

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

DISSERTATION

**Identifizierung von zellbasierten Biomarkern im peripheren
Blut von Patienten mit aktiver, ankylosierender Spondylitis
zur Responseprädiktion bei TNF- α -blockierenden
Biologika-Therapien**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ursula Schulte-Wrede

aus Lennestadt

Datum der Promotion: 26.06.2022

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-----|--|------|
| 1 | Zusammenfassung | 6 |
| 2 | Abstract | 8 |
| 3 | Einleitung..... | 9 |
| 3.1 | Immunopathogenetischer und epidemiologischer Hintergrund der ankylosierenden Spondylitis..... | 9 |
| 3.2 | Chronische Aktivierung des zellulären Immunsystems bei AS | 9 |
| 3.3 | Bedeutung von TNF- α bei chronischen Entzündungen | 11 |
| 3.4 | TNF- α Blockade bei der AS..... | 12 |
| 3.5 | Biomarker als Baseline-Prädiktoren einer anti-TNF- α -Therapie in der Rheumatologie..... | 13 |
| 3.6 | Die multiparametrische Durchflusszytometrie als Screening-Plattform für zellbasierte Biomarker..... | 16 |
| 3.7 | Ziel und Ergebnis der Arbeit..... | 17 |
| 4 | Methoden | 19 |
| 4.1 | Patientenkollektiv..... | 19 |
| 4.2 | Präparation der Blutproben, Antikörperfärbung und durchflusszytometrische Messungen | 19 |
| 5 | Ergebnisse | 22 |
| 5.1 | Demografische und klinische Charakteristika der Patienten vor Behandlungsbeginn | 22 |
| 5.2 | Identifizierung signifikanter Parameter mittels des ImmunoClust-Algorithmus | 23 |
| 5.3 | Validierung von klassischen NK-Zellen und CD8-positiven NK-Zellen als potenzielle immunologische Biomarker für eine anti-TNF- α -Therapieprädiktion | 24 |
| 6 | Diskussion | 29 |
| 6.1 | Ziel der Arbeit..... | 29 |
| 6.2 | Patienten- und Laborparameter als Baseline-Prädiktoren in AS | 29 |
| 6.3 | Bedeutung von Immunzellen für die anti-TNF- α -Therapieprädiktion | 30 |
| 6.4 | NK-Zellen in AS..... | 31 |
| 6.5 | CD8 $\alpha\alpha$ -exprimierende NK-Zellen in AS..... | 32 |
| 6.6 | Unterschiede von ETN- und ADA-behandelten Patienten bezüglich der Response-Prädiktion..... | 33 |
| 6.7 | Vergleichende Genexpressionsanalysen von CD8 ⁺ und CD8 ⁻ NK Zellpopulationen..... | 33 |
| 6.8 | Limitation der Studie und Ausblick..... | 34 |
| 7 | Zusammenfassung | 35 |
| 8 | Literaturverzeichnis | I |
| 9 | Eidesstattliche Versicherung | VIII |
| 10 | Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation..... | IX |

| | | |
|----|---|-------|
| 11 | Auszug aus der Journal Summary List..... | X |
| 12 | Druckexemplar der ausgewählten Publikation..... | XI |
| 13 | Lebenslauf..... | XXI |
| 14 | Publikationsliste..... | XXII |
| 15 | Danksagung | XXIII |

ABKÜRZUNGEN

| | |
|---------|---|
| ADA | Adalimumab |
| ADAb | anti-drug antibodies |
| AS | Ankylosierende Spondylitis |
| ASAS | Assessment of Spondyloarthritis International Society |
| ASDAS | Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score |
| BASDAI | Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index |
| BMI | Body-Mass-Index |
| CEACAM1 | Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 |
| CED | chronisch-entzündliche Darmerkrankungen |
| CCR6 | C-C-Chemokinrezeptor Typ 6 |
| CRP | C-reaktives Protein |
| CTL | zytotoxische T-Lymphozyten |
| CTX-II | C-terminal vernetzendes Telopeptid von Typ-II-Kollagen |
| DC | dendritische Zellen |
| DMARD | Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug |
| EA | Enteropathische Arthritis |
| ERAP | Endoplasmatischen Retikulum Aminopeptidase |
| ESR | Erythrozytensedimentationsrate |
| ETN | Etanercept |
| FCS | Flow Cytometry Standard |
| FSC | Forward Scatter |
| HLA | humanes Leukozyten-Antigen |
| IL | Interleukin |
| IFN | Interferon |
| IP | interferon-inducible protein |
| IMID | immunvermittelte entzündliche Erkrankungen |
| ITGAX | Integrin-Alpha-X-kodierendes Gen |
| JIA | juvenile idiopathische Arthritis |
| KIR | killer cell immunoglobulin-like receptor |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| MMP | Matrix-Metalloprotease |
| MRT | Magnetresonanztomographie |

| | |
|---------------|------------------------------------|
| NK-Zellen | natürliche Killer-Zellen |
| NSAR | nichtsteroidale Antirheumatika |
| PE | Phycoerythrin |
| PMT | Photomultiplier Tube |
| PsA | Psoriasis-Arthritis |
| RA | Rheumatoide Arthritis |
| ReA | Reaktive Arthritis |
| ROC | Receiver-Operating-Characteristics |
| SAA | Serum-Amyloid A |
| SNP | Single Nucleotide Polymorphism |
| SpA | Spondyloarthritiden |
| SSC | Side Scatter |
| TGF | Transforming Growth Factor |
| Th-Zellen | T-Helfer-Zellen |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor- α |
| TNFR | Tumornekrosefaktor-Rezeptor |
| Treg | regulatorische T-Zellen |
| uSpA | undifferenzierte Spondyloarthritis |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

1 Zusammenfassung

HINTERGRUND

Die therapeutische Blockade des Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) wird mit großem Erfolg bei verschiedenen chronisch-entzündlichen Erkrankungen angewendet. Im Fall der ankylosierenden Spondylitis (AS) oder Morbus Bechterew zeigen nur ca. 50-60% der Patienten ein gutes bis sehr gutes Ansprechen, ca. 30% werden als Therapieversager eingestuft. Da es mittlerweile verschiedene therapeutische Optionen zur TNF- α -Blockade bei AS-Patienten gibt, besteht ein großes Interesse an neuen Biomarkern, die eine Therapiestratifizierung von Patienten bereits vor Behandlungsbeginn ermöglichen. Ziel dieser explorativen Arbeit war es daher, mit Hilfe der multiparametrischen Zytometrie zellbasierte Biomarker im peripheren Blut zu identifizieren, die zur prätherapeutischen Stratifizierung von AS-Patienten eingesetzt werden können.

METHODEN

Ein multiparametrischer, durchflusszytometrischer Ansatz wurde etabliert, um Baseline-Prädiktoren in 31 AS-Patienten vor der Behandlung mit den TNF-Blockern Adalimumab (TNF-Neutralisation) und Etanercept (löslicher TNF-Rezeptor) auf Einzelzell-Niveau zu identifizieren.

ERGEBNISSE

Der hochauflösende Immunphänotypisierungsansatz erlaubte es, eine Subpopulation von CD8-exprimierenden natürlichen Killer (NK)-Zellen zu identifizieren, deren erhöhte Frequenz im Blut mit einem guten, klinischen Ansprechverhalten auf eine TNF- α -Blockade korreliert. Während eine inverse Korrelation von klassischen CD56⁺/CD16⁺ NK-Zellen mit einer Reduktion der Krankheitsaktivität beobachtet werden konnte, zeigte die CD8⁺ NK-Zell-Subpopulation eine positive Korrelation, d.h. vor der Behandlung zeigten Responder eine signifikant erhöhte Frequenz von CD8⁺ NK-Zellen verglichen mit Non-Respondern.

FAZIT

Mit dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine detaillierte Immunphäotypisierung, insbesondere des NK-Zell-Kompartimentes, die Identifizierung eines sogenannten Baseline-Prädiktors zur Vorhersage des Therapieerfolgs bei anti-TNF- α -behandelten AS-Patienten erlaubte. Pathomechanistisch deuten diese Daten auf eine aktive Beteiligung von NK-Zellen im Allgemeinen und von CD8⁺ exprimierenden Subsets im Speziellen am chronischen Entzündungsgeschehen bei der AS hin.

2 Abstract

BACKGROUND

The therapeutic blockade of tumor necrosis factor- α (TNF- α) is used with great success in various chronic inflammatory diseases. In ankylosing spondylitis (AS) or Bechterew's disease, only about 50-60% of patients show a good to very good response, about 30% are classified as non-responders. Since there are now various therapeutic options for TNF- α blockade in AS patients available, great interest exists in the discovery of new biomarkers, which allow therapy stratification of patients already before the start of treatment. Therefore, the aim of this explorative study was to identify cell-based biomarkers in peripheral blood that can be used for the pretherapeutic stratification of AS patients using cell-based multiparametric cytometry.

METHODS

A multiparametric flow cytometric approach was established to identify baseline predictors in 31 AS patients prior to treatment with the TNF blockers adalimumab (TNF neutralization) and etanercept (soluble TNF receptor) at the single cell level.

RESULTS

The high-resolution immunophenotyping approach allows the identification of a subpopulation of CD8-expressing natural killer (NK) cells whose increased frequency correlates with good response to TNF blockade. While an inverse correlation of classical CD56⁺/CD16⁺NK cells with a reduction in disease activity could be observed, it behaved the other way around with the CD8⁺ NK cell subpopulation. Thus, prior to treatment, responders showed a significantly increased frequency of CD8⁺ NK cells compared to non-responders.

CONCLUSIONS

This work demonstrated for the first time that detailed immunophenotyping, especially of the NK cell compartment, allowed the identification of a baseline predictor for predicting the success of treatment in anti-TNF- α -treated AS patients. Pathomechanically, these data indicate an active involvement of NK cells in general and particularly of CD8⁺ expressing subsets in the chronic inflammatory process in AS.

3 Einleitung

3.1 Immunopathogenetischer und epidemiologischer Hintergrund der ankylosierenden Spondylitis

Die ankylosierende Spondylitis (AS) gehört zur Gruppe der Spondyloarthritiden (SpA), die zwar zu den chronisch entzündlich-rheumatischen Erkrankungen gezählt wird, bei denen sich aber in der Regel keine Autoantikörper nachweisen lassen [1]. Klinisch auffällig sind vor allem schmerzhafte und radiografisch darstellbare Veränderungen der Wirbelsäulengelenke, die vorwiegend bei Patienten auftreten, die Träger des humanen Leukozyten-Antigen (HLA)-B27 Allels sind [2]. Weitere Vertreter der Spondyloarthritiden sind unter anderem die Psoriasis-Arthritis (PsA), die Reaktive Arthritis (ReA), die Enteropathische Arthritis (EA) und die undifferenzierte Spondyloarthritis (uSpA) [3]. Die Verbreitung von AS beträgt ca. 1,43 Millionen innerhalb der europäischen Bevölkerung [4], wobei der Krankheitsbeginn in der Adoleszenz liegt und mit einem ca. zwei Mal höheren Anteil an Männern angegeben wird [5, 6]. Zwischen dem Auftreten erster Symptome und der Diagnose vergehen in der Regel 6-8 Jahre [7].

Zu den Diagnoseoptionen von AS gehören Röntgenbildgebungsverfahren [8] gemäß den traditionellen modifizierten New-York-Kriterien [9], mit der strukturelle Knochenschäden nachgewiesen werden können sowie neuere Klassifizierungsmethoden nach den ASAS (Assessment of Spondyloarthritis International Society)-Kriterien, bei der die axiale SpA in radiografische und nicht-radiografische SpA unterteilt wird [10].

Die Pathogenese von AS ist noch immer weitgehend unbekannt. Es wird jedoch angenommen, dass die Krankheitsentwicklung hauptsächlich von genetischen Faktoren, insbesondere dem Vorhandensein des MHC (Major Histocompatibility Complex)-I Antigens HLA-B27 [2] sowie als initialer Auslöser der Entzündung durch Umweltfaktoren z.B. Infektionen mit Enterobakterien bestimmt wird [11].

3.2 Chronische Aktivierung des zellulären Immunsystems bei AS

Die nachfolgend beschriebenen Immunzellen der angeborenen und adaptiven Immunität sowie die von ihnen produzierten Zytokine sind entscheidend an der Initiierung und Progression von AS beteiligt. Jüngste Ergebnisse konnten beispielsweise zeigen, dass die Interleukin (IL)-23 /IL-17-Achse eine wichtige

pathogene Rolle bei AS spielt [12]. Die Aktivierung dieses Signalweges erfolgt unter anderem durch hohe Mengen des von Makrophagen produzierten proinflammatorischen Zytokins IL-23 im Serum und Synoviumgewebe von AS-Patienten. IL-23 veranlasst wiederum die Produktion von IL-17 durch weitere Immunzellen und trägt somit zu Entzündungen in AS bei [13].

Obwohl bei anderen Autoimmunerkrankungen eine verringerte Anzahl von NK-Zellen beobachtet wurde, zeigen AS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine signifikant erhöhte Frequenz von CD56^{dim}CD16⁺ NK-Zellen sowie zudem eine stärkere Expression des NK-Zell-Rezeptors CEACAM1 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1) [14]. Andere Studien konnten zeigen, dass durch die spezifische Bindung von HLA-B27 an den inhibitorischen NK-Zell-Rezeptor KIR (killer cell immunoglobulin-like receptor) DL1 die zytolytische Aktivität von NK-Zellen gehemmt wird [15].

Zudem ist eine verringerte Anzahl zirkulierender CD1c⁺ dendritischer Zellen (DC) bei AS-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden begleitet von einer erhöhten Frequenz mononukleärer CD14⁺CD16⁺ Zellen beschrieben. Die daraus resultierende Aktivierung CC-Chemokinrezeptor (CCR) 6-exprimierender T-Zellen zusammen mit einer erhöhten Produktion von IL-1b und IL-6 tragen maßgeblich zu T-Helferzellen (Th-Zellen) 17-Immunantworten und den damit verbundenen Manifestationen in AS bei [16]. Eine weitere Untergruppe von CD4⁺ T-Lymphozyten, die an der Entwicklung von AS beteiligt ist, sind unter anderem Th1-Zellen, die durch das Chemokin IP (interferon-inducible protein)-10 in entzündete Gewebe rekrutiert werden können. Die damit verbundene erhöhte Produktion von Interferon (IFN)- γ sowie TNF- α verursacht anhaltende Entzündungen bei AS-Patienten. Vergangene Studien konnten außerdem zeigen, dass die von Th2-Zellen produzierten Zytokine IL-4 sowie IL-13 eine Aktivierung von Makrophagen bewirken und somit zum Krankheitsverlauf von AS beitragen [17]. Es ist dokumentiert, dass die Anzahl von Th22-Zellen im peripheren Blut von AS-Patienten erhöht ist [18]. Th22-Zellen sind neben der Sekretion von IL-13 und TNF- α vor allem durch die Produktion von IL-22 an der Pathogenese von AS beteiligt [19]. Regulatorische T-Zellen (Treg) tragen durch die Sezernierung der inhibitorischen Zytokine TGF (Transforming Growth Factor)- β und IL-10, die eine Hemmung dendritischer Zellen und Makrophagen verursachen können, zur Krankheitsentstehung von AS bei. Zudem könnten Treg-Zellen eine Rolle bei der Modulation von Entzündungsprozessen in AS spielen [20].

CD8⁺ T-Zellen vermitteln ihre pathogene Rolle bei AS über verschiedene Mechanismen. Cytotoxische T-Lymphozyten (CTL) bewirken eine direkte Lysierung der Zielzellen durch Sekretion von Perforin und Granzym. Darüber hinaus produzieren CD8⁺ Effektor-T-Zellen entzündliche Zytokine wie TNF- α , IFN- γ sowie IL-17 und unterstützen so chronische Immunantworten bei AS-Patienten [21].

Eine Hypothese besagt, dass Komponenten infektiöser bakterieller Antigene, die mit HLA-Molekülen kreuzreagieren, CD8⁺ T-Lymphozyten stimulieren können [22]. Von dem Mikroorganismus *Klebsiella pneumoniae* wird beispielsweise angenommen, dass er an der Pathogenese von AS als auslösender bzw. fortbestehender Faktor beteiligt ist [23], da einige seiner Komponenten eine strukturelle Ähnlichkeit mit spezifischen genetischen Sequenzen beim Menschen aufweisen und eine molekulare Mimikry bei AS zeigen [24].

B-Zellen sind nach dem heutigen Kenntnisstand über verschiedene Mechanismen an der Pathogenese von AS beteiligt. Insgesamt sind eine höhere Prävalenz von B-Zellen, die Antigen-Präsentation für aktive T-Zellen, die Bildung ektopischer lymphoider Strukturen und die Existenz von Autoantikörpern ein wichtiger Hinweis für die Rolle von B-Zellen bei AS. Hinzu kommt die Bildung immunomodulatorischer Zytokine wie IL-6 sowie RANKL, welche die Plasmazellbildung und Osteoklastengengese stimulieren können [25].

Zusammenfassend spielen vor allem durch chronisch aktivierte T-Zellen, darunter besonders Th1 und CD8⁺ T-Zellen, verursachte erhöhte TNF- α -Spiegel eine wichtige Rolle hinsichtlich der Entzündungsreaktionen bei AS.

3.3 Bedeutung von TNF- α bei chronischen Entzündungen

Als ein zentrales proinflammatorisches Zytokin ist TNF- α an der Pathogenese einer Vielzahl immunvermittelter Entzündungskrankheiten beteiligt. Der Nachweis erhöhter TNF- α -Spiegel im Serum oder im Gewebe von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen legte den Ansatz einer therapeutischen Blockade von TNF- α nahe [26]. Ursprünglich für die Behandlung der rheumatoiden Arthritis (RA) entwickelt, wurde der therapeutische Einsatz von anti-TNF-Wirkstoffen Anfang 2000 auf die Behandlung der AS ausgeweitet [27]. TNF- α ist ein starkes proinflammatorisches Zytokin, das von verschiedenen Immunzellen wie aktivierten NK- und T-Zellen, Makrophagen,

Monozyten und Neutrophilen aber auch von Fibroblasten und Endothelzellen produziert wird [28].

Die biologischen Funktionen von TNF- α werden durch die Bindung an die Membranrezeptoren TNFR1 (p55, CD120a) oder TNFR2 (p75/p80, CD120b) vermittelt, die sich bezüglich ihrer zellulären Lokalisation und Signalmechanismen unterscheiden. Während TNFR1 ubiquitär auf allen lymphoiden und myeloiden Immun- und Körperzellen exprimiert wird [29], ist die Expression von TNFR2 hauptsächlich auf T-Zellen [30] und natürliche Killerzellen beschränkt [31]. Des Weiteren wird TNFR2 von endothelialen und mesenchymalen Zellen, Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS), Oligodendrocyten und Cardiomyocyten [32] und einigen anderen Zelltypen exprimiert [33]. Während TNFR1 sowohl an lösliches als auch an membrangebundenes TNF- α bindet, wird angenommen, dass TNFR2 hauptsächlich durch membrangebundenes TNF aktiviert wird [34]. Entsprechend seiner Funktion ist TNFR1 hauptsächlich mit proapoptischen Prozessen und akuten Entzündungsreaktionen assoziiert, während TNFR2 für Prozesse verantwortlich ist, welche das Überleben von Zellen sicherstellen [35]. Die wichtige pathogenetische Rolle von TNF- α bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wird durch die therapeutische Wirksamkeit von anti-TNF-Präparaten unterstützt.

