

Aus der Klinik mit Schwerpunkt
Rheumatologie und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

IFN α and its response proteins, IP-10 and SIGLEC-1, are
biomarkers of disease activity in systemic lupus erythematosus

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Thomas Rose

aus Berlin

Datum der Promotion:22.6.14.....

Inhaltsverzeichnis

Englisches Abstract	3
Deutsches Abstract	4
Eidesstattliche Versicherung	6
Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation	7
Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge SM)	8
Publikation	9
Lebenslauf	16
Publikationsliste	17
Danksagung	18

Abstract

Objectives:

To evaluate and compare the clinical efficacy of three biomarkers for interferon (IFN) activity (measured directly and indirectly) and six traditional biomarkers in indicating current and prospective disease activity (DA) in systemic lupus erythematosus (SLE).

Methods

IFN α (dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassay), IFN γ -inducible protein 10 (IP-10; ELISA) and sialic acid-binding Ig-like lectin 1 (SIGLEC-1; flow cytometry) expression on monocytes were measured in 79 accurately characterised patients with lupus and compared with serum titres of Anti-dsDNA (ELISA and radioimmunoassay), Anti-dsDNA-NcX ELISA, Anti-Nuc ELISA, and complement C3 and C4. DA was evaluated using the British Isles Lupus Assessment Group 2004 index (BILAG-2004) and a modified SLE Disease Activity Index-2000 (mSLEDAI-2K). In addition, 31 clinically quiescent patients were monitored for flares over the course of 180 days.

Results:

Increased levels of serum IFN α , serum IP-10 and SIGLEC-1 expression on monocytes were found in 32%, 50% and 86%, respectively, of 66 patients with active SLE. IFN α ($r=0.45$; $p<0.0001$) and SIGLEC-1 ($r=0.54$; $p<0.0001$) correlated better with BILAG-2004 than did IP-10 ($r=0.38$; $p=0.0002$), Farr assay ($r=0.40$; $p=0.0001$), Anti-dsDNA-NcX ELISA ($r=0.28$; $p=0.0061$), Anti-dsDNA ELISA ($r=0.31$; $p=0.0025$), Anti-Nuc ELISA ($r=0.25$; $p=0.0121$), C3 ($r=-0.43$; $p<0.0001$) and C4 ($r=-0.33$; $p=0.0013$). Predictors of SLE flares were disease duration ≤ 92 months, mild clinical activity (in contrast with no activity), complement C3 ≤ 89 mg/dl and IFN $\alpha \geq 20$ pg/ml, while only low lymphocyte count and younger age were independent predictors in multivariate analysis.

Conclusion:

Serum IFN α and IP-10 as well as SIGLEC-1 expression on monocytes emerged as beneficial biomarkers of DA in patients with SLE. Therefore the implementation of IFN biomarkers in standard lupus diagnostics should be reappraised, especially in view of emerging anti-IFN-directed therapies.

Abstract

Ziel:

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob die Bestimmung von Interferon (IFN) assoziierten Biomarkern zu einer verbesserten Aktivitätsdiagnostik beim systemischen Lupus erythematoses (SLE) beitragen kann. Hierfür wurde IFN α als zentrales Zytokin der Pathophysiologie beim SLE direkt und indirekt als induziertes lösliches Protein-10 (IP-10), sowie zellmembranständiges Protein (SIGLEC-1) bestimmt und mit sechs konventionellen Biomarkern hinsichtlich klinischer Fragestellungen, wie die krankheitsgradbezogene Sensitivität, die Korrelation zur Krankheitsaktivität und der prädiktive Wert für Krankheitsschübe verglichen.

