

Aus dem Institut/der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Antikörper gegen mutiertes citrulliniertes Vimentin vom Typ IgG
und IgA als prädiktive und verlaufstherapeutische Biomarker für
das Therapieansprechen auf Rituximab bei Patienten mit
Rheumatoider Arthritis

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Luisa Lindenberg

aus Werneuchen

Datum der Promotion: 09.09.2016

Meinem Vater gewidmet

Abstrakt

Einleitung: Die rheumatoide Arthritis (RA) ist aufgrund ihres systemisch-autoimmunen Charakters durch eine frühzeitige Funktionseinschränkung der betroffenen Gelenke sowie eine erhöhte Mortalität gekennzeichnet. Biologische „Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs“ DMARDs wie die B-Zell-Depletionstherapie (BZDT) mittels Rituximab (RTX) können aufgrund ihrer gezielten immunmodulatorischen und effektiven Wirkweise eine Krankheitsremission in therapierefraktären RA-Patienten erzielen. Bei zirka einem Drittel versagt jedoch auch diese Biologika-Therapie. Eine frühzeitige Identifikation dieser Patienten anhand validierter Biomarker ist von großem Interesse. Antikörper gegen mutiertes citrulliniertes Vimentin (AMCV) kennzeichnet aufgrund ihres synovialen Ursprungs eine hohe Sensitivität für RA-Patienten und Korrelation mit der Krankheitsaktivität. Bislang wurde unzureichend untersucht, ob die Verteilung der Immunglobulin-Subklassen des AMCV als Korrelat der BZ-Aktivität einen prädiktiven und verlaufstherapeutischen Effekt unter der BZ-Depletion für RTX aufzeigt.

Methodik: In dieser Studie wurden 50 AMCV IgG-positive RA-Patienten auf ihre Immunglobulinsubklassen-Verteilung (IgM, IgA) vor und 24 Wochen nach der RTX-Intervention in Abhängigkeit vom Therapieansprechen (Responder/Non-Responder) untersucht. Die Antikörpertiter wurden mittels „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ bestimmt und mit dem diagnostisch etablierten Rheumafaktor (RF) und den Antikörpern gegen cyclisches, citrulliniertes Peptid (ACCP) verglichen.

Ergebnisse: Die AMCV IgG-positiven Patienten, die auf die Therapie ansprachen, wiesen vor Therapiebeginn weniger häufig den AMCV-Subtypus IgA auf (Sensitivität 42 %, Spezifität 100 %). Ein negativer Befund für AMCV IgA war mit einer hohen Wahrscheinlichkeit prädiktiv für ein erfolgreiches RTX-Ansprechen (Negativer Prädiktiver Wert = 0,86). Die Reduktion der AMCV IgA-Titer während der Therapie korrelierte mit der Verbesserung der Krankheitsaktivität und der erzielten Therapieantwort nach sechs Monaten. Patienten mit einem Therapieversagen wiesen häufiger eine prätherapeutische Doppelpositivität für AMCV IgG und IgA mit stabilen AMCV IgA-Werten unter der Therapie auf. AMCV IgA-positive Patienten kennzeichnete weiterhin eine verstärkte Koinzidenz der AMCV-Subtypen und des RF IgA. Im Vergleich konnte keine dieser Beobachtungen für die Immunglobulin-Isotypen des RF und der ACCP beobachtet werden.

Schlussfolgerung: Die differente AMCV IgA-Kinetik in Abhängigkeit von dem Therapieansprechen der Patienten könnte auf persistierende IgA-Plasmablasten (PB) zurückgeführt werden, die reaktiv im Sinne einer immunologischen Erinnerungsfunktion auf mukosale Auslöser aus gewebsresistenten Gedächtnis-BZ hervorgehen. Bei fehlender RTX-Sensibilität der PB könnte die anhaltende IgA-Produktion die erhöhte Krankheitsaktivität und das Therapieversagen von RTX in diesen Patienten bewirken.

Take home points: Als Beitrag zu einer personalisierten Medizin in RA-Patienten deutet die prätherapeutische Konstellation von positivem AMCV IgG bei negativem AMCV IgA und/oder abnehmenden AMCV IgA-Titern während der Therapie auf ein erfolgreiches RTX-Ansprechen hin.

Schlagwörter: Rheumatoide Arthritis, Anti-citrullinierte Antikörper, Immunglobulin-Subklassen, MCV IgA-Antikörper, B-Zell-Depletion, Rituximab, mukosale Plasmablasten und Gedächtniszellen, therapeutischer Biomarker

Abstract

Introduction: Rheumatoid arthritis (RA) is characterized by premature functional disability of involved joints and elevated mortality due to its systemic autoimmune disorder. Biological “disease modifying anti-rheumatic drugs” (DMARDs) like b-cell depletion therapy (BCDT) with rituximab (RTX) are due to their immunomodulatory mechanism an effective treatment of patients refractory to conventional therapy. However, nearly one third of patients fail to this biological treatment. An early identification of these patients is required. Antibodies against mutated citrullinated vimentin (AMCV) appear to play a central role in pathogenesis and association with disease activity due to their inflammatorily synovial origin and sensitivity for RA-patients. The relation between immunoglobulin isotypes (IgG, IgM, IgA) of AMCV as correlate of the B-cell kinetic and treatment benefit following B-cell depletion by RTX is insufficiently elucidated.

Methods: In this study, 50 AMCV-positive RA-patients were tested for their immunoglobulin subtype profiles (IgM, IgA) before and 24 weeks after RTX-administration with reference to response outcome. Antibody titers were determined by “enzyme-linked immunosorbent assay” technique and compared to diagnostically established rheumatoid factor (RF) and antibody against cyclic, citrullinated peptide (ACCP).

Results: AMCV IgG-positive patients, who responded to RTX, were more frequently AMCV IgA negative at baseline (sensitivity of 42 %, specificity of 100 %). An absence of AMCV IgA would predict a good response to RTX by a great probability (negative predictive value = 0.86). The reduction of AMCV IgA-titers upon BCDT correlated with the improvement of disease activity and treatment response. Non-responders to RTX showed more frequently a double-positivity for AMCV IgG and IgA with stable AMCV IgA-titers during RTX-treatment. Furthermore, AMCV IgA-positive patients showed a higher coincidence of AMCV-isotypes and RF IgA. In comparison to RF and ACCP no divergences in subtype courses could be observed.

Conclusion: The different AMCV IgA-kinetic upon BCDT for responders and non-responders could be explained by circulating IgA-plasmablasts (PB) developing from tissue-resident memory b-cells in consequence of mucosal triggers. The RTX-resistance of PB and maintenance of IgA-production could be responsible for high disease activity and non-response to RTX observed in certain patients.

Take home points: With the aim of “personalized medicine” for RA-patients, restrictive baseline constellation of AMCV IgG without concomitant AMCV IgA and/or declining AMCV IgA-titers upon treatment could predict a good RTX-response.

Key Words: rheumatoid arthritis, immunoglobulin-subtypes, anti-citrullinated antibodies, MCV IgA antibodies, B-cell depletion, rituximab, mucosal plasmablasts and memory-cells, therapeutic biomarker

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Rheumatoide Arthritis (RA)	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie.....	1
1.1.2 Symptomatik, Klassifikation und Krankheitsaktivität.....	2
1.1.3 Ätiopathogenese.....	3
1.1.4 Prognose.....	5
1.2 Therapie	6
1.2.1 Klassische und Biologische „Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs“.....	6
1.2.2 Biologische B-Zell-Depletionstherapie mit Rituximab (RTX).....	7
1.2.2.1 Exkurs: B-Zell-Reifung und Entstehung der Immunglobulin-Isotypen.....	7
1.2.2.2 Pharmakodynamik des RTX.....	8
1.3 RA-assoziierte Biomarker (RA-assoziierte Autoantikörper)	11
1.3.1 Rheumafaktor (RF).....	12
1.3.2 Antikörper gegen citrullinierte Peptide/ Proteine (ACPAs).....	12
1.3.2.1 Antikörper gegen cyclisches citrulliniertes Peptid/Protein (ACCP).....	12
1.3.2.2 Antikörper gegen mutiertes citrulliniertes Vimentin (AMCV).....	12
1.3.3 Diagnostische Bedeutung.....	14
1.3.4 Prognostische Bedeutung.....	15
1.3.5 Therapeutische Bedeutung.....	15
1.4 Zielsetzung und Arbeitshypothese der Arbeit	16
2 Patienten und Methodik	18
2.1 Patienten	18
2.1.1 Charakteristik der Patienten.....	18
2.1.2 Einschlusskriterien der vorliegenden Studie.....	18
2.1.3 Charakteristik des Studienkollektivs.....	19
2.2 Methodik	20

2.2.1 Studienaufbau.....	20
2.2.2 Bestimmung der Autoantikörper mittels „Enzyme-linked-Immunosorbent Assay“	20
2.3 Statistik.....	24
3 Ergebnisse.....	26
3.1 Die Einteilung der Patienten in Non-/Responder auf RTX.....	26
3.2 Die Autoantikörperverteilung der Patienten vor RTX-Therapiebeginn.....	27
3.2.1 Die AMCV-Isotypen-Verteilung bei RR und NRR vor der RTX-Therapie	28
3.2.2 Die RF und ACCP-Isotypen-Verteilung in RR und NRR vor der RTX-Therapie	31
3.3 Die Autoantikörperverläufe der Patienten unter RTX-Therapie	32
3.3.1 Die AMCV-Titerverläufe von RR und NRR unter RTX-Therapie.....	33
3.3.2 Die AMCV IgA-Titerverläufe in Abhängigkeit von der Therapieantwort der Patienten	38
3.3.3 Die RF und ACCP-Titerverläufe von RR und NRR unter RTX-Therapie.....	40
3.4 Korrelation der Autoantikörper mit dem „Disease Activity Score 28“.....	44
3.5 Die Assoziation der Autoantikörper mit den AMCV-Isotypen.....	46
3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	49
4 Diskussion	50
4.1 Prätherapeutische Prädiktoren für die B-Zell Depletionstherapie mittels RTX.....	51
4.1.1 Prädiktive Parameter auf genomischer Ebene.....	51
4.1.2 Prädiktive Parameter auf klinischer Ebene	52
4.1.3 Prädiktive Parameter auf humoraler Ebene.....	53
4.1.4 Prädiktive Parameter auf zellulärer Ebene	54
4.2 Verlaufstherapeutische Prädiktoren für die B-Zell Depletionstherapie mittels RTX.....	56
4.2.1 Verlaufstherapeutische Parameter auf humoraler Ebene.....	56
4.2.2 Verlaufstherapeutische Parameter auf zellulärer Ebene	58
4.3 Die Assoziation der Autoantikörper mit den AMCV-Isotypen.....	60
4.4 Die Bedeutung der Immunglobulinklasse IgA (AMCV IgA)	61
4.4.1 Physiologie und Pathophysiologie des IgA.....	61

4.4.2 RA-spezifische Autoantikörper vom Typ IgA.....	63
4.4.3 Zellulärer und histologischer Ursprung des IgA	63
4.4.4 Bedeutung des IgA in einer RTX-Non-Response	64
4.5 Anspruch an einen Biomarker: AMCV IgA als therapeutischer Marker?.....	65
4.6 Limitationen der Studie	67
4.6.1 Probandenkollektiv.....	68
4.6.2 Testmethodik	69
4.7 Weiterführende Investigationen.....	70
4.8 Relevanz der Studie.....	71
Literaturverzeichnis	73
Eidesstattliche Versicherung	83
Lebenslauf.....	84
Anteilsklärung an den erfolgten Publikationen.....	84
Danksagung	87

Abkürzungsverzeichnis

AAK	Auto-Antikörper
ACCP	Antikörper gegen zyklisches citrulliniertes Peptide/Protein
ACPA	Anti-Citrullinierte Protein Antikörper
ACR	American College for Rheumatology
AIE	Autoimmunerkrankung
AMCV	Antikörper gegen mutiertes citrulliniertes Vimentin
AV	Abhängige Variable eines Tests
BAFF (BLyS)	B-Cell Activating Factor (B-Lymphocyte Stimulator)
BSG	Blutkörperniedrigungsgeschwindigkeit
BZ	B-Zellen
BZD	B-Zell-Depletion
BZDT	B-Zell-Depletionstherapie
CRP	C-reaktives Protein
DAS28	Disease Activity Score in 28 joints
DMARDs	Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs (b = biologische; k = klassische)
ELISA	Enzyme-Linked-Immunesorbent Assay
ERA	Frühe (Early) Rheumatoide Arthritis
EULAR	The European League Against Rheumatism
HAQ-Score	Health Assessment Questionnaire-Score
HKA	Hohe Krankheitsaktivität
IgG/IgM/IgA	Immunglobulin G/Immunglobulin M/ Immunglobulin A
MKA	Mittlere Krankheitsaktivität
MTX	Methotrexat
NKA	Niedrige Krankheitsaktivität
NRR	<u>Non-Responder</u> auf <u>Rituximab</u>

n	Anzahl der Patienten
PB	Plasmablasten
PZ	Plasma-Zellen
R	Remission
RA	Rheumatoide Arthritis
RAAK	RA-assoziierte Autoantikörper
RF	Rheumafaktor
RR	<u>R</u> esponder auf <u>R</u> ituximab
RTX	Rituximab
s	Standardabweichung
sIg	Serum-Immunglobuline
TNFI	Tumor-Necrosis-Factor- α -Inhibitor
UA	Undifferenzierte Arthritis
UAV	Unabhängige Variable eines Tests

1 Einleitung

Die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Antikörper gegen mutiertes citrulliniertes Vimentin vom Typ IgG und IgA als prädiktive und verlaufstherapeutische Biomarker für das Therapieansprechen auf Rituximab bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis“ betrachtet die therapiebedingten Veränderungen erkrankungsspezifischer Autoantikörper von Patienten mit Rheumatoider Arthritis unter B-Zell-depletierender Therapie. Einleitend wird ein Schwerpunkt auf die Charakteristik und Bedeutung der drei grundlegenden Aspekte dieser Arbeit „Rheumatoide Arthritis, assoziierte Biomarker und Biologika-Therapie“ gelegt. Hierbei wird der aktuelle Forschungsstand hinsichtlich diagnostischer, prognostischer und therapeutischer Erkenntnisse beleuchtet, in dessen Zusammenhang wir die Intention zur Durchführung unserer Untersuchung sehen und beschreiben werden.

1.1 Rheumatoide Arthritis

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Die rheumatoide Arthritis (RA) als ein Hauptvertreter der Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises ist eine autoimmune Systemerkrankung, die als weltweit häufigste entzündliche Gelenkerkrankung vorwiegend die Gelenke betrifft [1]. Die RA imponiert primär als eine inflammatorische Reaktion des synovialen Gelenkgewebes mit progressiver Gelenkszerstörung und Funktionsverlust, die sich im Verlauf auf weitere Organsysteme ausdehnt und durch kardiovaskulär und neoplastisch bedingte Begleiterkrankungen mit einer verfrühten Mortalität einhergeht [2]. In Deutschland betreffen muskuloskelettale Erkrankungen ein Viertel der Bevölkerung, unter denen RA mit einer Prävalenz von 0,65 % der Gesamtbevölkerung zu den häufigsten chronischen Gelenkerkrankungen zählt [3]. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen 50 und 70 Jahren mit einer Inzidenz von 25-30 bei Männern bzw. 50-60 bei Frauen (pro 100.000 Einwohner pro Jahr) [3]. Insbesondere durch ihre hohe Prävalenz, ihren zum Teil rasch progredienten Krankheitsverlauf und ihre behandlungsabhängige Prognose ist sie von hoher Bedeutsamkeit, die nicht zuletzt durch die immensen direkten und indirekten Kosten im Gesundheitssystem sowie durch die individuelle und sozio-ökonomische Beeinträchtigung des Patienten untermauert wird [4].

1.1.2 Symptomatik, Klassifikation und Krankheitsaktivität

Symptomatik: Die RA imponiert durch das klassische Bild einer Entzündung des betroffenen Gelenkes („Dolor, Calor, Tumor, Rubor und Functio laesa“) als schmerzhaft, palpable Schwellung mit Bewegungseinschränkung und Gelenksteifigkeit (Morgensteifigkeit) [5]. Sie manifestiert sich an den direkten artikulären (Capsulitis, Chondritis, Ostitis) und den indirekt beteiligten Strukturen (Bursitis synovialis, Tendovaginitis), die eine Synovialmembran als gemeinsame, ursächliche Komponente (Synovitis) besitzen [5]. Die sehr frühe Symptomatik wird oft durch unspezifische Beschwerden im Sinne einer noch undifferenzierten Arthritis (UA) auffällig und kann in eine frühe RA übergehen. Sie tritt als Mon- oder Polyarthritis primär an kleinen Gelenken auf und ergreift im Verlauf symmetrisch auch größere Gelenke mit entzündungsbedingten Spätfolgen wie Fehlstellungen und Ankylosen im Endstadium („Rheumatische/r Hand/Fuß“) [5]. Als systemische und chronische Komponente treten ebenfalls extraartikuläre Manifestationen wie Rheumaknoten, viscerale Organbeteiligungen und Fatigue auf [5].

Klassifikation: Zur Klassifizierung der RA gelten seit 2010 die von 1987 überarbeiteten Kriterien der internationalen Organisationen „American College of Rheumatology“ (ACR) sowie „European League Against Rheumatism“ (EULAR) (s. Tab. 1) [6].

Tab. 1: Die überarbeiteten ACR/EULAR-Klassifikationskriterien einer rheumatoiden Arthritis von 2010 [6]

	Punktwert*
1. Gelenkbeteiligung	
1 mittelgroßes bis großes Gelenk	0
mehr als 1 mittelgroßes bis großes Gelenk, nicht symmetrisch	1
mehr als 1 mittelgroßes bis großes Gelenk, symmetrisch	1
1 bis 3 kleine Gelenke	2
4 bis 10 kleine Gelenke	3
mehr als 10 Gelenke (kleine Gelenke eingeschlossen)	5
2. Serologie (RF und ACPA)	
weder RF noch ACPA positiv	0
niedrigtitriger Nachweis mindestens eines Antikörpers (< 3-faches des Referenzwertes)	2
hochtitriger Nachweis mindestens eines Antikörpers (≥ 3-faches des Referenzwertes)	3
3. Dauer der Synovitis	
weniger als 6 Wochen	0
mindestens 6 Wochen	1
4. Akute Phase- Reaktion	
weder CRP noch BSG auffällig	0
auffälliges CRP oder auffällige BSG	1

* ab einem Punktwert von ≥ 6 Klassifikation als definitive rheumatoide Arthritis

Die ursprüngliche Klassifikation erfolgte anhand von Kriterien für eine bereits etablierte RA wie subkutane Rheumaknoten, symmetrische Arthritis mehrerer Gelenkregionen, Nachweis des weniger spezifischen Rheumafaktors (RF) und röntgenologisch messbare Veränderungen [7]. In der neuen *ACR/EULAR-Klassifikation* von RA-Patienten wurde die Labordiagnostik entscheidend durch die RA-spezifischen anti-citrullinierten Peptid-Antikörper (ACPAs) ergänzt, die eine Früherkennung der RA (Early Rheumatoid Arthritis ERA) ermöglichen [6].

Krankheitsaktivität: Die klinische Beurteilung der RA und Krankheitsaktivität erfolgt in der Praxis über den „*Disease Activity Score 28*“ (DAS28). Er kalkuliert mathematisch mehrere Variablen zu einem Indexwert (Punkteskala 2,0-10,0) [8]:

- das Ausmaß der Synovitis anhand der Anzahl geschwollener und druckschmerzhafter Gelenke (je 0-28 von an 28 EULAR-definierten Gelenken),
- die Akute-Phase-Reaktion (Blutkörper senkungsgeschwindigkeit BSG oder C-reaktives Protein CRP) sowie
- subjektive Einschätzung des Patienten durch den Patient und Arzt (Visuelle Analogskala 0-100 mm).

In regelmäßigen Bestimmungen erzielt der Score die Bewertung der Krankheitsaktivität im Verlauf und unter Therapie, wodurch eine qualitative Vergleichbarkeit von Werten eines Patienten, jedoch aufgrund des Ordinal-Skalenniveaus kein quantitativer und interindividueller Vergleich ermöglicht wird [8]. Ergänzend evaluieren patientenbezogene Assessments die Funktionabilität (Health Assessment Questionnaire HAQ, Funktionsfragebogen Hannover) und Lebensqualität des Patienten (Short Form 36-Gesundheitsfragebogen, Patientenselbsteinschätzung, Fatigue). Weiterhin können bildgebende Verfahren wie Arthro-Sonografie (Synovitis, Erosion), Röntgen (subchondrale Osteoporose, Demineralisierung, Erosionen, Ankylosen, Gelenkfehlstellungen) und Schnittbildverfahren hinzugezogen werden [9].

1.1.3 Ätiopathogenese

Autoimmunreaktion: Bei der Entstehung der RA als eine Autoimmunerkrankung gegen endogene Antigene besitzen die B-Zellen (BZ) eine Schlüsselfunktion: Sie sind als Antigen-präsentierende Zellen über die T-Zell-Aktivierung und als Autoantikörper- sowie

Einleitung

Zytokinproduzenten über die Chemotaxis weiterer Immunzellen entscheidend an der lokalen und systemischen Immunreaktion beteiligt [10].

Bei den endogenen Antigenen der RA handelt es sich insbesondere um citrullinierte Peptide, deren Citrullin-Domänen als Epitope für die Autoantikörper (AAK) von BZ fungieren und als Anti-Citrullinierte-Protein-Antikörper (ACPAs) bezeichnet werden [11]. Citrullinierung ist ein physiologischer, posttranslatinaler Vorgang in Zellen, bei dem aus der proteinogenen Aminosäure Arginin die nicht-proteinogene Aminosäure Citrullin durch Peptidylarginin-Deiminasen (PADI-2/4) katalysiert wird [12]. Demzufolge enthalten eine Reihe physiologischer Proteine Citrullin wie Fibrinogen, Kollagen II und Vimentin [11]. Diese enzymatische Reaktion bedarf höherer intrazellulärer Kalzium-Konzentrationen, die im Rahmen von zellulären Plasmamembran-Imbalancen und Apoptose in inflammatorischen Prozessen auftreten. Überdies können externe Faktoren wie Tabak, gastrointestinale Mikroorganismen und *Porphyromonas gingivalis* direkt eine Citrullinierung auslösen [11, 13]. Die Citrullinierung ist folglich nicht RA-spezifisch und ursächlich, sondern lediglich ein natürlicher Indikator für einen zellulären Umsatz und Auslöser für die RA-spezifische Intoleranz gegenüber diesen citrullinierten Epitopen.

Der Verlust der Immuntoleranz wiederum basiert grundsätzlich auf mannigfaltigen, genetischen Veränderungen im zellulären Genom der Immunzellen, die zu der zellulären, zellinteraktiven und/oder humoralen Fehlreaktion führen. In diesem Zusammenhang wird der HLA-DRB1-Lokus (HLA-DRB1*1001) hervorgehoben, der die β -Kette des MHC II-Komplexes auf den Antigen-präsentierenden BZ codiert („shared epitope“ SE) und mit höherer Affinität jene citrullinierten Reste als „rheumatoides Epitop“ erkennt [10].

Lokale und systemische Entzündungsreaktion: Die autoimmune Reaktion und klinische Erstmanifestation der RA findet sich im Stütz- und Bewegungsapparat insbesondere der Gelenke mit übergeordneter Beteiligung der inneren Membran (Synovialmembran mit Fibroblasten- und Makrophagen-ähnlichen Synoviozyten) [10]. Bestimmte Proteine wie Vimentin werden fast ausschließlich in den Synoviozyten beobachtet (s. hierzu 1.3.2.2) und könnten die Entstehung einer chronischen Synovitis mit pathognomonischer Pannusbildung erklären, die sich auf die gesamten artikulären Strukturen mit einer Zerstörung der Gelenkarchitektur auswirkt [14] (s. Abb. 1).

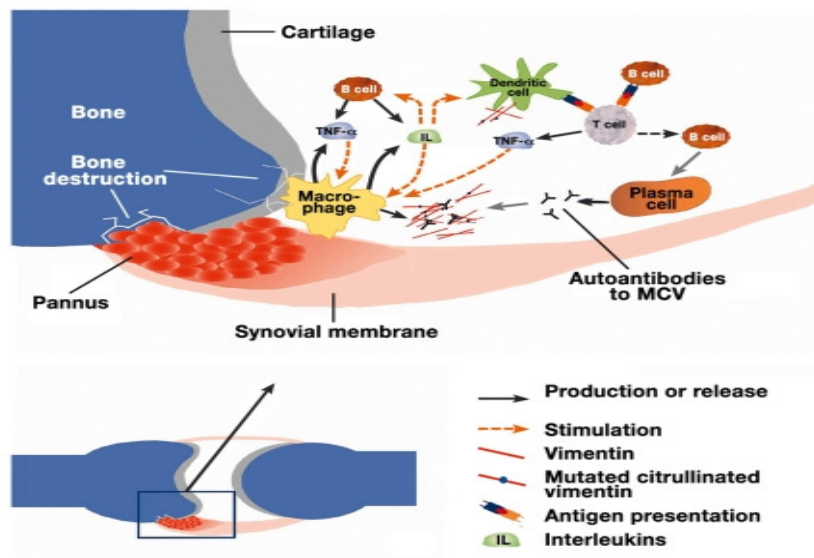


Abb. 1: Entstehung und Aufrechterhaltung der synovialen Entzündung in RA durch ACPAs (speziell: Mutiertes Citrulliniertes Vimentin MCV), aus: Egerer K, 2009 [14]

Das ubiquitäre Vorkommen der citrullinierten Antigene sowie die Zirkulation von Entzündungsmediatoren bedingt den systemisch entzündlichen Charakter der RA, der ursächlich für eine verfrühte Mortalität der RA-Patienten sein kann [10].

1.1.4 Prognose

Unbehandelt zeichnet sich in der RA wie bei der Mehrzahl der chronischen, systemischen Erkrankungen eine schlechte Prognose ab. Erosive Veränderungen der Gelenke treten bereits vier Monate nach Symptombeginn ein und können innerhalb von einem Jahr bereits zu einer wesentlichen Funktionseinschränkung der betroffenen Gelenke führen [15]. Aufgrund der Systemerkrankung besteht eine infektiös, kardiovaskulär oder onkologisch bedingte, erhöhte Mortalität gegenüber der Normalbevölkerung [2]. Konsequenzen der individuellen Funktionseinschränkung ergeben sich für den Patienten und das medizinische Gesundheitssystem auf zahlreichen Ebenen: physisch (Einschränkungen im Alltag/Beruf), psychisch (Fatigue, depressive Komorbiditäten, Chronifizierung des Schmerzes), sozial (Isolation, Frühberentung) und wirtschaftlich (direkte, indirekte, intangible Krankheitskosten) [4, 15]. Durch das heutige RA-Management, welches den Weg von der Diagnosestellung bis zur adäquaten Therapie beschreibt, zeichnete sich in den letzten Dekaden ein besseres Überleben der RA-Patienten ab [16].

1.2 Therapie

1.2.1 Klassische und Biologische „Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs“

Die adäquate Therapie der RA hat einen symptomarmen/-losen Zustand im Sinne einer kompletten Remission als Ziel („Target“) und meint die Verhinderung einer klinischen, radiologischen und funktionellen Progression der Arthritis und Systemerkrankung [17]. Das Vorgehen zum Erreichen der Remission wird als „Treating Rheumatoid Arthritis to Target“(T2T)-Management bezeichnet, welches anhand der klinischen Gelenkscores (u.a. DAS28) in regelmäßigen Kontrollen bewertet wird [17].

Die medikamentöse Therapie ist neben der ganzheitlich rehabilitativen Behandlung der Grundpfeiler in der Behandlung des RA-Progresses und setzt sich aus zwei Säulen zusammen: die klassische/konventionelle und biologische „Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug“ (DMARD)-Therapie mit dem Übergang von einer breiten, allgemeinen zu einer gezielten, pathogenetisch-orientierten Therapie [18].

Die *klassischen DMARDs* (kDMARDs) in Form von Zytostatika oder Immunsuppressiva (insbesondere Methotrexat MTX, Sulfasalazin SSZ, Leflunomid) besitzen eine DNA- bzw. Zellzyklus-modifizierende Wirkweise mit einer relativ unspezifischen und reversiblen Hemmung der Proliferation sich neubildender Zellen (Autoimmunzellen, aber auch des gastrointestinalen Epithels usw.) [19]. Im Sinne einer immunsuppressiven Behandlung reduzieren sie die Krankheitsaktivität und bewirken eine Progressionshemmung der Gelenksdestruktion [19]. Trotz des relativ breiten Nebenwirkungsprofils (gastrointestinale Symptome, Augen-, Nieren- und Leberschädigungen, Alopexie, allergische Hautreaktionen, Blutbildveränderungen) werden sie von den Patienten in der Regel gut toleriert und nach Diagnosestellung als erste Wahl als Basistherapeutika auf lange Zeit verabreicht [19].

Der zunehmende Erkenntnisgewinn in der Pathogenese der RA eröffnete die Ära von Antikörper-basierten Wirkstoffen („*biologische DMARDs*, *bDMARDs* oder *Biologika*“), die das Immunsystem auf humoraler (Zytokine: TNF- α , Interleukine), zellulärer (Lymphozyten) und intrazellulärer Ebene beeinflussen. Zu ihnen zählen aktuell vier Substanzklassen und neun zugelassene Wirkstoffe, die bei initial-therapierefraktärer RA in Kombination mit MTX eingesetzt werden [18]:

- fünf TNF- α -Inhibitoren (TNFI): Infliximab, Adalimumab, Certolizumab Pergol, Golimumab, Etanercept;
- zwei Interleukin-Inhibitoren (ILI): Tocilizumab (IL6I) und Anakinra (IL1I);
- T-Zell-Costimulator-Inhibitoren: Atabacept;
- *B-Zell-Antagonist als B-Zell-Depletions-Therapie: Rituximab*;
- Die neueren intrazellulären Signalkaskade-Inhibitoren (Janus-Kinase: Tofacitinib) zählen offiziell nicht zu den bDMARDs, sondern zu den targeted-synthetical DMARDs.

Aufgrund der Thematik meiner Arbeit wird die B-Zell-Depletionstherapie (BZDT) mittels Rituximab nachfolgend ausführlicher vorgestellt.

1.2.2 Biologische B-Zell-Depletionstherapie mit Rituximab (RTX)

Rituximab (RTX) umschreibt als „direktes B-Zell-Targeting“ einen chimären, monoklonalen Antikörper (mab) gegen Oberflächenmoleküle (Cluster of differentiation CD) auf BZ (CD20-Rezeptor) [20]. Um die untersuchten Autoantikörperprofile dieser Studie vor dem Hintergrund der therapeutischen Effekte des RTX zu verstehen, ist die Kenntnis der physiologischen BZ-Reifung und Immunglobulin-Subklassen-Generierung grundlegend und sei vorab kurz dargestellt:

1.2.2.1 Exkurs: B-Zell-Reifung und Entstehung der Immunglobulin-Isotypen

Naive BZ (CD19+/CD20+) entstehen im Knochenmark aus diversen Vorstufen (Stammzellen, Prä/Pro-B-Zellen) und begeben sich ohne Antigen-Kontakt in sekundäre lymphoide Organe (Primärfollikel) (s. **Abb. 2 a**) [21]. Nach Antigen-Kontakt (über einen transmembranären IgM-Rezeptor) formieren sie sich unter T-Helfer-Zell-Stimulation in Keimzentren mit weiteren Immunzellen zu Sekundärfollikeln (oder ebenfalls T-Zell-unabhängig und außerhalb von Lymphfollikeln) (s. **Abb. 2 b**) [22]. Unter ständiger Antigen-Präsentierung durchlaufen die unreifen BZ mittels somatischer Hypermutation der Antigen-Bindungsstellen eine Verbesserung der Spezifität ihrer Antikörper und den Klassenwechsel ihrer Immunglobuline (Ig): Aus dem aviden IgM, das im Rahmen einer ersten Reaktion auf unbekannte Antigene von unreifen BZ sezerniert wird, findet ein Übergang zu dem affinen IgG bzw. IgA aus reifen BZ statt [22]. Die BZ differenzieren zu den reifen, kurzlebigen und ins Blut rezirkulierenden Plasmablasten (PB: CD19+/CD20-), die durch einen Verlust des CD20-Rezeptors gekennzeichnet sind, oder zu langlebigen Gedächtniszellen (Memory-B-Zellen MBZ: CD19+/CD20+) (s. **Abb. 2 c**) [22].