3.4 TNF- α Blockade bei der AS

Für AS existieren zurzeit keine kurativen Behandlungsmethoden. Zur Linderung der axialen Symptome werden als Primärbehandlung nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) sowie Physiotherapie eingesetzt. Eine TNF- α -blockierende Therapie wird nur bei Patienten mit dauerhaft hoher Krankheitsaktivität angewendet, welche nicht auf eine konventionelle NSAR-Behandlung ansprechen [36, 37]. Obwohl die Blockade von TNF- α in den letzten zehn Jahren sehr erfolgreich bei der Behandlung von SpA eingesetzt wurde, sprechen wie auch bei anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen ca. 30-40% der Patienten nicht oder unzureichend auf die Therapie an. Dies ist teilweise auf die Entwicklung von gegen Medikamente gerichtete Antikörper (ADAb) zurückzuführen, welche eine reduzierte Bioverfügbarkeit zur Folge haben [38]. Die wahrscheinlichste Voraussetzung für den Wechsel von einem auf ein anderes TNF- α -Biologikum ist das partielle oder vollständige Ausbleiben eines Therapieeffektes sowie das Auftreten von Nebenwirkungen [39]. Dabei ist die häufigste Nebenwirkung einer anti-TNF-Therapie

ein erhöhtes Risiko für schwerwiegende chronische Infektionen, die insbesondere die Atemwege betreffen, wobei die Reaktivierung der latenten Tuberkulose (TB) ein Hauptproblem darstellt [40]. Auch andere Infektionen, wie z.B. Histoplasmose, Listeriose, Pneumocystis-Pneumonie treten immer wieder auf. Als Langzeitriskien sind maligne Erkrankungen wie Lymphome erwähnenswert [41].

Für die Behandlung von AS sind gegenwärtig fünf anti-TNF α -Inhibitoren zugelassen [37]: Infliximab, ein monoklonaler chimärer Antikörper [42], Etanercept, ein humanes lösliches Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Fusionsprotein [43]; Adalimumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper [44]; Golimumab, ein humaner monoklonaler Antikörper [45] und Certoluzimab, ein Fab-Fragment eines humanisierten monoklonalen Antikörpers [46]. Die meisten dieser Biologika werden auch erfolgreich bei der Behandlung weiterer immunvermittelter entzündlicher Erkrankungen (IMID) wie z.B. rheumatoider Arthritis (RA), Psoriasis-Arthritis (PsA), juveniler idiopathischer Arthritis (JIA) und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) angewendet [47, 48]. Aufgrund ausgelaufener Schutzrechte und niedrigerer Behandlungskosten werden neuerdings auch TNF- α -Biosimilars zur Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen zugelassen. Verglichen mit den ursprünglich zugelassenen Biologika weisen Biosimilars eine gleichwertige Wirksamkeit und keine klinisch relevanten Unterschiede in Bezug auf Sicherheit und Immunogenität auf. Derzeit sind drei generische krankheitsmodifizierende Antirheumatika (DMARD) in der Europäischen Union für Patienten mit rheumatischen Erkrankungen zugelassen. Für Infliximab kommt alternativ CT-P13 sowie SB2 und für Etanercept das Biosimilar SB4 zur Anwendung [49]. Trotz der ähnlichen Wirksamkeit, Sicherheit und Immunogenität von Biosimilars im Vergleich zu ihrem jeweiligen Referenzbiologikum kann der Wechsel jedoch zu Nocebo-Reaktionen wie einer subjektiven Zunahme der Krankheitsaktivität und schmerzbedingten, unerwünschten Ereignissen führen [50].

3.5 Biomarker als Baseline-Prädiktoren einer anti-TNF- α -Therapie in der Rheumatologie

Biomarker umfassen ein breites Spektrum an objektiv messbaren Größen, zu denen zelluläre, biochemische und molekulare, aber auch physiologische und anatomische Parameter sowie Bildgebungsverfahren zählen. Sie können als Indikatoren für

physiologische sowie pathologische Abläufe und auch zur Beurteilung eines Therapieausgangs dienen [51, 52].

Diagnostische Biomarker erlauben eine Differenzierung von normalen biologischen Abläufen gegenüber krankhaften Veränderungen, wohingegen prognostische Biomarker die Vorhersage des individuellen Krankheitsverlaufs ermöglichen sollen. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Analyse von prädiktiven Biomarkern, welche zur Einschätzung eines potenziellen Therapieerfolgs nützlich sein könnten [51, 53].

In der Rheumatologie besteht eine große Nachfrage an neuen prädiktiven Biomarkern, da ein Großteil, der mit Biologika behandelten Patienten kein adäquates Ansprechen auf die kostenintensiven Behandlungen zeigt. Der Nutzen von Biomarkern liegt vor allem in einer möglichen Identifizierung von Krankheitsrisiken sowie einer verbesserten Diagnose und Prognose der Erkrankung. Durch eine vorrausschauende Beurteilung der Therapieresponse wären im Rahmen einer personalisierten Medizin mit Hilfe geeigneter Biomarker zielgerichtetere Therapien möglich. Somit könnten unwirksame Therapien frühzeitig erkannt bzw. vermieden werden, die Medikation individueller an den jeweiligen Patienten angepasst und mögliche Nebenwirkungen reduziert werden [51].

Durch den Einsatz neuer Technologien, zu denen u.a. Einzelzellanalysen wie Durchflusszytometrie und Massenzytometrie zählen, konnten in der Vergangenheit eine Vielzahl neuer Biomarker identifiziert werden [54].

Aufgrund des wachsenden Angebots an zielgerichteten, jedoch teuren Biologika erfahren neue Testmethoden wie die therapiebegleitende Diagnostik bzw. Companion Diagnostics auf dem Gebiet der Rheumatologie zunehmend an Bedeutung [55]. Diese Form der Präzisionsmedizin berücksichtigt die aus genetischen und umweltbedingten Faktoren bestehende patientenspezifische biologische Komplexität, die für die heterogene Therapieresponse verantwortlich ist und nutzt diese Heterogenität zur Einteilung der Patienten in Gruppen entsprechend klinischer Merkmale wie Therapieresponse- oder versagen [56]. Durch eine zeitnahe Einteilung von effektiven Medikamenten verspricht dieser Ansatz eine frühe Entscheidungshilfe bei der Therapiewahl [57, 58].

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass verschiedene demografische und klinische Parameter wie eine hohe Krankheitsaktivität, eine kurze Krankheitsdauer, junges Patientenalter, männliches Geschlecht und das Vorhandensein von HLA-B27 mit einer adäquaten klinischen Kurz- und Langzeit-Response in Verbindung stehen [59-63]. Als zusätzliche Patientencharakteristika zu Therapiebeginn, die mit einem schlechten

Ansprechen auf TNF-Inhibitoren in AS korrelieren, sind ein hoher Body-Mass-Index (BMI) und aktueller oder ehemaliger Nikotingenuss der Patienten beschrieben [64, 65]. Viele Studien zur Vorhersage des Behandlungsausgangs konzentrierten sich allerdings auf lösliche Marker wie Zytokine oder Chemokine, die im Serum messbar sind. Da diese Moleküle von den Zellen jedoch in der Regel nur in geringen Mengen ausgeschieden werden, führen die Messungen am Rand der unteren Nachweisgrenze häufig zu widersprüchlichen Ergebnissen. Im Serum von AS-Patienten wurden z.B. höhere Ausgangswerte der zirkulierenden Entzündungsmarker C-reaktives Protein (CRP), IL-6, des C-terminal vernetzenden Telopeptid von Typ-II-Kollagen (CTX-II), der Matrixmetalloproteinase (MMP)-3 und des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) sowie niedrige YLK-40-Werte mit einer erfolgreichen Therapie-Response in Zusammenhang gebracht [66]. Andere Studien beschrieben kürzlich eine Korrelation von Calprotectin, einem heterodimeren Proteinkomplex aus S100A8- und S100A9-Untereinheiten und dem erfolgreichen Ansprechen auf eine anti-TNF-Therapie in SpA [67]. Bezüglich RA-Patienten konnte gezeigt werden, dass die Serumspiegel der Proteine MRP 8/14 und der Chemokine CXCL10 sowie CXCL13 in der Gruppe der Responder verglichen zu den Non-Respondern vor Beginn einer Therapie mit Biologika signifikant erhöht waren [68, 69].

Im Hinblick auf die Rolle des Stoffwechsels und des Darmmikrobioms bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen konnte in jüngerer Zeit ein Zusammenhang zwischen erhöhten Ausgangswerten des Betaproteobakteriums Burkholderiales bei SpA-Patienten und dem klinischen Ansprechen auf eine anti-TNF-Therapie festgestellt werden [70]. Ein Screening von Stoffwechselprofilen im Urin vor Therapiebeginn ergab, dass bei RA- und PsA-Patienten ein erhöhtes Vorkommen der Metabolite Histamin, Glutamin, Xanthursäure und Ethanolamin mit einem positiven Therapieergebnis assoziiert ist.

Auf Transkriptomebene konnte eine Studie zeigen, dass die Expression des für CD11c kodierenden Integrin-Alpha-X-kodierenden Gens (ITGAX) auf Monozyten des peripheren Blutes von RA-Patienten bei den Respondern zu Behandlungsbeginn signifikant höher war [71], sofern sie eine TNF- α -Monotherapie erhalten haben.

Des Weiteren werden moderne bildgebende Verfahren wie die Magnetresonanztomographie (MRT) dazu verwendet, um den Abbau von Knochen und Gewebe auf die Behandlungsresponse zu beziehen [72]. Diese Techniken sind jedoch zu zeitaufwendig und teuer, um routinemäßig im Rahmen von Voruntersuchungen

angewendet zu werden. In weiterführenden Studien, in denen die Response auf anti-TNF-Biologika mit dem Vorhandensein verschiedener TNF- α -Genotypen in Beziehung gesetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass Patienten mit TNF- α -308 G/G,-857 C/C, oder -1031 T/T Genotypen eine bessere Response zu anti-TNF Biologika aufwiesen als Patienten ohne diesen Polymorphismus [73, 74].

Obwohl zahlreiche Biomarker vornehmlich in Pilotstudien beschrieben werden, verlassen sie selten das experimentelle Stadium und gelangen zur klinischen Anwendung. Darin ist auch der Grund zu sehen, woran die Umsetzung des vielgepriesenen Konzeptes der personalisierten oder individualisierten Medizin bisher gescheitert ist. Insbesondere bei AS steht derzeit noch kein robuster, validierter und einfach anzuwendender Biomarker zur Verfügung.

3.6 Die multiparametrische Durchflusszytometrie als Screening-Plattform für zellbasierte Biomarker

Auf dem Gebiet der hochdimensionalen Zytometrie konnte in den letzten Jahren hinsichtlich der Entwicklung von neuen Geräten ein exponentielles Wachstum beobachtet werden, wobei Photomultiplier Tube (PMT)-basierte Durchflusszytometer der neuen Generation durch die Implementierung von weiteren Anregungslasern für neu entwickelte Fluorochrome bisher ungenutzte Absorptionsspektren abdecken [75] und somit derzeit bis zu 30 Parameter erfassen können [76]. Auf der Suche nach zellulären Biomarkern im peripheren Blut ist die Durchflusszytometrie die Methode der Wahl, da gleichzeitig die Erfassung phänotypischer und funktioneller Eigenschaften auf Einzelzellniveau möglich ist. Aufgrund ihrer multiparametrischen Natur besitzt diese Technologie zusammen mit rechnergestützten Analysemethoden das Potenzial zu einem Hypothesen-generierendem, explorativen Ansatz, welcher unter Anwendung eines innovativen Cluster-Algorithmus auch der vorliegenden Arbeit zugrunde liegt. Um in der Zytometrie eine höhere Dimensionalität zu erzielen, wurden in den vergangenen Jahren konventionelle Technologien kontinuierlich weiterentwickelt. Bei PMT- und spektralbasierten Zytometern wurde beispielsweise der zur Anregung von Fluorochromen nutzbare Wellenbereich durch Einsatz von UV-Lasern erweitert. Auf dem Gebiet der bildgebenden Durchflusszytometrie wurden außerdem Methoden zur Detektion der Zellmorphologie implementiert. Neue Technologien, wie die Massenzytometrie, die auf der Verwendung von mit stabilen Metallisotopen markierten

Antikörpern basiert, sowie die bildgebende Massenzytometrie sind auf einer Kombination der Grundprinzipien von Durchflusszytometrie und Massenspektrometrie begründet [77].

Von den vielen möglichen Assays, die mit Hilfe der Durchflusszytometrie realisierbar sind, wurde in dieser Arbeit die Immunphänotypisierung angewandt. Die zunehmende Anzahl von Parametern, die gleichzeitig erfasst werden können, führt jedoch hinsichtlich der nachgeschalteten Datenverarbeitung zu einer erheblichen Komplexität. Um die hochdimensionalen Daten voll ausschöpfen zu können, ist daher die Entwicklung von mathematischen Algorithmen mit der die bestmögliche Korrelation zwischen Biomarkern, Arzneimittelwirkung und klinischen Ergebnis ermittelt werden kann und die somit eine personalisierte Behandlung der Patienten verbessert daher unverzichtbar [78].

3.7 Ziel und Ergebnis der Arbeit

In dieser Arbeit wurde das Ziel verfolgt, mit Hilfe eines multiparametrischen, durchflusszytometrischen Ansatzes zellbasierte Biomarker im peripheren Blut von AS-Patienten zu identifizieren, welche schon vor Behandlungsbeginn ein erfolgreiches therapeutisches Ansprechen gegenüber TNF- α -Inhibitoren prognostizieren. Als wichtigstes Ergebnis dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es Unterschiede in der immunphänotypischen Zusammensetzung des NK-Zell-Kompartimentes bei AS Patienten gibt, die gut, schlecht oder gar nicht auf eine anti-TNF-Therapie ansprechen. So zeigt eine niedrige Frequenz von CD8-exprimierenden NK-Zellen im Blut bereits vor Behandlungsbeginn an, dass Patienten eher nicht von einer TNF- α -Therapie profitieren werden. Dieser Parameter war sowohl bei Patienten auffällig, die mit dem TNF- α neutralisierenden Antikörper Adalimumab als auch mit dem TNF- α bindenden, löslichen Rezeptor, Etanercept, behandelt wurden.

Obwohl die pathophysiologische Bedeutung von unterschiedlichen NK Zell-Phänotypen im Krankheitsverlauf der AS bisher noch weitestgehend ungeklärt ist, so sind die Ergebnisse dieser Arbeit doch von großer klinischer Bedeutung, einen relativ einfach durchflusszytometrisch zu messenden Biomarker zur Verfügung zu haben, der für eine individualisierte Therapieempfehlung zu Hilfe genommen werden kann. Aufgrund des „Proof-of-Concept“-Charakters dieser Arbeit muss das diagnostische Potenzial von NK-

Zellen zum Therapie-Ansprechverhalten von TNF- α Biologika an einem größeren Patientenkollektiv validiert werden.

4 Methoden

4.1 Patientenkollektiv

Die vorliegende Arbeit wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki 1964 durchgeführt und durch das Ethikkomitee I der Charité Universitätsmedizin (Campus Mitte) genehmigt, wobei alle an der Studie teilnehmenden Patienten über die Studie informiert wurden und eine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme und Blutspende abgegeben haben.

Das Studiendesign beinhaltete insgesamt 31, durch die rheumatologische Ambulanz der Charité rekrutierte, AS-Patienten (22 männlich, 9 weiblich), von denen alle die modifizierten New York-Kriterien [9] erfüllten und 81% HLA-B27 positiv waren, sowie 10 gesunde Probanden (7 männlich, 3 weiblich). Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei $38 \pm 10,2$ Jahren und das der gesunden Kontrollen bei $34 \pm 10,7$ Jahren.

Die Krankheitsaktivität wurde gemäß dem Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) bestimmt, der einen Bereich von 0 (keine Symptome) bis 10 (hohe Krankheitsaktivität) abdeckt. Alle in der Studie eingeschlossenen Patienten wiesen eine anhaltend hohe Krankheitsaktivität auf, welche durch einen BASDAI von größer als 4 gekennzeichnet war, wobei der Mittelwert vor TNF-Blocker-Therapie $6,2 \pm 1,3$ betrug.

Die Behandlung der Patienten mit TNF-Inhibitoren, aufgrund einer erfolglosen Vorbehandlung mit NSAR oder dem Absetzen von NSAR infolge von Nebenwirkungen, wurde als weiteres Einschlusskriterium hinzugezogen. Dabei wurden 15 Patienten mit Etanercept (Enbrel; Amgen and Pfizer) und 16 Patienten mit Adalimumab (Humira; AbbVie Inc.) behandelt. Der BASDAI-Wert wurde jeweils vor der Behandlung und bei den Follow-Up-Besuchen erfasst [79], wobei die Therapieresponse zwischen dem ersten und sechsten Monat nach Behandlungsbeginn bestimmt und als eine 50%-ige BASDAI-Reduktion (BASDAI50 response) in Relation zu dem Baseline-BASDAI definiert wurde. Die Akquise der gesunden Kontrollen erfolgte im Kollegenkreis.

4.2 Präparation der Blutproben, Antikörperfärbung und durchflusszytometrische Messungen

Die Präparation der Blutproben und Antikörperfärbungen für die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten wie bei Steinbrich-Zöllner et al. beschrieben [80]. Die durch Erythrozytenlyse aus 10 ml frischen, heparinisierten Vollblut

gewonnenen Leukozyten der noch unbehandelten Patienten und der gesunden Kontrollen wurden auf 10 unterschiedliche Färbeansätze verteilt, wobei jeder einen Cocktail aus mindestens 7 und höchstens 10 verschiedenen, gegen Oberflächenantigene gerichtete Antikörper enthielt, die wiederum mit 7 verschiedenen Fluorochromen konjugiert vorlagen. In der Summe wurden so 50 verschiedene Oberflächenantigene auf Einzelzell-Niveau analysiert, so dass letztlich ein Immunzell-Profilung von annähernd allen bisher bekannten Leukozytenpopulationen des angeborenen und adaptiven Immunsystems sowie von deren Aktivierungs- und Differenzierungszuständen durchgeführt werden konnte. Nach der Färbung wurden die Zellen in 1% Paraformaldehyd fixiert und innerhalb von 24 Stunden analysiert. Eine Lebend-/Tot-Zellfärbung wurde nicht eingeschlossen, da Zelldebris, Erythrozyten und Thrombozyten gemäß ihren Eigenschaften im Vorwärts- (FSC; Forward Scatter) und Seitwärtsstreulicht (SSC; Side Scatter) ausgeschlossen werden konnten. Die Datenerfassung erfolgte mit einem FACSCanto™ II Flow Cytometer (BD Biosciences, USA), mit dem durchschnittlich eine Million Zellen pro Sample aufgenommen werden konnten. Mit Hilfe einer geeigneten Gating-Strategie war es möglich, bis zu 3 Antigene mit Antikörpern zu detektieren, die mit demselben Fluorochrom gekoppelt waren. Durch diese Strategie war es möglich bis zu 12 Parameter in einem Färbeansatz zu erfassen, obwohl nur 7 Fluoreszenzkanäle zur Verfügung standen. Die Baseline Performance des Zytometers wurde täglich vor Messbeginn mit Hilfe des in der FACSDiva-Software implementierten Geräte-Setups unter Zuhilfenahme sogenannter Tracking-Beads kontrolliert und abgeglichen. Eine vollständige Liste der für die Durchführung der Experimente verwendeten Antikörper und den jeweiligen Fluorochromen ist in der auf dieser Arbeit basierenden Publikation angegeben (S.3, Tab.2) [81]. Ergänzend zum manuellen Gating wurde für die Datenanalyse der automatische Zell-Clusteralgorithmus *immunoClust* eingesetzt [82]. Dieser Algorithmus erlaubt es unabhängig von einer vorgegebenen Gating-Strategie Zellen aufgrund ähnlicher Expressionseigenschaften der untersuchten Antigene zu Cluster zusammenzufassen. Nachfolgend sortiert ein Klassifizierungsalgorithmus diese Cluster in Populationen, welche zwischen verschiedenen Proben vergleichbar sind. Generell bieten computergestützte, automatisierte Anwendungen gegenüber traditionell manuell gesetzten Gates mehrere Vorteile, wie z.B. eine erwartungsfreie, objektivere Betrachtungsweise, die es unabhängig von bekannten Zelltypen ermöglicht, auch

Phänotypen zu erfassen, die aufgrund einer unerwarteten Kombinatorik der untersuchten Antigene eher nicht zu erwarten waren [83].

