

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

DISSERTATION

Methylierungsverhalten peripherer mononukleärer Blutzellen unter  
Janus-Kinase-Inhibitoren, Sarilumab und Methotrexat bei aktiver rheumatoider Arthritis

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ilka Liebold

Berlin

Datum der Promotion: 04.03.2022

# Inhalt

Abstract .....	3
Zusammenfassung.....	5
1. Einleitung.....	7
1.1 Die Rheumatoide Arthritis.....	7
1.2. Pathogenese der rheumatoiden Arthritis und mögliche Einflüsse der Methylierung .....	7
1.3. Diagnosestellung und Aktivitätserfassung mithilfe des Disease Activity Score 28 .....	8
1.4. Therapie der rheumatoiden Arthritis mit Fokus auf Behandlung mit Baricitinib, Tofacitinib und Sarilumab.....	9
2. Aktueller Forschungsstand zur DNA-Methylierung bei rheumatoider Arthritis .....	10
2.1. Bedeutung des Epigenoms .....	10
2.2. Methylierungsprozesse und Einfluss auf das Zellverhalten .....	10
2.3. Funktion der DNA-Methyltransferasen .....	11
2.4. Methoden zur Messung der DNA-Methylierung.....	12
2.5. Klinische Biomarker der rheumatoiden Arthritis .....	12
2.6. Ziel dieser Studie .....	13
3. Material und Methodik .....	14
3.1. Patientenkohorte .....	14
3.2. Identifikation der Blutsubpopulationen durch Zelloberflächenfärbung.....	15
3.3. Intranukleäre Färbung mittels des anti-5'-Methylcytosin Antikörpers.....	16
3.4. Isolierung von mononuklearen Zellen des peripheren Blutes .....	16
3.5. Immunfluoreszenzmikroskopie .....	17
3.6. AMNIS ImageStream® Durchflusszytometrie.....	18
3.7. Nährstoffentzug und Inkubation der U937 Zellkultur mit 5-Azacytidin.....	19
3.8. Durchflusszytometrie zum Nachweis der Methylierung in Blutzellen .....	19
3.9. Datenauswertung .....	20
3.10. Untersuchung der Genexpression durch Polymerase-Kettenreaktion .....	21
4. Ergebnisse.....	21
4.1. Korrelationen der Krankheitsaktivität mit der Höhe der Signalintensitäten des 5'-mC-FITC Antikörpers.....	21
4.2. Methylierungsniveau nach dreimonatiger Therapie.....	22
4.3. Vergleich der FITC-Signalintensitäten von Patienten zu Therapiebeginn mit Normalspendern und nach dreimonatiger Behandlung.....	24
4.4. Expression von Gentranskripten, die bei der Methylierung der DNA von Bedeutung sind.....	25
4.5. Veränderungen der Zellfrequenzen nach dreimonatiger Therapie .....	25

4.6. Überprüfung der Spezifität der Methodik mittel Immunfluoreszenzmikroskopie, AMNIS Imagestream® und Zellkulturen .....	25
5. Diskussion.....	27
5.1. Durchflusszytometrie als Messinstrument für Methylierung .....	27
5.2. Analyse der PBMC-Subpopulationen und Transkriptionsniveaus von Katalysatoren der Methylierung.....	28
5.3. Diagnostisches und therapeutisches Potential der DNA-Methylierung.....	29
6. Limitationen .....	30
7. Ausblick.....	30
8. Literaturverzeichnis.....	31
Eidesstattliche Versicherung .....	35
Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation als Top-Journal im Rahmen der Promotionsverfahren zum Dr. med.....	36
Auszug aus der „Journal Summary List .....	38
Publikation.....	39
Lebenslauf .....	51
Danksagung .....	52

## **Abstract**

### **Objective**

DNA methylation, as an important epigenetic regulator of gene transcription, is dynamic, reversible and influences the course of rheumatoid arthritis (RA). The study will focus on global DNA methylation in peripheral mononuclear cells (PBMCs) of patients with RA to determine whether testing the global DNA-methylation pattern could be useful in monitoring disease activity and response to therapeutics.

### **Methods**

In this prospective, experimental study, blood samples from 29 patients with RA were analyzed and compared to a control cohort of 17 healthy donors. The methylation status was determined with an anti-5'-methylcytosine antibody (anti-5'-mC) and analyzed in PBMCs, as well as via 'cluster of differentiation' (CD)4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> cell measurements by flow cytometry. The signal intensities of methylation measurements were correlated with the values of the clinically relevant Disease Activity Score 28 (DAS28-BSG, DAS28-CRP). Blood samples from RA patients were collected at baseline and after three months of treatment with the Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug (DMARD) methotrexate, the biological DMARD Sarilumab or Janus kinase inhibitors (JAKinibs). In addition, the transcription levels of genes involved in methylation processes were correlated with the level of 5'-mC methylation strength. The protocol was established with the model cell line U937.

### **Results**

Compared to healthy donors, PBMCs and their subtypes of RA patients showed significant global DNA hypomethylation. Correlations between global 5'-mC signal intensities and DAS28-ESR values were obtained for lymphocytes ( $r=-0.57$ ), CD4<sup>+</sup> ( $r=-0.57$ ), CD8<sup>+</sup> ( $r=-0.54$ ), CD14<sup>+</sup> ( $r=-0.49$ ) and CD19<sup>+</sup> ( $r=-0.52$ ) blood cell subpopulations. The signal intensities of the anti-5'-mC measurements showed a good correlation with the transcription levels of the DNA-methyltransferase genes DNMT1 ( $r=0.57$ ), DNMT3B ( $r=0.53$ ), the 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase gene (MTR;  $r=0.46$ ) and to a lesser extent with the methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR;  $r=0.39$ ). The relative number of blood cell frequencies at baseline and after three months of treatment showed a decrease in lymphocytes (-5.3%) and CD4<sup>+</sup> cells (-3.2%), while the number of other cell subpopulations remained unchanged.

## **Conclusions**

Our study indicates an association between the methylation behavior of PBMCs and their subtypes and disease activity in patients with RA. Based on flow cytometric measurements, the degree of global methylation might be a promising biomarker for therapy monitoring and prognosis of therapy success in inflammatory diseases.

## **Zusammenfassung**

### **Zielsetzung**

Die DNA-Methylierung, als wichtiger epigenetischer Regulator, ist dynamisch, reversibel und beeinflusst den Verlauf der rheumatoiden Arthritis (RA). Die Studie konzentriert sich auf die globale DNA-Methylierung in peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) von Patienten mit RA, um festzustellen, ob die Prüfung des globalen DNA-Methylierungsmusters für die Überwachung der Krankheitsaktivität und für das Ansprechen auf Therapeutika genutzt werden kann.

### **Methoden**

In dieser prospektiven, experimentellen Studie wurden Blutproben von 29 Patienten mit RA untersucht und mit einer Kontrollkohorte von 17 gesunden Spendern verglichen. Der Methylierungsstatus wurde mit einem anti-5'-Methylcytosin Antikörper (anti-5'-mC) bestimmt und in PBMCs, sowie über 'Cluster of differentiation' (CD)4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-, CD14<sup>+</sup>- und CD19<sup>+</sup> Zellmessungen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Signalintensitäten der Methylierungsmessung wurden mit den Werten des klinisch relevanten Disease Activity Score 28 (DAS28-BSG, DAS28-CRP) korreliert. Blutproben von RA-Patienten wurden vor Studienbeginn und nach drei Monaten Behandlung mit dem DMARD Methotrexat, dem biologischen DMARD Sarilumab oder mit Janus-Kinase-Inhibitoren (JAKinibs) entnommen. Darüber hinaus wurden die Transkriptionsniveaus von Genen, die an Methylierungsprozessen beteiligt sind, mit dem Grad der 5'-mC Methylierungsstärke korreliert. Das Protokoll wurde mit der Modell-Zelllinie U937 etabliert.

### **Ergebnisse**

Im Vergleich zu gesunden Spendern zeigten PBMCs und ihre Subtypen von RA-Patienten eine signifikante globale DNA-Hypomethylierung. Korrelationen zwischen der 5'-mC-Signalintensität und den DAS28-BSG Werten wurden für Lymphozyten ( $r=-0,57$ ), CD 4<sup>+</sup> ( $r=-0,57$ ), CD8<sup>+</sup> ( $r=-0,54$ ), CD14<sup>+</sup> ( $r=-0,49$ ) und CD19<sup>+</sup> ( $r=-0,52$ ) Zellsubpopulationen berechnet. Die Signalintensitäten der 5'-mC-Messungen zeigten eine gute Korrelation mit den Transkriptionsniveaus der DNA-Methyltransferasen Gene DNMT1 ( $r=0,57$ ), DNMT3B ( $r=0,53$ ), dem Gen für die 5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein Methyltransferase (MTR;  $r=0,46$ ) und in geringerem Maße mit dem Gen der Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR;  $r=0,39$ ). Die relative Anzahl der Zellzahlen zu Beginn und nach drei Monaten

Behandlung zeigte dabei eine Abnahme der Lymphozyten (-5,3%) und CD4<sup>+</sup>-Zellen (-3,2%), während die Anzahl der anderen Zellsubpopulationen unverändert blieb.

### **Schlussfolgerungen**

Unsere Studie zeigt einen Zusammenhang zwischen dem Methylierungsverhalten von PBMCs und ihren Blutzell-Subtypen und der Krankheitsaktivität bei Patienten mit RA. Basierend auf durchflusszytometrischen Messungen kann der Grad der globalen Methylierung ein vielversprechender Biomarker für die Therapieüberwachung und die Prognose des Therapieerfolgs bei entzündlichen Erkrankungen sein.

# **1. Einleitung**

## **1.1 Die Rheumatoide Arthritis**

Die RA ist eine systemische, chronisch-entzündliche Erkrankung mit autoimmunem Charakter und einer weltweiten Prävalenz von ca. 1 % (2). Die RA verläuft meist progredient mit rezidivierenden Schüben, wobei der individuelle Verlauf sehr variabel sein kann. Im Vordergrund steht eine Synovialitis, welche im Verlauf zu einer chronischen und erosiven Polyarthritiden führen kann. Das typische Befallsmuster entspricht einer symmetrischen Entzündung der kleinen Finger- und Zehengelenke, charakteristischerweise der Metacarpophalangeal- und der proximalen Interphalangealgelenke. Begleitend kann eine Tendovaginitis oder Bursitis Beschwerden verursachen. Die Patienten klagen vor allem über Schmerzen und Schwellungen der betroffenen Gelenke, die mit Funktionseinschränkungen, bis hin zum Verlust der Bewegungsfähigkeit, einhergehen. Die Mortalität der Erkrankung wird maßgeblich durch eine Beteiligung innerer Organe, kardiovaskuläre Ereignisse und ein erhöhtes Risiko für Neoplasien bestimmt. Bisher wurden diverse Risikofaktoren identifiziert, welche die Wahrscheinlichkeit an einer RA zu erkranken erhöhen und die Krankheitsaktivität beeinflussen können. Beispielfhaft erhöhen sowohl Rauchen als auch ein zu hoher BMI das Risiko zu erkranken, während ein moderater Alkoholkonsum, mediterrane Ernährung und regelmäßige körperliche Aktivitäten die Krankheitsaktivität senken können (3, 4). Zu den unbeeinflussbaren Risikofaktoren zählt ein hohes Alter, das weibliche Geschlecht und genetische Marker, wie z.B. die RA assoziierten humanen Leukozytenantigene der Isotypengruppe HLA-DR (3). Diese HLA Gene codieren für die sogenannten „Shared Epitopes“, welche bei bis zu 90% der an RA erkrankten Patienten nachweisbar sind (5).

