

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

Dissertation

Siglec-1 als Interferon-Surrogatmarker beim Systemischen Lupus Erythematoses

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Robert Biesen
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. F. Hiepe
 2. Prof. Dr. med. B. Manger
 3. Prof. Dr. med. U. Müller-Ladner

Datum der Promotion: 27.03.2009

Zusammenfassung

IFN- α nimmt in der Pathogenese des systemischen Lupus erythematoses (SLE) eine Schlüsselrolle ein und wird daher als therapeutisches Ziel avisiert. Zielstellung dieser Arbeit war es, einen Interferon-Surrogatmarker zu etablieren, der die Krankheitsaktivität und die Wirkung neuer IFN-suppressiver Therapien bei SLE-Patienten widerspiegelt.

Mithilfe der Affymetrix GeneChip Technologie wurden genomweite differentielle Genexpressionsanalysen hoch aufgereinigter Blutmonozyten von 9 SLE-Patienten und 8 Normal Spendern erstellt. Siglec-1 (Sialoadhesin, CD169), ein Interferon-induziertes Adhäsionsmolekül, wurde ausgewählt und in der Durchflusszytometrie auf inflammatorischen und residenten Blutmonozyten bei 52 SLE-Patienten und 38 Kontrollen als Interferon-Surrogatmarker beurteilt.

Blutmonozyten weisen eine prominente IFN-Signatur in der differentiellen Genexpressionsanalyse beim SLE auf. Siglec-1 wurde als das am stärksten hochregulierte IFN-induzierte Oberflächenprotein identifiziert. Der Prozentsatz Siglec-1 positiver (exprimierender) Monozytensubtypen korrelierte mit der Krankheitsaktivität (SLEDAI) und mit dem Komplementverbrauch von C3 und C4. Die Höhe der Anti-dsDNA-Antikörpertiter korrelierte dagegen nur mit dem Prozentsatz Siglec-1 positiver residenter, nicht aber dem der inflammatorischen Monozyten. Eine drastische Reduktion von Siglec-1 auf beiden Monozytensubpopulationen konnte beispielhaft durch die Gabe ultrahoher Glukokortikoiddosen bei vier aktiven SLE Patienten gezeigt werden.

Erstmals konnte durch die Kombination von Zellseparation und Genexpressionsanalysen das monozytäre Adhäsionsmolekül Siglec-1 als Biomarker beim SLE identifiziert werden. Siglec-1 wurde auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie als IFN-induzierter Aktivitätsmarker validiert und könnte zukünftig helfen, unter IFN-inhibitorischen Therapien individualisierte Dosisanpassungen vorzunehmen.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	2
3	ERGEBNISSE	3
3.1	DIE TYP I INTERFERONSIGNATUR IN SLE-MONOZYTEN.....	3
3.2	INDUKTION VON SIGLEC-1 DURCH IFN-ALPHA2A.....	4
3.3	SIGLEC-1 ZEIGT DIE AKTIVIERUNG DES TYP I INTERFERONSYSTEMS AN.....	4
3.4	KORRELATION MIT KLINISCHEN PARAMETERN.....	6
3.5	THERAPIEÜBERWACHUNG MITTELS SIGLEC-1	8
4	DISKUSSION	9
4.1	DIE TYP I INTERFERON-SIGNATUR IN SLE-MONOZYTEN	9
4.2	SIGLEC-1 ALS INDIKATOR FÜR EIN AKTIVIERTES IFN-SYSTEM BEIM SLE.....	9
4.3	SIGLEC-1 ALS BIOMARKER FÜR KRANKHEITSAKTIVITÄT BEIM SLE	10
4.4	SIGLEC-1 REFLEKTIERT DIE WIRKUNG VON IFN-INHIBITOREN.....	11
4.5	METHODENVERGLEICH MIT ANDEREN INTERFERON-SURROGATMARKERN.....	12
5	ANHANG	I
	LITERATURVERZEICHNIS	I
	DANKSAGUNG	II
	CURRICULUM VITAE.....	III
	EIDESSTÄTTICHE ERKLÄRUNG	IV

1 Einleitung

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine chronische, in Schüben verlaufende Autoimmunerkrankung, die zu den systemischen Bindegewebskrankheiten gezählt wird und vornehmlich junge Frauen im gebärfähigen Alter betrifft.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten in den letzten Jahren prominente Typ I Interferon-Signaturen im Blut, in entzündeten Gelenken, der Haut und in den Nieren bei SLE-Patienten nachweisen ¹. Die Serumspiegel von IFN- α korrelieren zudem mit der Krankheitsaktivität, dem Komplementverbrauch und den Antikörpertitern gegen doppelsträngige DNA ². Dementsprechend wurde Typ I Interferon als neues therapeutisches Ziel avisiert. Die Inhibition eines aktivierten IFN-Systems ist bei SLE-Patienten bisher nur für ultrahohe Glukokortikoidgaben bewiesen ¹, bei Hydroxychloroquin und Immunglobulinen ist diese Wirkung zumindest indirekt belegt ³. Neuere therapeutische Ansatzpunkte beinhalten unter anderem monoklonale Antikörper gegen IFN- α (MEDI-545) oder Signaltransduktioninhibitoren wie KN-93 ⁴.

Monozyten / Makrophagen tragen zur Pathogenese mit einer erhöhten Apoptoserate, einer Phagozytoseschwäche und der IFN- α -abhängigen Reifung zu Autoantigen-präsentierenden dendritischen Zellen entscheidend bei ⁵. Dabei wurde bisher in den Untersuchungen an SLE-Monozyten nicht zwischen den zwei im Blut existierenden Monozytensubtypen unterschieden. Zum einen existieren CD14⁺⁺⁺/CD16⁻ inflammatorische Monozyten, die das Blut als Vehikel in Entzündungsregionen benutzen und zum anderen CD14⁺/CD16⁺ residente Monozyten, die die Gewebemakrophagen des Blutes darstellen.

Wir verglichen erstmals in einer Studie genomweite Genexpressionsanalysen von hochreinen und schonend isolierten CD14⁺ Blutmonozyten von 9 aktiven SLE-Patienten und 8 passenden gesunden Kontrollen mit dem Ziel:

1. die unterschiedliche Genexpression zu definieren,
2. einen neuen Krankheitsmarker zu identifizieren
3. und diesen auf beiden Monozytensubpopulationen zu validieren.

2 Material und Methoden

Die Details bezüglich der untersuchten Patienten, der Erstellung der Monozytentranskriptome und den verwendeten Filterkriterien zur Identifikation differentiell regulierter Transkripte finden sich in der Originalpublikation über Siglec-1 ⁶.

