

Aus dem Zentrum Innere Medizin (ZIM)
Medizinische Klinik und Poliklinik II
Rheumatologie/ Klinische Immunologie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele

**Klonale T-LGL-Zellen bei Patienten
mit Rheumatoider Arthritis**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von

Lara Päldsom Rosemarie Junker
aus Frankfurt am Main

Würzburg, Dezember 2020



Referent: Professor Dr. med. Hans-Peter Tony

Korreferentin: Professor Dr. med. Martina Prelog

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13. April 2021

Die Promovendin ist Ärztin.

In Liebe und Dankbarkeit
meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Rheumatoide Arthritis | 1 |
| 1.1. Definition | 1 |
| 1.2. Epidemiologie | 2 |
| 1.3. Ätiologie und Pathogenese | 3 |
| 1.4. Diagnostik und Labor | 6 |
| 1.5. Klinische Symptome | 12 |
| 1.6. Therapie | 15 |
| 1.7. Prognose | 19 |
| 2. T-Large Granular Lymphocytes Leukämie (T-LGL-Leukämie) | 20 |
| 2.1. Definition | 20 |
| 2.2. Epidemiologie | 21 |
| 2.3. Ätiologie und Pathogenese | 21 |
| 2.3.1. Pathogenese der Neutropenie im Rahmen der T-LGL-Leukämie | 22 |
| 2.4. Diagnostik und Labor | 23 |
| 2.4.1. Differentialdiagnose Felty-Syndrom | 26 |
| 2.5. Klinische Symptome | 28 |
| 2.6. Therapie und Prognose | 29 |
| 3. Zielsetzung der Arbeit | 32 |
| 4. Material und Methoden | 33 |
| 4.1. Patientenkollektiv | 33 |
| 4.1.1. Einschlusskriterien | 34 |
| 4.1.2. Ausschlusskriterien | 34 |
| 4.2. Erhebung der Patientendaten | 34 |
| 4.2.1. Raucheranamnese | 35 |
| 4.2.2. Komorbiditäten | 36 |
| 4.2.3. Blutbild und serologische Parameter | 36 |
| 4.2.4. Medikation | 37 |
| 4.3. Blutproben | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4. Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) | 40 |
| 4.4.1. Antikörper | 40 |
| 4.4.2. Reagenzien | 41 |
| 4.4.3. Materialien und Geräte | 42 |
| 4.4.4. Vorbereitung und Durchführung | 42 |
| 4.4.5. Technik der Durchflusszytometrie | 44 |
| 4.4.6. Gating Strategie | 46 |
| 4.4.7. Auswertung | 54 |
| 4.5. Klonalitätsanalyse mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) | 54 |
| 4.5.1. Primer | 55 |
| 4.5.2. Geräte | 56 |
| 4.5.3. Prinzip der PCR | 56 |
| 4.5.4. Durchführung | 57 |
| 4.5.5. DNA-Extraktion | 57 |
| 4.5.6. DNA-Vervielfältigung | 58 |
| 4.5.7. Darstellung der Klonalitätsanalysen | 60 |
| 4.6. Kriterien für eine klonale T-LGL-Zellvermehrung | 61 |
| 4.7. Studiendesign | 61 |
| 4.8. Statistische Analyse | 61 |
| 5. Ergebnisse | 63 |
| 5.1. Gesamtes Patientenkollektiv | 63 |
| 5.1.1. Allgemeine Charakteristika | 63 |
| 5.1.2. Laborparameter | 65 |
| 5.1.3. Lymphozytensubpopulationen | 66 |
| 5.1.4. Medikamente zur Therapie der Rheumatoiden Arthritis | 68 |
| 5.1.5. Medikation bei Studieneinschluss | 69 |
| 5.1.6. Komorbiditäten | 70 |
| 5.2. Patienten ohne klonale T-LGL-Zellexpansion | 72 |
| 5.2.1. Allgemeine Charakteristika | 72 |
| 5.2.2. Laborparameter | 73 |
| 5.2.3. Lymphozytensubpopulationen | 74 |

| | |
|--|------------|
| 5.2.4. Medikamente zur Therapie der Rheumatoiden Arthritis | 75 |
| 5.2.5. Medikation bei Studieneinschluss | 76 |
| 5.2.6. Komorbiditäten | 77 |
| 5.3. Patienten mit klonaler T-LGL-Zellexpansion | 78 |
| 5.3.1. Ergebnisse der Klonalitätsanalyse | 78 |
| 5.3.2. Allgemeine Charakteristika | 78 |
| 5.3.3. Laborparameter | 80 |
| 5.3.4. Lymphozytensubpopulationen | 82 |
| 5.3.5. Medikamente zur Therapie der Rheumatoiden Arthritis | 83 |
| 5.3.6. Medikation bei Studieneinschluss | 84 |
| 5.3.7. Komorbiditäten | 85 |
| 5.4. Vergleich der beiden Patientenkollektive | 87 |
| 5.4.1. Allgemeine Charakteristika | 87 |
| 5.4.2. Laborparameter | 89 |
| 5.4.3. Lymphozytensubpopulationen | 90 |
| 5.4.4. Medikamente zur Therapie der Rheumatoiden Arthritis | 91 |
| 5.4.5. Medikation bei Studieneinschluss | 93 |
| 5.4.6. Komorbiditäten | 94 |
| 6. Analyseschritte der Untersuchung | 95 |
| 7. Diskussion | 96 |
| 8. Zusammenfassung | 109 |
| 9. Eigenanteil | 110 |
| 10. Geschlechtergerechte Sprache | 112 |
| 11. Literaturverzeichnis | 113 |
| 12. Abbildungsverzeichnis | 141 |
| 13. Tabellenverzeichnis | 142 |
| 14. Abkürzungsverzeichnis | 144 |

15. Anhang

15.1. Patienteninformation und Aufklärung

15.2. Studienprotokoll

Danksagung

Curriculum Vitae

1. Rheumatoide Arthritis

1.1. Definition

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung, die meist schubweise und progredient verläuft. In erster Linie betrifft sie symmetrisch die Metacarpophalangeal- und die proximalen Interphalangealgelenke der Hände, häufig auch die der Vorfüße. Charakteristischerweise sind die betroffenen Gelenke geschwollen, steif und schmerzempfindlich. Bis zu einem Drittel der Patienten zeigen bereits im Akutstadium zusätzlich allgemeine Krankheitssymptome wie Abgeschlagenheit, subfebrile Temperaturen, Gewichtsverlust oder Depressionen. Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium, so wie seltener auch von Beginn an, kann sich eine RA auf weiter proximal gelegene Gelenke und extraartikulär ausbreiten (1) (2) (3). Es sind vor allem Herz und Lunge betroffen, aber auch im Bereich des Auges oder der Gefäße kann sich die systemische Inflammation manifestieren (2) (4). Auch das Risiko für maligne Erkrankungen, insbesondere für Lymphome ist bei einer RA erhöht (5) (6) (7). Die durch verschiedene und teilweise ungeklärte Mechanismen ausgelöste Entzündung kann unbehandelt zur Destruktion der Gelenkstrukturen führen, was Invalidität zur Folge haben kann (1) (8).

Aus diesem Grund wird die Therapie möglichst frühzeitig mit synthetischen und/oder biologischen DMARDs (Disease-modifying anti-rheumatic drugs) nach dem Prinzip „hit hard and early“ begonnen. Die Erstlinien-Therapie stellt Methotrexat (MTX) dar. Weiterführend kommen häufig Biologika zum Einsatz, welche in die Mechanismen des Immunsystems eingreifen und Entzündungsprozesse unterdrücken können. Ziele der Behandlung sind, die Krankheitsaktivität gering zu halten, irreversible Schäden zu vermeiden und im Idealfall eine Remission zu erreichen (9) (10) (11) (12). Der Begriff der Remission wird im Abschnitt „1.6. Therapie“ definiert.

1.2. Epidemiologie

Die Rheumatoide Arthritis gehört zu den bedeutendsten chronisch entzündlichen Erkrankungen. Die Prävalenz liegt bei ca. 1% unter Erwachsenen (13). Je nach Geschlecht und Herkunftsland weichen die Werte leicht vom Durchschnittswert ab. Die höchste Prävalenz zeigt sich unter Frauen aus nördlich gelegenen Industriestaaten (14). Die Inzidenz der Erkrankung ist schwankend. In der amerikanischen Untersuchung von Doran et al. konnte über 40 Jahre hinweg eine deutliche Abnahme der Inzidenz, von 61,2 auf 32,7 unter 100.000 Personen, aufgezeigt werden (15). Wohingegen Myasoedova et al. in der Zeitspanne von 1955 bis 2007 einen leichten Anstieg der Neuerkrankungen unter Frauen nachwies (16). Für die Schwankungen werden vor allem veränderte Umweltfaktoren als ursächlich erachtet (15) (16).

Mit steigendem Alter erhöht sich das Erkrankungsrisiko. Im Durchschnitt liegt das Hauptmanifestationsalter zwischen dem 55. und 60. Lebensjahr (13) (15) (16). Frauen sind dabei etwa zwei- bis dreimal häufiger als Männer betroffen (3) (9) (15) (16). Hormonelle Unterschiede werden als ein Aspekt der geschlechtsspezifischen Verteilung vermutet (14). Auch Kinder können betroffen sein. In diesem Fall wird von einer juvenilen idiopathischen Arthritis gesprochen (9).

Eine familiäre Häufung ist zu beobachten, was eine genetische Disposition wahrscheinlich macht. Eine tragende Rolle spielt das HLA (Humanes Leukozytenantigen) -DR4 /DRB1, welches im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung deutlich häufiger bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden kann (9) (17).

Abgesehen von den möglichen Folgen für die Patienten durch Mobilitätseinschränkungen, Komorbiditäten und zuletzt Invalidität, stellen die zum Teil früh auftretende Arbeitsunfähigkeit und die damit einhergehenden Krankheitsfolgekosten ein erheblich soziales und ökonomisches Problem dar (18).

1.3. Ätiologie und Pathogenese

Die genauen Ursachen der Rheumatoiden Arthritis sind bisher nicht vollständig geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass die Erkrankung multifaktoriell bedingt ist, wobei ein Zusammenspiel aus Umweltfaktoren, wie beispielsweise Infektionen, genetischer Disposition und Autoimmunprozessen als wahrscheinlich erachtet wird. Weitere Aspekte, die in der Ätiologie berücksichtigt werden müssen, sind ein fortgeschrittenes Lebensalter und eine positive Raucheranamnese (14).

Es ist davon auszugehen, dass sich die Pathogenese in eine Antigenpräsentation, eine Immunsystemreaktion und eine daraus resultierenden Inflammation mit Gelenkdestruktion gliedert (19). Innerhalb einer physiologischen Abwehrreaktion kommt es beim Kontakt des Immunsystem mit einem zuvor unbekanntem (Auto-) Antigen durch intrazelluläre Signalkaskaden zu einer kurzfristigen Aktivierung und Proliferation von Zellen und einer Zytokinausschüttung. Das Antigen führt über Antigen-präsentierende Zellen zu einer Aktivierung von T-Lymphozyten, welche in der Lage sind, weitere Entzündungszellen zu stimulieren. Im Verlauf wird die Entzündungsreaktion durch verschiedene Mechanismen herabreguliert (20) (21). Im Gegensatz dazu wird im Fall einer RA eine dauerhafte Zellstimulation beobachtet, was die anhaltende Entzündungsreaktion und die damit verbundene Destruktion der körpereigenen Strukturen bedingt (19).

Vorrangig sind CD4 (cluster of differentiation) positive T-Lymphozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten, synoviale Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoklasten an der Krankheitsentstehung und -aufrechterhaltung beteiligt (19) (22).

Sind die proinflammatorischen Zellen in die Gelenkstruktur eingewandert, fördern sie die Entzündung und die Aktivierung weiterer Zellen durch die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, wie dem Tumor Nekrose Faktor (TNF) und Interleukinen (IL) (3) (9) (19) (22) (23). Die daraus im Verlauf resultierende Gelenkzerstörung wird nicht nur durch Entzündungszellen, sondern viel mehr durch synoviale Fibroblasten beeinflusst. Diese heften sich über Adhäsionsmoleküle an den Knorpel und produzieren Proteasen, wodurch es zur

Knorpeldestruktion kommt. In vitro kann eine Verstärkung der Invasion durch TNF nachgewiesen werden (24).

Bei der Knochendestruktion spielen neben Zytokinen und Antikörpern der Faktor RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) eine tragende Rolle. Dieser kann unter anderem von T-Zellen exprimiert werden und stimulierend auf die Osteoklastendifferenzierung wirken, sodass das Verhältnis von Knochenaufbau zu -abbau aus dem Gleichgewicht gerät. Das kann zu einem dauerhaften Verlust von Knochensubstanz führen. Aber auch andere Faktoren, wie der Tumor Nekrose Faktor scheinen an der Osteoklastenaktivierung beteiligt zu sein. So kann unter Therapie mit TNF α -Inhibitoren eine Reduktion des Knochenabbaus festgestellt werden (8) (23) (25) (22).

Neben dem Abbau von Gelenkstrukturen kommt es zeitgleich zu einer Zellvermehrung im Bereich der Synovialmembran. Die synoviale Hyperplasie wird als Pannus bezeichnet und stellt das charakteristische Bild einer chronischen Polyarthrits dar (9). Ursächlich für die Zellvermehrung wird statt einer erhöhten Proliferationsrate mehr eine Apoptoseresistenz der Fibroblasten vermutet, die durch eine Hochregulation von Proto-Onkogene ausgelöst sein könnte (24). Die Gefäßneubildungen durch pro-angiogene Faktoren, das ausbreitende Wachstum bei zeitgleicher Destruktion umliegender Gewebe werden mit einem örtlich begrenzt wachsendem Tumor verglichen. Es wird auch von „Tumor-like Proliferation“ gesprochen (9) (22) (24) (26) (27).

Die Beteiligung von B-Zell-Lymphozyten an der Pathogenese der RA ist nicht vollständig verstanden. Sie werden im Rahmen von Antigenpräsentationen aktiviert und produzieren Antikörper, wie beispielsweise den Rheumafaktor und Zytokine. Außerdem sind sie in der Lage, Antigene zu präsentieren und T-Zellen zu aktivieren (28) (29). Der CD20-Antikörper Rituximab bewirkt durch das Anheften an das CD20-Molekül eine B-Zelledepletion aus dem Blut (30). Dadurch kann bei therapierefraktären RA-Patienten häufig ein Rückgang der Entzündungsaktivität festgestellt werden (31).

Eine Rolle in der unkontrollierten Zellaktivierung spielen möglicherweise die regulatorischen T-Zellen, eine Untergruppe der CD4 positiven T-Zellen. Sie stellen 1-4% der CD4 positiven T-Zellen dar und exprimieren charakteristischerweise CD4, CD25^{high} und geringe Mengen CD127 auf ihrer Oberfläche. Die regulatorischen T-Zellen sind an der Regulation des Immunsystems, insbesondere der T-Zellen und somit auch an Entzündungsprozessen beteiligt. Eine Dysregulation dieser kann Autoimmun- und Tumorerkrankungen begünstigen (32).

Bei der RA handelt es sich somit nicht nur um eine Immunantwort auf ein auslösendes Fremdantigen, sondern es scheint vielmehr um eine autoreaktive Entartung der Immunreaktion zu gehen. Die Autoren Geiler et al. beschreiben eine „molekulare Mimikry“, bei der körpereigene Antigene fälschlicherweise erkannt und angegriffen werden (33). Ob und wie stark eine Autoimmunreaktion im Körper ausgelöst wird, könnte von einer genetischen Disposition abhängig sein (33). Die genetische Komponente kann durch eine spezifische Aminosäuresequenz in der β -Kette der HLA-DR erklärt werden. Die spezifische Kombination von Aminosäuren wird als „Shared Epitope“ bezeichnet (34). Im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung können diese genetischen Variationen signifikant häufiger unter RA-Patienten nachgewiesen werden (35) (36). Die Fähigkeit der HLA-Moleküle, Antigene und möglicherweise auch Autoantigene gegenüber T-Zellen zu präsentieren, unterstützt die Beteiligung an der RA Pathogenese (33). Zudem konnten im Zusammenhang mit bestimmten HLA-DR-Allelen vermehrt Antikörper gegen Kollagen Typ II (37) und vermehrte Knochenerosionen im Röntgenbild (38) nachgewiesen werden. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass es sich dabei nicht um krankheitsspezifische Allele handelt, sondern vielmehr um eine Prädisposition für autoreaktive Prozesse (23), denn auch in der gesunden Allgemeinbevölkerung kann das Genmerkmal nachgewiesen werden (9).

Es kommt also durch ein unbekanntes Antigen zu einer unregulierten Stimulation von Entzündungszellen, welche durch Zytokinausschüttung und sich gegenseitig bedingende Faktoren eine anhaltende proinflammatorische Wirkung zeigen. Die dadurch hervorgerufene Synovitis in Zusammenhang mit einer autoreaktiven Komponente führen zu einer Destruktion der Gelenkstrukturen. Eine entsprechende genetische Disposition kann einen unterstützenden Faktor darstellen (22) (19).

1.4. Diagnostik und Labor

Die Diagnostik setzt sich aus einer ausführlichen Anamnese, einer körperlichen Untersuchung, laborchemischer und apparativer Diagnostik zusammen. Um frühzeitig die Diagnose stellen und rechtzeitig eine Therapie einleiten zu können, werden die Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) und der European League Against Rheumatism (EULAR) von 2010 zur Hilfe genommen. Im Rahmen der Klassifikation werden Schwellungen und Schmerzhaftigkeit der Gelenke, Serologie, Entzündungsparameter des Blutes und Symptombdauer bewertet. Die maximal zu erreichende Punktzahl beträgt zehn. Ab sechs oder mehr Punkten kann von einer Rheumatoiden Arthritis ausgegangen werden (39). Die folgende Tabelle veranschaulicht die Punktevergabe:

Tabelle 1: ACR/EULAR-Klassifikationskriterien der RA von 2010

| | | |
|----------------------|--|----------|
| Betroffene Gelenke | 1 großes Gelenk ¹ | 0 Punkte |
| | 2-10 große Gelenke | 1 Punkt |
| | 1-3 kleine Gelenke ² (mit oder ohne Beteiligung großer Gelenke) | 2 Punkte |
| | 4-10 kleine Gelenke (mit oder ohne Beteiligung großer Gelenke) | 3 Punkte |
| | >10 Gelenke, davon ≥ 1 kleines Gelenk | 5 Punkte |
| Serologie | RF ³ und Anti-CCP-Ak ⁴ negativ | 0 Punkte |
| | RF oder Anti-CCP-Ak leicht erhöht | 2 Punkt |
| | RF oder Anti-CCP-Ak ≥ 3 -fach erhöht | 3 Punkte |
| Entzündungsparameter | CRP ⁵ und BSG ⁶ normal | 0 Punkte |
| | CRP oder BSG erhöht | 1 Punkt |
| Symptombdauer | <6 Wochen | 0 Punkte |
| | ≥ 6 Wochen | 1 Punkt |

¹Große Gelenke: Sprung-, Knie-, Hüft-, Ellenbogen- und Schultergelenk

²Kleine Gelenke: Fingergrund- (MCP) und Fingermittelgelenke (PIP) I-V, Zehengrundgelenke (MTP) II-V, Daumen Interphalangealgelenke und Hangelenke

³RF: Rheumafaktor

⁴Anti-CCP-Ak: Anti-Citrullinated Protein Antibodies, ACPA

⁵CRP: C-reaktives Protein

⁶BSG: Blutsenkungsgeschwindigkeit

Nach der Klassifikation der American Rheumatism Association von 1987 müssen vier der sieben folgenden Kriterien und eines davon über einen Zeitraum von

mindestens sechs Wochen erfüllt sein, um die Diagnose einer Rheumatoiden Arthritis stellen zu können:

1. Morgensteifigkeit für mindestens eine Stunde
2. Arthritis/ Weichteilschwellung von drei oder mehr Gelenkregionen
3. Arthritis/ Weichteilschwellung von den proximalen Interphalangeal-, Metacarpophalangeal- oder Handgelenken
4. Symmetrisches Auftreten der Arthritis
5. Auftreten von Rheumaknoten
6. Nachweis eines erhöhten Rheumafaktors im Serum
7. Typische Veränderungen im Röntgen (gelenknahe Osteoporose oder Erosionen)

Die Kriterien der American Rheumatism Association weisen eine Sensitivität von 91-94% und eine Spezifität von 89% für den Nachweis einer RA auf (40).

Auf die charakteristische Symptomatik und ihre klinische Untersuchung wird im Abschnitt „1.5. Klinische Symptome“ näher eingegangen.

Um die Krankheitsaktivität zu objektivieren und im Verlauf zu dokumentieren, werden unterschiedliche Composite Scores herangezogen. Dazu gehören der Disease Activity Score for 28 joints (DAS28), der Simplified Disease Activity Index (SDAI) und der Clinical Disease Activity Index (CDAI) (41) (42). Wie auch in der vorliegenden Arbeit wird vorzugsweise der DAS28-Score verwendet. Dieser beinhaltet Schwellung und Druckschmerzhaftigkeit von 28 definierten Gelenken (Finger-, Hand-, Ellenbogen-, Schulter- und Kniegelenke), die Blutsenkungsgeschwindigkeit und die individuelle Patienteneinschätzung zur Krankheitsaktivität (10) (43). Von Nachteil ist, dass die Beteiligung der Füße nicht berücksichtigt wird (10).

Nach der körperlichen Untersuchung werden routinemäßig Laborwerte bestimmt, wobei ein besonderes Augenmerk auf den Entzündungsparametern, wie Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und C-reaktives Protein (CRP) liegt. Eine

Erhöhung der Werte korreliert bei einigen Patienten mit der Entzündungsaktivität der RA und kann bei diesen als ein Verlaufsparemeter zur Verifizierung des Therapieerfolges eingesetzt werden (44). Zusätzlich sind häufig das Speichereisen Ferritin und die α -/ γ -Globuline im Rahmen der chronischen Inflammation erhöht (9).

Eventuell können sich Blutbildveränderungen, in Form einer normo- oder hypochromen Anämie oder einer milden Thrombozytose, feststellen lassen. Auch das körpereigene Eiweiß Albumin kann bei erheblicher Krankheitsaktivität reduziert sein (41) (9).

Zu den zusätzlich erhobenen Laborparametern bei Verdacht auf eine RA zählen ACPA (anti-citrullinated-protein-antibodies), RF (Rheumafaktoren) und ANAs (Antinukleäre Antikörper) (45) (44).

ACPA sind Autoantikörper gegen citrullinierte Peptide. Dieser Wert ist mit über 90% hochspezifisch für das Vorliegen einer RA. Die Sensitivität ist deutlich niedriger mit etwa 65-70% (45). Rheumafaktoren stellen Autoantikörper gegen das Fc-Fragment des Immunglobulin G dar. Da der Faktor bei vielen chronisch-entzündlichen Erkrankungen und sogar auch bei Gesunden erhöht sein kann, ist seine Spezifität als eher niedrig mit 79% einzustufen (45). Jedoch ist der Nachweis des Rheumafaktors - mit oder ohne zeitgleichem Vorhandensein von ACPA - mit einer erhöhten Krankheitsaktivität assoziiert (46) (47).

Sowohl der Anti-CCP-Antikörper als auch der Rheumafaktor sind bei einem Teil der Patienten bereits Jahre vor Ausbruch der Erkrankung erhöht (48).

Der ANA-Wert ist unspezifisch und bei einer Rheumatoiden Arthritis nur in 41% der Fälle erhöht (44). Er kann jedoch zur differentialdiagnostischen Einordnung der Erkrankung sinnvoll sein.

Bildgebende Verfahren sind wichtig zur Diagnosesicherung, Bestimmung des Krankheitsstadiums und zur Verlaufskontrolle. Sonographie, konventionelle Röntgenaufnahmen, Magnetresonanztomographie, Computertomographie und Szintigraphie stehen zur Verfügung. Obwohl die Untersuchungen mittels

Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) sensitiver als eine herkömmliche Röntgenaufnahme sind, gehören sie im klinischen Alltag nicht zur Routinediagnostik. Sonographien und Röntgenaufnahmen werden routinemäßig durchgeführt (1) (41) (9).