5 Ergebnisse

5.1 Demografische und klinische Charakteristika der Patienten vor Behandlungsbeginn

Die vorliegende Studie umfasste insgesamt 31 AS-Patienten, wobei die Anzahl an Männern 22 und die Anzahl an Frauen 9 betrug. Das Alter aller Patienten lag durchschnittlich bei $38 \pm 10,2$ Jahren. In der gesamten Patienten-Kohorte lag die Krankheitsdauer bei $140,8 \pm 117,9$ Monaten und der Baseline-BASDAI bei $6,2 \pm 1,3$. Die Beurteilung der Krankheitsaktivität erfolgte im Durchschnitt bei allen AS-Patienten $3,1 \pm 1,4$ Monate nach Therapiebeginn. Nach ein bis sechs Behandlungsmonaten lag die relative Reduktion des BASDAI für alle AS-Patienten bei $47,6 \pm 31,3$ %. Gemäß den BASDAI-Responsekriterien sprachen fünf Patienten in der ETN-Gruppe und sieben Patienten in der ADA-Gruppe nicht auf die Therapie an. Die an der Studie teilnehmenden Patienten wiesen im Hinblick auf demografische Parameter wie Alter und Geschlecht sowie klinische Ausgangscharakteristika wie Krankheitsdauer, Baseline-BASDAI, CRP, der Erythrozytensedimentationsrate (ESR) und des HLA-B27-Status keine signifikanten Unterschiede in den beiden Behandlungsgruppen auf. Die Patienten hatten einen CRP-Ausgangswert von $1,5 \pm 1,7$ mg/dl sowie einen ESR von $33,2 \pm 21,9$ mm/h und waren zu 81% HLA-B27 positiv. Einzelne Werte für ADA und ETN können der Tabelle unten aufgeführten entnommen werden (Tab.1).

Zudem war bezüglich der schon vor Therapiebeginn zur Verfügung stehenden klinischen Parameter keine Unterscheidung zwischen Patienten möglich, die auf TNF- α -Blocker ansprechen und solchen, die nicht angesprochen haben.

Tabelle 1

Demografische und krankheitsbezogene Merkmale von AS-Patienten, die mit ETN bzw. ADA behandelt wurden

| | mit ADA und ETN behandelte AS- Patienten (n = 31) | mit ETN behandelte AS- Patienten (n = 15) | mit ADA behandelte AS- Patienten (n = 16) |
|---------------------------|---|---|---|
| Demografie | | | |
| Geschlecht (m:w) | 22:9 | 11:4 | 11:5 |
| Alter (Jahre) | 38 ± 10,2 | 37,7 ± 11,5 | 38,3 ± 9,2 |
| Krankheitsstatus | | | |
| Krankheitsdauer (Monate) | 140,8 ± 117,9 | 145,1 ± 135,4 | 136,8 ± 103,8 |
| Baseline-BASDAI | 6,2 ± 1,3 | 6,2 ± 1,5 | 6,2 ± 1,2 |
| BASDAI red. (%) | 47,6 ± 31,3 | 51,1 ± 31,7 | 44,3 ± 31,6 |
| BASDAI-Erfassung (Monate) | 3,1 ± 1,4 | 3 ± 1 | 3,2 ± 1,6 |
| BASDAI50 (R:NR) | 19:12 | 10:5 | 9:7 |
| CRP (mg/dl) | 1,5 ± 1,7 | 1,3 ± 1,1 | 1,6 ± 2,2 |
| HLA-B27-positiv (%) | 81 | 87 | 75 |
| ESR (mm/h) | 33,2 ± 21,9 | 31,7 ± 22,3 | 34,6 ± 22,3 |

Die Ergebnisse werden als Mittelwert ± SD angezeigt, sofern nicht anders angegeben

ADA Adalimumab, AS ankylosierende Spondylitis, BASDAI Bath Ankylosing Disease Activity Index, BASDAI red. prozentuale BASDAI-Reduktion nach 1–6-monatiger Therapie, BASDAI50 BASDAI-Reduktion nach einer Verbesserung von 50%, CRP C-reaktives Protein, ESR Erythrozytensedimentationsrate, ETN Etanercept, HLA menschliches Leukozyten-Antigen, m männlich, NR Non-Responder, R Responder, w weiblich

5.2 Identifizierung signifikanter Parameter mittels des ImmunoClust-Algorithmus

Zur besseren Visualisierung wurden die signifikanten, immunphänotypischen Parameter in einem zweidimensionalen hierarchischen Cluster dargestellt, welches alle Untergruppen der Leukozyten einschließlich bestimmter Aktivierungsmarker, die in den Gruppen der Responder und Non-Responder eine unterschiedliche Expression zeigten,

zusammenfasst. Neben dem NK-Zell-Kompartiment zugehörigen Populationen konnten zudem Subpopulationen der B-Zellen, T-Zellen, Monozyten und Granulozyten durch den ImmunoClust-Algorithmus detektiert werden. Hier sind besonders CD8+CD45RA+CD27+ T-Zellen und CD38+ Lymphozyten zu nennen, die zwar eine Diskriminierung von Respondern und Non-Respondern erlaubten, jedoch eine geringe Signifikanz aufwiesen.

Als Datengrundlage wurden FCS (Flow Cytometry Standard)-Dateien unkompenzierter Rohdaten verwendet. Unter Anwendung des ImmunoClust-Algorithmus auf alle Patientenproben konnten insgesamt 36 Parameter identifiziert werden. Obwohl die Verwendung der oben genannten Parameter keine fehlerfreie Klassifikation von Respondern und Non-Respondern ermöglichte, wurden alle Proben in zwei Hauptcluster gruppiert. Überraschenderweise konnten mehr als 50% der diskriminierenden Parameter eindeutig NK-Zell-Subpopulationen zugeordnet werden, wenn die Patienten beider Behandlungsgruppen gemeinsam analysiert wurden. Für weitere Analysen zur Identifizierung NK-Zell-spezifischer, therapierelevanter Responsesignaturen und vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Wirkmechanismen von ETN und ADA, wurden beide Behandlungsgruppen auch separat betrachtet. Hier konnte der ImmunoClust-Algorithmus in der mit ETN behandelten Gruppe 21 und in der mit ADA behandelten Patienten-Kohorte 27 Phänotypen identifizieren. Diesen Ansatz folgend, hatte die Mehrheit aller Parameter, welche einen signifikanten Unterschied zwischen Non-Respondern und Respondern der ETN- und ADA-Gruppe zeigten, einen Bezug zu dem NK-Zell-Kompartiment. Die beste Klassifizierung von Respondern und Non-Respondern konnte in der Gruppe der ETN-behandelten Patienten erzielt werden. Hier wurden nur 2 von 10 Respondern als Non-Responder gruppiert und ein einziger aus 5 Non-Respondern als Responder klassifiziert.

5.3 Validierung von klassischen NK-Zellen und CD8-positiven NK-Zellen als potenzielle immunologische Biomarker für eine anti-TNF- α -Therapieprädiktion

Da sowohl die prozentuale Verteilung klassischer NK-Zellen und insbesondere das Verhältnis von CD8-positiven und CD8-negativen NK-Zellen als die vielversprechendsten Prädiktoren für eine erfolgreiche anti-TNF-Therapieresponse erschienen, folgte eine detailliertere, manuelle Auswertung mit Fokus auf das NK-Zell-

Kompartiment und insbesondere der Rezeptorexpression von CD8. Obwohl mehrere Antigene mit Antikörpern markiert wurden, die an dasselbe Fluorochrom gekoppelt waren, z.B. durch Kopplung von Phycoerythrin (PE) an CD14/CD56/IgD wie im Methodenteil beschrieben, zeigte das „Backgating“ auf die Monozyten- und NK-Zell- Populationen, dass diese komplexen Färbungen hinsichtlich NK-, B- und T-Zellen sowie Monozyten eindeutig aufgelöst werden konnten. Unter Anwendung der allgemeinen Gating-Strategie zur Bestimmung von klassischen CD56^{dim}CD16⁺ NK-Zellen, wurde als erstes ein Lymphozyten-Scatter-Gate gesetzt. Um den prozentualen Anteil von CD56^{dim}CD16⁺ NK-Zellen zu bestimmen, wurden danach T- und B-Zellen aus der Lymphozytenpopulation ausgeschlossen. Daraufhin wurden die CD8-positiven NK-Zellen durch ein untergeordnetes Gate quantifiziert. Dabei konnte eine signifikant höhere Frequenz von CD8-positiven NK-Zellen in der Gruppe der Responder verglichen mit der Gruppe der Non-Responder beobachtet werden. Um Krankheits-assoziierte immunophänotypische Veränderungen analysieren und besonders um eine Aussage über die Verteilung von NK-Zell-Subpopulationen bezüglich ihrer CD8-Expression im Vergleich zu gesunden Spendern stellen zu können, wurde außerdem Blut von 10 gesunden Kontrollpersonen untersucht. Die Gruppe der Normalspender wurde gemäß einer möglichst hohen Übereinstimmung bezogen auf das Alter und Geschlecht zur Patientengruppe ausgewählt. In der auf diese Arbeit bezogenen Publikation ist eine Gegenüberstellung der Frequenzen CD8-positiver NK-Zellen gesunder Probanden und anti-TNF Responder sowie anti-TNF Non-Responder dargestellt (S.7, Abb. 3) [81]. Beim Vergleich des prozentualen Anteils von CD8-positiven NK-Zellen mit gesunden Kontrollen, zeigten AS-Patienten, welche nicht auf die Therapie ansprechen würden in allen drei Behandlungsgruppen (ADA+ETN, ETN, ADA), eine niedrigere Frequenz an CD8-exprimierenden NK-Zellen, wobei dieser Unterschied nur bei den Non-Respondern der ETN-Therapiegruppe eine Signifikanz zeigte ($p=0,01$). Responder zeigten im Vergleich zu gesunden Kontrollen dahingegen eine erhöhte Frequenz CD8-positiver NK-Zellen, die allerdings keine statistische Signifikanz aufwies.

In Rangkorrelationsanalysen nach Spearman und linearen Regressionsanalysen konnte unter Berücksichtigung aller 31 Patienten eine signifikante inverse Korrelation der Frequenzen klassischer NK-Zellen und einem verbesserten Therapieausgang festgestellt werden (Abb. 1A: $p = 0,01$; $R^2 = 0,19$). Die getrennte Betrachtung der ADA- (Abb. 1A: $p = 0,06$; $R^2 = 0,23$) sowie ETN- (Abb. 1A: $p = 0,08$; $R^2 = 0,22$) Kohorte zeigte

dabei keine Verbesserung bezüglich der Qualität des prädiktiven Parameters.

Betrachtet man die Frequenzen von CD8-exprimierenden NK-Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der klassischen NK-Zellen, so konnte bei Berücksichtigung aller Patienten eine positive, lineare Korrelation beobachtet werden (Abb. 1B: $p = 0,002$; $R^2 = 0,29$), die bei separaten Analysen der mit ETN (Abb. 1B: $p = 0,001$; $R^2 = 0,56$) verglichen mit der mit ADA (Abb. 1B: $p = 0,18$; $R^2 = 0,12$) behandelten Patientenkohorte leicht verbesserte Werte zeigte.

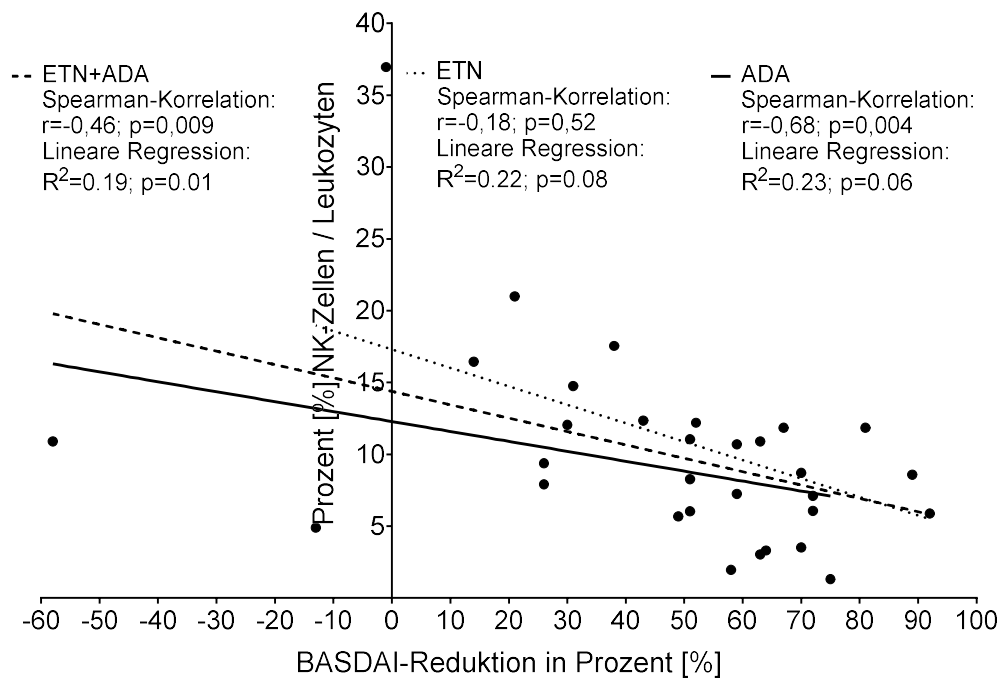
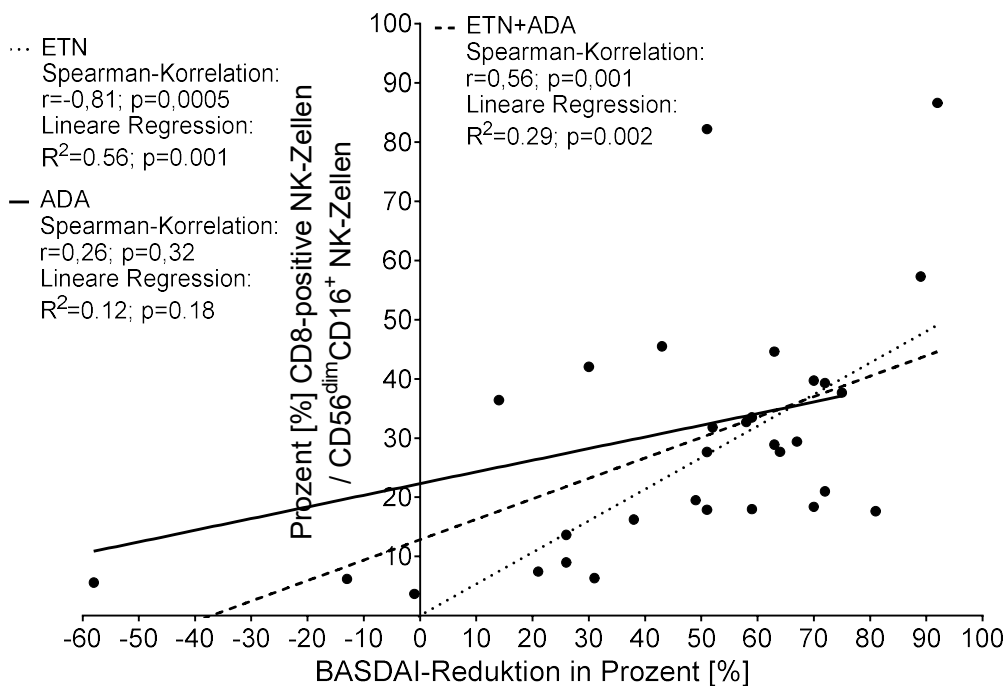
A**B**

Abbildung 1 Lineare Regressions- und Spearman-Rangkorrelationsanalysen zeigen eine relative Abnahme der Werte des Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) innerhalb von 1 bis 6 Monaten nach Behandlung mit ADA und ETN ($n = 31$), nur mit ADA ($n = 16$) sowie nur mit ETN ($n = 15$) verbunden mit Änderungen der prozentualen Häufigkeit von natürlichen Killer (NK) -Zellen (A) und CD8-positiven NK-Zellen (B).

Des Weiteren wurden in ROC (Receiver-Operating-Characteristics)-Kurven dargestellte reverse Regressionsanalysen durchgeführt, um die Nützlichkeit von klassischen und

speziell CD8-positiven NK-Zellen als geeignete zelluläre Biomarker für eine anti-TNF- α -Therapieprädiktion zu verifizieren. Bei Berücksichtigung aller Patientenproben, war die Frequenz klassischer NK-Zellen der vielversprechendste prädiktive Parameter (Abb. 2A: $p = 0,008$; AUC = 0,79). Eine Aufteilung entsprechend den Behandlungsgruppen in ADA (Abb. 2A: $p = 0,04$; AUC = 0,8) und ETN (Abb. 2A: $p = 0,14$; AUC = 0,74) konnte den Wert von klassischen NK-Zellen als Therapieprädiktor nicht verbessern. Bei Verwendung der Frequenz von CD8-positiven NK-Zellen, zeigten sich bei Betrachtung von allen Patienten leicht verbesserte Werte (Abb. 2B: $p = 0,007$; AUC = 0,79). Der prädiktive Wert der CD8-positiven NK-Zellen als Responseparameter wies in der mit ETN (Abb. 2B: $p = 0,002$; AUC = 1) behandelten Patientenkohorte sogar Verbesserung und in der mit ADA (Abb. 2B: $p = 0,37$; AUC = 0,63) behandelten Gruppe eine Verschlechterung auf.

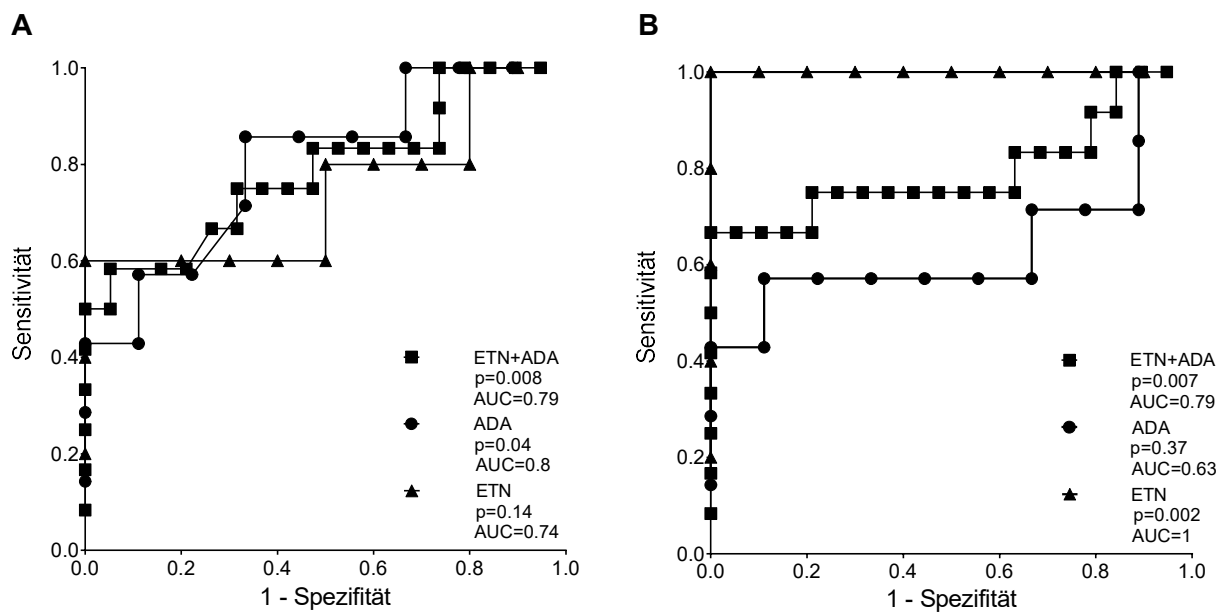


Abbildung 2 ROC-Kurven für alle Patienten und nach Aufteilung entsprechend der jeweiligen Behandlungsgruppen ETN sowie ADA. Der Wert klassischer NK-Zellen (A) und CD8-exprimierender NK-Zellen (B) als Prognosemarker ist durch eine Zunahme des Bereichs unter den Kurvenwerten (area under the curve; AUC) erkennbar.

6 Diskussion

6.1 Ziel der Arbeit

Eine der größten Herausforderungen bei der Behandlung von rheumatischen Erkrankungen besteht in der Entwicklung geeigneter klinischer und biologischer Marker, welche die Diagnose erleichtern, die Krankheitsaktivität einzuschätzen und das therapeutische Ansprechen auf die Behandlung mit immunsuppressiven Biologika-Therapien, insbesondere von TNF-Inhibitoren vorherzusagen vermögen.

