

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

DISSERTATION

Der Einfluss von Typ-I-Interferonen auf Leukozyten-
Subpopulationen im Blut: Ein neuer diagnostischer Ansatz für die
Verwendung der Interferon-Signatur als Biomarker beim
systemischen Lupus erythematodes

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Romy Strauß

aus Berlin

Datum der Promotion: 07.12.2018

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	2
Abstrakt.....	4
Eidesstattliche Versicherung.....	6
Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation	7
Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge SM)	9
Publikation	10
Lebenslauf	23
Publikationsliste	24
Danksagung.....	25

Abstract

Introduction:

Interferon-regulated proteins and gene signatures are considered promising candidates for monitoring disease activity in systemic lupus erythematosus (SLE). The whole blood interferon signature (WBIFNS), defined by the simultaneous measurement of different interferon-induced transcripts in whole blood, is the most recent method for an indirect type I interferon assessment in SLE. Although the WBIFNS reflects the SLE disease activity in cross-sectional analyses, a long-term correlation has not yet been demonstrated. The aim of this study was to clarify the reasons for this paradox and, based on an optimized measurement procedure, further enhance the clinical diagnostic value of the type I interferon signature.

Methods:

By combining a multicentre dataset, gene expression data from SLE patients were applied to determine cell-specific differences in the expression of interferon-induced transcripts in leukocyte subsets. In a following cross-sectional study, percentages and absolute counts of peripheral blood leukocytes were compared in 79 patients with SLE to those of 20 healthy controls and 42 patients with hepatitis C. Changes of blood composition in 26 SLE patients were then longitudinally compared to changes of disease activity (BILAG-2004) and interferon activity (flow cytometric measurement of „sialic acid-binding lectin 1“) and additionally in 16 patients with hepatitis C receiving an interferon alpha therapy.

Results:

Leukocyte subsets could be distinguished by a cell-specific expression of interferon-induced transcripts making it possible to classify even closely related cell types according to their unique interferon signatures. By comparing the amplitude of interferon signature of different leukocyte subsets we found that the contributions of neutrophils and monocytes to the WBIFNS are significantly higher than those of lymphocyte subtypes. The whole blood composition of SLE patients is highly different from healthy controls and untreated patients with hepatitis C: in the cross-sectional study the percentage of

neutrophils was substantially higher whereas the absolute count and percentage of lymphocytes were significantly reduced in SLE patients. At the same time, the longitudinal analyses revealed that type I interferons lead to distinct changes in the composition of blood cells that, in particular, contain a neutropenia and relative lymphocytosis.

Conclusion:

The longitudinal measurement of interferon signatures in whole blood is biased by various effects of type I interferons on leucocyte subsets resulting in a cell-specific expression of interferon-induced transcripts and relevant alterations in blood composition. Therefore, the assessment of type I interferon signature should be performed in a cell-specific manner for its implementation as a biomarker in clinical practice.

Abstrakt

Einleitung:

Interferon-regulierte Proteine und Gensignaturen werden als vielversprechende neue Biomarker zur Überwachung der Krankheitsaktivität beim systemischen Lupus erythematoses (SLE) angesehen. Heute gilt die Vollblut-Interferon-Signatur, bei der die Expression von verschiedenen Interferon-induzierten Transkripten im Vollblut bestimmt wird, als Standardmethode für die indirekte Messung der Typ-I-Interferon-Aktivität beim SLE. Dabei spiegelt die Vollblut-Interferon-Signatur zwar in Querschnittsuntersuchungen die Krankheitsaktivität von SLE-Patienten wider, Veränderungen der Aktivität im Verlauf können mit ihr aber nicht erfasst werden. Ziel dieser Arbeit war es, die Ursachen für diesen scheinbaren Widerspruch aufzuzeigen und die klinische Etablierung der Typ-I-Interferon-Signatur durch eine optimierte Messung weiter voranzutreiben.

Methoden:

In einer Multicenter-Analyse wurden zunächst die Genexpressionsdaten von SLE-Patienten verwendet, um zellspezifische Unterschiede in der Expression von Interferon-induzierten Transkripten in verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen zu bestimmen. Anschließend wurden in einer Querschnittsuntersuchung die prozentualen Anteile und absoluten Zahlen der Blutleukozyten von 79 SLE-Patienten mit denen von 42 Hepatitis-C-Patienten und 20 gesunden Normal Spendern verglichen. In zwei Längsschnittuntersuchungen wurden zusätzlich die Veränderungen in der Blutzusammensetzung von 26 SLE-Patienten unter dem Einfluss von Krankheitsaktivität (BILAG-2004) und Interferon-Aktivität (durchflusszytometrische Messung von „sialic acid-binding actin Ig-like lectin 1“) sowie ebenso die von 16 Hepatitis-C-Patienten unter dem Einfluss einer Interferon-alpha-Therapie untersucht.