Durchflusszytometrie:

Ausgehend von 4 ml EDTA-Blut wurde die Erythrozyten-bereinigte Leukozytenfraktion durch Erythrozytenlyse (EL-Puffer; Quiagen, GmbH, Hilden) und zweimaligem Waschen mit 5mM EDTA -versetztem PBS-Puffer (Sigma, München, Deutschland) gewonnen. Für die Siglec-1 Färbung wurde der Anti-Siglec-1 (CD169) Klon HSN 7D2 (Abcam, Cambridge, Großbritannien) verwendet. Ein FITC-konjugierter F(ab')₂ Anti-Maus IgG (Dianova, Hamburg, Germany) wurde als Sekundärantikörper benutzt. Mit Immunglobulinen von der Maus (Dianova) wurden unspezifische Bindungsstellen geblockt, bevor erneut mit den Zelllinien-spezifischen, direkt-markierten Antikörpern inkubiert wurde. Danach wurden PE-konjugierter Anti-CD14- (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) und APC-Cy7-konjugierter Anti-CD16- Antikörper für Färbung der Monozytensubpopulationen hinzu gegeben. Die Proben wurden an einem Multiparameter-Zytometer (LSRII; Becton Dickinson) gemessen und die Siglec-1⁺ inflammatorischen und Siglec-1⁺ residenten Monozyten nach entsprechendem „Gating“ erfasst und der Prozentsatz Siglec-1⁺ Monozyten berechnet.

Statistik:

Die differentiell regulierten Transkripte wurde mit Hilfe der SIPAGENE-Datenbank (www.bioretis-analysis.de/sipagene) und den dortigen Standardfilterkriterien aus den eingelesenen Monozytentranskriptomen identifiziert. Analog wurde mit den fremden Datensätzen von Dhodapkar et al. zur Definition der Typ I Interferon-Signatur verfahren. Die Clusteranalysen und die Darstellung der Genexpressionsdaten erfolgten mit Genesis V1.8.2. Die statistischen Auswertungen von Siglec-1 und den klinischen Parametern wurde mit GraphPad Prism 4 durchgeführt. Die Ergebnisse waren signifikant ab einem P-Wert < 0,05. Für die Korrelationsanalysen wurde jeweils der Pearson'sche Korrelationskoeffizient berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Die Typ I Interferonsignatur in SLE-Monozyten

Der Vergleich der Monozytentranskriptome von 9 SLE-Patienten und 8 gesunden Normalspendern erbrachte, dass 96 % der mehr als dreifach hoch regulierten Transkripte durch Typ I Interferon induziert waren.

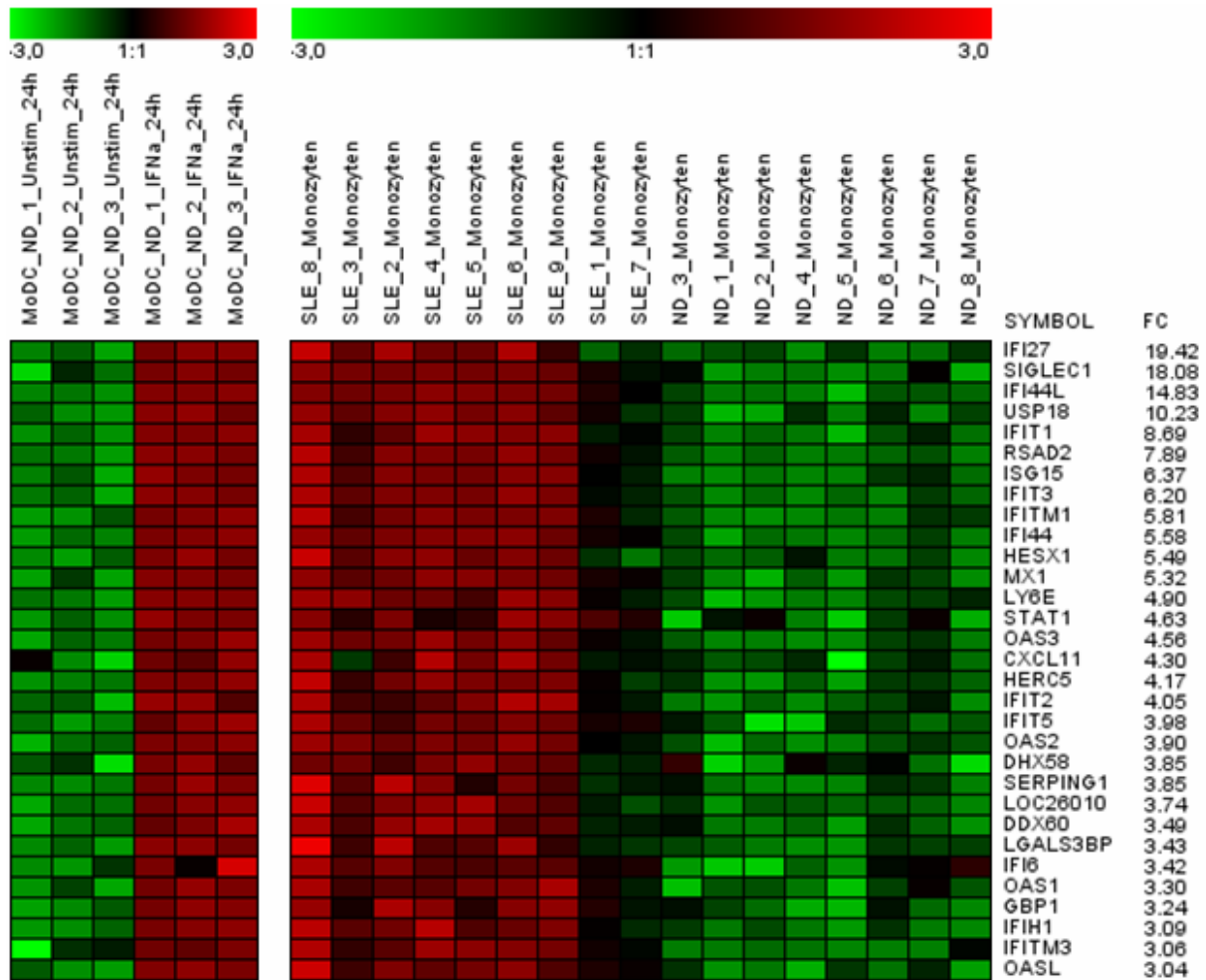


Abbildung 1: Typ I Interferonsignatur in mit IFN α -inkubierten kultivierten von Monozyten abstammenden Dendritischen Zellen (links) (Dhodapkar et al.) und ex vivo separierten CD14⁺ Monozyten von Patienten mit SLE im Vergleich zu Normalspendern (ND) (rechts). In der rechten Signatur sind alle Typ I IFN-induzierten Transkripte mit einem Fold Change (FC) > 3 bei 9 x SLE (w:m=7:2) versus 8 x ND (w:m=6:2) dargestellt. Die 31 identifizierten Transkripte sind absteigend nach dem FC sortiert. Die Patienten SLE 1, SLE 7 und alle Normalspender wiesen keine Typ I Interferonsignatur auf.