## **1.2. Pathogenese der rheumatoiden Arthritis und mögliche Einflüsse der Methylierung**

Über die Ätiologie der RA ist bisher noch wenig bekannt. Die Pathogenese der RA ist ein multifaktorielles Geschehen und stellt ein komplexes System fehlgesteuerter Blutzellinteraktion dar. Es gibt Hinweise, dass die RA durch eine fehlgeleitete Immunreaktion ausgelöst z.B. durch virale oder bakterielle Infekte und eine zusätzlich vorliegende genetische Disposition ausgelöst werden kann (6). Als Autoimmunerkrankung ist die RA durch die Produktion von Autoantikörpern, wie dem Rheumafaktor (RF) oder Antikörpern gegen citrullinierte Peptid- oder Protein-Antikörper (ACPA) gekennzeichnet. Beide Antikörpertypen sind sowohl systemisch im Serum wie auch lokal in der Synovialflüssigkeit der Gelenke zu finden. Die Bestandteile der viskösen Synovialflüssigkeit setzt sich aus Lubricin,



Hyaluronsäure und Proteinen der extrazellulären Matrix zusammen, die von synovialen Fibroblasten (SF) produziert werden und Bausteine der Gelenkinnenhaut (Synovium) sind. Lubricin und Hyaluronsäure verringern unter anderem die Reibung im Gelenkspalt und sorgen für eine ausgeglichene Immunantwort (7). Bei Patienten mit RA zeigen die SF einen aktivierten, aggressiveren Phänotyp (8) und werden im weiteren Text als RASF (synoviale Fibroblasten der RA) bezeichnet. Neben den synovialen Makrophagen in der Deckzellschicht des inflammatorischen Gewebes sind diese Produzenten degradierender Enzyme, wie z.B. von Cathepsin und Matrixmetalloproteasen und unterhalten die Entzündung durch Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. dem Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (9). Im weiteren Entzündungsverlauf werden zusätzlich Adhäsionsmoleküle exprimiert, sowie chemotaktische Zytokine und Angiogenesefaktoren ausgeschüttet, was zur vermehrten Infiltration des Synovialgewebes durch Immunzellen führt. Durch Aktivierung von Monozyten/Makrophagen und CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, welche durch positive Rückkopplung weitere pro-inflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  ausschütten, wird wiederum die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen oder Monozyten initiiert (10). Das lokale Geschehen innerhalb des Gelenkspalt führt zur Hyperplasie des Synovialgewebes, welches die darunterliegende Knorpel- und Knochenoberfläche überwuchert, infiltrierte und letztendlich das Gelenk zerstört. Im Vergleich zu SF wiesen die RASF in vorangegangenen Studien eine Hypomethylierung auf (11). Diese Hypomethylierung, insbesondere in Promoter- und Gen-kodierenden Regionen, trägt zu einer verstärkten Genexpression von Adhäsionsmolekülen und Matrixmetalloproteasen, sowie zu einer Sezernierung pro-inflammatorischer Zytokine bei.

### **1.3. Diagnosestellung und Aktivitätserfassung mithilfe des Disease Activity Score 28**

Um irreversible Schäden der Gelenke zu verhindern, ist eine frühe und korrekte Diagnose der RA erforderlich. Noch bevor Gelenkveränderungen im Röntgenbild erkennbar werden, können spezifische und unspezifische Labormarker, wie z.B. der RF, der Anstieg des C-reaktiven Proteins (CRP) oder die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) Hinweise für eine gesicherte Diagnose liefern.

Um eine frühe Diagnosestellung zu erleichtern, wurden von der Gesellschaft European League Against Rheumatism (EULAR) Klassifikationskriterien definiert. Diese beinhalten das Ausmaß der Gelenkbeteiligung, die Serologie (RF und ACPA), die Höhe der Entzündungsparameter (CRP und BSG) und die Symptombdauer (12). Als Bedingung für die Anwendung der Kriterien muss mindestens eine sichere Synovitis in einem für die RA typischen Gelenk vorliegen. Um

die Aktivität der RA und das Ansprechen auf eine Therapie einordnen zu können, wurde u.a. der Disease Activity Score 28 (DAS28) entwickelt (13). Hierfür werden die Druckschmerzhaftigkeit und die Schwellung von n=28 definierten Gelenken erfasst und die vom Patienten selbst wahrgenommene Krankheitsaktivität der letzten sieben Tage auf einer visuellen Analogskala (VAS) beurteilt. In Kombination mit der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) oder der Konzentration des CRP als Entzündungsparameter kann der DAS28 als validierter Wert für die Krankheitsaktivität berechnet werden. Zusätzlich können bildgebende Verfahren wie das konventionelle Röntgen oder die Arthrosonographie einen guten Überblick der bereits erfolgten Destruktion des Gelenkes liefern, sowie entzündliche Befunde in Form von Synovialitis und Ergußbildung identifizieren.

#### **1.4. Therapie der rheumatoiden Arthritis mit Fokus auf Behandlung mit Baricitinib, Tofacitinib und Sarilumab**

Eine frühestmögliche Therapieeinleitung kann irreversible Gelenkschäden verhindern und eine Remission des Krankheitsgeschehens einleiten. Als Mittel der ersten Wahl wird meist MTX als konventionelles synthetisches (cs)DMARD herangezogen und im initialen Krankheitsschub individuell durch Glukokortikoidgaben ergänzt. Mit der Einführung von sogenannten biologischen (b)DMARDs, wie z.B. gegen TNF- $\alpha$  oder IL-6 Rezeptor gerichtete monoklonale Antikörper, wurde die Therapie der RA um eine weitere wertvolle Therapiemöglichkeit ergänzt. Diese sind in der Lage gezielt pro-inflammatorische Zytokine wie z.B. TNF- $\alpha$  oder IL-6 zu inhibieren. Trotz der mittlerweile großen Vielfalt an wirksamen Medikamenten, gibt es weiterhin Patienten, bei denen keine Remission erreicht wird oder die an unerwünschten Nebenwirkungen leiden. Neben der Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten müssen somit auch die Auswirkungen neuer Medikamente in Studien erschlossen werden. Im Fokus dieser Studie stehen die seit 2017 in Deutschland zugelassenen zielgerichteten synthetischen (ts)DMARDs Xeljanz<sup>®</sup> (Wirkstoff: Tofacitinib) und Olumiant<sup>®</sup> (Wirkstoff: Baricitinib) als JAKinibs für die Behandlung der RA zur Verfügung. Baricitinib hemmt die Signalübertragung der JAK1 und JAK2 (14). Tofacitinib hemmt zusätzlich die JAK3 (15), was zu einer verminderten Zytokinproduktion (u.a. IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21) führt und modulierend auf die Zellkommunikation und Immunantwort von Lymphozyten wirkt (15). Durch die Möglichkeit der oralen Einnahme, wird auch die Patientenadhärenz gefördert. Auch der in dieser Studie untersuchte IL-6-Rezeptor Inhibitor Kevzara<sup>®</sup> (Wirkstoff: Sarilumab) wurde 2017 als neues bDMARD für die RA zugelassen, nachdem in der Vergangenheit vielversprechende Ergebnisse mit Eingriffen in die IL-6-Signalweg Kaskade (beispielsweise

mit dem IL-6-Inhibitor Tocilizumab) erzielt wurden. In Kopf-an-Kopf Monotherapiestudien zeigten beide IL-6-Rezeptor Antagonisten sogar eine stärkere Reduktion des DAS28 als das bDMARD Adalimumab, welches gegen TNF- $\alpha$  gerichtet ist (15, 16).

## **2. Aktueller Forschungsstand zur DNA-Methylierung bei rheumatoider Arthritis**

### **2.1. Bedeutung des Epigenoms**

Auf Ebene der DNA besitzt jede Zelle die gleichen genetischen Informationen. Die Inhibition oder die Aktivierung spezifischer Genabschnitte ist Voraussetzung für die Individualität der Zelltypen. Innerhalb dieser epigenetischen Muster besteht eine hohe Dynamik, weswegen weitere Studien zu diesem Thema nötig sind. Womöglich der wichtigste Mechanismus für Genmodulierungen ist die Histonmodifikation. Molekulare Veränderungen an Histonen in Form von z.B. Methylierung, Acetylierung und Phosphorylierung beeinflussen die Transkription von Genen, indem sie das Ablesen der DNA erschweren oder erleichtern (17). Hierdurch entstehen individuelle epigenetische Muster, die durch den Lebensstil, insbesondere die Ernährung, stark beeinflusst werden können. Eine mögliche Vererbung dieses Phänomens wurde in zahlreichen Publikationen untersucht und nachgewiesen (18). Außerdem können schon im jungen Alter erworbene Modifikationen von Genabschnitten jahrzehntelang im (Epi-)Genom persistieren. Es wird vermutet, dass die Vererbung epigenetischer Muster einen wichtigen Faktor der schnellen Adaptation an wechselnde Umweltbedingungen darstellt. Die RA zeigt eine Konkordanzrate von 15,4 % bei eineiigen Zwillingen (19), was auf einen nur begrenzten Einfluss des Genoms bei der Entwicklung der RA hindeutet. Das epigenetische System könnte die RA somit stärker beeinflussen als bisher angenommen und rückt immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses.

### **2.2. Methylierungsprozesse und Einfluss auf das Zellverhalten**

Die epigenetische Regulation der Transkription erfolgt hauptsächlich durch Modulationen in Form von DNA-Methylierung, Acetylierung und Phosphorylierung von DNA. Der Fokus dieser Studie liegt auf der Methylierung als chemische Modifikation der DNA ohne Veränderung des Grundgerüsts. In Eukaryoten können die beiden DNA-Basen Cytosin und Adenin enzymatisch zu 5-Methylcytosin bzw. zu N<sup>6</sup>-Methyladenin methyliert werden (20). Während die Methylierung des Adenins eher zur Korrektur von Fehlpaarungen der DNA-Basen in Bakterien dient, spielt die Methylierung des Cytosins beim Menschen für epigenetische

Prozesse eine maßgebliche Rolle. Eine Voraussetzung hierfür ist, dass Guanin die nachfolgende Base des Cytosins ist, was als CpG-Dinukleotid bezeichnet wird.

5-Methylcytosin ist eine modifizierte DNA-Nukleinbase mit einem Pyrimidingrundgerüst und einer zusätzlichen Methylgruppe in Position fünf des Kohlenstoffringes. Dieser Vorgang wurde von Hotchkiss im Jahre 1948 zum ersten Mal beschrieben (21). Befindet sich diese Methylierung in Promoter-/Enhancer Regionen, wird ein Ablesen des Gens durch die RNA-Polymerase verhindert. Auch innerhalb von Introns und Exon übernimmt DNA-Methylierung regulatorische Funktionen. Neben einer Reduktion der Genexpression wird hier auch eine Modulation des genetischen Spleißens innerhalb der Exon/Intron Bereiche vermutet (22).

Methylierungsprozesse spielen innerhalb steuernder Promoter-Elemente bei der Initiierung oder dem Abschalten der Genexpression als weitere Regulationsmechanismen eine wesentliche Rolle. Hierdurch wird die Transkription von z.B. (pro-)inflammatorischen Zytokinen gesteuert, welche die Proliferation und Differenzierung verschiedenster Zellen fördern können und somit einen Einfluss auf die Krankheitsaktivität haben. Eine niedrige Methylierungsdichte geht somit z.B. auch mit einer hohen Zytokintranskription einher, was zu einer Verstärkung der pro-inflammatorischen Aktivität von Leukozyten führt und die Entzündung unterhält. Dies hat vermutlich zur Folge, dass systemisch aktivierte Blutzellen in die betroffenen Bereiche der Gelenke einwandern und dort dann lokal aktiviert die Entzündung initiieren bzw. fördern können. Krankheitsspezifische epigenetische Muster sind Gegenstand aktueller Forschungen, um daraus einen möglichen klinischen Nutzen zu gewinnen.

### **2.3. Funktion der DNA-Methyltransferasen**

Die Methylierung wird durch charakteristische Enzyme die als sog. DNA-Methyltransferasen (DNMTs) bezeichnet werden initiiert. Deren Aktivierung erfolgt zumeist über den Ras-c-Jun Signalweg und über diverse Mechanismen u.a. durch Beteiligung der Zink-Finger-Proteine Sp1 und Sp3 (23). Durch DNMTs erfolgt die postreplikative Bildung von 5-Methylcytosin. Oft sind die regulatorischen Einheiten des Genoms, wie z.B. Promoter- oder Enhancer-Regionen das Ziel der DNMTs, was eine gezieltere Regulierung der Gentranskription durch Methylierung zur Folge hat (24). Außer den beiden DNA-Methyltransferasen DNMT1 und DNMT3b wurden in dieser Studie die Expression der Methyltransferasen BHMT1 und MTR sowie die Expression des Enzyms MTHFR untersucht. Diese sind an Methylierungsprozessen innerhalb des Folat-Kreislaufs beteiligt und somit an Prozessen zur Bereitstellung von S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonor.

## **2.4. Methoden zur Messung der DNA-Methylierung**

Um eine umfassende und reproduzierbare Untersuchung des Methyloms und seiner Wirkung bei Autoimmun- oder Tumorerkrankungen zu ermöglichen, wurde für die Quantifizierung die Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) Methode entwickelt. Diese Methode stellt bis dato immer noch den Goldstandard für die Untersuchung der Methylierung und die Kartierung spezifischer Genabschnitte dar. In zahlreichen Studien wurde mit dieser Methode das Methylierungsverhalten von Genabschnitten und deren Einfluss bei z.B. Tumor- und chronisch inflammatorischen Erkrankungen untersucht. In einer Assoziationsstudie wurde beispielsweise die DNA-Methylierung von asymptomatischen, ACPA-positiven Menschen und ACPA-negativen Menschen verglichen. Man fand spezifische Genloci, welche hauptsächlich bei ACPA-positiven Patienten hypomethyliert bzw. hypermethyliert waren (25). Interessanterweise waren viele der betroffenen Gen-Loci auch mit Signalwegen im Zusammenhang mit dem Epstein-Barr-Virus und der damit verbundenen Immunantwort assoziiert, was möglicherweise auch auf einen potentiellen Einfluss bzw. eine Assoziation von äußeren Faktoren schließen lässt.