Ein wesentliches Ziel dieser als Proof-of-Concept zu verstehenden Arbeit lag daher in der Identifizierung von krankheitsspezifischen Veränderungen in der qualitativen und/oder quantitativen Zusammensetzung des Leukozyten-Kompartimentes des peripheren Blutes, welche die lokalen Entzündungsreaktionen im Gelenk oder Gewebe widerspiegeln und für eine verbesserte Diagnostik einsetzbar wären. Im Besonderen wurde bei diesem Versuchsansatz der Fokus auf die Detektion von zellulären Biomarkern gelegt, welche schon vor Behandlungsbeginn eine Klassifikation von AS-Patienten hinsichtlich der Response auf anti-TNF-Blocker ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit ein multiparametrischer, durchflusszytometrischer Ansatz zusammen mit einer neuen unabhängigen Datencluster-Methode durchgeführt. Ein ähnlicher Ansatz wurde in der Vergangenheit für die Klassifizierung von aktiven AS-Patienten und gesunden Spendern hinsichtlich spezifischer phänotypischer Veränderungen erfolgreich angewendet [80].

6.2 Patienten- und Laborparameter als Baseline-Prädiktoren in AS

Die innerhalb der letzten Jahre vorgestellten, beispielsweise durch molekulare oder genomischen Techniken identifizierten Biomarkern, welche das klinische Ansprechen bei rheumatisch-entzündlichen Erkrankungen auf eine anti-TNF-Therapie vorhersagen sollen, konnten bisher durch unabhängige Studien nicht ausreichend validiert werden [84].

Wie schon in der Einleitung erwähnt, werden zwar Entzündungsparameter, wie z.B. CRP- und ESR-Werte sowie das Protein Serum-Amyloid A (SAA) als mögliche Baseline-Prädiktoren für eine erfolgreiche anti-TNF- α -Therapieresponse bei HLA-B27-positiven AS-Patienten in der klinischen Praxis angewendet, allerdings sind diese Marker bezüglich Spezifität und Sensitivität nur von sehr geringem prädiktivem Wert

und daher für eine personalisierte Prädiktion der Therapieresponse ungeeignet [85]. Erhöhte CRP- oder ESR-Werte werden beispielsweise nur bei etwa 40–50% der SpA-Patienten beobachtet [39]. Zudem kann der CRP-Spiegel auch infolge von Alterung, Anämie, Infektionen oder dem Vorhandensein von Immunglobulinen erhöht sein [70]. Auch in der vorliegenden Arbeit ließen diese klassischen, jedoch unspezifischen Patienten- und Laborparameter, wie z.B. das Alter, die Krankheitsdauer, CRP- und ESR-Werte, keine Vorhersage bezüglich des Ansprechens auf eine anti-TNF-Therapie zu. Neue in der Literatur vorgestellte, molekulare Biomarker, wie der Einzelnukleotid-Polymorphismus (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) des TNF-Gens, die Aktivität der Endoplasmatischen Retikulum Aminopeptidase (ERAP)-1 [86], Serumlevel der Matrix-Metalloprotease (MMP)-3 [87] oder des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) [88] konnten bisher noch nicht zufriedenstellend in größeren AS-Kohorten validiert werden. Ein grundsätzliches Problem dieser Studien stellt die Korrelation von messbaren Biomarker und dem Krankheitsaktivitätsscore BASDAI dar, da dieser lediglich auf der Basis des subjektiven Wohlbefindens von Patienten berechnet wird und somit als Messparameter nur von eingeschränktem Wert ist.

6.3 Bedeutung von Immunzellen für die anti-TNF- α -Therapieprädiktion

Im Hinblick auf einen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit bestimmter Immunzellen und dem Ansprechen auf eine Biologika-Therapie, konnte der ImmunoClust-Algorithmus Subpopulationen der B-Zellen, T-Zellen, Monozyten und Granulozyten detektieren. Darunter sind z.B. naive CD8 T-Zellen mit dem Phänotyp CD45RA⁺CD27⁺ zu nennen, die bei den Therapierespondern eine höhere Frequenz aufwiesen als in der Nonresponder-Gruppe. Die Beobachtung, dass ein Zusammenhang zwischen Subpopulationen von T-Zellen und dem Ansprechen auf anti-TNF-Inhibitoren besteht, steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien. So sollen CD8 T-Zellen, die spezifisch an Apoptose-verwandte Antigene binden, bei anti-TNF-Respondern in RA signifikant erhöht sein [89]. B-Zellen wurden ebenfalls in vergangenen Studien als Prädiktoren für das Ansprechen auf anti-TNF-Therapien geprüft. In einer Studie wurden hohe Ausgangswerte von CD27⁺ Memory-B-Zellen bei RA-Patienten mit einem guten Behandlungserfolg in Verbindung gebracht [90]. Die Ergebnisse vergangener Studien wiesen jedoch hinsichtlich potenzieller Prädiktoren für das Ansprechen auf eine anti-TNF-Therapie einen Mangel an Konsistenz auf.

6.4 NK-Zellen in AS

Die Parameter mit der höchsten Signifikanz, die durch die Cluster-Analyse identifiziert werden konnten, sind jedoch dem NK-Zell-Kompartiment zuzurechnen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Studien, konnte hier gezeigt werden, dass die angeborene Immunität und dabei insbesondere die NK-Zellen eine zentrale Rolle in der Ätiologie verschiedener Autoimmunerkrankungen, sowohl in protektiver als auch in pathogener Weise, spielen. So zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass ein erhöhter Anteil der Hauptpopulation der NK-Zellen (CD56^{dim}CD16⁺) auf eine schwache therapeutische anti-TNF- α -Response hinweist. In der Vergangenheit wurde die Häufigkeit und Funktionalität von NK-Zellen innerhalb chronisch-inflammatorischer Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis [91], der Multiplen Sklerose [92], der Psoriasis [93] und dem systemischen Lupus Erythematoses [94] in mehreren Studien untersucht. Trotz einiger widersprüchlicher Ergebnisse in der Literatur ist eine allgemeine Abnahme der Anzahl zirkulierender NK-Zellen sowie eine eingeschränkte zytologische Aktivität beschrieben. In AS wird die Funktionalität der NK-Zellen ebenfalls als beeinträchtigt beschrieben [95], doch im Gegensatz zu anderen Autoimmunerkrankungen konnte in verschiedenen Studien eine erhöhte Frequenz von NK-Zellen beobachtet werden [96]. Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse konnten durch eine Gegenüberstellung der Non-Responder mit Normal Spendern in dieser Arbeit bestätigt werden, wobei jedoch der Anteil der NK-Zellen in der Responder-Kohorte verglichen mit gesunden Individuen ähnlich war. Der Zusammenhang von NK-Zellen und der Ätiologie von AS ist durch die Expression der sogenannten KIR-Rezeptoren gegeben, die genotypabhängig an das zu 80-90% in AS-Patienten exprimierte HLA-B27 Antigen binden [14]. Einhergehend mit einer krankheitsbedingt erhöhten Anzahl von KIR3DL1⁺ NK-Zellen in AS ist die IFN- γ Produktion entsprechend verringert. Überdies sind aktivierte KIR3DL2⁺ NK-Zellen in SpA erhöht und könnten eine pathogene Rolle spielen [97]. Nach dem bisherigen Kenntnisstand sind NK-Zellen jedoch nicht nur durch die Interaktion ihrer KIR-Rezeptoren mit HLA-B27 an der Pathogenese von AS beteiligt, sondern auch durch die Sekretion inflammatorischer Zytokine und deren Wirkung auf Treg-Zellen [98]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie beschreibt einen Zusammenhang zwischen einer verringerten A20-Expression auf zirkulierenden CD56^{bright}-NK-Zellen und der Krankheitsaktivität von AS-Patienten und

sieht in dem Parameter einen nützlichen prognostischen Indikator sowie ein potenzielles therapeutisches Ziel [99].

6.5 CD8 α -exprimierende NK-Zellen in AS

Im Rahmen dieser Arbeit brachte eine fundierte Analyse des NK-Zell-Kompartiments zum Vorschein, dass eine erhöhte Frequenz von CD8-exprimierenden klassischen NK-Zellen eine signifikante, positive Korrelation mit der anti-TNF-Response aufweist. Obwohl der Determinationskoeffizient R^2 , der die Anpassungsgüte eines Regressionsmodells bzw. die Größe des Zusammenhangs zwischen den Variablen darstellt [100] in den durchgeführten Korrelationsanalysen einen relativ niedrigen Wert aufzeigt, konnte dennoch in allen untersuchten Behandlungsgruppen ein signifikanter p-Wert von $<0,05$ ermittelt werden.

Eine Gegenüberstellung der gesunden Kontrollen mit allen AS-Patienten zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Frequenz von CD8-positiven NK-Zellen. Lediglich bei AS-Patienten der ETN-Behandlungsgruppe, welche nicht auf die Therapie ansprachen, waren signifikant niedrigere Werte als bei den Normal Spendern zu beobachten [81].

Es ist bekannt, dass in etwa 40% der NK-Zellen CD8 in einer α/α homodimeren Form exprimiert wird, wobei die CD8-positive Subpopulation erhöhte zytotoxische Eigenschaften, verglichen mit dem CD8-negativen Pendant, zeigt [101].

In dieser Arbeit konnten keine signifikanten alters- oder geschlechtsbedingten Unterschiede hinsichtlich der Frequenz von CD8-positiven NK-Zellen, weder in der Gruppe der gesunden Kontrollen noch bei den AS-Patienten, ermittelt werden. Wenn CD8 α -exprimierende NK-Zellen direkt an dem durch anti-TNF- α Blocker vermittelten immunsuppressiven Effekt beteiligt sind, kann angenommen werden, dass ihre erhöhte zytotoxische Aktivität, oder ihre eingeschränkte Fähigkeit bezüglich einer durch Zytotoxizität vermittelten Apoptose, zu dem beobachteten effektiveren Ansprechen gegenüber TNF-Blockern führt. Alternativ kann angenommen werden, dass eine Bindung der CD8 α -Rezeptoren auf NK-Zellen mit Molekülen der HLA-I Familie eine erhöhte Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α and IFN- γ hervorruft [102], was wiederum sowohl die Synthese von TNFR als auch seine Proteolyse in eine lösliche Form begünstigt [103]. Über diesen Mechanismus können endogen synthetisierte sTNFRs [104] den Wirkmechanismus von therapeutischen TNF-

Inhibitoren unterstützen [105]. Diese sogenannten „Decoy-Rezeptoren“, führen indirekt zu einer Inaktivierung von TNF und könnten daher als ein natürlicher TNF-Antagonist vergleichbar mit ETN fungieren [106].

6.6 Unterschiede von ETN- und ADA-behandelten Patienten bezüglich der Response-Prädiktion

Da in der vorliegenden Arbeit sowohl mit ADA als auch mit ETN behandelte Patienten untersucht wurden, war es möglich Unterschiede bezüglich der Neutralisation von TNF- α zu untersuchen. Obwohl sich durch diese getrennte Betrachtung beider Therapien die Anzahl der Patienten innerhalb der Behandlungsgruppen verringerte und somit zu einer verminderten statistischen Aussagekraft der Prädiktionsanalysen führte, konnte eine bessere Korrelation der mit ETN behandelten Patienten verglichen mit den ADA-therapierten Patienten festgestellt werden. Aus diesem Grund erscheint es vielversprechend, die Ergebnisse dieser Arbeit in unabhängigen Kohorten, die eine adäquate Gruppengröße besitzen, zu validieren. Ließen sich die Ergebnisse bestätigen, würde dies darauf hinweisen, dass ETN, neben der Neutralisation von TNF- α alternative, möglicherweise indirekte Wirkmechanismen besitzt.

6.7 Vergleichende Genexpressionsanalysen von CD8⁺ und CD8⁻ NK Zellpopulationen

Da relativ wenig über die funktionelle Bedeutung von CD8-positiven und CD8-negativen NK-Zell-Subsets bekannt ist, wurden vergleichende globale Transkriptom-Analysen mittels Affymetrix-Genchips von hochaufgereinigten Zell-Subsets bei gesunden Individuen durchgeführt. Obwohl annähernd 2.500 differentiell exprimierte Transkripte identifiziert werden konnten, wurden keine Unterschiede in der Expression von TNFR1, TNFR2 oder TNF- α festgestellt, die auf eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber TNF-blockierende Therapien hingedeutet hätten. Da diese Untersuchungen bisher nur bei Zellen von gesunden Individuen durchgeführt wurden, bleibt noch die Frage offen, ob bei Zellen von AS-Patienten möglicherweise Unterschiede in der Expression von TNFR oder TNF- α unter chronisch inflammatorischen Bedingungen existieren.

6.8 Limitation der Studie und Ausblick

Da es sich bei der vorliegenden Arbeit um eine explorative Studie mit „Proof-of-Concept“-Charakter handelt, die aufzeigen sollte, ob zelluläre Veränderungen im Blut von AS-Patienten ein diagnostisches bzw. prädiktives Potential hinsichtlich der Therapieresponse besitzen, ist die Anzahl der eingeschlossenen Patienten und gesunden Probanden nur von geringem Umfang. Zudem wurden die Patienten mit verschiedenen TNF-Inhibitoren behandelt, die unterschiedliche Wirkmechanismen besitzen. Dies stellt in Bezug auf Analysen von Subpopulationen und der statistischen Aussagekraft eine Limitation der Studie dar, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollte. Eine weitere Validierung der Ergebnisse in einer unabhängigen Kohorte von Patienten mit AS sowie anderen rheumatischen und gastrointestinalen Erkrankungen, bei denen anti-TNF-Blocker verabreicht werden ist daher notwendig.

Eine weitere Einschränkung stellt die Verwendung des BASDAI zur Bestimmung der Krankheitsaktivität dar, da dieser nicht wie der ASDAS (Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score) Laborwerte einschließt, sondern lediglich auf den subjektiven Einschätzungen der Patienten basiert.

Auch der relativ lange Untersuchungszeitraum, in dem die Proben aufbereitet und gemessen wurden, muss berücksichtigt werden. Bedingt durch die Alterung der Messgeräte und Antikörper sowie der Verwendung von Reagenzien unterschiedlicher Chargen ist daher von einer größeren Varianz der akquirierten Daten auszugehen. Bei dem Immunphänotypisierungsansatz dieser Arbeit ist die Anzahl der zu erfassenden Parameter vergleichsweise beschränkt. In den vergangenen Jahren hat das erweiterte Spektrum an detektierbaren Parametern durch den Einsatz von massenzytometrischen Messverfahren jedoch auch die Erfassung seltenerer Zellpopulationen ermöglicht [107].

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass zelluläre Response-Signaturen im peripheren Blut mit Hilfe eines umfangreichen immunphänotypischen Ansatzes identifiziert werden können und somit eine Klassifikation von AS-Patienten hinsichtlich des Ansprechens auf TNF-Inhibitoren schon vor Therapiebeginn ermöglichen. Die Verwendung von CD8-positiven NK-Zellen als Biomarker für eine TNF- α -Response bei AS-Patienten erscheint dabei besonders vielversprechend. Basierend auf den Daten dieser Arbeit, kann angenommen werden, dass CD8-positive NK-Zellen offensichtlich in der Lage sind den neutralisierenden Effekt von TNF-Blockern zu verstärken. Dennoch ist eine weiterführende Validierung in einer unabhängigen Patientenkohorte von AS und anderen rheumatischen Erkrankungen sinnvoll. Der exakte Mechanismus, inwieweit CD8-positive NK-Zellen und der therapeutische Effekt von TNF-Blockern in AS zusammenhängen, ist zwar noch weitgehend ungeklärt, dennoch bietet das Monitoring dieser Zellen mittels Durchflusszytometrie, besonders in Bezug auf ein personalisiertes Therapiekonzept, eine aussichtsreiche prognostische Option.

8 Literaturverzeichnis

1. Braun J and Sieper J. *Ankylosing spondylitis*. The Lancet, 2007. 369(9570): p. 1379-1390.
2. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC and Sturrock RD. *Ankylosing spondylitis and HL-A 27*. Lancet, 1973. 1(7809): p. 904-7.
3. Puchner R. *Rheumatologie aus der Praxis. Entzündliche Gelenkerkrankungen – mit Fallbeispielen*. Springer-Verlag, 2017: p. 42.
4. Dean LE, Jones GT, MacDonald AG, Downham C, Sturrock RD and Macfarlane GJ. *Global prevalence of ankylosing spondylitis*. Rheumatology, 2013. 53(4): p. 650-657.
5. Feldtkeller E, Khan M, van der Heijde D, van der Linden S and Braun J. *Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis*. Rheumatology international, 2003. 23(2): p. 61-66.
6. Hill HF, Hill AG and Bodmer JG. *Clinical diagnosis of ankylosing spondylitis in women and relation to presence of HLA-B27*. Ann Rheum Dis, 1976. 35(3): p. 267-70.
7. Rudwaleit M, Khan MA and Sieper J. *The challenge of diagnosis and classification in early ankylosing spondylitis: do we need new criteria?* Arthritis & Rheumatism, 2005. 52(4): p. 1000-1008.
8. Schett G, Coates LC, Ash ZR, Finzel S and Conaghan PG. *Structural damage in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis: traditional views, novel insights gained from TNF blockade, and concepts for the future*. Arthritis Res Ther, 2011. 13 Suppl 1(1): p. S4.
9. van der Linden S, Valkenburg HA and Cats A. *Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria*. Arthritis Rheum, 1984. 27(4): p. 361-8.
10. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewe R, Listing J, Akkoc N, Brandt J, Braun J, Chou CT, Collantes-Estevez E, Dougados M, Huang F, Gu J, Khan MA, Kirazli Y, Maksymowych WP, Mielants H, Sorensen IJ, Ozgocmen S, Roussou E, Valle-Onate R, Weber U, Wei J and Sieper J. *The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection*. Ann Rheum Dis, 2009. 68(6): p. 777-83.
11. Trull A, Ebringer A, Panayi G, Ebringer R and James DC. *HLA-B27 and the immune response to enterobacterial antigens in ankylosing spondylitis*. Clin Exp Immunol, 1984. 55(1): p. 74-80.
12. Jethwa H and Bowness P. *The interleukin (IL)-23/IL-17 axis in ankylosing spondylitis: new advances and potentials for treatment*. Clinical & Experimental Immunology, 2016. 183(1): p. 30-36.
13. Mei Y, Pan F, Gao J, Ge R, Duan Z, Zeng Z, Liao F, Xia G, Wang S, Xu S, Xu J, Zhang L and Ye D. *Increased serum IL-17 and IL-23 in the patient with ankylosing spondylitis*. Clinical Rheumatology, 2011. 30(2): p. 269-273.
14. Azuz-Lieberman N, Markel G, Mizrahi S, Gazit R, Hanna J, Achdout H, Gruda R, Katz G, Arnon TI, Battat S, Zamir E, Adawi M, Mader R and Mandelboim O. *The involvement of NK cells in ankylosing spondylitis*. Int Immunol, 2005. 17(7): p. 837-45.
15. Luque I, Solana R, Galiani MD, González R, García F, López de Castro JA and Peña J. *Threonine 80 on HLA-B27 confers protection against lysis by a group of natural killer clones*. Eur J Immunol, 1996. 26(8): p. 1974-7.
16. Wright PB, McEntegart A, McCarey D, McInnes IB, Siebert S and Milling SW. *Ankylosing spondylitis patients display altered dendritic cell and T cell populations that implicate pathogenic roles for the IL-23 cytokine axis and intestinal inflammation*. Rheumatology (Oxford), 2016. 55(1): p. 120-32.
17. Wang J, Zhao Q, Wang G, Yang C, Xu Y, Li Y and Yang P. *Circulating levels of Th1 and Th2 chemokines in patients with ankylosing spondylitis*. Cytokine, 2016. 81: p. 10-14.