Die Sonographie wird vorrangig zu Abklärung eines Gelenkergusses mit Kapselschwellung und einer Synovitis eingesetzt. Sie kann mit Hilfe des Power-Dopplers Auskunft über eine eventuelle Hyperperfusion der gelenknahen Strukturen und damit über den Grad der Entzündung geben. Nachteilig ist die untersucherabhängige Einschätzung der Befunde (9) (49). In neueren Studien konnten erstmalig verschiedene Pulsationsmuster in der Ultraschalldiagnostik in Korrelation mit dem Auftreten von ACPA dargestellt werden (50).

Das MRT ist vor allem bei Verdacht auf eine Zervikalarthritis sinnvoll, kann aber auch zur Frühdiagnostik an den Händen eingesetzt werden. Von Vorteil ist, dass damit eine wesentlich sensitivere Diagnostik von Erosionen als mittels konventionellem Röntgen möglich ist. Die hohen Kosten und der Zeitaufwand machen das MRT jedoch nicht zur ersten Wahl unter den diagnostischen Maßnahmen (1) (49) (51).

Standard der apparativen Diagnostik stellt immer noch das konventionelle Röntgenbild dar. Es werden dorsopalmare bzw. dorsoplantare Aufnahmen der Hände und Vorfüße angefertigt. Im Anfangsstadium der Erkrankung lassen sich häufig noch keine Veränderungen nachweisen. Jedoch schließt das Fehlen radiologischer Veränderungen eine Rheumatoide Arthritis nicht aus. In den ersten Jahren nach Diagnosestellung ist die Zunahme von Erosionen im Röntgenbild am deutlichsten zu beobachten (52), sodass nach drei Jahren etwa 70% der Patienten radiologische Gelenkveränderungen aufweisen (53).

Typische radiologische Zeichen einer RA sind Verschmälerung der Gelenkzwischenräume, gelenknahe Osteoporose, Knorpel- und Knochenläsionen,

Usuren und im fortgeschrittenem Stadium auch Luxationen und Gelenkzerstörungen (1) (9) (49).

Die Veränderungen im Röntgenbild können nach verschiedenen Klassifikationen eingeteilt werden. Dazu gehören beispielsweise Steinbrocker, Sharp, Larsen und die modifizierte Variante nach van der Heijde-Sharp.

Die Kriterien nach Steinbrocker:

- Stadium I: evtl. gelenknahe Osteoporose
- Stadium II: zusätzlich beginnende Knorpel- und Knochendestruktion
- Stadium III: zusätzlich beginnende Subluxationen und Fehlstellungen
- Stadium IV: Gelenkzerstörung und -deformierungen, Gelenkluxationen, Ankylosen (9)

Der Sharp-Score, der Larsen-Score und der van der Heijde-Sharp-Score werden vor allem im Rahmen von Studien zu einem objektiven Vergleich eingesetzt. Im klinischen Alltag haben sie geringe Bedeutung. Im Rahmen dieser Tests werden festgelegte Gelenkregionen auf Zeichen der Destruktion hin untersucht und klassifiziert (54).

Wird die Gelenkflüssigkeit untersucht, lassen sich in der sonst zellfreien Synovialflüssigkeit meist Entzündungszellen nachweisen. Charakteristisch ist eine deutliche Leukozytose, je nach Aktivität 4.000 – 50.000 Leukozyten/ μ l. Auch Rheumafaktoren lassen sich nachweisen (9). Der Glukosewert und die Komplementfaktoren C3 und C4 sind typischerweise erniedrigt (1). Der Nachweis von Bakterien im Punktat ist regulär nicht möglich und sollte stattdessen an eine Gelenkinfektion denken lassen (9).

1.5. Klinische Symptome

In der Initialphase bleibt die Erkrankung häufig unentdeckt, da sie sich lediglich in Allgemeinsymptomen wie Abgeschlagenheit, subfebrilen Temperaturen, Gewichtsverlust und Myalgien äußern kann. Erst im Verlauf bilden sich Symptome, wie Gelenkschwellungen und -schmerzen aus. Zu Beginn kann sich noch eine asymmetrische Polyarthritiden zeigen. Später präsentieren sich üblicherweise symmetrische Schwellungen und bewegungsunabhängige Schmerzen der kleinen Finger- und Handgelenke, seltener auch der Zehen- und Fußgelenke (1) (3) (9) (49) (2). Wobei die Finger- und Zehenendgelenke typischerweise nicht betroffen sind. Sind diese beteiligt, müssen Differentialdiagnosen in Betracht gezogen werden (9).

Charakteristischerweise tritt die RA-Symptomatik in Schüben auf und ist von Kraftverlust und Morgensteifigkeit begleitet. Diese wird erst im Laufe des Tages durch kontinuierliche Bewegung gelöst (1) (9) (49) (2).

Im fortgeschrittenen Stadium einer RA können Muskeln atrophieren und Gelenkdeformitäten entstehen. Die Hand des Patienten kann dabei krankheitsspezifische Form annehmen. Es wird von Ulnardeviationen, Knopflochdeformitäten, Schwanenhalsdeformierungen der Finger und von 90/90-Deformitäten des Daumens gesprochen. Die Ulnardeviation beschreibt das Abweichen der Finger Richtung ulnar. Eine Knopflochdeformität beschreibt die Beugestellung im Fingermittelgelenk und eine Überstreckung im Fingerendgelenk. Bei einer Überstreckung im Fingermittelgelenk und einer Beugestellung im Fingerendgelenk spricht man von der Schwanenhalsdeformität. Eine 90-90-Deformität des Daumens beschreibt eine Daumenbeugekontraktur. Sie zeigt sich durch ein Streckdefizit im Daumengrundgelenk mit Überstreckung im Endgelenk (9) (49). Auch gelenkumgebende Strukturen können von der inflammatorischen Reaktion betroffen sein. Festsustellen sind Bursitiden und Tendovaginitiden (9) (49) (2).

Ein Karpaltunnel-Syndrom tritt in bis zu 5% der Fälle in Zusammenhang mit einer RA auf. Es handelt sich um eine Kompression des Nervus medianus im Karpaltunnel, die vor allem zu nächtlichen Parästhesien und Schmerzen des Daumens, Zeige- und Mittelfingers führt. Auch eine Thenaratrophy ist eine mögliche Ausprägung des Syndroms. Der Faustschluss und die Opponierbarkeit des Daumens sind erschwert. Auslösbar sind die Schmerzen durch eine Dorsalflexion der Hand (Phalen-Zeichen) und durch das Beklopfen der Innenseite des Handgelenks (Hoffmann-Tinel-Zeichen) (9) (1).

Das Sulcus-Ulnaris-Syndrom kann bei Ellbogenarthritis und einer damit verbundenen Kompression des Nervus ulnaris auftreten. Es kommt zu Missempfindungen im vierten und fünften Finger (9) (1).

Die unteren Extremitäten sind allgemein seltener betroffen. Gehäuft in Zusammenhang mit einer RA tritt die Baker-Zyste auf. Bei dieser handelt es sich um eine Aussackung der Kniegelenkshöhle. Sie führt zu Bewegungseinschränkungen und Schmerzen beim Gehen. Durch Lockerung der Bänder des Kniehalteapparates kann es zu Fehlstellungen kommen (9) (49) (2). Zwei weitere Manifestationen der unteren Extremität sind die Achillessehnenruptur und die Stressfraktur des Calcaneus. Beide treten selten auf (1).

Rheumaknoten sind indolente, subkutan auftretende Knoten, die vor allem in Sehnen zu finden sind. Sie treten besonders an den Streckseiten der Gelenke, vorrangig an den Ellenbogen, auf. Es handelt sich dabei um nekrotisches Material und eine Ansammlung von Makrophagen. In bis zu einem Fünftel der RA-Fälle lassen sich diese nachweisen (9) (49).

Das Auftreten einer Arthritis in den zervikalen Gelenken kann Schmerzen und Nackensteifigkeit zur Folge haben. In der Maximalvariante kann es zu basilären Einengungen mit der Folge einer Querschnittslähmung kommen (1) (9) (49) (2).

Im Rahmen extraartikulärer Manifestationen ist am häufigsten die Lunge in Form einer asymptomatischen Pleuritis betroffen. Aber auch interstitielle

Lungenerkrankungen, Lungenfibrose, Bronchiolitis und pulmonal-arterielle Hypertonie können mit einer RA einhergehen. Die Lungenfibrose kann sowohl Ursprung in der RA haben, als auch eine seltene Nebenwirkung der Behandlung mit Methotrexat sein (9) (49) (2).

Das Herz ist in bis zu 30% der Fälle erkrankt. Perikarditiden, Myokarditiden und Herzklappenveränderungen sind dabei am häufigsten zu diagnostizieren. Meist sind sie jedoch asymptomatisch. Dass RA-Patienten ein erhöhtes Risiko für Arteriosklerose aufweisen, erklärt das dreifach erhöhte Risiko für Schlaganfälle und Herzinfarkte. Durch das erhöhte Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen steigt das Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko auf das 2-5-fache an (9) (49).

Die Leber kann im Rahmen einer unspezifischen Begleitreaktion betroffen sein (9) (49).

Eine Nierenbeteiligung in Form einer fokal membranösen Glomerulonephritis, subklinischen renalen Dysfunktion oder einer Amyloidose kommt ausgesprochen selten vor. Sollte es jedoch dazu kommen, erhöht sich das Mortalitätsrisiko signifikant (41) (9) (49).

Etwa 30% der RA-Patienten leiden an einer Keratoconjunctivitis sicca. Weitere Augenmanifestationen sind Skleritiden und Episkleritiden. Selten tritt ein Ulcus corneae auf. Treten Ulcera auf, sind diese als Hinweis auf eine erhöhte Mortalität anzusehen (9) (49).

Bei Befall der Gefäße im Sinne einer Vaskulitis kann es zu peripheren Durchblutungsstörungen, Hautulzera, Neuropathien und Nekrosen kommen (9) (49). Lymphknotenvergrößerungen und Splenomegalie können als Ausdruck der lymphatischen Beteiligung gewertet werden (49).

Ebenso kann die Psyche in Form von depressiven Verstimmungen und Niedergeschlagenheit betroffen sein (49).

Eine besonders schwere Verlaufsform der RA ist das Felty-Syndrom. Es tritt in unter 1% der Fälle auf und präsentiert sich mit der charakteristischen Trias von Hepatosplenomegalie, Granulozytopenie und Rheumatoider Arthritis (55).

Möglicherweise handelt es sich beim Felty-Syndrom und der T-LGL (large granular lymphocyte) -Leukämie um die selbe oder eine pathogenetisch ähnliche Erkrankung. Auf diese Theorie wird im Abschnitt der T-LGL-Leukämie konkreter eingegangen.

1.6. Therapie

Um eine Rheumatoide Arthritis adäquat behandeln zu können, ist es wichtig, möglichst viele Mechanismen zu kennen, welche die Krankheitsentstehung und -aufrechterhaltung erklären. In diesem Bereich wurden in den vergangenen Jahren große Fortschritte erzielt, sodass nicht mehr die symptomatische Behandlung, sondern die krankheitsmodulierende Medikation im Vordergrund steht (10) (11) (12).

Bei Diagnosestellung einer Rheumatoiden Arthritis sollte eine Therapie frühestmöglich eingeleitet werden (10) (11). Die Krankheitsaktivität kann so niedrig gehalten und Schmerzen frühzeitig reduziert werden. Denn bereits in den ersten Jahren der Erkrankung kann es zu irreversiblen Gelenkschäden kommen, die im Verlauf zu Deformitäten und Funktionsverlust führen können (56).

Die Leitlinien des American College of Rheumatology (ACR) und der European League Against Rheumatism (EULAR) bilden die Grundlage für die Behandlung (57) (11). Unterschieden werden drei Medikamentengruppen. Die Grundlage bilden die csDMARDs, konventionell synthetische DMARDs, zu denen Methotrexat, Leflunomid, Sulfasalazin und Hydroxychloroquin gehören (41) (10) (12). Zum anderen gibt es die Gruppe der Biologika, bDMARDs, bestehend aus TNF α -Inhibitoren (Etanercept, Infliximab, Adalimumab, Golimumab und Certolizumab), einem Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (Anakinra), Interleukin-6-Rezeptorantagonisten (Tocilizumab, Sarilumab), einem T-Zell-Costimulations-

Blocker (Abatacept) und einem Anti-CD20-Antikörper (Rituximab) (41) (10) (12). Im Rahmen der Biologika wird zusätzlich noch die Gruppe der Biosimilar-Biologika unterschieden. Dazu gehören Infliximab, Adalimumab und Etanercept. Es handelt sich dabei um biologisch hergestellte Produkte, die dem Original ähnlich sind, jedoch nicht identisch mit der ursprünglichen, molekulargenetischen Struktur (58). Die modernste Gruppe wird aus den JAK (Januskinase)-Inhibitoren (Baricitinib und Tofacitinib), targeted synthetic DMARDs, tsDMARDs, gebildet (41) (10) (12).

Nach Symptombeginn sollte die Therapie möglichst innerhalb der ersten drei Monate begonnen werden. Methotrexat stellt die Therapie der ersten Wahl dar. In der Regel wird der Folsäure-Antagonist zu Anfang mit einem niedrig dosierten Glukokortikoid kombiniert, sodass die Entzündung im Körper zügig eingedämmt werden kann. Eine dauerhafte Kombination empfiehlt sich aufgrund der möglicherweise schwerwiegenden Nebenwirkungen nicht. Zeigt sich nach zwölf Wochen kein ausreichendes Ansprechen, sollte auf eine Kombinationstherapie aus zwei DMARDs umgestellt werden. Der Einsatz von bDMARDs und tsDMARDs kommt normalerweise erst bei einer anhaltenden Krankheitsaktivität von über sechs Monaten in Betracht. Nur selten, beispielsweise bei einer sehr schlechten Prognose oder weit vorangeschrittenen Destruktionen, werden Medikamente aus diesen Gruppen bereits bei Diagnosestellung verwendet. Auch hier gilt das Prinzip, dass bei fehlendem Ansprechen über einen Zeitraum von drei bis sechs Monaten hinweg auf ein anderes Präparat der verwendeten Gruppe gewechselt werden sollte. Die Therapie mit bDMARDs und tsDMARDs soll in Kombination mit MTX durchgeführt werden (12) (10) (11). Auf Grund der Toxizitätserhöhung und keinem zunehmenden Behandlungserfolg stellt eine Kombination aus zwei Biologika keine Alternative dar (9) (59).

Das Therapieziel ist, innerhalb von sechs Monaten die Remission oder zumindest eine deutlich verringerte Krankheitsaktivität zu erreichen (11) (10). Die Remission ist bislang nicht endgültig definiert. Das American College of Rheumatology, die

European League Against Rheumatism und die Outcome Measures in Rheumatology Initiative definieren zwei verschiedene Ansätze einer Remission. Eine Definitionsmöglichkeit besteht aus der Zusammenschau von druckempfindlichen und geschwollenen Gelenken, dem CRP und der subjektiven Patientenbeurteilung, wobei insgesamt nicht mehr als eine Auffälligkeit festzustellen sein darf. Ein weiterer Definitionsansatz ist ein SDAI Score von unter 3,3 oder ein DAS28-Wert von kleiner 2,6 (57) (60).

Bei einer dauerhaft anhaltenden Remission besteht eventuell die Möglichkeit, die medikamentöse Therapie schrittweise zu reduzieren und letztendlich komplett abzusetzen. Langzeitstudien gibt es dazu nur wenige, sodass bislang keine eindeutige Empfehlung zur Therapiereduktion ausgesprochen werden kann (12) (61) (62) (11).

Vor einer Therapie sind Kontraindikationen und Nebenwirkungen zu beachten. Im Fall latenter Infektionen, wie Tuberkulose oder Virus-Hepatitis besteht das Risiko einer Reaktivierung unter immunsuppressiver Therapie, sodass diese Infektionen zuvor ausgeschlossen bzw. behandelt werden sollten (41) (10) (63).

Des Weiteren empfiehlt es sich, entsprechend der Empfehlungen der ständigen Impfkommission, geimpft zu sein. Zusätzlich sind Impfungen gegen Pneumokokken, Herpes zoster (bei Patienten ab dem 50. Lebensjahr) und saisonale Grippe indiziert. Lebendimpfungen sind unter immunsuppressiver Therapie hingegen zu vermeiden (9) (10).

Ophthalmologische Screeninguntersuchungen vor und während der Therapie mit Medikamenten (z.B. Hydroxychloroquin), welche die Sehleistung beeinträchtigen können, sind angeraten (41).

Mögliche Nebenwirkungen einer Behandlung mit Methotrexat sind vorrangig gastrointestinale Beschwerden, Myelosuppression mit Zytopenie, Hepatotoxizität, interstitielle Pneumonien und Lungenfibrose. Diese treten jedoch im rheumatologischen Dosisbereich selten auf (9) (64).

Die Hauptnebenwirkung einer TNF α -Inhibitoren-Therapie sind Infektionen, welche vor allem die Haut und die Atemwege betreffen (65) (66). Aber auch allergische Reaktionen, grippeähnliche Beschwerden und Blutbildveränderungen können auftreten (67) (66).

Aufgrund der Wirkung des TNF-Faktors, in Form von tumorhemmenden als auch – fördernden Eigenschaften, wird der Zusammenhang einer TNF α -Inhibitoren-Therapie und der Malignomentstehung diskutiert und untersucht (65) (68) (69) (70) (71) (72).

Einige Untersuchungen erwecken den Anschein einer Korrelation zwischen den beiden Faktoren (72). Jedoch ist bislang ungeklärt, ob es sich um eine Nebenwirkung des immunmodulierenden Medikamentes handelt oder vielmehr um eine Auswirkung der Grunderkrankung (66). In den Langzeitbeobachtungen des RABBIT-Registers (Rheumatoide Arthritis: Beobachtung der Biologika-Therapie, <http://www.biologika-register.de>) lässt sich kein erhöhtes Krebsrisiko bei Patienten mit TNF α -Inhibitoren Gabe verzeichnen (65) (73).

Spezielle Kontraindikationen für eine Therapie mit TNF α -Inhibitoren sind eine schwere Herzinsuffizienz (NYHA III/IV), demyelinisierende Erkrankungen, akute Infektionen und aktuelle oder vorausgegangene Malignomerkrankungen (67) (66).

Zusätzlich zur medikamentösen Therapie ist eine nicht-pharmakologische Therapie von Nutzen. Hierzu zählen Patientenschulungen, psychologische Betreuung, ausreichende Bewegung und Gewichtsanpassung (41).

Die Bestimmung des aktuellen DAS28 wie auch Kontrolluntersuchungen des Blutes und Röntgenaufnahmen in regelmäßigen Abständen sind essentiell für eine adäquate Behandlung. Sie ermöglichen den Krankheitsverlauf zu objektivieren, Verschlechterungen frühzeitig zu erkennen und auf Nebenwirkungen der medikamentösen Therapie zu reagieren (41) (10).

1.7. Prognose

Der Verlauf einer Rheumatoiden Arthritis kann sehr unterschiedlich sein. Kennzeichnend ist ein chronischer Verlauf mit wechselhafter Beschwerdeintensität (1) (2) (41).

Allgemeine Risikofaktoren für einen schweren und erosiven Verlauf sind die Beteiligung vieler Gelenke, Auftreten von Rheumaknoten, extraartikuläre Manifestationen, ein hohes Lebensalter, Nikotinabusus, das weibliche Geschlecht und ein niedriger sozioökonomischer Status (3) (41) (9). Im Blut weisen hohe Titer des Rheumafaktors, der Nachweis von ACPA, hohe CRP-Werte und eine hohe BSG auf eine erhöhte Krankheitsaktivität, einen aggressiveren Verlauf und damit auf eine schlechtere Prognose hin (1) (3) (41) (9). Auch der Nachweis einer Homozygotie der HLA-DR4-Allele („shared epitope“) ist prognostisch als ungünstig zu werten (3) (41) (9) (22) (2).

Eine dauerhaft erhöhte Krankheitsaktivität und extraartikuläre Manifestationen erhöhen die Mortalität der Patienten, weshalb eine frühe Diagnosestellung und eine frühzeitige Therapieeinleitung von hoher Bedeutung für die Lebenserwartung sind. Eine rechtzeitige Behandlung kann die Funktionseinschränkungen im Gelenk minimieren, eine hohe Lebensqualität fördern und die Prognose verbessern (1) (41) (9) (74) (4) (75).

Mit einem gesunden Lebensstil und einer guten Medikamenten-Compliance können Patienten einen positiven Beitrag zum Krankheitsverlauf leisten. Durch regelmäßige sportliche Aktivität können Krankenhausaufenthalte und deren Dauer signifikant reduziert werden (76).

2. T-Large Granular Lymphocytes Leukämie (T-LGL-Leukämie)

2.1. Definition

Die T-LGL-Leukämie ist eine seltene, chronische Erkrankung, die mit einer Vermehrung der T-LGL-Zellen einhergeht (77) (78). Unterschieden wird zwischen Leukämie, ausgehend von den T-Lymphozyten und von NK (Natürliche Killer)-Zellen (77) (79). Die T-Zell-Form kommt mit ca. 85% der Fälle deutlich häufiger vor (77) (80) (81). Meist verläuft sie im Gegensatz zu der NK-Zell-Variante indolent (78). Diagnostisch lassen sich die beiden Varianten durch das Oberflächenmolekül CD3 voneinander differenzieren. Die T-LGL-Zelle trägt – im Gegensatz zu einer NK-LGL-Zelle – charakteristischerweise das Merkmal CD3 (77) (79). Da die NK-LGL-Leukämie im Gegensatz zur T-LGL-Leukämie eine vorrangige Assoziation zu Virusinfektionen, wie dem Epstein-Barr-Virus aufweist und keine Assoziation mit Rheumatoider Arthritis bekannt ist, geht diese Arbeit nicht näher auf die NK-Leukämie ein (82) (83).

Wird eine Vermehrung der LGL-Zellen diagnostiziert, ist es wichtig, zwischen einem reaktiven Anstieg und einer chronischen neoplastischen Erkrankung zu differenzieren (77) (78). Reaktive Anstiege treten beispielsweise nach Infektionen und Viruserkrankungen auf (84). Aber auch Nieren-, Herz- und Stammzelltransplantationen können Auslöser eines LGL-Zellanstiegs im peripheren Blut sein (85) (86).

Eine T-LGL-Leukämie ist in einer Vielzahl der Fälle mit Autoimmunerkrankungen, (Rheumatoide Arthritis, Sjögren-Syndrom, polyglanduläres Autoimmunsyndrom, systemischer Lupus erythematoses etc.) oder auch hämatologischen Veränderungen (Hodgkin Lymphom, Multiples Myelom, Myelodysplastisches Syndrom, Aplastische Anämie) assoziiert (87) (88). Die Rheumatoide Arthritis ist eine der am häufigsten assoziierten Erkrankungen in Zusammenhang mit einer T-LGL-Leukämie (77) (80) (89). Die Aussagen bezüglich einer Verbindung zwischen LGL-Expansionen und soliden Tumoren sind uneinheitlich (89) (90) (91).

2.2. Epidemiologie

Aufgrund der anfänglich geringen Symptomatik und der umfangreichen Diagnostik sowie angesichts der Seltenheit der Erkrankung in der Allgemeinbevölkerung, ist ihre Prävalenz lediglich abzuschätzen. Die LGL-Leukämie tritt mit einer Inzidenz von etwa 0,2 auf 1.000.000 Personen auf (81). Davon macht die T-LGL-Leukämie ca. 85% aus und stellt damit etwa 2-6% der chronisch lymphoproliferativen Erkrankungen dar (77). Die Erkrankung wird vorrangig im fortgeschrittenen Alter (Median bei 60 Jahren) diagnostiziert, wobei sich die Verteilung zwischen Frauen und Männern gleichermaßen gestaltet (77) (78).

2.3. Ätiologie und Pathogenese

Die Entstehung der T-LGL-Leukämie ist bislang nicht geklärt. Verschiedene Mechanismen werden für möglich gehalten, unter anderem gegenseitig bedingende Reaktionen in Zusammenhang mit anderen Autoimmun- oder Viruserkrankungen (77).