Eine exakte Definition der Typ I IFN-Signatur in Monozyten (Abbildung 1) gelang durch den Vergleich mit den frei zugänglichen Transkriptomdaten von Dodapkar et al., welche

Monozyten inkubierten und die Transkriptome mit dem Affymetrix HG-U133 Plus 2 GeneChip vor und nach einer Inkubation durch Interferon- α verglichen ⁷.

Die Größe der Typ I Interferonsignatur in den SLE-Monozyten variiert naturgemäß nach den zugrunde liegenden Filterkriterien für die gewünschte Transkriptomanalyse. Bei einem FC > 3 bestand die Typ I Interferon-Signatur aus 31 Transkripten. Sialic acid binding Ig-like lectin 1 (Siglec-1, Sialoadhesin, CD169) war dasjenige für ein Oberflächenprotein kodierende Transkript, welches am stärksten durch Typ I IFN in Monozyten beim SLE induziert war. Daher wurde Siglec-1 ausgewählt, um es als Interferon-surrogatmarker in der Durchflusszytometrie auf inflammatorischen und residenten Monozyten zu validieren und den möglichen klinischen Informationsgehalt bei Patienten mit SLE zu bestimmen.

3.2 Induktion von Siglec-1 durch IFN-alpha

Vor der geplanten Validierung von Siglec-1 wurde unabhängig geprüft, ob Siglec-1 tatsächlich durch IFN (hier IFN- α 2a) induziert wird. Bei einer neu diagnostizierten Patientin mit der Erdheim-Chester-Erkrankung wurde vor Therapiebeginn mit IFN- α 2a und nach 9 Tagen die Siglec-1-Expression auf sowohl inflammatorischen als auch residenten Monozyten in der Durchflusszytometrie bestimmt. Die Patientin erhielt drei mal wöchentlich 3×10^6 internationale Einheiten IFN- α 2a. Die Frequenz Siglec-1⁺ inflammatorischer Monozyten stieg von 15,3 % vor Therapie auf 93,5 % und die Frequenz Siglec-1⁺ residenter Monozyten von 5,1 % auf 57,4 % innerhalb der 9 Tage an. Wie bereits aus der Analyse der Genexpressionsdaten und auch der Literatur bekannt, wird Siglec-1 durch IFN- α induziert ⁸. Aufgrund der unterschiedlichen Streulichteigenschaften von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten konnte zudem gezeigt werden, dass Siglec-1, wie ebenfalls in der Literatur vor beschrieben ⁸, im Blut ausschließlich auf Monozyten exprimiert wird (Daten nicht gezeigt).

3.3 Siglec-1 zeigt die Aktivierung des Typ I Interferonsystems an

Im Weiteren wurden der Prozentsatz Siglec-1⁺ inflammatorischer und residenter Monozyten in 52 SLE-Patienten und 38 passenden Normalspendern gemessen und verglichen. Siglec-1 war im Durchschnitt bei den SLE Patienten im Vergleich zu den Normalspendern auf inflammatorischen Monozyten um den Faktor 3 und auf residenten Monozyten um den Faktor 4 erhöht (Abbildung 2). Der Nachweis einer Überexpression von Siglec-1 auf beiden Subpopulationen zeigt, dass sowohl inflammatorische als auch residente Monozyten beim SLE zu der vorab identifizierten Interferonsignatur beitragen.

Basierend auf den vorliegenden Messwerten war es möglich, eine Indikatorgrenze zu

berechnen, ab der von einer Aktivierung des Typ I Interferon-Systems in dem untersuchten Kollektiv und mit der verwendeten Methodik ausgegangen werden kann. Da die Streuung der Expression von Siglec-1 bei den Normalspendern deutlich geringer auf den residenten Monozyten (Varianz = 56,7; Variationskoeffizient = 79,6) als auf den inflammatorischen Monozyten (Varianz = 452,9; Variationskoeffizient = 108,3) war, wurden die Siglec-1-Werte der residenten Monozyten benutzt, um jene gesuchte Indikatorgrenze zu berechnen. Berechnet man für die Normalspender den Durchschnitt der Siglec-1-Werte auf residenten Monozyten ($D = 9,46 \%$) und addiert dazu die zweifache Standardabweichung ($2 \times SD = 15,04 \%$), so erhält man eine Indikatorgrenze von $24,5 \%$ für das Vorliegen eines aktivierten IFN-Systems oder das Vorhandensein erhöhter Typ I Interferon-Spiegel der Patienten im Vergleich zum untersuchten Kontrollkollektiv.