MBZ besitzen im Sinne einer *immunologischen Gedächtnisfunktion* die Fähigkeit, nach abgelaufenen Immunreaktionen im Falle eines neuen Antigen-Kontaktes, PB zu bilden und aktive Immunreaktionen auszulösen („reaktive humorale Gedächtnisfunktion“) sowie ihre Antigen-Affinität in Keimzentrumsreaktionen zu verbessern (s. Abb. 2 d) [23]. PB differenzieren zu PZ, sind postmitotisch und begeben sich zurück in Knochenmarksnischen (IgG-PZ) oder Mukosa-assoziierte, lymphatische Gewebe (MALT: IgA-PZ) [24]. Die PZ schützen dort den Organismus mit niedrigen, konstanten Antikörperproduktionen vor Reinfektionen („konstitutive humorale Gedächtnisfunktion“), was eines bestimmten Zytokin- und Antigen-Milieus bedarf [24]. Die PZ bilden gemeinsam mit den MBZ die grundlegende humorale Abwehr [23]. Bei Reinfektionen treten somit Erhöhungen der IgG- bzw. IgA-Antwort auf und bei Neuinfektionen findet eine IgM-Antwort statt.

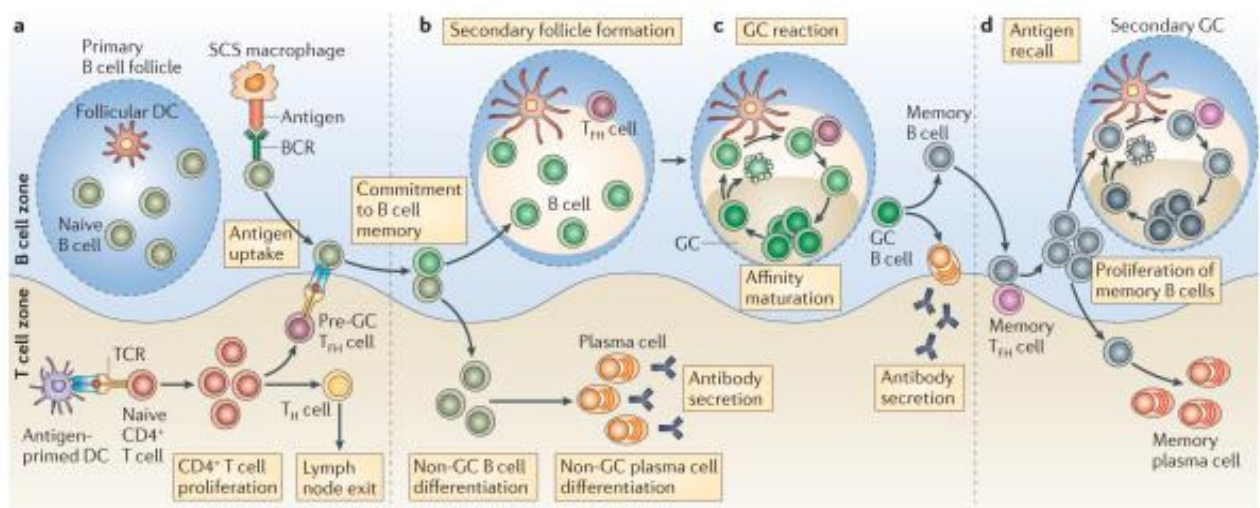


Abb. 2: Die T-Helfer-Zell-abhängige Reifung der B-Zellen (BZ) von naiven BZ zu Plasmazellen und Memory-B-Zellen in oder außerhalb von Keimzentren (Germinal Centers GC) von Lymphfollikeln lymphoider Gewebe (BCR: B-Cell-Receptor; DC: Dendritic Cell; SCS: Subcapsular Sinus; TCR: T-Cell-Receptor); aus McHeyzer-Williams 2012 [22]

1.2.2.2 Pharmakodynamik des RTX

Wirkweise von RTX

Die CD20-Depletion (BZ-Depletion BZD) betrifft folglich die aktivierten BZ und MBZ, hingegen nicht die BZ-Vorläufer (Stammzellen, Pro/Prä-BZ) und BZ-Nachfolger (PB/PZ). Einen Überblick über den Besitz der BZ an CD-Rezeptoren gibt Abb. 3 [25].

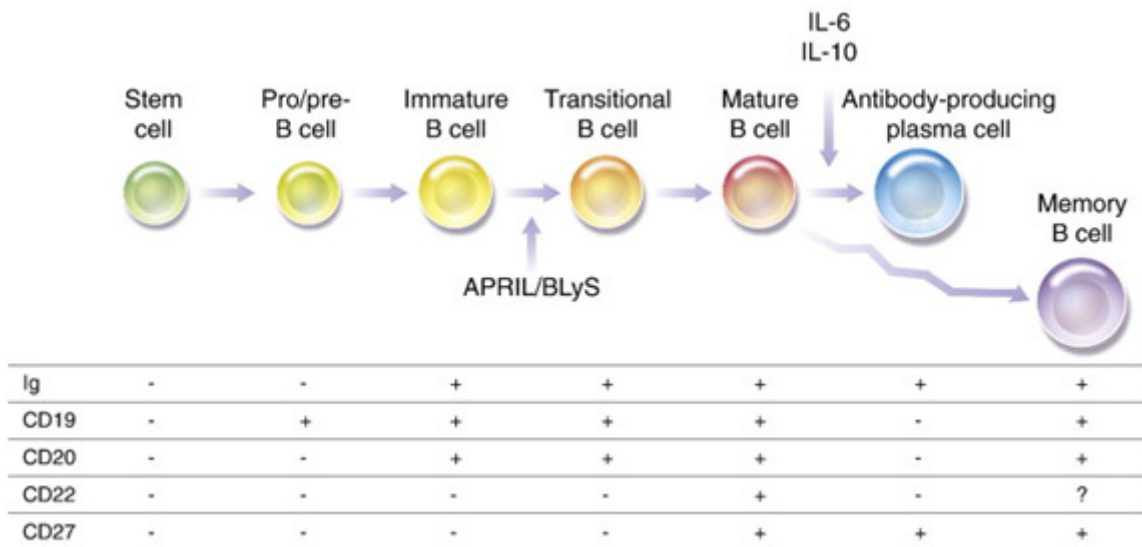


Abb. 3: Darstellung der B-Zell-Reifung von der naiven B-Zelle zur Memory-B-Zelle mit dem jeweiligen Besatz an spezifischen Cluster of Differentiation (CD)-Rezeptoren; aus Dörner, 2010 [25]

Die MBZ/PB (als direkte Nachfolger der aktuell-depletierten BZ) werden indirekt und dadurch zeitversetzt ebenfalls reduziert [26]. Die Depletion hängt weiterhin von der histologischen Verteilung der BZ ab (peripheres Blut > Knochenmark > Synovium) [27, 28]. Unter Vorbehalt, dass es sich um eine rein theoretische Annahme handelt, würde sich im Rahmen dieser BZD eine Reduktion des IgM (durch die Reduktion der naiven BZ) ergeben. Weiterhin würde sich durch die Depletion der MBZ ohne die Beteiligung der PB/PZ eine Reduktion des IgG bzw. IgA ergeben, die in Abhängigkeit von histologischen Verteilung und Erreichbarkeit der MBZ durch RTX steht.

Insgesamt hängt die erfolgreiche Wirkung des RTX von der *Pharmakokinetik/-dynamik und der individuellen BZ-Kinetik* ab: Das Wechselspiel aus monoklonalem Antikörper und dem CD20-Oberflächenmolekül der BZ bedingt eine Übereinstimmung von RTX-Dosis und der individuellen BZ-Anzahl inklusive der histologischen Verteilung der BZ und Gewebegängigkeit des RTX, der vorherrschenden RTX-sensiblen BZ-Subpopulationen und des vorrangigen Wirkmechanismus von RTX im Patienten (bei der Elimination der BZ) [29].

Wirkmechanismus von RTX

RTX wirkt auf dreierlei Wege BZ-depletierend (s. Abb. 4) [30]: Aufgrund seiner mab-Morphologie (Fc-Teil) löst RTX auf BZ eine Antikörper-gesteuerte Zytotoxizität der BZ aus

Einleitung

(über bestimmte Fc-Rezeptoren von Natural-Killer-Zellen, Monozyten/Makrophagen) (s. Abb. 4 B1 und 2). Zudem bewirkt RTX eine Komplement-abhängige Zytotoxizität (über C1q s. Abb. 4 B3). Letztlich, aber weniger effektiv, verursacht es die direkte BZ-Apoptose durch Aggregation mehrerer Fab-gebundener BZ oder den direkten Zelltod (s. Abb. 4 A). Als relevantester Weg wird die Komplement-bedingte Elimination der BZ angesehen.

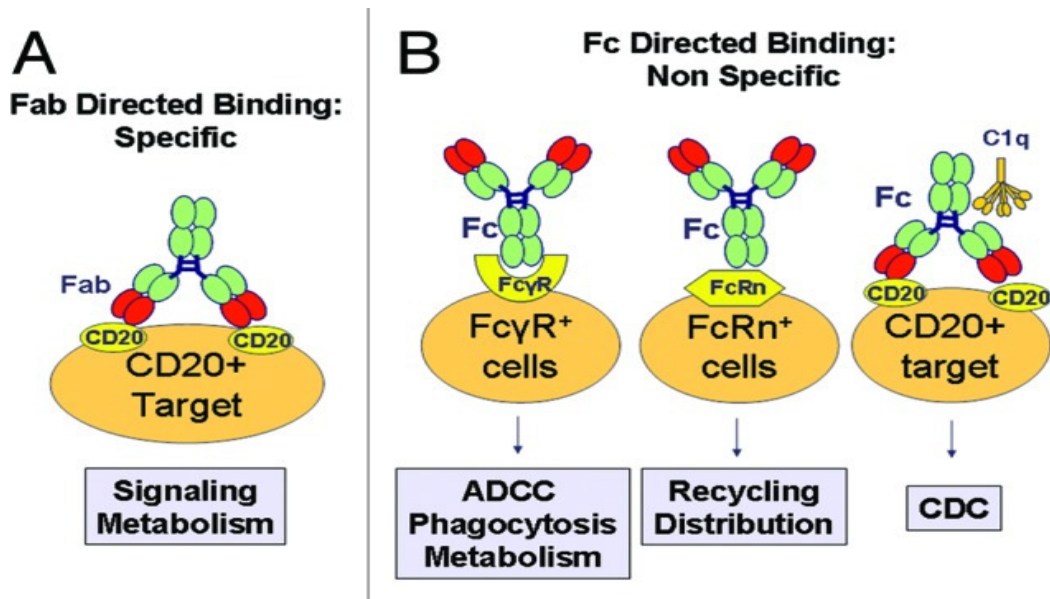


Abb. 4: RTX-bedingte, wirtsbezogene Immunreaktionen zur Elimination der autoimmunen B-Zellen (CD20+ Target) durch spezifische (A) bzw. unspezifische (B1-2-3) Zytotoxizität durch den Fab- bzw. Fc-Teil des RTX, aus: Golay 2013 [30]

Indikation, Applikation und Arzneimittelsicherheit von RTX

Seit der Autorisierung im Jahr 2006 ist RTX insbesondere nach dem Versagen eines TNFI als Biologikum der zweiten Wahl indiziert [31]. Bei prognostisch ungünstigen Risikofaktoren (bekanntes Lymphom oder Malignom, latente Tuberkulose, demyelinisierende Erkrankungen) wird es entsprechend der EULAR-Leitlinien von 2013 sogar als Erstlinien-Therapie empfohlen [18]. Nach heutigen Richtlinien wird es in zwei Infusionen (1000 mg) innerhalb von zwei Wochen (Tag 1 und 15) appliziert [31]. Eine absolute BZD ($< 0.0001 \times 10^9$ Zellen/Liter) ist nach zwei Wochen im Blut nahezu jedes Patienten nachweisbar [30, 31]. Der Wirkbeginn datiert sich auf 8-16 Wochen mit einer Wirkdauer von 24-48 Wochen [30, 31]. Eine Repopulation von BZ findet nach 6-12 Monaten statt, weshalb eine erneute Applikation oft innerhalb dieses Zeitraumes als nächster Zyklus erfolgt [30, 31].

Der große Vorteil einer Biologikum- und insbesondere RTX-basierter Therapie besteht darin, dass sie durch ihren gezielten immunmodulatorischen Eingriff den Krankheitsprogress nachweislich aufhalten kann und eine Therapieoption für Patienten darstellt, bei denen die Basistherapie und sogar ein erstes Biologikum keine Remission erzielte [32]. Die Therapie ist bei parenteraler Applikation und ärztlicher Überwachung nicht abhängig von der Compliance des Patienten hinsichtlich der Medikamenteneinnahme, schneller wirksam und erlaubt für RTX im halbjährigen Zyklus eine einfache Patientenführung. Des Weiteren ist RTX in einer Monotherapie ebenso effektiv wie in Kombination mit MTX und stellt eine gute Alternative in Patienten mit Kontraindikationen für MTX dar [33].

Von Nachteil sind im Allgemeinen die hohen Kosten der Biologika, wobei RTX von einer guten Kosteneffektivität profitiert [34]. Weiterhin besteht durch die Immunsuppression eine höhere Rate an (viralen, bakteriellen, fungalen) Neuinfektionen, infektiösen Reaktivierungen (Tuberkulose, Hepatitis) und Neoplasien, wobei für RTX eine gute Arzneimittelsicherheit ohne schwere Ereignisse über die allgemeinen Risikofaktoren (Alter, Komorbidität, extraartikuläre Manifestation, prätherapeutisch existente Hypogammaglobulinämie) hinaus aufgezeigt werden konnte [35]. Die Entscheidung zu einer Biologikum-basierter Therapie und die Wahl der geeigneten Wirksubstanz aus den heterogenen Wirkstoffgruppen ist für den Rheumatologen ein Abwägen vieler Faktoren und richtet sich bislang nach klinischen Gesichtspunkten ohne validierte Biomarker.

1.3 RA-assozierte Biomarker (RA-assozierte Autoantikörper)

Biomarker auf humoraler, zellulärer, genomischer, klinischer Ebene zählen in der Medizin durch ihre physiologische Aktivität bzw. ihr pathologisches Aufkommen zu den wichtigsten objektiven Instrumentarien in der Prädiktion, Diagnostik und Therapie bestimmter Erkrankungen [36]. Bei der RA zählen humorale Parameter zu den wichtigsten Biomarkern: Parameter der Akute-Phase-Reaktion (BSG und CRP) werden als weitestgehend unspezifische Marker vieler inflammatorischer und onkologischer Prozesse bestimmt. Weitaus spezifischer sind serologisch messbare, krankheitsassoziierte Autoantikörper (AAK) im Patientenserum. Zurzeit werden zwei Gruppen von AAK mit unterschiedlicher Charakteristik zu diagnostischen Zwecken verwendet: *Rheumafaktor (RF)* und *Antikörper gegen citrullinierte Peptide/Proteine (ACPAs)* [37]. Die bislang bedeutendsten RA-assozierten Autoantikörper (RAAK), die auch Gegenstand unserer

Untersuchung waren, werden im Folgenden bezüglich ihrer morphologischen und krankheitsbezogenen (diagnostischen, prognostischen, therapeutischen) Charakteristik näher beleuchtet:

1.3.1 Rheumafaktor (RF)

RF ist ein AAK vom IgM/IgG/IgA/IgE-Typ, der sich selbst gegen den Fc-Teil (C γ 2–C γ 3) eines autologen Antikörpers (bestehend aus Fab- und Fc-Teil) vom IgG-Typ richtet und sowohl im Serum als auch Synovium der RA-Patienten nachweisbar ist [38]. Im Zusammenhang mit der RA war RF der erste AAK, der durch eine Hämagglutinationsreaktion des RA-Patientenserums mit Schafserythrozyten entdeckt wurde (Erik Waaler 1937) [39]. Durch die Unterscheidung zwischen erkrankten („seropositiven“) und gesunden („seronegativen“) Personen mittels des „Waalser-Rose-Tests“ revolutioniert RF seit über 70 Jahren das Erkrankungsbild und ist seit 1987 fester Bestandteil der ACR/EULAR-Klassifikation [7].

1.3.2 Antikörper gegen citrullinierte Peptide/Proteine (ACPAs)

Die Gruppe der Antikörper gegen citrullinierte Proteine (ACPAs) geht auf die Entdeckung der Anti-Filaggrin-Antikörper (bzw. Anti-Keratin-Antikörper) zurück, die 24 Jahre nach der RF-Entdeckung gegen Antigene in der Mundschleimhaut und in keratinisierten Geweben von RA-Patienten beschrieben wurden [40]. Die citrullinierten Antigene umfassen heute eine Vielzahl an bereits aufgedeckten und noch zu entdeckenden Proteinen: α -Enolase, Fibrin/-ogen, Vimentin und Kollagen II [11]. ACPAs etablierten sich maßgeblich neben dem RF als pathognomonisches Korrelat für die RA und sind seit 2010 ebenfalls Bestandteil der RA-Klassifikation [6].

1.3.2.1 Antikörper gegen cyclisches citrulliniertes Peptid (ACCP)

Antikörper gegen cyclisches citrulliniertes Peptid (ACCP, insbesondere IgG) sind die bisher am besten untersuchten ACPAs. Dabei beschreiben sie kein physiologisch vorkommendes, sondern eine synthetisch hergestellte, zyklische Anordnung von citrullinierten Peptiden, auf die AAK aus dem Serum des Patienten in der ELISA-Testmethode reagieren [41]. Diese Detektion geht seitdem mit stetigen testmethodischen Verbesserungen für eine genauere Diagnostik einher (CCP1-CCP3.1) und ist mit dem Test zweiter Generation am häufigsten klinisch etabliert [41].

1.3.2.2 Antikörper gegen mutiertes citrulliniertes Vimentin (AMCV)

Antikörper gegen mutiertes citrulliniertes Vimentin (AMCV) als eine der jüngst entdeckten ACPAs verkörpern heute einen Parameter mit wesentlichen Besonderheiten zu den genannten AAK, weshalb sie zentraler Gegenstand unserer Untersuchung wurden und hier detaillierter aufgeführt werden:

Morphologie, Vorkommen: Vor zwei Dekaden begann mit der Untersuchung des sogenannten Sa-Antigens und den assoziierten Antikörpern in der Milz, der Plazenta und der Synovialflüssigkeit der Gelenke sowie nachfolgend in RA-Patienten die Entdeckung der citrullinierten Variante des Vimentins [42]. Vimentin zählt als mesenchymales Intermediärfilament zum eukaryontischen Zytoskelett und ist zentraler Bestandteil der Makrophagen- und Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten in der Synovialmembran der Gelenkkapsel [42]. MCV stellt als mutierte und citrullinierte Form eine Isoform des Vimentins dar: Die citrullinierte Komponente entspricht der beschriebenen Citrullinierung von Argininresten zu Citrullin durch die PADI-2/4 [12]. Die mutierte Komponente stellt eine Besonderheit des MCV dar, welche durch Bang et al. [43] mittels Massenspektroskopie als Ersatz diverser Glycinreste durch Arginin beschrieben wurde. Der hohe Arginingehalt führt zu einer höheren Citrullindichte des MCV, welche die Autoimmunantwort vermehrt triggern könnte.

Pathophysiologischer Prozess: Die Freisetzung dieser mutierten und citrullierten Form, die nachfolgend zur BZ-gerichteten Autoimmunantwort führt, erfolgt insbesondere während der Apoptose aus den synovialen Makrophagen, die während inflammatorischer Prozesse zum Zelltod neigen und stets neue Blutmonozyten rekrutieren [12].

Das synoviale Vorkommen von MCV mit dem entzündungsbedingten Auftreten von AMCV bedingt einen stärkeren pathogenetischen Zusammenhang dieser Antikörper mit der Arthritis der Patienten. Durch die Assoziation mit dem Makrophagenzerfall im Rahmen der Entzündungsaktivität könnte durch die Antikörper ebenfalls ein Hinweis auf die Krankheitsaktivität der RA gegeben werden. Eine Korrelation des AMCV mit den druckschmerzhaften/geschwollenen Gelenken sowie dem CRP in aktiven im Gegensatz zu inaktiven RA-Patienten untermauert diese Annahme [44]. Weiterhin stimulieren AMCV direkt die Osteoklastogenese und folglich den Knochenabbau, was eine stärkere Gelenkschädigung

Einleitung

bewirkt [45]. Das Auftreten von AMCV spiegelt aus diesem Grunde die (radiologisch nachgewiesene) Gelenkerosion besser als andere ACPAs wider [46].

1.3.3 Diagnostische Bedeutung

Eine detaillierte Darstellung der diagnostischen, prognostischen und therapeutischen Charakteristika der einzelnen Antikörper im Vergleich gibt **Tab. 2**.

Tab.2: Darstellung der RA-bezogenen Charakteristik des RF, ACCP, AMCV als Biomarker

Diagnostische Wertigkeit				
	RF	ACCP	AMCV	Quellen
Sensitivität	69%	67%	77%	47,48
Spezifität	86%	96%	89%	
positive Likelihood-Ratio	4,86	12,46	7,24	
RA-bezogene Prädiktion (Jahre; Sensitivität)	RF IgA (1,5; 39%)	ACCP IgG bzw. IgA (2,5; 35,2 bzw. 23,9%)	AMCV IgG (1; 57,40%)	49-51
Prognostische Wertigkeit				
Korrelation mit radiologischer Progression	ja	ja	ja	53-55
Korrelation mit DAS28, BSG/CRP	nein	nein	ja (r = 0,17-0,8)	44,56,57
Korrelation mit extraartikulärer Manifestation	ja	ja	ja	14,49,53
Therapeutische Wertigkeit				
prädiktiver Biomarker				
kDMARDs	RF IgM	nein	? *	60
TNFI	positiver Prädiktor RF IgM	nein	? *	58,59
	negativer Prädiktor RF IgA	ACCP IgG	? *	114
Monitoring-Biomarker				
kDMARDs	RF IgM	ACCP IgG (nur ERA)	? *	61
TNFI	RF IgM	nein	AMCV IgG	52,58,59,62

RF und ACPAs sind feste Bestandteile der RA-Klassifikationskriterien, jedoch unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer Validität [6, 7]. Basierend auf Metaanalysen besitzen RF und ACCP eine mittelgradige und AMCV die höchste Sensitivität für RA-Patienten [47, 48]. Hingegen zeugt ACCP von höchster Spezifität und Likelihood-Ratio [47]. Die Antikörper können bereits vor dem klassischen RA-Symptombeginn (3 Monate bis 2,5 Jahre) im Serum des Patienten nachgewiesen werden und den Übergang aus einer UA in eine ERA anzeigen [49-51]. Trotz des bislang eher additionalen Charakters könnte AMCV IgG zunehmend alleinige diagnostische Bedeutung aufgrund seines Vorkommens in ACCP und/oder RF-negativen Patienten finden [44, 52].

1.3.4 Prognostische Bedeutung

Das Auftreten der RAAK ist mit einem höheren Schweregrad der Erkrankung (radiologisch gemessene Gelenkbeteiligung) vergesellschaftet [53]. Insbesondere die ACPAs und allen voran AMCV prädisponiert für den Grad der Progression, bei der eine therapeutisch-bedingte Reduktion des AMCV die radiologischen Langzeitergebnisse verbessert [54, 55]. Als einziger RAAK zeichnete sich AMCV durch eine Korrelation mit der Krankheitsaktivität (BSG/CRP, Anzahl geschwollener/druckschmerzhafter Gelenke und HAQ) aus [44, 56]. Insbesondere die Korrelation von AMCV und DAS28 im Erkrankungsverlauf verdeutlicht eine starke Assoziation mit dem entzündlich aktiven Verlauf der Erkrankung, welcher Grundvoraussetzung für die Reflexion einer Therapie als Biomarker ist (s. Tab. 2) [57].

1.3.5 Therapeutische Bedeutung

Aufgrund der heterogenen Studienlage (Untersuchungsschwerpunkt, Studiendesign, verschiedene Therapeutika mit dem Schwerpunkt auf TNFI) ist lediglich eine richtungsweisende Aussage möglich. Insgesamt wurde überwiegend eine Seropositivität des RF (RF IgM) vor der Therapie und eine Reduktion unter klassischer bzw. biologischer Therapie mit einem besseren Ansprechen auf die Therapieform postuliert, während sich ACCP insgesamt nahezu stabil verhielt [58-61]. Die Studienlage zu AMCV ist zum jetzigen Zeitpunkt auf wenige Untersuchungen begrenzt. Im direkten Vergleich mit weiteren ACPAs (ACCP, Anti-Fibrinogen, Anti- α -Enolase) konnten lediglich für AMCV Titerreduktionen beschrieben werden, die bei Patienten unter intensivierter klassischer oder in Biologika-Kombination mit einem Therapieerfolg einhergingen [62]. AMCV korrelierte mit dem DAS28 zum jeweiligen Messzeitpunkt, während ACCP dies nicht erzielte (s. Tab. 2) [52].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass RF und ACCP aufgrund ihres frühzeitigen Auftretens, ihrer Spezifität und Assoziation mit artikulären sowie extraartikulären Erkrankungsmanifestationen gute diagnostische und prognostische Charakteristiken aufweisen [47, 49]. Die kürzlich detektierten Antikörper gegen das mutierte, citrullinierte Vimentin heben sich insbesondere durch folgende Merkmale hervor:

- synoviales Vorkommen und inflammatorisches Auftreten [42],
- hohe Sensitivität für RA, niedrige Falsch-Positiv-Rate [48],

- z. T. in (RF-, ACCP-) seronegativen Patienten [44],
- Korrelation mit der Krankheitsaktivität [54, 56, 57],
- in Korrelation mit der (radiologisch gemessenen) Gelenkdestruktion durch direkte Stimulation der Osteoklastogenese [45, 62],
- therapeutisches Monitoring unter klassischen DMARDs und TNFI [52, 62].

1.4 Zielsetzung und Arbeitshypothese der Arbeit

Aktueller Forschungsstand: In therapierefraktären RA können Antikörper-positive Patienten von Biologika-basierten Therapien (insbesondere RTX) profitieren [31, 32]. Bei zirka einem Drittel der Patienten versagt jedoch ebenfalls diese Therapieoption, weshalb eine Prädiktion notwendig erscheint. Die Besonderheiten und limitierte Studienlage zu den MCV-Antikörpern führten zu unseren Untersuchungen der AMCV-Antikörper unter B-Zell depletierender Therapie mit RTX.

Zielsetzung: Das Anliegen der vorliegenden Arbeit besteht darin, in einem AMCV-positiven Patientenkollektiv unter B-Zell-Depletionstherapie, eine Subgruppe an Patienten hinsichtlich der Immunglobulin-Isotypenverteilung zu identifizieren, die von RTX profitieren könnte. Das Ziel ist die Bestimmung eines prädiktiven und verlaufstherapeutischen Biomarkers für RA-Patienten unter RTX-Therapie.

Grundannahmen: In der Auseinandersetzung mit der Untersuchung ergaben sich folgende Fragestellungen und theoretische Annahmen, die als Grundvoraussetzung gegeben sein müssten, damit AMCV therapiebezogene Merkmale aufweisen kann:

i) Können Immunglobulin-Isotypen (Typ M, G, A) des AMCV unterschiedliche Krankheitsentitäten der RA charakterisieren und prädiktiv sein?

Die Subklassen IgM, IgG und IgA verkörpern im Allgemeinen einen unterschiedlichen Aktivitätszustand/Reifegrad von BZ (mit Bezug auf Punkt 1.2.2.1). Das Vorherrschen oder die Kombination bestimmter Isotypen könnte demzufolge die Krankheitsaktivität der Patienten genauer kategorisieren. Die Subklasse IgA des AMCV geht mit schwerwiegenderen Krankheitsverläufen der RA einher und könnte somit auf eine schwer therapierbare RA hindeuten [63].

Einleitung

ii) Spiegeln AMCV die Krankheitsaktivität unter Therapie wider und erlauben sie eine Verlaufskontrolle?

Das entzündungsbedingte, synoviale Auftreten des MCV aus Synoviozyten bedingt die hohe Sensitivität der Antikörper gegen MCV für eine Synovitis und legt eine Assoziation zur Krankheitsaktivität nahe [54, 56]. Anhand der Titerhöhe des AMCV könnte demzufolge eine quantitative Bewertung der Krankheitsaktivität unter Therapie erfolgen.

iii) Werden die AMCV-Titer durch die BZDT beeinflusst und erlauben sie eine therapeutische Verlaufskontrolle?

Eine Depletion der BZ lässt einen direkten Einfluss auf die Antikörperspiegel im Serum annehmen [64], jedoch in Abhängigkeit von der eliminierten BZ-Subpopulation und der vorrangigen Isotypus-Produktion. Auf diese Weise könnten sich abhängige Antikörperprofile ergeben, die den Verlauf expliziter widerspiegeln könnten.

Arbeitshypothese: Um meine Arbeitshypothese „*Verteilung der AMCV-Isotypen in Abhängigkeit vom Therapieansprechen der Patienten auf die BZDT mit RTX*“ zu überprüfen, untersuchte ich retrospektiv die Antikörperprofile von AMCV IgG/IgM/IgA in Patienten mit einem Ansprechen bzw. Versagen auf eine erstmalige RTX-Intervention hinsichtlich der folgenden drei Sachverhalte:

- die Verteilung der AMCV-Isotypen vor der RTX-Therapie (Prädiktion),
- die Verläufe der AMCV-Isotypen unter der RTX-Therapie (Monitoring) und
- ein Vergleich der AMCV-Isotypen mit RF und den CCP-Antikörpern (Stellenwert der AMCV).

2 Patienten und Methodik

2.1 Patienten

2.1.1 Charakteristik der Patienten

Für die gewünschte Untersuchung wurden Seren von 64 deutschen Patienten (aus der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie/Immunologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin Campus Charité Mitte, Berlin, Deutschland) und 27 russischen Patienten (aus dem Federal Almazov Heart, Blood and Endocrinology Centre, St. Petersburg, Russland) genutzt. Diese Patienten erfüllten die ACR/EULAR-Kriterien einer RA (s. Tab. 1) [6]. Alle Patienten wiesen ein vorheriges Versagen einer kDMARDs-Therapie (MTX, SSZ, Leflunomid und/oder HCQ) sowie zum Teil auch einer bDMARDs-Therapie mit aktiver RA auf (DAS28-Werte > 3,2). Aufgrund des unzureichenden Ansprechens war entsprechend der EULAR-Leitlinien ein weiterführendes Biologikum indiziert [18]. Die Mehrheit der deutschen Patienten erhielt RTX als Biologikum der zweiten Wahl nach vorausgegangener TNFI-Refraktärität. Den russischen Patienten wurde bereits nach MTX-Refraktärität überwiegend RTX als Biologikum der ersten Wahl („RTX-first-line“) verabreicht. Die Patienten erhielten am Tag 1 und 15 jeweils eine intravenöse Infusion von 1000 mg RTX als ersten Zyklus [31]. Weiterhin erhielt der Großteil der Patienten entsprechend der derzeitigen Leitlinien zur Biologika-ergänzenden Therapie als Basismedikation MTX [18]. Bei Patienten mit Kontraindikationen für MTX (schwere Leber- und Nierenfunktionsstörungen) wurde eine RTX-Monotherapie durchgeführt. Die Re-Evaluation der Patienten hinsichtlich der Krankheitsaktivität unter Therapie erfolgte nach einem, drei und sechs Monaten [17]. Zu Beginn und im Verlauf erfolgte eine venöse Blutabnahme in Serumröhrchen, die zentrifugiert, aliquotiert und bei < -20 ° Celsius bis zur weiteren Untersuchung gelagert wurden. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité genehmigt. Alle Patienten willigten in die Durchführung der Studie mit einer Einverständniserklärung ein.