Im Rahmen einer physiologischen Immunreaktion werden T-Zellen aktiviert. Zuvor haben sie den Selektionsprozess des Thymus durchlaufen, um eine Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen sicher zu stellen (92). Durch den Kontakt mit einem Antigen oder einem aktivierenden Zytokin werden die Zellen zu sogenannten Effektor-Zellen. Sie sind im Stande durch synthetisiertes Perforin, Granzym und FAS-Ligand körperfremde Stoffe unschädlich zu machen (87). Nach infektsbedingt, kurzfristigen Anstiegen der Zellzahlen kommt es im Verlauf regulär zu einem induzierten Zelltod der Zellen, um unkontrollierte Zellexpansionen zu vermeiden (21). Dieser Mechanismus scheint im Rahmen der T-LGL-Leukämie gestört zu sein. Bei den Zellen handelt es sich ebenfalls um post-thymische T-Zellen, die zellvernichtende Proteine produzieren können, sodass von einer zuvor stattgefundenen Antigenaktivierung der Zellen ausgegangen wird. Um was für eine

Art von Antigen es sich handelt, ist jedoch unklar. Die Malignität entwickelt sich durch eine überdurchschnittliche Expansion von monoklonalen Zellen mit der Eigenschaft, eine Apoptoseresistenz bilden zu können (87) (93) (94).

Die Apoptoseresistenz entsteht zum einen durch veränderte Signalwege wie JAK/STAT, PI3K/Akt oder NF- κ B (93) (95). Wobei die Dysregulation des JAK/STAT Signalweges eine große Rolle spielt, denn in bis zur Hälfte der Patienten mit T-LGL-Leukämie lässt sich eine Mutation im STAT3 Gen nachweisen (96) (97). Zum anderen fördern lösliche Substanzen, wie Interleukin 15 und der Wachstumsfaktor PDGF (platelet derived growth factor) das Überleben der T-LGL-Zellen (93) (98) (99). Aber auch die vermehrte Produktion von FAS und FAS Liganden der LGL-Zellen trägt zur Pathogenese bei. Durch die Produktion von FAS und FAS-Liganden kann die Apoptose in anderen Zellen ausgelöst werden. Die LGL-Zellen selbst sind jedoch dem FAS-induzierten Zelltod gegenüber resistent (94) (95).

Zusammenfassend liegt der Pathogenese der T-LGL-Leukämie somit am ehesten eine anhaltende Antigenaktivierung mit Selektion eines Klons in Zusammenhang mit der Ausbildung einer Apoptoseresistenz zu Grunde.

2.3.1. Pathogenese der Neutropenie im Rahmen der T-LGL-Leukämie

Sowohl Autoimmun- als auch Tumorerkrankungen können mit Zytopenien einhergehen, wobei vor allem die Neutrophilen betroffen sind. Die Ursache dafür ist nicht endgültig geklärt, wahrscheinlich aber multifaktoriell bedingt (100).

Vorstellbar sind pro-inflammatorische Zytokine, welche die Zellproduktion hemmen (101). Oder auch antineutrophile Antikörper, die sich an neutrophile Zellen heften und so eine Phagozytose durch Makrophagen der Milz bewirken (100) (102).

Eine vermehrte Expression von FAS-Liganden durch T-LGL-Zellen kann ebenfalls eine Neutropenie erzeugen (94) (103). Bestätigend für diese Hypothese ist das gleichzeitige Verschwinden von FAS-Liganden im Serum und eine Verbesserung

der Neutropenie unter einer adäquaten Therapie (104).

2.4. Diagnostik und Labor

Ein Drittel der Patienten ist asymptomatisch bei Diagnosestellung. Zwei Drittel werden auffällig durch Zytopenien, meist Neutropenien und die damit einhergehenden Infektionen (77) (105).

Im Blutbild eines T-LGL-Patienten zeigen sich häufig ein Mangel an Neutrophilen bei gleichzeitig dezenter Vermehrung der Lymphozyten. Etwa 60% der Patienten weisen Rheumafaktoren und 40% positive ANA-Werte auf. Diese Konstellation ist jedoch nicht zwingend notwendig, um die Diagnose stellen zu können (79). Auf weitere Blutbildveränderungen und deren Symptomatik wird im Abschnitt „2.5. Klinische Symptome“ eingegangen.

Derzeit gibt es keine bindenden Leitlinien für die Diagnosestellung, sodass unterschiedliche Kriterien angewandt werden. Die folgenden Kriterien werden mit einigen Abstufungen üblicherweise verwendet:

- Expansion von T-LGL-Zellen im peripheren Blut, >500 T-LGL-Zellen/ μ l Blut
- Charakteristischer Phänotyp mit Expression von CD3, CD8 und CD57
- Klonalität und Rearrangement des T-Zell-Rezeptors

(106) (107)

In verschiedenen Untersuchungen wird als weiteres Kriterium die klinische Symptomatik berücksichtigt (78) (95). Wohingegen in der Untersuchung von Bourgault-Rouxel et al. die LGL-Expansion zusätzlich für mindestens sechs Monate nachgewiesen sein muss (108).

Wird ein Patient klinisch auffällig und besteht der Verdacht einer LGL-Leukämie,

kann mittels Blutentnahme und Durchflusszytometrie die Menge der LGL-Zellen im Blut bestimmt werden. Die Durchflusszytometrie erlaubt mittels Flüssigkeitsstrom, Lichtstrahlen und entsprechenden Antikörpern die Analyse bestimmter Zelloberflächenmerkmale und damit die Zelleinteilung (genauere Erklärung unter „4.4. Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)“) (109).

Physiologisch liegt der Anteil der T-LGL-Zellen bei 200-400 Zellen/ μ l Blut (Median 223 +/- 99/ μ l Blut) (77) (79). Das entspricht in etwa 10-15% der mononukleären Zellen (105). Bei Diagnose einer T-LGL-Leukämie beträgt die Anzahl der Zellen meist über 2000 Zellen/ μ l Blut (Median bei 4200 Zellen/ μ l Blut) (79) (77). Dennoch ist es wichtig, bereits bei geringeren Zellzahlen eine T-LGL-Leukämie in Betracht zu ziehen. Die Untersuchung von Semenzato et al. zeigt, dass Patienten mit niedrigeren LGL-Zellzahlen (500-1850/ μ l Blut) unter einer ähnlichen Symptomatik wie Patienten mit höheren Zellzahlen leiden können (110).

Auch zur Differenzierung und der Analyse des Immunphänotyps der T-LGL-Zellen im peripheren Blut wird die Durchflusszytometrie eingesetzt. Es lässt sich kein einheitlicher Phänotyp für die Diagnose einer T-LGL-Leukämie ermitteln. Es gibt jedoch Kombinationen von CD-Oberflächenmolekülen, die eine T-LGL-Leukämie wahrscheinlich machen. Gehäuft lassen sich in Untersuchungen positive Ergebnisse für die Merkmale CD3, CD8, CD16 und CD57 feststellen (105) (79). Der charakteristische Phänotyp setzt sich aus CD3+, TCR $\alpha\beta$ +, CD8+, CD16+ und CD57+ zusammen (78). Dabei ist das gemeinsame Auftreten von CD8 und CD57 signifikant mit der Diagnose einer T-LGL-Leukämie und einer Neutropenie assoziiert (111).

Um die Diagnose zu bestätigen, wird eine Klonalitätsanalyse durchgeführt. Dies ist durch eine Untersuchung des TCR-Rearrangements mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) (siehe „4.5. Klonalitätsanalyse mittels PCR (Polymerase Chain Reaction)“) möglich. So kann zwischen einem mono- oder polyklonalen Anstieg der T-LGL-

Zellen unterschieden werden.

Innerhalb der T-LGL-Leukämien kann nochmals zwischen einer $\alpha\beta$ - und einer $\gamma\delta$ -Variante des T-Zell-Rezeptors unterschieden werden. Der T-Zell-Rezeptor ist ein Heterodimer und besteht aus zwei Polypeptiden (108) (87). Deutlich häufiger ist die $\alpha\beta$ -Form. Eine $\gamma\delta$ -Leukämie lässt sich in weniger als 10% der Fälle diagnostizieren (77). $\gamma\delta$ -T-Zellen machen ca. 1-6% der CD3 positiven T-Zellen aus. Klinisch, epidemiologisch und in ihrer Assoziation zu Autoimmunerkrankungen unterscheiden die beiden Formen sich nicht wesentlich voneinander (108).

Im Mikroskop zeigen sich besonders große Lymphozyten mit einem hohen Anteil an Zytoplasma und einzelnen azurophilen Granula (79) (112). Die Zellkerne sind meist rund oder nierenförmig und die Kern-Plasma-Relation ist hoch (77).

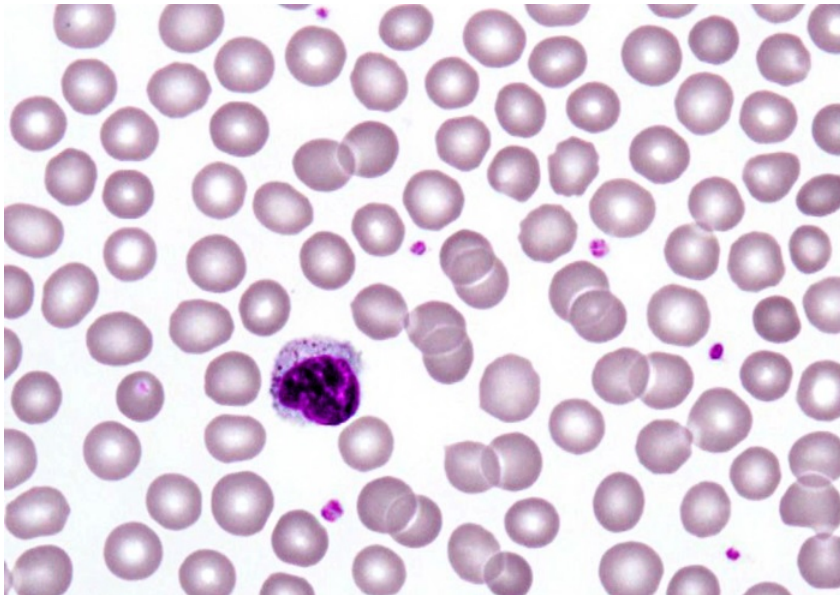


Abbildung 1: T-Large-Granular-Lymphozyt im peripheren Blut (Bildmitte), Abbildung aus (113) mit Lizenzierung des Georg Thieme Verlags

Die Knochenmarkpunktion ist im Rahmen der Diagnosestellung einer T-LGL-Leukämie kein Standard, jedoch kann die Diagnose dadurch zusätzlich bestätigt werden. Besteht bei einem Patienten klinisch der Verdacht auf eine T-LGL-Leukämie, ist jedoch die Anzahl der LGL-Zellen nicht deutlich erhöht, kann eine positive Knochenmarkhistologie die Diagnose verifizieren (78) (107). Die meisten Patienten entwickeln im Verlauf der Erkrankung eine Knochenmarkinfiltration (79) (112). Allerdings gibt es keine Korrelation zwischen der Stärke der Infiltration und der Anzahl der Leukämie-Zellen, dem Grad der Neutropenie und den systemischen Symptomen (107).

Zusammenfassend erfolgt eine Diagnosestellung durch die Komponenten eines vermehrten Vorhandensein von LGL-Zellen, einer durchflusszytometrischen Untersuchung mit Analyse des Phänotyps und der Bestätigung der Monoklonalität durch PCR unter Berücksichtigung der klinischen Symptomatik.

2.4.1. Differentialdiagnose Felty-Syndrom

Bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis kommt es häufig zu Blutbildveränderungen, insbesondere treten Neutropenien auf. In Zusammenhang mit einem Neutrophilenmangel müssen differentialdiagnostisch sowohl das Felty-Syndrom als auch die monoklonale T-LGL-Zellvermehrung in Betracht gezogen werden. Die beiden Erkrankungen können sich ähnlich präsentieren, sodass eine Unterscheidung sich schwierig gestaltet.

Das Felty-Syndrom ist eine extraartikuläre Manifestation einer meist lang bestehenden, seropositiven Rheumatoiden Arthritis. Das Syndrom ist definiert als die Trias von Rheumatoider Arthritis, Splenomegalie und Neutropenie, wobei jedoch nicht jeder Aspekt von Beginn an nachzuweisen sein muss (55). Es tritt bei etwa 1% der RA-Patienten auf (114) und geht im Vergleich zu der allgemeinen RA-Kohorte mit einer höheren Krankheitsaktivität einher (115). Die Kombination der Symptome kann ebenso durch eine monoklonale T-LGL-Zellvermehrung in

Verbindung mit einer Rheumatoiden Arthritis verursacht werden, was die Differenzierung erschwert (79). Sowohl in der klinischen Präsentation als auch in den Blutbilduntersuchungen unterscheiden sich Patienten der beiden Erkrankungen nicht wesentlich voneinander. Als Abgrenzung kann unter Patienten mit einer T-LGL-Leukämie häufiger eine Lymphozytose (106) und unter Felty-Syndrom Patienten eher eine Leukopenie beobachtet werden (102). Beide Erkrankungsformen sind mit dem genetischen Hintergrund von HLA-DR4 assoziiert. Sowohl unter den Felty-Syndrom Patienten als auch unter denen mit LGL-Leukämie kann das Merkmal zu 86% bzw. 90% nachgewiesen werden. Wohingegen nur ein Drittel der LGL-Leukämie Patienten ohne gleichzeitig bestehende RA positiv für HLA-DR4 sind, was vergleichbar mit der Allgemeinbevölkerung ist (116). Des Weiteren kann bei beiden Krankheitsentitäten eine Mutation im STAT Signalweg festgestellt werden. Unter Patienten mit Felty-Syndrom konnte eine STAT3 Mutation bei 43% (117) und unter Patienten mit LGL-Leukämie bei 40% (96) bzw. bei T-LGL-Leukämie von 43% (118) nachgewiesen werden.

Beide Erkrankungen können sowohl mit einer Vermehrung der LGL-Zellen als auch einem ähnlichen Phänotypen einhergehen, sodass eine endgültige Differenzierung durch die Zellzahl oder die Oberflächenmerkmale nicht ausreichend möglich ist (83) (119). Voneinander unterscheiden lassen sich die beiden Erkrankungen durch eine Klonalitätsanalyse des T-Zell-Rezeptors. Bei Patienten mit T-LGL-Leukämie lassen sich klonale T-LGL-Zellexpansionen nachweisen. Wohingegen Patienten mit Felty-Syndrom regulär lediglich polyklonale Expansionen aufweisen (83) (102) (106) (119).

Die aufgeführten Überschneidungspunkte der beiden Erkrankungen sprechen für einen ähnlichen, wenn nicht sogar gleichen Pathomechanismus (106) (120). Es muss davon ausgegangen werden, dass einige Patienten mit Felty-Syndrom fehldiagnostiziert wurden und tatsächlich an einer T-LGL-Leukämie in Kombination mit einer Rheumatoiden Arthritis erkrankt sind (102) (106). Um die Diagnose eines Felty-Syndroms stellen zu können, ist es von großer Bedeutung

andere Ursachen, wie beispielsweise eine T-LGL-Leukämie zuvor auszuschließen (113).

2.5. Klinische Symptome

Eine T-LGL-Leukämie kann im Anfangsstadium asymptomatisch sein. Bei einem Drittel der Patienten handelt es sich um einen Zufallsbefund, sie sind auch bei Diagnosestellung noch symptomfrei (77).

Häufige Symptome sind Auswirkungen der Zytopenie. Eine Neutropenie zeigt sich bei mehr als der Hälfte der Patienten, meist in Form von rezidivierenden Infektionen, die mit Fieber einhergehen können. Infektionen der Haut, der Schleimhäute und der Atemwege sind dabei besonders häufig (77) (80) (79) (121) (89) (122).

Bis zu 50% der Patienten zeigen eine Anämie. Eine Thrombozytopenie tritt in Zusammenhang mit der Leukämie nur selten, in bis zu 20% der Fälle, auf (77) (79). Auch B-Symptome (Fieber, Gewichtsverlust von mehr als 10% in 6 Monaten und Nachtschweiß) werden in 7-12% der Fälle beschrieben (80) (89). Lymphadenopathien treten kaum in Zusammenhang mit einer T-LGL-Leukämie auf (79) (122) (80) (121) (89). Bei bis zur Hälfte der Betroffenen lässt sich eine Splenomegalie diagnostizieren. Eine Hepatomegalie ist hingegen selten (79) (80) (122). Knochenmarkinfiltrationen können in Patientenkollektiven mit T-LGL-Leukämie in weit über der Hälfte nachgewiesen werden: Barea et al. 72% (80), Loughran et Starkebaum 70% (122), Loughran 88% (79).

Bourgault-Rouxel et al. zeigen im Vergleich von $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -Leukämie einen signifikanten Unterschied im Auftreten einer Anämie. Diese ist unter Patienten mit einer $\gamma\delta$ -Leukämie deutlich seltener (10% vs. 49%; $p=0,001$). In Bezug auf Neutropenie, Thrombozytopenie, Splenomegalie und Hepatomegalie ergeben sich keine signifikanten Differenzen (108).

2.6. Therapie und Prognose

Derzeit gibt es keine standardisierten Leitlinien zur Behandlung einer T-LGL-Leukämie, sodass die Therapieempfehlungen aus verschiedenen Fallberichten stammen. Nicht in jedem Fall ist eine Therapie zwingend notwendig (107).

Im Verlauf der Erkrankung benötigen bis zu 70% der Patienten eine Therapie (89). Dabei stellen Neutropenien und damit einhergehende Infektionen die häufigste Behandlungsindikation dar. Aber auch transfusionsabhängige Anämien, Thrombozytopenien, B-Symptome, Vaskulitiden oder assoziierte Autoimmunerkrankungen können derart ausgeprägt sein, dass sie eine Therapie erfordern (80) (78). Bei asymptomatischen Patienten kann ein zuwartendes Verhalten vertreten werden (95) (107) (103).

Folgende Therapieindikationen lassen sich festhalten (107):

- <500 Neutrophile/ μl
- Moderate Neutropenie (>500 Neutrophile/ μl) in Verbindung mit einer Infektneigung
- Symptomatische oder transfusionsbedürftige Anämien
- Autoimmunerkrankungen, die eine Behandlung erfordern

Der Fokus der Therapie liegt in der Immunsuppression. Sie nützt sowohl der Behandlung der T-LGL-Leukämie als auch der anderer autoreaktiver Erkrankungen, wie beispielsweise der Rheumatoiden Arthritis (89) (107).

Der Folsäure-Antagonist Methotrexat ist das Mittel der ersten Wahl (107). Cyclophosphamid und Ciclosporin A werden teilweise als eine alternative Erstlinien-Therapie empfohlen (80) (107) (93) (123) (95). Vielversprechend ist eine Kombination aus einem der genannten Medikamente mit einem niedrig dosierten Glukokortikoid zu Beginn. Eine Remission durch Glukokortikoide allein ist jedoch nicht zu erwarten (80). Sollte der Patient auf die Medikamente der

ersten Wahl nicht ansprechen, gibt es verschiedene Medikamente, von denen in Case Reports erfolgsversprechend berichtet wird. Dazu gehören Purinanaloga (Fludarabin), CD20-Antikörper (Rituximab) und CD52-Antikörper (Alemtuzumab) (107) (93) (124) (125) (126).

Eine symptomatische Behandlung der Neutropenie mit dem Wachstumsfaktor G-CSF (Granulocyte-colony stimulating factor) kann erfolgreich zur Linderung von anhaltenden Infektionen eingesetzt werden. Dieser stimuliert die Zell- und Neutrophilenbildung und stärkt so das Immunsystem. Jedoch kann es nach Beendigung der Therapie zu einem erneuten Abfall der Neutrophilen kommen (100) (127).

Mit ausreichender Indikation und prophylaktischem Schutz vor Infektionen stellt die Entfernung der Milz eine Alternative bei der Behandlung der T-LGL-Leukämie dar (128). Unter Patienten mit Felty-Syndrom werden nach Splenektomie Verbesserungen des Blutbildes festgestellt, jedoch kann das Infektionsrisiko nicht signifikant gesenkt werden (115). Hinzukommend ist das allgemeine Infektionsrisiko nach Splenektomie, sodass aufgrund der zunehmend besseren medikamentösen Therapiemöglichkeiten die Splenektomie nur selten durchgeführt wird (78) (89).

Das Ziel der Therapie ist die Remission. Von dieser wird gesprochen, wenn das Blutbild und die LGL-Zellzahl normalisiert sind. Eine molekulare Remission schließt den Nachweis eines T-Zell-Klons in der PCR aus (97). Die Erfolgsraten unter Therapie variieren. Die Betrachtung mehrerer Untersuchungen konnte ein Ansprechen bei über der Hälfte der Patienten auf eine Therapie mit Methotrexat, Cyclophosphamid oder Ciclosporin A zeigen (107). Eine komplette, hämatologische Remission kann jedoch häufig nur in einem kleinen Patientenanteil erreicht werden (97) (129). Ein besonders gutes Therapieansprechen kann auf Grundlage verschiedener genetischer Prädispositionen festgestellt werden, sodass Patienten mit HLA-DR4 mittels Ciclosporin A (130) und Patienten mit STAT3 Y640F Mutationstyp durch eine

Therapie mit MTX (97) besonders erfolgreich behandelt werden können.

Aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten in der eindeutigen Diagnosefindung und des möglicherweise fehl- und unterdiagnostizierten Patientenanteils, fällt eine Aussage über die Prognose bezüglich der T-LGL-Leukämie nicht leicht. Sicher ist, dass eine T-LGL-Leukämie die Lebenserwartung durch Blutbildveränderungen und insbesondere erhöhte Infektneigung einschränken kann (131). Auch ein fortgeschrittenes Lebensalter und vermehrte Komorbiditäten sind prognosebeschränkend (81). Die Daten zur medianen Überlebensdauer der Patienten variieren und liegen zwischen 9 und 14,5 Jahren (81) (89) (129). In der französischen Patientenkohorte mit T-LGL-Leukämie zeigte sich eine 5-Jahres-Überlebensrate von 89% (80).

3. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorgelegten Arbeit besteht darin, eine Aussage über die Verteilung der T-Zell-Oberflächenmerkmale innerhalb einer RA-Population machen zu können. Der Fokus liegt dabei insbesondere auf den T-LGL-Zellen. Aufgrund der Seltenheit von monoklonalen T-LGL-Zellexpansionen können nur sehr begrenzt Aussagen über die Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung getroffen werden. Durch die Assoziation von RA und T-LGL-Leukämie wird von einer höheren Prävalenz von monoklonalen T-LGL-Zellen in unserem RA-Patientenkollektiv ausgegangen. Es wird der Einschluss eines großen Patientenkollektivs angestrebt, um trotz der zu erwartenden niedrigen Fallzahlen statistisch valide Aussagen über die Prävalenz der monoklonalen T-LGL-Zellvermehrungen innerhalb einer RA-Population treffen zu können.

Des Weiteren erwarten wir, mögliche assoziierte Faktoren für die Expansion von klonalen T-Zellen herausarbeiten zu können. Von Interesse sind dafür vor allem die Daten zur demographischen Verteilung und zur rheumatischen Erkrankung der Patienten sowie zu deren medikamentöser Therapie.

Werden Zusammenhänge gefunden, könnte dies ein Ansatz zu neuen Behandlungsstrategien und möglichen Screeningprogrammen in Risikopopulationen sein.

4. Material und Methoden

4.1. Patientenkollektiv

Im Rahmen der Studie werden 529 Patienten, die die ACR-Kriterien (siehe „1.4. Diagnostik und Labor“) für Rheumatoide Arthritis aus 2010 erfüllen, eingeschlossen. 449 Patientendaten stammen aus der Rheumatologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg.

Um die zu untersuchende Kohorte zu vergrößern und eine repräsentative Verteilung der medikamentösen Therapie in unserem Patientenkollektiv zu erreichen, werden 80 weitere Patienten aus der Praxisgemeinschaft Dr. Kleinert, Dr. Rapp, Dr. Ronneberger, Dr. Schuch und Dr. Wendler für Rheumatologie-Nephrologie in Erlangen¹ hinzugenommen.

Die Patientenrekrutierung erfolgt konsekutiv im Rahmen von Routineuntersuchungen und ohne vorherige Selektion im Zeitraum von November 2013 bis August 2015.