18. Zhang L, Li YG, Li YH, Qi L, Liu XG, Yuan CZ, Hu NW, Ma DX, Li ZF, Yang Q, Li W and Li JM. *Increased Frequencies of Th22 Cells as well as Th17 Cells in the Peripheral Blood of Patients with Ankylosing Spondylitis and Rheumatoid Arthritis*. PLOS ONE, 2012. 7(4): p. e31000.
19. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK and Spits H. *Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from TH-17, TH1 and TH2 cells*. Nature Immunology, 2009. 10(8): p. 864-871.
20. Liao HT, Lin YF, Tsai CY and Chou CT. *Regulatory T cells in ankylosing spondylitis and the response after adalimumab treatment*. Joint Bone Spine, 2015. 82(6): p. 423-7.
21. Kruithof E, Baeten D, De Rycke L, Vandooren B, Foell D, Roth J, Cañete JD, Boots AM, Veys EM and De Keyser F. *Synovial histopathology of psoriatic arthritis, both oligo- and polyarticular, resembles spondyloarthritis more than it does rheumatoid arthritis*. Arthritis Research & Therapy, 2005. 7(3): p. R569.
22. Antoniou AN, Lenart I and Guiliano DB. *Pathogenicity of Misfolded and Dimeric HLA-B27 Molecules*. Int J Rheumatol, 2011. 2011: p. 486856.
23. Rashid T and Ebringer A. *Ankylosing spondylitis is linked to Klebsiella—the evidence*. Clinical Rheumatology, 2007. 26(6): p. 858-864.
24. Ramos M, Alvarez I, Sesma L, Logean A, Rognan D and López de Castro JA. *Molecular Mimicry of an HLA-B27-derived Ligand of Arthritis-linked Subtypes with Chlamydial Proteins **. Journal of Biological Chemistry, 2002. 277(40): p. 37573-37581.
25. Quaden D, De Winter LM and Somers V. *Detection of novel diagnostic antibodies in ankylosing spondylitis: An overview*. Autoimmunity Reviews, 2016. 15(8): p. 820-832.
26. Feldmann M. *Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis*. Nat Rev Immunol, 2002. 2(5): p. 364-71.
27. Braun J, Sieper J, Breban M, Collantes-Estevez E, Davis J, Inman R, Marzo-Ortega H and Mielants H. *Anti-tumour necrosis factor alpha therapy for ankylosing spondylitis: international experience*. Ann Rheum Dis, 2002. 61 Suppl 3(suppl 3): p. iii51-60.
28. Locksley RM, Killeen N and Lenardo MJ. *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. 104(4): p. 487-501.
29. Aggarwal BB, Gupta SC and Kim JH. *Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey*. Blood, 2012. 119(3): p. 651-65.
30. Ware CF, Crowe PD, Vanarsdale TL, Andrews JL, Grayson MH, Jerzy R, Smith CA and Goodwin RG. *Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells*. J Immunol, 1991. 147(12): p. 4229-38.
31. Mason AT, McVicar DW, Smith CA, Young HA, Ware CF and Ortaldo JR. *Regulation of NK cells through the 80-kDa TNFR (CD120b)*. Journal of leukocyte biology, 1995. 58(2): p. 249-255.
32. Yang L, Lindholm K, Konishi Y, Li R and Shen Y. *Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways*. Journal of Neuroscience, 2002. 22(8): p. 3025-3032.
33. Faustman DL and Davis M. *TNF Receptor 2 and Disease: Autoimmunity and Regenerative Medicine*. Front Immunol, 2013. 4: p. 478.
34. Grell M, Douni E and Wajant H. *The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor*. Cell, 1995. 83(5): p. 793-802.
35. Naude PJ, den Boer JA, Luiten PG and Eisel UL. *Tumor necrosis factor receptor cross-talk*. FEBS J, 2011. 278(6): p. 888-98.
36. Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, Boonen A and Zink A. *Ankylosing spondylitis: an overview*. Ann Rheum Dis, 2002. 61 Suppl 3(suppl 3): p. iii8-18.
37. Sieper J and Poddubnyy D. *New evidence on the management of spondyloarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2016. 12(5): p. 282-95.
38. Vincent FB, Morand EF, Murphy K, Mackay F, Mariette X and Marcelli C. *Antidrug antibodies (ADAb) to tumour necrosis factor (TNF)-specific neutralising agents in chronic inflammatory diseases: a real issue, a clinical perspective*. Ann Rheum Dis, 2013. 72(2): p. 165-78.

39. Haberhauer G, Strehblow C and Fasching P. *Observational study of switching anti-TNF agents in ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis versus rheumatoid arthritis*. Wien Med Wochenschr, 2010. 160(9-10): p. 220-4.
40. Baeten D, Kruithof E, Van den Bosch F, Van den Bossche N, Herssens A, Mielants H, De Keyser F and Veys EM. *Systematic safety follow up in a cohort of 107 patients with spondyloarthritis treated with infliximab: a new perspective on the role of host defence in the pathogenesis of the disease?* Ann Rheum Dis, 2003. 62(9): p. 829-34.
41. Lis K, Kuzawinska O and Balkowiec-Iskra E. *Tumor necrosis factor inhibitors - state of knowledge*. Arch Med Sci, 2014. 10(6): p. 1175-85.
42. Braun J, Deodhar A, Dijkmans B, Geusens P, Sieper J, Williamson P, Xu W, Visvanathan S, Baker D, Goldstein N, van der Heijde D and Group Ankylosing Spondylitis Study for the Evaluation of Recombinant Infliximab Therapy Study. *Efficacy and safety of infliximab in patients with ankylosing spondylitis over a two-year period*. Arthritis Rheum, 2008. 59(9): p. 1270-8.
43. Dijkmans B, Emery P, Hakala M, Leirisalo-Repo M, Mola EM, Paolozzi L, Salvarani C, Sanmarti R, Sibia J, Sieper J, Van Den Bosch F, van der Heijde D, van der Linden S and Wajdula J. *Etanercept in the longterm treatment of patients with ankylosing spondylitis*. J Rheumatol, 2009. 36(6): p. 1256-64.
44. Van der Heijde D, Schiff MH, Sieper J, Kivitz AJ, Wong RL, Kupper H, Dijkmans BAC, Mease PJ, Davis JC and Group ATLAS Study. *Adalimumab effectiveness for the treatment of ankylosing spondylitis is maintained for up to 2 years: long-term results from the ATLAS trial*. Annals of the rheumatic diseases, 2009. 68(6): p. 922-929.
45. Deodhar A, Braun J, Inman RD, van der Heijde D, Zhou Y, Xu S, Han C and Hsu B. *Golimumab administered subcutaneously every 4 weeks in ankylosing spondylitis: 5-year results of the GO-RAISE study*. Ann Rheum Dis, 2015. 74(4): p. 757-61.
46. Landewe R, Braun J, Deodhar A, Dougados M, Maksymowych WP, Mease PJ, Reveille JD, Rudwaleit M, van der Heijde D, Stach C, Hoepken B, Fichtner A, Coteur G, de Longueville M and Sieper J. *Efficacy of certolizumab pegol on signs and symptoms of axial spondyloarthritis including ankylosing spondylitis: 24-week results of a double-blind randomised placebo-controlled Phase 3 study*. Ann Rheum Dis, 2014. 73(1): p. 39-47.
47. Menegatti S, Bianchi E and Rogge L. *Anti-TNF Therapy in Spondyloarthritis and Related Diseases, Impact on the Immune System and Prediction of Treatment Responses*. Front Immunol, 2019. 10(382): p. 382.
48. Armuzzi A, Lionetti P, Blandizzi C, Caporali R, Chimenti S, Cimino L, Gionchetti P, Girolomoni G, Lapadula G, Marchesoni A, Marcellusi A, Mennini FS., Salvarani C and Cimaz R. *anti-TNF agents as therapeutic choice in immune-mediated inflammatory diseases: focus on adalimumab*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2014. 27(1 Suppl): p. 11-32.
49. Schulze-Koops H and Skapenko A. *Biosimilars in rheumatology: A review of the evidence and their place in the treatment algorithm*. Rheumatology (Oxford), 2017. 56(suppl_4): p. iv30-iv48.
50. Smolen JS, Goncalves J, Quinn M, Benedetti F and Lee JY. *Era of biosimilars in rheumatology: reshaping the healthcare environment*. RMD Open, 2019. 5(1): p. e000900.
51. Group Biomarkers Definitions Working. *Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework*. Clin Pharmacol Ther, 2001. 69(3): p. 89-95.
52. Burska A, Boissinot M and Ponchel F. *Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis*. Mediators Inflamm, 2014. 2014: p. 545493.
53. Frangogiannis NG. *Biomarkers: hopes and challenges in the path from discovery to clinical practice*. Transl Res, 2012. 159(4): p. 197-204.
54. Robinson WH and Mao R. *Biomarkers to guide clinical therapeutics in rheumatology?* Curr Opin Rheumatol, 2016. 28(2): p. 168-75.
55. Angulo B, Lopez-Rios F and Gonzalez D. *A new generation of companion diagnostics: cobas BRAF, KRAS and EGFR mutation detection tests*. Expert Rev Mol Diagn, 2014. 14(5): p. 517-24.

56. Gibson DS, Bustard MJ, McGeough CM, Murray HA, Crockard MA, McDowell A, Blayney JK, Gardiner PV and Bjourson AJ. *Current and future trends in biomarker discovery and development of companion diagnostics for arthritis*. Expert Rev Mol Diagn, 2015. 15(2): p. 219-34.
57. Bell J. *Stratified medicines: towards better treatment for disease*. Lancet, 2014. 383 Suppl 1: p. S3-5.
58. Hocking LJ and Rivadeneira F. *Stratified medicine approaches for the treatment of musculoskeletal disorders*. Curr Opin Pharmacol, 2014. 16: p. 127-32.
59. Arends S, Brouwer E, van der Veer E, Groen H, Leijnsma MK, Houtman PM, Th A Jansen, Kallenberg CG and Spoorenberg A. *Baseline predictors of response and discontinuation of tumor necrosis factor-alpha blocking therapy in ankylosing spondylitis: a prospective longitudinal observational cohort study*. Arthritis Res Ther, 2011. 13(3): p. R94.
60. Arends S, van der Veer E, Kallenberg CG, Brouwer E and Spoorenberg A. *Baseline predictors of response to TNF-alpha blocking therapy in ankylosing spondylitis*. Curr Opin Rheumatol, 2012. 24(3): p. 290-8.
61. Lord P, Farragher TM, Lunt M, Watson KD, Symmons D, Hyrich KL and Register BSR Biologics. *Predictors of response to anti-TNF therapy in ankylosing spondylitis: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register*. Rheumatology, 2009. 49(3): p. 563-570.
62. Maneiro JR, Souto A, Salgado E, Mera A and Gomez-Reino JJ. *Predictors of response to TNF antagonists in patients with ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis: systematic review and meta-analysis*. RMD Open, 2015. 1(1): p. e000017.
63. Rudwaleit M, Listing J, Brandt J, Braun J and Sieper J. *Prediction of a major clinical response (BASDAI 50) to tumour necrosis factor alpha blockers in ankylosing spondylitis*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2004. 63(6): p. 665-670.
64. Gremese E, Bernardi S, Bonazza S, Nowik M, Peluso G, Massara A, Tulusso B, Messuti L, Miceli MC, Zoli A, Trotta F, Govoni M and Ferraccioli G. *Body weight, gender and response to TNF-alpha blockers in axial spondyloarthritis*. Rheumatology (Oxford), 2014. 53(5): p. 875-81.
65. Grintborg B, Hojgaard P, Lund Hetland M, Steen Krogh N, Kollerup G, Jensen J, Chrysidis S, Jensen Hansen IM, Holland-Fischer M, Hojland Hansen T, Nilsson C, Espesen J, Nordin H, Rasmussen Loft AG, Pelck R, Lorenzen T, Flejsborg Oeftiger S, Unger B, Jaeger F, Mosborg Petersen P, Rasmussen C and Dreyer L. *Impact of tobacco smoking on response to tumour necrosis factor-alpha inhibitor treatment in patients with ankylosing spondylitis: results from the Danish nationwide DANBIO registry*. Rheumatology (Oxford), 2016. 55(4): p. 659-68.
66. Pedersen SJ, Sorensen IJ, Garnero P, Johansen JS, Madsen OR, Tvede N, Hansen MS, Thamsborg G, Andersen LS, Majgaard O, Loft AG, Erlendsson J, Asmussen K, Jurik AG, Moller J, Hasselquist M, Mikkelsen D, Skjodt T, Lambert R, Hansen A and Ostergaard M. *ASDAS, BASDAI and different treatment responses and their relation to biomarkers of inflammation, cartilage and bone turnover in patients with axial spondyloarthritis treated with TNFalpha inhibitors*. Ann Rheum Dis, 2011. 70(8): p. 1375-81.
67. Turina MC, Yeremenko N, Paramarta JE, De Rycke L and Baeten D. *Calprotectin (S100A8/9) as serum biomarker for clinical response in proof-of-concept trials in axial and peripheral spondyloarthritis*. Arthritis Res Ther, 2014. 16(4): p. 413.
68. Choi IY, Gerlag DM, Herenius MJ, Thurlings RM, Wijbrandts CA, Foell D, Vogl T, Roth J, Tak PP and Holzinger D. *MRP8/14 serum levels as a strong predictor of response to biological treatments in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2015. 74(3): p. 499-505.
69. Han BK, Kuzin I, Gaughan JP, Olsen NJ and Bottaro A. *Baseline CXCL10 and CXCL13 levels are predictive biomarkers for tumor necrosis factor inhibitor therapy in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis: a pilot, prospective study*. Arthritis Res Ther, 2016. 18(1): p. 93.
70. Bazin T, Hooks KB, Barnetche T, Truchetet ME, Enaud R, Richez C, Dougados M, Hubert C, Barre A, Nikolski M and Schaeffer T. *Microbiota Composition May Predict Anti-Tnf Alpha Response in Spondyloarthritis Patients: an Exploratory Study*. Sci Rep, 2018. 8(1): p. 5446.
71. Stuhlmuller B, Haupl T, Hernandez MM, Grutzkau A, Kuban RJ, Tandon N, Voss JW, Salfeld J, Kinne RW and 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): p. 311-21.
72. Rudwaleit M, Schwarzlose S, Hilgert ES, Listing J, Braun J and Sieper J. *MRI in predicting a major clinical response to anti-tumour necrosis factor treatment in ankylosing spondylitis.* Ann Rheum Dis, 2008. 67(9): p. 1276-81.
 73. Seitz M, Wirthmüller U, Möller B and Villiger PsM. *The- 308 tumour necrosis factor- α gene polymorphism predicts therapeutic response to TNF α -blockers in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients.* Rheumatology, 2006. 46(1): p. 93-96.
 74. Tong Q, Zhao DB, Bajracharya P, Xu X, Kong RN, Zhang J, Dai SM and Cai Q. *TNF- α -857 and-1031 polymorphisms predict good therapeutic response to TNF- α blockers in Chinese Han patients with ankylosing spondylitis.* Pharmacogenomics, 2012. 13(13): p. 1459-1467.
 75. Chattopadhyay PK, Gaylord B, Palmer A, Jiang N, Raven MA, Lewis G, Reuter MA, Nur-ur Rahman AKM, Price DA, Betts MR and Roederer M. *Brilliant violet fluorophores: A new class of ultrabright fluorescent compounds for immunofluorescence experiments.* Cytometry Part A, 2012. 81A(6): p. 456-466.
 76. Mair F and Prlic M. *OMIP-044: 28-color immunophenotyping of the human dendritic cell compartment.* Cytometry Part A, 2018. 93(4): p. 402-405.
 77. Galli E, Friebel E, Ingelfinger F, Unger S, Núñez NG and Becher B. *The end of omics? High dimensional single cell analysis in precision medicine.* European Journal of Immunology, 2019. 49(2): p. 212-220.
 78. Millán O and Brunet M, *Flow Cytometry as Platform for Biomarker Discovery and Clinical Validation*, in *General Methods in Biomarker Research and their Applications*, V.R. Preedy and V.B. Patel, Editors. 2015, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 141-164.
 79. Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P and Calin A. *A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index.* J Rheumatol, 1994. 21(12): p. 2286-91.
 80. Steinbrich-Zöllner M, Grün JR, Kaiser T, Biesen R, Raba K, Wu P, Thiel A, Rudwaleit M, Sieper J and Burmester GR. *From transcriptome to cytome: integrating cytometric profiling, multivariate cluster, and prediction analyses for a phenotypical classification of inflammatory diseases.* Cytometry Part A, 2008. 73(4): p. 333-340.
 81. Schulte-Wrede U, Sörensen T, Grün JR, Häupl T, Hirseland H, Steinbrich-Zöllner M, Wu P, Radbruch A, Poddubnyy D, Sieper J, Syrbe U and Grützkau A. *An explorative study on deep profiling of peripheral leukocytes to identify predictors for responsiveness to anti-tumour necrosis factor alpha therapies in ankylosing spondylitis: natural killer cells in focus.* Arthritis Res Ther, 2018. 20(1): p. 191.
 82. Sörensen T, Baumgart S, Durek P, Grützkau A and Häupl T. *immunoClust—An automated analysis pipeline for the identification of immunophenotypic signatures in high-dimensional cytometric datasets.* Cytometry Part A, 2015. 87(7): p. 603-615.
 83. Saey Y, Van Gassen S and Lambrecht BN. *Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data.* Nat Rev Immunol, 2016. 16(7): p. 449-62.
 84. Reveille JD. *Biomarkers for diagnosis, monitoring of progression, and treatment responses in ankylosing spondylitis and axial spondyloarthritis.* Clin Rheumatol, 2015. 34(6): p. 1009-18.
 85. de Vries MK, van Eijk IC, van der Horst-Bruinsma IE, Peters MJ, Nurmohamed MT, Dijkmans BA, Hazenberg BP and Wolbink GJ. *Erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein level, and serum amyloid a protein for patient selection and monitoring of anti-tumor necrosis factor treatment in ankylosing spondylitis.* Arthritis Rheum, 2009. 61(11): p. 1484-90.
 86. Evans DM, Spencer CA, Pointon J, Su Z, Harvey D, Kochan G, Oppermann U, Dilthey A, Pirinen M and Stone MA. *Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility.* Nature genetics, 2011. 43(8): p. 761.
 87. Arends S, van der Veer E, Groen H, Houtman PM, Jansen TL, Leijnsma MK, Bijzet J, Limburg PC, Kallenberg CG, Spoorenberg A and Brouwer E. *Serum MMP-3 level as a biomarker for monitoring*