2.1.2 Einschlusskriterien der vorliegenden Studie

Mein Fokus lag auf der Untersuchung eines AMCV IgG-positiven Kollektivs vor erstmaliger RTX-Applikation, wodurch sich folgende Einschlusskriterien der zur Verfügung stehenden Patienten (n = 91) ergaben:

- erstmalige RTX-Intervention nach klassischer bzw. TNFI-Therapierefraktärität,

- positiver AMCV IgG-Titer (≥ 20 U/ml) vor der RTX-Intervention,
- verfügbares Probenmaterial und DAS28-Dokumentationen vor und nach sechs Monaten des ersten Zyklus RTX.

Hierdurch ergab sich eine Reduktion der deutschen Patientenzahl von 64 auf 37 und der russischen Patientenzahl von 27 auf 13, sodass die Studie insgesamt 50 Patienten einschloss.

2.1.3 Charakteristik des Studienkollektivs

Die 50 einbezogenen Patienten wiesen die folgenden Charakteristika auf: Die Patienten waren überwiegend weiblichen Geschlechts ($n = 35/50$). Sie waren durchschnittlich 52,71 Jahre ($\pm 10,02$) alt mit einem jüngsten bzw. höchsten Alter von 18 bzw. 72 Jahren. Die durchschnittliche Erkrankungsdauer betrug 46,95 ($\pm 66,13$) Monate (bzw. $3,91 \pm 5,51$ Jahre) mit der niedrigsten bzw. höchsten Dauer von einem Monat bzw. 231 Monaten. Von den 50 Patienten waren vor der RTX-Therapieintervention 20 Biologikum-naiv (8 deutsche, 12 russische) und 30 (29 deutsche, 1 russischer) erhielten RTX als zweites Biologikum nach erstem Biologikum-Versagen. Hierunter wurden 30 von 50 Patienten mit Infliximab (TNFI) behandelt. 38 von 50 erhielten kotherapeutisch MTX ($\varnothing 19,04$ mg/Tag) und 21 von 50 Prednisolon ($\varnothing 7,22$ mg/Tag) (s. Tab. 3).

Tab. 3: Charakteristik der 50 eingeschlossenen RA-Patienten mit erstmaligem RTX-Zyklus

Geschlecht (weiblich; n, %)	35/50	70 %
Lebensalter (Jahre \pm SD)	52,71	10,0
Krankheitsdauer (Monate \pm SD)	46,95	66,13
Versagen der Basistherapie (MTX,Sulfasalazin, Azathioprin, Leflunomid) (n, %)	50/50	100%
RTX als Erstlinien-Biologikum (n, %)	20/50	40 %
RTX als Zweitlinien-Biologikum (n, %)	30/50	60 %
Begleitmedikation:		
MTX (n, mittlere Dosis in mg pro Woche)	76,19 %	19,04
Prednisolon (n, mittlere Dosis mg/Tag)	42,86 %	7,22
Antikörper-Positivität		
RF IgG (n, %)	3/50	6 %
Anti-CCP IgG (n, %)	46/50	92 %
Anti-MCV IgG (n, %)	50/50	100 %
mittlerer DAS28 aller Patienten vor RTX (\pm SD)	5,93	1,08

2.2 Methodik

2.2.1 Studienaufbau

In die Studie flossen die Daten vor und 24 Wochen nach der RTX-Applikation ein, da sich der Wirkbeginn von RTX auf 16 Wochen mit einer Wirkdauer von 24 bis maximal 48 Wochen datiert. Die Visite der Patienten umfasste eine venöse Blutabnahme und eine Evaluation der Krankheitsaktivität. Die venöse Blutbestimmung beinhaltete die Akute-Phase-Proteine (BSG und CRP) sowie die serologischen Marker zu unserer Studie. Die Krankheitsaktivität des Patienten wurde anhand des DAS28 eingeschätzt. Die weiterführende serologische Bestimmung umfasste die Bestimmung der RA-assoziierten AAK (RF, ACCP, AMCV).

2.2.2 Bestimmung der Autoantikörper mittels „Enzyme-linked-Immunsorbent Assay“

Für die Untersuchung wurden die Reaktivitäten von IgG, IgM und IgA für AMCV und RF sowie IgG für ACCP vor und 24 Wochen nach der RTX-Intervention getestet. Die Bestimmung der AAK im Serum der Patienten erfolgte mit der „Enzyme-linked-Immunsorbent Assay“ (ELISA)-Technik.

Testprinzip des ELISA

Ein ELISA basiert auf dem immunologischen Prinzip einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Nachzuweisende Antikörper (AAK) im Serum des Patienten binden synthetisch hergestellte Antigene und werden über einen Enzym-gekoppelten Antikörper gegen den AAK (anti-IgG) sichtbar gemacht (indirekter ELISA) (s. Abb. 5) [65].

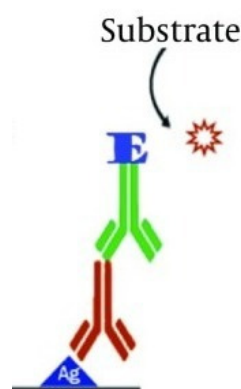


Abb. 5: Testprinzip des indirekten ELISA-Verfahrens, aus: Heiat M, 2014 [65]

Grundsätzlicher Testaufbau des ELISA für alle Immunglobuline

Die Antigene der AAK sind an die feste Phase von Mikrotiterplatten gebunden und durch Inkubation mit einem vorverdünnten Patientenserum werden die darin enthaltenen AAK gebunden. Durch Waschung wird der nicht-gebundene Anteil entfernt. In einem zweiten Reaktionsschritt binden synthetisch und enzymatisch-markierte (Peroxidase) anti-human-IgG an die AAK. Nach erneuter Waschung werden überschüssige Konjugatmoleküle entfernt und die gebundenen Immunkomplexe mit dem Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) inkubiert. Es findet ein enzymatisch-bedingter Farbumschlag einer farblosen Lösung (TMB) zum blauen Reaktionsprodukt (oxidiertes TMB) statt. Durch Zugabe einer sauren Stopplösung wird die Reaktion beendet (gelber Farbumschlag). Dieses farbliche Reaktionsprodukt besitzt für jede Patientenkapazität eine spezifische optische Dichte, die photometrisch bestimmt werden kann. Anhand einer Standardkurve, die durch Kalibrierung von Standardlösungen bekannter ansteigender Konzentrationen in jedem Ansatz neu aufgestellt wird, kann die Konzentration der einzelnen Kapazitäten berechnet und eine Aussage zum Titer der vorhandenen AAK im Serum der Patienten gegeben werden [66].

Hersteller-spezifischer Testansatz

Für die Testdurchführung standen für die drei AAK mit ihren Subklassen jeweils standardisierte ELISA-Kits zur Verfügung:

- MCV IgG, IgM und IgA von Orgentec Diagnostika, Mainz, Deutschland
- RF IgG, IgM und IgA von Generic Assays GmbH, Dahlewitz/Berlin, Deutschland
- CCP IgG von Medizym® anti-CCP, Medipan GmbH, Dahlewitz/Berlin, Deutschland (CCP IgG der zweiten Generation)

Der allgemeine Testansatz und die -durchführung stimmten aufgrund desselben Testprinzips weitestgehend in allen drei ELISA-Kits überein. Jedes Kit beinhaltete:

- eine Mikrotiterplatte mit 96 Kapazitäten
- Waschpuffer-Konzentrat, Probenpuffer-Konzentrat
- Konjugatlösung (anti-human-IgG-Antikörper, Peroxidase-gekoppelt)
- Substratlösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin mit Wasserstoffperoxid)
- Stopplösung (Schwefelsäure)
- Standardlösungen (1-5 ansteigender Konzentration)

- Positiv- und/oder Negativkontrolle.

Die allgemeine Testdurchführung beschreibt das Fließschema in **Abb. 6**.

Für die einzelnen Kits variierten die Mischungsverhältnisse von Patientenseren, Inkubationszeiten und Cut-off-Level der jeweiligen Hersteller.

Einen Vergleich der wichtigsten Größen für die verwendeten Kits gebe ich mit **Tab. 4**:

Tab. 4: Der herstellereigene Testansatz für die Bestimmung der AMCV-, RF- und ACCP- Subtypen

	RF			ACCP	AMCV		
	IgG	IgM	IgA	IgG	IgG	IgM	IgA
Probenverdünnung	1:101			1:101	1:100		
Standard/Kontrolle	5/1			5/1	6/2		
Standardbereich	1-300 U/ml			1-300 U/ml	0-1000 U/ml		
Inkubation	1.) 60 min -> 2.) 30 min -> 3.) 15 min				1.) 30 min -> 2.) 15 min -> 3.) 15 min		
Cut-off-Level	30 IU/ml	15 IU/ml	30 IU/ml	30 U/ml	20 U/ml	20 U/ml	20 U/ml

Ich bestimmte AMCV IgG, IgM, IgA, RF IgG, IgM, IgA und ACCP IgG zu Woche 0 und 24 für die 50 Patienten. Jede Patientenprobe wurde doppelt pipettiert und die optische Dichte sowie die Konzentration als arithmetisches Mittel beider Werte genommen. Außerhalb (unter bzw. über) der möglichen Nachweisgrenze liegende Titer bestimmte ich in einer (niedrigeren bzw. höheren) Vorverdünnung erneut und berechnete die Konzentration mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor.

Patienten und Methodik

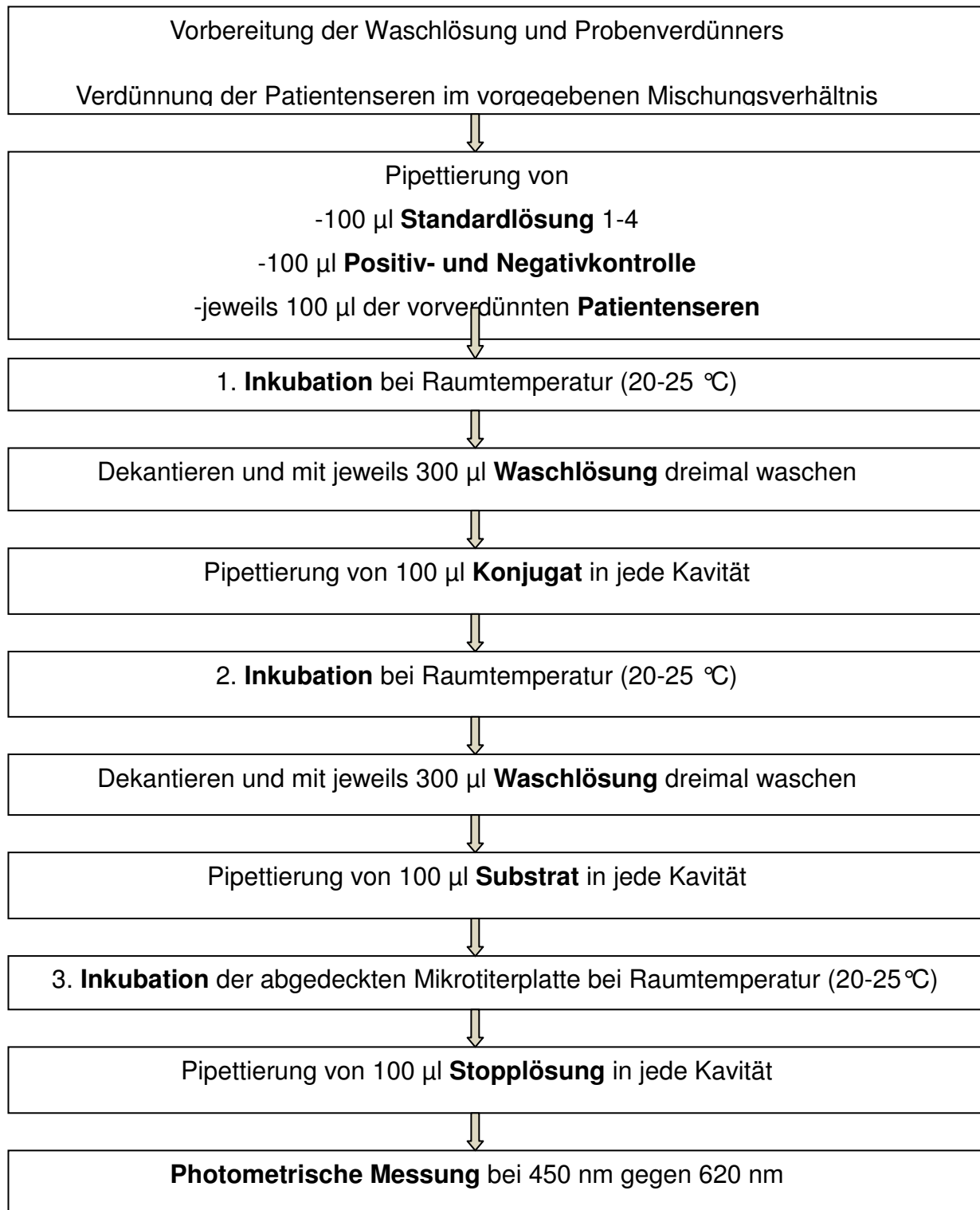


Abb. 6: Allgemeine ELISA-Testdurchführung für die Bestimmung der Immunglobuline der RA-Patienten unter RTX-Therapie

2.3 Statistik

Die o.g. Untersuchungen ergaben für das RA-Patientenkollektiv die Titer des AMCV IgG, IgM, IgA, RF IgG, IgM, IgA und ACCP IgG (abhängige Variable des Tests AV) zum Zeitpunkt 0 und Woche 24 während der RTX-Therapie (unabhängige Variable des Tests UAV). Die Beziehung zwischen der UAV (als Ursache) und AV (als Wirkung) sollte als kausal statistischer Zusammenhang (Validität) erforscht werden. Weiterhin ergab die Evaluation der Patienten hinsichtlich ihres Therapieansprechens zwei separate Gruppen von Patienten als zu untersuchende Stichproben (Non-/Responder auf RTX).

Eine Übersicht über die statistischen Größen gibt **Tab. 5**. Hinsichtlich meiner Arbeitshypothese erfolgte nun einerseits die Analyse des zeitlichen Verlaufes eines AAK-Subtypus für die Gruppe der Responder oder Non-Responder (abhängige/verbundene Stichprobe) und andererseits der Vergleich eines AAK-Subtypus zwischen beiden Gruppen zu einem Zeitpunkt (unabhängige/unverbundene Stichprobe).

Tab. 5: Die statistischen Größen der Hypothesenprüfung der Untersuchung

abhängige Variable (AV)	AMCV-Subtypen (sowie RF, ACCP)
unabhängige Variable (UAV)	BZDT mit RTX (Therapieansprechen der Patienten)
Stichprobe 1	RTX-Responder (RR)
Stichprobe 2	RTX-Non-Responder (NRR)
Nullhypothese H0	Die AV zeigt <u>keine</u> Abhängigkeit von der UAV : <i>Die AAK-Titer weisen keinen Unterschied zwischen RR und NRR für den jeweiligen AAK abhängig von RTX auf .</i>
Alternativhypothese H1	Die AV zeigt <u>eine</u> Abhängigkeit von UAV: <i>Die AAK-Titer weisen einen Unterschied zwischen RR und NRR für den jeweiligen AAK abhängig von RTX auf.</i>
non-parametrische Tests	<i>Mann-Whitney-Test:</i> unverbundener Stichprobenvergleich von RR und NRR zu Woche 0 oder 24 <i>Wilcoxon-Test:</i> verbundener Stichprobenvergleich von RR oder NRR von Woche 0 zu 24
Signifikanz (p-Niveau)	5% ($p = 0,05$)
Konfidenzintervall	95%

Die kleine Studiengröße, die unklare Verteilung der Variablen in der Population und die Studiengrößen-bedingte Varianzeninhomogenität innerhalb der Gruppe begründen die Verwendung non-parametrischer Testverfahren. Die Intervallskalierung der Variable (AAK-Titer) ermöglicht eine Anwendung des Wilcoxon-Test für die verbundene Stichprobe und den Mann-Whitney-Test für die unverbundene Stichprobe. Der Wilcoxon-Test wurde jeweils für die RR bzw. NRR für die Änderung des AAK-Subtypus im Verlauf durchgeführt. Der Mann-Whitney-Test wurde für den Vergleich der RR gegenüber den NRR für einen AAK-Subtypus zu einem Zeitpunkt angewendet.

Weiterhin führte der qualitative, nominalskalierte Vergleich der Seropositivität eines AAK-Subtypus (anhand des Cut-off-Levels) zwischen RR und NRR zur Verwendung des Chi-Quadrat- (χ^2) und Fischer-Tests. Zur Bestimmung des optimalen Cut-off-Levels mit der höchsten Sensitivität bzw. Spezifität des AMCV IgA führte die Firma Orgentec Diagnostika eine „Receiver Operating Characteristic“-Analyse (ROC-Kurve) anhand der 50 RA-Patienten und 11 gesunden Probanden durch. Für die statistische Bestimmung einer Korrelation r zwischen AAK und dem DAS28 wurde die Korrelationsanalyse nach Spearman genutzt. Diese statistische Auswertung erstellte ich mittels GraphPad Prism 4 (Graphpad Software, Inc.).

3 Ergebnisse

3.1 Die Einteilung der Patienten in Non-/Responder auf RTX

Für die Analyse therapiebedingter Änderungen der Krankheitsaktivität der RA-Patienten, wurden diese Patienten vorerst retrospektiv hinsichtlich ihres Therapieansprechens in Patienten mit Therapieerfolg (Responder auf RTX: RR) und Therapieversagen (Non-Responder auf RTX: NRR) eingeteilt. Diese Einteilung der Patienten erfolgte nach den EULAR-Kriterien (basierend auf dem DAS28-Wert der Patienten): Ein Therapieansprechen lag ab einer Verbesserung der DAS28-Differenz vom Ausgangswert zum Folgewert um $\geq 1,2$ vor [8]. Weiterhin wurden die Patienten entsprechend ihrer Krankheitsaktivität nach der Therapie eingeteilt: Patienten in Remission ($\text{DAS28} \leq 2,6$), mit geringer Krankheitsaktivität ($\text{DAS28} \leq 3,2$), moderater Krankheitsaktivität ($5,1 \geq \text{DAS28} > 3,2$) oder hoher Krankheitsaktivität ($\text{DAS28} > 5,1$) [8]. Einen numerischen Überblick über die Einteilungen entsprechend der EULAR-Kriterien gibt Tab. 6.

Tab. 6: Die Einteilung der Patienten hinsichtlich ihres erzielten DAS28-Wertes in der 24. Woche nach RTX-Applikation entsprechend der EULAR-Remissionskriterien

Einteilung der Patienten entsprechend des "Disease Activity Score 28" (DAS28)		
mittlerer DAS28 aller Patienten (baseline) \pm s	5,93	1,08
mittlerer DAS28 aller Patienten (24. Woche) \pm s	3,67	1,26
DAS28-Verbesserung $\geq 1,2$: Responder auf RTX (RR) n = 37/50		
mittlerer DAS28 der RR (baseline) \pm s	6,23	1,02
mittlerer DAS28 der RTX-Responder (24. Woche) \pm s	3,3	1,12
DAS28 $\leq 2,6$ (Remission)	12/37	
$3,2 \geq \text{DAS28} > 2,6$ (niedrige Krankheitsaktivität)	5/37	
$5,1 \geq \text{DAS28} > 3,2$ (moderate Krankheitsaktivität)	17/37	
DAS28 $> 5,1$ (hohe Krankheitsaktivität)	3/37	
DAS28-Verbesserung $\leq 1,2$: Non-Responder auf RTX (NRR) n = 13/50		
mittlerer DAS28 der RTX-Non-Responder (baseline) \pm s	5,09	0,79
mittlerer DAS28 der RTX-Non-Responder (24 weeks) \pm s	4,72	1,04
DAS28 $\leq 2,6$ (Remission)	0/13	
$3,2 \geq \text{DAS28} > 2,6$ (niedrige Krankheitsaktivität)	1/13	
$5,1 \geq \text{DAS28} > 3,2$ (moderate Krankheitsaktivität)	7/13	
DAS28 $> 5,1$ (hohe Krankheitsaktivität)	5/13	

Von den 50 Patienten erzielten 37 Patienten (74 %) eine DAS28-Verbesserung von $\geq 1,2$ und somit zählte der Großteil unserer Patienten zu den RR. 13 von den 50 Patienten (26 %) zeigten keine signifikante Verbesserung der Krankheitsaktivität und umfassten die Gruppe der NRR. Der mittlere DAS28-Wert dieser 37 RR betrug vor Therapiebeginn 6,23 und fiel um 47 % auf 3,30. Der mittlere DAS28-Wert der NRR war mit 5,09 anfangs zwar niedriger, blieb jedoch mit 4,72 weitestgehend stabil. Nach sechs Monaten erreichten 12 RR eine Remission und 5 RR eine niedrige Krankheitsaktivität, während der überwiegende Teil der Patienten ($n = 20/37$) nach wie vor einen Zustand moderater bis erhöhter Krankheitsaktivität aufwies. Die NRR wiesen eine unverändert moderate ($n = 7/13$) bis hohe ($n = 5/13$) Krankheitsaktivität auf.

3.2 Die Autoantikörperverteilung der Patienten vor RTX-Therapiebeginn

Vor der ersten Applikation von RTX wurden die AMCV IgG-positiven Patienten auf das zusätzliche Auftreten der Immunglobulin-Isotypen hin untersucht, die im weiteren Verlauf prädiktiv für das Ansprechen der Therapie sein könnten. Im Folgenden werden stets zuerst die Ergebnisse für die AMCV-Subtypen und nachfolgend die Ergebnisse für die RF- und ACCP-Subtypen mit Bezug auf die Daten aus [Tab. 7](#) dargestellt.

Ergebnisse

Tab. 7: Die absolute und prozentuale Verteilung seropositiver und seronegativer Responder (RR) und Non-Responder (NRR) auf RTX für die AMCV, RF und ACCP-Subtypen vor Therapiebeginn

Antikörper vor RTX-Therapie	AMCV IgG			
	RR n=37		NRR n=13	
positiv (absolut/ prozentual)	37	100%	13	100%
negativ (absolut/ prozentual)	0	0%	0	0%
	AMCV IgM			
	RR n=37		NRR n=13	
positiv (absolut/ prozentual)	16	43%	9	69%
negativ (absolut/ prozentual)	21	57%	4	31%
	AMCV IgA			
	RR n=37		NRR n=13	
positiv (absolut/ prozentual)	12	32%	9	69%
negativ (absolut/ prozentual)	25	68%	4	31%
	RF IgG			
	RR n=37		NRR n=13	
positiv (absolut/ prozentual)	2	5%	1	8%
negativ (absolut/ prozentual)	35	95%	12	92%
	RF IgM			
	RR n=37		NRR n=13	
positiv (absolut/ prozentual)	21	57%	8	62%
negativ (absolut/ prozentual)	16	43%	5	38%
	RF IgA			
	RR n=37		NRR n=13	
positiv (absolut/ prozentual)	20	54%	9	69%
negativ (absolut/ prozentual)	17	46%	4	31%
	ACCP IgG			
	RR n=37		NRR n=13	
positiv (absolut/ prozentual)	34	92%	12	92%
negativ (absolut/ prozentual)	3	8%	1	8%

3.2.1 Die AMCV-Isotypen-Verteilung bei RR und NRR vor der RTX-Therapie

AMCV IgM: Unter den 50 AMCV IgG-positiven Patienten waren gleichzeitig die Hälfte der Patienten AMCV IgM-positiv (n = 25/50). Hierbei waren die AMCV IgM-positiven verstärkt unter den NRR vertreten. Prozentual dargestellt, befanden sich unter den NRR mit 69 % (n = 9/13) verhältnismäßig mehr AMCV IgM-positiven Patienten als unter den RR mit 43 % (n = 16/37). Demzufolge war über die Hälfte der RR (n = 21/37) AMCV IgM-negativ. Eine

Ergebnisse

statistische Signifikanz für den Unterschied in der Seropositivität zwischen beiden Gruppen ist hingegen nicht gegeben (χ^2 - p-Wert = 0,105).

AMCV IgA: Evidenter waren die Ergebnisse für AMCV IgA. Von den 50 AMCV IgG-positiven Patienten waren gleichzeitig 42 % (n = 21/50) AMCV IgA-positiv. Diese AMCV IgA-positiven Patienten waren ähnlich dem AMCV IgM vermehrt unter den NRR vertreten, während die RR überwiegend kein AMCV IgA aufwiesen. Prozentual waren unter den RR mit 68 % (n = 25/37) rund zwei Drittel seronegativ für AMCV IgA, wobei mit 69 % (n = 9/13) rund zwei Drittel der NRR AMCV IgA aufwiesen. Im Gegensatz zu der AMCV IgM-Subklasse ist der Unterschied für AMCV IgA zwischen beiden Gruppen signifikant (χ^2 - p-Wert = 0,0203). Einen Vergleich der Verteilung von AMCV IgM und IgA zwischen RR und NRR illustriert **Abb. 7**.

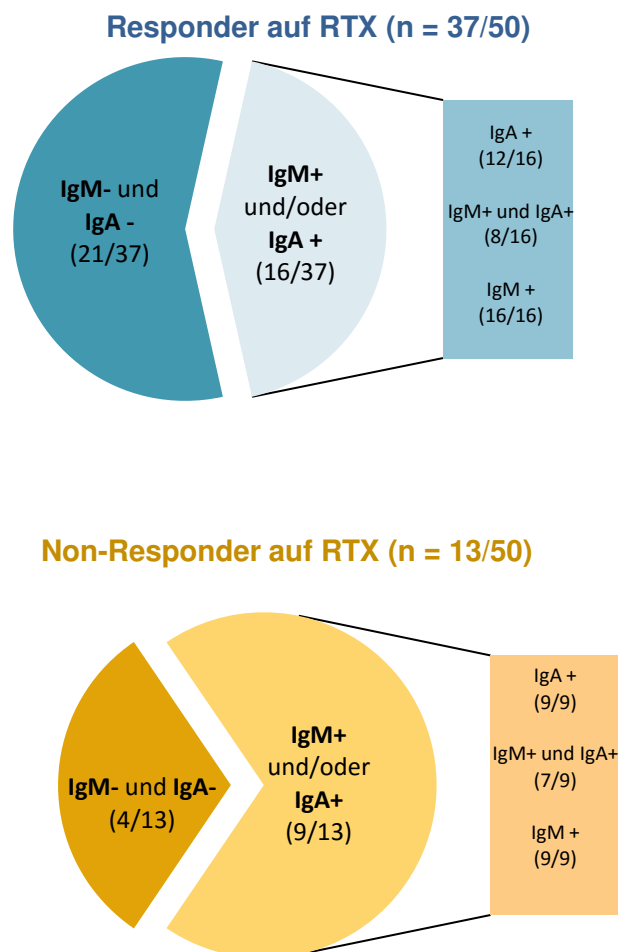


Abb. 7: Prozentuale Verteilung der AMCV-Subtypen IgM und IgA in AMCV IgG-positiven Respondern bzw. Non-Respondern auf RTX vor Therapiebeginn

Ergebnisse

RR zeigten überwiegend eine alleinige AMCV IgG-Antwort, während NRR eine Doppelerpositivität für AMCV IgG und IgA aufwiesen. Interessanterweise zeigte sich eine Trippelpositivität bezüglich AMCV IgG, IgM, IgA in 15 Patienten ($n = 15/50$; 30 %), die häufiger zu den NRR zählten: 7 von 9 möglichen Trägern (77,7 %) der NRR im Vergleich zu 8 von 12 möglichen Trägern (66,6 %) unter den RR.

Sensitivität/Spezifität und Positiver/Negativer prädiktiver Wert für AMCV IgA

Die signifikanten Ergebnisse für AMCV IgA führten zur Bestimmung der Spezifität, Sensitivität sowie des positiven und negativen prädiktiven Wertes des AMCV IgA für RA-Patienten im Rahmen einer RTX-Therapie. Eine „Receiver Operating Characteristic“ (ROC)-Kurven-Analyse zur Bestimmung des optimalen Cut-off-Level wurde durch die Firma Orgentec für die AMCV IgA-Werte von unseren Patienten und 11 gesunden Kontrollen erstellt. Bei dem gewählten Cut-off-Level von 20 U/ml ergab die Testung eine Sensitivität von 42 % und eine Spezifität von 100 % für unsere Kohorte (s. Abb. 8).

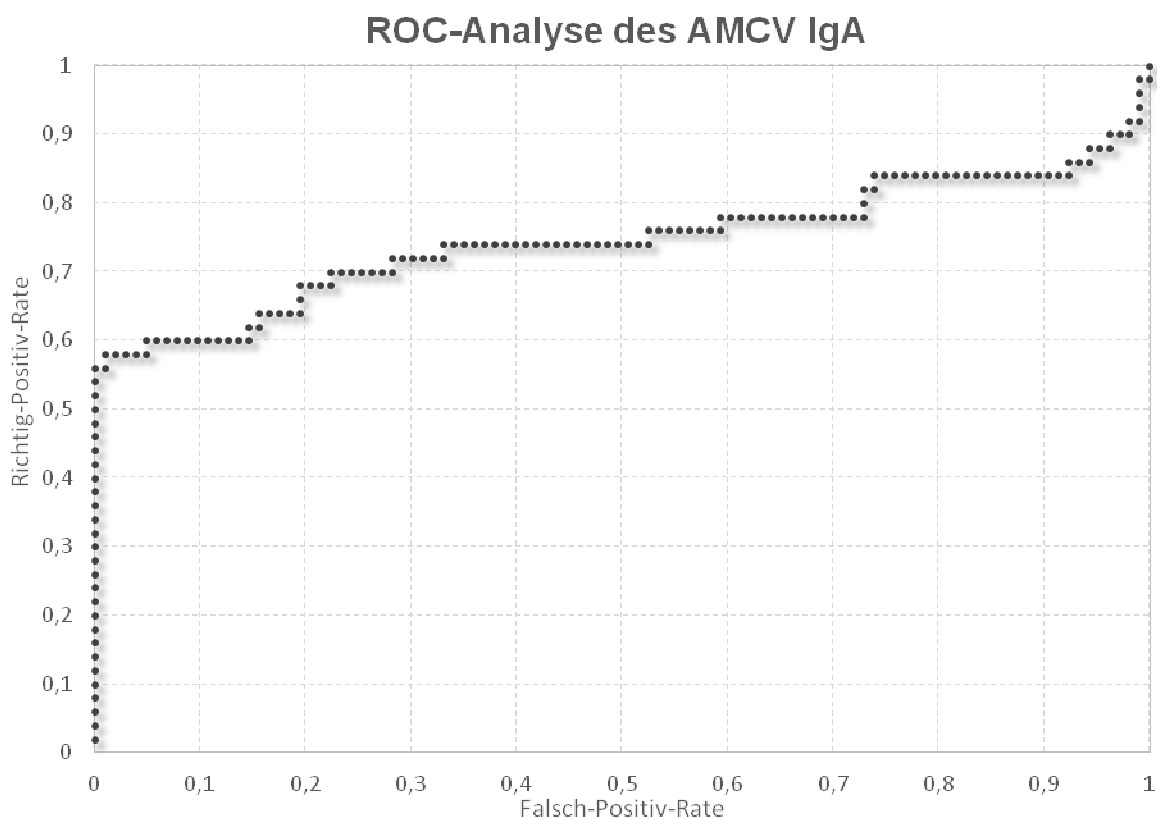


Abb. 8: Die ROC-Kurven-Analyse des AMCV IgA-Subtypus

Die Sensitivität von 42 % bestimmt die Fraktion aller NRR, die idealerweise durch einen positiven AMCV IgA-Nachweis (≥ 20 U/ml) als Therapieversager identifiziert wurden. Wiederum benennt die Spezifität von 100 % den Anteil an RR, die durch eine AMCV IgA-Negativtestung (< 20 U/ml) erkannt wurden. Demzufolge ist der Vorhersagewert des AMCV IgA für die Bestimmung des Therapieerfolgs entsprechend hoch (Negativer prädiktiver Wert NPW): Bei einer Negativtestung von AMCV IgA ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von 86,02 %, dass auf die nachfolgende RTX-Therapie angesprochen wird (NPW = 0,8602). Das bedeutete, dass von 29 negativ-getesteten Personen 25 zu den RR zählten. Weist der Patient hingegen AMCV IgA auf, liegt die Wahrscheinlichkeit für ein Therapieversagen bei 42,86 % in unserer Kohorte (Positiver prädiktiver Wert PPW = 0,4286).

