotypkontrolle. Publiziert in Frey et al.³⁹ 26
- Abbildung 5: DAB-Färbungen für IL-36R (obere Zeile) und IL-36Ra (mittlere Zeile) in RA- (erste Spalte), PsA- (zweite Spalte) und OA- Synovium (dritte Spalte) 40x vergrößert. Isotyp-Kontrolle unten links. Publiziert in Frey et al.³⁹ 27
- Abbildung 6: Quantifizierung der IHC-Ergebnisse: links Vergleich der IL-36 α - Expression in RA (schwarze Kreise, n=31) mit PsA (schwarze Quadrate, n=17) und OA (offene Kreise, n=22) durch Bewertung der Proteinexpression auf einer Skala von 0 bis 3; rechts Unterscheidung zwischen nicht-entzündlicher OA (OAni, offene Kreise) und entzündlicher OA (OAi, geteilte Kreise). Statistische Analysen wurden mit dem Mann- Whitney Test und Bonferroni Korrektur durchgeführt. *** P<0.0001, **p=0.0011 Publiziert in Frey et al.³⁹ 28
- Abbildung 7: Quantifizierung der IHC-Ergebnisse: Vergleich der IL-36R-Expression (links) und der IL-36Ra-Expression (rechts) in RA (schwarze Kreise), PsA (schwarze Quadrate) und OA (offene Kreise) durch Bewertung der jeweiligen Proteinexpression auf einer Skala von 0 bis 3. IL-36R: RA (n=16), PsA (n=10),OA (n=15); IL-36Ra: RA (n=28), PsA (n=16), OA (n=21). Publiziert in Frey et al.³⁹ 29
- Abbildung 8: RA Synovium links 40x, rechts 100x vergrößert: Doppelfärbung mit DAB für CD20 (braune membranös gefärbte Zellen, siehe grüner Pfeil) und VIP für IL-36 α (violett ebenfalls membranös und schwächer zytosolisch gefärbte Zellen, siehe roter Pfeil). 30
- Abbildung 9: RA Synovium 100x vergrößert: Doppelfärbung mit Alexa488 für CD20 (grün membranös) und Cy3 für IL-36 α (rot zytosolisch/membranös), blaue Kernfärbung mit DAPI. Rechts Isotypkontrolle. Neben spezifisch nur für CD20 oder IL-36 α positiven Zellen finden sich einige doppelgefärbte Zellen (siehe weiße Pfeile). 30
- Abbildung 10: RA links 20x, rechts 100x vergrößert: Fluoreszenz-Doppelfärbung mit Alexa 488 für CD68 (grünes Zytoplasma) und Streptavidin-APC für IL-36 α (rotes Zytoplasma), blaue Kernfärbung mit DAPI. Kein Nachweis von doppelgefärbten Zellen. 31
- Abbildung 11: RA 20x (A, B) und 100x vergrößert(C-E): Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit Alexa 488 für CD138 (grün) und Cy3 für IL-36 α (A, C), IL-36Ra (D) und IL-36R (E) (rot). Blaue

Gegenfärbung mit DAPI. Isotypkontrolle (B). Publiziert in Frey et al. ³⁹

32

Abbildung 12: Tonsille 20x vergrößert: Fluoreszenz-Doppelfärbung mit Alexa488 für CD3 (grüne membranös gefärbte Zellen) und Cy3 für IL-36 α (rot membranös gefärbte Zellen), blaue Kernfärbung mit DAPI. Rechts Isotypkontrolle. Kein Nachweis von doppelgefärbten Zellen.

33

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei all denjenigen zu bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben:

An erster Stelle bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Georg Schett für die freundliche Übernahme und formelle Betreuung, sowie die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten des Histologielabors.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. med. Dr. Axel Hueber: für das interessante Thema, die Einführung in die histologischen Techniken, sowie die hilfreichen Ideen und seine immerwährende fachliche und menschliche Unterstützung in jeder Phase der Erstellung dieser Arbeit.

Außerdem Dr. rer. nat. Silke Frey und der gesamten AG Hueber für die freundschaftliche Gesellschaft und Motivation.

Prof. Dr. med. Dominique Baeten, Dr. med. Dr. rer. nat. Serena Bugatti und Prof. Dr. med. Carlomaurizio Montecucco für die freundliche Bereitstellung der histologischen Gewebeproben und nicht zuletzt Eugenia Scheffler und Barbara Happich für die Anfertigung der Gewebeschnitte.

Besonders möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester danken, die mich seit jeher liebevoll unterstützt und mir in Höhen und Tiefen stets zur Seite gestanden haben.