Eine globale Methylierungsmessung mittels Durchflusszytometrie wurde bisher von Habib et al. (Nachweis von globaler Hypomethylierung in EBV-transformierten Interphasenkernen) (26) und von Celik-Uzuner et al. (Messung von globaler Methylierung in Mausfibroblasten) (27) beschrieben und von uns für Gesamt- und Einzelzellpopulationen des Blutes etabliert. Die globale Methylierungsmessung per Durchflusszytometrie bietet eine Reihe von Vorteilen, die sowohl bei der Durchführung wissenschaftlicher Studien als auch im klinischen Kontext nützlich sind. Einerseits wird nur eine geringe Menge an Probenmaterial benötigt, zum anderen erlaubt diese Methode eine schnelle und präzise Sortierung in einzelne Blutzell-Subgruppen.

## **2.5. Klinische Biomarker der rheumatoiden Arthritis**

Bisher werden in der klinischen Routine verschiedene Biomarker für Diagnosestellung und Verlaufsbewertung der RA genutzt. Diese können nur in Kombination mit der klinischen Diagnostik und Erhebung weiterer Befunde u.a. auch durch bildgebende Verfahren genutzt werden (28). Hierzu gehören die Entzündungsparameter CRP und die BSG, sowie der RF und ACPA als Autoantikörper. Neue, sensitive und spezifische Biomarker, welche eine präzisere Individualisierung der Therapiekonzepte auf Patientenebene erlauben und in der alltäglichen Praxis anwendbar sind, sind Gegenstand aktueller Forschung. Auch Prädiktoren für ein gutes oder fehlendes Ansprechen oder für unerwünschte Nebenwirkungen werden benötigt. Innerhalb

der letzten Jahre wurden bereits Hinweise auf Prädiktionsgene gefunden, z.B. konnte unter Monotherapie mit Adalimumab eine erhöhte Expression von CD11c bei klinischem Therapieansprechen bestätigt werden (29). Für die Vorhersage des Therapieansprechens auf MTX wurden bei RA Patienten mit HLA-DRB4-Paralogpräsenz ein weiterer transkriptioneller Biomarker identifiziert (30).

Die Behandlung der RA ist potenziell nebenwirkungsreich und durch hohe Kosten gekennzeichnet, weswegen validierte und präzise Biomarker mit einer hohen Sensitivität und Spezifität wichtig sind. Als statistische Gütekriterien diagnostischer Tests werden oft Sensitivität und Spezifität genannt. Die Sensitivität und Spezifität werden für den RF mit 69 % (95 % Konfidenz Intervall (CI), 65 %-73 %) und 85 % (95 % CI, 82 %-88 %) und für ACPA mit 67 % (95 % CI, 62 %-72 %) und 95 % (95 % CI, 94 %-97 %) angegeben (31).

Bisher wurden diverse Studien durchgeführt, welche den Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und RA untersuchten (32). Es wurde ein Zusammenhang zwischen Hypomethylierung innerhalb spezifischer Genloci und der erhöhten Krankheitsaktivität bei RA Patienten festgestellt. Beispielfhaft seien die für CYP2E1 oder DUSP22 codierenden Gene genannt. CYP2E1 oder DUSP22 sind Mediatoren von mit RA assoziierten proinflammatorischen Signalwegen (33). Auch die Auswirkungen therapeutischer Ansätze auf die Methylierung wurden in der Vergangenheit untersucht. Die Einnahme von MTX führt zu einem erhöhten Methylierungsniveau (34). Eine erfolgreiche Therapie mit DMARDs führt laut Glossop et al. zu einer Hypo- oder Hypermethylierung spezifischer Genabschnitte von T- und B-Zellen (35). DNA-Methylierung wurde auch hinsichtlich des Ansprechens auf TNF- $\alpha$ -Inhibitoren untersucht und als potenzieller Biomarker eingeschätzt (36). An der Entschlüsselung der für die Pathogenese der RA entscheidenden Gene und deren epigenetischer Muster wird aktuell geforscht. Bisher arbeitet man daran, die Mechanismen, welche zu Autoimmunerkrankungen führen, zu erschließen. Ob und wie man Methylierung als zukünftigen potenziellen Biomarker für den Verlauf, die Prognose oder das Ansprechen auf eine Therapie nutzen kann, steht dabei im Vordergrund.

## **2.6. Ziel dieser Studie**

Das Ziel dieser experimentellen Studie war es, einen Zusammenhang zwischen der Methylierungsdichte verschiedenster Subpopulationen der peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) und der Krankheitsaktivität von Patienten mit RA darzustellen. Ein zentrales Dogma der Epigenetik ist, dass hypomethylierte DNA-Promoter- und Exonregionen aktiver sind.

Methylierte Bereiche sind dagegen für die Transkription von Genen inaktiv (37). Die klinische Konsequenz dieser Hypothese wäre, dass ein niedriges globales Methylierungsniveau von PBMCs zu einer erhöhten Krankheitsaktivität (gemessen mit dem DAS28) führen könnte. Mithilfe eines anti-5'-Methylcytosin gerichteten monoklonalen Antikörpers der methylierte CpG-Dinucleotide innerhalb der DNA erkennt und an den der Fluoresceinisothiocyanat (FITC) Farbstoff gekoppelt ist, wurde dieser Zusammenhang durchflusszytometrisch untersucht. Das primäre Ziel war, die Messung der Methylierungsdichte innerhalb der DNA für eine präzise und individuelle Überwachung der Krankheitsaktivität zu nutzen und 5'-mC als potenziellen Biomarker für die Verlaufskontrolle und Prognose bei der RA verwenden zu können.

Weiterhin stand im Fokus, eine Methodik zu etablieren, die es erlaubt die DNA-Methylierungsstärke schnell und kosteneffizient in Blutzell-Subpopulationen zu bestimmen, welche auch im klinischen Alltag mit einer adäquat hohen Sensitivität und Spezifität einsetzbar ist. Es existieren diverse Möglichkeiten, den Methylierungsgrad von DNA-Proben zu ermitteln. Die Wahl der passenden Methode richtet sich nach den Anforderungen der Studie. Beispielsweise spielen die Menge des bereitgestellten Probenmaterials und die benötigte Sensitivität und Spezifität eine Rolle oder ob bekannte oder unbekannte epigenetische Vorgänge global oder innerhalb einzelner Kandidatengenbereiche untersucht werden sollen (38). Die in dieser Studie verwendete Methodik der Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, schnell und einzelzellbasiert die Methylierungsdichte innerhalb von Blutzell-Subpopulationen zu messen. Ein Vorteil dieser Methode ist, die Methylierungsstärke der bei der Entzündung beteiligten Immunzellen separat bestimmen zu können. Unter anderem können deren detaillierte physiologischen Eigenschaften hinsichtlich der Interpretation der zellulären Differenzierung, ihrer Funktion und/oder der Zell-Kommunikation bewertet werden.

### **3. Material und Methodik**

#### **3.1. Patientenkohorte**

Für die Messung des Methylierungsgrades wurde die DNA der PBMCs genutzt. Dazu wurde 29 Patienten mit einer aktiven RA gemäß den Kriterien des American College of Rheumatology und der European League Against Rheumatism aus dem Jahr 2010 (12) Vollblut entnommen. Gemessen wurde vor und nach dreimonatiger Therapie mit Baricitinib, Tofacitinib, Sarilumab oder Methotrexat. Einschlusskriterium für Patienten, welche Sarilumab oder einen JAKinib einnahmen, war eine Krankheitsdauer von mindestens zwei Jahren vor Studieneinschluss, um mögliche Einflüsse einer frühen Therapie auf die DNA-Methylierung zu verringern. Auch

eingeschlossen wurden Patienten, die nach der Erstdiagnose einer RA mit MTX behandelt wurden. Bevor die Blutentnahme erfolgte, unterzeichnete jede Patientin und jeder Patient eine Einwilligungserklärung und wurde über den Zweck und das Ziel dieser Studie informiert. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der Ethikkommission für Medizin der Charité genehmigt (EA1/193/10). Zum Vergleich wurde das Blut von 17 freiwilligen Normalspendern als Kontrollkollektiv untersucht.

### 3.2. Identifikation der Blutsubpopulationen durch Zelloberflächenfärbung

Jede Immunzelle besitzt ein spezifisches Muster bestehend aus membrangebundenen (Glyko-) Proteinen auf ihrer Oberfläche. Diese immunphänotypischen Oberflächenmerkmale sind spezifisch für Typ oder Entwicklungsstufe der zu untersuchenden Blutzellen und werden als ‚Cluster of Differentiation‘ (CD) bezeichnet. Funktionen dieser CDs sind unter anderem das Katalysieren enzymatischer Prozesse, Kommunikation, intrazelluläre Signalweiterleitung, Antigenerkennung und die Einleitung der Phagozytose. Sie können sowohl diagnostisch als auch therapeutisch von Nutzen sein. Mithilfe von mono- und polyklonalen Antikörpern können Subpopulationen von Zellen präzise nachgewiesen oder auch beeinflusst werden.

Zur Identifikation, der in dieser Studie untersuchten Zellpopulationen, wurden sieben verschiedene Antikörper gegen CD-Marker benutzt, die mit Fluorochromen konjugiert waren. Die gewählten Antikörper wurden in zwei Panels aufgeteilt und die Fluoreszenzen so gewählt, dass das Zytometer die Emissionen des Lichts detektieren kann.

Panel 1 in 92µl PBS/EDTA/BSA	Panel 2 in 96µl PBS/EDTA/BSA
1 µl CD4 - APC-CY7	2 µl CD19 - APC
1 µl CD8 - PE-CY7	1 µl CD14 PE - CY7
5'-mC - FITC	5'-mC - FITC

Tabelle 2: genutzte Antikörper-Panel



### **3.3. Intranukleäre Färbung mittels des anti-5'-Methylcytosin Antikörpers**

Der in dieser Studie verwendete Antikörper gegen 5-Methylcytosin wurde mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC, Exzitationsmaximum: 493 nm, Emissionsmaximum: 528 nm) konjugiert, womit eine Messung von Signalintensitäten in einem BD FACSCanto™-II Zytometer (Becton Dickinson; Franklin Lakes; NJ; USA) möglich wurde. In Kombination mit CD-Antikörpern, welche zur Unterscheidung der verschiedenen Subpopulationen verwendet wurden, konnte so eine quantitative Aussage über die Methylierungsdichte der einzelnen PBMC-Subpopulationen getroffen werden.

### **3.4. Isolierung von mononuklearen Zellen des peripheren Blutes**

Für die Isolierung der PBMCs aus Vollblut wurde ein Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer (Ficoll®) Dichtegradient benutzt. Diese Trägersubstanz ist bereits im CPT® (Cell Preparation Tube) -Vacutainer (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ, USA) enthalten und über eine Natriumcitrat-Lösung abgepuffert, um die Gerinnung des Blutes zu verhindern. Mithilfe einer Dichtegradientenzentrifugation werden nun die einzelnen Bestandteile des Vollblutes aufgetrennt. Hierbei sammeln sich Zellen mit einer Dichte, die höher als 1,077 g/ml ist, unterhalb des Ficoll®-Copolymers. Dazu gehören Erythrozyten, neutrophile sowie basophile Granulozyten. Auch tote Zellen und Zelldebris sammeln sich unterhalb des Ficoll® Gradienten. Lymphozyten und Monozyten, mit einer geringeren Dichte sammeln sich direkt oberhalb der Ficoll® Schicht. In der obersten Schicht reichern sich Thrombozyten und die restlichen Blutbestandteile, wie Elektrolyte, Hormone und Zytokine an. Für diesen Vorgang wurde die Blutprobe für 20 Minuten bei 800 g und 20 °C zentrifugiert. Die PBMC enthaltende Schicht wurde in ein 15 ml Falcon™ Tube (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA) überführt und dann zwei Mal durch Zugabe von jeweils 10 ml Phosphate Buffered Saline (PBS, Gibco; Carlsbad; CA; USA) bei 200 g und 4 °C zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt wird zukünftig als „Waschen“ bezeichnet. Er dient der Entfernung von überschüssigem Ficoll® und ungebundenen Antikörpern. Nun erfolgte eine Zählung der präparierten PBMCs mithilfe des Zellzählgeräts (Cellcounters; Thermo Fisher Scientific). Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl 0,4 % Tryptanblau-Lösung (Thermo Fisher Scientific) vorsichtig gemischt und automatisch in sogenannten ‚Cell Counting Chamber Slides‘ (Thermo Fisher Scientific) ausgezählt, um eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro 100 µl Reaktionsansatz herzustellen. Der Ansatz wurde in PBS/BSA/EDTA (PBS supplementiert mit 0,5 % Bovines Serum Albumin und 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure) aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Blockung der Fc-Rezeptoren durch Beriglobin (CSL Behring, Marburg,

Germany), um unspezifische Bindungen der Antikörper auf B-Zellen und Monozyten zu verhindern. Danach wurden die Zellen in zwei verschiedenen Antikörper-Panels mit Oberflächen-Markierungs-Antikörpern resuspendiert (Tabelle 2) und für 30 Minuten unter Lichtausschluss bei 4 °C inkubiert. Die optimale Verdünnung der Antikörper wurde während der Etablierung der Methodik durch Titrationen mit verschiedenen Verdünnungsansätzen ermittelt. Um ein Ausbleichen der mit den Antikörpern konjugierten Fluorochrome zu verhindern, erfolgte jede weitere Inkubation der Zellen im Dunkeln.