- and predicting response to etanercept treatment in ankylosing spondylitis.* The Journal of rheumatology, 2011. 38(8): p. 1644-1650.
88. Poddubnyy D, Conrad K, Haibel H, Syrbe U, Appel H, Braun J, Rudwaleit M and Sieper J. *Elevated serum level of the vascular endothelial growth factor predicts radiographic spinal progression in patients with axial spondyloarthritis.* Ann Rheum Dis, 2014. 73(12): p. 2137-43.
 89. Citro A, Scrivo R, Martini H, Martire C, De Marzio P, Vestri AR, Sidney J, Sette A, Barnaba V and Valesini G. *CD8+ T Cells Specific to Apoptosis-Associated Antigens Predict the Response to Tumor Necrosis Factor Inhibitor Therapy in Rheumatoid Arthritis.* PLoS One, 2015. 10(6): p. e0128607.
 90. Daien CI, Gailhac S, Mura T, Combe B, Hahne M and Morel J. *High levels of memory B cells are associated with response to a first tumor necrosis factor inhibitor in patients with rheumatoid arthritis in a longitudinal prospective study.* Arthritis Res Ther, 2014. 16(2): p. R95.
 91. Aramaki T, Ida H, Izumi Y, Fujikawa K, Huang M, Arima K, Tamai M, Kamachi M, Nakamura H and Kawakami A. *A significantly impaired natural killer cell activity due to a low activity on a per-cell basis in rheumatoid arthritis.* Modern rheumatology, 2009. 19(3): p. 245-252.
 92. Vranes̃ Z, Poljaković Z and Marus̃ić M. *Natural killer cell number and activity in multiple sclerosis.* Journal of the neurological sciences, 1989. 94(1-3): p. 115-123.
 93. Cameron AL, Kirby B and Griffiths CE. *Circulating natural killer cells in psoriasis.* Br J Dermatol, 2003. 149(1): p. 160-4.
 94. Ewan PW, Barrett HM and Pusey CD. *Defective natural killer (NK) and killer (K) cell function in systemic lupus erythematosus.* J Clin Lab Immunol, 1983. 10(2): p. 71-6.
 95. Conigliaro P, Scrivo R, Valesini G and Perricone R. *Emerging role for NK cells in the pathogenesis of inflammatory arthropathies.* Autoimmun Rev, 2011. 10(10): p. 577-81.
 96. Lopez-Botet M, Moretta L and Strominger J. *NK-cell receptors and recognition of MHC class I molecules.* Immunol Today, 1996. 17(5): p. 212-4.
 97. Scrivo R, Morrone S, Spadaro A, Santoni A and Valesini G. *Evaluation of degranulation and cytokine production in natural killer cells from spondyloarthritis patients at single-cell level.* Cytometry Part B: Clinical Cytometry, 2011. 80(1): p. 22-27.
 98. Zambrano-Zaragoza JF, Agraz-Cibrian JM, González-Reyes C, Durán-Avelar MJ and Vibanco-Pérez N. *Ankylosing Spondylitis: From Cells to Genes.* International Journal of Inflammation, 2013. 2013: p. 501653.
 99. Yang M, Zhou Y, Liu L, Wang S, Jiang J, Shang Q, Yu H, Xiang X, Pang X, Li T and Zhao P. *Decreased A20 expression on circulating CD56bright NK cells contributes to a worse disease status in patients with ankylosing spondylitis.* Clinical & Experimental Immunology, 2019. 198(1): p. 1-10.
 100. Timischl W, *Angewandte Statistik: Eine Einführung für Biologen und Mediziner.* 2013: Springer-Verlag Wien. XI, 550.
 101. Addison EG, North J, Bakhsh I, Marden C, Haq S, Al-Sarraj S, Malayeri R, Wickremasinghe RG, Davies JK and Lowdell MW. *Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity.* Immunology, 2005. 116(3): p. 354-61.
 102. Gibbings D and Befus AD. *CD4 and CD8: an inside-out coreceptor model for innate immune cells.* J Leukoc Biol, 2009. 86(2): p. 251-9.
 103. Fischer R, Kontermann R and Maier O. *Targeting sTNF/TNFR1 signaling as a new therapeutic strategy.* Antibodies, 2015. 4(1): p. 48-70.
 104. Engelmann H, Aderka D, Nophar Y, Kemper O, Brakebusch C, Holtmann H and Wallach D, *Soluble and cell surface receptors for tumor necrosis factor, in Mononuclear Phagocytes.* 1992, Springer. p. 359-365.
 105. Meusch U, Krasselt M, Rossol M, Baerwald C, Klingner M and Wagner U. *In vitro response pattern of monocytes after tmTNF reverse signaling predicts response to anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis.* J Transl Med, 2015. 13(1): p. 256.
 106. Higuchi M and Aggarwal BB. *TNF induces internalization of the p60 receptor and shedding of the p80 receptor.* J Immunol, 1994. 152(7): p. 3550-8.

107. Bertolo M, Baumgart S, Durek P, Peddinghaus A, Mei H, Rose T, Enghard P and Grützkau A. *Deep Phenotyping of Urinary Leukocytes by Mass Cytometry Reveals a Leukocyte Signature for Early and Non-Invasive Prediction of Response to Treatment in Active Lupus Nephritis*. *Frontiers in Immunology*, 2020. 11(256).

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Ursula Schulte-Wrede, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Identifizierung von zellbasierten Biomarkern im peripheren Blut von Patienten mit aktiver, ankylosierender Spondylitis zur Responseprädiktion bei TNF- α -blockierenden Biologika-Therapien“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

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

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

Datum

Unterschrift

10 Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation

Autoren: **Schulte-Wrede U**, Sörensen T, Grün JR, Häupl T, Hirseland H, Steinbrich-Zöllner M, Wu P, Radbruch A, Poddubnyy D, Sieper J, Syrbe U, Grützkau A.
Titel: An explorative study on deep profiling of peripheral leukocytes to identify predictors for responsiveness to anti-tumour necrosis factor alpha therapies in ankylosing spondylitis: natural killer cells in focus
Zeitschrift: Arthritis Research & Therapy
Erscheinungsjahr: 2018

Beitrag im Einzelnen:

Erstautorenschaft aufgrund folgender Kriterien:

- Konzeption und Ausarbeitung der Studie gemeinsam mit Dr. rer. nat. Andreas Grützkau
- Wesentlicher Anteil an der Erhebung der Daten mit Etablierung des zytometrischen Färbeprotokolls sowie Durchführung der Experimente
- Hauptanteil an der Aufbereitung und statistischen Auswertung der erhobenen Daten
- Hauptanteil an der graphischen Darstellung der Ergebnisse in allen Abbildungen (mit Ausnahme von Abbildung 1) und Tabellen
- Hauptanteil an der Interpretation der Ergebnisse
- Erarbeitung des Manuskripts zur Veröffentlichung der Studienergebnisse gemeinsam mit Dr. rer. nat. Andreas Grützkau sowie Mitarbeit an der Revision und Berücksichtigung der Änderungswünsche der Peer Reviewer

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

11 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 |

RESEARCH ARTICLE

Open Access



An explorative study on deep profiling of peripheral leukocytes to identify predictors for responsiveness to anti-tumour necrosis factor alpha therapies in ankylosing spondylitis: natural killer cells in focus

Ursula Schulte-Wrede¹, Till Sörensen², Joachim R. Grün^{1,4}, Thomas Häupl², Heike Hirsland¹, Marta Steinbrich-Zöllner³, Peihua Wu³, Andreas Radbruch^{1,5}, Denis Poddubnyy^{3,6}, Joachim Sieper³, Uta Syrbe³ and Andreas Grützkau^{1*} 

Abstract

Background: Therapeutic targeting of tumour necrosis factor (TNF)- α is highly effective in ankylosing spondylitis (AS) patients. However, since one-third of anti-TNF-treated AS patients do not show an adequate clinical response there is an urgent need for new biomarkers that would aid clinicians in their decision-making to select appropriate therapeutic options. Thus, the aim of this explorative study was to identify cell-based biomarkers in peripheral blood that could be used for a pre-treatment stratification of AS patients.

Methods: A high-dimensional, multi-parametric flow cytometric approach was applied to identify baseline predictors in 31 AS patients before treatment with the TNF blockers adalimumab (TNF-neutralisation) and etanercept (soluble TNF receptor).

Results: As the major result, the frequencies of natural killer (NK) cells, and in particular CD8-positive (CD8⁺) NK cell subsets, were most predictive for therapeutic outcome in AS patients. While an inverse correlation between classical CD56⁺/CD16⁺ NK cells and reduction of disease activity was observed, the CD8⁺ NK cell subset behaved in the opposite direction. At baseline, responders showed significantly increased frequencies of CD8⁺ NK cells compared with non-responders.

Conclusions: This is the first study demonstrating that the composition of the NK cell compartment has predictive power for prediction of therapeutic outcome for anti-TNF- α blockers, and we identified CD8⁺ NK cells as a potential new player in the TNF- α -driven chronic inflammatory immune response of AS.

Keywords: Ankylosing spondylitis, Etanercept, CD8⁺ NK cells, TNF-alpha blocker, Predictive biomarker

* Correspondence: gruetzkau@drfz.de

¹German Rheumatism Research Center Berlin (DRFZ), an Institute of the Leibniz-Association, Immune Monitoring Core Facility, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Ankylosing spondylitis (AS) is a multifactorial chronic inflammatory rheumatic disease belonging to the group of rheumatic diseases known as spondyloarthritis (SpA) which primarily affects the axial skeleton [1]. AS has a prevalence of about 1.43 million in the European population [2] with an onset in adolescence [3] and a two-times higher occurrence in men than women [4]. The pathogenesis of AS is still obscure; it is assumed that AS is mainly caused by both genetic factors, which implies the expression of the major histocompatibility complex (MHC) I antigen human leukocyte antigen B27 (HLA-B27) [5], and also by environmental factors such as enterobacterial antigens [6]. To alleviate the axial symptoms of AS patients, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are delivered as first-line therapy. Anti-tumour necrosis factor (TNF) blocking therapy is applied only in patients with constantly high disease activity who are non-responsive to conventional NSAID treatment [7, 8]. At present, there are five anti-TNF- α agents approved for the treatment of AS: infliximab [9], a monoclonal chimeric antibody; etanercept, a soluble human TNF receptor (sTNFR)2 fusion protein [10]; adalimumab, a humanised monoclonal antibody [11]; golimumab, a fully human monoclonal antibody [12]; and certolizumab, a Fab fragment of a humanised monoclonal antibody [13]. Most of these biologics are also successfully administered in rheumatoid arthritis (RA), psoriasis (Pso), juvenile inflammatory arthritis (JIA), and inflammatory bowel disease (IBD). The biological functions of TNF- α are mediated by binding to the membrane receptors TNFR1 (p55) or TNFR2 (p75). While TNFR1 is ubiquitously expressed in all lymphoid and myeloid immune cells and body cells [14], the expression of TNFR2 is mainly restricted to T cells [15] and natural killer (NK) cells [16]. In addition, TNFR2 can be found to be expressed in endothelial and mesenchymal cells, cells of the central nervous system (CNS), oligodendrocytes and cardiac myocytes [17], and a few other cell types [18]. According to their functions, TNFR1 is primarily associated with pro-apoptotic processes, while TNFR2 is responsible for processes ensuring survival of cells [19].

Although targeting of TNF- α is very effective in AS, around one-third of treated patients show only a poor response that can be partly attributed to the development of anti-drug antibodies (ADAb) resulting in reduced bioavailability [20]. The most likely precondition for swapping to another anti-TNF agent is partial or entire failure of effectiveness along with side effects [21]. With respect to these adverse reactions and the high costs of anti-TNF agents leading to high economic burden for the health care systems, it is desirable to stratify patients according to treatment predictors prior to biological therapy. Various demographic and clinical

parameters such as high baseline disease activity, short disease duration, young age, male sex, and presence of HLA-B27 have been shown to correlate with adequate clinical short- and long-term response [22–26]. In addition, modern imaging techniques, such as magnetic resonance imaging (MRI), are used to correlate bone and tissue destruction with treatment response [27]. However, these techniques are time consuming and expensive when used as a standard pre-treatment assessment. Another level of therapy response prediction was investigated when responsiveness to anti-TNF agents was related to the presence of different TNF- α genotypes. It was reported that patients with TNF- α -308 G/G, -857 C/C, or -1031 T/T genotypes showed a better response to anti-TNF agents than patients without these polymorphisms [28, 29]. Apart from these observations, there are no reliable predictive biomarkers for anti-TNF responsiveness in AS. Using a multi-parametric flow cytometric approach, we aimed to identify cell-based biomarkers in the peripheral blood of AS patients that are able to predict a successful therapeutic response to TNF inhibitors before starting therapy. As a result, we found that a low pre-treatment frequency of a CD8-expressing subpopulation of NK cells is associated with a lack of therapeutic response.

Methods

Subjects

Ethics statement

The study was performed in accordance with the 1964 Declaration of Helsinki and approved by the Charité University Medicine ethics committee I of Charité Campus Mitte. All patients provided written informed consent to participate in the study. Furthermore, we declare that this manuscript contains no information or images that could lead to identification of a study participant.

A total of 31 AS patients (22 male, 9 female) of whom 81% were positive for HLA-B27, recruited from the rheumatology outpatient clinics of the Charité, and 10 healthy controls (HC; 7 male, 3 female) participated in the study. The patients had an average age of 38 ± 10.2 years and the HC averaged 34 ± 10.7 years. All patients fulfilling the modified New York criteria [30] and who were eligible for anti-TNF inhibitor treatment because of persistently high disease activity (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) > 4) despite treatment with NSAIDs or who were unable to take NSAIDs due to contraindications were included in the study (Table 1). Disease activity was assessed according to the BASDAI index consisting of a score range from 0 (no symptoms) to 10 (high disease activity). The mean baseline BASDAI prior to TNF inhibitor therapy was 6.2 ± 1.3 (Table 1).

Table 1 Demographic and disease characteristics of AS patients treated with ETN and ADA, respectively

| | ADA- and ETN-treated AS patients (n = 31) | ETN-treated AS patients (n = 15) | ADA-treated AS patients (n = 16) |
|----------------------------|---|----------------------------------|----------------------------------|
| Demographics | | | |
| Sex (M:F) | 22:9 | 11:4 | 11:5 |
| Age (years) | 38 ± 10.2 | 37.7 ± 11.5 | 38.3 ± 9.2 |
| Disease status | | | |
| DD (months) | 140.8 ± 117.9 | 145.1 ± 135.4 | 136.8 ± 103.8 |
| BASDAI at baseline | 6.2 ± 1.3 | 6.2 ± 1.5 | 6.2 ± 1.2 |
| BASDAI red. (%) | 47.6 ± 31.3 | 51.1 ± 31.7 | 44.3 ± 31.6 |
| BASDAI assessment (months) | 3.1 ± 1.4 | 3 ± 1 | 3.2 ± 1.6 |
| BASDAI50 (R:NR) | 19:12 | 10:5 | 9:7 |
| CRP (mg/dl) | 1.5 ± 1.7 | 1.3 ± 1.1 | 1.6 ± 2.2 |
| HLA-B27-positive (%) | 81 | 87 | 75 |
| ESR (mm/h) | 33.2 ± 21.9 | 31.7 ± 22.3 | 34.6 ± 22.3 |

Results are displayed as mean ± SD unless otherwise indicated

ADA adalimumab, AS ankylosing spondylitis, BASDAI Bath Ankylosing Disease Activity Index, BASDAI red. percental BASDAI reduction after 1–6 month of therapy, BASDAI50 percental BASDAI reduction according to an improvement of 50%, CRP C-reactive protein, DD disease duration, ESR erythrocyte sedimentation rate, ETN etanercept, F female, HLA human leukocyte antigen, M male, NR non-responder, R responder

Prior to the start of TNF inhibitor therapy, 10 ml heparinised blood was taken to perform flow cytometric analysis. Fifteen patients were treated with etanercept (Enbrel; Amgen, and Pfizer) and 16 patients with adalimumab (Humira; AbbVie Inc.). The BASDAI score was obtained at baseline and at follow-up visits [31]. The response to treatment was assessed between 1 and 6 months after the start of therapy and defined as a 50% BASDAI reduction (BASDAI50 response) relative to baseline BASDAI (Additional file 1: Table S1).

Blood sample preparation, antibody staining, and flow cytometry measurement

Blood sample preparation and antibody staining procedures were as described previously [32]. Cells obtained from the blood of patients prior to treatment were stained for 50 different surface antigens in a seven-colour staining combined to 10 tubes (Table 2). After staining, cells were fixed with 1% paraformaldehyde and analysed within 24 h. We did not include a live/dead cell staining, but cell

debris, erythrocytes, and thrombocytes were excluded according to their SSC/FSC characteristics.

Data acquisition was accomplished with a FACS-Canto™ II Flow Cytometer (BD Biosciences, USA) with an average cell count of one million cells per sample. To warrant reproducibility and to survey the instruments' performance, a BD™ Cytometer Setup and Tracking Beads were regularly used before each measurement. In addition, we have always monitored the quality of antibody staining directly after data acquisition by monitoring each individual fluorescence channel used for each particular staining tube. For this 20,000 randomly selected events were plotted. Samples which did not pass this quality check were excluded from further analysis.

Data analysis and statistical analysis

Two different software tools were applied to analyse the complex datasets generated by this unsupervised flow cytometry approach, which is based on both manual and automatic bioinformatic strategies identify potential candidate phenotypes. In the first approach, the relevant

Table 2 Staining matrix showing antibodies and their corresponding fluorochrome conjugates measured in ten separate staining tubes

| Fluorochrome | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 | T9 | T10 |
|--------------|--------------------|----------------|------------------|-----------|-----------|-----------|--------|--------|-----------|-----------|
| Pacific Blue | CD3 | CD3 | CD3 | CD3 | CD3 | CD3 | CD3 | CD3 | CD3 | CD3 |
| FITC | CD27 | CD64 | CD244 | CD35 | CD46 | CD45RA | BDCA2 | CD138 | CD134 | CD28 |
| PE | IgD/ CD14/ CD56 | CD33/ NKG2D | CD163/ CRTH-2 | CD119 | CD88 | CXCR4 | CD1c | CD38 | ICOS | CD31 |
| PE-Cy5 | CD45RA | HLA-DR | CD128b | CD107a | CD21 | CD62L | HLA-DR | HLA-DR | CD154 | CD45RA |
| PE-Cy7 | CD8 | CD56/ CD14 | CD14 | CD14 | CD14 | CCR7 | CD14 | CD69 | CD69 | CD69 |
| APC | CD19 | CD32 | CCR2 | CD120b | CD55 | CXCR3 | CD11c | CD20 | CD25 | CD152 |
| APC-Cy7 | CD4/ CD16 | CD4/ CD16 | CD4/ CD16 | CD4/ CD16 | CD4/ CD16 | CD4/ CD16 | CD19 | CD19 | CD4/ CD16 | CD4/ CD16 |

T1–T10 represents the respective staining tubes

statistics such as mean fluorescence intensities (MFIs) and absolute cell numbers of manually analysed data were transferred as a comma-separated value (CSV) file format to an Access database as shown previously [32]. This primary data analysis including colour compensation and gate setting was performed by FACSDIVA v6.0 software (BD Biosciences, USA). The second approach utilised the automated classification algorithm immunoClust, which processes uncompensated raw data and therefore excludes any operator-dependent gating or compensation artefacts [33]. Population clustering and comparative meta-clustering of immunoClust assume finite mixture models and use Expectation Maximisation (EM)-iterations with an integrated classification likelihood (ICL) criterion to stabilise the number of reasonable clusters. For meta-clustering, a probability measure on Gaussian distributions was invented, which is based on the Bhattacharyya Coefficients. Meta-clusters were manually annotated and classified.

Linear regression and receiver operating characteristic (ROC) analysis performed with Prism 5 (GraphPad Software, Inc.) was used to elucidate associations between candidate markers and clinical parameters. For statistical data analysis, the Welch corrected *t* test was used where *p* values < 0.05 were determined as statistically significant.

Results

Patient baseline characteristics and their clinical responses

The study design encompassed 31 AS patients with high disease activity indicated by a baseline BASDAI of 6.2 ± 1.3 before treatment with adalimumab (ADA; *n* = 16) or etanercept (ETN; *n* = 15). The patient demographic and baseline clinical characteristics are summarised in Table 1 and showed no significant differences between the ADA- and ETN-treated patients.

The average BASDAI assessment date was 3.1 ± 1.4 month after the start of treatment. After 1 to 6 months of treatment, the relative reduction of disease activity assessed by BASDAI was $51.1 \pm 31.7\%$ for ETN-treated patients and $44.3 \pm 31.6\%$ for patients who received ADA. According to the BASDAI response criteria, five patients in the ETN group and seven patients in the ADA group failed to respond (Additional file 1: Table S1).

Clinical parameters available at baseline, such as disease duration, baseline BASDAI, C-reactive peptide (CRP) levels, and erythrocyte sedimentation rate (ESR), as well as the expression of HLA-B27, allowed no discrimination between patients who would respond to TNF- α blockers and those who would fail.