Zu Beginn werden die Patienten schriftlich und mündlich über die Studie aufgeklärt und erteilen schriftlich ihr Einverständnis zur Teilnahme. In der ausgehändigten Patienteninformation werden der genaue Studienablauf und die damit verbunden Risiken und der mögliche Nutzen erklärt (Patienteninformation siehe Anhang). Die Patienten stimmen mit ihrer Einverständniserklärung einer Blutentnahme, der Verwendung der Daten zu wissenschaftlichen Zwecken, der Veröffentlichung der erhobenen Daten in anonymisierter Form und der Aufbewahrung der Untersuchungsergebnisse zu.

Nach Abschluss der Publikation werden die Daten in anonymisierter Form aufbewahrt. Eine Aufbewahrung von Proben über längere Zeiträume ist nicht vorgesehen.

¹ Praxisgemeinschaft Rheumatologie-Nephrologie, Möhrendorfer Straße 1c, 91056 Erlangen (<http://www.pgrn.de>)

Das Zurückziehen dieser Einverständniserklärung war und ist jederzeit ohne Angabe von Gründen möglich. Die Zustimmung der lokalen Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg mit dem Aktenzeichen 154/13 liegt vor.

4.1.1. Einschlusskriterien

Volljährigkeit (18 Jahre) und das Vorliegen einer Rheumatoide Arthritis sind die einzigen Kriterien für die Aufnahme in die Studie. Dabei muss die Rheumatoide Arthritis die ACR-Kriterien für Rheumatoide Arthritis aus 2010 erfüllen. Jegliche antirheumatische Therapie ist für den Studieneinschluss möglich. Auch Patienten, die keine spezifische Therapie erhalten, können eingeschlossen werden, sofern die Diagnose gesichert ist.

4.1.2. Ausschlusskriterien

Ausschlusskriterien sind die fehlende Einwilligung bzw. Einwilligungsfähigkeit und ein Alter von unter 18 Jahren. Weitere Ausschlusskriterien werden nicht formuliert, um ein möglichst großes und realitätsnahes Patientenkollektiv für den Studieneinschluss zu rekrutieren.

4.2. Erhebung der Patientendaten

Die klinischen Daten der in die Studie eingeschlossenen Patienten werden herangezogen, um mögliche assoziierte Faktoren für das Auftreten klonaler T-LGL-Zellvermehrungen bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis aufzuzeigen.

In die Analyse gehen Geschlecht, Lebensalter, Erstmanifestationsalter, Raucheranamnese, BMI-Wert, Autoimmun- und Tumorerkrankungen sowie Blutbild und Serostatus ein. Ferner wird der durch den betreuenden Arzt erhobene DAS28-Wert als Maß für die Krankheitsaktivität berücksichtigt. Ein weiterer klinischer Parameter in der Auswertung ist das Vorhandensein von Rheumaknoten in der klinischen Untersuchung und Erosionen im Röntgenbild. Therapeutisch wird zwischen der Behandlung mit csDMARDs, bDMARDs und Steroiden unterschieden. Die JAK-Inhibitoren (Baricitinib, Tofacitinib und Upadacitinib) sind zum Zeitpunkt der Datenerhebung in Deutschland noch nicht zugelassen und werden deshalb in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Die verwendeten Patientendaten werden aus dem elektronischen Aktensystem EMIL®³ des Universitätsklinikums Würzburg entnommen. In diesem werden im Rahmen von ambulanten oder stationären Besuchen Anamnesen, standardgemäße rheumatologische Untersuchungen, Laborergebnisse, durchgeführte Diagnostik sowie Arztbriefe dokumentiert.

Die Daten der Patienten aus der Praxis Dr. Kleinert und Kollegen werden aus den uns ausgehändigten Arztbriefen entnommen. Da die Patienten aus der Praxis über den Zeitraum von Februar bis April 2015 rekrutiert werden, ist das exakte Einschlussdatum nicht zu ermitteln. Es wird der 15.03.2015 als das Einschlussdatum festgelegt.

4.2.1. Raucheranamnese

In die Raucheranamnese gehen das Konsumieren von Nikotin und Pfeifentabak ein. Es wird unterschieden zwischen aktiven bzw. ehemaligen Rauchern und Nichtrauchern. Die Dauer wie auch die Frequenz des Abusus gehen nicht in die Auswertung mit ein.

³ <https://www.itc-ms.de/>

4.2.2. Komorbiditäten

Komorbiditäten werden in Autoimmun- und Tumorerkrankungen unterschieden. Im Rahmen von Autoimmunerkrankungen werden zusätzlich zur RA bestehende Autoimmunerkrankungen erfasst.

Die Gruppe der Tumorerkrankungen wird als maligne Erkrankung definiert und nochmals in solide und hämatologische Tumore unterschieden. Berücksichtigt werden sowohl zurückliegende als auch aktuelle Tumorerkrankungen. Eine Differenzierung zu welchem Zeitpunkt die Erkrankung bestand, erfolgt nicht.

Anderweitige Nebendiagnosen werden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

4.2.3. Blutbild und serologische Parameter

Aus der routinemäßig durchgeführten Blutbilduntersuchung werden Leukozyten, Hämoglobin-Wert, Thrombozyten und absolute Lymphozytenzahl in die Auswertung einbezogen.

Auch die serologischen Parameter CRP (C-reaktives Protein), BSG (Blutsenkungsgeschwindigkeit), Rheumafaktor, ACPA (Antikörper gegen cyclisch citrullinierte Peptide), ANA (antinukleärer Antikörper), ENA (englisch: extractable nuclear antigen) und dsDNS (Doppelstrang-DNS) werden in der Auswertung berücksichtigt. Es liegt im Ermessen der aufnehmenden Ärzte, welche Parameter erneut bestimmt werden. Bei der Verwendung bereits vorliegender Werte werden stets die neusten Werte in die Auswertung aufgenommen. Nur der ACPA-Wert darf nicht älter als aus dem Jahr 2012 sein.

Der Rheumafaktor wird ab einem Wert von >20 IE/ml als positiv gewertet. Der ACPA-Wert wird ab über 10 IE/ml als positiv gewertet und bis zu einem Wert von 333 IE/ml gemessen. Der dsDNS Wert wird ab einem Wert von größer 15 IE/ml und der ANA-Wert ab 1:100 als positiv gewertet.

4.2.4. Medikation

Die Medikation wird in konventionelle und biologische DMARDs sowie Kortikosteroide unterschieden.

Zu den konventionellen DMARDs zählen Methotrexat, Leflunomid, Sulfasalazin und Hydroxychloroquin. In der Auswertung werden konventionelle DMARDs zwischen einer Monotherapie mit Methotrexat, einer Methotrexat Therapie mit anderweitigen konventionellen DMARDs und eine csDMARDs Therapie ohne Methotrexat unterschieden.

Die Biologika werden in TNF-Inhibitoren (Etanercept, Infliximab, Adalimumab, Golimumab und Certolizumab), Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (Anakinra), Interleukin-6-Rezeptorantagonisten (Tocilizumab und Sarilumab), T-Zell-Costimulations-Hemmer (Abatacept) und CD20-Antikörper (Rituximab, Ocrelizumab) unterschieden. Ocrelizumab wird im Rahmen von Studien verabreicht, da es keine Zulassung für die RA-Therapie gibt.

Die Biologika werden in der Regel unter Fortführung der Methotrexat Therapie verabreicht.

In der folgenden Tabelle werden die Medikamente mit ihren Standarddosierungen und der Verabreichungsart dargestellt.

Tabelle 2: RA-Medikamente und Dosierungen (132)

| Medikation | Dosierung | Verabreichung |
|-------------------|---|---|
| Methotrexat | 7,5-20mg/Woche | s.c. ¹ / i.v. ² / i.m. ³ |
| Leflunomid | 10-20mg/Tag (ggf. zuvor Aufsättigung) | p.o. ⁴ |
| Sulfasalazin | 2x1g/Tag (zuvor Eindosierung) | p.o. ⁴ |
| Hydroxychloroquin | 200-400mg/Tag | p.o. ⁴ |
| Etanercept | 50mg/Woche | s.c. ¹ |
| Infliximab | 3mg/kg (Wiederholung Woche 2 und 6, dann alle 8 Wochen) | i.v. ² |
| Adalimumab | 40mg alle 2 Wochen | s.c. ¹ |
| Golimumab | 50mg/Monat | s.c. ¹ |
| Certolizumab | 2x200mg/Tag (Wiederholung Woche 2, 4, danach Reduktion auf 200mg alle 2 Wochen) | s.c. ¹ |
| Anakinra | 100mg/Tag | s.c. ¹ |
| Tocilizumab | 162mg/Woche | s.c. ¹ |
| Sarilumab | 200mg alle 2 Wochen | s.c. ¹ |
| Abatacept | 125mg/Woche | s.c. ¹ |
| Rituximab | 1g (Wiederholung Woche 2) | i.v. ² |
| Ocrelizumab | 300mg (Wiederholung Woche 2) | i.v. ² |

¹ subkutan; ² intravenös; ³ intramuskulär; ⁴ peroral

Die Angaben beziehen sich auf die regulär verabreichte Dosis. In Einzelfällen kann es zu Dosisanpassungen kommen. Auf diese wird nicht explizit eingegangen.

Die Verabreichung von Kortikosteroiden (Prednisolon und entsprechende Äquivalente) wird nur im Rahmen der Medikation bei Studieneinschluss erfasst. Es wird zwischen einer Dosierung über und unter 15mg pro Tag unterschieden. Zur Eruiierung der Medikation bei Studieneinschluss wird das Einschlussdatum verwendet.

4.3. Blutproben

Nach Aufklärung und schriftlicher Zustimmung der Patienten erfolgt, zusätzlich zur regulären Blutentnahme, bei jedem Patienten eine Blutentnahme von ca. 10ml Serum und ca. 2,5 ml EDTA (Ethylendiamintetraazetat) -Blut.

Die Serumproben dienen zur Bestimmung serologischer Parameter der Rheumatoiden Arthritis und anderer Autoimmunkrankheiten (siehe „4.2.3. Blutbild und serologische Parameter) und dem Abgleich mit den Ergebnissen der Immunphänotypisierung (Synonyme: FACS-Analyse, Durchflusszytometrie), um eine mögliche Korrelation von T-Zell-Anomalien mit anderen serologischen Merkmalen nachzuweisen.

Das EDTA-Blut wird für die FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorter-Analyse) verwendet. Können in dieser potentiell klonale T-LGL-Populationen nachgewiesen werden, erfolgt beim nachfolgenden Ambulanztermin eine weitere EDTA-Blutentnahme zur Sicherung der Diagnose mittels Klonalitätsanalyse des T-Zell-Rezeptors durch das Institut für Pathologie der Universität Würzburg.

4.4. Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Es werden zuerst die Materialien und die Firmen, durch welche sie bezogen wurden, aufgeführt. Im darauf folgenden Abschnitt werden die Durchführung sowie die Auswertungsstrategie beschrieben.

Die Durchführung der Durchflusszytometrie erfolgt durch das Immunologische Labor der Universität Würzburg.

4.4.1. Antikörper

Tabelle 3: Antikörper und Farbstoffe

| Antikörper | Farbstoff | Klon | Bestellnr. | Firma |
|------------|-------------------------------------|--------------|------------|------------------|
| CD3 | PC7 ¹ | UCHT1 | # 737657 | Beckman Coulter |
| CD45/ CD14 | FITC ² / PE ³ | 2D1/ MφP9 | # 342408 | Becton Dickinson |
| CD19 | ECD ⁴ | J3-119 | # A07770 | Beckman Coulter |
| CD56 | PC5 ⁵ | N901 | # A07789 | Beckman Coulter |
| CD16 | PC5 ⁵ | 3G8 | # A07767 | Beckman Coulter |
| CD4 | FITC ² | 13B8.2 | # A07750 | Beckman Coulter |
| anti-TCRγδ | PE ³ | IMMU510 | # IM1418U | Beckman Coulter |
| CD8 | ECD ⁴ | SFCI21Thy2D3 | # 737659 | Beckman Coulter |
| CD45 | PC5 ⁵ | J33 | # A07785 | Beckman Coulter |
| CD45 | PC7 ¹ | J33 | # IM3548 | Beckman Coulter |
| CD7 | FITC ² | 8H8.1 | # A07755 | Beckman Coulter |
| CD2 | PE ³ | 39C1.5 | # A07744 | Beckman Coulter |

| Antikörper | Farbstoff | Klon | Bestellnr. | Firma |
|------------|-------------------------------------|---------|------------|-----------------|
| CD3 | ECD ⁴ | UCHT1 | # A07748 | Beckman Coulter |
| CD5 | PC5 ⁵ | BL1a | # A07754 | Beckman Coulter |
| CD3 | PC5.5 ⁷ | UCHT1 | # B49203 | Beckman Coulter |
| CD4 | APC ⁸ | 13B8.2 | # IM2468 | Beckman Coulter |
| γδ-TCR | FITC ² | IMMU510 | # B49175 | Beckman Coulter |
| CD56 | PE ³ | N901 | # A07788 | Beckman Coulter |
| CD45 | Krome Orange | J33 | # B36294 | Beckman Coulter |
| CD57 | Pacific Blue | NC1 | # A74779 | Beckman Coulter |
| CD14 | Alexa Fluor 700 | RM052 | # A99020 | Beckman Coulter |
| CD8 | APC ⁸ -Alexa Fluor750 | B9.11 | # A94683 | Beckman Coulter |

¹ Phycoerythrin-Cyanin 7; ² Fluorescein Isothiocyanate; ³ Phycoerythrin; ⁴ Phycoerythrin-Texas Red*-x; ⁵ Phycoerythrin-Cyanin 5; ⁶ Phycoerythrin-Cyanin 5.5; ⁷ Allophycocyanin

4.4.2. Reagenzien

Tabelle 4: Reagenzien

| | |
|---|-------------|
| PBS (phosphate buffered saline) - 11,9mM Phosphat - 137mM Natriumchlorid - 2,7mM Kaliumchlorid - pH-Wert 7,4 +/-0,1 | Biochrom |
| FBS (fetal bovine serum) | PAN Biotech |

| | |
|----------------------------|-----------------|
| VersaLyse Lysing Solution | Beckman Coulter |
| IOTest 3 Fixative Solution | Beckman Coulter |
| IsoFlow Sheath Fluid | Beckman Coulter |

4.4.3. Materialien und Geräte

Tabelle 5: Materialien und Geräte

| | |
|--|------------------------|
| FACS Röhrchen | Sarstedt |
| Pipettenspitzen | Sarstedt |
| Pipetten | Brand, Gilson, Starlab |
| Vortex (Reagenzglasmixer Powermix L46) | Hartenstein |
| Zentrifuge Totanta 460R | Hettich |
| Durchflusszytometer - Navios 3L 10COL (10 Farben) - FC500 MCL (5 Farben) | Beckman Coulter |

4.4.4. Vorbereitung und Durchführung

Die Immunophänotypisierung wird studienveranlasst durchgeführt. Untersucht wird im Rahmen dieser Arbeit peripher gewonnenes Patientenblut.

Die Untersuchung gliedert sich in zwei verschiedene Schritte, wodurch eine detaillierte Differenzierung der Zellpopulationen und der Oberflächenmerkmale ermöglicht wird.

Zunächst werden alle Patientenblutproben mittels einer 8-Farben Durchflusszytometrie analysiert. Bei Vermehrung von mehr als 10% T-NK-Zellen (definiert als Ko-Expression von CD3 und CD56) im Lymphozytengate erfolgt durch den medizinisch technischen Assistenten des Labors eine zweite durchflusszytometrische Untersuchung. Die zweite 5-Farben Durchflusszytometrie ermöglicht eine weitere Differenzierung und Charakterisierung der peripheren T-Zellen.

In beiden FACS-Analysen werden 100µl Patientenblut pro Röhrchen und jeweils 10µl des benötigten Antikörpers verwendet.

Die erste Durchflusszytometrie wird am 10 Farben Durchflusszytometer Navios 3L 10COL von Beckman Coulter durchgeführt. Es werden jedoch nur 8 Farben verwendet. Folgende Antikörper mit Farbstoffen werden verwendet: CD3 PC5.5, CD4 APC, $\gamma\delta$ -TCR FITC, CD56 PE, CD45 Krome Orange, CD57 Pacific Blue, CD14 Alexa Fluor 700 und CD8 APC-Alexa Fluor 750.

Die zweite FACS-Analyse erfolgt am 5 Farben Gerät FC500 ML von Beckmann Coulter. Hierfür werden drei Röhrchen mit jeweils 100µl Patientenblut benötigt.

Das erste Blutröhrchen erhält die Antikörper CD3 PC7, CD45 FITC/ CD14 PE, CD19 ECD und eine gemischte Antikörper-Flüssigkeit aus CD56 PC5 und CD16 PC5.

Das zweite Röhrchen wird mit CD3 PC7, CD4 FITC, anti-TCR $\gamma\delta$ PE, CD8 ECD und CD45 PC5 gefüllt.

Dem dritten Röhrchen wird CD45 PC7, CD7 FITC, CD2 PE, CD3 ECD und CD5 PC5 hinzugegeben.

Sowohl für die 8- als auch für die 5-Farben Durchflusszytometrie wird mit dem Gemisch aus Patientenblut und den jeweiligen Antikörpern gleichermaßen

verfahren. Der Übersicht halber werden die folgenden Schritte in Stichpunkten angegeben:

1. Das Patientenblut wird mit den jeweiligen Antikörpern mittels Vortex vermischt
2. Inkubation der Mischung bei Raumtemperatur (20°C) für 10 Minuten
3. Hinzufügen von 2ml VersaLyse und Fixans in einem Verhältnis von 200ml:10ml, wodurch ein Erythrozytenzerfall hervorgerufen wird
4. Inkubation der Substanzen bei Raumtemperatur (20°C) für 10 Minuten, wonach die Flüssigkeit klar erscheinen sollte
5. Zentrifugation der Flüssigkeit bei Raumtemperatur (20°C) mit 1650 rpm (revolutions per minute) für 5 Minuten, wodurch die Blutbestandteile voneinander getrennt werden
6. Der Überstand wird abgekippt
7. Der zurückgebliebenen Substanz werden 2ml Pufferlösung aus PBS und FBS in einem Verhältnis von 500ml PBS und 5ml inaktiviertem FBS hinzugegeben
8. Zentrifugation bei Raumtemperatur (20°C) mit 1650 rpm für 5 Minuten
9. Nach Abkippen des Überstands bleibt ein Lymphozyten-Pellet zurück
10. Das Pellet wird in 300µl Pufferlösung aufgenommen
11. Zu diesem Zeitpunkt ist eine Messung mittels Durchflusszytometer möglich

4.4.5. Technik der Durchflusszytometrie

Eine Durchflusszytometrie, auch FACS-Analyse oder Immunphänotypisierung genannt, ermöglicht eine sehr genaue Unterscheidung von verschiedenen Zellen und ihrer Charakteristika (109) (133). Genutzt werden können dafür Zellflüssigkeiten aus zum Beispiel Knochenmark, Blut, Liquor oder bronchoalveolärer Lavage.

Um Rezeptoren und Oberflächenantigene und somit die zu untersuchenden Zellen voneinander zu differenzieren, werden den Zellsuspensionen Fluorochrome in Form von Antikörpern hinzugefügt. So können Zelleigenschaften sichtbar gemacht werden (109) (133). Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei direkt proportional zur vorhandenen Zahl der zu untersuchenden Moleküle (109).

Ein Durchflusszytometer besteht aus einem Flüssigkeitssystem, in dem die Zellen transportiert werden, einer Lichtquelle, an welcher die Zellen vorbeigeführt werden und Detektoren, die das emittierte Licht der Zellen auffangen. Mittels der eingebauten Elektronik können optische in elektronische Daten umgewandelt werden, sodass diese der Computeranalyse zugänglich sind (109).

Die Flüssigkeit wird unter Druck beschleunigt. Dabei entsteht ein Zellstrom, in dem die Zellen voneinander getrennt werden, sodass die Messung einzelner Zellmerkmale ermöglicht wird. Der Zellstrom wird an Lichtquellen, meist Lasern vorbeigeführt. Dieser Messpunkt wird Laserabfrage genannt (109). Hier kommt es zu einer Aktivierung der Fluorochrome, sodass das Laserlicht gestreut und emittiert werden kann. Die zu messende Wellenlänge ist abhängig von den jeweilig verwendeten Fluorchromen und ermöglicht so eine Differenzierung zwischen den Zellmerkmalen (109).

Es werden zwei verschiedene Lichtquellen unterschieden. Ein Vorwärtslicht (Forward Scatter, FSC), das zur Bestimmung der Zellgröße verwendet wird und ein Seitwärtslicht (side Scatter, SSC), welches abhängig von der Zellmembranstruktur und der Beschaffenheit der Zelle gestreut wird (109) (133).

Wie viele verschiedene Fluorochrome gleichzeitig gemessen werden können, hängt vom Messgerät ab. Die Auswahl der Antikörper richtet sich nach der Fragestellung. Mit steigender Anzahl der Farben kommt es auch zu zunehmender Überlappung und damit zu einer schlechteren Auflösung und einer Beeinflussung der Ergebnisse. Das liegt daran, dass die Farbstoffe nicht nur von einer definierten Wellenlänge des Lichts angeregt werden (109) (133).

Der Schritt der Kompensation folgt im Anschluss und soll mögliche Überlappungen korrigieren (109).

4.4.6. Gating Strategie

In dieser Arbeit sind nur die Lymphozyten von Relevanz, sodass diese idealerweise ohne Einfluss anderer Zellen beurteilt werden sollen. Für diese Selektion ist das Gating von besonderer Bedeutung (109).

Zunächst erfolgt mittels CD45-Antikörper und Side Scatter die Selektion der Leukozyten (133). Um möglicherweise mitabgebildete Monozyten zu detektieren und von der Beurteilung auszuschließen, wird der Zellsuspension der Monozytenmarker CD14-Antikörper hinzugegeben, wodurch Zellen, die CD14 positiv sind, von der Analyse ausgeschlossen werden. Danach wird vom Lymphozytengate gesprochen.

Nach Hinzugabe der einzelnen Antikörper werden die generierten Dotplots durch den medizinisch technischen Assistenten des Labors per Hand bei Bedarf weiter angepasst. Dadurch ist eine genauere Abbildung der einzelnen Zellpopulationen möglich.

Die Kompensation erfolgt in dieser Arbeit mittels Autosetup der Firma Beckman Coulter.

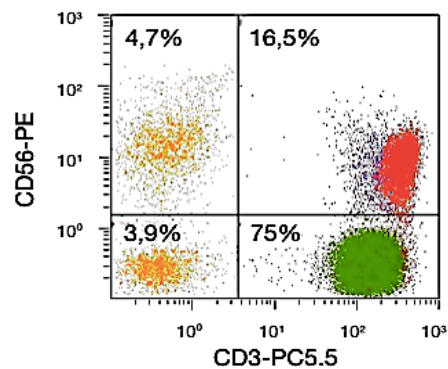
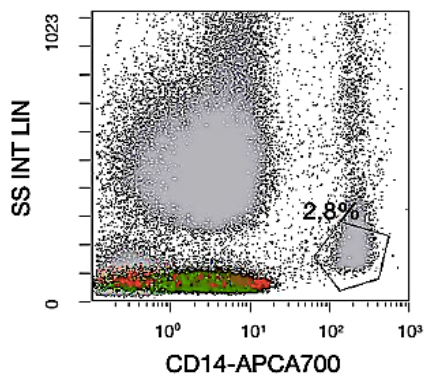
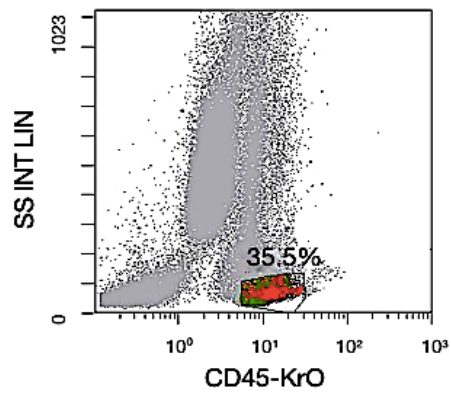
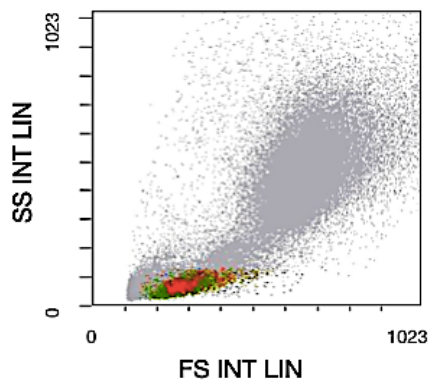
Exemplarisch werden die Ergebnisse der Durchflusszytometrie eines Patienten mit schlussendlich diagnostizierter klonaler T-LGL-Zellvermehrung dargestellt.