Nach erneutem zweimaligem Waschen zur Entfernung der überflüssigen Antikörper wurden die Zellen mit dem Invitrogen™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer (Thermo Fischer Scientific) für 40 Minuten inkubiert (bei 4 °C), wodurch eine Fixierung der PBMCs und eine Permeabilisierung des Zellkerns erfolgte. Das zweimalige Waschen der Zellen erfolgte dieses Mal in 10 ml des zugehörigen Permeabilisierungspuffers (Invitrogen™, Thermo Fischer Scientific). Die letzte Färbung der Zellen erfolgte mit einem im Verhältnis 1:100 (1 µl Antikörper auf 99 µl Permeabilisierungspuffer) verdünnten monoklonalen, FITC-konjugierten monoklonalen anti-5-Methylcytosin IgM Antikörper (Tabelle 2). Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurden die Zellen in PBS/BSA/EDTA aufgenommen und in 10 ml Rundbodenröhrchen (Becton-Dickinson) überführt. Danach erfolgt die sofortige Messung der Signalintensitäten mittels Durchflusszytometrie.

### **3.5. Immunfluoreszenzmikroskopie**

Für eine qualitative Einschätzung der angewendeten Methodik wurden U937 Zellen (CRL-1593.2; ATCC; Manassas; VA; USA) als Modellzelle benutzt und unter dem Immunfluoreszenzmikroskop (IFM, Bioevo BZ 9000 Keyence, Germany) betrachtet. Diese Nachweismethode beruht auf dem Prinzip der Lichtmikroskopie. Zusätzlich werden mit Antikörpern konjugierte fluoreszierende Farbstoffe zur Identifizierung spezifischer Zellstrukturen genutzt. Werden Fluorochrome durch Laser angeregt, absorbieren die Elektronen die Photonen und werden so auf ein höheres energetisches Level gebracht. Dies entspricht dem Absorptionsmaximum einer Fluoreszenz. Dieser Zustand kann jedoch nicht gehalten werden, da niedrigere Energielevel bevorzugt werden. Die Photonen werden nun mit höherer Wellenlänge wieder abgegeben. Das entspricht dem Emissionsmaximum. Diese Differenz zwischen Absorptionsmaximum und Emissionsmaximum wird als sogenannte ‚Stokes-Verschiebung‘ bezeichnet. Die im Immunfluoreszenz Mikroskop eingebauten Emissionsfilter sorgen dafür, dass nur Licht, welches die Wellenlänge des Emissionsmaximums besitzt über den Detektor erfasst werden kann.

Ein Reaktionsansatz von  $1 \times 10^6$  U937 Zellen, verdünnt in 100  $\mu$ l PBS, wurde nach Permeabilisierung mit dem verwendeten 5-Methylcytosin Antikörper, verdünnt im Verhältnis 1:75, markiert. Um eine Bindung des Antikörpers im Zellkern nachzuweisen, wurden die Zellen gleichzeitig mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 300 nM, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) im Verhältnis 1:1000 gefärbt, welcher in Adenin- und Thyminreichen Regionen innerhalb doppelsträngiger DNA interkaliert. Zu ca. 5-10 % werden auch Tertiärstrukturen in RNA Molekülen, die sich überwiegend im Cytoplasma befinden durch DAPI angefärbt. Im letzten Schritt wurden die markierten Zellen in 500  $\mu$ l PBS/BSA/EDTA resuspendiert, 200  $\mu$ l der Zellsuspension entnommen und mithilfe eines Cytospins Verfahrens auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern fixiert. Poly-L-Lysin erleichtert das Anheften der Zellen auf Glass- oder Plastikoberflächen. So wurde gewährleistet, dass eine definierte Menge an Zellen auf einer definierten Oberfläche aufgetragen wurde. Die optimale Gravitationskraft in g wurde in vorangegangenen Experimenten auf 260 g über fünf Minuten festgesetzt.

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI hat ein Absorptionsmaximum von 358 nm und ein Emissionsmaximum von 461 nm. Der 5-Methylcytosin Antikörper ist mit FITC konjugiert, welches ein Absorptionsmaximum von 495 nm und ein Emissionsmaximum von 519 nm besitzt. Mithilfe der verschiedenen Emissionsfilter wurden nun Bilder erzeugt, welche nur mit DAPI markierte Strukturen gezeigt haben und welche die nur mit dem 5-mC FITC markierten Antikörper generiert wurden. Für die Digitalisierung der entstandenen Bilder wurde die Software ProgRes Capture Pro (Jenoptik, Jena, Germany) verwendet. Anschließend wurden die Bilder übereinandergelegt und verglichen.

### **3.6. AMNIS ImageStream® Durchflusszytometrie**

Zusätzlich zur IFM wurde die Färbung der U937 Zellen in einem AMNIS ImageStream® (ImageStream®-X Mark-II; Luminex, Austin, TX, USA) untersucht. Die Fähigkeit der Durchflusszytometrie sehr große Zellmengen in kurzer Zeit zu analysieren und die hohe Bildauflösung der IFM werden hier kombiniert. Mithilfe dieser bildgebenden multiparametrischen Immunfluoreszenzanalyse können einzelne Zellen hinsichtlich ihrer Struktur und phänotypischen Eigenschaften beurteilt werden. In mehreren parallel durchgeführten Ansätzen wurden  $1 \times 10^6$  U937 Zellen isoliert mit CD13-Phycoerythrin (PE) und in Kombination nach Fixierung/Permeabilisierung mit DAPI und 5'-mC-FITC für 30 Minuten inkubiert. Zusätzlich wurde ein Ansatz, welcher nach Fixierung/Permeabilisierung nur mit

DAPI und 5'-mC-FITC inkubiert wurde, hergestellt. CD13 ist ein Oberflächenmarker, welcher auf premyeloischen U937 Zellen exprimiert wird.

Über die Software INSPIRE® (Luminex) erfolgte die Steuerung des AMNIS Imagestream® Geräts. die Auswertung der entstandenen Datenbilderreihen wurde mit der Software IDEAS® (Luminex) durchgeführt.

### **3.7. Nährstoffentzug und Inkubation der U937 Zellkultur mit 5-Azacytidin**

Ein weiter Ansatz zur Verifizierung der Methodik und der Spezifität des 5'-mC-FITC-Antikörpers wurde durchgeführt, indem Zellen der U937 Zellkultur über 72 Stunden ausgehungert wurde. Hierfür wurden die Zellen in RPMI-1640 Medium (Merck-Biochrome, Berlin, Germany) ohne den Zusatz von fetalem Kälber Serum (FCS, Merck-Biochrome) kultiviert. Dieser Zustand des Nährstoffentzugs führt zu einer Verlangsamung des Stoffwechsels, was eine stärkere Methylierungsdichte zur Folge hat (39). Zusätzlich wurde eine weitere U937 Zellkultur über 72 h mit 3 µM 5-Azacytidin (5-AzaC) inkubiert. Dieses synthetische Nukleosid hemmt die DNA-Methyltransferasen und wird bereits in der Therapie des Myelodysplastischen Syndroms oder der akuten myeloischen Leukämie verwendet (40). Eine weitere, unbehandelte Kultur in RPMI-1640 und einem 10 % Anteil von FCS wurde als Kontrolle angesetzt. Bei allen Kulturen wurden nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h die Methylierungsdichte mithilfe des anti-5-Methylcytosin Antikörpers durchflusszytometrisch gemessen. Alle Zellkulturansätze wurden zum Schutz vor Kontaminationen mit 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Merck-Biochrome, Berlin, Deutschland) kultiviert.

### **3.8. Durchflusszytometrie zum Nachweis der Methylierung in Blutzellen**

Um mit Antikörpern markierte Zellen quantitativ zu erfassen und hinsichtlich Streuung des Lichts und Signalintensität des Fluoreszenzfarbstoffes gegeneinander abzugrenzen wurde ein FACS-Canto-II Durchflusszytometer benutzt.

Vor jeder Messung erfolgten eine standardisierte Reinigung des Zytometers mit dafür vorgesehenen Reinigungs- und Spüllösungen, sowie eine Kontrolle des Ergebnisses mit destilliertem Wasser. Für eine Baseline Kalibrierung der Laser wurde vor jeder Messung ein „Cytometer Setup and Tracking“ (CST) mit CST-Beads durchgeführt. Verschiedene Parameter wurden hierbei evaluiert, um die Effizienz der Detektoren, die Zytometer Leistungsfähigkeit und die Funktionalität der Laser zu bewerten und dadurch eine hohe Qualität der Messungen

sicherzustellen. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte über das Programm BD FACSCanto™ Software (Beckton, Dickinson).

Um den störenden Einfluss von Zelldebris und Verunreinigungen mit z.B. Thrombozyten bei den Messungen auszuschließen, wurde ein minimaler Schwellenwert für das Detektieren von Zellpartikeln festgelegt. Die Anzahl der zu detektierenden Partikel wurde auf 50.000 festgelegt. Bei jeder Messung wurden als negative Vergleichsproben komplett unbehandelte Zellen und nur fixierte, aber unmarkierte Zellen mitgemessen. Die optimalen Werte für Laserintensitäten und Detektorspannungen wurden während der Probemessungen identifiziert und dann festgelegt. Um den Einfluss des Hintergrundsignals auszuschließen wurde ein Isotyp-Kontroll-Antikörper mitgeführt. Vor Beginn der Messungen wurden Titrierungen der einzelnen Antikörper durchgeführt, um eine optimale Signalintensität und auch die notwendige Spezifität zu gewährleisten.

Während der Messung passieren die Zellen mit den an Antikörpern gekoppelten Fluorochromen den Laser und emittieren nun Licht einer spezifischen Wellenlänge. Die eigentliche Messung der markierten Blutzellen erfolgt im Durchflussverfahren über Photomultiplier-Röhren (PMT). PMTs wandeln das Licht der Fluoreszenzen in unterschiedlich starke elektrische Impulse um. In den Plots und Histogrammen sind die gemessenen Impulse digitalisiert dargestellt und werden als "Signalintensitäten" angezeigt. Diese Messsignale können durch das Anlegen einer Spannung an die PMTs verstärkt werden. Um eine homogene Datenanalyse zu gewährleisten, wurden die gewählten Messparameter am Durchflusszytometer über den gesamten Zeitraum konstant gehalten.

### **3.9. Datenauswertung**

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mithilfe der Durchflusszytometrie-Analyse-Software FlowJo® (Treestar, Ashland, OR, USA).

Die Unterscheidung der Monozyten und Lymphozyten Blutzellpopulationen war bereits optisch durch eine Betrachtung der Zellen im Vorwärts – und Seitwärtsstreulicht möglich. Um die Zellen in einem optimalen Bereich dazustellen, wurden die Spannungen des Vorwärtsstreulichts auf 362 V und die des Seitwärtsstreulichtes auf 504 V festgelegt.

Absorptions- und Emissionsmaximum fallen oft breit aus, weswegen es teilweise zu Überlappungen von deren Spektren kommen kann. Zur Korrektur dieser Störfaktoren wurde

für jedes Antikörperpanel (Tabelle 1) eine Kompensationsmatrix erstellt. Hierbei wird der Signalanteil, der durch diese Signal-Überschneidung zustande kommt, manuell abgezogen.

Zur Darstellung der Graphen und für die statistische Auswertung wurden die Software SigmaPlot Version 14.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) sowie die Programmiersprache R (v.3.5.1, RStudio Version 1.1.456) genutzt.

### **3.10. Untersuchung der Genexpression durch Polymerase-Kettenreaktion**

Die RNA von 29 RA-Patienten und 12 gesunden Spendern wurde mithilfe des AllPrepR DNA/RNA/miRNA Universal Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) in einem Nanodrop™ 1000 Gerät quantifiziert (Thermo Fisher Scientific). Anschließend wurden 100ng RNA mit dem SuperScript-III cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) retranskribiert. Die Primer die für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) verwendet wurden, wurden mit der NCBI-Software Primer-Blast entworfen und bei TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) synthetisiert und bestellt. Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde in einem StepOnePlus™ Thermocycler (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt und 2,5 ng transkribierte cDNAs wurden in Duplikaten eingesetzt. Als Referenzgen wurde das Haushaltgen Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) verwendet. Das qPCR-Reaktionsprotokoll bestand aus einer 2-minütigen Denaturierungszeit bei 95 °C, gefolgt von 40 Zyklen über 15 Sekunden (s) Denaturierung bei 95 °C, einer 30 s-Annealingzeit zur Primerbindung bei 62 °C und einem 45 s-Extensionszeitschritt bei 68 °C unter Zusatz von SYBR-Green (Thermo Fisher Scientific).