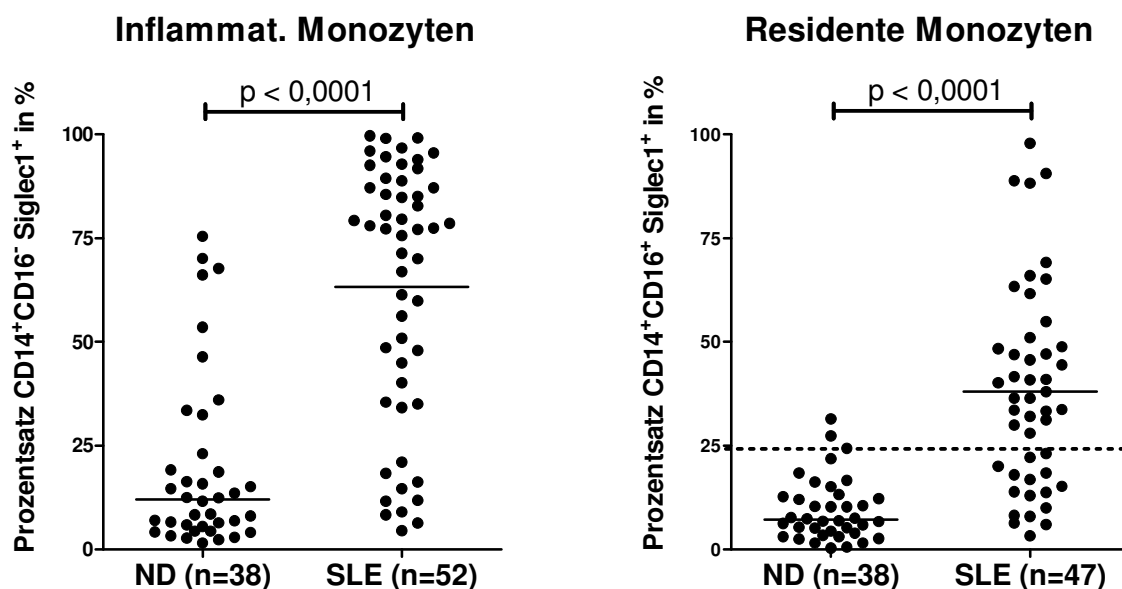


Abbildung 2: Prozentualer Anteil Siglec-1⁺ inflammatorischer und residenter Monozyten bei Normalspendern und SLE-Patienten. Der Prozentsatz an Siglec-1⁺ inflammatorischen Monozyten war in der Mehrheit der SLE-Patienten ($D_s = 63,3 \%$; $SD = \pm 30,8 \%$) im Vergleich zu Normalspendern ($D_s = 19,6 \%$; $SD = \pm 21,3 \%$) hoch reguliert. Ebenso war der Prozentsatz an Siglec-1⁺ residenten Monozyten bei den SLE-Patienten ($D_s = 38,0 \%$; $SD = \pm 24,04 \%$) im Vergleich zu Normalspendern ($D_s = 9,5 \%$; $SD = \pm 7,5 \%$) erhöht. Die p-Werte wurden mit dem t-Test für unabhängige Stichproben berechnet. Eine Grenzwert von Siglec-1 > 24,5 % wurde berechnet, um eine Aktivierung des Typ I Interferon Systems anzuzeigen (siehe gestrichelte Linie).

Wendet man diesen Schwellenwert von ~ 25 % Siglec-1⁺ residenter Monozyten für die analysierten SLE-Patienten und Normalspender an, so wiesen 31 von 47 (entspricht 65,6 %) SLE Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme ein aktiviertes Interferonsystem auf. Im Vergleich dazu wiesen nur 2 von 38 (entspricht 5,3 %) der Normalspender ein (anscheinend nur schwach) aktiviertes Interferonsystem auf (Abbildung 2).

3.4 Korrelation mit klinischen Parametern

IFN-Scores, bestehend aus verschiedenen IFN- induzierten Transkripten, korrelieren beim SLE mit der Krankheitsaktivität gemessen am SLEDAI und dem Komplementverbrauch von C3 und C4, nicht aber mit Anti-dsDNA-Antikörpertitern^{9,10}.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Korrelationen der Siglec-1-Expression auf beiden Monozytensubpopulationen mit der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG), Leukozytenanzahl, C3, C4, SLEDAI und Anti-dsDNA-Antikörpertitern untersucht. Von 25 SLE-Patienten wurde der vollständige SLEDAI erhoben. Bei 2 dieser Patienten konnten in der Durchflusszytometrie nicht ausreichend residente Monozyten (> 2000 Zellen) erfasst werden, so dass diese beiden Patienten aus der Analyse für residente Monozyten ausgeschlossen wurden. Die Ergebnisse der Korrelation von Siglec-1 mit dem SLEDAI, C3 und Anti-dsDNA-Antikörpertitern sind in (Abbildung 3) dargestellt. Außerdem ergab sich, dass der Prozentsatz an Siglec-1⁺ inflammatorischen Monozyten negativ mit einer Leukopenie ($r = -0,36$; $p = 0,029$) und C4 ($r = -0,47$; $p = 0,019$), positiv mit der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit ($r = 0,36$; $p = 0,029$), nicht aber mit dem C-reaktiven Protein (CRP) ($r = 0,21$; $p = 0,20$) korrelierte.

Im direkten Vergleich korrelierte der Prozentsatz an Siglec-1⁺ residenten Monozyten negativ mit Komplementfaktor C4 ($r = -0,44$; $p = 0,045$), positiv mit der BSG ($r = 0,36$; $p = 0,045$), nicht aber mit CRP ($r = 0,05$; $p = 0,78$) oder einer Leukopenie ($r = -0,19$; $p = 0,27$).