3.2.2 Die RF und ACCP-Isotypen-Verteilung in RR und NRR vor der RTX-Therapie

Die Betrachtung der Immunglobulin-Isotypen von RF und ACCP ergab eine annähernd gleiche Verteilung in beiden Patientengruppen ohne evidente Unterschiede zwischen RR und NRR (s. Tab. 7). Abb. 9. bietet einen illustrativen Vergleich der Seropositivitäten aller AAK zwischen RR und NRR.

RF IgG, IgM und IgA: Das gesamte Patientenkollektiv war überwiegend seronegativ ($n = 47/50$). Lediglich drei der 50 Patienten waren seropositiv, wodurch es nicht möglich war, eine Beziehung zum Therapieansprechen herzustellen: Zwei RR ($n = 2/37$, 5 %) bzw. ein NRR ($n = 1/13$, 8 %) der Patienten wiesen in dem gleichen Verhältnis RF IgG auf (χ^2 -p-Wert $> 0,05$).

Die RF-Subtypen IgM und IgA waren relativ ausgeglichen in der Gesamtkohorte verteilt. Im Detail waren 58 % ($n = 29/50$) aller Patienten RF IgM-positiv und RF IgA-positiv, während 42 % ($n = 21/50$) keine Antikörper aufwiesen. In Abhängigkeit von dem Therapieansprechen waren RR bzw. NRR prozentual vergleichbar positiv für RF IgM mit 57 % ($n = 21/37$) bzw. 62 % ($n = 8/13$) und für RF IgA mit 54 % ($n = 20/37$) bzw. 69 % ($n = 9/13$). Es ließ sich kein qualitativer Unterschied zwischen beiden Gruppen beschreiben (χ^2 -p-Wert $> 0,05$).

ACCP IgG: Die Gesamtkohorte war ebenfalls überwiegend ACCP IgG-positiv ($n = 46/50$). Jeweils 92 % der RR ($n = 34/37$) und der NRR ($n = 12/13$) wiesen diese AAK auf und unterschieden sich damit nicht (χ^2 -p-Wert $> 0,05$). Lediglich vier Patienten wiesen keine AAK auf, die sich dabei vermehrt unter den RR fanden ($n = 3/4$). Insgesamt ließ sich bei der Analyse

Ergebnisse

der Verteilung der RF- und ACCP-Isotypen in unserer Kohorte kein Zusammenhang eines bestimmten AAK-Profiles zu dem RTX-Ansprechen beschreiben.

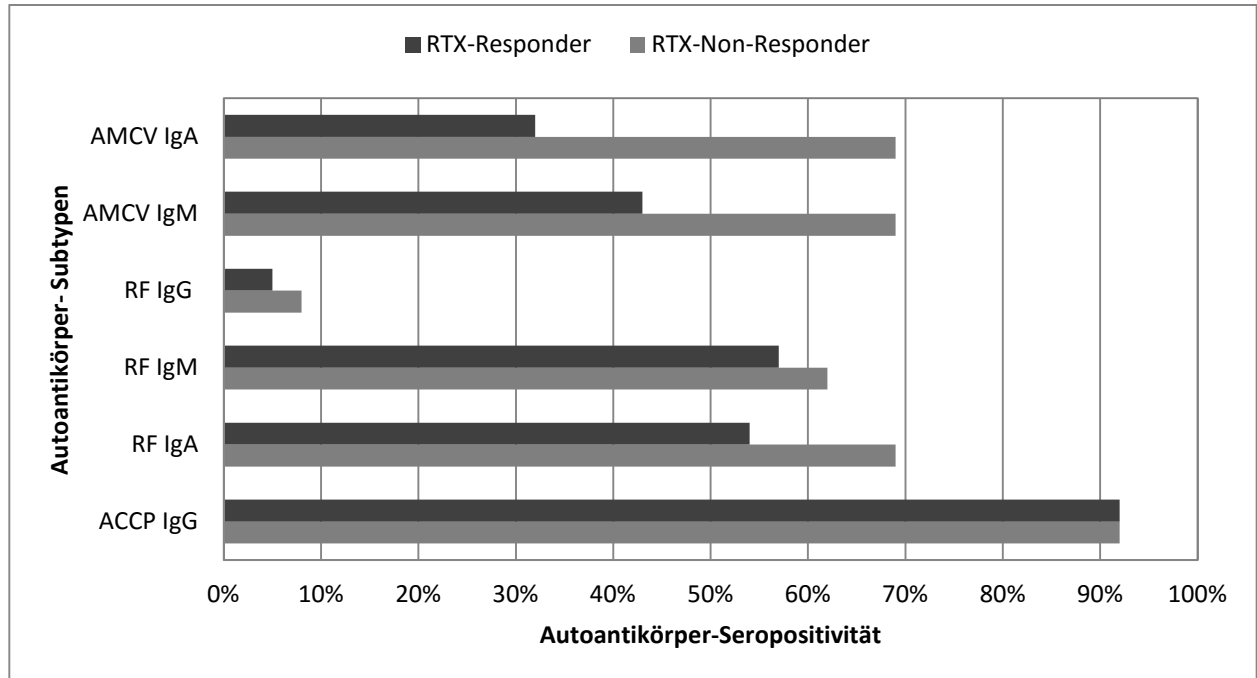


Abb. 9: Prozentualer Anteil der Patienten mit dem Nachweis der Autoantikörper-Subtypen in der Gruppe der Responder (RR) und Non-Responder (NRR) vor RTX-Therapiebeginn im Vergleich

Kernaussagen:

Die Analyse der AAK-Subklassen-Verteilung der AMCV IgG-positiven RA-Patienten vor der RTX-Intervention ergab drei Kernaussagen:

- RR wiesen zu Therapiebeginn weniger häufig die AMCV-Isotypen auf.
- Das Fehlen des AMCV IgA vor der RTX-Intervention sagte mit einer 86 %-igen Wahrscheinlichkeit einen Therapieerfolg voraus.
- Das Auftreten der Subklasse AMCV IgA fand sich vermehrt in den NRR.

3.3 Die Autoantikörperverläufe der Patienten unter RTX-Therapie

Ich analysierte die AAK-Profile der Patienten erneut nach sechs Monaten im Rahmen der maximalen BZD unter RTX, um das Verhalten der Antikörper ebenfalls im Verlauf der Therapie in Abhängigkeit vom Therapieansprechen der Patienten zu bewerten. Hierzu wurden die

gemittelten Titerwerte aller AAK-Isotypen vor und in der 24. Woche nach der RTX-Intervention in RR und NRR verglichen.

3.3.1 Die AMCV-Titerverläufe von RR und NRR unter RTX-Therapie

Die Betrachtung der absoluten Titer für die AMCV-Subtypen vor RTX-Beginn ergab entsprechend der qualitativen Unterschiede einen erhöhten mittleren Titer in der Gruppe der NRR verglichen mit den RR (s. Tab. 8).

Im Detail tendierte der mittlere **AMCV IgG**-Titer aller NRR zu höheren Werten als die Titer der RR (856,99 vs. 769,05 U/ml). Der mittlere **AMCV IgM**-Titer aller NRR war nahezu dreifach so hoch wie der Wert der RR (106,06 vs. 39,97 U/ml). Der mittlere **AMCV IgA**-Titer aller NRR lag mit dem Doppelten über dem Titerwert der RR (182,51 vs. 90,14 U/ml). Trotz dieser Tendenzen war der Unterschied zwischen beiden Gruppen statistisch nicht-signifikant, sodass RR und NRR vergleichbar hohe Ausgangswerte vor Therapiebeginn besaßen (Mann-Whitney-p-Wert > 0,05).

Nach dem ersten RTX-Zyklus tendierten die RR zu größeren Titerreduktionen der AMCV-Isotypen als die NRR. Im Folgenden wird dies numerisch und illustrativ detaillierter vorgestellt: **AMCV IgG:** Bei dem Großteil der RR (n = 31/37) nahmen die Ausgangstiter ab, jedoch normalisierte lediglich die Minderheit (11 %, n = 4/37) ihre initialen Werte. Der Gesamt-Titer aller RR sank signifikant um 49,22 % (von 769,05 auf 390,46 U/ml) (p < 0,0001) (s. Abb. 10). Unter den NRR fiel der Titer um 22,68 % (von 856,99 auf 662,67 U/ml; p = 0,02), unter denen auch nur ein Patient seinen Ausgangswert normalisieren konnte (s. Abb. 10). Nach der RTX-Intervention war somit die Mehrheit der RR (n = 33/37) und der NRR (n = 12/13) weiterhin AMCV IgG-positiv.

Der Vergleich der Verlaufswerte von RR mit NRR ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen nach der Therapie (p = 0,288). Eine alleinige Bestimmung des AMCV IgG unter Therapie besäße somit keine Aussagekraft bezüglich des RTX-Ansprechens.

Ergebnisse

Tab. 8: Die AMCV-Verläufe unter RTX-Therapie: Die Anzahl der Patienten mit Titerabfall bzw. Titeranstieg sowie Seronormalisierung bzw. Serokonversion mit den gemittelten Titern vor und nach RTX-Therapie sowie der prozentualen Veränderung

	AMCV IgG			
	RR n=37		NRR n=13	
mittlerer Titer (Baseline)/ s (U/ml)	769,05	891,04	856,99	982,98
Titerabfall (absolut/prozentual)	31	84%	11	85%
Titeranstieg (absolut/prozentual)	6	16%	1	7,5 %
Titer unverändert (absolut/prozentual)	0	0%	1	7,5 %
Seronormalisation (absolut/prozentual)	4	11%	1	8 %
Serokonversion (absolut/prozentual)	0	0%	0	0%
mittlerer Titer (24. Woche)/ s (U/ml)	390,46	432,06	662,67	834,47
relative Veränderung/ Wilcoxon p-Wert	-49,22%	p < 0,0001	-22,68%	p = 0,02
Mann-Whitney-U-p-Wert (24. Woche)	p = 0,288			
	AMCV IgM			
	RR n=37		NRR n=13	
mittlerer Titer (Baseline)/ s (U/ml)	39,97	94,43	106,06	147,25
Titerabfall (absolut/prozentual)	33	89%	8	62%
Titeranstieg (absolut/prozentual)	4	11%	5	38%
Titer unverändert (absolut/prozentual)	0	0%	0	0%
Seronormalisation (absolut/prozentual)	11	69%	3	33%
Serokonversion (absolut/prozentual)	0	0%	1	25%
mittlerer Titer (24. Woche)/ s (U/ml)	10,41	10,84	39,8	48,62
relative Veränderung/ Wilcoxon p-Wert	-73,95%	p < 0,0001	-62,50%	p = 0,03
Mann-Whitney-U-p-Wert (24. Woche)	p = 0,0003			
	AMCV IgA			
	RR n=37		NRR n=13	
mittlerer Titer (Baseline)/ s (U/ml)	90,14	240,85	182,51	483,40
Titerabfall (absolut/prozentual)	32	87%	9	69%
Titeranstieg (absolut/prozentual)	5	13%	4	31%
Titer unverändert (absolut/prozentual)	0	0%	0	0%
Seronormalisation (absolut/prozentual)	5	42%	2	22%
Serokonversion (absolut/prozentual)	0	0%	0	0%
mittlerer Titer (24. Woche)/ s (U/ml)	29,84	89,06	218,57	513,17
relative Veränderung/ Wilcoxon p-Wert	-67%	p < 0,0001	+19,76	p = 0,17
Mann-Whitney-U-p-Wert (24. Woche)	p = 0,007			

Ergebnisse

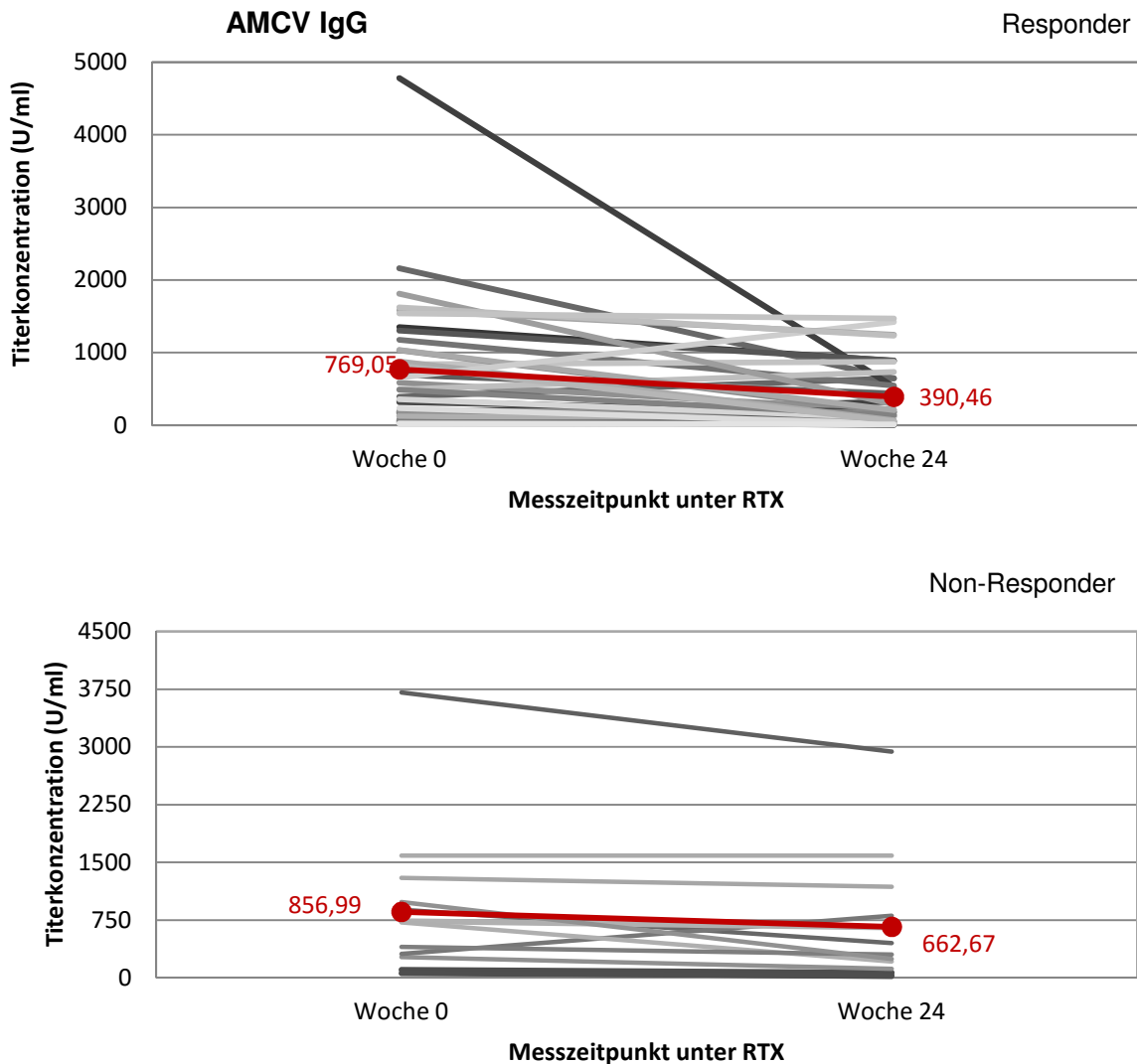


Abb. 10: Die vergleichende Darstellung der AMCV IgG-Titerverläufe aller Responder bzw. Non-Responder auf RTX von Therapiebeginn zu Woche 24 nach RTX-Applikation mit dem gemittelten Titerverlauf (rot)

AMCV IgM: In RR und NRR reduzierte sich ebenfalls der anfängliche Titer unter RTX, was zu einem signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen nach sechs Monaten führte ($p = 0,0003$). Die RR zeigten eine signifikante Abnahme ihres anfänglichen Gesamt-Titers um 73,95 % (von 39,97 auf 10,41 U/ml) ($p < 0,0001$) (s. Abb. 11), wovon der Großteil der ursprünglich AMCV-positiven RR (69 %, $n = 11/16$) im Verlauf kein AMCV IgM mehr aufwies.

Der mittlere Titer der NRR sank ebenfalls signifikant um 62,5 % (von 106,06 auf 39,80 U/ml) ($p = 0,03$) (s. Abb. 11). Obwohl die Mehrheit der NRR AMCV IgM-positiv war, normalisierten

Ergebnisse

lediglich 33 % (n = 3/9) ihre initialen Titer. Unter den NRR entwickelte sogar ein Patient AMCV IgM im Verlauf. Nach der Therapie blieben somit fünf der RR (n = 5/16) bzw. sechs der NRR (n = 6/9) und folglich insgesamt 13,51 % (n = 5/37) der RR bzw. 53,85 % (n = 7/13) der NRR weiterhin AMCV IgM-positiv. Im Allgemeinen zeigte die AMCV IgM-Subklasse die höchsten prozentualen Titerreduktionen und Seronormalisierungsraten von RR und NRR unter allen AAK-Subtypen, was eine stärkere Beeinflussung dieser Subklasse durch RTX impliziert.

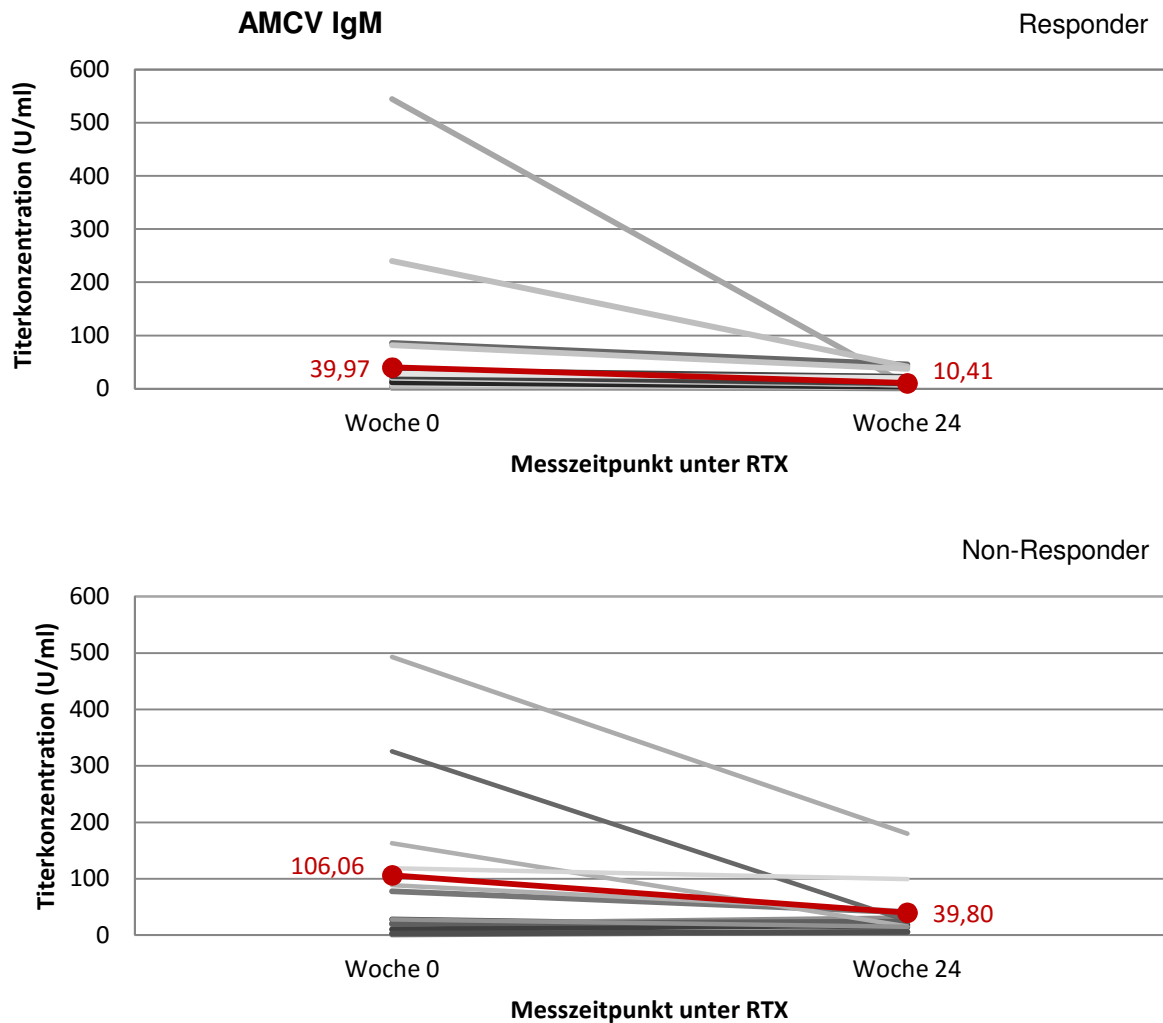


Abb. 11: Die vergleichende Darstellung der AMCV IgM-Titerverläufe aller Responder bzw. Non-Responder auf RTX von Therapiebeginn zu Woche 24 nach RTX-Applikation mit dem gemittelten Titerverlauf (rot)

Ergebnisse

AMCV IgA: Am stärksten offenbarte sich ein Unterschied zwischen RR und NRR für AMCV IgA (s. Abb. 12). Die Mehrheit der RR ($n = 32/37$, 87 %) wies einen Titerabfall nach dem ersten Zyklus RTX auf, wobei der mittlere Titer signifikant um 67 % (von 90,14 auf 29,84 U/ml) nach sechs Monaten sank ($p < 0,0001$). Im Gegensatz hierzu stieg der initiale Titer der NRR unter der Therapie sogar um 19,76 % (182,51 U/ml auf 218,57 U/ml) an ($p = 0,17$).

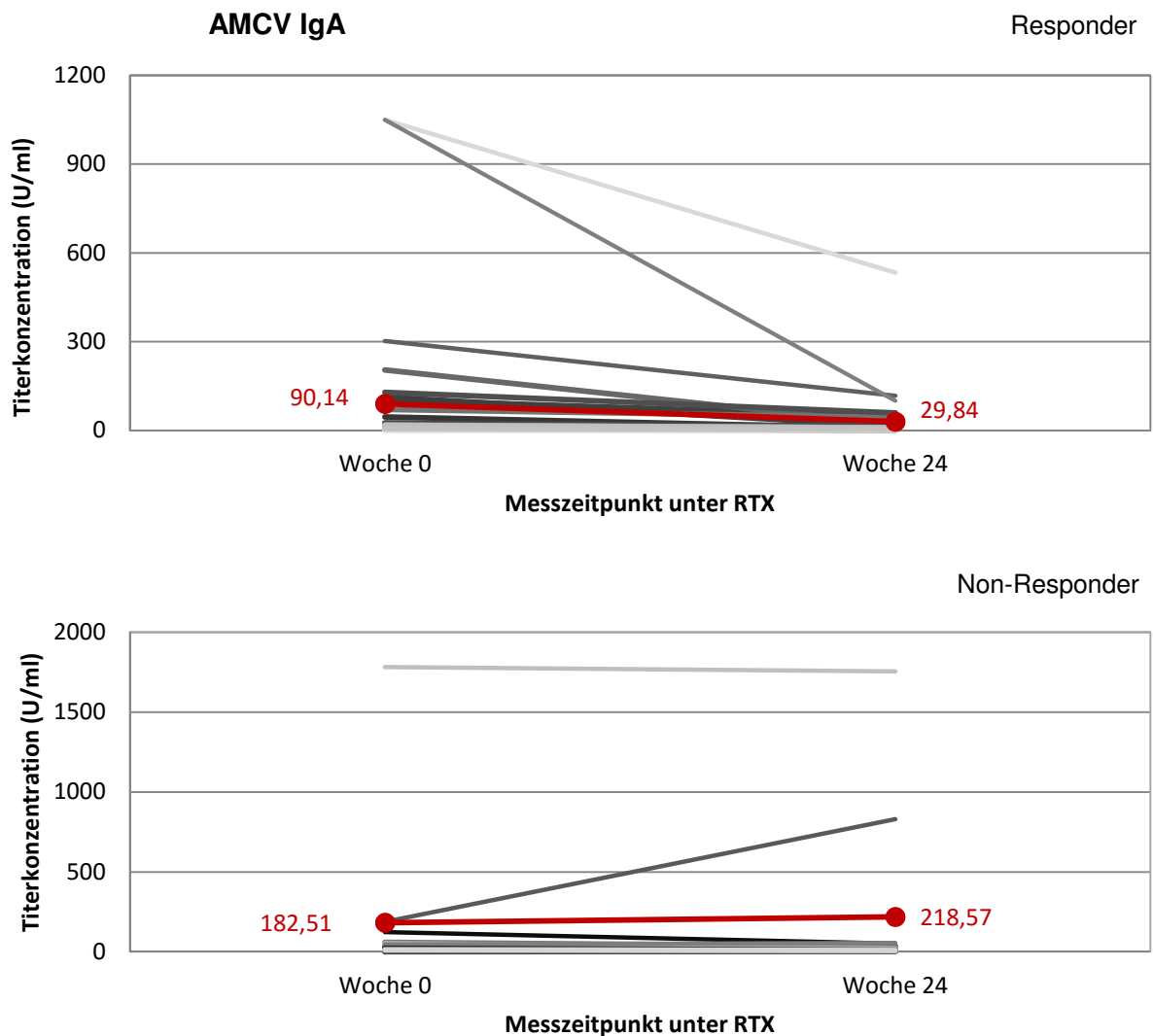


Abb. 12: Die vergleichende Darstellung der AMCV IgA-Titerverläufe aller Responder bzw. Non-Responder auf RTX von Therapiebeginn zu Woche 24 nach RTX-Applikation mit dem gemittelten Titerverlauf (rot)

Dieser Anstieg war zwar statistisch nicht-signifikant, bedeutete aber, dass die NRR ihr hohes Ausgangslevel unverändert beibehielten und die AMCV IgA-Titer durch die RTX-Intervention nicht beeinflusst wurden. Diese AMCV IgA-Verläufe ergaben am Ende der Therapie eine

Ergebnisse

signifikante Differenz zwischen beiden Gruppen, sodass nach ähnlichen Ausgangsleveln die unterschiedlichen AMCV IgA-Verläufe eine Unterscheidung beider Gruppen ermöglichten ($p = 0,007$). Nach der Therapie waren noch sieben Patienten der RR ($n = 7/12$) sowie NRR ($n = 7/9$) und somit insgesamt 18,92 % ($n = 7/37$) unter den RR sowie 53,85 % ($n = 7/13$) unter den NRR positiv für AMCV IgA.

3.3.2 Die AMCV IgA-Titerverläufe in Abhängigkeit von der Therapieantwort der Patienten

Der o.g. Unterschied für AMCV IgA offenbarte sich noch deutlicher bei der differenzierten Betrachtung der Patienten hinsichtlich der Krankheitsaktivität und Therapieantwort nach sechs Monaten (entsprechend des erzielten DAS28 nach den EULAR-Kriterien) (s. Tab. 9): Höhere Reduktionen der AMCV IgA-Titer gingen mit einer besseren Therapieantwort einher.

Tab. 9: Die AMCV IgA-Titerverläufe der Responder (RR) und Non-Responder (NRR) auf RTX in Abhängigkeit von ihrer DAS28-Antwort 24 Wochen nach der RTX-Applikation

DAS28 der Patienten zu Woche 24	Anzahl der Patienten	mittlerer AMCV IgA-Wert zu Beginn (U/ml)	mittlerer AMCV IgA-Wert zu Woche 24 (U/ml)	prozentuale Veränderung (absolute Titerveränderung)	p-Wert
Responder (RR) n = 37/50					
DAS28 \leq 2,6 (Remission)	n = 12/37	141,94	30,00	78,86% (111,93)	0,0005
3,2 \geq DAS28 > 2,6 (niedrige Krankheitsaktivität)	n = 5/37	33,85	17,06	49,61% (16,79)	0,13
5,1 \geq DAS28 > 3,2 (moderate Krankheitsaktivität)	n = 17/37	83,52	37,26	55,39% (46,26)	0,014
DAS28 > 5,1 (hohe Krankheitsaktivität)	n = 3/37	14,32	8,45	41,00% (8,87)	0,25
Non-Responder (NRR) n = 13/50					
DAS28 \leq 2,6 (Remission)	n = 0/13	/	/	/	/
3,2 \geq DAS28 > 2,6 (niedrige Krankheitsaktivität)	n = 1/13	46,11	55,56	17,01% (9,45)	/
5,1 \geq DAS28 > 3,2 (moderate Krankheitsaktivität)	n = 7/13	290,79	270,51	06,97% (20,27)	0,016
DAS28 > 5,1 (hohe Krankheitsaktivität)	n = 5/13	71,41	221,49	67,76% (150,08)	1

Die höchsten AMCV IgA-Reduktionen zeigten RR in Remission (Abnahme um 78,86 %; $p = 0,0005$). Hingegen fanden sich in RR mit einer hohen Krankheitsaktivität nach sechs Monaten unveränderte AMCV IgA-Titer (nicht-signifikante Abnahme um 41,00 %, $p = 0,25$). Patienten mit moderater bzw. niedriger Krankheitsaktivität nach der Therapie zeigten im Verlauf mittlere AMCV IgA-Reduktionen um 55,39 % bzw. 49,61 %. Im Gegensatz dazu tendierten NRR mit einer hohen Krankheitsaktivität zu einer nicht-signifikanten Zunahme ihrer initialen AMCV IgA-Titer und somit zu stabilen (therapieresistenten) AMCV IgA-Spiegeln (um 67,76 %; $p = 1,0$).

Ergebnisse

NRR mit einer moderaten statt hohen Krankheitsaktivität offenbarten hingegen bereits eine geringgradige Abnahme der initialen AMCV IgA-Titer.

Da lediglich ein Patient der NRR nach der RTX-Intervention eine niedrige Krankheitsaktivität erzielte, ist dieser alleinig nicht repräsentativ für die gesamte Gruppe. Nichtsdestotrotz zeigte auch dieser Patient als Therapieversager eine AMCV IgA-Zunahme. Insgesamt wiesen die NRR im Gegensatz zu den RR nach der Therapie die höchsten AMCV IgA-Spiegel auf.

Die AMCV IgA-Verläufe stehen somit in indirekt-proportionaler Linearität zu den DAS28-Werten der Patienten (je niedriger die DAS28-Zielwerte der Patienten, umso höher die AMCV IgA-Reduktionen). Einen grafischen Vergleich beider Gruppen der entsprechenden Therapieantwort bietet **Abb. 13**.