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Korrelationen der Krankheitsaktivität mit der Höhe der Signalintensitäten des 5'-mC-FITC Antikörpers**

Zur Quantifizierung der linearen Abhängigkeit der durchflusszytometrisch gemessenen medianen 5'-mC-FITC-Signalintensität und des DAS28 wurde die Pearson Korrelation genutzt, mit welcher der Korrelations-Koeffizient  $r$  berechnet wird. Zusätzlich wurde zur Darstellung der linearen Regression der Determinationskoeffizient  $r^2$  bestimmt. Innerhalb der PBMC Blutzellen, wie auch in deren Hauptzellsubgruppen wurde eine negative lineare Korrelation zwischen den gemessenen Signalintensitäten und den individuellen DAS28/BSG Entzündungswerten nachgewiesen. Vor Therapiebeginn wurde eine Korrelation der 5'-mC-FITC-Signalintensität der globalen PBMCs ( $r=-0.551$ ;  $p=0.002$ ), der Lymphozyten ( $r=-0.566$ ,  $p=0.001$ ), sowie deren Blutzell-Subtypen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ( $r=-0.568$ ;  $p=0.001$ ) und CD8<sup>+</sup>-T-

Zellen ( $r=-0.537$ ;  $p=0.001$ ) mit dem DAS28/BSG festgestellt. Auch die 5' mC-FITC-Signalintensität der CD19<sup>+</sup> B-Zellen ( $r=-0.519$ ;  $p=0.004$ ) und der CD14<sup>+</sup> Monozyten ( $r=-0.485$ ,  $p=0.008$ ) korrelierten gut mit den DAS28/BSG Werten (1).

#### **4.2. Methylierungsniveau nach dreimonatiger Therapie**

Nach dreimonatiger Therapie erschienen 16 Patienten zum Wiedervorstellung. Das Therapieansprechen wurde nach den EULAR-Kriterien ausgewertet. 50% der Patienten zeigten ein gutes oder mäßiges Ansprechen und 50% der Patienten wurden als Non-Responder eingestuft. Die mittlere DAS28/BSG zu Beginn der Behandlung ( $5,1 \pm 1,4$  SD) sank nach drei Monaten Behandlung auf  $3,8 \pm 1,3$  und der DAS28/CRP sank von  $4,5 \pm 1,4$  SD auf  $3,4 \pm 1,4$  (1).

Auch nach dreimonatiger Therapie zeigte sich eine entsprechende negative Korrelation mit den individuellen DAS28/BSG Werten in PBMCs ( $r=-0.582$ ;  $p=0.009$ ), Lymphozyten ( $r=-0.635$ ;  $p=0.003$ ) und deren Subtypen der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ( $r=-0.474$ ;  $p=0.040$ ) und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ( $r=-0.449$ ;  $p=0.054$ ). Die niedrigsten Korrelationen wurden in CD19<sup>+</sup> B-Zellen ( $r=-0.349$ ;  $p=0.170$ ) und in CD14<sup>+</sup> Monozyten ( $r=-0.323$ ,  $p=0.192$ ) bestimmt. Im Vergleich zum DAS28/BSG wurden für den DAS28/CRP insgesamt niedrigere Korrelationen festgestellt. Alle statistischen Korrelations- und linearen Regressionswerte sind in Tabelle 1 aufgeführt (1).

### Korrelationen der anti-5'-mC-FITC Signalintensitäten mit dem DAS28

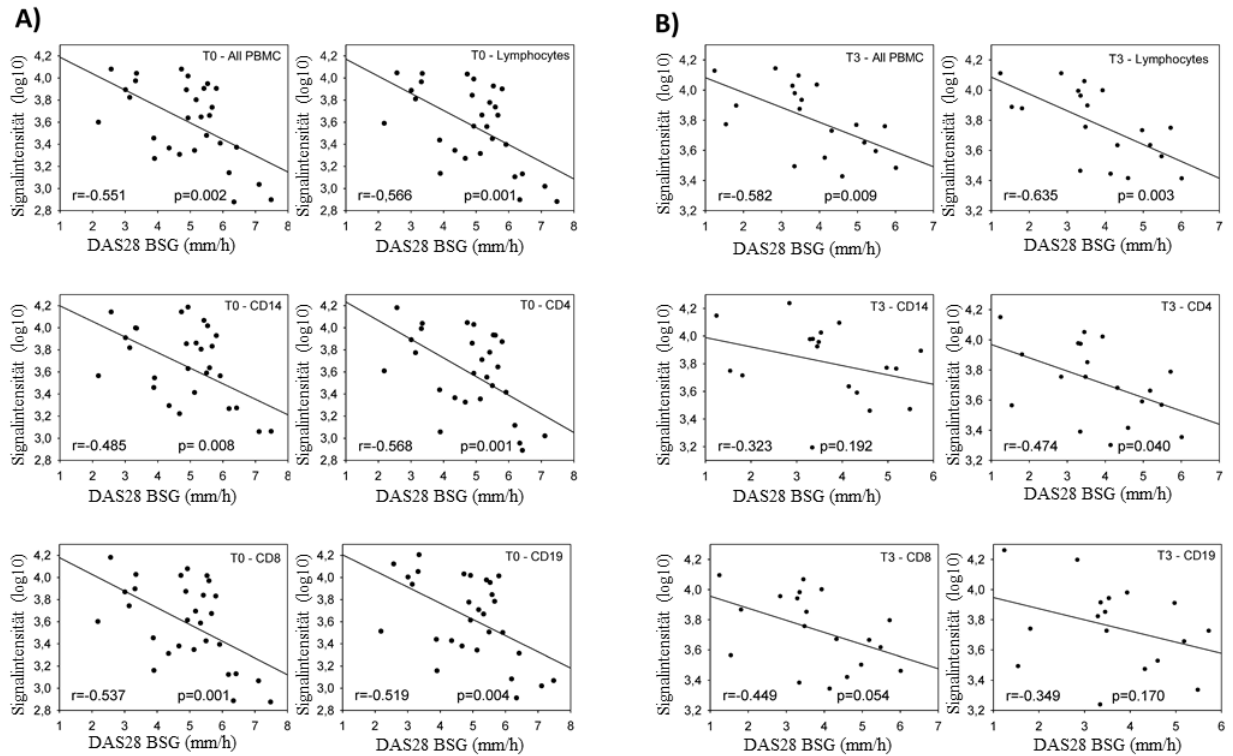


Abbildung 1: Korrelationen der anti-5'-mC-FITC Signalintensität mit dem DAS28 vor (A) und nach dreimonatiger Therapie (B). Die Grafik wurde mit Erlaubnis von Rheumatology verwendet und adaptiert (Paper-ID: RHE-20-1053.R1) (1).

Baseline (T0)	Pearson Korrelation	Determinierungskoeffizient	t-Test
DAS28-BSG (mm/h)	r	r <sup>2</sup>	p
Globale PBMCs	-0.551	0.303	0.002
Lymphozyten	-0.566	0.321	0.001
CD4 <sup>+</sup>	-0.568	0.323	0.001
CD8 <sup>+</sup>	-0.537	0.288	0.003
CD19 <sup>+</sup>	-0.519	0.269	0.004
CD14 <sup>+</sup>	-0.485	0.235	0.008
<b>DAS28-CRP</b>			
Globale PBMC's	-0.383	0.147	0.044
Lymphozyten	-0.398	0.158	0.036
CD4 <sup>+</sup>	-0.384	0.148	0.044



CD8 <sup>+</sup>	-0.352	0.124	0.066
CD19 <sup>+</sup>	-0.366	0.134	0.055
CD14 <sup>+</sup>	-0.321	0.103	0.096
<b>3 Monate (T3)</b>			
<b>DAS28-BSG (mm/h)</b>	<b>r</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>p</b>
Globale PBMCs	-0.582	0.338	0.009
Lymphozyten	-0.635	0.403	0.003
CD4 <sup>+</sup>	-0.474	0.225	0.040
CD8 <sup>+</sup>	-0.449	0.202	0.054
CD19 <sup>+</sup>	-0.349	0.122	0.170
CD14 <sup>+</sup>	-0.323	0.104	0.192
<b>DAS28-CRP</b>			
Globale PBMC's	-0.437	0.191	0.061
Lymphozyten	-0.471	0.222	0.042
CD4 <sup>+</sup>	-0.261	0.068	0.281
CD8 <sup>+</sup>	-0.252	0.063	0.298
CD19 <sup>+</sup>	-0.181	0.033	0.487
CD14 <sup>+</sup>	-0.151	0.023	0.551

*Tabelle 1:* Korrelationskoeffizienten (r) und Determinierungskoeffizienten der linearen Korrelation (r<sup>2</sup>) von DAS28-BSG und DAS28-CRP zu Studienbeginn (Baseline; T0) und nach drei Monaten Behandlung (T3) mit den Signalintensitäten aller RA-Patienten (n=29). Die Tabelle wurde mit Erlaubnis von Rheumatology verwendet und adaptiert (Paper-ID: RHE-20-1053.R1) (1).

#### **4.3. Vergleich der FITC-Signalintensitäten von Patienten zu Therapiebeginn mit Normalspendern und nach dreimonatiger Behandlung**

Im Vergleich zu Patienten mit aktiver RA, ist das Niveau der medianen globalen 5'mC-FITC-Signalintensität der Normalspender in den globalen PBMCs, sowie in allen Subtypen erhöht. Eine verstärkte Methylierung wurden bei CD14<sup>+</sup>-Zellen (p=0,005), Lymphozyten (p=0,030), bei deren Blutzell-Subtypen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (p=0,006) und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (p=0,010), Monozyten (p=0,005) und CD19<sup>+</sup>-B-Zellen (p=0,053) gefunden. Auch nach dreimonatiger Behandlung zeigte sich eine signifikante Hypermethylierung sowohl in PBMCs als auch in

Lymphozyten ( $p < 0,05$ ). Bei  $CD4^+$ -T-Zellen,  $CD8^+$ -T-Zellen, Monozyten und  $CD19^+$ -B-Zellen wurden ein tendenzieller Anstieg der 5'-mC-FITC-Signalintensität ( $p > 0,05$ ) festgestellt, der jedoch nicht das Signifikanzniveau erreichte (Abbildung 3B) (1).

#### **4.4. Expression von Gentranskripten, die bei der Methylierung der DNA von Bedeutung sind**

Die Expression der an Methylierungsprozessen beteiligten Gene BHMT, DNMT1, DNMT3B, MTR und MTHFR wurden mittels quantitativer Polymerase Kettenreaktion (qPCR) in Patienten ( $n=29$ ) und Normal Spendern ( $n=12$ ) untersucht, da diese an für die Methylierung wesentlichen Prozessen beteiligt sind. Die Patientenproben zeigten niedrigere Genexpressionen als die der Normal Spender. Die in den FACS-Analysen erhaltenen 5'-mC-Signalintensitäten korrelierten gut mit dem relativen Expressionsgrad der Gene DNMT1 ( $r=0,57$ ), DNMT3b ( $r=0,51$ ), MTR ( $r=0,46$ ) und MTHFR ( $r=0,39$ ). Die Genexpression von BHMT1 war in den PBMCs über qPCR selbst nach 38 PCR-Zyklen nur äußerst grenzwertig nachzuweisen (1). Im Gegensatz zu PBMCs wird das Gen BHMT1 nur in Thrombozyten exprimiert (siehe: <https://genecards.weizmann.ac.il/v3/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BHMT>). BHMT1 wurde aus diesem Grund auch als Negativkontrolle verwendet. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die über Ficoll<sup>®</sup> Dichtegradienten-Zentrifugation angereicherten PBMCs keine Verunreinigung mit Thrombozyten zeigten.

#### **4.5. Veränderungen der Zellfrequenzen nach dreimonatiger Therapie**

Monozyten, T- und B-Zell-Subtypen wurden auf Veränderungen der relativen Häufigkeiten untersucht. Hier fanden sich nur marginale, nicht signifikante Veränderungen in allen Zellpopulationen (1). Da die Häufigkeit der einzelnen PBMC-Subpopulationen individuell stark variiert, waren diese Ergebnisse zu erwarten.

#### **4.6. Überprüfung der Spezifität der Methodik mittel Immunfluoreszenzmikroskopie, AMNIS Imagestream<sup>®</sup> und Zellkulturen**

Beim Übereinanderlegen der mit DAPI und anti-5'-mC-FITC gefärbten U937 Zellen unter dem IFM zeigte sich eine Kongruenz der nukleären DNA (1). DAPI färbt in geringerem Maße RNA im Zytoplasma (41), aus diesem Grund ist der durch DAPI gefärbte Bereich etwas größer als der von 5'-mC-FITC.