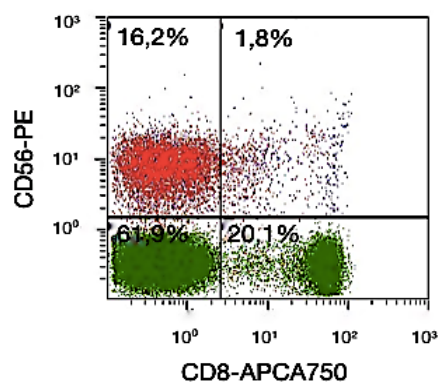
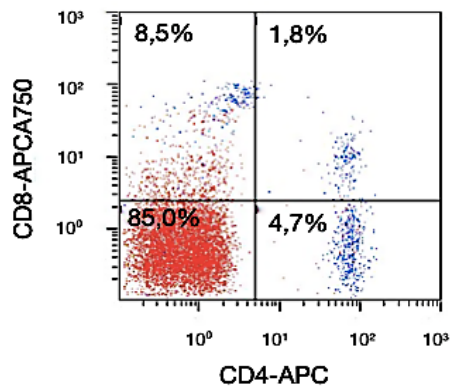
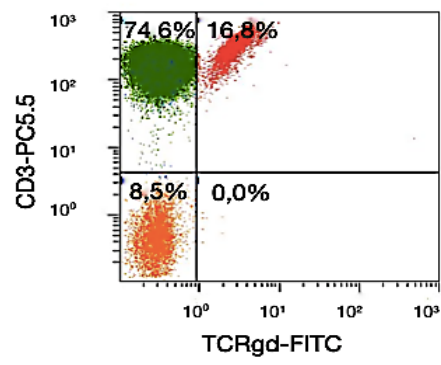
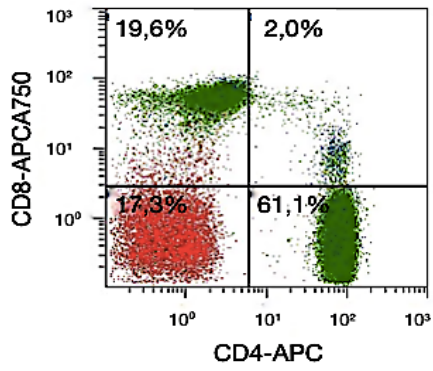
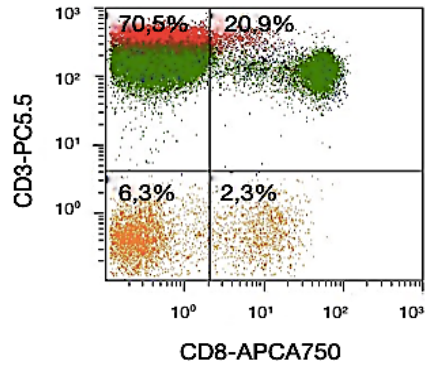
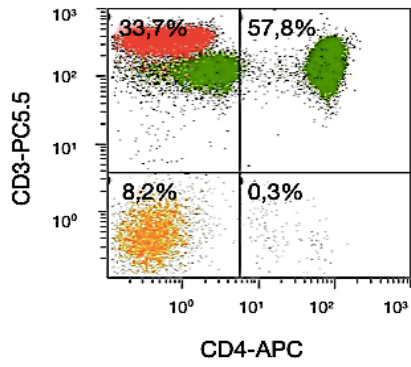
Die erste Abbildung stellt die Dotplots der ersten durchflusszytometrischen Untersuchung dar.

Initial erfolgt eine Differenzierung der Zellen der peripheren Blutprobe. Durch den CD45 Antikörper werden kernhaltige Zellen isoliert. Nach Ausschluss der Monozyten mittels des CD14 Antikörpers wird das Lymphozytengate erhalten.

Für die weitere Analyse sind ausschließlich die CD3-positiven Lymphozyten, die T-Lymphozyten relevant. Die CD3-positiven T-Zellen werden mit 91,5% dargestellt. Die CD3-negativen Zellen können sowohl B-Zellen als auch NK-Zellen darstellen. Im nächsten Schritt erfolgt eine Unterscheidung der T-Zellen.

Diese können unterschieden werden in CD4-positive Zellen, T-Helferzellen, CD8-positive Zellen, zytotoxischen T-Zellen, CD56/CD16-positive Zellen, T-NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen. Mittels der entsprechenden Oberflächenmerkmale erfolgt die Differenzierung. In diesem Fall sind 57,8% der Zellen CD4 positiv, 20,9% CD8 positiv und 16,5% CD56 positiv. 16,8% der T-Zellen sind $\gamma\delta$ -TCR positiv.





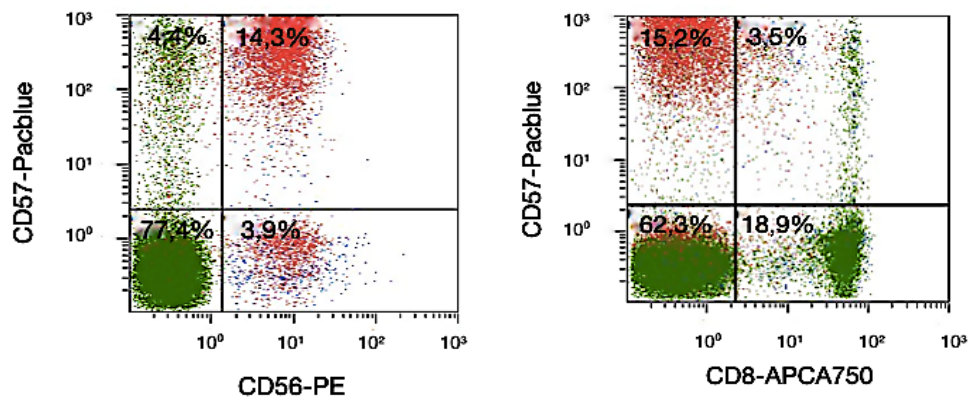


Abbildung 2: Exemplarische Darstellung der Dotplots der ersten Durchflusszytometrie

Zur Durchführung der zweiten Durchflusszytometrie werden drei verschiedene Röhrchen mit den genannten Antikörper gefüllt.

Das erste Röhrchen enthält die Antikörper CD45, CD14, CD19, CD3 und CD56/CD16. Wie in der ersten durchflusszytometrischen Untersuchung erfolgt zunächst eine Isolation der CD3-positiven Zellen mittels des CD45 und des CD14 Antikörpers. Durch Hinzunahme des spezifischen CD19 Markers ist eine Differenzierung zwischen B- und T-Zellen möglich. 90,8% der Zellen sind CD3 positiv und CD19 negativ, was für eine T-Zellpopulation spricht. 3,1% der Zellen sind CD19 positiv und CD3 negativ und damit B-Zellen. Bei den 6,0% der Zellen, die weder CD3 positiv noch CD19 positiv sind, könnte es sich möglicherweise um NK-Zellen handeln.

Durch Hinzugabe des CD56/ CD16 Antikörpers werden die T-NK Zellen als CD3- positive und CD56/ CD16-positive Zellen repräsentiert. 17,8% der Zellen sind positiv für CD3 und CD56/ CD16.

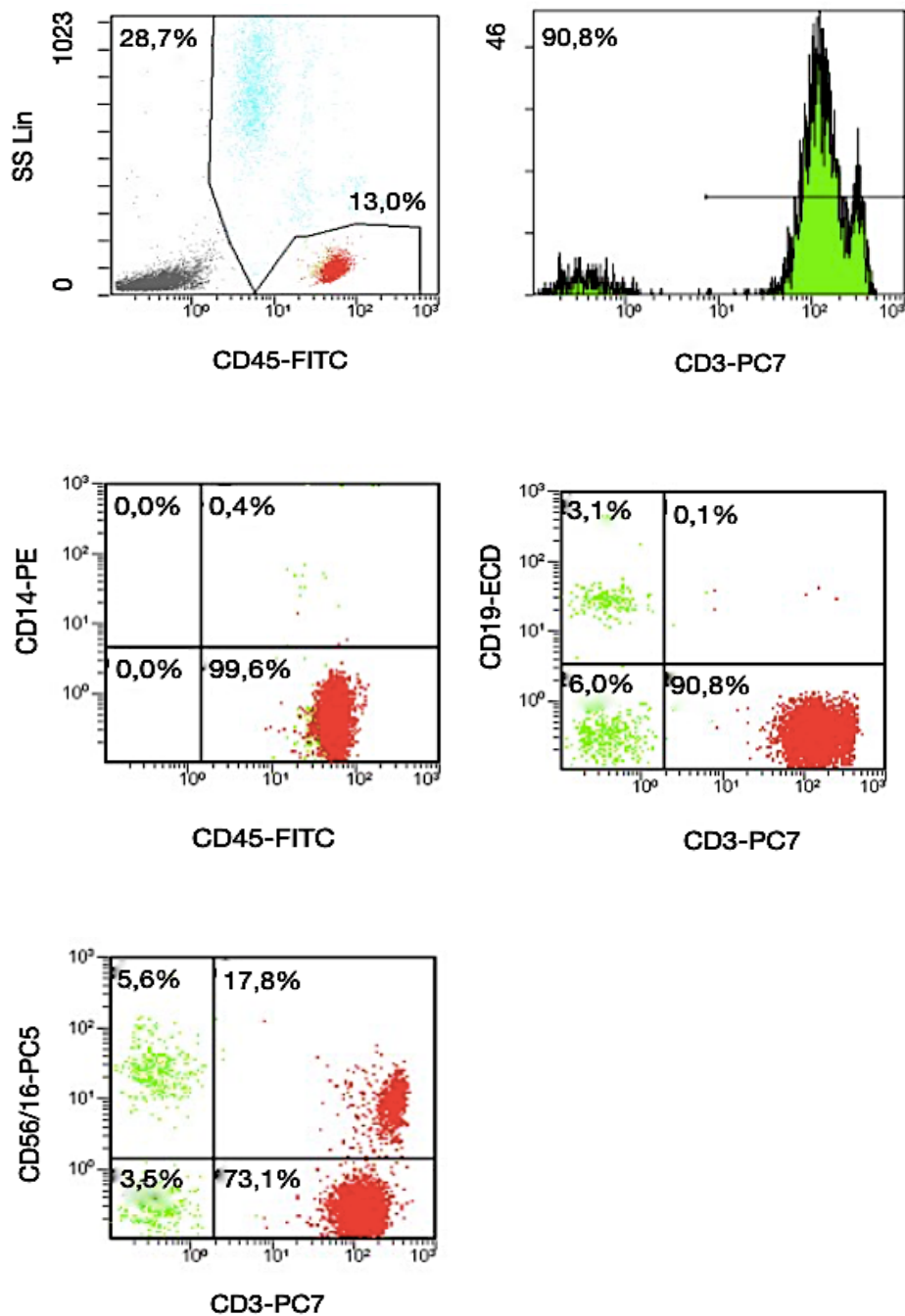
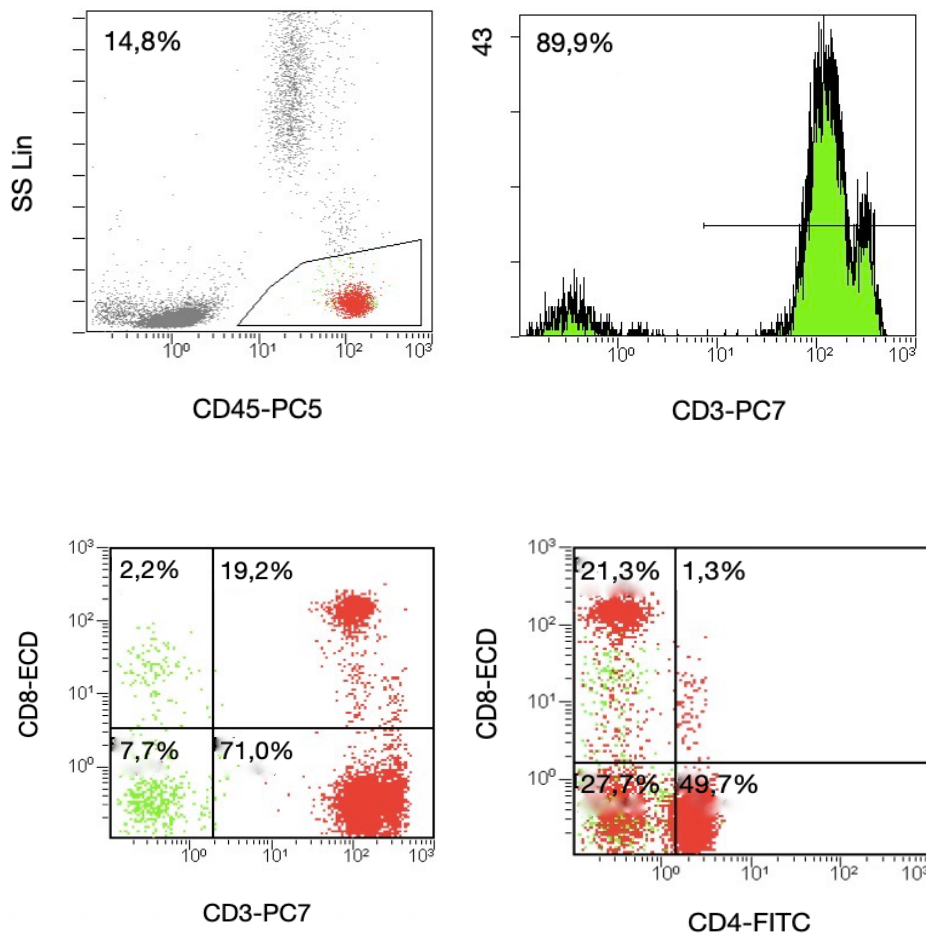


Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der Dotplots des ersten Röhrchens der zweiten Durchflusszytometrie

Das zweite Röhrchen enthält die Antikörper CD45, CD3, CD4, CD8 und anti-TCR $\gamma\delta$. Nach erneuter Isolation der CD3-positiven T-Zellen werden die Zellen durch CD4

und CD8 Antikörper in T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen unterschieden. Bei 54,7% der Zellen handelt es sich um CD4-positive Helferzellen. 19,2% der Zellen sind CD8-positive zytotoxische Zellen. Zellen, die doppelt positiv für CD4 und CD8 als auch Zellen, die doppelt negativ für beide Oberflächenmerkmale sind, kommen selten vor. Ein unausgewogenes Verhältnis von CD4-positiven und CD8-positiven Zellen kann Anhalt für einen pathologischen Prozess sein. Das Verhältnis wird mittels der CD4/CD8-Ratio angegeben.



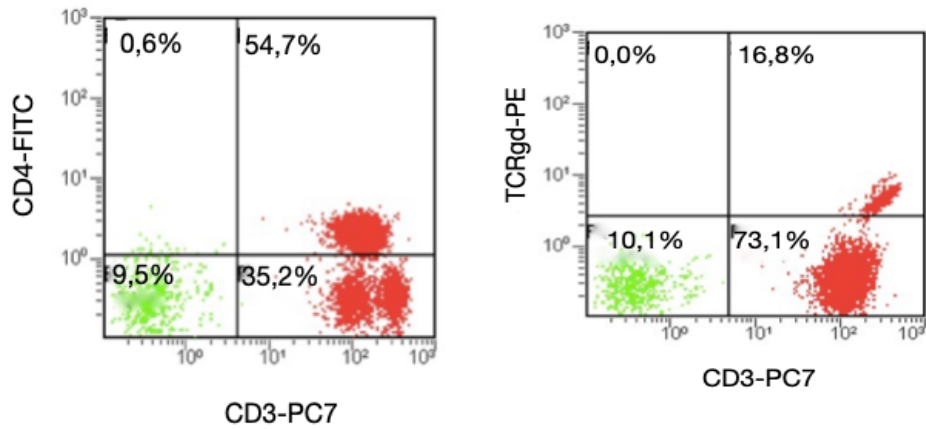
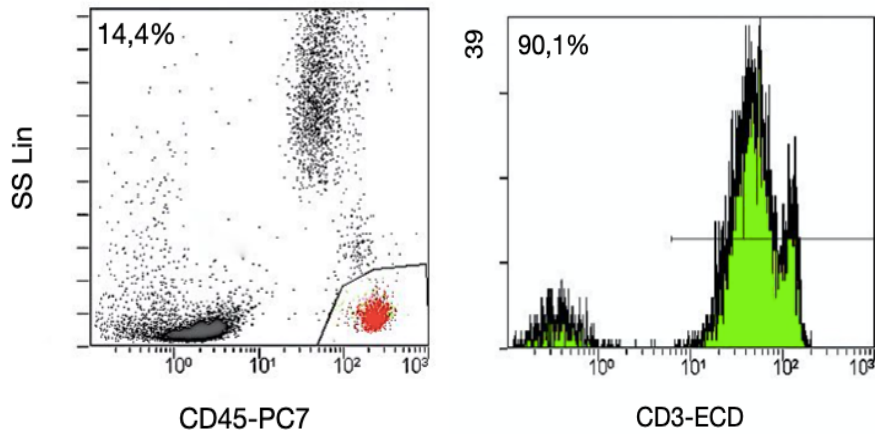


Abbildung 4: Exemplarische Darstellung der Dotplots des zweiten Röhrchens der zweiten Durchflusszytometrie

Nach erneuter Isolation der CD3-positiven Zellen werden dem dritten Röhrchen die Antikörper CD2, CD5 und CD7 hinzugefügt.



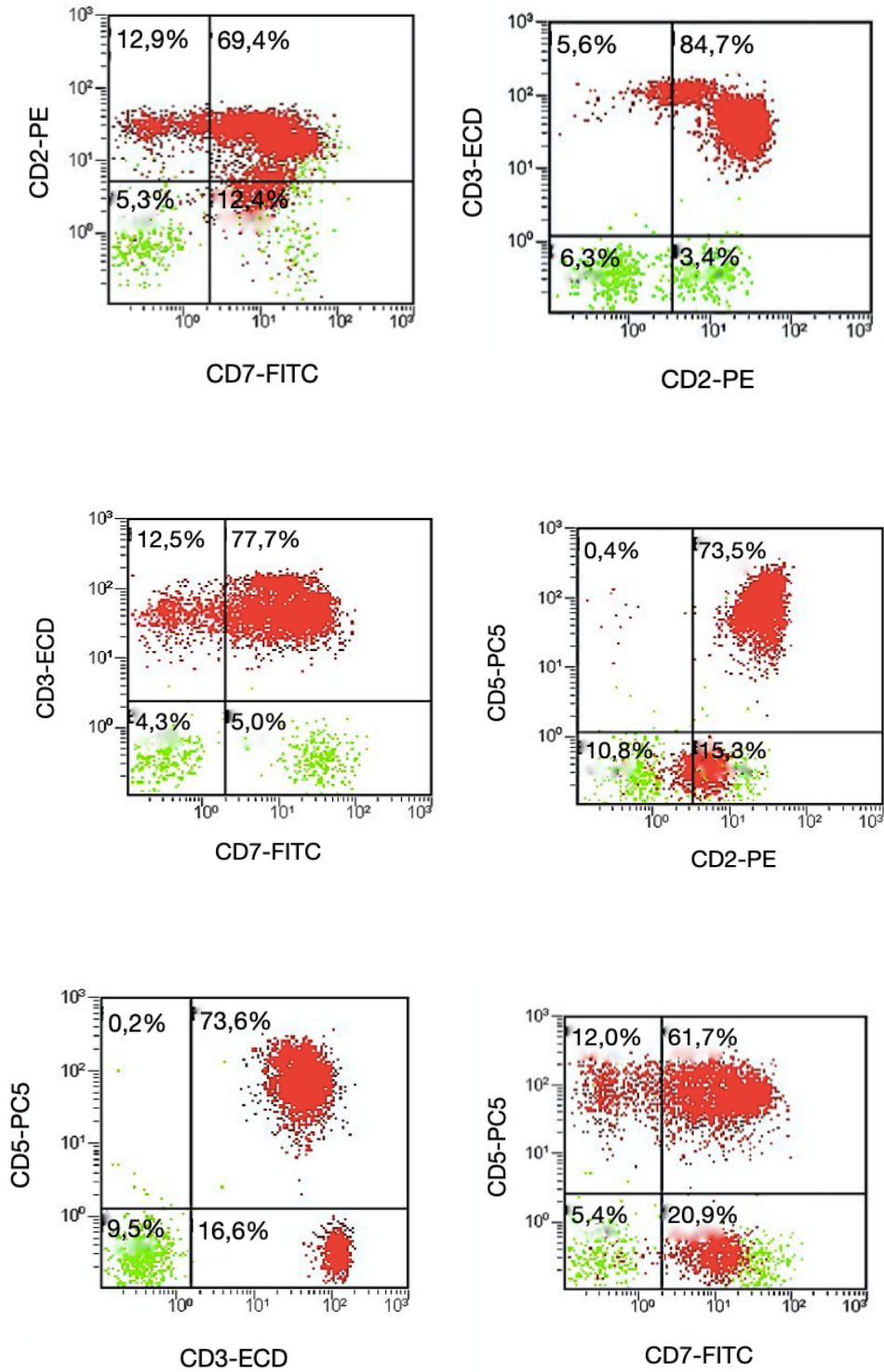


Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Dotplots des dritten Röhrchens der zweiten Durchflusszytometrie

4.4.7. Auswertung

Die Ergebnisse der FACS-Analyse werden in Form von Dotplots dargestellt. Die Auswertung erfolgt mittels der Software CXP der Firma Beckman Coulter.

Um die Ergebnisse der Untersuchung zu verifizieren, werden zuvor Negativkontrollen mittels der Untersuchung gesunder Probanden durchgeführt.

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen und somit die Entscheidung über eine anschließende PCR bei Verdacht einer klonalen T-LGL-Zellvermehrung erfolgt durch eine visuelle Beurteilung der Dotplots unter Zuhilfenahme der folgenden Kriterien. Die Wahl der Grenzwerte erfolgt willkürlich.

- CD3+ und CD56+ >25%
- $\gamma\delta$ -T-Zellen >10%
- CD4+ / CD8+ - Ratio von <0,5 oder >9
- CD4+ und CD8+ >10%
- CD4- und CD8- >10%
- Populationen mit auffälliger CD2- und/ oder CD5-Expression (vor allem CD2 und/ oder CD5 low)

Im Fall einer atypischen Zellvermehrung oder -verminderung erfolgt anschließend eine Klonalitätsanalyse des T-Zell-Rezeptors mittels PCR.

4.5. Klonalitätsanalyse mittels PCR (Polymerase Chain Reaction)

Zunächst werden die verwendeten Primer und Materialien aufgelistet. Darauffolgend werden die Durchführung der PCR Analyse und exemplarische Beispiellabbildungen dargestellt.

Die Durchführung der PCR erfolgt im Institut für Pathologie der Universität Würzburg.

4.5.1. Primer

Tabelle 6: Primer

TCR γ Tube A

| | Primersequenzen |
|----------------------|---------------------------------------|
| V γ 1f | 5' GGA AGG CCC CAC AGC RTC TT 3' |
| V γ 10 | 5' AGC ATG GGT AAG ACA AGC AA 3' |
| JP1/2 (FAM) | 5' TTA CCA GGC GAA GTT ACT ATG AGC 3' |
| J γ 1/2 (FAM) | 5' GTG TTG TTC CAC TGC CAA AGA G 3' |

TCR γ Tube B

| | Primersequenzen |
|----------------------|---------------------------------------|
| V γ 9 | 5' CGG CAC TGT CAG AAA GGA ATC 3' |
| V γ 11 | 5' CTT CCA CTT CCA CTT TGA AA 3' |
| JP1/2 (FAM) | 5' TTA CCA GGC GAA GTT ACT ATG AGC 3' |
| J γ 1/2 (FAM) | 5' GTG TTG TTC CAC TGC CAA AGA G 3' |

4.5.2. Geräte

Tabelle 7: Geräte

| | |
|-------------------------|--------------------|
| Thermocycler peqSTAR 96 | Peqlab |
| 3130XL Genetic Analyzer | Applied Biosystems |

4.5.3. Prinzip der PCR

Die Polymerase Chain Reaction ist ein Verfahren, welches es ermöglicht, gewünschte DNA-Sequenzen in vitro zu vervielfältigen. Als Ausgangssubstanz wird dafür nur eine geringe Menge DNA benötigt. Durch synthetische Replikation kann eine exponentielle Vermehrung des Materials erreicht werden (134) (135) (136).