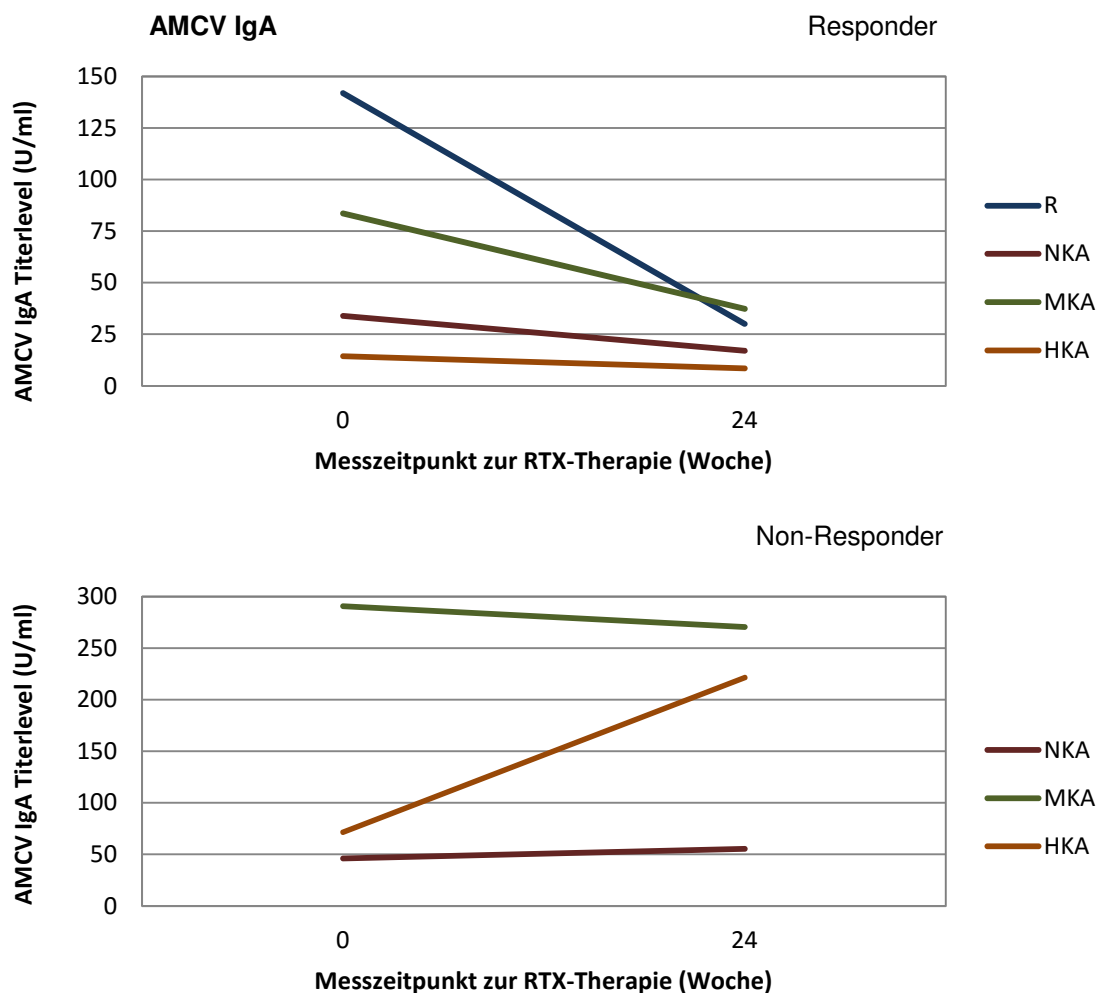


Abb. 13: Der Verlauf des AMCV IgA-Titers der Responder bzw. Non-Responder entsprechend ihrer Krankheitsaktivität nach der RTX-Therapie (R = Remission, NKA = Niedrige Krankheitsaktivität, MDA = Moderate Krankheitsaktivität, HDA = Hohe Krankheitsaktivität)

Interessanterweise waren die Therapieantwort und die erzielten Titerreduktionen unabhängig von den absoluten Titerwerten vor und nach der Therapie: Die absoluten AMCV IgA-Titer waren zu Beginn in der Gruppe der RR mit Krankheitsremission höher als die Titer der RR mit hoher Krankheitsaktivität (141,94 vs. 14,32 U/ml). Gleichsam war der initiale Wert der NRR mit moderater Krankheitsaktivität höher als der Wert der NRR mit hoher Krankheitsaktivität (290,79 vs. 71,41 U/ml). Lediglich die Gegenüberstellung der Werte vergleichbarer Gruppen (moderate bzw. hohe Krankheitsaktivität von RR vs. NRR) vor und nach der Therapie offenbarte, dass die Titer der NRR nach der Therapie einen höheren Wert annahmen als die Titer der RR. Das verdeutlichte, dass lediglich die Veränderung während des Therapieverlaufs mit der relativen Verlaufsbewertung zum Ausgangswert ein Indiz zum Therapieerfolg bot.

3.3.3 Die RF und ACCP-Titerverläufe von RR und NRR unter RTX-Therapie

In beiden Patientengruppen konnten vergleichbare Titerabnahmen der RF- und ACCP-Isotypen beobachtet werden, ohne dass sie einen signifikanten Unterschied zwischen RR und NRR nach sechs Monaten aufzeigten (s. Tab. 10).

RF IgG: RR bzw. NRR waren zum Großteil seronegativ (11,99 bzw. 13,69 IU/ml) vor der Therapie und reduzierten unter Therapie weiterhin ihre Titer (um 74,8 bzw. 67,32 %, $p < 0,05$). Die wenigen positiven Patienten ($n = 3/50$) normalisierten ebenfalls ihre Werte, sodass nach der Therapie alle Patienten seronegativ waren. Aufgrund der überwiegenden Seronegativität kann sowohl vor als auch nach der Therapie kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bestehen ($p = 0,224$).

RF IgM, RF IgA: Die RR zeigten für RF IgM bzw. IgA niedrigere Ausgangswerte und höhere Titerreduktionen unter RTX im Vergleich zu den NRR (s. Tab. 10). Über ein Drittel der RF IgM- und IgA-positiven RR normalisierte die initialen Titer, während es bei den NRR nur ein Patient war. Ein RR entwickelte hingegen sogar RF IgA im Verlauf. Nach der Intervention waren somit zirka zwei Drittel der RR negativ für RF IgM ($n = 24/37$) und IgA ($n = 23/37$) und der überwiegende Teil der NRR blieb positiv für RF IgM ($n = 7/13$) und IgA ($n = 8/13$). Trotz dieser Unterschiede führte die Analyse der Verlaufswerte zu keiner signifikanten Differenz zwischen RR und NRR nach der Therapie ($p = 0,17$ bzw. $0,147$).

Ergebnisse

Tab. 10: Die RF- und ACCP-Verläufe unter RTX-Therapie: Die Anzahl der Patienten mit Titerabfall bzw. Titeranstieg sowie Seronormalisierung bzw. Serokonversion mit den gemittelten Titern vor und nach RTX-Therapie sowie der prozentualen Veränderung

	RF IgG			
	RR n=37		NRR n=13	
mittlerer Titer (Baseline)/ s (U/ml)	11,99	15,99	13,69	12,30
Titerabfall (absolut/prozentual)	37	100%	13	100%
Titeranstieg (absolut/prozentual)	0	0%	0	0%
Titer unverändert (absolut/prozentual)	0	0%	0	0%
Seronormalisation (absolut/prozentual)	2	100%	1	100%
Serokonversion (absolut/prozentual)	0	0%	0	0%
mittlerer Titer (24. Woche)/ s (U/ml)	3,07	0,97	4,47	3,48
relative Veränderung/ Wilcoxon p-Wert	- 74,38 %	p < 0,0001	- 67,32 %	p = 0,002
Mann-Whitney-U-p-Wert (24. Woche)	p = 0,224			
	RF IgM			
	RR n=37		NRR n=13	
mittlerer Titer (Baseline)/ s (U/ml)	44,48	69,40	86,22	102,80
Titerabfall (absolut/prozentual)	36	97%	11	85%
Titeranstieg (absolut/prozentual)	0	0%	2	15%
Titer unverändert (absolut/prozentual)	1	3%	0	0%
Seronormalisation (absolut/prozentual)	8	38%	1	13%
Serokonversion (absolut/prozentual)	0	0%	0	0%
mittlerer Titer (24. Woche)/ s (U/ml)	16,54	20,85	58,67	81,14
relative Veränderung/ Wilcoxon p-Wert	- 62,82 %	p < 0,0001	- 31,95 %	p = 0,011
Mann-Whitney-U-p-Wert (24. Woche)	p = 0,170			
	RF IgA			
	RR n=37		NRR n=13	
mittlerer Titer (Baseline)/ s (U/ml)	102,35	124,70	167,60	144,70
Titerabfall (absolut/prozentual)	30	81%	10	77%
Titeranstieg (absolut/prozentual)	5	14%	2	15%
Titer unverändert (absolut/prozentual)	2	5%	1	8%
Seronormalisation (absolut/prozentual)	7	35%	1	11%
Serokonversion (absolut/prozentual)	1	6%	0	0%
mittlerer Titer (24. Woche)/ s (U/ml)	60,77	94,57	124,00	128,40
relative Veränderung/ Wilcoxon p-Wert	- 40,62 %	p < 0,0001	- 26,05 %	p = 0,014
Mann-Whitney-U-p-Wert (24. Woche)	p = 0,147			
	ACCP IgG			
	RR n=37		NRR n=13	
mittlerer Titer (Baseline)/ s (U/ml)	1125,71	700,00	1044,35	775,6
Titerabfall (absolut/prozentual)	29	78%	8	62%
Titeranstieg (absolut/prozentual)	5	14%	4	31%
Titer unverändert (absolut/prozentual)	3	8%	1	8%
Seronormalisation (absolut/prozentual)	0	0%	0	0%
Serokonversion (absolut/prozentual)	0	0%	0	0%
mittlerer Titer (24. Woche)/ s (U/ml)	841,11	667,20	861,55	682,10
relative Veränderung/ Wilcoxon p-Wert	- 25,28 %	p < 0,0001	- 17,50 %	p = 0,129
Mann-Whitney-U-p-Wert (24. Woche)	p = 0,982			

Ergebnisse

ACCP IgG: Für die überwiegend positiven RR und NRR zeigte sich in beiden Gruppen eine Titerabnahme, die jedoch verglichen mit den anderen AAK geringer ausgeprägt war. Lediglich unter den RR verlief die Abnahme um 25,28 % (von 1125,71 auf 841,11 U/ml) signifikant ($p < 0,0001$). Die NRR verzeichneten einen nicht-signifikanten Abfall von 17,05 % (von 1044,35 auf 861,55 U/ml) ($p = 0,129$) und blieben demzufolge eher stabil zum Ausgangswert. Aufgrund der vergleichbaren posttherapeutischen Titer war der Unterschied zwischen RR und NRR jedoch nicht signifikant ($p = 0,982$), sodass auch für ACCP IgG nach der Therapie keine quantitative Unterscheidung zwischen RR und NRR beobachtet werden konnte. Trotz überwiegender Positivität normalisierte sich in keinem der Fälle ein ACCP IgG-Titerwert unter der Therapie, sodass alle prätherapeutisch ACCP-positiven Patienten auch nach der Therapie weiterhin ACCP-positiv blieben (s. Tab. 10).

Für RF IgG, IgM und IgA sowie ACCP IgG ergibt sich ähnlich der qualitativen Verteilung ebenfalls kein charakteristischer Unterschied hinsichtlich der Titerverläufe unter RTX in RR und NRR, sodass diese AAK keine prädiktive Aussagekraft für die RTX-Therapie in unserer Kohorte besitzen.

Einen abschließend illustrativen Vergleich über den Verlauf des gemittelten Titerbetrages der AMCV, RF und ACCP-Subtypen für die RR bzw. NRR bietet Abb. 14.

Ergebnisse

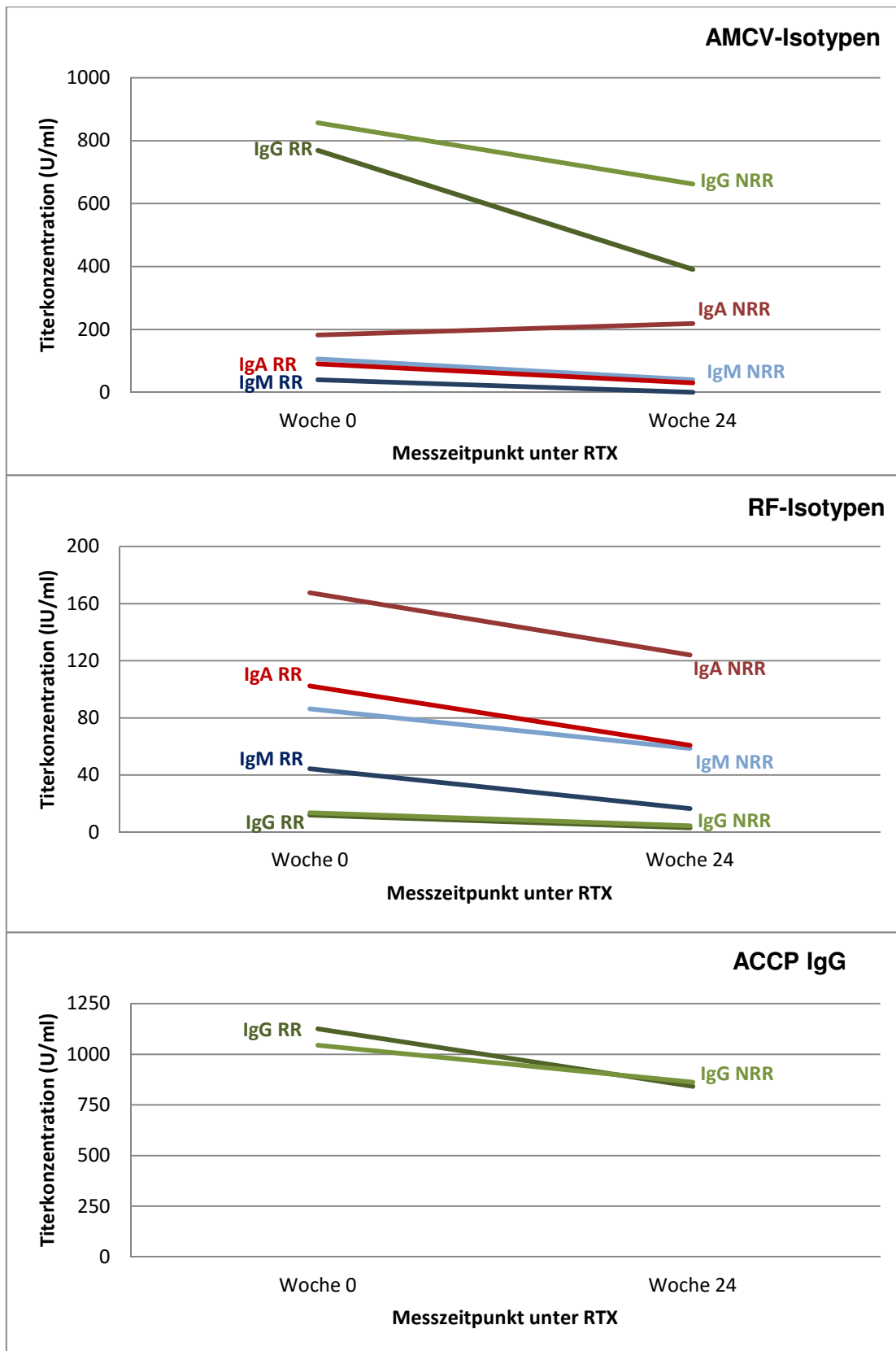


Abb. 14: Die Subtypen-Verläufe der mittleren AMCV-, RF- und ACCP-Titer von Therapiebeginn zu Woche 24 nach RTX-Applikation getrennt für Responder (RR) und Non-Responder (NRR) auf RTX

Kernaussagen:

- AMCV IgM und IgA zeigten höhere Titerreduktionen und Seronormalisierungen unter RTX in RR mit einem signifikanten Unterschied zu den NRR nach der RTX-Intervention.
- NRR wiesen stabile, therapieresistente AMCV IgA-Titer unter RTX auf.
- Die Höhe der AMCV IgA-Titerabnahme vom Ausgangs- zum Folgewert entsprach einer besseren Therapieantwort der Patienten auf RTX nach sechs Monaten.
- Für RF und ACCP-Subtypen konnte kein evidenter Unterschied im Verlauf zwischen RR und NRR aufgezeigt werden.

3.4 Korrelation der Autoantikörper mit dem „Disease Activity Score 28“

Die oben beschriebenen Ergebnisse, die einen Zusammenhang des AMCV IgA mit der Krankheitsaktivität des Patienten erlaubten, wurden durch eine Korrelationsanalyse expliziter untersucht. Die Krankheitsaktivität des Patienten kann nach derzeitigen Richtlinien am besten über den DAS28 eingeschätzt werden, der mit den AMCV IgA-Titern der entsprechenden Patienten korreliert wurde. Vergleichend wurde dies auch für die einzelnen RF- und ACCP-Subtypen durchgeführt.

Ich ermittelte die Differenz (Betrag) des Ausgangswertes zum Folgewert für den DAS28 und den jeweiligen AAK-Titer der AAK-positiven Patienten und korrelierte die Beträge, um einen rein-quantitativen Zusammenhang zwischen beiden Variablen zu erhalten, der unabhängig von einem Zeitpunkt ist. Ausschließlich für AMCV IgA ergab sich von allen AAK ein signifikanter Korrelationskoeffizient (r) von 0,49 ($p = 0,023$) (s. **Abb. 15**). Diese mittlere Korrelation verdeutlichte einen moderaten positiven linearen Zusammenhang der Beträge von AMCV IgA und DAS28 unter RTX-Therapie: Eine Vergrößerung der Differenz beider Variablen (von höheren Ausgangswerten zu niedrigeren Folgewerten) entspricht einer größeren Abnahme des AMCV-Titers und einer Verbesserung des DAS28 und der Krankheitsaktivität. Im Vergleich hierzu ergab eine separate Korrelation von AMCV IgA und DAS28 zu einem Zeitpunkt lediglich eine schwache Korrelation ($r = 0,38$ vor Therapiebeginn bzw. $r = 0,25$ nach der Therapie). Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass nur ein geringer Zusammenhang zwischen den absoluten Werten des DAS28 und AMCV IgA zu einem Zeitpunkt besteht und die relative Veränderung vom Ausgangswert zum Folgewert aussagekräftiger ist.

Ergebnisse

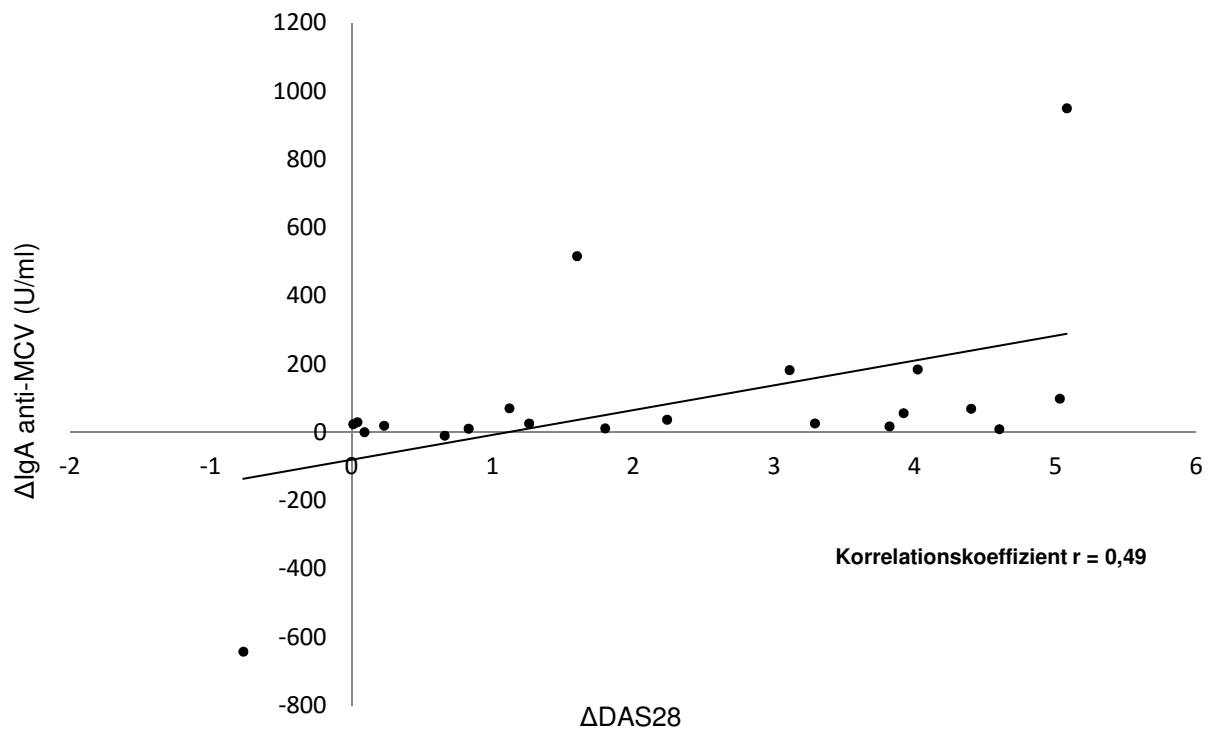


Abb. 15: Korrelation der AMCV IgA-Titer mit dem DAS28 aller 21 AMCV IgA-positiven Patienten als Differenz (Δ) des Ausgangs- zum Folgewert

Für die weiteren Antikörper waren die Korrelationen nicht-signifikant (ausgenommen RF IgG) ($p > 0,05$) (s. Tab. 11). RF IgG zeigte mit dem DAS28 eine Korrelation von $r = 0,997$ auf ($p = 0,046$), die sich jedoch lediglich auf drei RF IgG-positiven Patienten bezog, wodurch die Aussagekraft des Ergebnisses nicht verlässlich ist.

Tab. 11: Korrelationsanalyse aller AAK-Subtypen mit dem „Disease Activity Score 28“ (DAS28) der Autoantikörper-positiven Patienten

	positive Patienten	Korrelationskoeffizient r	p-Wert
AMCV IgA	21	0,49	0,023
AMCV IgM	25	-0,065	0,759
AMCV IgG	50	-0,069	0,063
RF IgG	3	0,997	0,046
RF IgM	29	-0,127	0,51
RF IgA	29	0,012	0,949
ACCP IgG	46	0,211	0,159

Zusammengefasst unterstreicht auch diese Korrelationsanalyse die Unterschiede zwischen den AMCV- und RF/ACCP-Subtypen, die vor allem das AMCV IgA betreffen.

Die Analyse unterstützt die Ergebnisse aus Punkt 3.3.2, in denen die höchsten (relativen) AMCV IgA-Reduktionen mit der besten Therapieantwort einhergingen und die Höhe des absoluten AMCV IgA-Titers keinen Einfluss hatte.

Kernaussage:

AMCV IgA korreliert mit der Krankheitsaktivität der Patienten unter RTX.

3.5 Die Assoziation der Autoantikörper mit den AMCV-Isotypen

Die zuvor in 3.2-3.4 beschriebenen Ergebnisse für AMCV IgA führten zur getrennten Betrachtung der Patienten hinsichtlich ihrer AMCV IgA-Positivität bzw. -negativität. Ich verglich die qualitative (Seropositivität) und quantitative Verteilung (gemittelter Titerbetrag) der übrigen AAK-Subtypen in der AMCV IgA-positiven Patientengruppe (n = 21) mit der AMCV IgA-negativen Gruppe (n = 29). Es konnte für alle AAK eine stärkere Assoziation mit höheren mittleren Titern mit der AMCV IgA-positiven Gruppe nachgewiesen werden (Tab. 12 und Abb. 16):

AMCV IgG: Obwohl die gesamte Kohorte AMCV IgG-positiv war und sich somit eine identische Verteilung in der AMCV IgA-positiven und -negativen Gruppe ergab, war der mittlere AMCV IgG-Titer in der AMCV IgA-positiven Gruppe höher als in der AMCV IgA-negativen Gruppe. Der gemittelte AMCV IgG-Titer war mit 1128,58 U/ml signifikant um das Doppelte größer als für die negativen Patienten mit 548,13 U/ml ($p = 0,012$).

AMCV IgM: Die AMCV IgA-positiven Patienten waren ebenfalls zu 71 % (15/21) mit AMCV IgM vergesellschaftet und zeigten einen signifikant dreifach höheren Titerwert als die AMCV IgA-negative Kohorte (98,65 U/ml vs. 27,1 U/ml) ($p = 0,005$). Hingegen waren 66 % (19/29) der AMCV IgA-negativen Patienten ebenfalls AMCV IgM-negativ, sodass sich nahezu eine spiegelbildliche Verteilung in beiden Gruppen offenbarte.

RF IgG, IgM, IgA: Für die RF und ACCP-Subtypen offenbarten sich ähnliche Tendenzen wie für die AMCV-Subtypen. Der Großteil aller Patienten war RF IgG-negativ, wobei unter den AMCV IgA-negativen Patienten der prozentuale Anteil an RF IgG-negativen Patienten etwas höher war als unter den AMCV IgA-positiven Patienten (97 % vs. 90 %). Die wenigen RF IgG-

Ergebnisse

positiven Patienten waren prozentual auch eher unter den AMCV IgA-positiven Patienten vertreten, was einen signifikant um fast das Doppelte höheren Titer gegenüber der negativen Gruppe bewirkte (16,42 vs. 9,54 IU/ml) ($p = 0,013$).

Tab. 12: Die qualitative und quantitative Verteilung der RF- und ACCP-Subtypen aller 50 RA-Patienten in Abhängigkeit von ihrem serologischen AMCV IgA-Status

		AMCV IgA positive Patienten n = 21	AMCV IgA negative Patienten n = 29	Mann-Whitney p-Wert
AMCV IgG	positiv	100 % (21/21)	100 % (29/29)	
	negativ	0	0	
	mittlerer Titer (U/ml)	1128,58	548,13	0,012
	s (U/ml)	1160,25	573,98	
AMCV IgM	positiv	71 % (15/21)	34 % (10/29)	
	negativ	29 % (6/21)	66 % (19/29)	
	mittlerer Titer (U/ml)	98,65	27,10	0,005
	s (U/ml)	157,69	47,63	
RF IgG	positiv	10 % (2/21)	3 % (1/29)	
	negativ	90 % (19/21)	97 % (28/29)	
	mittlerer Titer (IU/ml)	16,42	9,54	0,013
	s (IU/ml)	15,62	14,13	
RF IgM	positiv	71 % (15/21)	48 % (14/29)	
	negativ	29 % (6/21)	52 % (15/29)	
	mittlerer Titer (IU/ml)	83,47	34,96	0,071
	s (IU/ml)	103,29	51,77	
RF IgA	positiv	81 % (17/21)	41 % (12/29)	
	negativ	19 % (4/21)	59 % (17/29)	
	mittlerer Titer (IU/ml)	161,68	88,66	0,003
	s (IU/ml)	137,91	120,54	
ACCP IgG	positiv	100 % (21/21)	86 % (25/29)	
	negativ	0 % (0/21)	14 % (4/29)	
	mittlerer Titer (U/ml)	1262,77	989,99	0,253
	s (U/ml)	597,03	776,62	

Ebenfalls wies die AMCV IgA-positive Gruppe eine Vergesellschaftung zu 71 % mit RF IgM und zu 81 % mit RF IgA auf. Konträr dazu waren die AMCV IgA-negativen Patienten zu 52 % RF IgM und 59 % RF IgA-negativ. Die mittleren Titer des RF IgM und IgA waren in der positiven Kohorte verglichen mit den AMCV IgA-negativen Patienten um das Doppelte erhöht, wobei jedoch der Unterschied lediglich für RF IgA signifikant war ($p = 0,003$).

ACCP IgG: 46 von 50 Patienten sind ACCP IgG-positiv. Die vier wenigen ACCP IgG-negativen Personen fanden sich interessanterweise auch ausschließlich in der AMCV IgA-

Ergebnisse

negativen Gruppe, womit die AMCV IgA-positive Gruppe ausschließlich ACCP IgG-positiv war. Der mittlere ACCP IgG-Titer der AMCV IgA-positiven Kohorte ist nichtsdestotrotz neben RF IgM mit als einziger AAK-Subtyp aller beschriebenen AAK nicht-signifikant höher als der gemittelte Titer der negativen Kohorte (1262,77 vs. 989,99 U/ml) ($p = 0,253$).

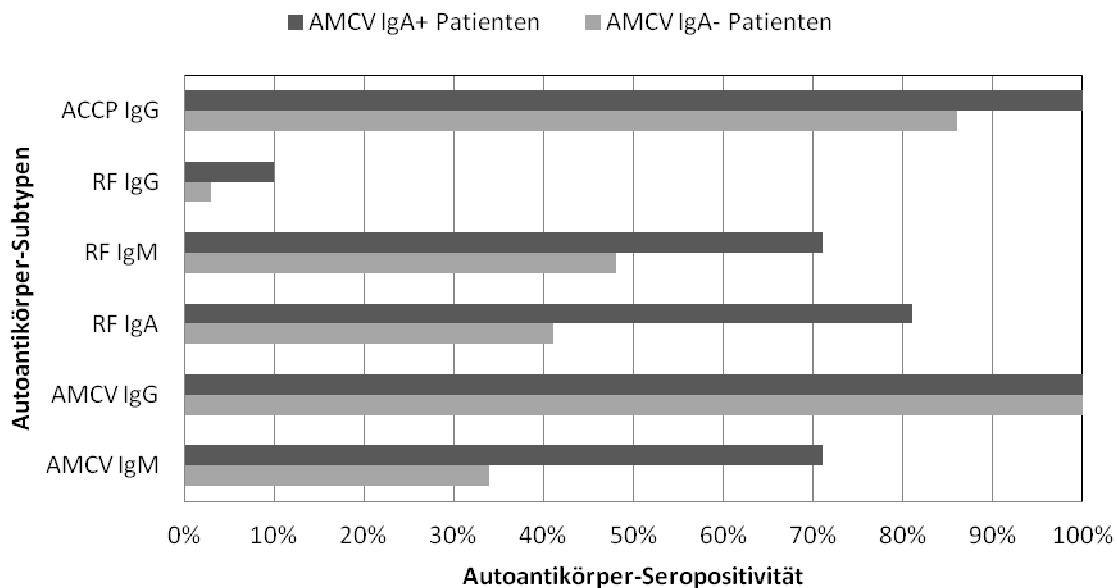


Abb. 16: Assoziation der Autoantikörper-Isotypen mit AMCV IgA-positiven bzw. AMCV IgA-negativen Patienten

Lässt man die nicht-signifikanten AAK außer Betracht, ist AMCV IgA ebenfalls mit AMCV IgM und RF IgA assoziiert. Dies könnte der Subklasse IgA allgemein eine besondere Bedeutung in therapierefraktären, schwerwiegenden Krankheitsverläufen zuschreiben.

Kernaussage:

RA-Patienten mit einem positiven AMCV IgA-Status neigen zu einer subklassenübergreifenden Reaktivität gegen das Antigen MCV.

Ergebnisse

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die prä- und verlaufstherapeutische Verteilung der AMCV-Isotypen könnte eine Subgruppe von RA-Patienten identifizieren, die von einer RTX-Therapie profitiert (s. Tab. 13 und 14):

- i) Das prätherapeutische Fehlen der Subklasse IgA in AMCV IgG-positiven Patienten kann auf ein erfolgreiches Ansprechen auf RTX hindeuten.
- ii) Das Verhalten von AMCV IgA unter RTX entspricht der erzielten Therapieantwort und Krankheitsaktivität nach sechs Monaten der RTX-Therapie.
- iii) AMCV IgA-Positivität ist mit einer übergreifenden Subklassen-Seropositivität (AMCV IgG, AMCV IgM, RF IgA) assoziiert.

Tab. 13: Übersicht über die zentralen Ergebnisse in der AAK-Analyse eines AMCV-IgG-positiven RA-Kollektivs vor und nach RTX-Therapie (R = Remission, NKA = Niedrige Krankheitsaktivität, MDA = Moderate Krankheitsaktivität, HDA = Hohe Krankheitsaktivität)

	AMCV IgG-positives RA-Kollektiv unter RTX-Therapie	
	Responder auf RTX (RR)	Non-Responder auf RTX (NRR)
relative AAK-Verteilung	AMCV IgG +	AMCV IgG +
vor der RTX-Intervention	AMCV IgM -	AMCV IgM +
	AMCV IgA -	AMCV IgA +
	RR \cong NRR für RF und ACCP-Subtypen	
postinterventioneller	AMCV IgM ↓	AMCV IgM ↓
AAK-Verlauf	AMCV IgA in R ↓↓ in MDA ↓	AMCV IgA in HDA/MDA ~
	RR \cong NRR für AMCV IgG, RF IgG, IgM, IgA und ACCP IgG	

Tab. 14: Darstellung der testcharakteristischen Eigenschaften des AMCV IgA als Biomarker für die Evaluation von RA-Patienten für eine RTX-Therapie

Testcharakteristik des AMCV IgA als Biomarker für RA-Patienten unter RTX	
Sensitivität	42%
Spezifität	100%
Positiver prädiktiver Wert	42,86%
Negativer prädiktiver Wert	86,02%
Korrelation r (Δ AMCV IgA und Δ DAS28)	0,49

4 Diskussion

Biologische DMARDs wie RTX sind eine sichere und effektive Behandlungsoption für therapierefraktäre RA-Patienten, um den Krankheitsprogress nachhaltig zu verhindern und eine Remission zu erzielen [31, 32]. In einem Drittel der Fälle versagt jedoch auch dieses Biologikum, was mit individuellen und wirtschaftlichen Konsequenzen verbunden ist [34]. Eine frühzeitige Stratifizierung dieser Patienten, die von der Wirksubstanz profitieren, ist im Sinne des RA-Managements und einer personalisierten Medizin anhand validierter Biomarker von großem Interesse.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Bedeutung der Antikörper gegen MCV als therapeutischen Biomarker in RA-Patienten unter RTX-Therapie. Die Untersuchung von 50 AMCV IgG-positiven RA-Patienten unter RTX-Therapie ergab eine prä- und verlaufstherapeutische Assoziation der Subklasse AMCV IgA zum Therapieansprechen der Patienten mit drei zentralen Resultaten entsprechend meiner Arbeitshypothese:

- i) Der isolierte Nachweis von AMCV IgG ohne die Isotypen IgA und IgM geht mit einem erfolgreichen Ansprechen auf RTX einher. Eine prätherapeutische Doppeleropositivität für AMCV IgG und IgA kann auf ein Therapieversagen hindeuten.
- ii) Das Verhalten der AMCV IgA-Titer unter RTX weist auf die Verbesserung der Krankheitsaktivität und die Therapieantwort des Patienten hin. Stabile AMCV IgA-Titer können hierbei ein Therapieversagen aufzeigen.
- iii) Für die RF- und ACCP-Isotypen konnte weder vor noch während der RTX-Therapie ein Zusammenhang zum Therapieansprechen beschrieben werden. AMCV IgA-positive Patienten zeigen eine verstärkte AAK-Positivität (AMCV IgG, AMCV IgM, RF IgA).