### Immunfluoreszenzmikroskopie von U937 Zellen

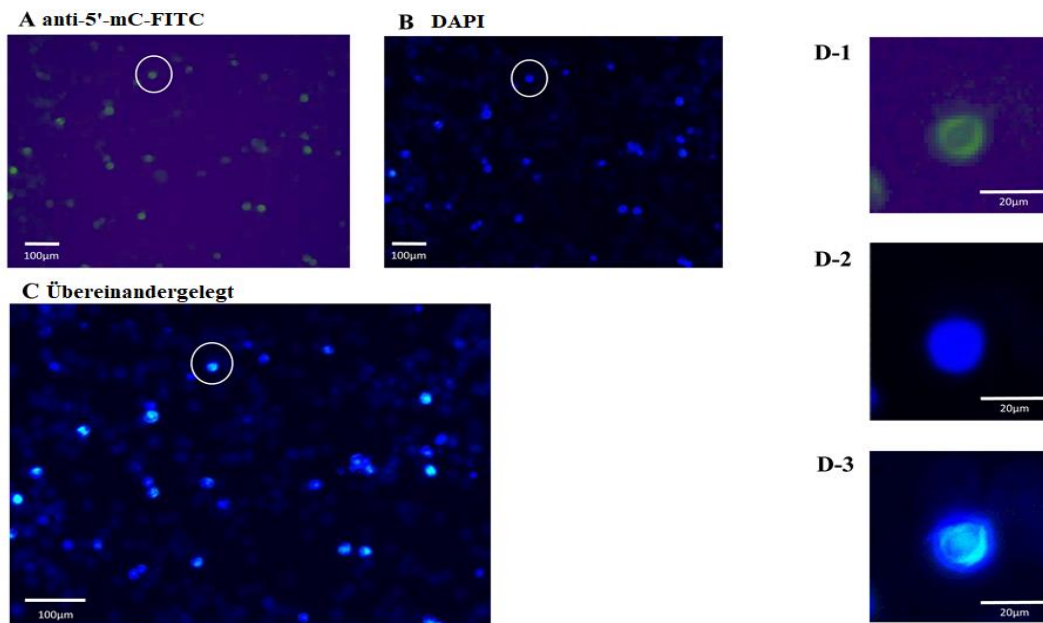


Abbildung 2: Immunfluoreszenzmikroskopie der U937-Zelllinie. A: Intranukleäre Färbung mit dem anti-5'-mC-FITC-Antikörper. B: DAPI Färbung. C: Überlagerung beider Bildausschnitte. Die weiß umrandete Zelle wurde noch einmal mit FITC, DAPI und übereinandergelegten Bildern vergrößert dargestellt (D-1, D-2, D-3). Die Grafik wurde mit Erlaubnis von Rheumatology verwendet und adaptiert (Paper-ID: RHE-20-1053.R1) (1).

Bei der Auswertung der AMNIS Imagestream® konnte man ähnlich den Ergebnissen der IFM eine Kongruenz der Kernfärbungen mit anti-5'-mC-FITC und DAPI erkennen, sowie zusätzlich eine Färbung der Plasmamembran mit dem monoklonalen anti-CD13-PE-Antikörper (1).

### AMNIS Imagestream®

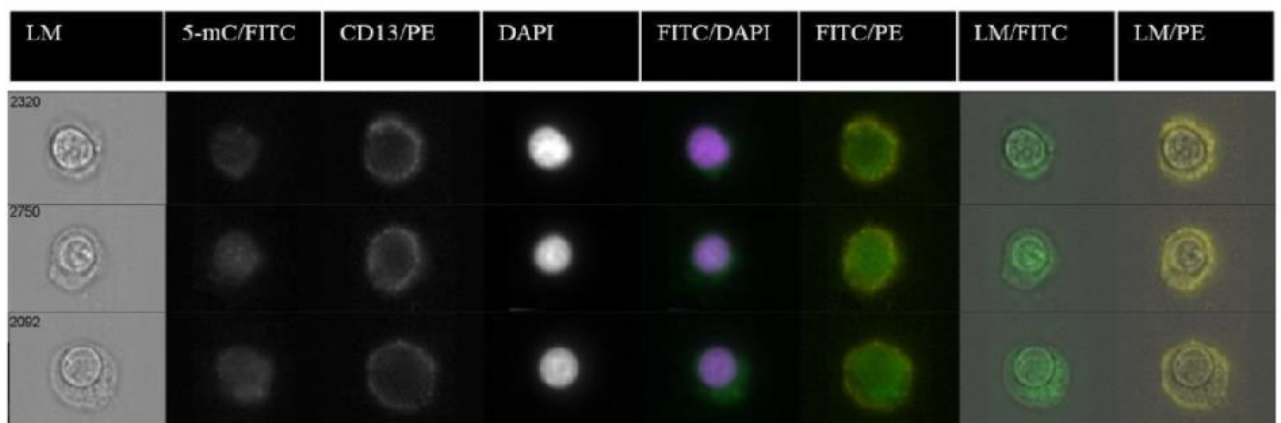


Abbildung 3: Analyse und übereinandergelegte Bilder der Zellen mittels AMNIS Imagestream®. Lichtmikroskopie= LM. Die Grafik wurde mit Erlaubnis von Rheumatology verwendet und adaptiert (Paper-ID: RHE-20-1053.R1) (1).

Nach 72 Std. zeigten sich bei der Ermittlung der Methylierungsdichte erhöhte 5'-mC-FITC-Signalintensitäten bei den ausgehungerten Zellen im Vergleich zu den mit regulärem 10 % FCS supplementierten Zellkulturmedium. Die U937-Zellen, die mit 3  $\mu$ M 5-AzaC behandelt wurden, zeigten nach 72 Std. eine Abnahme der mittleren 5'-mC-FITC-Signalintensität (1).

## **5. Diskussion**

Die durchgeführte Studie liefert vielversprechende Daten und zeigt, dass eine verminderte DNA-Methylierung mit einer verstärkten Krankheitsaktivität bei Patienten mit RA assoziiert ist. Im Vergleich zu gesunden Blutspendern wurden signifikant niedrigere 5'-mC-FITC-Signalintensitäten bei Patienten mit RA gemessen (1). Die Quantifizierung des Methylierungsniveaus der DNA könnte somit ein potenzieller Biomarker für die Therapiekontrolle von RA-Patienten darstellen und die Aktivitätseinschätzung ergänzen.

### **5.1. Durchflusszytometrie als Messinstrument für Methylierung**

Bisher wurde zum Nachweis von DNA-Methylierung zumeist die Bisulfit-Sequenzierung genutzt, welche es sich zu Nutzen macht, dass nur unmethyliertes Cytosin mit Natriumhydrogensulfit zu Uracil konvertiert wird. Nachteilig ist, dass diese Methodik nicht zwischen 5-Methylcytosin und 5-Hydroxymethylcytosin unterscheiden kann, es teilweise zu inkompletten Konversionen des unmethylierten Cytosins kommt und dass die DNA nach der Umwandlung zu bis zu 90% abgebaut wird (42). Zu diesen Problemen kommt es bei der Fluoreszenz-aktivierten Durchflusszytometrie nicht. Hier erweist es sich eher als nachteilig, dass man durch Überschneidung der Emissionsspektren ein teilweise verzerrtes Ergebnis erhält, welches kompensiert werden muss. Dieser Nachteil wird Beispielsweise bei der Flugzeitmassenspektrometrie durch die Nutzung von Lanthanoiden anstelle von Fluorochromen verhindert. Weiterhin werden für die fachgerechte Bedienung eines Durchflusszytometers spezialisierte Mitarbeiter benötigt. Der große Vorteil der Durchflusszytometrie besteht darin, präzise, multiparametrische und schnelle Analysen innerhalb der komplexen Blutzellzusammensetzung auf Ebene der Sub-Zellpopulationen zu untersuchen. Diese Eigenschaften sind insbesondere für die weitere Erforschung unbekannter Immunzell-Zusammenhänge von sehr großer Bedeutung. Ein genauerer Überblick über weitere bisher verwendete Methoden zur Messung der Methylierungsstärke, inklusive deren Vor- und Nachteile, ist in der Publikation von Kurdyukov et al. beschrieben (38).

Vor Durchführung der Studie wurde die beschriebene Methodik erfolgreich etabliert und hinsichtlich Qualität und Reproduzierbarkeit überprüft. Die Spezifität der 5-mC-Antikörperbindung wurde durch IFM- und AMNIS<sup>®</sup> Imagestream Experimente nachgewiesen und durchflusszytometrisch mit 5-AzaC-behandelten Zellen und FCS-behandelten U937-Zellen bestätigt (1). Während 5-AzaC eine Inhibition der DNA-Methylasen DNMT1 und DNMT3b initiiert und dadurch eine DNA-Hypomethylierung mit intra-S-Phasen-Stopp der DNA-Replikation induziert (43), führt ein Nährstoffentzug zu einem G0-Zellzyklus-Stopp, einem langsameren Zellmetabolismus und einer Erhöhung der DNA-Methylierung (39, 44).

## **5.2. Analyse der PBMC-Subpopulationen und Transkriptionsniveaus von Katalysatoren der Methylierung**

Die stärksten Korrelationen der FITC-Signalintensität mit dem DAS28 wurde in Lymphozyten und deren Subgruppen CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und in B-Zellen gefunden (1). Die während ansteigender Krankheitsaktivität verstärkte Immunantwort dieser Zelltypen impliziert eine umfangreiche genetische Aktivität der B- und T-Zellen in Form von z.B. Differenzierung und Proliferation und wird durch ein komplexes, epigenetisches Regulierungsprogramm gesteuert (45). Bisher wurden meist spezifische Genloci untersucht, um dieses System zu erforschen. Beispielsweise wurde eine Demethylierung des IFN- $\gamma$ -Gens beim Übergang von naiven- zu Memory-T-Zellen nachgewiesen (46) oder eine Promoter-Demethylierung des IL-6 Gens in Patienten mit aktiver RA (47). Beide dieser Zytokine sind mit pro-inflammatorischen Signalwegen assoziiert. Interessanterweise zeigten T-Zellen durch einen sensitiveren T-Zell-Rezeptor Signalweg (48) eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Antigenen in entzündlichem Milieu (49). Nachdem die Infektion abgeklungen war, konnte eine Abnahme dieser Veränderung beobachtet werden. Diese Ergebnisse implizieren ein streng kontrolliertes, aber auch reversibles System. Monozyten zeigten den niedrigsten Korrelationskoeffizienten, was mit einer geringeren Differenzierungs- und Proliferationsrate im Vergleich zu B- und T-Zellen zusammenhängen könnte (45, 50). Weiterhin gibt es Hinweise, dass Monozyten von RA-Patienten eine Linksverschiebung der Ziellinie mit reduzierter Differenzierung zu CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>-Monozyten aufweisen (51).

Trotz unterschiedlicher Anamnesen und Prämedikationen konnte in dieser Studie eine Assoziation zwischen dem DAS28 und dem Methylierungsniveau von PBMCs und deren Blutzell-Subtypen hergestellt werden (1). Ein nächster Schritt wäre nun die Durchführung unserer Methodik in spezifischeren Subgruppen, wie z.B. auf Ebene der Memory T-Zellen, um eine sensitivere Messung zu gewährleisten. In Studien wie z.B. von Durek et al. wurde eine

fortschreitende Demethylierung beim Differenzierungsprozess von Naïven- zu Memory-T-Zellen beobachtet (50). Spezielle Untersuchungen dieser Einzelzellpopulationen würden die Störung innerhalb des angeborenen und adaptiven Immunsystems tiefergreifend beleuchten.

Auch die relativen Transkriptionslevel der Gene BHMT, DNMT1, DNMT3b, MTR und MTHFR waren im Vergleich zu gesunden Spendern bei RA-Patienten erniedrigt (1), was mit vorangegangenen Studienergebnissen einhergeht (35). Weiterhin korrelierte auch die globale mediane Signalintensität des anti-5'-mC-FITC Antikörpers mit der relativen Genexpression (1). Dieses Ergebnis unterstreicht die Hypothese der Hypomethylierung in aktiven bzw. aktivierten Blutzelltypen.