For data analysis, we have applied an unsupervised, automated cell clustering approach, immunoClust [33], to identify potential immunophenotypic parameters that

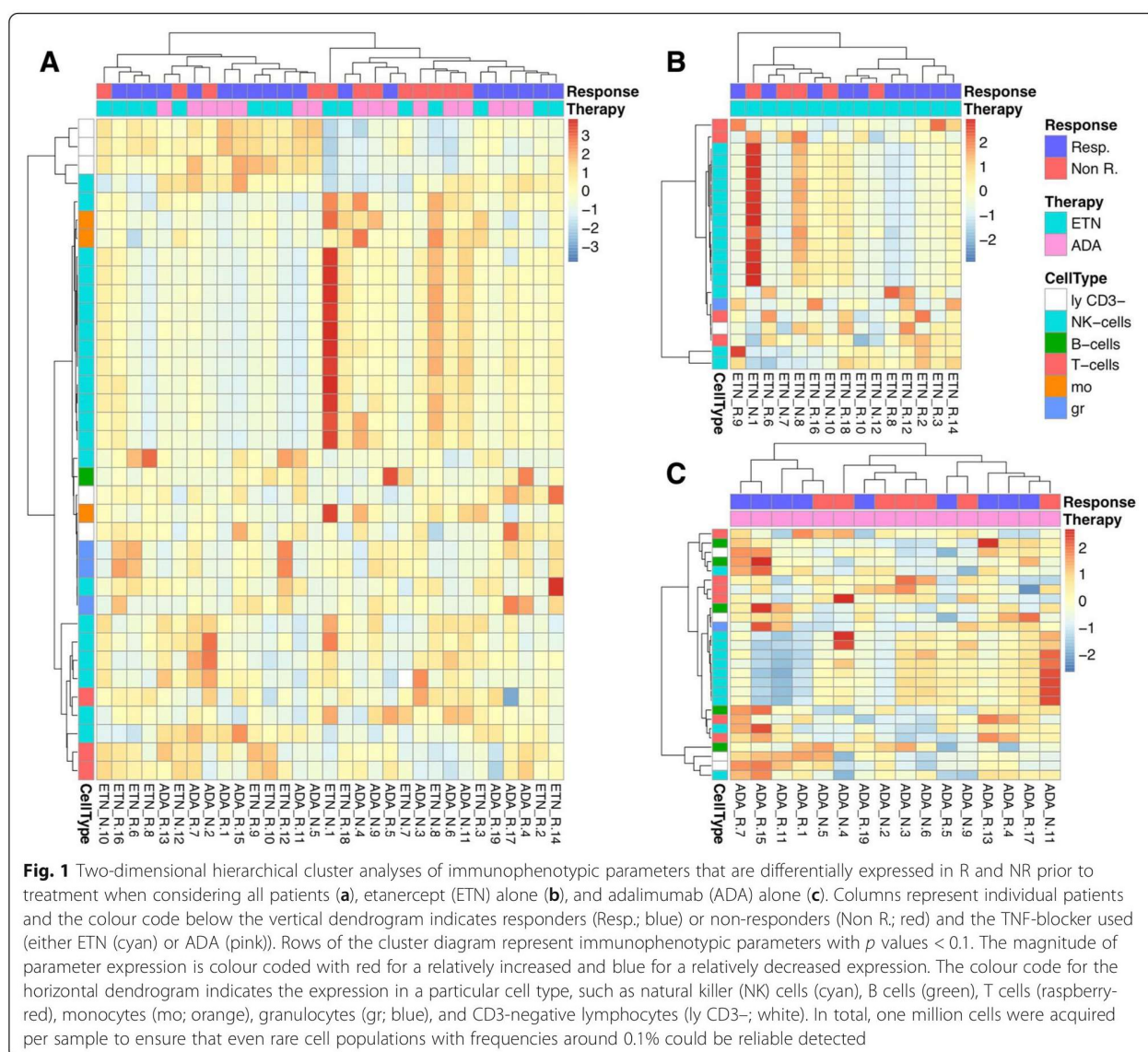
enable classification of AS patients into responders (R) and non-responders (NR) prior to anti-TNF treatment. Since the freshly obtained patient blood was immediately processed we have not performed dead cell staining, but we gated for live cells according to cell size and granularity defined by forward scatter (FSC) and sideward scatter (SSC) characteristics, respectively.

The presented two-dimensional clustering approach with patients clustered in the vertical direction and immunophenotypic parameters clustered in the horizontal direction gives an overview of all leukocyte subsets including certain activation markers that are differentially expressed in R and NR. For the identification of significant parameters by the immunoClust algorithm, FCS files (Flow Cytometry Standard file format) of uncompensated raw data were used and finally disclosed 36 parameters when all patient samples were considered. Analysing ETN- and ADA-treated patients separately revealed 21 and 27 parameters, respectively (Fig. 1).

Although using all these parameters did not allow an error-free classification of R and NR, all samples were grouped into two main clusters which were enriched for R and NR, respectively (Fig. 1a). Surprisingly, more than 50% of the discriminating parameters could be clearly assigned to NK cell subsets if all patients were analysed together (Fig. 1a). For further analysis of NK cell-related subsets, and knowing that ETN and ADA have different modes of action to neutralise the effect of TNF- α , we continued to investigate both treatment groups separately to identify therapy-specific response signatures. Using this approach, the majority of parameters that significantly discriminate between NR and R in the ETN group (Fig. 1b) and ADA group (Fig. 1c) were related to the NK cell compartment. The best classification of R and NR was achieved in the group of ETN-treated patients. Here, only two of 10 R were grouped as NR and one single of five NR was grouped as R.

Validation of classical NK cells and CD8-positive NK cells as potential immunological biomarkers for an anti-TNF- α therapy prediction

Since both the percentage distribution of classical NK cells in general and the ratio of CD8-positive and CD8-negative NK cells in particular appeared to be the most promising predictors for an anti-TNF therapy response, we looked at the CD8 receptor expression on NK cells in more detail. In Fig. 2 the general gating strategy to define classical CD56^{dim}CD16⁺ NK cells is shown. In Additional file 2 (Figure S1), backgating for monocytes and NK cells demonstrates that, despite labelling multiple antigens by the same fluorochrome (CD14/CD56/IgD labelled to PE), unravelling of these complex stainings with respect to NK cells, monocytes, T cells, and B cells is possible.



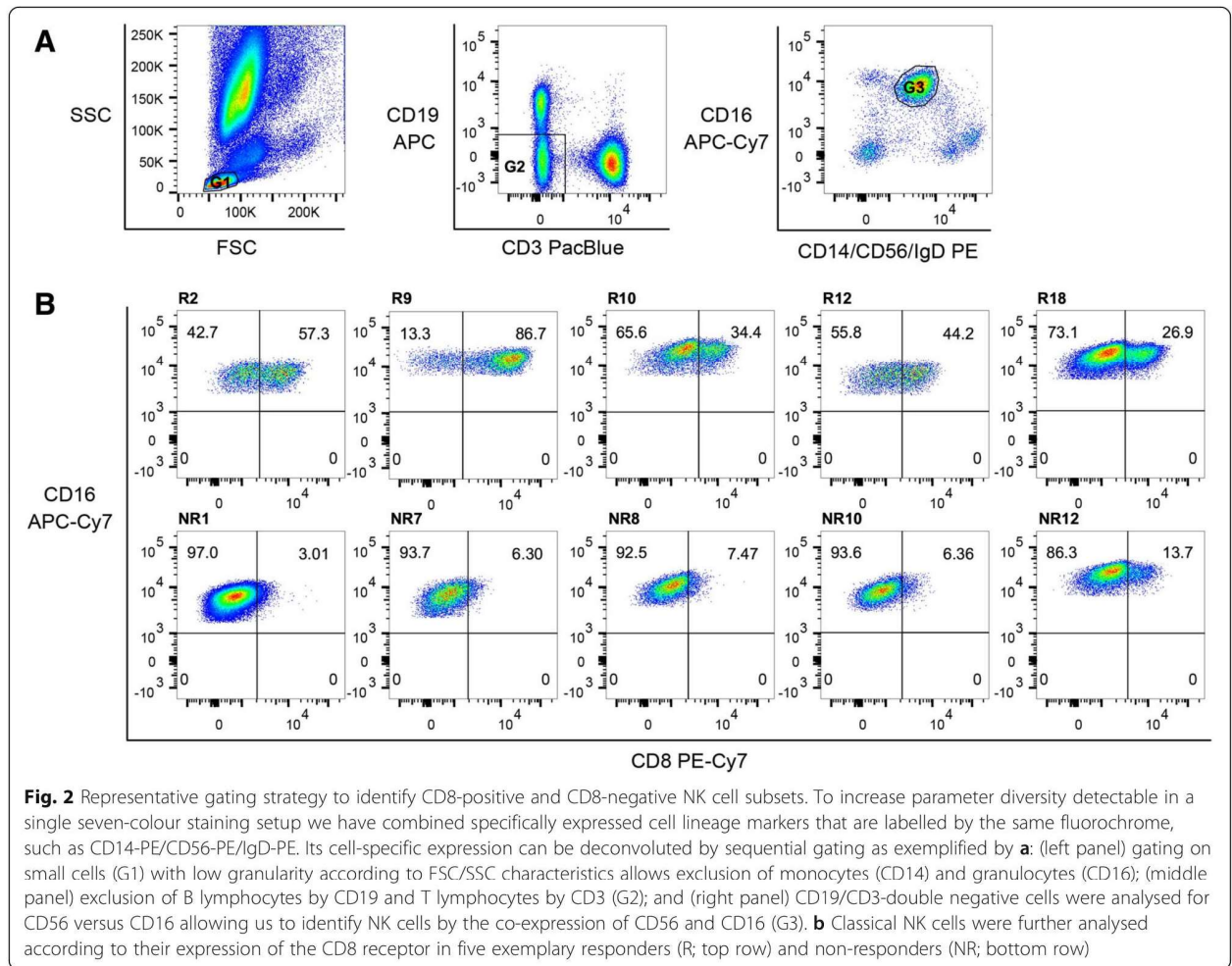
At first, a lymphocyte scatter gate (G1) was set (Fig. 2a). Next T and B cells were excluded out of the lymphocyte population (G2) to determine the percentage of CD56^{dim}CD16⁺ NK cells (G3). Subsequently, the CD8-positive NK cells were quantified by sub-gating as shown exemplarily for five responders (R2, R9, R16, R12, and R18) and five non-responders (NR1, NR7, NR8, NR10, and NR12) (Fig. 2b).

Figure 3 shows the frequencies of CD8-positive NK cells for healthy controls ($n = 10$), anti-TNF R ($n = 19$), and anti-TNF NR ($n = 12$). A significantly higher frequency of CD8 receptor-bearing NK cells was observed in the R group compared with NR (Fig. 3). Comparing the percentage of CD8-positive NK cells to HC, AS patients who will not respond showed significantly lower frequencies of

CD8-expressing NK cells (Fig. 3). Individual values for frequencies and absolute counts of NK cells and CD8-positive subsets are given in Additional file 1 (Table S1).

Next, we performed Spearman's rank correlation and linear regression analyses which showed a significant inverse correlation of frequencies of classical NK cells and an improved therapy outcome if all 31 patients were included (Fig. 4a; $p = 0.01$, $r^2 = 0.19$).

Surprisingly, a positive, linear correlation was found when we focused on the analysis of CD8-expressing NK cells (Fig. 4b). Here, the frequency of CD8-positive cells related to the cells of the total NK cells (G3) clearly correlated with a successful therapy response. This correlation was statistically significant when all patients were considered ($p = 0.002$, $r^2 = 0.29$).



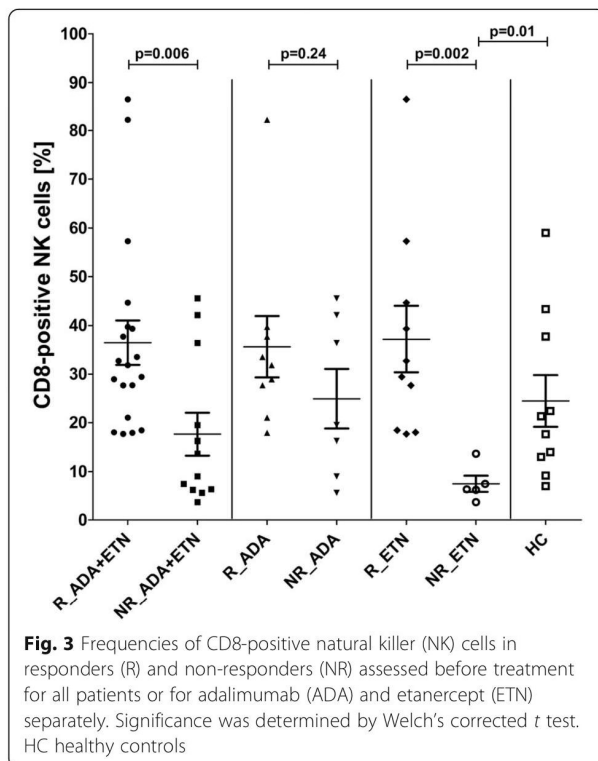
Furthermore, reverse regression analyses, displayed by ROC curves, were performed to verify the quality of classical and especially CD8-positive NK cells as suitable cellular biomarkers for predicting an anti-TNF therapy outcome (Fig. 4c, d). If all samples were included for this analysis, the frequency of classical NK cells was the most promising parameter as a baseline predictor (Fig. 4c; $p = 0.008$, area under the curve (AUC) = 0.79). Slightly improved values were obtained if the frequency of CD8-positive NK cells was used (Fig. 4d; $p = 0.007$, AUC = 0.79). Therefore, our data implicate that the appearance of CD8-positive NK cells is a robust biomarker for the prediction of an anti-TNF- α response at baseline.

Discussion

To our knowledge, this is the first study aiming to identify cellular biomarkers in peripheral blood to stratify AS patients upfront with regard to subsequent responsiveness to anti-TNF- α therapy. To date, there are no quantifiable laboratory parameters available that can be used for a

personalised response prediction [34]. Although higher values of CRP, ESR, and serum amyloid A (SAA), together with the presence of HLA-B27, have been reported to be useful baseline predictors for a successful anti-TNF- α therapy response in AS, the robustness, sensitivity, and specificity fail if applied to individual patients [35, 36]. Even our data, such as the age of patients, disease duration, CRP levels, or blood sedimentation, did not allow any prediction of future responsiveness.

Other potential new biomarkers described, such as single nucleotide polymorphisms (SNPs) and activity of endoplasmic reticulum aminopeptidase (ERAP)-1 [37], serum levels of matrix metalloproteinase (MMP)-3 [38], or vascular endothelial growth factor (VEGF) [39], have not yet reached a standard in the clinical diagnostic routine of AS. Generally, it is challenging to correlate quantifiable parameters to the disease activity BASDAI score, which is calculated on the basis of a patient's subjective assessment of well-being and therefore is only of limited value when used as an absolute variable.



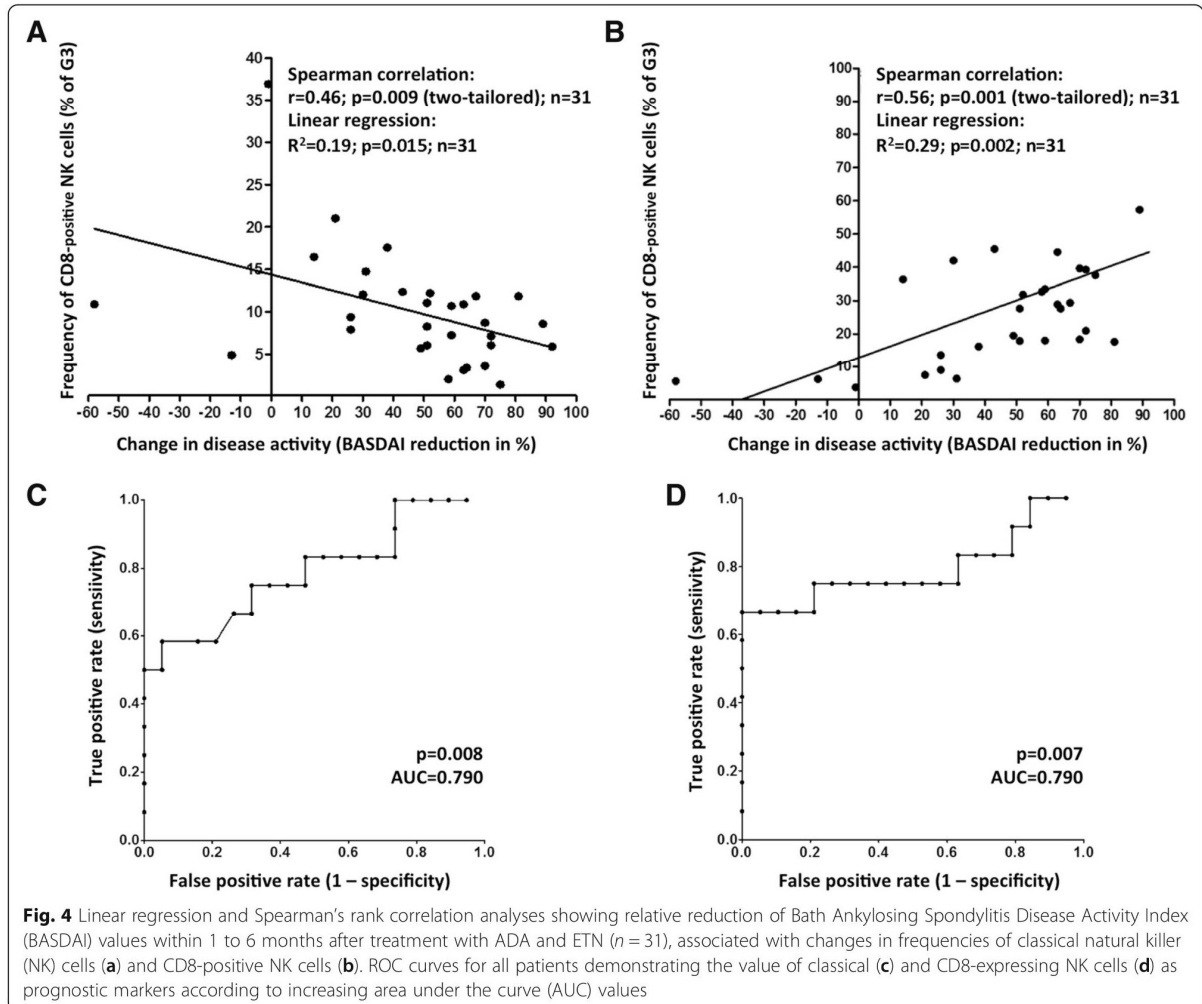
In our explorative study presented here we used an integrated multi-parametric flow cytometry and a new unsupervised data clustering approach to identify possible cellular biomarkers that are qualitatively or quantitatively different in responders and non-responders. A similar approach has been successfully used to classify active AS patients from healthy donors according to specific phenotypical changes in blood [32]. A comprehensive overview about immunophenotypical changes described so far in different autoimmune diseases is given by Alegria et al. [40].

Principally, at first view, an increased frequency of the major $CD56^{\text{dim}}CD16^+$ NK cell subset was indicative for a weak therapeutic anti-TNF response. This finding is in line with other reports showing that innate immunity and particularly NK cells may play a central role in the pathogenesis of various autoimmune diseases both in a protective and pathogenic manner. Their frequency and functionality were investigated in chronic inflammation, such as rheumatoid arthritis [41], multiple sclerosis [42], psoriasis [43], and systemic lupus erythematosus [44]. Despite some conflicting results, an overall decrease and a cytolytic impairment of circulating NK cells could be observed. In AS, the functionality of NK cells is described to be likewise impaired [45] but, in contrast to other autoimmune diseases, an increased NK cell number is reported [46, 47]. We could confirm this observation if comparing the non-responder group with normal donors (Fig. 3a); however, the NK cell frequency in the responder cohort was similar to the

number of healthy individuals. The strong association between NK cells and the aetiology of AS is underlined by the capability of the disease-dependent elevated killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) to recognise the HLA-B27 antigen, which is expressed in 80–90% of AS patients [48, 49]. Concomitant with a pathogenetic upregulated frequency of $KIR3DL1^+$ NK cells in AS, interferon (IFN) γ production is correspondingly diminished [50]. Moreover, activated $KIR3DL2^+$ NK cells are increased in SpA and may play a pathogenic role.

An in-depth analysis of the NK cell compartment revealed that the frequency of classical NK cells expressing the CD8 antigen showed a significant and positive correlation with anti-TNF responsiveness. It is known that about 40% of NK cells variably express CD8 in an α/α homodimeric form whereas the CD8-positive subset is described to exhibit enhanced cytotoxic features as compared with its CD8-negative counterpart [51, 52]. We could not detect significant age- or sex-related differences with respect to the frequency of CD8-positive NK cells either in the group of healthy controls or in that of AS patients. Thus, our data imply that NK cells expressing the CD8 $\alpha\alpha$ homodimer are directly or indirectly involved in the immunosuppressive effect exerted by anti-TNF- α blockers.