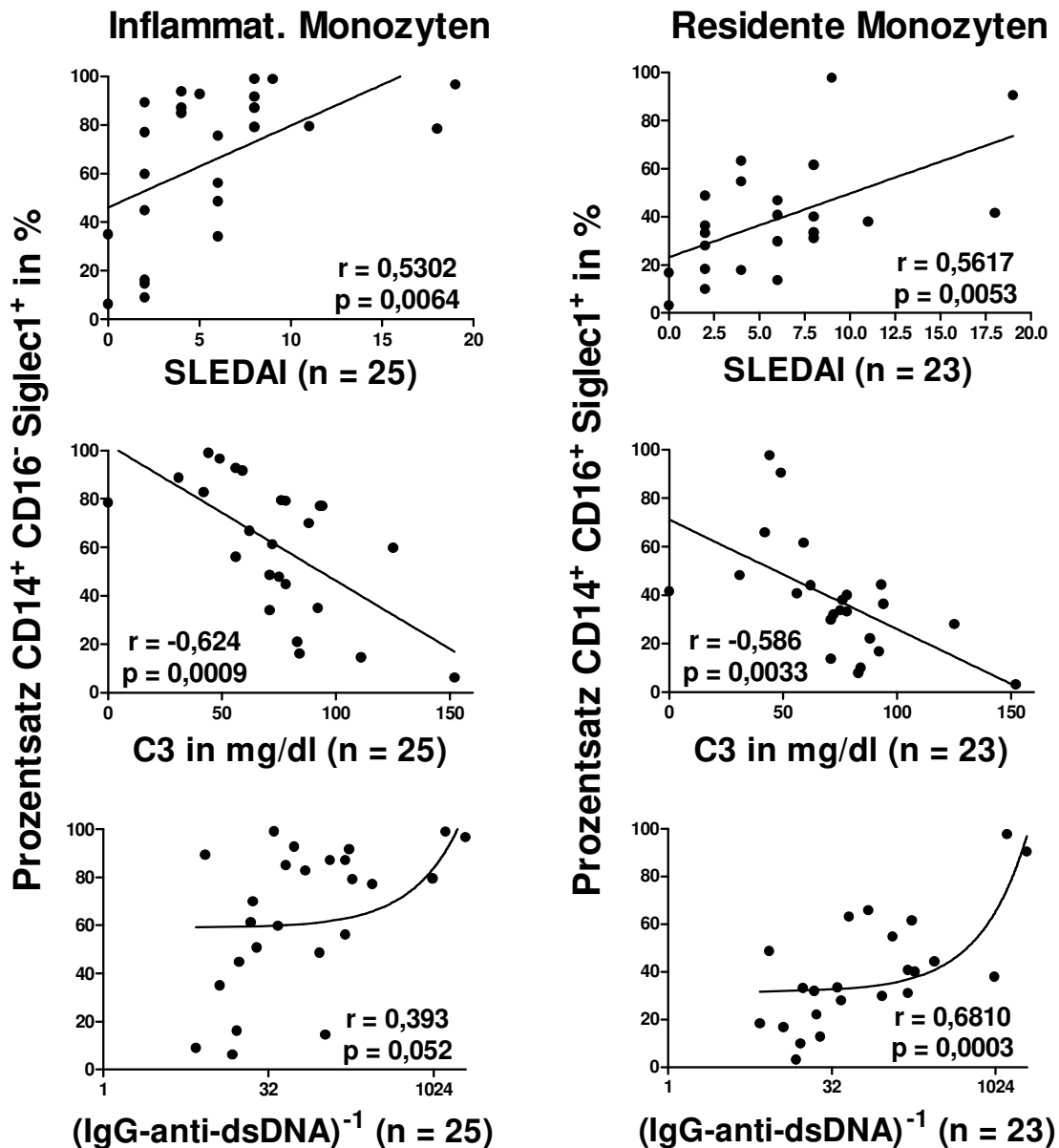


Abbildung 3: Korrelation von Siglec-1 mit dem SLEDAI, C3 und Anti-dsDNA-Antikörpertitern. Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient wurde für SLEDAI, C3 und dem Anti-dsDNA-Antikörpertiter berechnet. Bei den Antikörpertitern sind die Werte auf der Abszisse als Log2-Werte angegeben, um eine bessere optische Darstellung der Einzelpunkte zu gewährleisten. Der Prozentsatz an Siglec-1⁺ Monozytensubpoulationen korrelierte positiv mit dem SLEDAI und negativ mit der Menge an Komplementfaktor C3. Nur Siglec-1⁺ residente Monozyten korrelierten im Gegensatz zu Siglec-1⁺ inflammatorische Monozyten hochgradig und signifikant mit Anti-dsDNA-Antikörpertitern.

3.5 Therapieüberwachung mittels Siglec-1

Der Einsatz von ultrahohen Glukokortikoiddosen hat die Therapie bei hochaktiven Verlaufsformen des SLE verbessert. Außer bei den ebenfalls IFN-inhibitorischen Immunglobulinen ist bisher bei keinem anderen Medikament ein derart zeitnahes Therapieansprechen klinisch zu beobachten. Bennett et al. zeigten bereits im Jahre 2003, dass Glukokortikoide in der Lage sind die Interferonsignatur in Blutzellen auszulöschen ¹.

Um zu überprüfen, ob auch Siglec-1 die Inhibition von Interferon anzeigen kann, wurde bei 4 hochaktiven SLE-Patienten Siglec-1 vor Therapiebeginn (Tag 0) und unter Therapie (Tag 7) mit ultrahohen Glukokortikoiddosen gemessen.

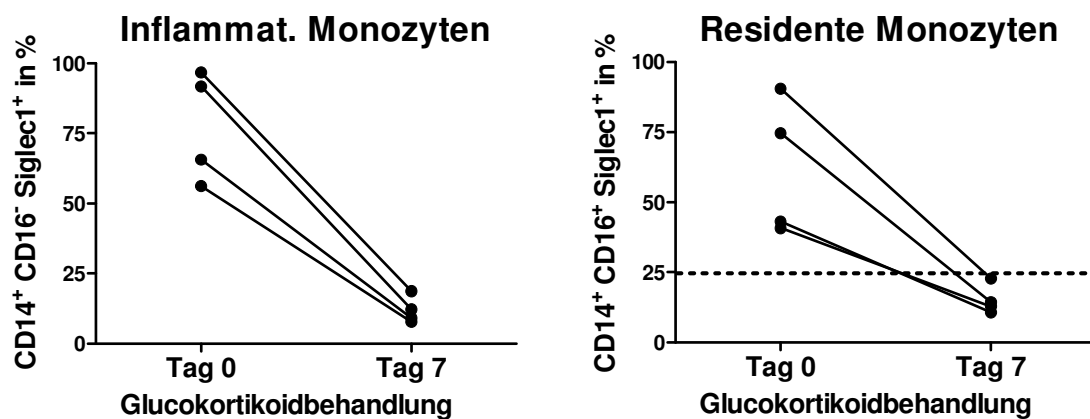


Abbildung 4: Suppression von Siglec-1 durch Hochdosisglukokortikoide. Alle Patientinnen (SLEDAI 14 bis 22) erhielten für 3 Tage 750 mg Urbason und für 3 Tage 500 mg Urbason intravenös.

Bei den 4 im Verlauf gemessenen SLE-Patienten führte die Gabe von ultrahohem Urbason innerhalb von 7 Tagen zu einer deutlichen Reduktion von Siglec-1 mit Unterschreitung der Indikatorgrenze für ein aktiviertes IFN System von 24,5 % Siglec-1⁺ residenter Monozyten (Abbildung 4).

Die Suppression von zuvor erhöhten Siglec-1-Werten durch ultrahohe Glukokortikoidgaben zeigt damit die Wirkung einer IFN-suppressiven Therapie auf beiden untersuchten Subpopulationen zeitnah auf.

4 Diskussion

4.1 Die Typ I Interferon-Signatur in SLE-Monozyten

Bei 7 aktiven SLE-Patienten konnte eine Typ I Interferon-Signatur in Monozyten nachgewiesen werden. Alle Normalspender und 2 inaktive Patienten wiesen hingegen keine Interferonsignatur auf. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit dem Nachweis von Typ I Interferon-Signaturen im Blut von SLE-Patienten¹. Erstmals wurde in dieser Arbeit jedoch eine rein zellspezifische Interferonsignatur beim SLE beschrieben. Für eine exakte Analyse war dabei der Vergleich von Gruppen mit gleicher Geschlechtsverteilung von Bedeutung, da sich bereits die Monozytentranskriptome von gesunden Männern und Frauen signifikant unterscheiden (Daten nicht gezeigt). Die hier beschriebene Interferonsignatur in Monozyten unterscheidet sich von den bisher beschriebenen Interferonsignaturen durch den erstmaligen Nachweis von stark hoch regulierten Transkripten wie zum Beispiel SIGLEC-1, USP18, IFITM1, RSAD2, HESX1, was letztlich den Nutzen und die Wertigkeit der Kombination von Zellsortierung und Genexpressionsanalytik unterstreicht.