### **5.3. Diagnostisches und therapeutisches Potential der DNA-Methylierung**

Die Variabilität der Proben, welche durch individuelle Methylierungsmuster bedingt ist, stellt eine große Hürde für die Nutzbarkeit der Methylierung als Biomarker dar. Auch ist Methylierung im Vergleich zu transkriptionellen und translationalen Vorgängen ein eher langfristiger Prozess. Weiterhin erhöht sich nachweislich die Methylierungsdichte im fortgeschrittenen Alter, was berücksichtigt werden müsste (52). Interessanterweise gibt es jedoch bereits einen etablierten Methylierungs-Biomarker: MGMT-Promotermethylierung wird in der Klinik bereits erfolgreich als Marker für das Ansprechen auf Temozolomid bei Patienten mit Glioblastom genutzt (53). Ein wesentlicher Schritt in Richtung personalisierte Medizin ist das Identifizieren von spezifischen Genen, welche den Beginn und den Progress der RA begünstigen. Das Muster dieser Gensegmente zu entschlüsseln ist Gegenstand aktueller Forschung. Dazu gehört auch, dass antiinflammatorische Gene durch deren Hypermethylierung zum Krankheitsverlauf beitragen könnten. Zusätzlich zu den hypomethylierten Gensegmenten wurde auch diverse hypermethylierte Gene bei RA-Patienten gefunden (54, 55). Beispielsweise ist die IL-10 Promoterregion in RA-Patienten hypermethyliert (56). IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin, welches hauptsächlich von regulatorischen T-Zellen und Monozyten produziert wird. Eine spezifische Demethylierung, mithilfe von z.B. DNMT-Inhibitoren, der IL-10 Promoterregion könnte also möglicherweise die Krankheitsaktivität der RA beeinflussen. Bisher wurden diverse DNMT-Inhibitoren als Behandlungsmöglichkeit für Malignome in Studien getestet (57). Da 5-Azacytidin eine toxische Wirkung auf Zellen hat (58), wurden z.B. RG108 und SGI-1027 als neue, weniger nebenwirkungsreiche Alternativen untersucht (59, 60). Dies sind synthetisch hergestellte, nicht-nukleosidische DNMT-Inhibitoren, welche ohne selbst in die DNA integriert zu werden wirken, was auch eine eventuelle Instabilität der DNA verhindert. Ein weiterer eventueller Ansatz für therapeutische

Interventionen ist z.B. die Nutzung von S-adenosylmethionin (SAM) als Spender der Methylgruppe beim Prozess der Methylierung. In den synovialen Fibroblasten von RA-Patienten wurde neben einer erniedrigten Menge an DNMT1 auch ein erniedrigtes SAM-Level gemessen. Eine Supplementierung von SAM führt jedoch wiederum zu einem Anstieg der DNMT1 (61). Die systematische Erforschung der Mechanismen und Folgen epigenetischer Veränderungen wie Methylierung, aber auch Acetylierung und/oder anderer Strategien zur Beeinflussung des Genoms ist entscheidend für die personalisierte Therapie dieser entzündlichen Systemerkrankungen.

## **6. Limitationen**

Die durchgeführte Studie wurde mit einer begrenzten Patientenzahl durchgeführt, die im Rahmen der Studie von der Ethikkommission genehmigt wurde. Auf Grund der vielversprechenden Ergebnisse empfehlen sich weitere zukünftige Studien mit größeren und vielseitigeren Kohorten. Weiterhin wurden in dieser Studie nur die Haupt-Blutzellsubtypen der PBMCs untersucht. Tiefergehende Untersuchungen, wie z.B. von Naïven- oder Effektor T-Zellen, B-Zellen, klassischen-, intermediären und nicht-klassischen Monozyten, dendritischen Zellen oder auch natürlichen Killerzellen sind geplant und sollen weitere wertvolle Erkenntnisse liefern und zum tieferen Verständnis des Epigenoms beitragen. Möglicherweise bestehen zudem Interaktionen der unterschiedlichen Begleiterkrankungen, Ko-Medikationen und Wechselwirkungen von Umweltfaktoren, die zu Änderungen der DNA-Methylierung beitragen. Deswegen ist eine individuelle Betrachtung des Methylierungsniveaus, auch im Verlauf der Erkrankung und der Behandlung, von sehr großer Bedeutung.

## **7. Ausblick**

Um die Bedeutung des Epigenoms zu entschlüsseln sind große Datensätze erforderlich, welche statistische Auswertungen von individuellen Mustern ermöglichen. Es ist schwer vorstellbar, dass aufgrund der Heterogenität der RA und der unterschiedlichen Medikationen mit einer jeweils unterschiedlichen pharmakologischen Wirkung, ein einzelner Biomarker präzise Entscheidungen garantiert. Ein System, bestehend aus demographischen Daten, familiärer Anamnese, einem Biomarker-Panel und der individuellen Vorgeschichte könnten die Grundlage personalisierter Medizin bilden. Diese Vorgehensweise wird Nebenwirkungen und Unverträglichkeiten reduzieren, dem Arzt bei der Entscheidungsfindung zur optimalen Therapie verhelfen und somit wirtschaftliche Vorteile durch eine effektivere Therapie erzielen.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Liebold I, Grutzkau A, Gockeritz A, Gerl V, Lindquist R, Feist E, Zanker M, Haupl T, Poddubnyy D, Zernicke J, Smiljanovic B, Alexander T, Burmester GR, Gay S, Stuhlmüller B. Peripheral blood mononuclear cells are hypomethylated in active rheumatoid arthritis and methylation correlates with disease activity. *Rheumatology (Oxford)*. 2021;60(4):1984-95.
2. Carmona L, Villaverde V, Hernandez-Garcia C, Ballina J, Gabriel R, Laffon A, Group ES. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. *Rheumatology (Oxford)*. 2002;41(1):88-95.
3. Deane KD, Demoruelle MK, Kelmenson LB, Kuhn KA, Norris JM, Holers VM. Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2017;31(1):3-18.
4. Grygielska J, Raciborski F, Klak A, Owoc J. The impact of nutrition and generally available products such as nicotine and alcohol on rheumatoid arthritis - review of the literature. *Reumatologia*. 2018;56(2):121-7.
5. El-Awar N, Jucaud V, Nguyen A. HLA Epitopes: The Targets of Monoclonal and Alloantibodies Defined. *J Immunol Res*. 2017;2017:3406230.
6. Smiljanovic B, Grutzkau A, Sorensen T, Grun JR, Vogl T, Bonin M, Schendel P, Stuhlmüller B, Claussnitzer A, Hermann S, Ohrndorf S, Aupperle K, Backhaus M, Radbruch A, Burmester GR, Haupl T. Synovial tissue transcriptomes of long-standing rheumatoid arthritis are dominated by activated macrophages that reflect microbial stimulation. *Sci Rep*. 2020;10(1):7907.
7. Brondello JM, Djouad F, Jorgensen C. Where to Stand with Stromal Cells and Chronic Synovitis in Rheumatoid Arthritis? *Cells*. 2019;8(10).
8. Neumann E, Lefevre S, Zimmermann B, Gay S, Müller-Ladner U. Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts. *Trends Mol Med*. 2010;16(10):458-68.
9. Klein K, Gay RE, Gay S. [Synovial fibroblasts : Main players in rheumatoid arthritis]. *Z Rheumatol*. 2016;75(6):560-4.
10. Burmester GR, Stuhlmüller B, Keyszer G, Kinne RW. Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum*. 1997;40(1):5-18.
11. Karouzakis E, Gay RE, Michel BA, Gay S, Neidhart M. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2009;60(12):3613-22.
12. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Menard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010;62(9):2569-81.
13. van Riel PL, Renskers L. The Disease Activity Score (DAS) and the Disease Activity Score using 28 joint counts (DAS28) in the management of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2016;34(5 Suppl 101):S40-S4.
14. Al-Salama ZT, Scott LJ. Baricitinib: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs*. 2018;78(7):761-72.
15. Fleischmann R, Kremer J, Cush J, Schulze-Koops H, Connell CA, Bradley JD, Gruben D, Wallenstein GV, Zwillich SH, Kanik KS, Investigators OS. Placebo-controlled trial of tofacitinib monotherapy in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2012;367(6):495-507.
16. Gabay C, Emery P, van Vollenhoven R, Dikranian A, Alten R, Pavelka K, Klearman M, Musselman D, Agarwal S, Green J, Kavanaugh A, Investigators AS. Tocilizumab monotherapy versus adalimumab monotherapy for treatment of rheumatoid arthritis (ADACTA): a randomised, double-blind, controlled phase 4 trial. *Lancet*. 2013;381(9877):1541-50.
17. Bogdanovic O, Lister R. DNA methylation and the preservation of cell identity. *Curr Opin Genet Dev*. 2017;46:9-14.



18. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer*. 2011;2(6):607-17.
19. Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, Ollier WE. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol*. 1993;32(10):903-7.
20. Breiling A, Lyko F. Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. *Epigenetics Chromatin*. 2015;8:24.
21. Hotchkiss RD. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem*. 1948;175(1):315-32.
22. Maunakea AK, Chepelev I, Cui K, Zhao K. Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition. *Cell Res*. 2013;23(11):1256-69.
23. Kishikawa S, Murata T, Kimura H, Shiota K, Yokoyama KK. Regulation of transcription of the Dnmt1 gene by Sp1 and Sp3 zinc finger proteins. *Eur J Biochem*. 2002;269(12):2961-70.
24. Huang CZ, Yu T, Chen QK. DNA Methylation Dynamics During Differentiation, Proliferation, and Tumorigenesis in the Intestinal Tract. *Stem Cells Dev*. 2015;24(23):2733-9.
25. Shao X, Hudson M, Colmegna I, Greenwood CMT, Fritzler MJ, Awadalla P, Pastinen T, Bernatsky S. Rheumatoid arthritis-relevant DNA methylation changes identified in ACPA-positive asymptomatic individuals using methylome capture sequencing. *Clin Epigenetics*. 2019;11(1):110.
26. Habib M, Fares F, Bourgeois CA, Bella C, Bernardino J, Hernandez-Blazquez F, de Capoa A, Niveleau A. DNA global hypomethylation in EBV-transformed interphase nuclei. *Exp Cell Res*. 1999;249(1):46-53.
27. Celik-Uzuner S, Li Y, Peters L, O'Neill C. Measurement of global DNA methylation levels by flow cytometry in mouse fibroblasts. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2017;53(1):1-6.
28. Combe B, Landewe R, Daien CI, Hua C, Aletaha D, Alvaro-Gracia JM, Bakkers M, Brodin N, Burmester GR, Codreanu C, Conway R, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Fonseca J, Raza K, Silva-Fernandez L, Smolen JS, Skingle D, Szekanecz Z, Kvien TK, van der Helm-van Mil A, van Vollenhoven R. 2016 update of the EULAR recommendations for the management of early arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(6):948-59.
29. Stuhlmuller B, Haupl T, Hernandez MM, Grutzkau A, Kuban RJ, Tandon N, Voss JW, Salfeld J, Kinne RW, Burmester GR. CD11c as a transcriptional biomarker to predict response to anti-TNF monotherapy with adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacol Ther*. 2010;87(3):311-21.
30. Stuhlmuller B, Mans K, Tandon N, Bonin MO, Smiljanovic B, Sorensen TA, Schendel P, Martus P, Listing J, Detert J, Backhaus M, Neumann T, Winchester RJ, Burmester GR, Haupl T. Genomic stratification by expression of HLA-DRB4 alleles identifies differential innate and adaptive immune transcriptional patterns - A strategy to detect predictors of methotrexate response in early rheumatoid arthritis. *Clin Immunol*. 2016;171:50-61.
31. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, Saigo K, Morinobu A, Koshiba M, Kuntz KM, Kamae I, Kumagai S. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med*. 2007;146(11):797-808.
32. Guo S, Xu L, Chang C, Zhang R, Jin Y, He D. Epigenetic Regulation Mediated by Methylation in the Pathogenesis and Precision Medicine of Rheumatoid Arthritis. *Front Genet*. 2020;11:811.
33. Mok A, Rhead B, Hologue C, Shao X, Quach HL, Quach D, Sinclair E, Graf J, Imboden J, Link T, Harrison R, Chernitskiy V, Barcellos LF, Criswell LA. Hypomethylation of CYP2E1 and DUSP22 Promoters Associated With Disease Activity and Erosive Disease Among Rheumatoid Arthritis Patients. *Arthritis Rheumatol*. 2018;70(4):528-36.
34. de Andres MC, Perez-Pampin E, Calaza M, Santaclara FJ, Ortea I, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Assessment of global DNA methylation in peripheral blood cell subpopulations of early rheumatoid arthritis before and after methotrexate. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:233.