If CD8 $\alpha\alpha$ -expressing NK cells are directly involved it can be assumed that their increased cytotoxic activity and/or their diminished behaviour regarding cytotoxicity-induced apoptosis are responsible for the improved responsiveness of TNF blockers. Alternatively, it can be hypothesised that an engagement of CD8 $\alpha\alpha$ receptors on NK cells to molecules of the HLA-I family can cause an increased secretion of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IFN γ [53], which in turn promote both TNF receptor (TNFR) synthesis and its proteolysis to a soluble form [54]. By this mechanism, endogenously synthesised sTNFRs [55, 56] can co-operatively support the action of therapeutic TNF inhibitors [57, 58]. These non-signalling 'decoy' receptors are still competent for binding TNF and thus may function as a natural TNF antagonist comparable to ETN [59]. Since we have included adalimumab- and etanercept-treated patients in our study, it was interesting to know if differences in the prediction of responsiveness were detectable when either TNF- α was neutralised by ADA or scavenged by the sTNFR2 fusion protein (ETN). Although group size reduction was responsible for a less statistical power of prediction analysis, we could ascertain a better correlation with respect to ETN-treated patients compared with ADA-treated patients. Therefore, these findings are encouraging for validation in new independent cohorts of appropriate group sizes. If this result could be validated it would indicate diverse and more complex modes of action going beyond the mere neutralising effect of TNF- α blockers.



To elucidate possible differences in the TNFR expression in CD8-positive and CD8-negative NK cell subsets isolated from healthy individuals, we performed global gene expression analyses but could not detect any differential expression of TNFR1, TNFR2, or TNF- α (data not shown). Comparing the expression of TNFR1 and TNFR2 in healthy individuals, it was obvious that higher expression levels were detectable for TNFR2 (data not shown). Unfortunately, thus far we have had no opportunity for analysing cells isolated from AS patients to test if TNFRs or TNF- α were differentially expressed under chronic inflammatory conditions. Thus, according to our data, it can be postulated that CD8-positive NK cells are obviously capable of amplifying the neutralising effect of TNF-blockers, but it remains unclear why this amplification is preferentially observed in ETN- and not in ADA-treated patients.

Conclusions

Although our findings are promising, a further validation of CD8-positive NK cells as a potential biomarker for TNF responsiveness is necessary in an independent cohort of AS and other rheumatic and gastrointestinal diseases where anti-TNF blockers are successfully administered. Nevertheless, our study is a first proof of the concept that cellular response signatures can be identified in peripheral blood by an extensive immunophenotyping approach. Even though the exact mechanism of how CD8-positive NK cells and the therapeutic effect of TNF- α blockers are interrelated in AS is only poorly understood thus far, monitoring these cells by flow cytometry offers an interesting new diagnostic option with respect to the challenges of an individualised therapy concept, at least in the field of chronic inflammatory rheumatic diseases.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Individual data on treatment, responsiveness, NK cell counts per μ l blood, and frequencies related to total leukocytes. Moreover, absolute numbers and frequencies of CD8-positive NK cells in relation to all CD56/CD16-double positive NK cells are given. n.d. not determined. (DOCX 25 kb)

Additional file 2: Figure S1. Clarification of the gating strategy for NK cells shown in Fig. 2. By backgating, monocytes can be clearly separated from NK cells (Gate A, PBMC; Gate B, CD3/CD19-double negative PBMC; Gate C, monocytes; and Gate D, NK cells). (DOC 87 kb)

Abbreviations

ADA: Adalimumab; AS: Ankylosing spondylitis; BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; CRP: C-reactive protein; ERAP: Endoplasmic reticulum aminopeptidase; ESR: Erythrocyte sedimentation rate; ETN: Etanercept; HC: Healthy controls; IBD: Inflammatory bowel disease; JIA: Juvenile inflammatory arthritis; KIR: Killer cell immunoglobulin-like receptor; MFI: Mean fluorescence intensity; MMP: Matrix metalloproteinase; NK: Natural killer; NR: Non-responders; NSAID: Non-steroidal anti-inflammatory drug; Pso: Psoriasis; R: Responders; RA: Rheumatoid arthritis; SAA: Serum amyloid A; SNP: Single nucleotide polymorphism; SpA: Spondyloarthritis; sTNFR: Soluble human tumour necrosis factor receptor; TNF: Tumour necrosis factor; VEGF: Vascular endothelial growth factor

Funding

This study was funded by the following grants: IMI JU-funded Project BeTheCure (grant no. 115142-2), the German Research Foundation (DFG) (grant no. SFB 650 TPZ06), the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) within the framework of the e:Med research and funding concept sysINFLAME (grant no. 01ZX1306B), and Leibniz ScienceCampus Chronic Inflammation (<http://www.chronische-entzuendung.org>). These funders had no involvement in the study design, in the collection, analysis, and interpretation of the data, in the writing of the report, or in the decision to submit the paper for publication.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

US-W performed experiments, analysed data, and wrote the manuscript. TS, JRG, and TH analysed data. MS-Z, HH, and PW performed experiments. AR and JS designed the experimental strategy. US and DP characterised the patients and determined clinical inclusion criteria. AG designed the experimental strategy, analysed data, and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The study was performed in accordance with the 1964 Declaration of Helsinki and approved by the "Charité University Medicine ethics committee I of Charité Campus Mitte", and all patients provided written informed consent to participate in the study. Furthermore, we declare that this manuscript contains no information or images that could lead to identification of a study participant.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹German Rheumatism Research Center Berlin (DRFZ), an Institute of the Leibniz-Association, Immune Monitoring Core Facility, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany. ²Department of Rheumatology and Clinical Immunology,

Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. ³Department of Gastroenterology, Infectiology and Rheumatology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. ⁴German Rheumatism Research Center Berlin (DRFZ), an Institute of the Leibniz-Association, Bioinformatics Group, Berlin, Germany. ⁵German Rheumatism Research Center Berlin (DRFZ), an Institute of the Leibniz-Association, Cell Biology Group, Berlin, Germany. ⁶German Rheumatism Research Center Berlin (DRFZ), an Institute of the Leibniz-Association, Epidemiology Unit, Berlin, Germany.

Received: 27 September 2017 Accepted: 31 July 2018

Published online: 29 August 2018

References

- Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis. *Lancet*. 2007;369:1379–90.
- Dean LE, et al. Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53:650–7. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ket387>.
- Feldtkeller E, Khan M, van der Heijde D, van der Linden S, Braun J. Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int*. 2003;23:61–6.
- Hill HF, Hill AG, Bodmer JG. Clinical diagnosis of ankylosing spondylitis in women and relation to presence of HLA-B27. *Ann Rheum Dis*. 1976; 35:267–70.
- Brewerton DA, et al. Ankylosing spondylitis and HLA-A27. *Lancet*. 1973;1:904–7.
- Trull A, Ebringer A, Panayi G, Ebringer R, James DC. HLA-B27 and the immune response to enterobacterial antigens in ankylosing spondylitis. *Clin Exp Immunol*. 1984;55:74–80.
- Coates LC, Marzo-Ortega H, Bennett AN, Emery P. Anti-TNF therapy in ankylosing spondylitis: insights for the clinician. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2010;2:37–43.
- Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, Boonen A, Zink A. Ankylosing spondylitis: an overview. *Ann Rheum Dis*. 2002;61(Suppl 3):iii8–18.
- Braun J, et al. Efficacy and safety of infliximab in patients with ankylosing spondylitis over a two-year period. *Arthritis Rheum*. 2008;59:1270–8.
- Dijkman B, et al. Etanercept in the long-term treatment of patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*. 2009;36:1256–64. <https://doi.org/10.3899/jrheum.081033>.
- van der Heijde D, et al. Adalimumab effectiveness for the treatment of ankylosing spondylitis is maintained for up to 2 years: long-term results from the ATLAS trial. *Ann Rheum Dis*. 2009;68:922–9.
- Deodhar A, et al. Golimumab administered subcutaneously every 4 weeks in ankylosing spondylitis: 5-year results of the GO-RAISE study. *Ann Rheum Dis*. 2015;74:757–61.
- Landewe R, et al. Efficacy of certolizumab pegol on signs and symptoms of axial spondyloarthritis including ankylosing spondylitis: 24-week results of a double-blind randomised placebo-controlled phase 3 study. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:39–47.
- Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. 2012; 119:651–65.
- Ware C, et al. Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells. *J Immunol*. 1991;147:4229–38.
- Mason A, et al. Regulation of NK cells through the 80-kDa TNFR (CD120b). *J Leukoc Biol*. 1995;58:249–55.
- Yang L, Lindholm K, Konishi Y, Li R, Shen Y. Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways. *J Neurosci*. 2002;22:3025–32.
- Faustman DL, Davis M. TNF receptor 2 and disease: autoimmunity and regenerative medicine. *Front Immunol*. 2013;4(478):1–8.
- Naude PJ, den Boer JA, Luiten PG, Eisel UL. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *FEBS J*. 2011;278:888–98.
- Vincent FB, et al. Antidrug antibodies (ADAb) to tumour necrosis factor (TNF)-specific neutralising agents in chronic inflammatory diseases: a real issue, a clinical perspective. *Ann Rheum Dis*. 2013;72:165–78.
- Haberhauer G, Strehlow C, Fasching P. Observational study of switching anti-TNF agents in ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis versus rheumatoid arthritis. *Wien Med Wochenschr*. 2010;160:220–4.
- Arends S, et al. Baseline predictors of response and discontinuation of tumor necrosis factor-alpha blocking therapy in ankylosing spondylitis: a

- prospective longitudinal observational cohort study. *Arthritis Res Ther.* 2011;13:R94.
23. Arends S, van der Veer E, Kallenberg CG, Brouwer E, Spoorenberg A. Baseline predictors of response to TNF-alpha blocking therapy in ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol.* 2012;24:290–8.
 24. Lord PA, et al. Predictors of response to anti-TNF therapy in ankylosing spondylitis: results from the British Society for Rheumatology biologics register. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49:563–70.
 25. Maneiro JR, Souto A, Salgado E, Mera A, Gomez-Reino JJ. Predictors of response to TNF antagonists in patients with ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis: systematic review and meta-analysis. *RMD Open.* 2015;1:e000017.
 26. Rudwaleit M, Listing J, Brandt J, Braun J, Sieper J. Prediction of a major clinical response (BASDAI 50) to tumour necrosis factor alpha blockers in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2004;63:665–70.
 27. Rudwaleit M, et al. MRI in predicting a major clinical response to anti-tumour necrosis factor treatment in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67:1276–81.
 28. Seitz M, Wirthmuller U, Moller B, Villiger PM. The –308 tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism predicts therapeutic response to TNFalpha-blockers in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients. *Rheumatology (Oxford).* 2007;46:93–6.
 29. Tong Q, et al. TNF-alpha –857 and –1031 polymorphisms predict good therapeutic response to TNF-alpha blockers in Chinese Han patients with ankylosing spondylitis. *Pharmacogenomics.* 2012;13:1459–67.
 30. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum.* 1984;27:361–8.
 31. Garrett S, et al. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol.* 1994;21:2286–91.
 32. Steinbrich-Zollner M, et al. From transcriptome to cytome: integrating cytometric profiling, multivariate cluster, and prediction analyses for a phenotypical classification of inflammatory diseases. *Cytometry A.* 2008;73:333–40.
 33. Sørensen T, Baumgart S, Durek P, Grützkau A, Häupl T. ImmunoClust—an automated analysis pipeline for the identification of immunophenotypic signatures in high-dimensional cytometric datasets. *Cytometry A.* 2015;87:603–15.
 34. Reveille J. Biomarkers for diagnosis, monitoring of progression, and treatment responses in ankylosing spondylitis and axial spondyloarthritis. *Clin Rheumatol.* 2015;34:1009–18.
 35. de Vries MK, et al. Erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein level, and serum amyloid A protein for patient selection and monitoring of anti-tumour necrosis factor treatment in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2009;61:1484–90.
 36. Luc M, et al. C-reactive protein predicts tumor necrosis factor-alpha blocker retention rate in axial ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* 2007;34:2078–81.
 37. Evans D, et al. Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat Genet.* 2011;43:761–7.
 38. Arends S, et al. Serum MMP-3 level as a biomarker for monitoring and predicting response to etanercept treatment in ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* 2011;38:1644–50.
 39. Poddubnyy D, et al. Elevated serum level of the vascular endothelial growth factor predicts radiographic spinal progression in patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2014;73:2137–43.
 40. Carvajal Alegria G, Gazeau P, Hillion S, Daien CI, Cornec DYK. Could lymphocyte profiling be useful to diagnose systemic autoimmune diseases? *Clinic Rev Allerg Immunol.* 2017;53:219–36.
 41. Aramaki T, et al. A significantly impaired natural killer cell activity due to a low activity on a per-cell basis in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2009;19:245–52.
 42. Vranes Z, Poljakovic Z, Marusic M. Natural killer cell number and activity in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 1989;94:115–23.
 43. Cameron AL, Kirby B, Griffiths CE. Circulating natural killer cells in psoriasis. *Br J Dermatol.* 2003;149:160–4.
 44. Ewan PW, Barrett HM, Pusey CD. Defective natural killer (NK) and killer (K) cell function in systemic lupus erythematosus. *J Clin Lab Immunol.* 1983;10:71–6.
 45. Conigliaro P, Scrivo R, Valesini G, Perricone R. Emerging role for NK cells in the pathogenesis of inflammatory arthropathies. *Autoimmun Rev.* 2011;10:577–81.
 46. Lopez-Botet M, Moretta L, Strominger J. NK-cell receptors and recognition of MHC class I molecules. *Immunol Today.* 1996;17:212–4.
 47. Mousavi T, et al. Phenotypic study of natural killer cell subsets in ankylosing spondylitis patients. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2009;8:193–8.
 48. Azuz-Lieberman N, et al. The involvement of NK cells in ankylosing spondylitis. *Int Immunol.* 2005;17:837–45.
 49. Chan AT, Kollnberger SD, Wedderburn LR, Bowness P. Expansion and enhanced survival of natural killer cells expressing the killer immunoglobulin-like receptor KIR3DL2 in spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* 2005;52:3586–95.
 50. Scrivo R, Morrone S, Spadaro A, Santoni A, Valesini G. Evaluation of degranulation and cytokine production in natural killer cells from spondyloarthritis patients at single cell level. *Cytometry B Clin Cytom.* 2011;80:22–7.
 51. Addison EG, et al. Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology.* 2005;116:354–61.
 52. Srour EF, Leemhuis T, Jenks L, Redmond R, Jansen J. Cytolytic activity of human natural killer cell subpopulations isolated by four-color immunofluorescence flow cytometric cell sorting. *Cytometry.* 1990;11:442–6.
 53. Gibbings D, Befus AD. CD4 and CD8: an inside-out coreceptor model for innate immune cells. *J Leukoc Biol.* 2009;86:251–9.
 54. Fischer R, Kontermann RE, Maier O. Targeting sTNF/TNFR1 signaling as a new therapeutic strategy. *Antibodies.* 2015;4:48–70.
 55. Solomaon KA, Pesti N, Wu G, Newton RC. Cutting edge: a dominant negative form of TNF-alpha converting enzyme inhibits proTNF and TNFR1 secretion. *J Immunol.* 1999;163:4105–8.
 56. Wallach D, et al. Soluble and cell surface receptors for tumor necrosis factor. *Agents Actions Suppl.* 1991;35:51–7.
 57. Meusch U, et al. In vitro response pattern of monocytes after tmTNF reverse signaling predicts response to anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis. *J Transl Med.* 2015;13:256. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0620-z>.
 58. Pinckard JK, Sheehan KC, Arthur CD, Schreiber RD. Constitutive shedding of both p55 and p75 murine TNF receptors in vivo. *J Immunol.* 1997;158:3869–73.
 59. Higuchi M, Aggarwal BB. TNF induces internalization of the p60 receptor and shedding of the p80 receptor. *J Immunol.* 1994;152:3550–8.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



13 Lebenslauf

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

14 Publikationsliste

Schulte-Wrede U, Sørensen T, Grün JR, Häupl T, Hirsland H, Steinbrich-Zöllner M, Wu P, Radbruch A, Poddubnyy D, Sieper J, Syrbe U, Grützkau A. "An explorative study on deep profiling of peripheral leukocytes to identify predictors for responsiveness to anti-tumour necrosis factor alpha therapies in ankylosing spondylitis: natural killer cells in focus".

Arthritis Res Ther. 2018 Aug 29;20(1):191.

Einflussfaktor: 4.269 (2017)

Smiljanovic B, Radzikowska A, Kuca-Warnawin E, Kurowska W, Grün JR, Stuhlmüller B, Bonin M, **Schulte-Wrede U**, Sørensen T, Kyogoku C, Bruns A, Hermann S, Ohrndorf S, Aupperle K, Backhaus M, Burmester GR, Radbruch A, Grützkau A, Maslinski W, Häupl T. "Monocyte alterations in rheumatoid arthritis are dominated by preterm release from bone marrow and prominent triggering in the joint."

Ann Rheum Dis. 2018 Feb;77(2):300-308.

Einflussfaktor: 14.299 (2018)

Baumgart S, Peddinghaus A, **Schulte-Wrede U**, Mei HE, Grützkau A. "OMIP-034: Comprehensive immune phenotyping of human peripheral leukocytes by mass cytometry for monitoring immunomodulatory therapies."

Cytometry A. 2017 Jan;91(1):34-38.

Einflussfaktor: 3.433 (2018)

Kyogoku C, Smiljanovic B, Grün JR, Biesen R, **Schulte-Wrede U**, Häupl T, Hiepe F, Alexander T, Radbruch A, Grützkau A. "Cell-specific type I IFN signatures in autoimmunity and viral infection: what makes the difference?"

PLoS One. 2013 Dec 31;8(12):e83776.

Einflussfaktor: 2.776 (2018)

Smiljanovic B, Grün JR, Biesen R, **Schulte-Wrede U**, Baumgrass R, Stuhlmüller B, Maslinski W, Hiepe F, Burmester GR, Radbruch A, Häupl T, Grützkau A. "The multifaceted balance of TNF- α and type I/III interferon responses in SLE and RA: how monocytes manage the impact of cytokines."

J Mol Med (Berl). 2012 Nov;90(11):1295-309.

Einflussfaktor: 4.938 (2017)

Thuere C, Zenclussen ML, Schumacher A, Langwisch S, **Schulte-Wrede U**, Teles A, Paeschke S, Volk HD, Zenclussen AC. "Kinetics of regulatory T cells during murine pregnancy."

Am J Reprod Immunol. 2007 Dec;58(6):514-23.

Einflussfaktor: 2.916 (2015)

15 Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die mich während dieser Forschungsarbeit begleitet und unterstützt haben. Insbesondere möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas Radbruch für die Überlassung des Themas und Herrn Dr. rer. nat. Andreas Grützkau für seine Betreuung sowie Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danken. Dipl.-Math. Till Sörensen und Dr. rer. nat. Joachim Grün verdanke ich die Hilfe bei der statistischen Datenauswertung.

Der Arbeitsgruppe Immunmonitoring am DRFZ, insbesondere Heike Hirsland und Dr. rer. nat. Sabine Baumgart, danke ich für den fachlichen Austausch.

Prof. Dr. med. Joachim Sieper, PD Dr. med. Thomas Häupl und Dr. rer. nat. Biljana Smiljanovic möchte ich herzlich danken für lehrreiche Diskussionen sowie fortwährende Unterstützung bei dieser Promotionsarbeit. Dipl. Ing. Toralf Kaiser, Jenny Kirsch, Peihua Wu, und Silvia Pade bin ich sehr dankbar für ihre Hilfe bei der Akquisition von Spendern und der Durchführung von Experimenten. Für das Interesse an meiner Arbeit und die Unterstützung bei der Finalisierung dieser Arbeit geht ein besonderer Dank an meine Familie, insbesondere an meine Schwester, Beata Schulte-Wrede.