Aktuell ist ein Vergleich von Interferonsignaturen zum Beispiel bei verschiedenen Krankheitsentitäten (z.B. progressive systemische Sklerose, Virusinfekten, SLE), zwischen männlichen und weiblichen SLE-Patienten oder aber auch inflammatorischen und residenten Monozyten zur Identifikation möglicher Unterschiede noch nicht möglich.

4.2 Siglec-1 als Indikator für ein aktiviertes IFN-System beim SLE

Bei den residenten Monozyten der Normalspender war die Messwertstreuung für Siglec-1 niedriger als auf den inflammatorischen Monozyten, so dass diese ausgewählt wurden, um eine Aktivierung des Interferonsystems anzuzeigen. Die Ursachen für diese geringere Streuung der Siglec-1 Expression auf inflammatorischen Monozyten sind unbekannt. Möglich ist, dass die im direkten Vergleich weniger differenzierten inflammatorischen Monozyten sensitiver auf äußere Einflüsse wie zum Beispiel IFN- α reagieren.

Basierend auf dem errechneten Schwellenwert von ~ 25 % Siglec-1⁺ residenter Monozyten, wiesen zwei Drittel der untersuchten SLE-Patienten eine Aktivierung des IFN-Systems auf. Damit konnte exemplarisch die Identifikation derjenigen Patientengruppe gezeigt werden, die von neuartigen IFN-suppressiven Therapien zukünftig profitieren könnte. Die Siglec-1-Werte sollten jedoch immer im Zusammenhang mit der Klinik des Patienten interpretiert werden müssen, denn auch Viren, einige Bakterien und mutmaßlich auch Medikamente (z.B. Infliximab) können zu einer Hochregulation von Siglec-1 führen.

4.3 Siglec-1 als Biomarker für Krankheitsaktivität beim SLE

Aus verschiedenen IFN-induzierbaren Transkripten bildeten Feng et al. (OAS1, LY6E, OASL, MX1, ISG15) und Kirou et al. (PRKR, IFIT1, IFI44) sogenannte IFN-Scores, die dann in PCR-Analysen aus Vollblut gemessen und mit klinischen Parametern korreliert wurden ^{9,10}. Diese IFN-Scores korrelierten mit dem SLEDAI und dem Komplementverbrauch, allerdings nicht mit der Bildung von Anti-dsDNA-Autoantikörpern. Bereits sechs Jahre vorher konnte in einer damals noch wenig beachteten Arbeit durch Bengtsson et al. gezeigt werden, dass die reinen IFN-alpha-Spiegel im Blut von SLE-Patienten auch mit der Titerhöhe der Anti-dsDNA-Antikörper korrelieren ².

Die hier erstellten Korrelationen der Expression von Siglec-1 auf beiden Monozytensubpopulationen zeigte, dass die Siglec-1⁺ inflammatorischen Monozyten etwas besser mit dem Komplementverbrauch von C3 und C4 und einer Leukopenie korrelieren. Siglec-1⁺ residente Monozyten korrelierten hingegen stärker mit dem SLEDAI und exklusiv oder ausschließlich mit den Anti-dsDNA-Antikörpertitern. Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen IFN-Scores korrelierten somit die Siglec-1⁺ residenten Monozyten auch mit der Titerhöhe an Anti-dsDNA-Antikörpern. Dieser Zusammenhang ist vor allem im Wissen um die Arbeit von Blanco et al. interessant. Demnach differenzieren einige Blutmonozyten unter dem Einfluss von IFN-alpha zu hochaktiven Antigen-präsentierenden Zellen ⁵. Die hohe Korrelation der Siglec-1-Expression auf CD14⁺/CD16⁺ Monozyten mit den Anti-dsDNA-Antikörpertitern lässt zumindest die Vermutung zu, dass die IFN-abhängige DC-Differenzierung in vivo zum einen eher für residente Monozyten zutrifft und zum anderen eng mit der Bildung von Anti-dsDNA-Autoantikörpern assoziiert ist. In Einklang mit dieser These ist, dass residente Monozyten eher in Antigen-präsentierende Zellen differenzieren als inflammatorische Monozyten ¹¹. Siglec-1 hat zudem eine essentielle Rolle in der Antigenpräsentation inne. So ist es in der Lage mit CD43 auf T-Zellen zu interagieren ¹² und alleine durch eine Antikörperblockade von Siglec-1 konnte die Graft-versus-Leukämie-Reaktion in einem entsprechenden Mausmodell unterbunden werden ¹³. Alle diese Hinweise legen nahe, dass mit den CD14⁺/CD16⁺/Siglec-1⁺ Monozyten erstmals Vorläufer von Autoantigen-präsentierenden Zellen beim SLE ex vivo erfasst wurden, die zur Bildung von Anti-dsDNA-Autoantikörpern beitragen.

4.4 Siglec-1 reflektiert die Wirkung von IFN-Inhibitoren

Die Gabe ultrahoher Glukokortikoiddosen bewirkt eine Unterdrückung IFN-induzierter Transkripte wie in Genexpressionsanalysen von PBMC's durch Bennett et al. gezeigt werden konnte ¹. Die grundlegenden Mechanismen dieser Glukokortikoidwirkung sind unbekannt. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Glukokortikoide die Differenzierung der plasmazytoiden dendritischen Zellen inhibieren und deren Apoptose beschleunigen. Genauso kommen aber auch suppressive genomische Effekte der Glukokortikoide in Betracht. Aufgrund der enormen Pleiotropie von Glukokortikoiden ist jedoch anzunehmen, dass mehrere Mechanismen zu der IFN-inhibitorischen Wirkung beitragen.