Diese Ergebnisse werfen folgende Fragen zum AMCV IgA auf, die nachfolgend diskutiert werden sollen: Kann AMCV IgA einen therapeutischen Biomarker für eine Biologika-Therapie mit RTX in RA-Patienten darstellen? Was kennzeichnet ihn gegenüber den bislang beschriebenen, prä- und verlaufstherapeutischen Parametern? Welche pathogenetische Rolle erfüllt AMCV IgA und insbesondere die Subklasse IgA für die Therapierefraktärität auf RTX?

4.1 Prätherapeutische Prädiktoren für die BZDT mittels RTX

In der RA gibt es bislang wenig therapeutisch-validierte Biomarker für die adäquate Wahl und Überwachung einer Therapiemethode. Therapeutische Prädiktoren für die biologische BZDT mittels RTX wurden auf genomischer, klinischer, humoraler und zellulärer Ebene untersucht:

4.1.1 Prädiktive Parameter auf genomischer Ebene

Aufgrund einer genetischen Prädisposition für RA wurden pharmakogenomische Untersuchungen des RTX veranlasst, die insbesondere die *Major Histocompatibility Complex (MHC)-Regionen und Non-MHC-Regionen* als sogenannte RA-Risiko-Regionen betreffen [67]. Die 23 beschriebenen Regionen umfassen wiederum Oberflächenmoleküle auf Immunzellen, Zytokine, intrazelluläre Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren. Nachfolgend sollen nur die wichtigsten Regionen mit einer Assoziation zu dem RTX-Ansprechen aufgeführt werden:

Gemäß der Schlüsselfunktion der Zytokine und des relativ guten Therapieerfolgs mit Zytokininhibitoren konnte gezeigt werden, dass *Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNP)* im TNF- und Interferon (INF)-Gen mit einem positiven ACPA-Status vergesellschaftet sind und schlechter auf RTX ansprechen [68]. Hierbei vermittele INF aus peripheren, mononukleären Zellen eine protektorische Funktion auf die BZ in Lymphfollikeln, die somit der Depletion entgehen können [69]. Ebenfalls kann ein Polymorphismus des C/G-174 des *Interleukin 6 (IL-6)* auf ein RTX-Versagen hindeuten und somit einen Versuch des IL6-Inhibitors Tocilizumab indizieren [70].

Des Weiteren konnte ein Polymorphismus im „*B-cell Activating Factor*“ (*BAFF*)-Gen in Beziehung mit einem guten RTX-Ansprechen gebracht werden [71]. Der SNP korrelierte mit dem absoluten BAFF-Level vor der Therapie und somit der Aktivität der BZ, wodurch eine BZD mittels RTX Erfolg verzeichnen könnte.

Weiterhin konnte der *Fcγ-Rezeptor III (FcγRIII)-Genotyp (FcγRIIIa-158V)* auf Monozyten für ein verbessertes RTX-Ansprechen identifiziert werden [72]. Dieser Rezeptor erkennt mit einer höheren Affinität den IgG1-Subtyp. RTX als synthetischer IgG1-Antikörper erkennt BZ, die dann durch die Monozyten verstärkt depletiert werden.

Auch wenn genomische Untersuchungen von Patienten mittlerweile technisch durchführbar sind, eine zunehmende Bedeutung aufgrund methodischer Verbesserung erfahren und einen guten diagnostischen und prognostischen Wert besitzen, ist eine derartige Stratifizierung von Patienten in einer Routine-Diagnostik noch utopisch. Die Analyse in geeigneten Zentren bedingt einen größeren Aufwand mit höheren Kosten, Zeitdauer inklusive Wartezeit bis zur Ergebnisanalyse und ermöglicht keine Verlaufskontrollen von Therapien. Auch wenn ein erkrankungsspezifischer, genomischer „Bedside-Test“ in Zukunft durchaus denkbar ist, wurden diese genetischen Veränderungen bislang nur in AAK-positiven Patienten erforscht [68], sodass negative Patienten weiterhin anderer Biomarker bedürfen.

4.1.2 Prädiktive Parameter auf klinischer Ebene

Die Erhebung klinischer Gelenkscores vor und während der Therapie ist der Goldstandard in dem RA-Management, da eine Verbesserung der aktuellen Krankheitsaktivität des Patienten eine erfolgreiche Therapie widerspiegelt [17]. Höhere DAS28-CRP/BSG-Werte zu Therapiebeginn gingen mit einer Verbesserung der Krankheitsaktivität unter RTX einher und zeigten ein RTX-Ansprechen auf [73]. Dies konnte ebenfalls in unserem Kollektiv beobachtet werden: Während RR mit einem durchschnittlichen DAS28-Wert von 6,23 einen höheren Wert als die NRR mit 5,09 aufwiesen, fiel dieser um nahezu die Hälfte nach sechs Monaten. In NRR blieb dieser hingegen mit einem Abfall von 7,4 % recht stabil.

Weiterhin waren das Versagen eines TNFI und eine fehlende Steroidtherapie vor der RTX-Therapie ein guter Indikator für ein nachfolgendes RTX-Ansprechen [74]. Patientenbezogene Angaben wie das weibliche Geschlecht oder ein hoher HAQ-Score deuteten auf ein schlechteres Outcome hin [73]. Hingegen zeigten Alter und Krankheitsdauer keinen Zusammenhang mit dem Therapieerfolg. In der Praxis orientiert man sich bei einem Therapieentscheid bislang überwiegend an der klinischen Präsentation des Patienten, dem DAS28-CRP/BSG und klinischen Angaben, wobei diese jedoch lediglich richtungsweisend als definitive, objektive Parameter sind.

4.1.3 Prädiktive Parameter auf humoraler Ebene

RA-assoziierte AAK sind die therapeutisch am häufigsten untersuchten Biomarker, da sie sich als gute diagnostische Parameter etablierten. Für die BZDT mittels RTX ist *RF* (insbesondere RF IgM) als Indikator für ein gutes Ansprechverhalten der Patienten auf RTX benannt worden [74-81]. Demgegenüber gab es auch Studien, die keinen Zusammenhang zwischen der Seropositivität der Patienten und dem Ansprechverhalten auf RTX beschreiben konnten [82]. Experimentell wurde sogar aufgezeigt, dass sich das Vorhandensein von RF IgM negativ auf die Wirkweise des RTX auswirke, da RF IgM den Fc-Teil des RTX bindet, wodurch die RTX-bedingte Komplement-abhängige Zytotoxizität der BZ verhindert werde [83]. Unsere Kohorte war nahezu seronegativ für RF IgG. RF IgM und IgA waren in RR und NRR gleichmäßig verteilt, sodass in unserer Untersuchung kein Zusammenhang zur RTX-Therapie hergestellt werden konnte.

Betrachtet man die ACPAs, wurde das RTX-Outcome insbesondere für *ACCP* untersucht. Wenige Untersuchungen betrafen *AMCV*. *ACCP* IgG wurde im direkten Vergleich zu RF des Öfteren eine Unterlegenheit des therapieassoziierten Verhaltens zugeschrieben [74, 78, 80]. Das entspricht den Beobachtungen zu *ACCP* IgG in meiner Untersuchung. Es gibt jedoch auch Studien, die dem Nachweis von *ACCP* IgG (gleichwertig zum RF IgM) ein gutes Ansprechen auf RTX zuschrieben [79, 81]. In Biologikum-naiven Patienten war *ACCP* sogar ein positiv-prädiktiver Parameter [84]. Der Aspekt „Biologikum-naiv“ ist bedeutsam, weil diese Patienten (wie partiell in unserer Kohorte) vortherapeutisch unbeeinflusst waren und sich die AAK-Kinetiken ohne Biologikum-vormodulierende Wirkung offenbarten (s. 4.6.1). Der Nachweis von *ACCP* IgM im Synovium könnte ebenfalls auf ein positives RTX-Ansprechen hindeuten [85]. Eine synoviale Bestimmung von AAK ist jedoch eine relativ invasive Methodik mit einem höheren Aufwand und der Gefahr postinterventioneller Komplikationen, sodass es für die Routinediagnostik des klinischen Alltags eher eine untergeordnete Rolle besäße.

AMCV IgG wurde in einem direkten Vergleich mit RF- und *ACCP*-Isotypen als RTX-Prädiktor aufgezeigt [78]. Einen ersten Hinweis auf die Bedeutung der Subklassen des *AMCV* erbrachten Svärd et al. [63], indem sie aufzeigten, dass die Co-Existenz von *AMCV* IgA in *AMCV* IgG-positiven Patienten mit einem prognostisch-ungünstigen Krankheitsverlauf vergesellschaftet war.

Um den Zusammenhang eines schwerwiegenden Krankheitsverlaufes mit der Therapierefraktärität und den Ig-Isotypen herzustellen, untersuchte ich die Isotypen-Verteilung in einer AMCV-positiven Kohorte. Patienten meiner Untersuchung, die auf RTX nicht ansprachen, wiesen häufiger AMCV IgA auf. Ein Fehlen des AMCV IgA ging demgegenüber mit einer hohen Wahrscheinlichkeit mit einem guten Therapieeffekt unter RTX einher. Das Auftreten des AMCV IgA könnte demzufolge nicht nur einen schwerwiegenden Verlauf, sondern auch ein Versagen auf RTX anzeigen. Weitere Untersuchungen explizit zur Assoziation der AMCV-Subtypen in Patienten mit dem RTX-Ansprechen fehlen bislang.

Insgesamt sind die Ergebnisse der RA-assoziierten AAK nicht zuletzt aufgrund der Heterogenität der Studien (s. 4.6) kontrovers postuliert und erlauben keine definitive Aussage, wodurch ein standardisiertes Vorgehen in der RTX-Therapie noch nicht ermöglicht werden konnte.

4.1.4 Prädiktive Parameter auf zellulärer Ebene

BZ des peripheren Blutes umfassen zu 60-70 % naive BZ, die durch RTX nahezu komplett depletiert werden [30]. Dennoch weist die absolute, prätherapeutische *BZ-Zahl* im Serum und die messbare BZD ($< 0,0001 \times 10^9$ Zellen/Liter Blut) keine Relation zu der klinischen Verbesserung und dem Therapieerfolg unter RTX auf [86]. Diese Beobachtung ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass der Krankheitszustand eines Patienten nicht nur durch die im Blut nachweisbaren, zirkulierenden BZ bedingt wird. Insbesondere die extravasalen BZ lymphoider Gewebe sind für die Krankheitsaktivität des Patienten entscheidend, da dort die BZ-Reifungen und AAK-Generierungen stattfinden [87]. Eine absolute BZD im peripheren Blut kann demzufolge durch die parenterale RTX-Applikation bereits nach zwei Wochen nahezu komplett erfolgen und nachgewiesen werden [30, 31]. Hingegen findet die Depletion im Synovium und Knochenmark in Abhängigkeit von der Pharmakokinetik/-dynamik des RTX (Gewebegängigkeit und Erreichbarkeit der extravasalen BZ) statt und ist inkomplett [27, 28, 88, 89]. Das residuale Auftreten von der BZ im Synovium und/oder Knochenmark geht mit einer Rest-Entzündungsaktivität einher, die maßgeblich auf den entdifferenzierten Zellen beruht und die Krankheitsaktivität des Patienten bestimmt [87].

Das RTX-Ansprechen hängt folglich von der *Pharmakokinetik/-dynamik des RTX* und dem *individuellen BZ-Repertoire* des Patienten ab [29]. Beides stellen jedoch Parameter dar, die vor

Diskussion

der Therapie objektiv nicht fassbar und die Therapieerfolge damit vorhersehbar sind. Unter der Therapie symbolisiert eine stärkere synoviale Depletion an BZ ein besseres Ansprechen auf RTX und wäre das entscheidende Kriterium zur Therapieevaluation [90]. Untersuchungen zur Bestimmung der BZ-Anzahl der Synovialflüssigkeit [88, 90], der Milz und des Knochenmarks [85, 89] sind durchaus technisch möglich. Eine derartige Stratifizierung ist jedoch für die Routine-Diagnostik aufgrund postinterventioneller Komplikationen (Infektions-/Blutungsrisiko) und der Anwendungsmöglichkeit (Verfügbarkeit, Kosten, Zeitaufwand, Spezialisten) weniger praktikabel. Die alleinige, rein quantitative BZD im peripheren Blut stellt somit keinen prädiktiven Marker für die RTX-Response dar [86].

Lediglich 2,4 (\pm 1,5) % der *T-Zellen* exprimieren den CD20-Rezeptor, weshalb RTX vorrangig ein B-Lymphozyten-Antagonist ist [91]. Nichtsdestotrotz offenbarte eine aktuelle Studie bei einer Blutzell-Analyse mittels Durchflusszytometrie in RA-Patienten nach BZDT eine indirekt-bedingte Abnahme der T-Helfer (CD4+)-Zellzahl (bis 57 %) nach 24 Wochen, wobei nicht-depletierte T-Zellen sogar mit einem RTX-Versagen einhergingen [91]. Ähnliches wurde für die synovialen T-Helfer-Zellen gezeigt, wohingegen die Anzahl im peripheren Blut bei dieser Untersuchung nicht abnahm [28]. Hier besteht jedoch weiterer Forschungsbedarf.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die genannten prädiktiven Parameter auf genomischer, klinischer, humoraler und zellulärer Ebene einen Hinweis, jedoch keine definitive Prädiktion zum RTX-Ansprechen gewährleisten können [80]. Parameter, die auf einen aktiven Erkrankungszustand und schwerwiegenden Verlauf der RA hindeuten, können die Notwendigkeit und den Erfolg von RTX implizieren: fortgeschrittenes Krankheitsbild und hohe Krankheitsaktivität (DAS28), später Therapiebeginn bzw. Therapierefraktärität (k/bDMARDs), Erhöhungen der RA-spezifischen (RF IgM/G oder AMCV IgG) und unspezifischen Biomarker (CRP, BSG) sowie eine genetische Prädisposition. Eine Bestimmung der absoluten BZ-Zahl unter BZDT ermöglicht aufgrund der fehlenden extravasalen BZ-Bestimmung keine Prädiktion für RTX. Hingegen könnte eine differenzierte Bestimmung der Ig-Subtypen (IgG, IgM, IgA) als Korrelat der BZ-Aktivität weitaus genauere Einblicke gewähren: In dieser Studie zu den AMCV-Subtypen konnte gezeigt werden, dass die Konstellation AMCV IgG+/AMCV IgA- auf ein erfolgreiches RTX-Ansprechen hindeuten könnte, während AMCV IgG+/AMCV IgA+ ein Indikator für ein mögliches RTX-Versagen sein könnte.

4.2 Verlaufstherapeutische Prädiktoren für die BZDT mittels RTX

Für die genannten humoralen und zellulären Parameter zeigte sich vielmehr eine verlaufstherapeutische als prädiktive Bedeutung für die RTX-Therapie.

4.2.1 Verlaufstherapeutische Parameter auf humoraler Ebene

Alle *RF-Subklassen* (RF IgM > RF IgG) zeigten RTX-bedingte Reduktionen der initialen AAK-Level im Zusammenhang mit einer besseren Therapieantwort [92-94]. Im Gegensatz dazu blieb *ACCP IgG* unter der Therapie unverändert [92-94] oder fiel sehr moderat erst nach sechs Monaten [95]. Auch unsere Untersuchung bestätigte diese Beobachtungen: RF imponierte mit RTX-abhängigen Titerreduktionen für alle Subtypen nach einem halben Jahr (RF IgM > IgA), jedoch unabhängig vom Therapieansprechen der Patienten. *ACCP IgG* verhielt sich gleichermaßen in RR und NRR über sechs Monate stabil.

Untersuchungen des *AMCV*-Verhaltens unter BZDT fehlen bislang. In meiner Untersuchung unterschieden sich die *AMCV*- von den *RF*- und *ACCP*-Isotypen bezüglich ihrer Verläufe in Abhängigkeit von dem RTX-Ansprechen:

- *AMCV IgM* stärkste, kongruente Reduktionen in RR/NRR,
- *AMCV IgG* leichte, kongruente Reduktionen in RR/NRR und
- *AMCV IgA* mittlere, inkongruente Reduktionen in RR/NRR.

Diese Unterschiede zwischen den einzelnen AAK-Isotypen (IgM > IgA > IgG) können auf unterschiedliche RTX-sensible BZ-Subpopulationen zurückgeführt werden, die man unter RTX-Therapiekontrolle nutzen kann (s. hierzu 1.2.2.1):

Die Subklasse IgM als primärer Antikörper aus RTX-sensiblen BZ bzw. IgM-MBZ verkörpert im Allgemeinen eine akute, aktive Entzündungssituation eines Patienten. Die permanente Autoantigen-Präsentation bewirkt das Recruitment neuer BZ und die immer wieder neu-aufflammenden Synovitiden mit dem Nachweis von (ACPA)s IgM [96]. Die akute Entzündungssituation wird in der RA über den klinischen Gelenkstatus anhand des DAS28 erfasst [8]. Ein erhöhtes IgM und erhöhter DAS28 sind somit theoretisch Parameter, die auf das Vorherrschen einer RTX-sensiblen BZ-Population hindeuten könnten und in den Schüben ein

Diskussion

Durchbrechen des Circulus vitiosus mittels RTX ermöglichen würden. In meiner Untersuchung bestätigten die Reduktion des IgM (aller AAK) mit einer stärkeren Seronormalisierung in RR und die Reduktion des DAS28 in RR diese Annahme.

Die IgG/A-Level aus PB/PZ und MBZ spiegeln im Gegenzug die autoprotektive Grundaktivität wider [23]. Kerkman et al. [97] konnten für die ACPAs nachweisen, dass ACCP IgG des peripheren Blutes aus RTX-resistenten PB und RTX-sensiblen MBZ stammt. Die vorrangig im Patienten vorherrschende Zelllinie, histologische Verteilung der BZ und Gewebegängigkeit des RTX könnte für eine variable Depletion der BZ sorgen. Diese abhängige Depletion könnte wiederum für die variablen Verläufe von IgG und IgA unter RTX verantwortlich sein. Aus diesem Grunde könnte eine Langzeit-Therapie mit RTX, die vermutlich auf der besseren Gewebdiffusion des RTX bis in die lymphoiden Nischen basiert, zur Reduktion der IgA- und IgG-Titer führen [89].

Da die Reduktionen von AMCV IgG und IgM für RR und NRR unter RTX in unserer Kohorte nahezu kongruent verliefen, könnte man eine ähnliche BZ-Population in beiden Gruppen vermuten. Im Gegensatz dazu verliefen die Reduktionen von AMCV IgA unterschiedlich in RR und NRR in Abhängigkeit von der Verbesserung der Krankheitsaktivität nach sechs Monaten: Je besser das Therapieansprechen war, desto höher waren die AMCV IgA-Reduktionen. Die absoluten AMCV IgA-Ausgangswerte besaßen per se keinen prädiktiven Charakter, jedoch je höher die AMCV IgA-Werte in den RR waren, umso stärker war die relative Titerreduktion. Vergleichbar mit den Tumormarkern in onkologischen Therapieevaluationen sind die relativen Verläufe des AMCV IgA entscheidend, was durch die positive moderate Korrelation des Betrages von DAS28 und AMCV IgA bestätigt wurde. Die unbeeinflussten AMCV IgA-Titer in NRR könnten nun in Analogie zu dem oben Genannten auf AMCV IgA-BZ zurückgeführt werden, die sich bezüglich des BZ-Reifegrades (Besitz des CD20-Rezeptors), der Gewebpräferenz oder histologischen Erreichbarkeit durch RTX von den AMCV IgA-BZ der RR unterscheiden (nähere Ausführung s. 4.4) [29].

In diesem Kontext demonstrierte unsere Arbeitsgruppe (Lindenberg et al.) anhand eines *MCV-Epitop-Mappings* ein differentes Erkennungsmuster der MCV-Epitope durch die AMCV-Antikörper in Abhängigkeit der RTX-Response von 34 RA-Patienten. Die Antikörper von RR (n = 23) reagierten vor der Therapie gegen andere Peptidsequenzen des MCV-Proteins als die der NRR (n = 11). Unter der BZDT reduzierte sich die Reaktivität in RR, blieb jedoch unverändert

hoch in NRR. Diese unterschiedliche AMCV-Reaktivität verdeutlicht die unterschiedliche AAK-Natur beider Gruppen noch eindrücklicher. Einerseits könnte diese unterschiedliche Reaktivität durch das Vorherrschen unterschiedlicher Ig-Subtypen in RR und NRR bedingt sein, die dominierend oder interferierend (Avidität) gegen bestimmte Epitope reagieren. Andererseits beträfe es dieselbe Ig-Subklasse mit lediglich unterschiedlichen Fab-Regionen in RR und NRR aufgrund des favorisierten Epitopes. Welche Bewandnis die unterschiedliche Detektion und Kombination bestimmter Epitope für die Non-Response auf RTX hat, könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

4.2.2 Verlaufstherapeutische Parameter auf zellulärer Ebene

Aufgrund der beschriebenen Immunglobulin-Kinetik als Korrelat der BZ-Aktivität könnte eine differenziertere Betrachtung der *BZ-Subpopulationen* in RR und NRR den individuellen (therapeutischen) Krankheitsverlauf expliziter darstellen [98]. Das Therapieansprechen unter BZDT sei insbesondere mit dem Gedächtnis-BZ-Kompartiment (MBZ: CD19+, CD20+, CD27+) assoziiert (CD27+ bzw. IgD als Marker der Differenzierung bzw. des Ig-Klassenwechsels) [25]. Diese Zellen besitzen als immunologisches Gedächtnis die Fähigkeit bei Antigen-Kontakt (wie den citrullinierten Proteinen), neue, aktive PB zu generieren, die ihrerseits zeitlebens als PZ mit niedrig-titrigen AAK-Produktionen ins Knochenmark übergehen und die RA aufrechterhalten [22]. Eine Depletion dieser RTX-sensiblen MBZ als Prä-Switch (IgD+) oder Post-Switch (IgD-)-MBZ sei somit der Schlüssel, diesen sich selbst-ernährenden Prozess aufzuhalten [99].

Eine komplette Depletion der MBZ (mit der indirekten PB-Reduktion) im peripheren Blut geht mit einem erfolgreichen Therapieansprechen einher [27, 100]. Höhere zirkulierende PB nach dem ersten RTX-Zyklus seien mit einer schlechteren Therapieantwort assoziiert [101]. Insgesamt zeigte sich ein Shift der unreifen CD27-negativen BZ zu Gunsten der RR und der reifen CD27-positiven BZ zu Ungunsten der NRR [102]: Durch die komplette Depletion der BZ ist die nachfolgende, entdifferenzierte CD27-positive BZ-Linie (MBZ, PB) mit einer „kompensatorischen Erhöhung“ der unreifen BZ-Linie in RR (IgD-, CD27-) ebenfalls indirekt depletiert. Eine Erhöhung der Prä-Switch-MBZ wird hingegen in den NRR beobachtet. Prä-Switch-MBZ sind hauptsächlich aus dem Marginal-Pool der Milz bekannt, der befähigt ist, T-Zell-unabhängige Immunantworten zu generieren, weshalb diese Zellen zumeist auf einer frühen

Diskussion

Stufe ohne Klassenwechsel (IgD/IgM+) verbleiben [103, 104]. Inwiefern dieser Zusammenhang ursächlich für eine Non-Response sein kann, ist Gegenstand der Forschung. Diese histologische Milz-Nische könnte jedoch eine Ursache für die reduzierte Wirksamkeit von RTX sein.

Im Anschluss an eine Depletion findet in allen Patienten eine *Repopulation von BZ* in einer bestimmten Reihenfolge im peripheren Blut statt: Als erstes erscheinen unreife BZ und PZ-ähnliche BZ (IgD/IgM-, CD20-, CD27/38+), gefolgt von naiven BZ, die den größten Teil umfassen und zuletzt regenerieren sich die MBZ [105]. In NRR konnte gezeigt werden, dass vor allem die MBZ in der Repopulationsphase überwogen [106]. So könnte ein erneuter RTX-Zyklus bei initialen NRR, noch ehe sich die Repopulation ereignet, zu einem besseren RTX-Ansprechen führen [101].

Während die naiven BZ im peripheren Blut vorherrschten, hielten sich im Synovium überwiegend Post-Switch-MBZ auf [107]. In welchem Verhältnis diese synovialen Post-Switch-MBZ zum Therapieversagen und zu den Prä-Switch-MBZ der NRR im peripheren Blut stehen, ist noch nicht geklärt. MBZ machen lediglich einen geringen Teil der Zellen im peripheren Blut aus, da sie sich überwiegend in lymphoiden Geweben ansiedeln, wodurch ihre erfolgreiche Elimination überwiegend von ihrer extravasalen Depletion durch RTX abhängt [108]. Zirkulierende PB, die infolge einer Reaktivierung aus MBZ hervorgehen können und nach einer BZDT weiterhin im Serum nachweisbar sind, gingen mit einem unzureichenden Ansprechen auf RTX einher [101]. Das erfolgreiche Ansprechen auf RTX hängt ebenfalls von der Reduktion der synovialen PZ ab, die aus den PB hervorgehen und für die basalen AAK-Produktionen verantwortlich sind [28, 109]. Eine Reduktion der synovialen AAK (IgG, IgM; ACCP IgM; RF IgM) konnte den extravasalen RTX-Effekt widerspiegeln und das erfolgreiche Ansprechen aufzeigen [85, 107, 110]. Den meisten klinischen Rezidiven ging ein AAK-Anstieg (insbesondere gezeigt für RF IgM) voraus [95, 111].

All diese aufgeführten Beobachtungen könnten die Hypothese bestätigen, dass unterschiedliche BZ-Subpopulationen bzw. BZ-Kinetiken in RR und NRR bestehen: In NRR könnten gewebesresistente MBZ mit konsekutiv erhöhten Autoimmunreaktionen vermutet werden. Die extravasale Depletion der MBZ wäre somit das entscheidende Kriterium zur Bewertung des Therapieansprechens des Patienten auf RTX [112]. Die synoviale Bestimmung bzw. Phänotypisierung der BZ mittels Durchflusszytometrie macht sie technisch möglich, jedoch zum

relativ-invasiven, weniger-praktikablen und zeit-/kostenaufwändigen Bewertungsmaßstab. Die Immunglobulin-Isotypen der RA-assoziierten AAK (idealerweise synoviale AAK) könnten als Korrelat der BZ-Subpopulation die erkrankungsbedingte, artikuläre Aktivität wiedergeben und damit labordiagnostisch-messbare, weniger-invasive sowie praktikablere Maßstäbe darstellen. Einerseits könnte MCV als synoviales, inflammatorisch-bedingtes Protein mit den Verläufen der assoziierten AMCV-Subtypen unter Therapie einen Anhalt auf die eliminierte BZ-Klasse (individuelles BZ-Repertoire) geben. Andererseits könnte es zugleich die Kapazität der Diffusion des RTX bis in die synovialen Nischen (Pharmakokinetik) widerspiegeln. AMCV IgM als Zeichen der unreifen, RTX-sensiblen BZ wird in unserem RA-Kollektiv am stärksten in RR reduziert, wohingegen AMCV IgA in NRR unbeeinflusst bleibt. AMCV IgA könnte durch seine RTX-bedingte Kinetik als verlaufstherapeutischer Marker einen Anhalt auf das Therapieansprechen geben.

4. 3 Die Assoziation der Autoantikörper mit den AMCV-Isotypen

Unsere Patienten wurden hinsichtlich ihrer *AMCV IgA-Positivität* in AMCV IgA-positive und negative Patienten unterteilt, um die Koinzidenz mit weiteren AAK zu überprüfen. Es konnte durch eine vorherige Studie gezeigt werden, dass eine übergreifende AAK-Seropositivität (RF IgG, IgM, IgA; AMCV IgG; ACCP IgG, IgM, IgA) prädiktiv für das RTX-Ansprechen sein könnte [78]. Eine Kombination bestimmter Isotypen, die das Ansprechen besonders gut oder weniger gut voraussagen, wurde nicht benannt, da schlussendlich in die Studie alle Patienten mit einer Seropositivität für einen dieser AAK einbezogen wurden.

Weiterhin ergab ein Vergleich der AAK-Verteilungen in Patienten, die einen TNFI (Gruppe 1) bzw. auf TNFI-Refraktärität RTX (Gruppe 2) erhielten, ein verstärktes Auftreten aller RF-Isotypen in Gruppe 2 [113]. Insbesondere RF IgA, dessen Auftreten mit einem vorzeitigen Symptombeginn [49], extraartikulären Manifestationen [49] und einem TNFI-Versagen einhergeht [114], trat vermehrt unter diesen Patienten auf. Inwiefern RF IgA-Seropositivität mit dem RTX-Therapieansprechen zusammenstünde, wurde in der Studie nicht untersucht.

In unserer Kohorte ging eine AMCV IgA-Positivität nicht nur mit einer stärkeren Assoziation von AMCV IgM und IgG, sondern auch RF IgA einher. RF IgA war in der Gruppe der NRR mit 69 % gegenüber den RR mit 54 % prozentual stärker nachzuweisen (jedoch ohne Signifikanz).

Dies verdeutlichte, dass AAK-positive RA-Patienten eine übergreifende AAK-Positivität aufweisen und nicht nur eine Betrachtung der RF- oder ACPA-Positivität, sondern auch der

Isotyp-Verteilung erfolgen sollte. An dieser Stelle wird durch das IgA-AMCV und IgA-RF die Aufmerksamkeit auf den Isotyp IgA gerichtet, dessen Relevanz nachfolgend erörtert wird.

4.4 Die Bedeutung der Immunglobulinklasse IgA (AMCV IgA)

Unsere Beobachtungen offenbarten die Subklasse IgA des AMCV als Komponente eines schlechteren Therapieansprechens auf eine BZDT. Vorherige Untersuchungen charakterisierten RF IgA und sIgA ebenfalls als negative therapeutische Prädiktoren [114, 115]. Die Anfänge der serologischen RA-Forschung widmeten sich dem IgA-RF, der wiederholt erhöht in RA-Patienten auftrat, mit schwerwiegenderen Verläufen und der Krankheitsaktivität assoziiert war, jedoch verliefen sich die Untersuchungen vielmehr in neueren AAK-Gruppen als der Immunglobulinsubklasse IgA per se [116]. Für jeden AAK-Typus lässt sich jedoch übergeordnet für die Subklasse IgA ähnliche Beobachtungen anstellen (s. 4.4.4), sodass zu klären gilt:

Welche Bedeutung besitzt die Immunglobulinklasse IgA für die Entstehung der RA und folglich die Therapie der RA?

- ➔ Ist AMCV IgA das Sinnbild einer generell erhöhten IgA-Immunantwort?
- ➔ In welcher BZ-Subklasse, in welchem Gewebe und auf welchen Stimulus wird IgA im Vergleich zu IgM und IgG generiert?
- ➔ Inwiefern sind erhöhte IgA-Werte mit einem schwerwiegenderen Krankheitsverlauf und einer Therapierefraktärität assoziiert?