Methodik:

IFN α (dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassay), IFN γ -induziertes lösliches Protein 10 (IP-10; ELISA) und „sialic acid-binding Ig-like lectin 1“ (SIGLEC-1; Durchflusszytometrie) wurden in 79 Patienten mit der Diagnose SLE bestimmt und mit Serumspiegeln von Autoantikörpern (Anti-dsDNA-Antikörper im ELISA und Farr-Radioimmunoassay, Anti-dsDNA/Nukleosomen-Antikörper im Anti-dsDNA-NcX ELISA, Anti-Nukleosomen-Antikörper im Anti-Nuc ELISA) und der Komplementfaktoren C3 sowie C4 verglichen. Die Krankheitsaktivität wurde mit Hilfe des BILAG-2004 (British Isles Lupus Assessment Group 2004) und des mSLEDAI-2K (modifizierter SLE Disease Activity Index 2000) bestimmt. Zusätzlich wurden 31 klinisch inaktive SLE Patienten über einen Zeitraum von 180 Tagen hinsichtlich des Auftretens von Krankheitsschüben untersucht.

Ergebnisse:

Erhöhte Serumkonzentrationen von IFN α und IP-10 sowie eine erhöhte Expression von SIGLEC-1 auf Monozyten konnten in 32%, 50% und 86% der 66 aktiven SLE-Patienten nachgewiesen werden. Gemessen am BILAG-2004 Index korrelierten IFN α ($r=0.45$; $p<0.0001$) und SIGLEC-1-Expression auf Monozyten ($r=0.54$; $p<0.0001$) besser mit der Krankheitsaktivität als IP-10 ($r=0.38$; $p=0.0002$), Farr-Radioimmunoassay ($r=0.40$; $p=0.0001$), Anti-dsDNA-NcX ELISA ($r=0.28$; $p=0.0061$), Anti-dsDNA ELISA ($r=0.31$; $p=0.0025$), Anti-Nuc ELISA ($r=0.25$; $p=0.0121$) sowie C3 ($r=-0.43$; $p<0.0001$) und C4 ($r=-0.33$; $p=0.0013$). Prädiktoren für Krankheitsschübe beim SLE waren Krankheitsdauer (<92 Monaten), milde klinische Aktivität, Komplementfaktor C3 (≤ 89 mg/dl) und IFN α (≥ 20

pg/ml). Niedrige Lymphozytenzahl und junges Alter der Patienten stellten sich als einzige unabhängige Prädiktoren in der multivariaten Analyse heraus.

Schlussfolgerung:

Die Bestimmung von IP-10 und SIGLEC-1 ist sensitiver als die direkte Bestimmung von IFN α . Dabei besitzt SIGLEC-1 als zellmembranständiges Protein krankheitsgradbezogen die höchste Sensitivität unter allen untersuchten Biomarkern. In der Querschnittsanalyse zur Krankheitsaktivität korrelieren die IFN assoziierten Biomarker mit der Krankheitsaktivität. Die Implementation von IFN assoziierten Biomarkern sollte deshalb beim SLE weiter vorangetrieben werden und insbesondere auch hinsichtlich neuer IFN-inhibitorischer Medikamente breiter und unabhängig validiert werden.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Thomas Rose, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „IFN α and its response proteins, IP-10 and SIGLEC-1, are biomarkers of disease activity in systemic lupus erythematosus“ 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.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben ist.

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

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation

Autoren: Rose T, Grützkau A, Hirseland H, Huscher D, Dähnrich C, Dzionek A, Ozimkowski T, Schlumberger W, Enghard P, Radbruch A, Riemekasten G, Burmester GR, Hiepe F, Biesen R.

Titel: IFN α and its response proteins, IP-10 and SIGLEC-1, are biomarkers of disease activity in systemic lupus erythematosus

Zeitschrift: Annals of the Rheumatic Diseases

Erscheinungsjahr: 2012

Beitrag im Einzelnen:

Für die Zielstellung wurden 79 Patienten mit der Diagnose SLE aus stationären Aufenthalten, der Tagesklinik und der Poliklinik von mir über die Studie informiert, rekrutiert und deren Krankheitsaktivität mittels zwei verschiedener Krankheitsindices (SLEDAI-2k und BILAG-2004) erfasst, sowie die nötigen Blutentnahmen vorgenommen. Des Weiteren wurden von mir 27 gesunde Probanden als Kontrollen für die Grenzwertbestimmung über die Studie informiert und eingeschlossen.