Die Methode kann allgemein beschrieben werden. Jedoch muss diese den verwendeten DNA-Abschnitten und Primern angepasst werden.

Prinzipiell besteht der Vorgang aus drei Schritten, die wiederkehrend ablaufen. Der erste Schritt besteht aus der Denaturierung des Genmaterials. Das Material wird erhitzt, wodurch sich die DNA-Doppelstränge voneinander trennen und zwei einzelne, komplementäre Ketten entstehen. Im zweiten Schritt wird ein Primer hinzugegeben, der an eine spezifische DNA-Sequenz bindet. Der Primer ist ein einzelsträngiges DNA-Segment, welches komplementär an die zu untersuchende DNA-Einheit bindet. Die im letzten Schritt hinzugefügte DNA-Polymerase setzt an den Primer an und synthetisiert den zu duplizierenden DNA-Strang komplementär, sodass wieder eine Doppelstrang-Kette entsteht. Dieser Vorgang kann wiederholt werden und führt somit zu einer Vervielfältigung der gewünschten Gensequenz (134) (135) (136).

4.5.4. Durchführung

Wird im Rahmen dieser Arbeit in den untersuchten Proben eine pathologische Vermehrung der T-Zellen mittels Durchflusszytometrie festgestellt, erfolgt die PCR zur Analyse des T-Zell-Rezeptors. Dabei ist herauszufinden, ob es sich um monoklonale oder polyklonale Populationen handelt. Dafür wird DNA aus der peripheren Blutprobe extrahiert, um dann den variablen Teil der γ -Kette des T-Zell-Rezeptors mit spezifischen Primern nach dem BIOMED-Protokoll zu vervielfältigen (134). Die zu untersuchenden Genabschnitte werden auf dem 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) untersucht.

4.5.5. DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA aus der Blutprobe erfolgt mit dem OIAamp DNA Mini Kit von Qiagen exakt nach den Vorgaben des Herstellers aus 200 μ l EDTA-Blut⁶. Der Vorgang wird im Hinblick auf die Übersichtlichkeit in Stichpunkten angegeben.

1. Es werden 20 μ l QIAGEN Protease (oder Proteinase K) in ein 1,5ml Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert
2. Es werden 200 μ l der Blutprobe in das Röhrchen hinzugegeben
3. Zudem kommen 200 μ l Puffer AL hinzu
4. Die Substanzen werden für 15 Sekunden mittels Vortex gemischt, um die Lyse zu gewährleisten
5. Es erfolgt eine Inkubation bei 56°C für 10 Minuten
6. Zentrifugation, um die Tropfen von der Innenseite des Deckels zu entfernen
7. Hinzugabe von 200 μ l Ethanol (96-100%) zur Probe

⁶ <https://www.qiagen.com/de/products/top-sellers/qiaamp-dna-blood-mini-kit/#orderinginformation>

8. Die Substanzen werden mittels Vortex 15 Minuten lang vermischt
9. Zentrifugation, um die Tropfen von der Innenseite des Deckels zu entfernen
10. Die Probe wird nun in einem 2ml Röhrchen auf die QIAamp Mini-Spin-Säule aufgetragen
11. Zentrifugation bei 8.000U/min für 1 Minute
12. QIAamp Mini-Spin-Säule wird in ein frisches 2ml Sammelröhrchen gelegt
13. Zur QIAamp-Mini-Spin-Säule werden 500µl Puffer AW1 hinzugegeben
14. Zentrifugation bei 8.000U/min für 1 Minute
15. QIAamp Mini-Spin-Säule wird in ein frisches 2ml Sammelröhrchen gelegt
16. Zur QIAamp-Mini-Spin-Säule werden 500µl Puffer AW2 hinzugegeben
17. Zentrifugation bei 14.000U/min für 3 Minuten
18. QIAamp Mini-Spin-Säule wird in ein frisches 2ml Sammelröhrchen gelegt
19. Zentrifugation bei 14.000U/min für 1 Minuten
20. QIAamp-Mini-Spin-Säule wird in ein sauberes 1,5ml Mikrozentrifugenröhrchen gelegt
21. Hinzugabe von 200µl Puffer AE oder destilliertem Wasser
22. Inkubation bei Raumtemperatur (15-25°C) für 1 Minute
23. Zentrifugation bei 8.000U/min für 1 Minute

200µl EDTA-Blut ergeben ungefähr 6µg DNA in 200µl Wasser.

4.5.6. DNA-Vervielfältigung

2,0µl der zuvor extrahierten DNA zusammen mit 16µl Wasser, 0,5µl dNTP (10mM each) (Desoxyribonukleosidtriphosphate), 1,5µl MgCl₂ (25mM) (Magnesiumchlorid), 2,5µl Primer-Mix und 0,2µl AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) stellen den PCR-Ansatz dar.

Die Vervielfältigung der DNA erfolgt mittels Thermocycler von Peqlab nach dem BIOMED Protokoll, nach einem sogenannten Touch-Down-Protokoll.

Wie der folgenden Tabelle zu entnehmen, wird die DNA zunächst für 7 Minuten auf 95°C erhitzt. Die folgenden Schritte der PCR, bestehend aus Denaturierung der DNA, Anlagerung des Primers und Verlängerung des komplementären DNA-Stranges, erfolgen vielfach hintereinander. Dabei bleibt die Dauer der einzelnen Schritte identisch, lediglich die Temperaturen werden im Verlauf angepasst. Zum Schluss der Vervielfältigung erfolgt eine Elongationsphase von 30 Minuten, gefolgt von einer Kühlung der DNA bei 8°C.

Tabelle 8: Ablauf der DNA-Vervielfältigung nach dem BIOMED Protokoll

| Zyklen | Temperatur in °C | Zeiten | Vorgang |
|--------|------------------|-------------|------------------|
| | 95°C | 7 Minuten | Start |
| 3x { | 95°C | 45 Sekunden | Denaturierung |
| | 66°C | 45 Sekunden | Annealing Primer |
| | 72°C | 90 Sekunden | Elongation |
| | 95°C | 45 Sekunden | Denaturierung |
| 3x { | 64°C | 45 Sekunden | Annealing Primer |
| | 72°C | 90 Sekunden | Elongation |
| | 95°C | 45 Sekunden | Denaturierung |
| 3x { | 62°C | 45 Sekunden | Annealing Primer |
| | 72°C | 90 Sekunden | Elongation |
| | 95°C | 45 Sekunden | Denaturierung |
| 30x { | 60°C | 45 Sekunden | Annealing Primer |
| | 72°C | 90 Sekunden | Elongation |
| | 72°C | 30 Minuten | Elongation |
| | 8°C | ∞ | Kühlung |

4.5.7. Darstellung der Klonalitätsanalysen

Nach Durchführung der PCR erfolgt die Auswertung mittels des 3130XL Genetic Analyzers.

Die Ergebnisse der Fragmentlängenanalysen werden durch das Institut für Pathologie in positiv, negativ bzw. grenzwertig in Bezug auf klonale T-Zell-Rezeptorvermehrungen klassifiziert.

Exemplarisch werden zwei Fragmentlängenanalysen, einmal mit polyklonalem Ergebnis und einmal mit einem monoklonalem (mit leicht polyklonalem Hintergrund) Ergebnis dargestellt.

In beiden Abbildungen werden auf der x-Achse die Basenpaare und auf der y-Achse die Fluoreszenzintensität dargestellt.

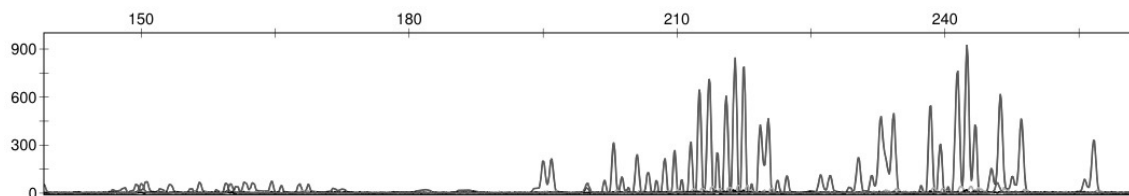


Abbildung 6: Exemplarische Darstellung einer polyklonalen Fragmentlängenanalyse

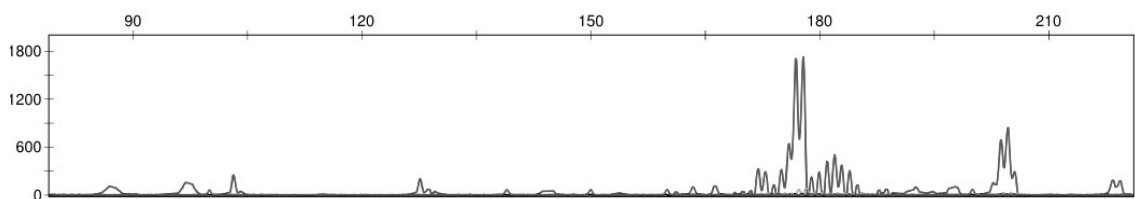


Abbildung 7: Exemplarische Darstellung einer monoklonalen Fragmentlängenanalyse mit leicht polyklonalem Hintergrund

4.6. Kriterien für eine klonale T-LGL-Zellvermehrung

Unsere Kriterien für eine signifikante, klonale T-LGL-Zellvermehrung leiten sich zum einen aus den Kriterien für eine T-LGL-Leukämie und zum anderen aus der Assoziation von T-LGL-Leukämien und Rheumatoider Arthritis ab:

- Diagnostisch gesicherte Rheumatoide Arthritis
- >10% der peripheren Lymphozyten in der FACS-Analyse haben einen LGL-Phänotyp mit der Expression von CD3 und zusätzlich CD56 oder CD57 oder $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor
- Klonales Rearrangement des T-Zell-Rezeptors in der PCR

(106) (107) (77)

4.7. Studiendesign

Die vorliegende Arbeit ist hypothesen-getrieben, in der Annahme, dass sich unter RA-Patienten häufiger als bisher bekannt T-LGL-Zellvermehrungen nachweisen lassen. Dafür erfolgt ein konsekutiver Einschluss von RA-Patienten mit einer daraufhin folgenden Querschnittsuntersuchung. Um mögliche assoziierte Faktoren aufzudecken, werden die klinischen Daten retrospektiv mittels der elektronischen Patientenakte bzw. der Arztbriefe erhoben.

4.8. Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung werden die Patientendaten aus der elektronischen Patientenakte wie auch die Ergebnisse der Durchflusszytometrie in Microsoft® Excel® 2010 Tabellen eingepflegt.

Die statistische Auswertung wird mittels Microsoft® Excel® 2010 und des Statistikprogramms IBM® SPSS® Statistics Version 23⁷ durchgeführt.

Die Verteilungseigenschaften einzelner Messgrößen werden mittels deskriptiver Datenanalyse und Häufigkeitsverteilungen ermittelt.

Mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurde auf Normalverteilung getestet. Nur die Variable des Lebensalters zeigt eine Normalverteilung, sodass die Berechnung mittels des T-Testes erfolgt. Aufgrund ansonsten unzureichender Normalverteilung und einer kleinen Patientenzahl, bei denen eine klonale T-LGL-Zellvermehrung festgestellt werden konnte, wird der Mann-Whitney U Test für metrische Variablen verwendet. Kategoriale Variablen werden mittels Fisher's Exact Test berechnet. Aufgrund des explorativen Ansatzes der Untersuchung wurde auf eine Korrektur hinsichtlich multiplen Testens verzichtet.

Als statistisch signifikant werden p-Werte unter $<0,05$ akzeptiert.

Die statistische Auswertung erfolgt mit Unterstützung und Beratung von Regina Renner (M.A.; Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Lehrstuhl für Vergleichende Politikwissenschaft und Systemlehre, Institut für Politikwissenschaft und Soziologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg).

⁷ https://www.ibm.com/support/knowledgecenter/de/SSLVMB_23.0.0/spss/base/whatsnew_23.html

5. Ergebnisse

Es wurden die Daten von 529 Patienten erhoben. Aus technischen Gründen erfolgt nur bei 527 Patienten eine Durchflusszytometrie, sodass auch nur von diesen 527 Patienten die allgemeinen Daten in der Auswertung berücksichtigt werden.

Nicht in jedem Fall können alle Parameter mittels elektronischer Patientenakte nachvollzogen werden. Fehlende bzw. nicht erhobene Daten werden nicht ergänzt. Die Anteilwerte werden im Verhältnis zu den gültigen Fällen angegeben. „n“ gibt an, bei wie vielen Patienten der Parameter ermittelt werden konnte.

Die Werte werden der Übersicht halber auf eine Nachkommastelle gerundet.

5.1. Gesamtes Patientenkollektiv

Insgesamt werden die Daten von 527 Patienten mit einer Rheumatoiden Arthritis als Grunderkrankung hinsichtlich ihrer T-Zell-Zahlen und möglichen Ko-Faktoren ausgewertet. 447 der 527 Patientendaten stammen aus der Universitätsklinik Würzburg. Die anderen 80 Probanden sind Patienten der Gemeinschaftspraxis Dr. Kleinert, Dr. Schuch, Dr. Rapp und Dr. Wendler aus Erlangen.

5.1.1. Allgemeine Charakteristika

Das durchschnittliche Lebensalter der 527 Studienteilnehmer liegt bei 60,6 Jahren mit einer Spannbreite von 23-89 Jahren zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses. Von den Studienteilnehmern sind 389 Patienten (73,8%) weiblich und 138 (26,2%) männlich. Alle Patienten haben eine nachgewiesene Rheumatoide Arthritis, deren mediane Erkrankungsdauer bei 12 Jahren (<1-49 Jahre) liegt.

179 Patienten (34,0%) sind Raucher bzw. ehemalige Raucher. 269 Patienten (51,0%) sind Nichtraucher. Bei 79 Patienten (15,0%) ist das Rauchverhalten nicht eindeutig aus den Akten zu ermitteln.

Im Durchschnitt sind die Patienten mit einem BMI (Body Mass Index)-Mittelwert von 26,7 leicht übergewichtig.

Der mediane DAS28-Wert der Patienten liegt bei 2,8 mit einer Spannbreite von 0,1-7,6. Dieser Wert spricht für eine insgesamt relativ niedrige Krankheitsaktivität unter den Teilnehmern.

357 Patienten (78,6%) weisen erosive Veränderungen in den Röntgenbildern als Ausprägung der Rheumatoiden Arthritis auf. Rheumaknoten sind bei 89 Patienten (19,8%) dokumentiert.

Tabelle 9: Allgemeine Charakteristika aller Studienteilnehmer

| | Mittelwert ± Standardabweichung | Median (Streuung, Min-Max) | % | Pat.-Anzahl | n |
|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------|------|-------------|-----|
| Lebensalter in Jahren | 60,6 ± 12,1 | 61,0 (23-89) | | | 527 |
| Weiblich | | | 73,8 | 389 | 527 |
| Männlich | | | 26,2 | 138 | 527 |
| RA-Erkrankungsdauer in Jahren | 13,8 ± 9,5 | 12,0 (<1-49) | | | 451 |
| Positive Raucheranamnese | | | 40,0 | 179 | 448 |
| BMI (kg/m ²) | 26,7 ± 5,0 | 26,0 (15,9-50,7) | | | 465 |
| DAS28-Wert | 2,9 ± 1,1 | 2,8 (0,1-7,6) | | | 517 |
| Min. 1 Gelenkerosion | | | 78,6 | 357 | 454 |
| Min. 1 Rheumaknoten | | | 19,8 | 89 | 450 |

5.1.2. Laborparameter

Tabelle 10: Laborparameter aller Studienteilnehmer

| | Mittelwert ± Standard- abweichung | Median (Streuung, Min- Max) | % | Pat.- Anzahl | n |
|------------------------------------|---|-----------------------------------|------|-----------------|-----|
| BSG 1h (mm/h) | 19,5 ± 16,8 | 14,0 (0-120) | | | 527 |
| CRP (mg/dl) | 0,5 ± 0,8 | 0,3 (0,0-6,3) | | | 526 |
| Leukozyten (/µl) | 7210 ± 2339 | 6900 (500-19800) | | | 519 |
| Hämoglobin (g/dl) | 13,4 ± 1,5 | 13,4 (7,7-17,0) | | | 526 |
| Thrombozyten (/µl) | 248544 ± 70035 | 245000 (17400- 530000) | | | 526 |
| abs. Lymphozytenzahl (/µl) | 1680 ± 677 | 1600 (360-5010) | | | 519 |
| Rheumafaktor (IE/ml) | 68,9 ± 171,1 | 19,2 (0,0-2779,0) | | | 525 |
| Rheumafaktor positiv (>20IE/ml) | | | 49,3 | 259 | 525 |
| ACPA (IE/ml) | 127,4 ± 140,4 | 50,5 (0,0-333,0) | | | 448 |
| ACPA positiv (>10IE/ml) | | | 62,9 | 282 | 448 |
| dsDNS (IE/ml) | 4,0 ± 14,7 | 1,1 (0,0-186,6) | | | 280 |
| dsDNS positiv (>15IE/ml) | | | 3,6 | 10 | 280 |
| ANA positiv | | | 43,7 | 143 | 327 |

| | | | | | |
|-------------|--|--|-----|----|-----|
| ENA positiv | | | 6,3 | 17 | 268 |
|-------------|--|--|-----|----|-----|

4 der 527 Patienten (0,8%) sind zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses neutropen (definiert als $<1000/\mu\text{l}$). Bei diesen 4 Patienten ergibt sich im weiteren Verlauf kein Anhalt für eine klonale T-LGL-Zellexpansion. Einer der Patienten mit einer schlussendlich nachgewiesenen klonalen T-LGL-Expansion zeigt bereits vor Studieneinschluss eine deutliche Neutropenie. Zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses können bei diesem Patienten Werte im Normbereich gemessen werden.

5.1.3. Lymphozytensubpopulationen

Die Tabelle gibt einen Überblick über die verschiedenen Subpopulationen der Lymphozyten des gesamten Studienkollektivs, sodass in diesem Fall sowohl die Patienten mit als auch ohne eine T-LGL-Zellvermehrung aufgeführt sind. Aus färbetechnischen Gründen kann die Subpopulation CD3+/CD56+/CD57+ bei einem Patienten nicht bestimmt werden.

Tabelle 11: Lymphozytensubpopulationen im Lymphozytengate aller Studienteilnehmer

| | Mittelwert (%) ± Standardabweichung | Median (%) (Streuung, Min-Max) | n |
|------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----|
| CD3+ | 73,9 ± 9,5 | 75,2 (38,0-94,8) | 527 |
| CD3+/ CD4+ | 53,1 ± 10,5 | 53,7 (5,1-83,5) | 527 |
| CD3+/ CD8+ | 20,5 ± 8,6 | 19,5 (1,9-50,0) | 527 |
| CD3+/ CD56+ | 5,8 ± 5,3 | 4,1 (0,1-31,1) | 527 |
| CD3+/ CD8+/ CD56+ | 4,2 ± 4,0 | 2,9 (0,1-29,2) | 527 |
| CD3+/ CD57+ | 11,4 ± 9,2 | 9,2 (0,3-85,7) | 527 |
| CD3+/ CD8+/ CD57+ | 8,2 ± 6,5 | 6,5 (0,2-42,3) | 527 |
| CD3+/ CD56+/ CD57+ | 4,3 ± 4,6 | 2,7 (0,0-26,3) | 526 |
| CD3-/ CD56+ | 14,1 ± 8,1 | 12,1 (1,2-50,4) | 527 |
| CD3+/ $\gamma\delta$ + | 2,8 ± 3,2 | 1,9 (0,1-25,9) | 527 |
| CD4+/ CD8+ -Ratio | 3,3 ± 2,1 | 2,8 (0,4-21,2) | 527 |

Bei der spezifischen Untersuchung der T-NK-Zellen (definiert als die Ko-Expression von CD3 und CD56) werden bei 437 Patienten (82,9%) ein Wert von unter 10% und bei 90 Patienten (17,1%) ein Wert von über 10% gemessen. 239 von 527 Patienten (45,4%) wiesen auf mehr als 10% der Zellen eine Ko-Expression der Oberflächenmerkmale CD3 und CD57 auf. Über 10% $\gamma\delta$ -positive T-Zellen zeigen 17 Patienten (3,2%).

5.1.4. Medikamente zur Therapie der Rheumatoiden Arthritis

Die rheumatologische Behandlung umfasst csDMARDs und bDMARDs. Innerhalb dieser Studie erhalten fast alle Patienten (521 Patienten, 98,7%) zu irgendeinem Zeitpunkt konventionell synthetische DMARDs. 463 Patienten (87,9%) erhalten MTX mit eventuell noch weiteren konventionellen DMARDs. 58 Patienten (11,0%) erhalten synthetische DMARDs ohne Methotrexat. Keine synthetischen DMARDs erhalten lediglich 3 Patienten (0,6%). Die Werte von 3 Patienten können in Bezug auf den Parameter der DMARDs nicht berücksichtigt werden, da trotz ausführlicher Aktenrecherche keine genauen Angaben dazu gefunden werden können.

Unter den Biologika wird am häufigsten mit TNF α -Inhibitoren behandelt, gefolgt von CD20-Antikörpern und dem IL6-Rezeptorantagonist Tocilizumab. Die Therapie mit CD20-Antikörpern umfasst nicht nur Rituximab, sondern auch Ocrelizumab im Rahmen von Therapiestudien. Nur wenige der Patienten erhalten IL1-Rezeptorantagonisten oder einen T-Zell-Costimulations-Hemmer.

305 Patienten (57,9%) haben einen TNF α -Inhibitor erhalten. Von 510 Patienten (96,8%) kann die Verabreichungsdauer der TNF α -Inhibitoren ermittelt werden. Im Durchschnitt werden die Patienten 2,0 Jahre (Standardabweichung 3,2; Median 0,5) mit einem TNF α -Inhibitor therapiert. Die Verabreichungsdauer beträgt von unter einem Jahr bis zu 14 Jahren.

Am zweithäufigsten werden Patienten mit CD20-Antikörpern behandelt. In dieser Studie sind es 146 Probanden (27,7%). 120 Patienten (22,8%) erhalten einen Interleukin-6-Rezeptorantagonisten, 37 Patienten (7,0%) erhalten T-Zell-Costimulations-Hemmer und nur 9 Patienten (1,7%) werden mit Interleukin-1-Rezeptorantagonisten therapiert.

In der folgenden Tabelle werden alle medikamentösen Therapien, welche die Patienten jemals im Rahmen ihrer RA Therapie erhalten haben, aufgeführt, sodass sich die Angaben sowohl auf die aktuell als auch auf die vergangene Medikation beziehen.

Tabelle 12: Medikamentöse Therapie aller Studienteilnehmer

| | Prozentuale Verteilung (%) | Pat.-Anzahl | n |
|------------------------------------|----------------------------|-------------|-----|
| Konventionelle DMARDs | 99,4 | 521 | 524 |
| TNF α -Inhibitoren | 57,9 | 305 | 527 |
| CD20-Antikörper | 27,7 | 146 | 527 |
| Interleukin-6-Rezeptorantagonisten | 22,8 | 120 | 527 |
| T-Zell-Costimulations-Hemmer | 7,0 | 37 | 527 |
| Interleukin-1-Rezeptorantagonisten | 1,7 | 9 | 527 |

5.1.5. Medikation bei Studieneinschluss

272 Patienten (51,6%) erhalten zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses eine Methotrexat-Therapie als Monotherapie oder in Kombination mit konventionellen DMARDs. Konventionell synthetische DMARDs ohne MTX erhalten 106 Patienten (20,1%). 282 Patienten (53,5%) werden mit Biologika behandelt, 141 Patienten (26,8%) mit TNF α -Inhibitoren, 48 Patienten (9,1%) mit CD20-Antikörpern in den letzten sechs Monaten, 76 Patienten (14,4%) mit IL6-Rezeptorantagonisten und 20 Patienten (3,8%) mit T-Zell-Costimulations-Hemmern. IL1-Rezeptorantagonisten werden in der Kohorte bei Studieneinschluss nicht verwendet.