⇨ Funktion und pathogenetische Relevanz der Subklasse IgA (mit Bezug zu AMCV)

4.4.1 Physiologie und Pathophysiologie des IgA

Funktion: IgA als Antikörper-Dimer (auch Monomer) der adaptiven Immunantwort wird physiologischerweise in Organsystemen gebildet, deren Epithelien extrinsischen Kontakt haben (Gastrointestinaltrakt, Urogenitaltrakt, Respirationstrakt, Milchdrüsengewebe etc.) [117]. Es bildet in sekretorischen Körperflüssigkeiten die Barriere von der Körperaußenwelt zur -innenwelt, indem es pathogene Antigene, ehe sie die Epithelschranke überschreiten, durch Immunkomplexbildung („Immunexklusion“) neutralisiert und diese durch mukoziliäre/peristaltische Vorgänge natürlich abgesondert werden [117]. Sie werden speziell in Mukosa-assoziierten lymphoiden Geweben („Mucosa associated lymphoid tissue MALT“: Laminae propriae vieler Gewebe mit drainierenden Lymphknoten) über Keimzentrumsreaktionen gebildet und durch IgA-bildende PZ über das Mukosaepithel lumenwärts sezerniert [117]. Eine

herausragende und die wohl essentiellste Bedeutung besitzen die IgA im Gastrointestinaltrakt („Gut-associated lymphoid tissue GALT“: Peyer-Plaques und isolierte Lymphfollikel) [118]. Im Gegensatz zur Neutralisierung der mukosal aufgenommenen, schädlichen Mikroorganismen anderer Gewebe müssen die IgA im Gastrointestinaltrakt zusätzlich für eine Toleranz der symbiotisch nützlichen Darmflora sorgen (mikrobielle Homöostase) [119].

IgA-Dysfunktion: Eine Imbalance zwischen der IgA-Antwort und der mikrobiellen Kolonisation des Gewebes ist für eine Immunschwäche mit einer erhöhten Anfälligkeit für infektiöse und nicht-infektiöse (autoimmune) Erkrankungen verantwortlich [120]. Häufig liegt eine Fehlfunktion des IgA zugrunde, deren Auswirkungen am besten anhand von Patienten mit einem selektiven IgA-Mangel (primäre IgA-Immundefizienz sIgA < 0,07 g/l) verstanden werden konnten [121]. Qualitative/funktionelle Veränderungen des IgA wirken sich ähnlich aus, nur werden diese durch Serummessungen nicht erfasst. Die Veränderungen des IgA können die Bildung in Keimzentren, den Epitheltransport, die zellulären IgA-Rezeptoren und eine luminale Dysfunktion durch vermindertes, vermehrtes oder aberrantes IgA betreffen [122, 123]. Interessanterweise zeigten sich diverse Aberrationen des intestinalen IgA (J-Kette, Ig-Rezeptor) in Mausmodellen in Erhöhungen des Serum-IgA aufgrund der Akkumulation der dysfunktionalen IgA-Antikörper [124].

IgA-bedingte Autoimmunerkrankungen: Bei dysfunktionalem IgA oder einer Imbalance der mikrobiellen Kolonisation ist die Entstehung von infektiösen Erkrankungen (bronchiale, gastrointestinale Infekte) plausibel [120]. Der Zusammenhang zu nicht-infektiösen (autoimmunen) Erkrankungen ist hingegen nicht sofort ersichtlich, dennoch wurde schon frühzeitig der Zusammenhang zwischen (primärer) IgA-Defizienz als IgA-Mangel und (juveniler) RA aufgezeigt [125, 126]. Wie aus epidemiologischen Untersuchungen hervorgeht, sind IgA-defiziente Patienten häufiger von Zöliakie, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, perniziöser Anämie, pankreatischen Erkrankungen, Atopien, Neoplasien und rheumatologischen Erkrankungen (Kollagenosen, RA, Vaskulitis) betroffen [126-129]. Inwiefern defizientes IgA zu autoimmunen Prozessen bzw. eine genetische, autoimmune Prädisposition zu IgA-Defizienz führt, ist noch ungeklärt [130].

Die häufigste ektopische, autoimmune Manifestation ist die RA, die über T-Helfer-17-Zellen (Th17) getriggert wird. Anhand eines Mausmodells konnte gezeigt werden, dass gastrointestinale

Bakterien, die vornehmlich mukosale Immunreaktionen triggern, über die Th17-Zellen eine humorale Reaktion auslösen können, die sich als Arthritis an den Gelenken manifestiert [131]. Die mikrobiell-bedingten Antikörperproduktionen könnten im Zuge der Ähnlichkeit zu artikulären Strukturen (molekulare Mimikry) zu diesen aseptischen Arthritiden führen [132]. Interessanterweise unterscheiden sich die RA und die IgA-Defizienz-bedingte Polyarthritits klinisch kaum (polyarthritische Beschwerden, Tenosynovitis, Rheumaknoten, Seronegativität). Es zeigt sich lediglich im Besatz der synovialen Immunzellen ein Shift von BZ/PZ/CD4+-T-Zellen zu geringen (bis fehlenden) BZ/PZ und CD8+-T-Zellen [132]. In nicht-RA-erkrankten Personen mit stattgehabten mukosalen Infektionen (respiratorisch, gastrointestinal, parodontal) finden sich häufig die RA-assoziierten AAK vom Typ IgA (RF und ACCP) und könnten der RA vorausgehen, wodurch diese Hypothese ebenfalls in Betracht zu ziehen ist [133].

Rein spekulativ könnte das für eine Subgruppe von Patienten mit der klinischen Präsentation einer RA bedeuten, dass diese sekundär durch eine mukosale (lokal begrenzte) IgA-Dysfunktion entstanden ist: Im Zuge des Übertritts pathogener Keime und der molekularen Mimikry manifestiert sie sich als aseptische, postinfektiöse Polyarthritits. Die Autoimmunantwort könnte dann als erhöhtes IgA im Serum detektierbar sein.

4.4.2 RA-spezifische Autoantikörper vom Typ IgA

Die Subklasse IgA des RF, ACCP sowie AMCV wurde des Öfteren beschrieben mit (einer/m):

- frühzeitigen Auftreten vor dem RA-Beginn: RF IgA, ACCP IgA [49, 51, 116],
- höheren synovialen Konzentration: RF IgA [134],
- schwerwiegenden Krankheitsverläufen: AMCV/ACCP IgA [63, 135],
- extraartikulären Manifestationen: RF IgA [49],
- Therapieversagen unter TNFI: RF IgA [114].

Das Auftreten der Subklasse IgA könnte somit auf eine Form der RA hinweisen, die sich durch eine stärkere systemische Komponente mit einem schwerwiegenden Krankheitsbild äußert.

4.4.3 Zellulärer und histologischer Ursprung des IgA

Interessante Untersuchungen der IgA-produzierenden BZ gingen auf Mei et al. [136] zurück: IgA stammten im Blut überwiegend aus PB/PZ. Diese Zellen exprimieren den Chemokin-Rezeptor Typ 10 (CCR10), dessen Ligand (CCL27) von den Epithelien der Haut, des Respirationstraktes und Gastrointestinaltrakts produziert wird und eine Chemotaxis auf

Melanozyten, PZ und T-Zellen bewirkt [136]. Ein Fortbestand der IgA-PB unter BZDT und ein fehlender Nachweis von PB-Vorläufern im Blut implizierte, dass die IgA-PB nicht aus naiven BZ oder MBZ des peripheren Blutes hervorgehen konnten [137]. Demzufolge wurde laut Mei et al. ein mukosaler Ursprung aus partiell RTX-resistenten IgA-MBZ und ein mukosaler Bestimmungsort der sIgA-PB vermutet. Das Blut diene im immunologischen Gleichgewicht somit als ein zwischenzeitlicher Aufenthaltsraum, aus dem die Zellen jederzeit in ihr Ursprungsgewebe rekrutiert werden können und man ihre Antikörper als sIgA-Level messen könnte [138]. Ob das Ursprungsgewebe vorrangig das GALT des Darmes oder das MALT der übrigen Schleimhäute darstellt, muss weiter erforscht werden. Eine Beziehung zu Darmmikroben oder der Bakterien der Parodontitis und somit extrinsischen Auslösern konnte jedoch schon früh aufgezeigt werden [13, 139].

4.4.4 Bedeutung des IgA in einer RTX-Non-Response

Systemische, sekundäre Immunisierungen (mit Tetanus/Diphtherie-Toxin) evozierten eine Genese von IgG-produzierenden PB mit PZ-Mobilisierung aus dem Knochenmark ohne eine eintretende sIgA-Immunantwort. Laut Mei et al. müsste die IgA-Produktion als autonome Immunantwort somit an einen mukosalen Trigger gekoppelt sein [136]. Da sIgA-PB aus sesshaften MBZ der Schleimhäute stammen, ginge eine aufkommende IgA-Immunantwort im Serum als Gedächtnisantwort mit der erhöhten Inflammation des mukosalen Gewebes einher. Für RA-Patienten konnte bspw. ein Zusammenhang zwischen aufkommender sIgA(M)-Antwort (sowie Erkrankungsaktivität) und Aufnahme bestimmter Nahrungsbestandteile (aus Milchproteinen, Cerealien, Fisch, Fleisch, Ei) gezeigt werden [140].

Fügt man alle o. g. Betrachtungen zusammen, könnte in einigen Patienten (NRR) eine **erhöhte sIgA-Immunantwort durch IgA-MBZ infolge einer mukosal-bedingten Inflammation** hervorgerufen werden. Diese Patienten könnten eine pathogenetisch-differente Entität zu den IgA-negativen Patienten darstellen. Die IgA-produzierenden PB (CD20-negativ) des peripheren Blutes bedingen dann die Non-Response auf RTX. Durch konstante IgA-Produktion halten sie in diesen Patienten die Krankheitsaktivität und RA aufrecht. Um welchen mukosalen (a-/bakteriellen, extrinsischen) Trigger es sich explizit handelt und ob sie die Epitope der bekannten RAAK (AMCV) darstellen, könnte Gegenstand weiterer pathogenetischer Bestrebungen werden.

4.5 Anspruch an einen Biomarker: AMCV IgA als therapeutischer Marker?

Die vorliegende Untersuchung konnte die praktische Bedeutung des AMCV IgA für die RTX-Therapie darlegen. Inwiefern AMCV IgA auch die theoretischen Kriterien einer Biomarkerfunktion erfüllt, soll basierend auf den Informationen des Buches „Biomarker“ von Gerd Schmitz dargestellt werden [36].

Theoretische Kriterien: Ein Biomarker ist ein „*Charakteristikum, welches objektiv gemessen als Indikator eines normalen biologischen oder pathologischen Prozesses oder einer pharmakologischen Antwort auf eine therapeutische Intervention dient*“ (Biomarkers Definitions Working Group 2001). Biomarker sind folglich Faktoren, die mit der Erkrankung/Therapie in kausalem (bestenfalls ätiologischen) Zusammenhang stehen und somit als präventive (Risikobewertung), diagnostische (Screeningmarker), prognostische oder therapeutische (Prädiktionsmarker und Monitoringmarker) Parameter dienen können.

Biomarker beinhalten folgende Merkmale:

- messbar (diagnostische und bildgebende Tests)
- objektiv und reliabel
- Indikatorfunktion für biologische Prozesse

Biomarker bedürfen folgender Ideal-Werte:

- intern hoch valide: hohe Sensitivität/Spezifität, hoher prädiktiver Wert
- extern hoch valide: Generalisierung auf alle Bevölkerungs- und Altersgruppen, Geschlechter
- gutes Nutzen-Risiko-Kosten-Verhältnis
- praktikable, wenig-aufwändige, nicht-invasive Testung
- Bradford-Hill-Kriterien zur Kausalität von Biomarker und Ereignis (1965)
- Surrogatparameterfunktion (Alle Aussagen beziehen sich auf Quelle [36]).

AMCV IgA als theoretischer Biomarker: AMCV IgA wird standardisiert, untersucher- und probandenunabhängig *labordiagnostisch gemessen* und bietet die Möglichkeit zur wiederholten Testung in RA-Kollektiven, wodurch die *Objektivität* und *Reliabilität* gewährleistet ist [43]. AMCV IgA besaß in unserer Kohorte eine mittlere *Sensitivität* (42 %) bei hoher *Spezifität*

Diskussion

(100%). In Abhängigkeit von dem gesetzten Cut-off-Level (20 U/ml) für den Nachweis von AMCV IgA könnte man die Sensitivität jedoch zu Lasten der Spezifität steigern. Im Vergleich könnte für unsere Kohorte die Sensitivität bei einem Cut-off-Level von 10 U/ml auf 56 % bei unveränderter Spezifität (100%) gesteigert werden, weshalb man ein Herabsetzen der Grenze überdenken könnte. AMCV IgA besitzt einen hohen *prädiktiven Wert* (NPW = 0,86), der im Allgemeinen für die Indikation einer Therapie von großer Bedeutung ist. Die gewünschte Stratifizierung von Patienten, die auf die Therapie ansprechen, könnte damit die Rate an inadäquaten Behandlungen senken [4].

Weiterhin handelt es sich um eine labordiagnostische Bestimmung des AMCV IgA, die geringer Invasivität/Zeit/Kosten bedarf, stationär sowie ambulant praktikabel und durch jeden Arzt durchführbar ist. Methodisch eignet es sich demzufolge für die Routinediagnostik und Bewertung der Therapie durch ein gutes *Nutzen-Kosten-Risiko-Verhältnis*.

Bradford-Hill klassifizierte sehr früh die Bedingungen, die einen Risikofaktor zum *Kausalfaktor* werden lassen: Stärke, Konsistenz, Spezifität, Zeitlichkeit, Dosis-Wirkung, Plausibilität, Kohärenz, Evidenz, Analogie [141]. Für Biomarker und AMCV IgA reduziert es sich auf [36]:

- Spezifität für eine Erkrankung -> pathophysiologische Bedeutung des AMCV in RA,
- Dosis-Wirkungs-Beziehung -> weiterführende Investigationen mit Modifikation von RTX-Dosis, Zyklus, Intervall, Placebo-Kontrolle,
- Konsistenz der Ergebnisse -> keine diesbezüglich vergleichbaren Studien,
- Kohärenz der Effekte in vitro und vivo -> nur in vivo-Testung am Menschen,
- Analogie zu weiteren Risikofaktoren-> Interaktion von Rauchen und ACPAs.

Mithilfe dieser Kriterien könnte AMCV IgA in einen vielmehr ursächlichen als nur zufällig bedingten Zusammenhang mit der RA und Therapie gebracht werden.

Die unbekannt Ätiologie und die multifaktorielle Genese der RA könnten dazu führen, dass es bislang nur wenig valide Biomarker für die drei Bereiche Diagnose/Prognose/Therapie gibt, da Biomarker eines kausalen Zusammenhanges bedürfen, um Erkrankungen zu operationalisieren. Die RA-assoziierten Biomarker RF und ACCP stellen durchaus valide diagnostische und prognostische [47], jedoch weniger therapeutische Marker dar [80]. Demzufolge werden Therapieentscheidungen durch den Rheumatologen anhand der klinischen Repräsentation des

Diskussion

Patienten und internationaler Therapieempfehlungen getroffen, wodurch jedoch Therapieversager nicht bereits vorab identifiziert werden können [142]. AMCV kennzeichnet im Vergleich zu anderen ACPAs eine bessere Reflexion der Krankheitsaktivität und könnte demzufolge eher mit Veränderungen unter der Therapie einhergehen [44, 54]. Unsere Untersuchung zeigte praktisch und an dieser Stelle theoretisch, dass AMCV IgA durchaus eine berechnete **prädiktive und verlaufstherapeutische Funktion als Stratifizierungs- und Monitoring-Marker** für AMCV-positive Patienten unter RTX-Therapie besitzt (Abb. 17).

Abb. 17: Darstellung der derzeit, verfügbaren Biomarker in den Krankheitsphasen der RA zur Diagnostik, Prognostik und Therapie

Gesund	Asymptomatische Phase	Symptomatische Phase		Chronische (oder geheilte) Phase
Risikobewertung	Screening/Diagnose	Prognose	Prädiktion	Monitoring
↓	↓	↓	↓	↓
	UA -> RA ERA vs. LRA	Entwicklung der RA	Ansprechen auf bDMARD	Therapieevaluation: Remission der RA
Primär/Sekundärprävention			Therapiewahl	Therapieanpassung
	RF IgG, IgM, IgA ACCP IgG, IgM, IgA	RF IgA ACCP IgG, IgA AMCV IgG, IgA	AMCV IgA	AMCV IgA

4.6 Limitationen der Studie

Die Limitationen dieser Untersuchung ergeben sich aus den Testgütekriterien eines Experiments, insbesondere der Validität (Güte der Operationalisierung). Diese Untersuchung kennzeichnete eine höhere interne Validität bei geringerer externer Validität. Die hohe interne Validität (der Zusammenhang von RTX-Intervention und AMCV-Subtypen) wird durch den standardisierten Untersuchungsaufbau (einheitliche Patientengruppe und Therapie, standardisierte Messmethoden, fixe Zeitpunkte) gewährleistet. Die Zusammensetzung des Kollektivs entsprechend der o.g. Einschlusskriterien reduziert weitere Störfaktoren, wodurch die RTX-Therapie in direkten (jedoch nicht bedingt-kausalen) Bezug zu den AAK-Verläufen gesetzt werden kann. Mögliche Konfundierungseffekte, die das Aufkommen der AMCV-Subtypen und die RTX-Response mitbedingen, sind nicht beeinflussbar und detektierbar. Die externe Validität des Tests (Generalisierung der Ergebnisse auf andere Personen, Situationen und Zeitpunkte) mindert sich mit zunehmender Standardisierung der Bedingungen. Eine limitierte, statistische

Validität ergibt sich aufgrund der Charakteristik unseres Probandenkollektivs (s. 4.6.1). Limitationen hinsichtlich der Vergleichbarkeit mit bisherigen Studien ergeben sich aus dem angewandten Studiendesign (s. 4.6.2).

4.6.1 Probandenkollektiv

Die *geringe Größe* und das *inhomogene Probandenkollektiv* (Prämedikation, Patientencharakteristik, Serologie) sind die hauptsächlich limitierenden Faktoren dieser Studie. Beide bewirken eine große Streuung des Merkmals (in unserem Falle die AAK) in der Gruppe (Varianzeninhomogenität), die die Wahrscheinlichkeit eines zufällig bedingten Unterschiedes erhöhen. Der zufallsbedingte Unterschied (α -Fehler) zwischen RR und NRR in unserer Kohorte ist durch die sehr signifikanten ($p \leq 0,01$) bis hochsignifikanten ($p \leq 0,001$) Unterschiede zwischen beiden Gruppen nahezu ausgeschlossen. Nichtsdestotrotz verifiziert ein größerer Stichprobenumfang statistisch etwaige Unterschiede viel signifikanter.

Die Inhomogenität unseres Kollektivs betrifft insbesondere die *Prämedikation*. Unser Kollektiv setzte sich aus 30 TNFI-Versagern und 20 TNFI-naiven Patienten zusammen, die somit RTX als Zweitlinien- bzw. Erstlinien-Medikation erhielten. Die bisherigen Untersuchungen beobachteten AAK-Verläufe unter RTX in nicht-Biologikum-naiven Patienten (zumeist entsprechend der bisherigen Konvention nach TNFI-Versagen [18]). Jedoch gehe ich davon aus, dass sich AAK-Kinetiken am besten in un-/kotherapierten und vor allem Biologikum-naiven RA-Patienten demaskieren. Auf diese Weise werden antiinflammatorische Effekte der Biologika auf die AAK verhindert und die AAK-Kinetik könnte sich neutral bewerten lassen. Im Falle der TNFI ist die humorale Signalkaskade betroffen, die indirekt die BZ beeinflusst und deren Aktivität minimiert. Dieses hat einen Einfluss auf die Krankheitsaktivität des Patienten vor der RTX-Intervention, unabhängig davon, ob sie auf die TNFI-Therapie ansprachen oder nicht. Weiterhin erhielten zirka 43 % Prednisolon, welches ebenfalls antiinflammatorisch die Krankheitsaktivität der Patienten reduziert [31]. Insgesamt hat jede Vormedikation einen Einfluss auf den DAS28-Wert vor der RTX-Therapie.

Die Inhomogenität betrifft weiterhin die *Nationalität* der Patienten, da wir 37 Patienten aus Deutschland und 13 Patienten aus Russland, die dort nach dortigen Übereinkünften und Standards diagnostiziert und vortherapiert wurden, einschlossen. Inwiefern nationale

Unterschiede das Krankheitsbild bezüglich genotypischer und phänotypischer Erscheinung beeinflussen, bleibt spekulativ, dennoch können sie Einfluss auf die AAK-Bildungen und das Therapieansprechen haben. Außerdem haben nicht-vermeidbare Gruppenunterschiede wie Alter/Geschlecht, Erkrankungsdauer sowie aktueller Schweregrad durchaus Einfluss auf den individuellen AAK-Status und Krankheitsverlauf unter Therapie.

Die spezielle Zusammensetzung unseres Kollektivs entsprechend der Serologie (*positiven AMCV IgG-Status*) führt zu einer geringeren Vergleichbarkeit mit bisherigen Studien. Derartige Studien mit einer AMCV-Subtypen-Analyse fehlen bislang. Außerdem erschwert es Parallelen zwischen den allgemeinen therapieabhängigen Verläufen bisheriger Studien zu ziehen, da alle einbezogenen Studien sich insbesondere hinsichtlich ihres Studiendesigns unterschieden: Patientenkollektiv mit Einschlusskriterien, Vergleichsgruppe, Dauer der Betrachtung sowie Testmethodik.

4.6.2 Testmethodik

Die *serologische Testmethodik* hat durch die herstellerspezifischen Instruktionen und die Cut-Off-Level ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf Messreliabilität sowie Validität. Alle AAK werden fast ausschließlich über die o.g. ELISA-Technik im Patientenserum detektiert. Die Bestimmung des AMCV erfolgt in den überwiegenden Studien einheitlich über das Testkit der Firma Orgentec Diagnostika als eine der ersten Hersteller der AMCV-Assays [43]. Für RF und ACCP-Subtypen stehen verschiedene Kits zur Verfügung (Eurodiagnostika Sweden, Inova Diagnostics CA USA, Medipan GmbH etc.), die je nach Studie und Herkunftsland unterschiedlich zum Einsatz kamen. Aus den herstellerspezifischen Testinstruktionen wie Verdünnungen des Patientenserums, Testsubstanzen, Inkubationszeiten, maschinell oder manuell gesteuerte Konzentrationsberechnungen sowie temperaturabhängige Lagerungen können Titerabweichungen der AAK resultieren, die Unterschiede mitbedingen können. Es resultieren Unterschiede aus den vom Hersteller festgelegten Cut-Off-Leveln als Nachweisgrenze der AAK, deren Schwelle die Sensitivität/Spezifität bedingt und die Vergleichbarkeit der AAK unterschiedlicher Studien bei verschiedenen Cut-Off-Leveln mindert [52, 143]. Es fließen hier natürlich auch interindividuelle, technische und statistische Unterschiede der Bestimmung ein, wie individuelle und technische Messfehler (Probengewinnung, Pipettierverhalten,

gerätetechnische Detektionsgrenzen) sowie statistische Analysen in Abhängigkeit von der gewählten Testauswertungen (non-/parametrische Tests).

Weiterhin wird die Vergleichbarkeit durch die getesteten *Zeitpunkte* nach der Therapie reduziert. Die Zeitpunkte variieren in den verschiedenen Studien von Baseline zu 16/18/24/32/36/48 Wochen bis drei Jahre nach der Therapie-Intervention. Für RTX setzt ein therapiebezogener Effekt jedoch erst nach 24-48 Wochen des ersten Zyklus ein, weshalb assoziierte Effekte erst dann erhoben werden sollten und vergleichbar wären [31]. Nicht zuletzt führen diese unterschiedlichen Studiendesigns zu den teilweise kontrovers aufgeführten Postulaten bezüglich der AAK in Diagnose und Therapie. Unsere Studie mit dem Fokus auf AMCV und dem einheitlichen Testkit ermöglicht Vergleiche zu anderen Studien, die jedoch wiederum aufgrund der bislang fehlenden Investigationen hinsichtlich der Ig-Subklassen dennoch erschwert werden.

4.7 Weiterführende Investigationen

Modifikation/Erweiterung unserer Studie

- Erweiterung der *Probandenzahl*:

➔ einheitliches Patientenkollektiv hinsichtlich einer Biologikum-naiven bzw. biologischen Vortherapie

➔ AMCV-IgG-negative Gruppe als Vergleichsgruppe

- Modifikation der *RTX-Intervention* als UAV (Placebo-Kontrolle, weitere Zyklen, variierende Dosen) sowie AMCV-Subklassen unter anderen *therapeutischen Interventionen* (MTX, TNI)

Ergänzende Studien

- Rolle der *Subklasse IgA*:

➔ Auslöser der mukosalen IgA-Immunantwort (AMCV IgA als Teil einer extrinsischen Immun- und mukosalen Gedächtnisfunktion)

(pathogenetische Lücke)

➔ differente BZ-Population in RR und NRR, BZ-Gedächtnisfunktion (pharmakodynamische Lücke des RTX)

➔ AMCV IgA im Synovium von RR und NRR

(pharmokokinetische Lücke des RTX)

- direkte ELISA-Methode zur Detektion von *MCV-Antigenen* zur Frühdiagnostik (antigene Strukturen erkennen, ehe AAK entstehen): Screening in Risikopatienten (jedoch große Kosten-Nutzen-Frage bei der vorliegenden Sensitivität)

4.8 Relevanz der Studie

Das oberste Gebot in der Medizin ist die kurative Behandlung einer Erkrankung. Der Behandlungserfolg in der RA wird anhand der klinischen, radiologischen und funktionellen Remission gemessen [17] und erfolgt insbesondere anhand des DAS28, der sich auf die Bewertung der arthritischen Komponente der RA stützt [8]. Diese Einschätzung des Behandlungserfolges wirft zwei Probleme auf: der systemische Charakter der RA und die Objektivität der Bewertung.

Systemerkrankungen wie RA bedürfen einer ganzheitlichen (kardiovaskulär, muskuloskelettal, psychisch und kognitiv) und nicht rein-artikulären Begutachtung für die angepasste Therapie. Nicht die Arthritis, sondern die extraartikuläre Manifestation bedingt die verminderte Lebensqualität und Sterblichkeit des Patienten [2]. Insbesondere heutzutage, wo RA-Patienten mehr Krankenjahren verzeichnen (Lebensverlängerung bei durchschnittlich gleichem Erkrankungsalter), sollte die Lebensqualität durch eine adäquate Therapie der artikulären und extraartikulären Komponente verbessert werden [16].

Die Wahl und Kontrolle der adäquaten Therapie sollte sich auf subjektiven und objektiven Bewertungen begründen. Die Einschätzung der Krankheitsaktivität anhand des subjektiven Befindens des Patienten, der Anzahl druckschmerzhafter/geschwollener Gelenke und der/des unspezifisch erhöhten BSG/CRP legt eine gute subjektive, aber unzureichend objektive Bewertung nahe [144]. Per definitionem konnte hierdurch eine Krankheitsremission trotz radiologischer Progression beschrieben werden [145]. Biomarker einer Erkrankung können zu diesem Zwecke Behandlungsziele operationalisieren und objektivieren [36]. Dies setzt jedoch eine Kenntnis der Kausalität von Biomarker und Erkrankung voraus, die aufgrund der multifaktoriellen Ätiopathogenese der RA nur unzureichend ermöglicht werden kann.

Zusammengetragen bedarf die RA im Rahmen der unbekannteren Ätiologie, der chronischen und systemischen Manifestation einer lebenslangen, multimodalen Therapie, die anhand der interdisziplinären Kombination mehrerer Biomarker evaluiert werden sollte [146].

Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung repräsentierte sich AMCV IgA als ein durchaus objektiver und valider Biomarker zur Beurteilung einer BZ-depletierender Therapie mit RTX in RA. Das inflammatorisch-bedingte, synoviale Auftreten ermöglichte die Assoziation zur Krankheitsaktivität und Therapierefraktärität durch RTX-resistente BZ. Aufgrund der labordiagnostischen Bestimmung eignet er sich unter therapeutischen Kontrollen entsprechend des RA-Managements als praktikabler, zuverlässiger Maßstab. Jedoch sollte auch AMCV IgA nur im individuellen Gesamtkonstrukt gesehen und für die personalisierte Medizin mit mehreren Parametern bewertet werden. Denn wie bereits Aristoteles verlautete, „(sei) das Ganze mehr als die Summe seiner Teile“ und ein einzelner Summand als Ausschnitt nicht fähig, den Menschen ganzheitlich zu reflektieren (Aristoteles, verkürztes Zitat aus Metaphysik VII 17, 1041b).

Literaturverzeichnis

1. Alamanos Y, Drosos AA: Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2005, 4(3):130-136.
2. Gabriel SE, Michaud K: Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis research & therapy* 2009, 11(3):229.
3. Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie e. V.: Rheuma in Zahlen, Betroffene Menschen in Deutschland. (Accessed February 10, 2015, at http://dgrh.de/fileadmin/media/DGRH/Presse/Rheuma_in_Zahlen_presse_aktual.pdf)
4. Ma VY, Chan L, Carruthers KJ: Incidence, prevalence, costs, and impact on disability of common conditions requiring rehabilitation in the United States: stroke, spinal cord injury, traumatic brain injury, multiple sclerosis, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, limb loss, and back pain. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 2014, 95(5):986-995 e981.
5. Lipsky P, Rheumatoide Arthritis. In: *Harrisons Innere Medizin*. 18. ed. 2012, Band 3, Teil 15, Abschnitt 2, S. 2958-2972. Für die deutsche Ausgabe Song HI und Sieper J.
6. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD et al: 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and rheumatism* 2010, 62(9):2569-2581.
7. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS et al: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 1988, 31(3):315-324.
8. Fransen J, van Riel PL: The Disease Activity Score and the EULAR response criteria. *Rheumatic diseases clinics of North America* 2009, 35(4):745-757, vii-viii.
9. Colebatch AN, Edwards CJ, Ostergaard M, van der Heijde D, Balint PV, D'Agostino MA, Forslund K, Grassi W, Haavardsholm EA, Haugeberg G et al: EULAR recommendations for the use of imaging of the joints in the clinical management of rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2013, 72(6):804-814.
10. McInnes IB, Schett G: The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine* 2011, 365(23):2205-2219.
11. Wegner N, Lundberg K, Kinloch A, Fisher B, Malmstrom V, Feldmann M, Venables PJ: Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunological reviews* 2010, 233(1):34-54.
12. Vossenaar ER, Radstake TR, van der Heijden A, van Mansum MA, Dieteren C, de Rooij DJ, Barrera P, Zendman AJ, van Venrooij WJ: Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Annals of the rheumatic diseases* 2004, 63(4):373-381.
13. Taneja V: Arthritis susceptibility and the gut microbiome. *FEBS letters* 2014, 588(22):4244-4249.
14. Egerer K, Feist E, Burmester GR: The serological diagnosis of rheumatoid arthritis: antibodies to citrullinated antigens. *Deutsches Arzteblatt international* 2009, 106(10):159-163.
15. Scott DL, Smith C, Kingsley G: What are the consequences of early rheumatoid arthritis for the individual? *Best practice & research Clinical rheumatology* 2005, 19(1):117-136.