Ergebnisse:

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von Interferon-induzierten Transkripten zellspezifisch ist, sodass auch sehr eng verwandte Leukozyten-Subpopulationen anhand ihrer Interferon-Signaturen voneinander abgegrenzt werden können. Darüber hinaus unterscheiden sich die verschiedenen Leukozytenarten auch in

der Amplitude ihrer Interferon-Signatur, was dazu führt, dass der Beitrag von neutrophilen Granulozyten und Monozyten zur Vollblut-Interferon-Signatur signifikant größer ist als der von verschiedenen Lymphozyten-Subtypen. Die Gesamtblutzusammensetzung von SLE-Patienten differiert dabei stark zu der von gesunden Normalspendern und unbehandelten Hepatitis-C-Patienten: Im Querschnittsvergleich waren der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten bei SLE-Patienten deutlich höher und sowohl die absolute Zellzahl als auch der prozentuale Anteil der Lymphozyten signifikant niedriger. Gleichzeitig konnte mithilfe der Längsschnittuntersuchungen gezeigt werden, dass Typ-I-Interferone ausgeprägte Veränderungen in der Gesamtblutzusammensetzung hervorrufen, zu denen insbesondere eine Neutropenie und relative Lymphozytose gehören.

Schlussfolgerung:

Typ-I-Interferone wirken in unterschiedlicher Weise auf verschiedene Leukozyten-Subpopulationen ein und induzieren sowohl zellspezifische Interferon-Signaturen als auch Verschiebungen in der Gesamtblutzusammensetzung. Diese Effekte können die Messung der Typ-I-Interferon-Signatur im Vollblut empfindlich stören und erklären, warum die Vollblut-Interferon-Signatur die Krankheitsaktivität von SLE-Patienten in Längsschnittuntersuchungen nicht wiedergibt. Um die Typ-I-Interferon-Signatur als Biomarker in die klinische Routine zu implementieren, sollte diese daher zukünftig auf einer zellspezifischen Ebene erfasst werden.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Romy Strauß, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss von Typ-I-Interferonen auf Leukozyten-Subpopulationen im Blut: Ein neuer diagnostischer Ansatz für die Verwendung der Interferon-Signatur als Biomarker beim systemischen Lupus erythematodes“ 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 etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, 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

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation:

Strauß R, Flint SM, Rose T, Klotsche J, Häupl T, Peck-Radosavljevic M, Yoshida T, Kyogoku C, Flechsig A, Becker AM, Dao KH, Radbruch A, Burmester GR, Lyons PA, Davis LS, Hiepe F, Grützkau A, Biesen R. Type I interferon as a biomarker in autoimmunity and viral infection: a leukocyte subset specific analysis unveils hidden diagnostic options. J Mol Med (Berl). 2017 Mar 29.

Beitrag im Einzelnen:

Für die vorliegende Publikation habe ich die Transkriptomdaten und klinischen Studiendaten aus vier Zentren (Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Immunologie der Charité Universitätsmedizin Berlin; Cambridge Institute for Medical Research and Department of Medicine, University of Cambridge; Department of Internal Medicine, The University of Texas Southwestern Medical Center; Klinische Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie der Medizinische Universität Wien) zusammengeführt, in ein vergleichbares Datenformat transferiert und analysiert. Die Transkriptomdaten, die im Format von HG-U133 GeneChips vorlagen (Datensätze aus Berlin und Dallas), wurden von mir mithilfe der BioRetis Datenbank (www.bioretis-analysis.de) und den dort zur Verfügung stehenden Auswahlkriterien gefiltert und so die Expressionsdaten der für die Arbeit ausgewählten Interferon-induzierten Transkripte gewonnen. Analog zu den Datensätzen aus Cambridge habe ich diese Genexpressionsdaten anschließend zur Vergleichbarkeit der Datensätze in Signal Log Ratios (SLR) überführt.

Aus meinen statistischen Auswertungen sind die Graphiken 1, 2a und b sowie 4 und 5 entstanden. Die Erstellung der Tabellen 1 und 2 sowie auch die Clusteranalysen und deren Darstellung in Form von Heatmaps (Figur 3) erfolgten durch mich.

Die Interpretation der Ergebnisse, die daraus resultierenden Schlussfolgerungen sowie die Verfassung des Manuskriptes habe ich in weiten Anteilen unter der Betreuung von Dr. med. Robert Biesen eigenständig durchgeführt.