Die Summe der Patienten mit TNF α -Inhibitoren-, CD20-Antikörper-, IL6-Rezeptorantagonist- und T-Zell-Costimulations-Hemmer-Therapie deckt sich aufgrund von Kombinationstherapien bzw. Therapieänderungen innerhalb der letzten sechs Monate nicht exakt mit der Patientenzahl, die Biologika erhalten haben. Zwei Patienten haben sowohl eine Behandlung mit einem T-Zell-Costimulations-Hemmer als auch eine CD20-Antikörper Therapie in den letzten

sechs Monaten erhalten. Ein weiterer Patient hat zusätzlich zur Therapie mit einem CD20-Antikörper einen Interleukin-6-Rezeptorantagonisten bekommen. 10 Patienten (1,9%) erhalten über 15mg Prednisolonäquivalent pro Tag.

Tabelle 13: Medikation bei Studieneinschluss aller Studienteilnehmer

| | Prozentuale Verteilung (%) | Pat.-Anzahl | n |
|---|----------------------------|-------------|-----|
| MTX mit und ohne andere konventionelle DMARDs | 51,6 | 272 | 527 |
| Konventionelle DMARDs ohne MTX | 20,1 | 106 | 527 |
| Biologika | 53,5 | 282 | 527 |
| TNF α -Inhibitoren | 26,8 | 141 | 527 |
| CD20-Antikörper (letzte 6 Monate) | 9,1 | 48 | 527 |
| Interleukin-6-Rezeptorantagonisten | 14,4 | 76 | 527 |
| T-Zell-Costimulations-Hemmer | 3,8 | 20 | 527 |
| Interleukin-1-Rezeptorantagonisten | 0,0 | 0 | 527 |
| Prednisolonäquivalent >15mg/ Tag | 1,9 | 10 | 527 |

5.1.6. Komorbiditäten

Bei Durchsicht der elektronischen Patientenakte und der ausgehändigten Arztbriefe kann nur bei 458 von 527 Patienten eindeutig geklärt werden, ob eine weitere Autoimmunerkrankung zusätzlich zur RA vorliegt. Bei den anderen 69

Patienten ist dies nicht möglich. Bei den fehlenden Daten handelt es sich um Patienten der Praxis Dr. Kleinert und Kollegen.

Von den 458 Patienten leiden 89 Patienten (19,4%) zusätzlich zur Rheumatoiden Arthritis an weiteren Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise Diabetes mellitus Typ 1, Multiple Sklerose, Colitis ulcerosa oder Morbus Basedow.

459 Patienten (87,1%) weisen weder eine zurückliegende noch eine aktuelle Tumorerkrankung auf. Bei 51 Patienten (9,7%) sind bereits solide Tumore diagnostiziert worden. Bei weiteren 15 Patienten (2,8%) ist eine hämatologische Tumorerkrankung bekannt. 2 der Untersuchten (0,4%) haben sowohl solide als auch hämatologische Tumore in der Anamnese. In die Statistik werden sowohl aktuelle als auch zurückliegende und geheilte Tumorerkrankungen einbezogen.

Tabelle 14: Komorbiditäten aller Studienteilnehmer

| | Prozentuale Verteilung (%) | Pat.-Anzahl | n |
|---|-------------------------------|-------------|-----|
| Autoimmunerkrankungen | 19,4 | 89 | 458 |
| Solide Tumorerkrankungen | 9,7 | 51 | 527 |
| Hämatologische Tumorerkrankungen | 2,8 | 15 | 527 |
| Solide und hämatologische Erkrankungen | 0,4 | 2 | 527 |

5.2. Patienten ohne klonale T-LGL-Zellexpansion

Von 527 Patienten ergibt sich bei 508 Patienten kein Anhalt für eine klonale T-LGL-Zellvermehrung. Die folgenden Tabellen geben die Ergebnisse der Patienten ohne klonale T-Zellveränderungen an.

5.2.1. Allgemeine Charakteristika

Tabelle 15: Allgemeine Charakteristika der Patienten ohne klonale T-LGL-Zellexpansion

| | Mittelwert ± Standard-abweichung | Median (Streuung, Min-Max) | % | Pat.-Anzahl | n |
|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------|------|-------------|-----|
| Lebensalter in Jahren | 60,5 ± 12,2 | 61,0 (23-89) | | | 508 |
| Weiblich | | | 74,0 | 376 | 508 |
| Männlich | | | 26,0 | 132 | 508 |
| RA-Erkrankungsdauer in Jahren | 13,8 ± 9,5 | 12,0 (<1-49) | | | 433 |
| Positive Raucheranamnese | | | 40,5 | 174 | 430 |
| BMI (kg/m ²) | 26,8 ± 5,0 | 26,0 (15,9-50,7) | | | 447 |
| DAS28-Wert | 2,9 ± 1,1 | 2,8 (0,1-7,6) | | | 498 |
| Min. 1 Gelenkerosion | | | 78,2 | 341 | 436 |
| Min. 1 Rheumaknoten | | | 20,1 | 87 | 432 |

5.2.2. Laborparameter

Tabelle 16: Laborparameter der Patienten ohne klonale T-LGL-Zellexpansion

| | Mittelwert ± Standard- abweichung | Median (Streuung, Min- Max) | % | Pat.- Anzahl | n |
|------------------------------------|---|-----------------------------------|------|-----------------|-----|
| BSG 1h (mm/h) | 19,4 ± 17,0 | 14 (0-120) | | | 508 |
| CRP (mg/dl) | 0,5 ± 0,8 | 0,31 (0,0-6,3) | | | 507 |
| Leukozyten (/µl) | 7217 ± 2354 | 6900 (500-19800) | | | 500 |
| Hämoglobin (g/dl) | 13,4 ± 1,5 | 13,4 (7,7-17,0) | | | 507 |
| Thrombozyten (/µl) | 247928 ± 70362 | 244000 (17400- 530000) | | | 507 |
| abs. Lymphozytenzahl (/µl) | 1668 ± 669 | 1590 (360-5010) | | | 500 |
| Rheumafaktor (IE/ml) | 69,0 ± 172,3 | 19,6 (0,0-2779,0) | | | 506 |
| Rheumafaktor positiv (>20IE/ml) | | | 49,8 | 252 | 506 |
| ACPA (IE/ml) | 126,9 ± 140,7 | 48,0 (0,0-333,0) | | | 429 |
| ACPA positiv (>10IE/ml) | | | 62,2 | 267 | 429 |
| dsDNS (IE/ml) | 4,0 ± 15,1 | 1,1 (0,0-186,6) | | | 261 |
| dsDNS positiv (>15IE/ml) | | | 3,4 | 9 | 261 |
| ANA positiv | | | 42,2 | 130 | 308 |

| | | | | | |
|-------------|--|--|-----|----|-----|
| ENA positiv | | | 6,4 | 16 | 250 |
|-------------|--|--|-----|----|-----|

5.2.3. Lymphozytensubpopulationen

Tabelle 17: Lymphozytensubpopulationen im Lymphozytengate der Patienten ohne klonale T-LGL-Zellexpansion

| | Mittelwert (%) ± Standardabweichung | Median (%) (Streuung, Min-Max) | n |
|------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----|
| CD3+ | 73,7 ± 9,4 | 75,1 (38,0-94,7) | 508 |
| CD3+/ CD4+ | 53,2 ± 10,5 | 53,7 (5,1-83,5) | 508 |
| CD3+/ CD8+ | 20,3 ± 8,5 | 19,3 (1,9-50,0) | 508 |
| CD3+/ CD56+ | 5,5 ± 5,0 | 4,0 (0,1-31,1) | 508 |
| CD3+/ CD8+/ CD56+ | 4,0 ± 3,8 | 2,8 (0,1-29,2) | 508 |
| CD3+/ CD57+ | 11,0 ± 8,5 | 8,9 (0,3-45,4) | 508 |
| CD3+/ CD8+/ CD57+ | 8,0 ± 6,4 | 6,4 (0,2-42,3) | 508 |
| CD3+/ CD56+/ CD57+ | 4,0 ± 4,3 | 2,4 (0,0-24,8) | 507 |
| CD3-/ CD56+ | 14,3 ± 8,1 | 12,3 (1,2-50,4) | 508 |
| CD3+/ $\gamma\delta$ + | 2,5 ± 2,2 | 1,8 (0,1-21,0) | 508 |
| CD4+/ CD8+ -Ratio | 3,3 ± 2,2 | 2,8 (0,4-21,2) | 508 |

5.2.4. Medikamente zur Therapie der Rheumatoiden Arthritis

Tabelle 18: Medikamentöse Therapie der Patienten ohne klonale T-LGL-Zellexpansion

| | Prozentuale Verteilung (%) | Pat.-Anzahl | n |
|------------------------------------|-------------------------------|-------------|-----|
| Konventionelle DMARDs | 99,4 | 502 | 505 |
| TNF α -Inhibitoren | 56,9 | 289 | 508 |
| CD20-Antikörper | 27,8 | 141 | 508 |
| Interleukin-6-Rezeptorantagonisten | 23,4 | 119 | 508 |
| T-Zell-Costimulations-Hemmer | 7,3 | 37 | 508 |
| Interleukin-1-Rezeptorantagonisten | 1,8 | 9 | 508 |

Im Durchschnitt werden die Patienten 1,9 Jahre (Standardabweichung 3,1; Median 0,5) mit einem TNF α -Inhibitor therapiert. Die Dauer der Verabreichung liegt zwischen unter einem Jahr und 14 Jahren. Die Daten liegen von 491 Patienten vor.

5.2.5. Medikation bei Studieneinschluss

Tabelle 19: Medikation bei Studieneinschluss der Patienten ohne klonale T-LGL-Zellexpansion

| | Prozentuale Verteilung (%) | Pat.-Anzahl | n |
|---|----------------------------|-------------|-----|
| MTX mit und ohne andere konventionelle DMARDs | 51,8 | 263 | 508 |
| Konventionelle DMARDs ohne MTX | 20,3 | 103 | 508 |
| Biologika | 53,5 | 272 | 508 |
| TNF α -Inhibitoren | 26,2 | 133 | 508 |
| CD20-Antikörper (letzte 6 Monate) | 9,1 | 46 | 508 |
| Interleukin-6-Rezeptorantagonisten | 15,0 | 76 | 508 |
| T-Zell-Costimulations-Hemmer | 3,9 | 20 | 508 |
| Interleukin-1-Rezeptorantagonisten | 0,0 | 0 | 508 |
| Prednisolonäquivalent >15mg/ Tag | 2,0 | 10 | 508 |

5.2.6. Komorbiditäten

Tabelle 20: Komorbiditäten der Patienten ohne klonale T-LGL-Zellexpansion

| | Prozentuale Verteilung (%) | Pat.-Anzahl | n |
|---|-------------------------------|-------------|-----|
| Autoimmunerkrankungen | 19,1 | 84 | 439 |
| Solide Tumorerkrankungen | 9,4 | 48 | 508 |
| Hämatologische Tumorerkrankungen | 2,8 | 14 | 508 |
| Solide und hämatologische Erkrankungen | 0,4 | 2 | 508 |

5.3. Patienten mit klonaler T-LGL-Zellexpansion

5.3.1. Ergebnisse der Klonalitätsanalyse

Aus der Universitätsklinik Würzburg werden 33 Patienten und aus der Gemeinschaftspraxis Dr. Kleinert und Kollegen 3 Patienten aufgrund der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung für auffällig befunden. Bei 35 Teilnehmern wird eine PCR des T-Zell-Rezeptors zur weiteren Diagnostik veranlasst. Ein Patient wird nicht mittels PCR Analyse untersucht, da er nicht zum Termin erscheint.

Von 35 Patienten zeigen 12 Patienten ein polyklonales Bild in der Analyse des T-Zell-Rezeptors und sind damit unauffällig in Bezug auf eine klonale T-Zellvermehrung. Bei 4 Patienten ist eine grenzwertige Fragmentlänge festzustellen, welche jedoch nicht ausreicht, um von einer klonalen Population zu sprechen. Diese Patienten werden aufgrund des nicht eindeutigen Ergebnisses durch das Institut für Pathologie als grenzwertig klassifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit werden diese Patienten als negativ gewertet.

19 Patienten haben einen eindeutig klonalen Peak in der Fragmentlängenanalyse, wodurch auf eine klonale T-Zell-Expansion geschlossen werden kann. Davon sind 18 Patienten aus dem Uniklinikum Würzburg und ein Patient aus der Gemeinschaftspraxis Dr. Kleinert und Kollegen. Das entspricht einer Prävalenz von 3,6%. Bei 11 von 19 Patienten mit einem T-LGL-Klon ist dieser $\gamma\delta$ -TCR positiv.

5.3.2. Allgemeine Charakteristika

Die Gruppe der T-LGL-Patienten besteht zu einem höheren Anteil aus weiblichen (13 Patientinnen, 68,4%) als männlichen (6 Patienten, 31,6%) Patienten. Im

Durchschnitt haben die Patienten ein Lebensalter von 63,2 Jahren (43 – 85 Jahre). Die mediane RA-Krankheitsdauer liegt bei 11 Jahren mit einer Spannbreite von unter einem Jahr bis 40 Jahre.

5 der 19 T-LGL-Patienten (26,3%) weisen eine Raucheranamnese auf. 13 Patienten (68,4%) sind Nichtraucher. Bei einem Patienten (5,3%) kann die Raucheranamnese nicht eruiert werden.

Der mediane DAS28-Wert liegt bei 2,6. 6 Patienten (31,6%) weisen einen DAS28-Wert von größer 3,2 und somit eine erhöhte Krankheitsaktivität auf.

Bei 16 Patienten (88,9%) können Erosionen in der Röntgenaufnahme gefunden werden. Hingegen werden nur bei 2 Patienten (11,1%) Rheumaknoten in der körperlichen Untersuchung dokumentiert.

Die Parameter Erkrankungsdauer, Raucheranamnese und BMI sowie der Nachweis von Gelenkerosionen und Rheumaknoten können nur von 18 Patienten erhoben werden. Bei dem fehlenden Wert handelt es sich um den Patienten aus der Praxis.

Tabelle 21: Allgemeine Charakteristika der Patienten mit klonaler T-LGL-Zellexpansion

| | Mittelwert ± Standardabweichung | Median (Streuung, Min-Max) | % | Pat.-Anzahl | n |
|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------|------|-------------|----|
| Lebensalter in Jahren | 63,2 ± 10,9 | 62,0 (43,0-85,0) | | | 19 |
| Weiblich | | | 68,4 | 13 | 19 |
| Männlich | | | 31,6 | 6 | 19 |
| RA-Erkrankungsdauer in Jahren | 14,1 ± 10,2 | 11,0 (<1-40) | | | 18 |
| Positive Raucheranamnese | | | 27,8 | 5 | 18 |
| BMI (kg/m ²) | 25,4 ± 4,3 | 23,9 (19,7-34,9) | | | 18 |
| DAS28-Wert | 2,8 ± 1,1 | 2,6 (1,2-5,1) | | | 19 |

| | | | | | |
|----------------------|--|--|------|----|----|
| Min. 1 Gelenkerosion | | | 88,9 | 16 | 18 |
| Min. 1 Rheumaknoten | | | 11,1 | 2 | 18 |

5.3.3. Laborparameter

Die meisten Patienten mit einer klonalen T-LGL-Zellvermehrung zeigen im Blutbild keine Veränderungen. Bei 5 der 19 Patienten können Blutbildveränderungen festgestellt werden. 2 von 19 Patienten (10,5%) leiden an einer milden Leukopenie. Ein Patient (5,3%) zeigt eine leichte Thrombopenie. Bei 2 der 19 Patienten (10,5%) kann eine minimale Abweichung der Lymphozyten-Normwerte festgestellt werden. Keiner der 19 Patienten war bei Studieneinschluss neutropen. In einem Fall wurde eine Knochenmarkpunktion aufgrund einer ausgeprägten Neutropenie vor Studienbeginn durchgeführt. Hierbei wurde die gleiche klonale T-Zellpopulation wie im peripheren Blut gefunden. Im weiteren Verlauf wird eine T-LGL-Leukämie in Kombination mit einer Rheumatoiden Arthritis und einer Neutropenie diagnostiziert.

Die folgende Tabelle gibt die Blutparameter der 19 Patienten mit einer klonalen T-LGL-Zellvermehrung an. Bis auf den ENA-Wert eines Patienten können alle Parameter erhoben werden.

Tabelle 22: Laborparameter der Patienten mit klonaler TLGL-Zellexpansion

| | Mittelwert ± Standard- abweichung | Median (Streuung, Min- Max) | % | Pat.- Anzahl | n |
|------------------------------------|---|-----------------------------------|------|-----------------|----|
| BSG 1h (mm/h) | 20,2 ± 11,1 | 21,0 (2,0-36,0) | | | 19 |
| CRP (mg/dl) | 0,4 ± 0,4 | 0,3 (0,0-1,1) | | | 19 |
| Leukozyten (/μl) | 7021 ± 1942 | 7100 (3400- 9800) | | | 19 |
| Hämoglobin (g/dl) | 13,2 ± 0,5 | 13,2 (12,1-14,2) | | | 19 |
| Thrombozyten (/μl) | 265000 ± 59900 | 294000 (135000- 346000) | | | 19 |
| abs. Lymphozytenzahl (/μl) | 1995 ± 833 | 1850 (990-4130) | | | 19 |
| Rheumafaktor (IE/ml) | 65,0 ± 139,1 | 15,2 (0,0-600,9) | | | 19 |
| Rheumafaktor positiv (>20IE/ml) | | | 36,8 | 7 | 19 |
| ACPA (IE/ml) | 139,7 ± 134,5 | 83,0 (0,7-333,0) | | | 19 |
| ACPA positiv (>10IE/ml) | | | 78,9 | 15 | 19 |
| dsDNS (IE/ml) | 3,0 ± 4,7 | 1,2 (0,4-19,0) | | | 19 |
| dsDNS positiv (>15IE/ml) | | | 5,3 | 1 | 19 |
| ANA positiv | | | 68,4 | 13 | 19 |
| ENA positiv | | | 5,6 | 1 | 18 |

5.3.4. Lymphozytensubpopulationen

Diese Tabelle zeigt die Verteilung der Subpopulationen der Lymphozyten im Lymphozytengate der 19 Patienten mit klonaler T-LGL-Zellvermehrung.

Tabelle 23: Lymphozytensubpopulationen im Lymphozytengate der Patienten mit klonaler T-LGL-Zellexpansion

| | Mittelwert (%) ± Standardabweichung | Median (%) (Streuung, Min-Max) | n |
|------------------------|--|-----------------------------------|----|
| CD3+ | 79,8 ± 8,3 | 78,5 (66,3-94,8) | 19 |
| CD3+/ CD4+ | 49,6 ± 10,6 | 46,5 (34,1-68,0) | 19 |
| CD3+/ CD8+ | 26,2 ± 7,9 | 23,5 (15,6-40,6) | 19 |
| CD3+/ CD56+ | 15,1 ± 5,1 | 15,5 (6,6-25,3) | 19 |
| CD3+/ CD8+/ CD56+ | 8,8 ± 5,6 | 6,7 (1,7-21,1) | 19 |
| CD3+/ CD57+ | 23,0 ± 17,5 | 19,1 (6,8-85,7) | 19 |
| CD3+/ CD8+/ CD57+ | 12,6 ± 7,9 | 9,9 (3,2-30,8) | 19 |
| CD3+/ CD56+/ CD57+ | 11,1 ± 5,9 | 10,0 (2,4-26,3) | 19 |
| CD3-/ CD56+ | 10,6 ± 6,0 | 9,6 (2,6-23,1) | 19 |
| CD3+/ $\gamma\delta$ + | 11,4 ± 8,4 | 12,2 (1,0-25,9) | 19 |
| CD4+/ CD8+ -Ratio | 2,1 ± 0,8 | 1,8 (0,9-3,5) | 19 |

5.3.5. Medikamente zur Therapie der Rheumatoiden Arthritis

Alle 19 Patienten (100%) werden zu irgendeinem Zeitpunkt im Laufe ihrer Erkrankung mit synthetischen DMARDs inklusive Methotrexat behandelt. Des Weiteren erhalten 16 Patienten (84,2%) TNF α -Inhibitoren. 5 der Patienten werden mit dem Medikament Etanercept therapiert. Die anderen 11 Patienten werden mit dem Antikörper Adalimumab oder Infliximab behandelt.

TNF α -Inhibitoren werden im Durchschnitt 4 Jahre (Standardabweichung 4,6; Median 2,0) verabreicht. Die Therapiedauer liegt zwischen weniger als einem Jahr und 12 Jahren. Die Daten liegen von allen 19 Patienten vor.

5 Patienten (26,3%) werden mit einem CD20-Antikörper therapiert. 2 Patienten erhalten die letzte RTX-Gabe im letzten halben Jahr, 1 Patient im letzten Jahr, 1 Patient vor 3 Jahren und 1 Patient von 3,5 Jahren.

Andere Wirkstoffklassen werden in deutlich geringerem Maße bzw. gar nicht verwendet. Interleukin-6-Rezeptorantagonisten werden bei einem Patienten (5,3%) eingesetzt, wohingegen T-Zell-Costimulations-Hemmer und Interleukin-1-Rezeptorantagonisten bei unserem T-LGL-Patientenkollektiv nicht zum Einsatz kommen. Die Angaben der medikamentösen Therapie beziehen sich sowohl auf die aktuelle als auch auf die vergangene Medikation.

Tabelle 24: Medikamentöse Therapie der Patienten mit klonaler T-LGL-Zellexpansion

| | Prozentuale Verteilung (%) | Pat.-Anzahl | n |
|------------------------------------|----------------------------|-------------|----|
| Konventionelle DMARDs | 100 | 19 | 19 |
| TNF α -Inhibitoren | 84,2 | 16 | 19 |
| CD20-Antikörper | 26,3 | 5 | 19 |
| Interleukin-6-Rezeptorantagonisten | 5,3 | 1 | 19 |
| T-Zell-Costimulations-Hemmer | 0,0 | 0 | 19 |
| Interleukin-1-Rezeptorantagonisten | 0,0 | 0 | 19 |

5.3.6. Medikation bei Studieneinschluss

Zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses erhalten 9 der 19 Patienten (47,4%) MTX allein oder kombiniert mit anderen csDMARDs. 3 Patienten (15,8%) werden mit csDMARDs, aber ohne MTX behandelt. 10 der 19 T-LGL-Patienten (52,6%) erhalten ein bDMARD. 8 der 10 Patienten werden mit einem TNF α -Inhibitor und 2 Patienten mit einem CD20-Antikörper innerhalb der letzten sechs Monate behandelt. IL1-, IL6-Rezeptorantagonisten oder T-Zell-Costimulations-Hemmer werden nicht verwendet. Keiner der 19 Patienten erhält während des Studieneinschlusses Steroide mit einer Dosis von über 15mg pro Tag. Gegebenenfalls werden die Patienten mit einer Low-Dose Kortison Therapie von unter 15mg behandelt. Diese Therapieoption wird nicht separat aufgeführt.

Tabelle 25: Medikation bei Studieneinschluss der Patienten mit klonaler T-LGL-Zellexpansion

| | Prozentuale Verteilung (%) | Pat.-Anzahl | n |
|--|-------------------------------|-------------|----|
| MTX mit und ohne andere konventionelle DMARDs | 47,4 | 9 | 19 |
| Konventionelle DMARDs ohne MTX | 15,8 | 3 | 19 |
| Biologika | 52,6 | 10 | 19 |
| TNF α -Inhibitoren | 42,1 | 8 | 19 |
| CD20-Antikörper (letzte 6 Monate) | 10,5 | 2 | 19 |
| Interleukin-6-Rezeptorantagonisten | 0,0 | 0 | 19 |
| T-Zell-Costimulations-Hemmer | 0,0 | 0 | 19 |
| Interleukin-1-Rezeptorantagonisten | 0,0 | 0 | 19 |
| Prednisolonäquivalent >15mg/ Tag | 0,0 | 0 | 19 |

5.3.7. Komorbiditäten

Im Kollektiv mit klonaler T-LGL-Zellvermehrung zeigen 5 Patienten (26,3%) Autoimmunerkrankungen zusätzlich zur Rheumatoiden Arthritis. Dazu zählen Sarkoidose, Alopezia areata, Vitiligo, Psoriasis (2 Patienten) und atopische Dermatitis.