Für die Bestimmung von SIGLEC-1, welches zuvor von Biesen et al. in zellspezifischen Transkriptomanalysen von Monozyten als IFN-Surrogatmarker identifiziert worden ist, erfolgten von mir zur besseren Vergleichbarkeit der Messergebnisse in verschiedenen Versuchsreihen die Etablierung eines Vier-Antikörper-Panels, die Entwicklung einer prozeduralen Standardisierung der Probenaufarbeitung und –messung, sowie die Ermittlung eines Grenzwertes für SIGLEC-1. Im Weiteren erfolgte die klinische Validierung in der ich alle SIGLEC-1 Probenaufarbeitungen und -bestimmungen in der Durchflusszytometrie (FACS), sowie die Messung von IP-10 im ELISA durchführte.

Die statistische Auswertung und Interpretation aller Abschnitte, mit Einschränkung in der Prädiktionsanalyse, die Konzeption und Erstellung der Graphiken (Tabelle 1, Figur 1 und 2), sowie in weiten Teilen die Verfassung des Manuskripts erfolgten unter Supervision von Robert Biesen durch mich.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)

ISI Web of KnowledgeSM

Journal Citation Reports[®]

WELCOME HELP MARKED LIST

2012 JCR Science Edition

Journal Summary List

Journals from: **subject categories RHEUMATOLOGY** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#) [Journal Title Changes](#)

Sorted by:

Journals 1 - 20 (of 29) Page 1 of 2

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data ^j						Eigenfactor [®] Metrics ^j	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor [®] Score	Article Influence [®] Score
<input type="checkbox"/>	1	NAT REV RHEUMATOL	1759-4790	1921	9.745	9.318	1.446	65	2.4	0.01198	3.503
<input checked="" type="checkbox"/>	2	ANN RHEUM DIS	0003-4967	27020	9.111	8.351	2.308	325	5.5	0.07255	2.518
<input type="checkbox"/>	3	ARTHRITIS RHEUM-US	0004-3591	45200	7.477	7.630	1.659	411	8.0	0.08898	2.515
<input type="checkbox"/>	4	CURR OPIN RHEUMATOL	1040-8711	3701	5.191	4.256	1.045	89	5.4	0.01155	1.467
<input type="checkbox"/>	5	ARTHRITIS RES THER	1478-6354	8883	4.302	4.769	0.521	309	4.6	0.03157	1.578
<input type="checkbox"/>	6	OSTEOARTHR CARTILAGE	1063-4584	8166	4.262	4.248	0.576	198	5.7	0.02244	1.290
<input type="checkbox"/>	7	RHEUMATOLOGY	1462-0324	13184	4.212	4.558	1.107	298	5.5	0.03792	1.419
<input type="checkbox"/>	8	SEMIN ARTHRITIS RHEU	0049-0172	3185	3.806	4.054	0.622	74	8.0	0.00604	1.239
<input type="checkbox"/>	9	ARTHRIT CARE RES	2151-464X	8784	3.731	4.777	0.874	238	4.8	0.03130	1.547
<input type="checkbox"/>	10	BEST PRACT RES CL RH	1521-6942	2138	3.550	3.693	0.373	59	5.5	0.00636	1.147
<input type="checkbox"/>	11	J RHEUMATOL	0315-162X	21050	3.258	3.544	0.921	330	9.5	0.03306	1.072
<input type="checkbox"/>	12	LUPUS	0961-2033	5089	2.783	2.736	0.608	237	5.8	0.01177	0.747
<input type="checkbox"/>	13	JOINT BONE SPINE	1297-319X	2436	2.748	2.395	0.748	107	4.7	0.00707	0.667
<input type="checkbox"/>	14	CLIN EXP RHEUMATOL	0392-856X	5909	2.655	2.312	0.655	252	6.2	0.01177	0.576
<input type="checkbox"/>	15	SCAND J RHEUMATOL	0300-9742	2714	2.216	2.379	0.551	69	9.0	0.00429	0.686
<input type="checkbox"/>	16	RHEUMATOL INT	0172-8172	3781	2.214	1.866	0.318	632	4.3	0.00990	0.475
<input type="checkbox"/>	17	RHEUM DIS CLIN N AM	0889-857X	1728	2.096	2.697	0.170	47	9.1	0.00378	0.921
<input type="checkbox"/>	18	CLIN RHEUMATOL	0770-3198	4559	2.037	1.866	0.373	249	5.3	0.01329	0.520
<input type="checkbox"/>	19	BMC MUSCULOSKEL DIS	1471-2474	3196	1.875	2.305	0.149	261	4.1	0.01365	0.750