16. Naz SM, Symmons DP: Mortality in established rheumatoid arthritis. *Best practice & research Clinical rheumatology* 2007, 21(5):871-883.
17. Smolen JS, Aletaha D, Bijlsma JW, Breedveld FC, Boumpas D, Burmester G, Combe B, Cutolo M, de Wit M, Dougados M et al: Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. *Annals of the rheumatic diseases* 2010, 69(4):631-637.
18. Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, Buch M, Burmester G, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, Gossec L, Nam J et al: EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Annals of the rheumatic diseases* 2014, 73(3):492-509.
19. Weinblatt ME: Methotrexate in rheumatoid arthritis: a quarter century of development. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 2013, 124:16-25.
20. European Medicines Agency (Europäische Arzneimittelagentur). Produktinformation Mabthera Rituximab. (Accessed September 4, 2014 at http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000165/human_med_000897.jsp&mid=WC0b01ac058001d124)
21. McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG: Antigen-specific memory B cell development. *Annual review of immunology* 2005, 23:487-513.
22. McHeyzer-Williams M, Okitsu S, Wang N, McHeyzer-Williams L: Molecular programming of B cell memory. *Nature reviews Immunology* 2012, 12(1):24-34.
23. Kurosaki T, Kometani K, Ise W: Memory B cells. *Nature reviews Immunology* 2015, 15(3):149-159.
24. Yoshida T, Mei H, Dorner T, Hiepe F, Radbruch A, Fillatreau S, Hoyer BF: Memory B and memory plasma cells. *Immunological reviews* 2010, 237(1):117-139.
25. Dorner T, Kinnman N, Tak PP: Targeting B cells in immune-mediated inflammatory disease: a comprehensive review of mechanisms of action and identification of biomarkers. *Pharmacology & therapeutics* 2010, 125(3):464-475.
26. Dass S, Rawstron AC, Vital EM, Henshaw K, McGonagle D, Emery P: Highly sensitive B cell analysis predicts response to rituximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2008, 58(10):2993-2999.
27. Nakou M, Katsikas G, Sidiropoulos P, Bertias G, Papadimitraki E, Raptopoulou A, Koutala H, Papadaki HA, Kritikos H, Boumpas DT: Rituximab therapy reduces activated B cells in both the peripheral blood and bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: depletion of memory B cells correlates with clinical response. *Arthritis research & therapy* 2009, 11(4):R131.
28. Thurlings RM, Vos K, Wijbrandts CA, Zwinderman AH, Gerlag DM, Tak PP: Synovial tissue response to rituximab: mechanism of action and identification of biomarkers of response. *Annals of the rheumatic diseases* 2008, 67(7):917-925.
29. Leandro MJ: B-cell subpopulations in humans and their differential susceptibility to depletion with anti-CD20 monoclonal antibodies. *Arthritis research & therapy* 2013, 15 Suppl 1:S3.
30. Golay J, Semenzato G, Rambaldi A, Foa R, Gaidano G, Gamba E, Pane F, Pinto A, Specchia G, Zaja F et al: Lessons for the clinic from rituximab pharmacokinetics and pharmacodynamics. *mAbs* 2013, 5(6):826-837.
31. Buch MH, Smolen JS, Betteridge N, Breedveld FC, Burmester G, Dorner T, Ferraccioli G, Gottenberg JE, Isaacs J, Kvien TK et al: Updated consensus statement on the use of rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2011, 70(6):909-920.

32. Caporali R, Caprioli M, Bobbio-Pallavicini F, Bugatti S, Montecucco C: Long term treatment of rheumatoid arthritis with rituximab. *Autoimmun Rev* 2009, 8(7):591-594.
33. Richter A, Strangfeld A, Herzer P, Wilden E, Bussmann A, Listing J, Zink A: Sustainability of rituximab therapy in different treatment strategies: results of a 3-year followup of a German biologics register. *Arthritis care & research* 2014, 66(11):1627-1633.
34. Schoels M, Wong J, Scott DL, Zink A, Richards P, Landewe R, Smolen JS, Aletaha D: Economic aspects of treatment options in rheumatoid arthritis: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2010, 69(6):995-1003.
35. Kimby E: Tolerability and safety of rituximab (MabThera). *Cancer treatment reviews* 2005, 31(6):456-473.
36. Schmitz G, Endres S, Götte D. Biomarker: Bedeutung für den medizinischen Fortschritt und Nutzenbewertung. Schattauer Verlag (Stuttgart) 2008.
37. Ursum J, Bos WH, van de Stadt RJ, Dijkmans BA, van Schaardenburg D: Different properties of ACPA and IgM-RF derived from a large dataset: further evidence of two distinct autoantibody systems. *Arthritis research & therapy* 2009, 11(3):R75.
38. Artandi SE, Calame KL, Morrison SL, Bonagura VR: Monoclonal IgM rheumatoid factors bind IgG at a discontinuous epitope comprised of amino acid loops from heavy-chain constant-region domains 2 and 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, 89(1):94-98.
39. Waaler E: On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. 1939. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2007, 115(5):422-438; discussion 439.
40. Simon M, Girbal E, Sebbag M, Gomes-Daudrix V, Vincent C, Salama G, Serre G: The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies," autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation* 1993, 92(3):1387-1393.
41. van Venrooij WJ, van Beers JJ, Pruijn GJ: Anti-CCP antibodies: the past, the present and the future. *Nature reviews Rheumatology* 2011, 7(7):391-398.
42. Vossenaar ER, Despres N, Lapointe E, van der Heijden A, Lora M, Senshu T, van Venrooij WJ, Menard HA: Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis research & therapy* 2004, 6(2):R142-150.
43. Bang H, Egerer K, Gaudiard A, Luthke K, Rudolph PE, Fredenhagen G, Berg W, Feist E, Burmester GR: Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2007, 56(8):2503-2511.
44. Zahran WE, Mahmoud MI, Shalaby KA, Abbas MH: Unique correlation between mutated citrullinated vimentine IgG autoantibodies and markers of systemic inflammation in rheumatoid arthritis patients. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB* 2013, 28(3):272-276.
45. Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, Jakobsson PJ, Baum W, Nimmerjahn F, Szarka E et al: Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *The Journal of clinical investigation* 2012, 122(5):1791-1802.
46. Avdeeva AS, Aleksandrova EN, Novikov AA, Smirnov AV, Cherkasova MV, Nasonov EL: The relationship of antibodies to modified citrullinated vimentin and markers of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *International journal of rheumatology* 2014, 2014:464585.

Literaturverzeichnis

47. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, Saigo K, Morinobu A, Koshiba M, Kuntz KM et al: Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Annals of internal medicine* 2007, 146(11):797-808.
48. Qin X, Deng Y, Xu J, Li TJ, Li S, Zhao JM: Meta-analysis: diagnostic value of serum anti-mutated citrullinated vimentin antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology international* 2011, 31(6):785-794.
49. Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U, van Venrooij WJ: Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2003, 48(10):2741-2749.
50. van der Linden MP, van der Woude D, Ioan-Facsinay A, Levarht EW, Stoeken-Rijsbergen G, Huizinga TW, Toes RE, van der Helm-van Mil AH: Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2009, 60(8):2232-2241.
51. Kokkonen H, Mullazehi M, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Ronnelid J, Rantapaa-Dahlqvist S: Antibodies of IgG, IgA and IgM isotypes against cyclic citrullinated peptide precede the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 2011, 13(1):R13.
52. Nicaise Roland P, Grootenboer Mignot S, Bruns A, Hurtado M, Palazzo E, Hayem G, Dieude P, Meyer O, Chollet Martin S: Antibodies to mutated citrullinated vimentin for diagnosing rheumatoid arthritis in anti-CCP-negative patients and for monitoring infliximab therapy. *Arthritis research & therapy* 2008, 10(6):R142.
53. De Rycke L, Peene I, Hoffman IE, Kruithof E, Union A, Meheus L, Lebeer K, Wyns B, Vincent C, Mielants H et al: Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. *Annals of the rheumatic diseases* 2004, 63(12):1587-1593.
54. Mathsson L, Mullazehi M, Wick MC, Sjoberg O, van Vollenhoven R, Klareskog L, Ronnelid J: Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis and rheumatism* 2008, 58(1):36-45.
55. Syversen SW, Goll GL, van der Heijde D, Landewe R, Lie BA, Odegard S, Uhlig T, Gaarder PI, Kvien TK: Prediction of radiographic progression in rheumatoid arthritis and the role of antibodies against mutated citrullinated vimentin: results from a 10-year prospective study. *Annals of the rheumatic diseases* 2010, 69(2):345-351.
56. Innala L, Kokkonen H, Eriksson C, Jidell E, Berglin E, Dahlqvist SR: Antibodies against mutated citrullinated vimentin are a better predictor of disease activity at 24 months in early rheumatoid arthritis than antibodies against cyclic citrullinated peptides. *The Journal of rheumatology* 2008, 35(6):1002-1008.
57. Keskin G, Inal A, Keskin D, Pekel A, Baysal O, Dizer U, Sengul A: Diagnostic utility of anti-cyclic citrullinated peptide and anti-modified citrullinated vimentin antibodies in rheumatoid arthritis. *Protein and peptide letters* 2008, 15(3):314-317.
58. Cuchacovich M, Bueno D, Carvajal R, Bravo N, Aguillon JC, Catalan D, Soto L: Clinical parameters and biomarkers for anti-TNF treatment prognosis in rheumatoid arthritis patients. *Clinical rheumatology* 2014, 33(12):1707-1714.

59. Lv Q, Yin Y, Li X, Shan G, Wu X, Liang D, Li Y, Zhang X: The status of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody are not associated with the effect of anti-TNF α agent treatment in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *PLoS one* 2014, 9(2):e89442.
60. Mikuls TR, O'Dell JR, Stoner JA, Parrish LA, Arend WP, Norris JM, Holers VM: Association of rheumatoid arthritis treatment response and disease duration with declines in serum levels of IgM rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody. *Arthritis and rheumatism* 2004, 50(12):3776-3782.
61. van Tuyl LH, Lems WF, Kerstens PJ, Voskuyl AE, Dijkmans BA, Boers M: IgM-rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide decrease by 50% during intensive treatment in early rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2009, 68(10):1652-1653.
62. Kastbom A, Forslund K, Ernestam S, Geborek P, Karlsson JA, Petersson IF, Saevarsdottir S, Klareskog L, van Vollenhoven RF, Lundberg K: Changes in the anticitrullinated peptide antibody response in relation to therapeutic outcome in early rheumatoid arthritis: results from the SWEFOT trial. *Annals of the rheumatic diseases* 2014.
63. Svard A, Kastbom A, Soderlin MK, Reckner-Olsson A, Skogh T: A comparison between IgG- and IgA-class antibodies to cyclic citrullinated peptides and to modified citrullinated vimentin in early rheumatoid arthritis and very early arthritis. *The Journal of rheumatology* 2011, 38(7):1265-1272.
64. Edwards JC, Cambridge G: Prospects for B-cell-targeted therapy in autoimmune disease. *Rheumatology* 2005, 44(2):151-156.
65. Heiat M, Ranjbar R, Alavian SM: Classical and modern approaches used for viral hepatitis diagnosis. *Hepatitis monthly* 2014, 14(4):e17632.
66. Orgentec Diagnostika. Produktinformation in der Rheumadiagnostik: Gebrauchsanweisung des Anti-MCV-Assays. (Accessed January 2, 2015, at http://products.orgentec.com/pdfs/ORG%20248_IFU_DE_QM112899_2014-0626_3.pdf)
67. Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson BP, Li Y, Kurreeman FA, Zernakova A, Hinks A et al: Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nature genetics* 2010, 42(6):508-514.
68. Raterman HG, Vosslander S, de Ridder S, Nurmohamed MT, Lems WF, Boers M, van de Wiel M, Dijkmans BA, Verweij CL, Voskuyl AE: The interferon type I signature towards prediction of non-response to rituximab in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis research & therapy* 2012, 14(2):R95.
69. Thurlings R BM, Tekstra J The type I IFN signature is a negative predictor of clinical response to rituximab treatment in RA. *Arthritis and rheumatism* 2009, 60:626-627.
70. Fabris M, Quartuccio L, Lombardi S, Benucci M, Manfredi M, Saracco M, Atzeni F, Morassi P, Cimmino MA, Pontarini E et al: Study on the possible role of the -174G>C IL-6 promoter polymorphism in predicting response to rituximab in rheumatoid arthritis. *Reumatismo* 2010, 62(4):253-258.
71. Ruysen-Witrand A, Rouanet S, Combe B, Dougados M, Le Loet X, Sibia J, Tebib J, Mariette X, Constantin A: Association between -871C>T promoter polymorphism in the B-cell activating factor gene and the response to rituximab in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology* 2013, 52(4):636-641.
72. Quartuccio L, Lombardi S, Fabris M, Masolini P, Saracco M, Pellerito R, De Vita S: Long-term effects of rituximab in rheumatoid arthritis: clinical, biologic, and

- pharmacogenetic aspects. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009, 1173:692-700.
73. Daien CI, Morel J: Predictive factors of response to biological disease modifying antirheumatic drugs: towards personalized medicine. *Mediators of inflammation* 2014, 2014:386148.
 74. Quartuccio L, Fabris M, Salvin S, Atzeni F, Saracco M, Benucci M, Cimmino M, Morassi P, Masolini P, Pellerito R et al: Rheumatoid factor positivity rather than anti-CCP positivity, a lower disability and a lower number of anti-TNF agents failed are associated with response to rituximab in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2009, 48(12):1557-1559.
 75. de Lemos LL, Costa Jde O, Machado MA, Almeida AM, Barbosa MM, Kakehasi AM, de Araujo VE, Guerra Junior AA, Acurcio Fde A: Rituximab for rheumatoid arthritis treatment: a systematic review. *Revista brasileira de reumatologia* 2014, 54(3):220-230.
 76. Isaacs JD, Cohen SB, Emery P, Tak PP, Wang J, Lei G, Williams S, Lal P, Read SJ: Effect of baseline rheumatoid factor and anticitrullinated peptide antibody serotype on rituximab clinical response: a meta-analysis. *Annals of the rheumatic diseases* 2013, 72(3):329-336.
 77. Maneiro RJ, Salgado E, Carmona L, Gomez-Reino JJ: Rheumatoid factor as predictor of response to abatacept, rituximab and tocilizumab in rheumatoid arthritis: Systematic review and meta-analysis. *Seminars in arthritis and rheumatism* 2013, 43(1):9-17.
 78. Ferraccioli G, Tolusso B, Bobbio-Pallavicini F, Gremese E, Ravagnani V, Benucci M, Podesta E, Atzeni F, Mannocci A, Biasi D et al: Biomarkers of good EULAR response to the B cell depletion therapy in all seropositive rheumatoid arthritis patients: clues for the pathogenesis. *PloS one* 2012, 7(7):e40362.
 79. Lal P, Su Z, Holweg CT, Silverman GJ, Schwartzman S, Kelman A, Read S, Spaniolo G, Monroe JG, Behrens TW et al: Inflammation and autoantibody markers identify rheumatoid arthritis patients with enhanced clinical benefit following rituximab treatment. *Arthritis and rheumatism* 2011, 63(12):3681-3691.
 80. Benucci M, Manfredi M, Puttini PS, Atzeni F: Predictive factors of response to rituximab therapy in rheumatoid arthritis: What do we know today? *Autoimmun Rev* 2010, 9(12):801-803.
 81. Sellam J, Hendel-Chavez H, Rouanet S, Abbed K, Combe B, Le Loet X, Tebib J, Sibia J, Taoufik Y, Dougados M et al: B cell activation biomarkers as predictive factors for the response to rituximab in rheumatoid arthritis: a six-month, national, multicenter, open-label study. *Arthritis and rheumatism* 2011, 63(4):933-938.
 82. Couderc M, Mathieu S, Pereira B, Glace B, Soubrier M: Predictive factors of rituximab response in rheumatoid arthritis: results from a French university hospital. *Arthritis care & research* 2013, 65(4):648-652.
 83. Jones JD, Shyu I, Newkirk MM, Rigby WF: A rheumatoid factor paradox: inhibition of rituximab effector function. *Arthritis research & therapy* 2013, 15(1):R20.
 84. Chatzidionysiou K, Lie E, Nasonov E, Lukina G, Hetland ML, Tarp U, Gabay C, van Riel PL, Nordstrom DC, Gomez-Reino J et al: Highest clinical effectiveness of rituximab in autoantibody-positive patients with rheumatoid arthritis and in those for whom no more than one previous TNF antagonist has failed: pooled data from 10 European registries. *Annals of the rheumatic diseases* 2011, 70(9):1575-1580.
 85. Teng YK, Levarht EW, Hashemi M, Bajema IM, Toes RE, Huizinga TW, van Laar JM: Immunohistochemical analysis as a means to predict responsiveness to rituximab treatment. *Arthritis and rheumatism* 2007, 56(12):3909-3918.

86. Breedveld F, Agarwal S, Yin M, Ren S, Li NF, Shaw TM, Davies BE: Rituximab pharmacokinetics in patients with rheumatoid arthritis: B-cell levels do not correlate with clinical response. *Journal of clinical pharmacology* 2007, 47(9):1119-1128.
87. William J, Euler C, Shlomchik MJ: Short-lived plasmablasts dominate the early spontaneous rheumatoid factor response: differentiation pathways, hypermutating cell types, and affinity maturation outside the germinal center. *Journal of immunology* 2005, 174(11):6879-6887.
88. Vos K, Thurlings RM, Wijbrandts CA, van Schaardenburg D, Gerlag DM, Tak PP: Early effects of rituximab on the synovial cell infiltrate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2007, 56(3):772-778.
89. Rehnberg M, Amu S, Tarkowski A, Bokarewa MI, Brisslert M: Short- and long-term effects of anti-CD20 treatment on B cell ontogeny in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 2009, 11(4):R123.
90. Walsh CA, Fearon U, FitzGerald O, Veale DJ, Bresnihan B: Decreased CD20 expression in rheumatoid arthritis synovium following 8 weeks of rituximab therapy. *Clinical and experimental rheumatology* 2008, 26(4):656-658.
91. Melet J, Mulleman D, Goupille P, Ribourtout B, Watier H, Thibault G: Rituximab-induced T cell depletion in patients with rheumatoid arthritis: association with clinical response. *Arthritis and rheumatism* 2013, 65(11):2783-2790.
92. Toubi E, Kessel A, Slobodin G, Boulman N, Pavlotzky E, Zisman D, Rozenbaum M, Rosner I: Changes in macrophage function after rituximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2007, 66(6):818-820.
93. Vancsa A, Szabo Z, Szamosi S, Bodnar N, Vegh E, Gergely L, Szucs G, Szanto S, Szekanecz Z: Longterm effects of rituximab on B cell counts and autoantibody production in rheumatoid arthritis: use of high-sensitivity flow cytometry for more sensitive assessment of B cell depletion. *The Journal of rheumatology* 2013, 40(5):565-571.
94. Cornec D, Avouac J, Youinou P, Saraux A: Critical analysis of rituximab-induced serological changes in connective tissue diseases. *Autoimmun Rev* 2009, 8(6):515-519.
95. Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JC, Ehrenstein MR, Salden M, Bodman-Smith M, Webster AD: Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2003, 48(8):2146-2154.
96. Willemze A, Shi J, Mulder M, Stoeken-Rijsbergen G, Drijfhout JW, Huizinga TW, Trouw LA, Toes RE: The concentration of anticitrullinated protein antibodies in serum and synovial fluid in relation to total immunoglobulin concentrations. *Annals of the rheumatic diseases* 2013, 72(6):1059-1063.
97. Kerkman PF, Rombouts Y, van der Voort EI, Trouw LA, Huizinga TW, Toes RE, Scherer HU: Circulating plasmablasts/plasmacells as a source of anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2013, 72(7):1259-1263.
98. Bugatti S, Vitolo B, Caporali R, Montecucco C, Manzo A: B cells in rheumatoid arthritis: from pathogenic players to disease biomarkers. *BioMed research international* 2014, 2014:681678.
99. Roll P, Dorner T, Tony HP: Anti-CD20 therapy in patients with rheumatoid arthritis: predictors of response and B cell subset regeneration after repeated treatment. *Arthritis and rheumatism* 2008, 58(6):1566-1575.
100. Sellam J, Rouanet S, Hendel-Chavez H, Abbed K, Sibilia J, Tebib J, Le Loet X, Combe B, Dougados M, Mariette X et al: Blood memory B cells are disturbed and predict the

- response to rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2011, 63(12):3692-3701.
101. Vital EM, Dass S, Rawstron AC, Buch MH, Goeb V, Henshaw K, Ponchel F, Emery P: Management of nonresponse to rituximab in rheumatoid arthritis: predictors and outcome of re-treatment. *Arthritis and rheumatism* 2010, 62(5):1273-1279.
 102. Brezinschek HP, Rainer F, Brickmann K, Graninger WB: B lymphocyte-typing for prediction of clinical response to rituximab. *Arthritis research & therapy* 2012, 14(4):R161.
 103. Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, Plebani A, Kumararatne DS, Bonnet D, Tournilhac O et al: Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 2004, 104(12):3647-3654.
 104. Weller S, Faili A, Garcia C, Braun MC, Le Deist FF, de Saint Basile GG, Hermine O, Fischer A, Reynaud CA, Weill JC: CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, 98(3):1166-1170.
 105. Roll P, Palanichamy A, Kneitz C, Dorner T, Tony HP: Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2006, 54(8):2377-2386.
 106. Leandro MJ, Cambridge G, Ehrenstein MR, Edwards JC: Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2006, 54(2):613-620.
 107. Moller B, Aeberli D, Egli S, Fuhrer M, Vajtai I, Vogelin E, Ziswiler HR, Dahinden CA, Villiger PM: Class-switched B cells display response to therapeutic B-cell depletion in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 2009, 11(3):R62.
 108. Gerlag DM, Tak PP: Novel approaches for the treatment of rheumatoid arthritis: lessons from the evaluation of synovial biomarkers in clinical trials. *Best practice & research Clinical rheumatology* 2008, 22(2):311-323.
 109. Teng YK, Levarht EW, Toes RE, Huizinga TW, van Laar JM: Residual inflammation after rituximab treatment is associated with sustained synovial plasma cell infiltration and enhanced B cell repopulation. *Annals of the rheumatic diseases* 2009, 68(6):1011-1016.
 110. Kavanaugh A, Rosengren S, Lee SJ, Hammaker D, Firestein GS, Kalunian K, Wei N, Boyle DL: Assessment of rituximab's immunomodulatory synovial effects (ARISE trial). 1: clinical and synovial biomarker results. *Annals of the rheumatic diseases* 2008, 67(3):402-408.
 111. Cambridge G, Perry HC, Nogueira L, Serre G, Parsons HM, De La Torre I, Dickson MC, Leandro MJ, Edwards JC: The effect of B-cell depletion therapy on serological evidence of B-cell and plasmablast activation in patients with rheumatoid arthritis over multiple cycles of rituximab treatment. *Journal of autoimmunity* 2014, 50:67-76.
 112. Neves M, Alves JD: Factors implicated in the generation and persistence of long-lived plasma cell-mediated autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2011, 10(7):375-382.
 113. Can M, Najip A, Yilmaz N, Inanc N, Yavuz S: Immunoglobulin subtypes predict therapy response to the biologics in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology international* 2013, 33(6):1455-1460.
 114. Bobbio-Pallavicini F, Caporali R, Alpini C, Avalle S, Epis OM, Klersy C, Montecucco C: High IgA rheumatoid factor levels are associated with poor clinical response to tumour necrosis factor alpha inhibitors in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2007, 66(3):302-307.

115. de la Torre I, Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G: Baseline serum immunoglobulin levels in patients with rheumatoid arthritis: relationships with clinical parameters and with B-cell dynamics following rituximab. *Clinical and experimental rheumatology* 2012, 30(4):554-560.
116. Teitsson I: IgA rheumatoid factor as predictor of disease activity. *Scandinavian journal of rheumatology Supplement* 1988, 75:233-237.
117. Corthesy B: Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis? *Journal of immunology* 2007, 178(1):27-32.
118. Suzuki K, Kawamoto S, Maruya M, Fagarasan S: GALT: organization and dynamics leading to IgA synthesis. *Advances in immunology* 2010, 107:153-185.
119. Corthesy B: Secretory immunoglobulin A: well beyond immune exclusion at mucosal surfaces. *Immunopharmacology and immunotoxicology* 2009, 31(2):174-179.
120. Sutherland DB, Fagarasan S: IgA synthesis: a form of functional immune adaptation extending beyond gut. *Current opinion in immunology* 2012, 24(3):261-268.
121. Cunningham-Rundles C: Physiology of IgA and IgA deficiency. *Journal of clinical immunology* 2001, 21(5):303-309.
122. Maruya M, Kawamoto S, Kato LM, Fagarasan S: Impaired selection of IgA and intestinal dysbiosis associated with PD-1-deficiency. *Gut microbes* 2013, 4(2):165-171.
123. Wines BD, Hogarth PM: IgA receptors in health and disease. *Tissue antigens* 2006, 68(2):103-114.
124. Strugnell RA, Wijburg OL: The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nature reviews Microbiology* 2010, 8(9):656-667.
125. Pelkonen P, Savilahti E, Makela AL: Persistent and transient IgA deficiency in juvenile rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology* 1983, 12(3):273-279.
126. Schaffer FM, Monteiro RC, Volanakis JE, Cooper MD: IgA deficiency. *Immunodeficiency reviews* 1991, 3(1):15-44.
127. Schaffer FM: Clinical assessment and management of abnormal IgA levels. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 2008, 100(3):280-282.
128. Xiao X, Miao Q, Chang C, Gershwin ME, Ma X: Common variable immunodeficiency and autoimmunity--an inconvenient truth. *Autoimmun Rev* 2014, 13(8):858-864.
129. Ludvigsson JF, Neovius M, Hammarstrom L: Association between IgA deficiency & other autoimmune conditions: a population-based matched cohort study. *Journal of clinical immunology* 2014, 34(4):444-451.
130. Ferreira RC, Pan-Hammarstrom Q, Graham RR, Gateva V, Fontan G, Lee AT, Ortmann W, Urcelay E, Fernandez-Arquero M, Nunez C et al: Association of IFIH1 and other autoimmunity risk alleles with selective IgA deficiency. *Nature genetics* 2010, 42(9):777-780.
131. Wu HJ, Ivanov, II, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y, Littman DR, Benoist C, Mathis D: Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity* 2010, 32(6):815-827.
132. Sordet C, Cantagrel A, Schaefferbeke T, Sibilia J: Bone and joint disease associated with primary immune deficiencies. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 2005, 72(6):503-514.
133. Janssen KM, de Smit MJ, Brouwer E, de Kok FA, Kraan J, Altenburg J, Verheul MK, Trouw LA, van Winkelhoff AJ, Vissink A et al: Rheumatoid arthritis-associated autoantibodies in non-rheumatoid arthritis patients with mucosal inflammation: a case-control study. *Arthritis research & therapy* 2015, 17:174.

134. Caspi D, Anouk M, Golan I, Paran D, Kaufman I, Wigler I, Levartovsky D, Litinsky I, Elkayam O: Synovial fluid levels of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and IgA rheumatoid factor in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 2006, 55(1):53-56.
135. Svard A, Kastbom A, Reckner-Olsson A, Skogh T: Presence and utility of IgA-class antibodies to cyclic citrullinated peptides in early rheumatoid arthritis: the Swedish TIRA project. *Arthritis research & therapy* 2008, 10(4):R75.
136. Mei HE, Yoshida T, Sime W, Hiepe F, Thiele K, Manz RA, Radbruch A, Dorner T: Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. *Blood* 2009, 113(11):2461-2469.
137. Mei HE, Frolich D, Giesecke C, Loddenkemper C, Reiter K, Schmidt S, Feist E, Daridon C, Tony HP, Radbruch A et al: Steady-state generation of mucosal IgA+ plasmablasts is not abrogated by B-cell depletion therapy with rituximab. *Blood* 2010, 116(24):5181-5190.
138. Mora JR, von Andrian UH: Differentiation and homing of IgA-secreting cells. *Mucosal immunology* 2008, 1(2):96-109.
139. Koziel J, Mydel P, Potempa J: The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review. *Current rheumatology reports* 2014, 16(3):408.
140. Hvatum M, Kanerud L, Hallgren R, Brandtzaeg P: The gut-joint axis: cross reactive food antibodies in rheumatoid arthritis. *Gut* 2006, 55(9):1240-1247.
141. Bradford Hill A: The Environment and Disease: Association or Causation? *Section of Occupational Medicine*. 1965:(Abruf 03.01.2015).
142. Kalkan A, Roback K, Hallert E, Carlsson P: Factors influencing rheumatologists' prescription of biological treatment in rheumatoid arthritis: an interview study. *Implementation science : IS* 2014, 9(1):153.
143. Poulosom H, Charles PJ: Antibodies to citrullinated vimentin are a specific and sensitive marker for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2008, 34(1):4-10.
144. Porter D, Gadsby K, Thompson P, White J, McClinton C, Oliver S: DAS28 and Rheumatoid Arthritis: The Need for Standardization. *Musculoskeletal care* 2011, 9(4):222-227.
145. Anandarajah A, Thiele R, Giampoli E, Monu J, Seo GS, Feng C, Ritchlin CT: Patients with rheumatoid arthritis in clinical remission manifest persistent joint inflammation on histology and imaging studies. *The Journal of rheumatology* 2014, 41(11):2153-2160.
146. Magnano MD, Genovese MC: Management of co-morbidities and general medical conditions in patients with rheumatoid arthritis. *Current rheumatology reports* 2005, 7(5):407-415.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Luisa Lindenberg, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Antikörper gegen mutiertes citrulliniertes Vimentin vom Typ IgG und IgA als prädiktive und verlaufstherapeutische Biomarker für das Therapieansprechen auf Rituximab bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Luisa Lindenberg hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation: Lindenberg L, Spengler L, Bang H, Dorner T, Maslyanskiy AL, Lapin SV, Ilivanova EI, Martinez-Gamboa L, Bastian H, Wittenborn E, Egerer K, Burmester GR, Feist E. Restrictive IgG antibody response against mutated citrullinated vimentin predicts response to rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2015;17:206.

Posterpräsentation: Lindenberg L, Naumann L, Bang H, Maslyanskiy AL, Lapin SV, Martinez-Gamboa L, Lehmann B, Bastian H, Wittenborn E, Doerner T, Egerer K, Burmester GR, Feist E. IgA of anti-MCV antibodies predict rituximab-outcome in patients with rheumatoid arthritis (RA.22). 41. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (2013).

Beitrag im Einzelnen: Luisa Lindenberg erhob durch die experimentelle Durchführung die Daten der Patienten, führte die statistische Auswertung durch und fasste die Ergebnisse in dieser oben genannten Veröffentlichung zusammen.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

- Prof. Dr. G.-R. Burmester: Ich danke insbesondere Prof. Dr. Burmester als Klinikdirektor der Medizinischen Klinik m. S. Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charité Berlin für die Unterstützung des Projektes und insbesondere die Hilfeleistung bei der Publikation der Ergebnisse.
- AG Feist: Ich bedanke mich bei Lorena Martinez-Gamboa und Khetam Ghannam für die freundliche Aufnahme, Einarbeitung sowie Hilfestellung während der experimentellen Bearbeitung der Thematik in die Arbeitsgemeinschaft.
- Prof. Dr. Dörner, Dr. Dr. Egerer, Dr. Spengler: Ich danke den Arbeitsgemeinschaften um Prof. Dr. Dörner, Dr. Dr. Egerer, Dr. Spengler sowie der russischen Kooperation für die Bereitstellung von Seren und der Patientencharakteristik.
- Dr. H. Bang (Orgentec Diagnostika): Ich bedanke mich insbesondere für Unterstützung/Förderung des Projektes bei der Firma Orgentec durch die Bereitstellung von ELISA-Testkits und gedanklichen Inspirationen.
- Familie, Partner und Freunde: Ein großer Dank gilt meinen Eltern, die mir diesen Weg ebneten und ermöglichten. Meinem Vater, der zu jedem Zeitpunkt in meinem Leben an meiner Seite stand und die Entwicklung voller Interesse begleitete. Meinem Partner, Marcel Werner, der mir in schweren Stunden zusprach und bedingungslos beistand. Meinen besten Freundinnen, Sarah Reichelt und Janice Rosenberg, die trotz meines Zeitmangels nie von meiner Seite wichen, an mich glaubten und mich kompromisslos unterstützen.
- Prof. Dr. Burkardt Dahlmann (Institut Biochemie): An vorletzter Stelle möchte ich meinen besonderen Dank an Prof. Dr. Dahlmann aussprechen, der mich vor Anbeginn des Studiums mit der medizinischen Forschung in Kontakt brachte, mich über das Studium begleitete und über eine Empfehlung an Dr. Feist vermittelte, dem mein letzter und größter Dank gilt:
- PD Dr. Eugen Feist: Insbesondere bei Dr. Feist bedanke ich mich, mir nicht nur diese Thematik und den Akt des Promovierens ermöglicht zu haben, sondern vor allem für die herausragende Betreuung und Förderung während der gesamten Zeit. Beide erachte ich als große Förderer meiner Entwicklung und beiden gilt meine große Hochachtung.