Für die bereits beschriebenen, mittels PCR validierten IFN-Scores wurde die Inhibition durch Glukokortikoide nicht untersucht ^{9,10}. In der vorliegenden Arbeit konnte bei 4 aktiven SLE Patienten zusätzlich gezeigt werden, dass Siglec-1 durch ultrahohe Glukokortikoidgaben auf beiden Monozytensubpopulationen supprimiert wird. Damit ist Siglec-1 in der Lage die IFN-unterdrückende Wirkung einer Medikation aufzuzeigen. Dies ist wichtig, um das Ansprechen einer neuen IFN-suppressiven Therapie beurteilen zu können, denn nach Hua et al. ist die Typ I IFN-Signatur in nur 90% der Fälle durch zirkulierendes IFN- α bedingt ¹⁴. Dies würde bedeuten, dass 10% aller SLE-Patienten nicht auf die Gabe von in der Erprobung befindlicher Antikörper gegen IFN- α (MEDI-545) ansprechen werden. Dieser Umstand könnte neben dem zu erwartenden fehlenden klinischen Ansprechen auch anhand von Siglec-1 dokumentiert beziehungsweise frühzeitiger erfasst werden.

Im klinischen Alltag findet in der Betreuung von SLE Patienten ein ständiges Abwägen zwischen dem Ausmaß an (nebenwirkungsbehafteter) Immunsuppression und dem Risiko für eine Zunahme der Krankheitsaktivität statt. Hier könnte Siglec-1 als zusätzlicher Laborparameter möglicherweise dem behandelnden Arzt in Zukunft helfen, eine optimale Behandlung zwischen minimaler Inhibition des Interferonsystems (z. B. durch Glukokortikoide, Hydroxychloroquin oder MEDI-545) und gleichzeitiger Vermeidung von Krankheitsschüben im Verlauf zu realisieren. Die langfristige Suppression des IFN-Systems birgt aber mutmaßlich auch die Risiken einer erhöhten Tumorinzidens und von protrahierten viralen oder bakteriellen Infektionen in sich ¹⁵. Diese Risiken könnten durch Vermeidung einer zu starken Unterdrückung von IFN minimiert werden. Ob die Expression von Siglec-1 auf residenten Monozyten die Überdosierung neuer IFN-inhibierender Medikamente anzeigen kann, ist aktuell jedoch noch unklar. Grundsätzlich wären individuelle Dosisanpassungen mit Hilfe von Siglec-1 ähnlich der Marcumarisierung zur Quickeinstellung möglich, wobei der therapeutische Zielbereich noch in größer angelegten Studien exakt definiert werden müsste.

4.5 Methodenvergleich mit anderen Interferon-Surrogatmarkern

Für die Evaluationen der IFN-Scores durch Feng et al. und Kirou et al. wurden jeweils 2×10^6 Leukozyten separiert und dann mittels quantitativer RT-PCR die Transkriptmenge der entsprechenden Interferon-Surrogatmarker bestimmt. Diese Methodik besitzt schwerwiegende Nachteile, die kurz erläutert werden sollen. Zum einen ist nicht bekannt, welche im Blut zirkulierenden Zellen die speziellen IFN-induzierten Transkripte exprimieren und mit welchem relativen Beitrag. Zum anderen sind eine Lymphopenie, Leukopenie oder auch eine Monozytopenie typische Blutbildbefunde beim SLE, die unter anderem in Abhängigkeit vom Aktivitätszustand eines Patienten variieren können.

Entwickelt beispielsweise ein SLE-Patient einen Schub mit Leukopenie oder Lymphopenie, so ändert dies die Blut- und Leukozytenzusammensetzung wesentlich. Dies kann irrtümlicherweise dazu führen, dass ein hochaktiver SLE-Patient mit Blut-/Knochenmark-Beteiligung einen (falsch) niedrigen IFN-Score aufweist, da diejenigen Zellen die mit ihren IFN-induzierten Transkripten zum IFN-Score am meisten beitragen, in ihrer Anzahl absolut reduziert sind. Ein anderer Patient oder der gleiche Patient zu einem anderen Zeitpunkt würde bei einer geringeren Aktivierung des IFN-Systems aber einer entsprechend höheren Anzahl derjenigen Zellen, die die IFN-induzierte Transkripte exprimieren, dann einen (falsch) hohen IFN-Score aufweisen. Eine zellspezifische Erfassung IFN-induzierter Transkripte wäre die Methode der Wahl. Genau diese notwendige Bedingung erfüllt die Siglec-1-Expressionsanalyse auf Monozyten in der Durchflusszytometrie.

Alle Interferon-Surrogatmarker wurden bisher nur in Querschnittsstudien evaluiert. In der klinischen Praxis hingegen ist die Beurteilung der Patienten im zeitlichen Verlauf von oberster Bedeutung. Auch in diesem Fall wird die zellspezifische Erfassung IFN-induzierter Transkripte notwendig sein, um wissenschaftlich korrekt die folgerichtige Frage beantworten zu können, ob die Interferon-Surrogatmarker auch longitudinal mit der Krankheitsaktivität korrelieren oder sogar Krankheitsschübe vorhersagen können. Gleichsam sollte für diese Fragestellungen der differentielle Krankheitsaktivitätsindex der British Isles Lupus Assessment Group (BILAG) benutzt werden, da mit diesem Veränderungen der Krankheitsaktivität genauer erfassbar sind als mit dem SLEDAI.

5 Anhang

Literaturverzeichnis

1. Bennett, L. et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* **197**, 711-23 (2003).
2. Bengtsson, A.A. et al. Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies. *Lupus* **9**, 664-71 (2000).
3. Lebon, P. Inhibition of herpes simplex virus type 1-induced interferon synthesis by monoclonal antibodies against viral glycoprotein D and by lysosomotropic drugs. *J Gen Virol* **66 (Pt 12)**, 2781-6 (1985).
4. Wang, L. et al. 'Tuning' of type I interferon-induced Jak-STAT1 signaling by calcium-dependent kinases in macrophages. *Nat Immunol* **9**, 186-93 (2008).
5. Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V. & Banchereau, J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* **294**, 1540-3 (2001).
6. Biesen, R. et al. Sialic acid-binding Ig-like lectin 1 expression in inflammatory and resident monocytes is a potential biomarker for monitoring disease activity and success of therapy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **58**, 1136-45 (2008).
7. Dhodapkar, K.M. et al. Selective blockade of the inhibitory Fcgamma receptor (FcgammaRIIB) in human dendritic cells and monocytes induces a type I interferon response program. *J Exp Med* **204**, 1359-69 (2007).
8. York, M.R. et al. A macrophage marker, Siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and toll-like receptor agonists. *Arthritis Rheum* **56**, 1010-20 (2007).
9. Feng, X. et al. Association of increased interferon-inducible gene expression with disease activity and lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **54**, 2951-62 (2006).
10. Kirou, K.A. et al. Activation of the interferon-alpha pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. *Arthritis Rheum* **52**, 1491-503 (2005).
11. Bajana, S. et al. Differential CD4(+) T-cell memory responses induced by two subsets of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* **122**, 381-93 (2007).
12. van den Berg, T.K. et al. Cutting edge: CD43 functions as a T cell counterreceptor for the macrophage adhesion receptor sialoadhesin (Siglec-1). *J Immunol* **166**, 3637-40 (2001).
13. Muerkoster, S., Rocha, M., Crocker, P.R., Schirmacher, V. & Umansky, V. Sialoadhesin-positive host macrophages play an essential role in graft-versus-leukemia reactivity in mice. *Blood* **93**, 4375-86 (1999).
14. Hua, J., Kirou, K., Lee, C. & Crow, M.K. Functional assay of type I interferon in systemic lupus erythematosus plasma and association with anti-RNA binding protein autoantibodies. *Arthritis Rheum* **54**, 1906-16 (2006).
15. Sangfelt & Strander, H. Apoptosis and cell growth inhibition as antitumor effector functions of interferons. *Med Oncol* **18**, 3-14 (2001).