Bildschirmfoto 2013-08-13

Journal: ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES

Mark	Journal Title	ISSN	Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Citable Items	Cited Half-life	Citing Half-life
<input checked="" type="checkbox"/>	ANN RHEUM DIS	0003-4967	27020	9.111	8.351	2.308	325	5.5	5.8

Bildschirmfoto 2013-08-13

Der Artikel ist unter folgender URL zu finden:

<http://ard.bmj.com/content/72/10/1639.long>

Der Artikel ist unter folgender URL zu finden:

<http://ard.bmj.com/content/72/10/1639.long>

Der Artikel ist unter folgender URL zu finden:

<http://ard.bmj.com/content/72/10/1639.long>

Der Artikel ist unter folgender URL zu finden:

<http://ard.bmj.com/content/72/10/1639.long>

Der Artikel ist unter folgender URL zu finden:

<http://ard.bmj.com/content/72/10/1639.long>

Der Artikel ist unter folgender URL zu finden:

<http://ard.bmj.com/content/72/10/1639.long>

Der Artikel ist unter folgender URL zu finden:

<http://ard.bmj.com/content/72/10/1639.long>

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

Publikationsliste

Biesen, R., Dähnrich, C., Rosemann, A., Barkhudarova, F., Rose, T., Jakob, O., Bruns, A., Backhaus, M., Stöcker, W., Burmester, G.R., Schlumberger, W., Egerer, K. & Hiepe, F., 2011, Anti-dsDNA-NcX ELISA: dsDNA-loaded nucleosomes improve diagnosis and monitoring of disease activity in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Res Ther*, 13(1), p. R26.

Rose, T., Grützkau, A., Hirseland, H., Huscher, D., Dähnrich, C., Dzionek, A., Ozimkowski, T., Schlumberger, W., Enghard, P., Radbruch, A., Riemekasten, G., Burmester, G.R., Hiepe, F. & Biesen, R., 2012, IFN α and its response proteins, IP-10 and SIGLEC-1, are biomarkers of disease activity in systemic lupus erythematosus, *Annals of the rheumatic diseases*.

Danksagung

Zusammenfassend waren die Promotionsjahre sehr bereichernd und bereiteten mir viel Freude - ein Zustand, der motiviert und kreatives Arbeiten ermöglicht. An diesem Umstand sind ganz maßgeblich meine Betreuer Dr. med. Robert Biesen und Dr. rer. nat. Andreas Grützkau beteiligt. Ich danke Beiden für die exzellente Betreuung, die Unnachgiebigkeit mich in die Kunst der Wissenschaft einzuführen und dafür, dass es am Ende in einer spannenden Promotionsarbeit mündete.

Im Weiteren möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Falk Hiepe bedanken, der mich nicht nur für die Rheumatologie als klinisches Fach begeistern konnte, sondern mich während der letzten fünf Jahr konstruktiv und mit Interesse begleitete und damit ein positives Arbeitsumfeld schaffte.

Ich danke Prof. Dr. rer. nat. Andreas Radbruch für die Möglichkeit im kreativen Umfeld im Deutschen Rheumaforschungszentrum arbeiten zu können. Die Einmaligkeit der Nähe zwischen Klinik und Forschung haben diese Arbeit erst ermöglicht.

Ich danke Heike Hirsland, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir bei Fragen im Labor zur Seite stand.

Zuletzt, aber sehr zentral möchte ich meiner Familie für die Unterstützung vor und während der Promotionszeit danken und dafür, dass sie mich in meinen eigenen Entscheidungen stets unterstützen. Meiner Schwester Angelika danke ich außerdem für den konstruktiven wissenschaftlichen Austausch.