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

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

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

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2016** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"GENETICS and HEREDITY"** Selected Category
 Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 166 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS GENETICS	32,654	40.282	0.102540
2	NATURE GENETICS	88,954	27.959	0.241770
3	TRENDS IN ECOLOGY & EVOLUTION	32,332	15.268	0.039290
4	GENOME RESEARCH	36,644	11.922	0.114230
5	GENOME BIOLOGY	28,862	11.908	0.095240
6	TRENDS IN GENETICS	11,304	10.844	0.025030
7	GENES & DEVELOPMENT	57,493	9.413	0.105240
8	AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS	33,926	9.025	0.073300
9	Annual Review of Genetics	7,482	8.745	0.016980
10	GENETICS IN MEDICINE	7,416	8.229	0.027710
11	Annual Review of Genomics and Human Genetics	2,377	7.579	0.006480
12	ONCOGENE	65,039	7.519	0.080060
13	Genome Medicine	3,161	7.071	0.015960
14	MOLECULAR THERAPY	15,093	6.688	0.032410
15	MOLECULAR BIOLOGY AND EVOLUTION	42,339	6.202	0.104460
16	PLoS Genetics	39,330	6.100	0.184430
17	CURRENT OPINION IN GENETICS & DEVELOPMENT	7,740	5.825	0.019580
18	AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS PART C-SEMINARS IN MEDICAL GENETICS	1,608	5.600	0.004440
19	MUTATION RESEARCH-REVIEWS IN MUTATION RESEARCH	3,062	5.500	0.003200
20	JOURNAL OF MEDICAL GENETICS	11,709	5.451	0.021210
21	Advances in Genetics	1,447	5.431	0.003540
22	DNA RESEARCH	2,773	5.404	0.005050
23	HUMAN MOLECULAR GENETICS	37,849	5.340	0.089860
24	Epigenetics & Chromatin	1,093	5.189	0.006450
25	Molecular Autism	1,294	4.833	0.006320
26	Circulation-Cardiovascular Genetics	2,923	4.743	0.012380
27	JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE-JMM	6,738	4.686	0.012010
28	HUMAN GENETICS	8,521	4.637	0.016650

Publikation

Die Publikation ist unter folgender URL zu finden:

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1515-7>

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Flechsig A, Rose T, Barkhudarova F, Strauß R, Klotsche J, Dähnrich C, Schlumberger W, Enghard P, Burmester GR, Hiepe F, Biesen R. What is the clinical significance of anti-Sm antibodies in systemic lupus erythematosus? A comparison with anti-dsDNA antibodies and C3. *Clin Exp Rheumatol*. 2017 Mar 3. Impact factor 2016 = 2,495.

Strauß R, Flint SM, Rose T, Klotsche J, Häupl T, Peck-Radosavljevic M, Yoshida T, Kyogoku C, Flechsig A, Becker AM, Dao KH, Radbruch A, Burmester GR, Lyons PA, Davis LS, Hiepe F, Grützkau A, Biesen R. Type I interferon as a biomarker in autoimmunity and viral infection: a leukocyte subset specific analysis unveils hidden diagnostic options. *J Mol Med (Berl)*. 2017 Mar 29. Impact factor 2016 = 4,686.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen Personen meinen Dank aussprechen, ohne deren Mithilfe diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Zuerst gebührt mein Dank Dr. med. Robert Biesen für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, insbesondere aber für seine umfangreiche Unterstützung und Betreuung während der gesamten Promotionszeit.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Falk Hiepe danke ich für die Möglichkeit, in einem produktiven und angenehmen Umfeld gemeinsam zu arbeiten und zu forschen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. rer. nat. Andreas Grützkau für die zahlreichen Diskussionen und Ideen, die maßgeblich dazu beigetragen haben, dass diese Dissertation nun in dieser Form vorliegt.

Weiterhin danke ich Dr. med. Thomas Rose für seine wertvollen Anregungen und Denkanstöße sowie Dr. med. Thomas Häupl für seine Hilfestellungen bei der Datenanalyse und Statistik.

Für die Zurverfügungstellung ihrer Datensätze und den wissenschaftlichen Austausch danke ich Shaun Flint und Paul Lyons von der University of Cambridge, Amy Becker, Kathryn Dao und Laurie Davis von der University of Texas sowie Prof Dr. med. Markus Peck-Radosavljevic von der Medizinischen Universität Wien.

Zum Schluss möchte ich ganz besonders meinen Eltern für ihre bedingungslose und fortwährende Unterstützung danken.