Danksagung

Für die Überlassung dieses wichtigen Themas und die vorbildliche umfassende Betreuung möchte ich mich sehr herzlich bei Dr. rer. nat. Andreas Grützkau bedanken.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Falk Hiepe danke ich sehr herzlich für die fortwährende Unterstützung bei dieser Promotionsarbeit und den äußerst lehrreichen Anmerkungen und Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas Radbruch gebührt mein Dank für sein Engagement, meinen Forscherdrang in Bahnen zu lenken und die Möglichkeit, im Deutschen-Rheuma-Forschungszentrum zu forschen.

Katharina Raba und Thoralf Kaiser vom Zellsortierlabor möchte ich für die exzellente Betreuung bei der Zellsortierung bedanken.

Heidi Schliemann und Beate Möwes möchte ich für die ständige Hilfsbereitschaft und die Zuverlässigkeit bei der Erstellung der Genexpressionsdaten danken.

Für die erklärenden Ausführungen zu den Genexpressionsdaten und der damit verbundenen Statistik bin ich Dr. rer. nat. Joachim Grün und für die Hilfestellung bei der Benutzung der SIPAGENE-Datenbank Dr. Thomas Häupl (www.bioretis-analysis.de/sipagene) zu großem Dank verpflichtet.

Meinen Kollegen Cemal Demir, Fidan Barchudarova und Marta Steinbrich-Zöllner danke ich für die gute Zusammenarbeit in Klinik und Labor.

Für die Geduld, das Interesse an meiner Arbeit und die vielen kleinen und großen Hilfestellungen danke ich meiner Freundin Roswitha und meinen Eltern.

Nicht zuletzt gebührt großer Dank allen teilnehmenden SLE Patienten und Normalspendern, welche mich interessiert empfangen und mit Ihrer Unterstützung diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Netzwerkes für Infektion und Entzündung: Signatures, Pathways, Genes (SIPAGE) des Nationalen Genomforschungsnetzes (NGFN) durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert.

Curriculum vitae

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

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Robert Biesen, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Siglec-1 als Interferon-Surrogatmarker beim Systemischen Lupus Erythematoses“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den

Robert Biesen

(Promovend)

Angabe der Originalarbeiten, die in die Publikationspromotion einfließen:

1. Biesen R, Demir C, Barkhudarova F, Grün JR, Steinbrich-Zöllner M, Backhaus M, Häupl T, Rudwaleit M, Riemekasten G, Radbruch A, Hiepe F, Burmester GR, Grützkau A. **Sialic acid-binding Ig-like lectin 1 expression in inflammatory and resident monocytes is a potential biomarker for monitoring disease activity and success of therapy in systemic lupus erythematosus.** Arthritis Rheum. 2008 Apr 58(4):1136-45. Impact factor Arthr. Rheum. 2007 = 7.677
2. Steinbrich-Zöllner M, Grün JR, Kaiser T, Biesen R, Raba K, Wu P, Thiel A, Rudwaleit M, Sieper J, Burmester GR, Radbruch A, Grützkau A. **From transcriptome to cytome: integrating cytometric profiling, multivariate cluster, and prediction analyses for a phenotypical classification of inflammatory diseases.** Cytometry A. 2008 Apr;73(4):333-40. Impact factor Cytometry A 2007 = 2.978
3. Enghard P, Humrich J, Rudolph B, Rosenberger S, Biesen R, Kuhn A, Manz R, Hiepe F, Radbruch A, Burmester GR, Riemekasten G. **CXCR3+CD4+ T cells are enriched in inflamed kidneys and urine and provide a new biomarker for acute nephritis flares in SLE patients.** Arthritis Rheum. 2008 Dec 30;60(1):199-206. Impact factor Arthr. Rheum. 2007 = 7.677

Erklärung über den Anteil an den Publikationen:

Der Promovend Robert Biesen hatte folgenden Anteil an den Publikationen:

Publikation 1: Biesen et al., Arthritis Rheum. 2008 Apr;58(4):1136-45

(Beteiligung ca. 65 %)

Beiträge im Einzelnen: Rekrutierung und Aufklärung von Patienten und gesunden Kontrollen, klinische Charakterisierungen, Blutabnahmen, Isolation von Granulozyten, Monozyten, T-Zellen, B-Zellen, Auswertung der monozytären Genexpressionsdaten, durchflusszytometrische Messungen von Siglec-1, Statistische Auswertung von Siglec-1 und den klinischen Daten, Entwurf und Anfertigung der Publikation in der vorliegenden Form.

Publikation 2: Steinbrich-Zöllner et al., Cytometry A. 2008 Apr;73(4):333-40.

(Beteiligung ca. 20 %)

Beiträge im Einzelnen: Diskussion des Studiendesigns, Rekrutierung und Aufklärung von Patienten, Blutabnahmen, Diskussion und Interpretation der Daten, aktive Mitgestaltung des Diskussionsteils der Publikation

Publikation 3: Enghard et al., Arthritis Rheum. 2008 Dec 30;60(1):199-206.

(Beteiligung ca. 20 %)

Beiträge im Einzelnen: Diskussion des Studiendesigns, Rekrutierung und Aufklärung von Patienten, Blutabnahmen, Diskussion, Entwurf und Anfertigung der Publikation

Prof. Dr. Falk Hiepe

Doktorvater

Robert Biesen

Promovend