35. Glossop JR, Nixon NB, Emes RD, Sim J, Packham JC, Matthey DL, Farrell WE, Fryer AA. DNA methylation at diagnosis is associated with response to disease-modifying drugs in early rheumatoid arthritis. *Epigenomics*. 2017;9(4):419-28.
36. Plant D, Webster A, Nair N, Oliver J, Smith SL, Eyre S, Hyrich KL, Wilson AG, Morgan AW, Isaacs JD, Worthington J, Barton A. Differential Methylation as a Biomarker of Response to Etanercept in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(6):1353-60.
37. Levenson VV. DNA methylation as a universal biomarker. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010;10(4):481-8.
38. Kurdyukov S, Bullock M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology (Basel)*. 2016;5(1).
39. Jones KL, Tarochione-Utt KD. DNA methylation in bovine adult and fetal fibroblast cells. *Cloning Stem Cells*. 2004;6(3):259-66.
40. Estey EH. Epigenetics in clinical practice: the examples of azacitidine and decitabine in myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2013;27(9):1803-12.
41. Kapuscinski J. Interactions of nucleic acids with fluorescent dyes: spectral properties of condensed complexes. *J Histochem Cytochem*. 1990;38(9):1323-9.
42. Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(13):E65-5.
43. Milutinovic S, Zhuang Q, Niveleau A, Szyf M. Epigenomic stress response. Knockdown of DNA methyltransferase 1 triggers an intra-S-phase arrest of DNA replication and induction of stress response genes. *J Biol Chem*. 2003;278(17):14985-95.
44. Cooper S. Reappraisal of serum starvation, the restriction point, G<sub>0</sub>, and G<sub>1</sub> phase arrest points. *FASEB J*. 2003;17(3):333-40.
45. Moro-Garcia MA, Mayo JC, Sainz RM, Alonso-Arias R. Influence of Inflammation in the Process of T Lymphocyte Differentiation: Proliferative, Metabolic, and Oxidative Changes. *Front Immunol*. 2018;9:339.
46. Kersh EN, Fitzpatrick DR, Murali-Krishna K, Shires J, Speck SH, Boss JM, Ahmed R. Rapid demethylation of the IFN-gamma gene occurs in memory but not naive CD8 T cells. *J Immunol*. 2006;176(7):4083-93.
47. Ishida K, Kobayashi T, Ito S, Komatsu Y, Yokoyama T, Okada M, Abe A, Murasawa A, Yoshie H. Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2012;83(7):917-25.
48. Richer MJ, Nolz JC, Harty JT. Pathogen-specific inflammatory milieu tune the antigen sensitivity of CD8(+) T cells by enhancing T cell receptor signaling. *Immunity*. 2013;38(1):140-52.
49. Slifka MK, Whitton JL. Functional avidity maturation of CD8(+) T cells without selection of higher affinity TCR. *Nat Immunol*. 2001;2(8):711-7.
50. Durek P, Nordstrom K, Gasparoni G, Salhab A, Kressler C, de Almeida M, Bassler K, Ulas T, Schmidt F, Xiong J, Glazar P, Klironomos F, Sinha A, Kinkley S, Yang X, Arrigoni L, Amirabad AD, Ardakani FB, Feuerbach L, Gorka O, Ebert P, Muller F, Li N, Frischbutter S, Schlickeiser S, Cendon C, Frohler S, Felder B, Gasparoni N, Imbusch CD, Hutter B, Zipprich G, Tauchmann Y, Reinke S, Wassilew G, Hoffmann U, Richter AS, Sieverling L, Consortium D, Chang HD, Syrbe U, Kalus U, Eils J, Brors B, Manke T, Ruland J, Lengauer T, Rajewsky N, Chen W, Dong J, Sawitzki B, Chung HR, Rosenstiel P, Schulz MH, Schultze JL, Radbruch A, Walter J, Hamann A, Polansky JK. Epigenomic Profiling of Human CD4(+) T Cells Supports a Linear Differentiation Model and Highlights Molecular Regulators of Memory Development. *Immunity*. 2016;45(5):1148-61.
51. Smiljanovic B, Radzikowska A, Kuca-Warnawin E, Kurowska W, Grun JR, Stuhlmuller B, Bonin M, Schulte-Wrede U, Sorensen T, Kyogoku C, Bruns A, Hermann S, Ohrndorf S, Aupperle K, Backhaus M, Burmester GR, Radbruch A, Grutzkau A, Maslinski W, Haupl T. Monocyte alterations in rheumatoid arthritis are dominated by preterm release from bone marrow and prominent triggering in the joint. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(2):300-8.

52. Boks MP, Derks EM, Weisenberger DJ, Strengman E, Janson E, Sommer IE, Kahn RS, Ophoff RA. The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. *PLoS One*. 2009;4(8):e6767.
53. Dunn J, Baborie A, Alam F, Joyce K, Moxham M, Sibson R, Crooks D, Husband D, Shenoy A, Brodbelt A, Wong H, Liloglou T, Haylock B, Walker C. Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *Br J Cancer*. 2009;101(1):124-31.
54. Park SH, Kim SK, Choe JY, Moon Y, An S, Park MJ, Kim DS. Hypermethylation of EBF3 and IRX1 genes in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Mol Cells*. 2013;35(4):298-304.
55. Zhou Q, Long L, Shi G, Zhang J, Wu T, Zhou B. Research of the methylation status of miR-124a gene promoter among rheumatoid arthritis patients. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:524204.
56. Fu LH, Ma CL, Cong B, Li SJ, Chen HY, Zhang JG. Hypomethylation of proximal CpG motif of interleukin-10 promoter regulates its expression in human rheumatoid arthritis. *Acta Pharmacol Sin*. 2011;32(11):1373-80.
57. Ciechomska M, Roszkowski L, Maslinski W. DNA Methylation as a Future Therapeutic and Diagnostic Target in Rheumatoid Arthritis. *Cells*. 2019;8(9).
58. Oakes CC, Kelly TL, Robaire B, Trasler JM. Adverse effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on spermatogenesis include reduced sperm function and selective inhibition of de novo DNA methylation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322(3):1171-80.
59. Graca I, Sousa EJ, Baptista T, Almeida M, Ramalho-Carvalho J, Palmeira C, Henrique R, Jeronimo C. Anti-tumoral effect of the non-nucleoside DNMT inhibitor RG108 in human prostate cancer cells. *Curr Pharm Des*. 2014;20(11):1803-11.
60. Sun N, Zhang J, Zhang C, Zhao B, Jiao A. DNMTs inhibitor SGI-1027 induces apoptosis in Huh7 human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Lett*. 2018;16(5):5799-806.
61. Karouzakis E, Gay RE, Gay S, Neidhart M. Increased recycling of polyamines is associated with global DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2012;64(6):1809-17.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ilka Liebold, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: “Methylierungsverhalten peripherer mononukleärer Blutzellen unter Janus-Kinase-Inhibitoren, Sarilumab und Methotrexat bei aktiver rheumatoider Arthritis” / „Peripheral blood mononuclear cells are hypomethylated in active rheumatoid arthritis and methylation correlates with disease activity” 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit Prof. Dr. Eugen Feist, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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 als Top-Journal im Rahmen der Promotionsverfahren zum Dr. med.**

Autoren:

Ilka Liebold, Andreas Grützkau, Anika Göckeritz, Velia Gerl, Randall Lindquist, Eugen Feist, Michael Zänker, Thomas Häupl, Denis Poddubnyy, Jan Zernicke, Biljana Smiljanovic, Tobias Alexander, Gerd R. Burmester, Steffen Gay, Bruno Stuhlmüller

Titel: Peripheral blood mononuclear cells are hypomethylated in active rheumatoid arthritis and methylation correlates with disease activity

Zeitschrift: Rheumatology (Oxford)

Erscheinungsdatum: 17.12.2020

Beitrag im Einzelnen:

Bei dieser Publikation habe ich die Versuche zur Etablierung der Methodik und deren qualitativer Verifizierung durchgeführt. Dazu gehörten das Vorbereiten und Kultivieren von U937 Zellen, das Anfärben der Zellen durch CD-Antikörper und deren immunfluoreszenzmikroskopische und durchflusszytometrische Ausmessung und Auswertung, wie in Kapitel 3.5. und 3.7. beschrieben. Die mit AMNIS-Imagestream<sup>®</sup> generierten Daten sowie die Experimente zur Genexpression entstanden innerhalb der Arbeitsgruppe meines wissenschaftlichen Betreuers, Herrn Dr. rer. nat. B. Stuhlmüller, wie auch in enger Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Frau Dr. A. Hauser und Herrn Dr. A. Grützkau des Deutschen Rheumaforschungs-Zentrums (DRFZ).

Weiterhin habe ich mit der Unterstützung meines Erstbetreuers Prof. Dr. med. Eugen Feist zur Koordination der Patientenrekrutierung aus den ambulanten Rheumatologie-Sprechstunden und der Studienabteilung der Charité beigetragen. Dabei habe ich bei der Erhebung der nötigen klinischen Daten mitgewirkt und den DAS28 zur späteren statistischen Auswertung berechnet.

Die Aufarbeitung der der Blutproben (wie in Kapitel 3. Material und Methoden beschrieben) und die anschließenden FACS-Messungen der angefärbten Zellen wurden von mir ausgeführt. Die Kompensation und Analyse der entstandenen Daten durch die Software FlowJo<sup>™</sup> und deren statistische Auswertung mithilfe von SigmaPlot wurden von mir durchgeführt. Für die

Analyse wurde mit Hilfe von Herrn Dr. A. Grützkau eine Gating-Strategie entwickelt, welche bei jedem Datensatz in gleicher Form von mir angewendet wurde. Die durch SigmaPlot und FlowJo™ entstandenen Grafiken und die Tabellen wurden von mir erstellt.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden durch den Letztautor Dr. Bruno Stuhlmüller und mir vor dem Hintergrund des aktuellen Forschungsstandes interpretiert. Der Erstentwurf des Manuskriptes stammte nach umfangreicher Literaturrecherche von mir und wurde von allen Co-Autoren korrigiert und ergänzt. Mithilfe von Dr. Bruno Stuhlmüller wurde das Manuskript überarbeitet und zur Publikation freigegeben sowie die anschließende Revision bearbeitet.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift der Doktorandin

## Auszug aus der „Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **“RHEUMATOLOGY”** Selected Category Scheme: WoS

**Gesamtanzahl: 31 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Nature Reviews Rheumatology	7,761	18.545	0.021650
2	ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES	44,754	14.299	0.082820
3	Arthritis & Rheumatology	10,169	9.002	0.046120
4	RHEUMATOLOGY	19,897	5.149	0.029990
5	SEMINARS IN ARTHRITIS AND RHEUMATISM	6,124	5.072	0.011650
6	Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease	817	5.045	0.002060
7	OSTEOARTHRITIS AND CARTILAGE	16,264	4.879	0.027140
8	ARTHRITIS CARE & RESEARCH	16,725	4.530	0.024540
9	ARTHRITIS RESEARCH & THERAPY	16,287	4.148	0.028820
10	CURRENT OPINION IN RHEUMATOLOGY	4,866	3.851	0.008140
11	Current Rheumatology Reports	2,855	3.645	0.005610
12	JOURNAL OF RHEUMATOLOGY	23,342	3.634	0.022670
13	RHEUMATIC DISEASE CLINICS OF NORTH AMERICA	2,234	3.527	0.003600
14	JOINT BONE SPINE	3,601	3.278	0.005480
15	CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY	8,671	3.238	0.012830
16	BEST PRACTICE & RESEARCH IN CLINICAL RHEUMATOLOGY	3,614	3.016	0.005500
17	LUPUS	7,708	2.924	0.009100
18	SCANDINAVIAN JOURNAL OF RHEUMATOLOGY	3,238	2.706	0.003880
19	Pediatric Rheumatology	1,290	2.673	0.003320
20	CLINICAL RHEUMATOLOGY	8,011	2.293	0.014140

## **Publikation**

<https://doi.org/10.1093/rheumatology/keaa649>



























## **Lebenslauf**

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

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei dem Laborleiter des Rheumatologischen Forschungslabors Herrn Dr. rer. nat. Bruno Stuhlmüller für die hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung in jeder Phase dieser Arbeit bedanken. Bei Herrn Prof. Dr.med. Gerd-Rüdiger Burmester und Herrn Professor Dr.med. Steffen Gay bedanke ich mich ebenso für die wissenschaftliche Diskussion und Hilfestellung. Die zahlreichen Gespräche lieferten wertvolle Hinweise bei der Ausführung der Experimente und eröffnete mir einen kritischen Zugang zu dieser Thematik.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Feist, meinem Doktorvater, der mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und immer wieder motiviert hat.

Außerdem bedanke mich vielmals bei Barbara Walewska, die mir im Labor mit ihren wertvollen Anregungen jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Weiterhin möchte ich Bismah Parwaz und Mahamuda Khan für die Durchführung der qPCRs und deren Auswertung danken. Bei Frau Dr. rer. nat. Anja Hauser und Herrn Dr. rer. nat. Andreas Grützkau aus dem DRFZ bedanke ich mich vielmals für die zahlreichen professionellen Gespräche und die Hilfestellungen während der Etablierung der Methodik der Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenz und der AMNIS Technologie die in Zusammenarbeit mit Frau BSC Annika Göckeritz durchgeführt wurden.

Die rege Zusammenarbeit mit allen Beteiligten der unterschiedlichen Institutionen und Arbeitsgruppen hat mir immer sehr viel Freude bereitet. Ebenfalls bedanke ich mich bei den Studienschwestern Silvia Pade und Gabriela Schmittat, den Ärzten der rheumatologischen Fachambulanz und der Studienabteilung der Klinik für Innere Medizin und Rheumatologie der Charité und bei dem Klinikleiter Herr Dr. Michael Zänker des Immanuel-Krankenhauses für die hervorragende Zusammenarbeit während der gesamten Patientenrekrutierung.

Zur guter Letzt möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern des Rheumatologischen Forschungslabors wie auch den stellvertretenden Co-Autoren für ihre konstruktiven und wertvollen Anregungen bedanken, ohne die der Erfolg dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.