3 der 19 Patienten (15,8%) haben einen soliden bzw. hatten in der Vergangenheit einen soliden Tumor. Einer der T-LGL-Patienten (5,3%) ist in der Vergangenheit an einem Hodgkin-Lymphom erkrankt. Zusätzlich leidet ein Patient an einem

Basaliom. Dieses geht hier jedoch nicht in die Auswertung mit ein, da es sich dabei um einen lokal invasiven Tumor handelt.

Keiner der 19 Patienten hat eine solide und eine hämatologische Tumorerkrankung zugleich.

Bei keinem der 19 Patienten wurde zuvor ein Felty-Syndrom diagnostiziert.

Tabelle 26: Komorbiditäten der Patienten mit klonaler T-LGL-Zellexpansion

| | Prozentuale Verteilung (%) | Pat.-Anzahl | n |
|---|-------------------------------|-------------|----|
| Autoimmunerkrankungen | 26,3 | 5 | 19 |
| Solide Tumorerkrankungen | 15,8 | 3 | 19 |
| Hämatologische Tumorerkrankungen | 5,3 | 1 | 19 |
| Solide und hämatologische Erkrankungen | 0,0 | 0 | 19 |

5.4. Vergleich der beiden Patientenkollektive

Im Folgenden werden die Patientenkollektive mit klonaler (19 Patienten) und ohne klonale (508 Patienten) T-LGL-Zellvermehrung miteinander verglichen.

In Klammern hinter dem Wert wird die Patientenanzahl, von denen der Wert zu Berechnung vorliegt, angegeben. Im Fall von kategorialen Variablen wird zusätzlich die Anzahl der Patienten angegeben, die für den zu bestimmenden Wert positiv sind.

Die p-Werte mit Signifikanz werden hervorgehoben.

5.4.1. Allgemeine Charakteristika

Die beiden Kollektive, bestehend aus den Patienten ohne eine klonale T-Zell-Expansion und denen mit einer, unterscheiden sich bezüglich ihrer demographischen und rheumatologischen Daten nur unwesentlich.

Die Gruppe der T-LGL-Patienten ist im Mittel etwas älter (63,2 Jahre vs. 60,5 Jahre; $p=0,34$). In beiden Gruppen ist der Anteil der weiblichen Teilnehmer höher als der männlichen. Der Anteil der Patientinnen in dem Kollektiv ohne eine T-LGL-Zellvermehrung ist im Verhältnis höher.

Das Kollektiv der T-LGL-Patienten hat im Durchschnitt einen niedrigen BMI als die Vergleichsgruppe (23,9 vs. 26,0; $p=0,25$). Bezüglich des Rauchverhaltens können unter den Patienten mit einer T-LGL-Zellvermehrung weniger Raucher identifiziert werden (27,8% vs. 40,5%; $p=0,21$).

In Bezug auf die Daten der rheumatischen Erkrankung lassen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede herausarbeiten. Beide Patientengruppen, mit und ohne klonale T-Zell-Vermehrung, sind annähernd gleich lang an Rheumatoider Arthritis erkrankt (Median: 12,0 Jahre vs. 11,0 Jahre; $p=0,94$). Auch der DAS28-Wert ist in beiden Gruppen annähernd gleich hoch, sodass sich kein Hinweis auf eine höhere Krankheitsaktivität in einem Patientenkollektiv ergibt (2,8 vs. 2,6; $p=0,64$).

Auch im Rahmen der radiologischen Untersuchungen lässt sich lediglich ein kleiner Unterschied zwischen den Kollektiven feststellen, wobei die Patientengruppe mit klonaler T-Zell-Vermehrung häufiger von Erosionen betroffen ist (88,9% vs. 78,1%; p=0,22). Das Auftreten von Rheumaknoten verhält sich dem entgegengesetzt (11,1% vs. 20,3%; p=0,27).

Die folgende Tabelle zeigt die allgemeinen Charakteristika der beiden Patientenkollektive im Vergleich.

Tabelle 27: Allgemeine Charakteristika der Patientenkollektive im Vergleich

| | Pat. ohne T-LGL-Zellvermehrung n= 508 | Pat. mit T-LGL-Zellvermehrung n= 19 | p-Wert |
|--|--|--|--------|
| Lebensalter (Mittelwert in Jahren) | 60,5 (508) | 63,2 (19) | 0,34 |
| Weiblich (%) | 74,0 (376/508) | 68,4 (13/19) | 0,38 |
| RA-Erkrankungsdauer (Median in Jahren) | 12,0 (433) | 11,0 (18) | 0,94 |
| Positive Raucheranamnese (%) | 40,5 (174/430) | 27,8 (5/18) | 0,21 |
| BMI (Median in kg/m ²) | 26,0 (447) | 23,9 (18) | 0,25 |
| DAS28-Wert (Median) | 2,8 (498) | 2,6 (19) | 0,64 |
| Min. 1 Gelenkerosion (%) | 78,2 (341/436) | 88,9 (16/18) | 0,22 |
| Min. 1 Rheumaknoten (%) | 20,1 (87/432) | 11,1 (2/18) | 0,27 |

5.4.2. Laborparameter

Der Vergleich der Blutparameter zwischen den beiden Kohorten erfolgt, wenn nicht anders angegeben, mittels der Mediane. Alle untersuchten Blutparameter, bis auf den ANA-Wert, ergeben keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Kohorten. Ein positiver ANA-Wert ist bei dem Patientenkollektiv mit einer klonalen T-LGL-Zellvermehrung vermehrt festzustellen (68,4% vs. 42,2%; $p=0,02$).

Tabelle 28: Laborparameter der Patientenkollektive im Vergleich

| | Pat. ohne T-LGL-Zellvermehrung n= 508 | Pat. mit T-LGL-Zellvermehrung n= 19 | p-Wert |
|-------------------------------|--|--|-------------|
| BSG 1h (mm/h) | 14,0 (508) | 21,0 (19) | 0,29 |
| CRP (mg/dl) | 0,3 (507) | 0,3 (19) | 0,98 |
| Leukozyten (/µl) | 6900 (500) | 7100 (19) | 0,89 |
| Hämoglobin (g/dl) | 13,4 (507) | 13,2 (19) | 0,26 |
| Thrombozyten (/µl) | 244000 (507) | 294000 (19) | 0,12 |
| abs. Lymphozytenzahl (/µl) | 1590 (500) | 1850 (19) | 0,09 |
| Rheumafaktor (IE/ml) | 19,6 (506) | 15,2 (19) | 0,53 |
| ACPA (IE/ml) | 48,0 (429) | 83,0 (19) | 0,58 |
| dsDNS (IE/ml) | 1,1 (261) | 1,2 (19) | 0,8 |
| ANA positiv (%) | 42,2 (130/308) | 68,4 (13/19) | 0,02 |
| ENA positiv (%) | 6,4 (16/250) | 5,6 (1/18) | 0,68 |

5.4.3. Lymphozytensubpopulationen

Die prozentualen Angaben der Verteilung der Oberflächenmerkmale im Lymphozytengate werden in Medianen angegeben.

Tabelle 29: Lymphozytensubpopulationen der Patientenkollektive im Vergleich

| | Pat. ohne T-LGL-Zellvermehrung n= 508 | Pat. mit T-LGL-Zellvermehrung n= 19 | p-Wert |
|------------------------|--|--|--------------|
| CD3+ | 75,1 (508) | 78,5 (19) | 0,01 |
| CD3+/ CD4+ | 53,7 (508) | 46,5 (19) | 0,13 |
| CD3+/ CD8+ | 19,3 (508) | 23,5 (19) | 0,003 |
| CD3+/ CD56+ | 4,0 (508) | 15,5 (19) | 0,00 |
| CD3+/ CD8+/ CD56+ | 2,8 (508) | 6,7 (19) | 0,00 |
| CD3+/ CD57+ | 8,9 (508) | 19,1 (19) | 0,00 |
| CD3+/ CD8+/ CD57+ | 6,4 (508) | 9,9 (19) | 0,003 |
| CD3+/ CD56+/ CD57+ | 2,4 (507) | 10,0 (19) | 0,00 |
| CD3-/ CD56+ | 12,3 (508) | 9,6 (19) | 0,04 |
| CD3+/ $\gamma\delta$ + | 1,8 (508) | 12,2 (19) | 0,00 |
| CD4+/ CD8+ -Ratio | 2,8 (508) | 1,8 (19) | - |

11 der 19 T-LGL-Patienten sind $\gamma\delta$ -Rezeptor positiv. Die meisten der $\gamma\delta$ -TCR positiven Fälle zeigen folgenden Immunphänotyp: CD3 high, CD56+, CD57 low, CD4-, CD8+/- . Der Phänotyp der $\gamma\delta$ -TCR negativen Fälle zeigt vor allem folgende Oberflächenmarker: CD3+, CD56+, CD57+, CD8+ und CD4+.

5.4.4. Medikamente zur Therapie der Rheumatoiden Arthritis

In den Vergleich der medikamentösen Therapie gehen alle jemals eingenommenen Medikamente in Bezug auf die rheumatische Erkrankung ein. Die medikamentösen Behandlungen mit bDMARDs und auch konventionellen DMARDs ähneln sich in den beiden Patientenkohorten bis auf eine Ausnahme, die Behandlung mit TNF α -Inhibitoren.

Synthetische DMARDs werden in beiden Gruppen zu fast 100% verabreicht (100% vs. 99,4%; $p=0,1$). Werden die einzelnen Biologika betrachtet, werden TNF α -Inhibitoren statistisch signifikant häufiger in der Gruppe mit klonaler T-Zell-Expansion verabreicht (84,2% vs. 56,9%; $p=0,01$). Auch die Therapiedauer mit TNF α -Inhibitoren ist in der Gruppe der Patienten mit klonaler T-Zell-Vermehrung signifikant länger (Median 2,0 Jahre vs. 0,5 Jahre; $p=0,01$). Die Behandlung mit CD20-Antikörpern wird in der Gruppe ohne eine T-Zell-Vermehrung unwesentlich häufiger angewandt (27,8% vs. 26,3%; $p=0,56$). Grenzwertig signifikant weniger wird die T-LGL-Patientengruppe mit Interleukin-6-Rezeptorantagonisten behandelt (5,3% vs. 23,4%; $p=0,046$). Patienten mit klonaler T-Zell-Vermehrung haben im Gegensatz zu Vergleichskohorte sowohl keine T-Zell-Costimulations-Hemmer (0,0% vs. 7,3%; $p=0,25$) als auch keine Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (0,0% vs. 1,8%; $p=0,72$) erhalten.

Tabelle 30: Medikamentöse Therapie der Patientenkollektive im Vergleich

| | Pat. ohne T-LGL-Zellvermehrung n= 508 | Pat. mit T-LGL-Zellvermehrung n= 19 | p-Wert |
|--|--|--|--------------|
| Konventionelle DMARDs (%) | 99,4 (502/505) | 100 (19/19) | 0,1 |
| TNF α -Inhibitoren (%) | 56,9 (289/508) | 84,2 (16/19) | 0,01 |
| Dauer der TNF α -Inhibitoren (Median in Jahren) | 0,5 (491) | 2,0 (19) | 0,01 |
| CD20-Antikörper (%) | 27,8 (141/508) | 26,3 (5/19) | 0,56 |
| Interleukin-6-Rezeptorantagonisten (%) | 23,4 (119/508) | 5,3 (1/19) | 0,046 |
| T-Zell-Costimulations-Hemmer (%) | 7,3 (37/508) | 0,0 (0/19) | 0,25 |
| Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (%) | 1,8 (9/508) | 0,0 (0/19) | 0,72 |

5.4.5. Medikation bei Studieneinschluss

Tabelle 31: Medikation bei Studieneinschluss der Patientenkollektive im Vergleich

| | Pat. ohne T-LGL-Zellvermehrung n= 508 | Pat. mit T-LGL-Zellvermehrung n= 19 | p-Wert |
|--|--|--|--------------|
| Konventionelle DMARDs (%) | 72,0 (366/508) | 63,2 (12/19) | 0,55 |
| Biologika (%) | 53,5 (272/508) | 52,6 (10/19) | 0,56 |
| TNF α -Inhibitoren (%) | 26,2 (133/508) | 42,1 (8/19) | 0,1 |
| CD20-Antikörper in den letzten 6 Monaten (%) | 9,1 (46/508) | 10,5 (2/19) | 0,53 |
| Interleukin-6-Rezeptorantagonisten (%) | 15,0 (76/508) | 0,0 (0/19) | 0,049 |
| T-Zell-Costimulations-Hemmer (%) | 3,9 (20/508) | 0,0 (0/19) | 0,47 |
| Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (%) | 0,0 (0/508) | 0,0 (0/19) | - |
| Prednisolonäquivalent >15mg/ Tag (%) | 2,0 (10/508) | 0,0 (0/19) | 0,69 |

5.4.6. Komorbiditäten

Die Kohorte der T-LGL-Patienten zeigt sowohl mehr Autoimmunerkrankungen als auch mehr Tumorerkrankungen im Vergleich zur Patientenkohorte ohne klonale T-LGL-Zellvermehrung. Signifikant sind diese Unterschiede nicht.

Tabelle 32: Komorbiditäten der Patientenkohorte im Vergleich

| | Pat. ohne T-LGL-Zellvermehrung n= 508 | Pat. mit T-LGL-Zellvermehrung n= 19 | p-Wert |
|---------------------------|--|--|--------|
| Autoimmunerkrankungen (%) | 19,1 (84/439) | 26,3 (5/19) | 0,3 |
| Tumorerkrankungen (%) | 12,6 (64/508) | 21,1 (4/19) | 0,22 |

6. Analyseschritte der Untersuchung

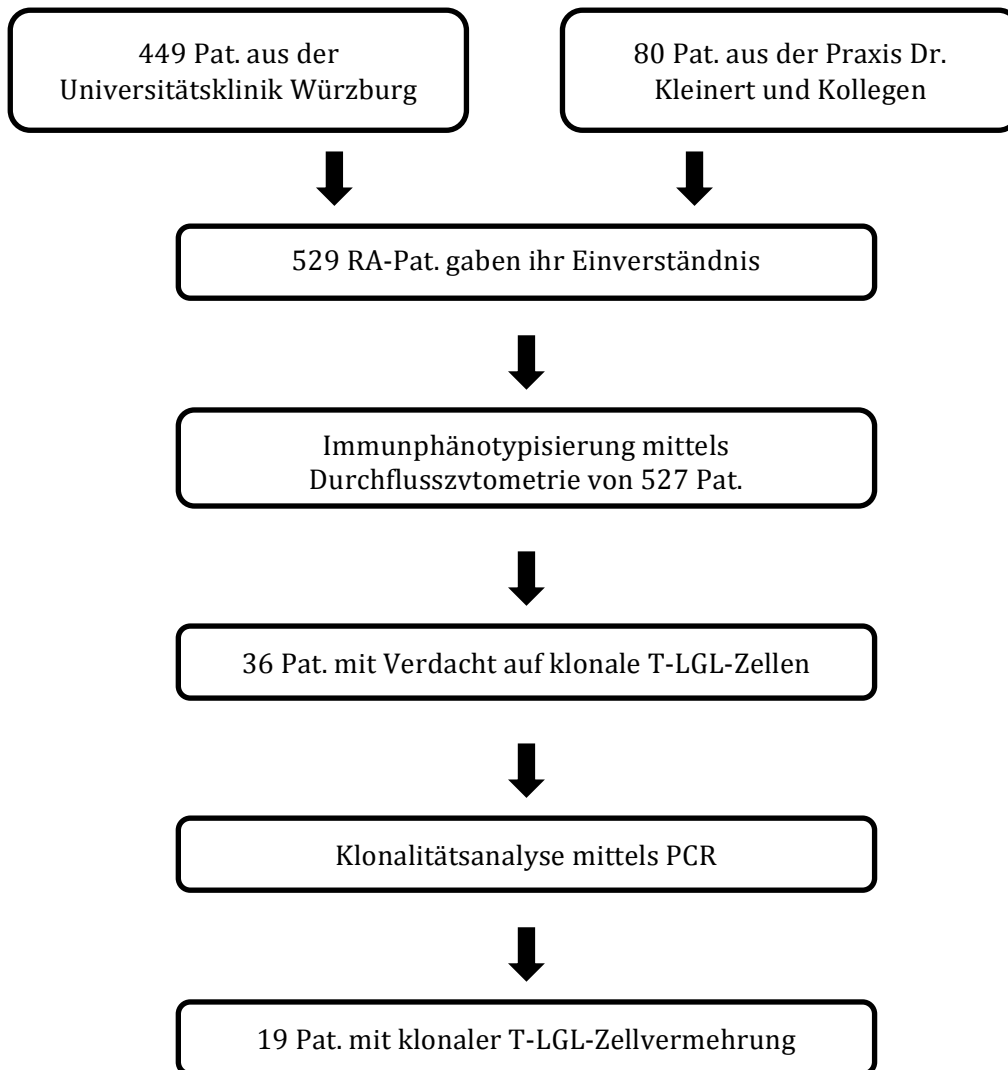


Abbildung 8: Analyseschritte der Untersuchung

7. Diskussion

Die Rheumatoide Arthritis ist eine chronisch entzündliche Systemerkrankung und betrifft ca. 1% der Erwachsenen (13). An der Pathogenese der Erkrankung sind primär CD4-positive T-Lymphozyten und sekundär Makrophagen, B-Lymphozyten, Chondroblasten, Osteoklasten und Fibroblasten beteiligt (22) (19). Durch die vorliegende Arbeit konnte erstmalig an einem großen Kollektiv mit über 500 Patienten die Differenzierung und prozentuale Verteilung der T-Lymphozyten und ihrer Rezeptoren innerhalb einer RA-Population bestimmt werden. Hierfür wurden mittels Durchflusszytometrie und PCR die T-Zellen der Patienten untersucht. In keiner uns bekannten Studie zuvor fand eine solch detaillierte Analyse der T-Lymphozyten einer RA-Population unter Hinzunahme des anti- $\gamma\delta$ -TCR statt. Die Ergebnisse können als Ansatz für die durchschnittliche Normalverteilung von verschiedenen T-Zell-Oberflächenmerkmalen bei RA erkrankten Patienten angesehen werden.

Das Hauptaugenmerk bei der T-Zell-Differenzierung lag auf den T-LGL-Zellen und ihrer monoklonalen Expansion. Sowohl die monoklonale Expansion von T-LGL-Zellen als auch die Extremform einer T-LGL-Leukämie gehören zu den seltenen lymphoproliferativen Erkrankungen (81), sodass die Rekrutierung von betroffenen Patientengruppen eine Herausforderung darstellt.

Anfang des Jahrhunderts wurden mittels eines Registers in Frankreich 201 Patienten mit einer T-LGL-Leukämie identifiziert. Die zunächst erstaunlich hohe Patientenzahl ist durch die lange Untersuchungsdauer von acht Jahren, 1999 bis 2007, zu erklären (80). 17% der identifizierten T-LGL-Patienten waren an einer RA erkrankt (80). In der Literatur werden sogar häufig RA-Prävalenzen von 11-36% beschrieben (77) (78) (107). Umgekehrt gibt es jedoch deutlich weniger Literaturangaben. Lamy et al. beschreiben eine Prävalenz von 1% für eine T-LGL-Leukämie unter RA-Patienten (77). Das zeitgleiche Auftreten von T-LGL-Leukämien und einer RA lässt eine gemeinsame Ätiologie oder sich gegenseitig

bedingende Faktoren vermuten (77) (120). In der Annahme, dass klonale T-LGL-Zellen eine Vorstufe der T-LGL-Leukämie darstellen, erfolgte in dieser Arbeit die Bestimmung von klonalen T-LGL-Zellen in einem RA-Patientenkollektiv. Dabei war es möglich, eine Prävalenz von 3,6% (19 Patienten) für klonale T-LGL-Zellen unter RA-Patienten zu ermitteln. Die hohe Prävalenz kann durch die Selektion des Patientenkollektivs, die moderne durchflusszytometrische Technologie und die Verwendung des anti- $\gamma\delta$ -TCR im FACS-Panel erklärt werden.

Prinzipiell kann eine RA mit einer Vielzahl an extraartikulären Erkrankungen, darunter auch Malignomen einhergehen (137). Die Gefahr, eine maligne Erkrankung zu entwickeln, ist im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung erhöht (5) (6) (138) (7). In einigen Fällen wird sie sogar als doppelt so hoch beschrieben (5) (7) (139). Zu den vermehrt auftretenden Malignomen gehören vor allem Erkrankungen aus dem lymphoproliferativen Bereich (140) (139), wie das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (141). Ausgehend von anderen Zellreihen schien es bisher keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung zu geben (141).

Die Ursachen für das gemeinsame Auftreten von RA und Tumorerkrankungen sind bislang nicht endgültig geklärt (142). Allgemein ist die Bildung von Tumoren ein multifaktorielles Geschehen, wobei Immunsystemveränderungen, wie in diesem Fall eine chronische Entzündungsreaktion bei einer RA-Erkrankung, einen unterstützenden Faktor darstellen können (142). Die am häufigsten beschriebenen und diskutierten Aspekte bezüglich einer erhöhten Lymphomrate unter RA-Patienten sind die Erkrankungsdauer (140), eine erhöhte Krankheitsaktivität (143), aber auch die Behandlung mit Biologika, insbesondere TNF α -Inhibitoren (72) (70) (144) (139) (68).

In unserer Untersuchung waren insbesondere die Daten zur rheumatischen Erkrankung, wie Krankheitsdauer, DAS28-Wert, Serostatus hinsichtlich

Rheumafaktor, ANA, ACPA und die medikamentöse Therapie von Relevanz. Darüber hinaus wurden Geschlecht, Lebensalter, Komorbiditäten, Blutbilder und Röntgenbefunde berücksichtigt. Nach Auswertung der vorliegenden Ergebnisse war es möglich, eine signifikante Korrelation zwischen der klonalen T-LGL-Zellentwicklung und der Verwendung von TNF α -Inhibitoren (84,2% vs. 56,9%; p=0,01) und ihrer Applikationsdauer (Median 2,0 Jahre vs. 0,5 Jahre; p=0,01) herzustellen.

Die ersten TNF α -Inhibitoren wurden Anfang des 21. Jahrhunderts zugelassen. Zu diesem Zeitpunkt gab es noch keine Datenlage über eventuelle Langzeitnebenwirkungen der Wirkstoffe (65). Nicht zuletzt wegen der Eigenschaft des Tumor Nekrose Faktors, Nekrosen in Tumorzellen bewirken zu können (145), steht die Medikamentengruppe seit Einführung im Verdacht, die Entwicklung von Malignomen fördern zu können. Mittlerweile ist klar, dass das Zytokin nicht nur zellvernichtend, sondern auch zellaktivierend arbeiten kann (146) (144). Insbesondere in verschiedenen Entzündungsprozessen und den damit einhergehenden Immunregulationen ist der Faktor beteiligt (147). Da eine Dysregulation des Immunsystems in der Tumorentstehung vermutet wird (148) (149), ergibt sich auch diesbezüglich Anhalt, für eine Beteiligung von TNF α -Inhibitoren im Tumorprozess. Allerdings ist ein möglicherweise protektiver Faktor von TNF α -Inhibitoren ebenfalls zu beachten, denn erhöhte Werte des Tumor Nekrose Faktors können mit einer schlechteren Prognose bei Malignomerkrankungen einhergehen (150).

Um Nebenwirkungen der Biologika langfristig besser analysieren zu können, wurden in mehreren europäischen Ländern Register zur Beobachtung eingerichtet. Ziel ist es, RA-Patienten, die langfristige Sicherheit und Erfolgsrate von Biologika, Biosimilars und JAK-Inhibitoren und die Aufdeckung potentieller Nebenwirkungen, insbesondere dem Lymphomrisiko, zu registrieren (151) (65).

Um einen Vergleich zu unserer Untersuchung zu ziehen, wurden Studien zum Lymphomrisiko basierend auf dem deutschen (Rheumatoide Arthritis – Beobachtung der Biologika Therapie Register, RABBIT-Register⁹) und englischen (British Society for Rheumatology Rheumatoid Arthritis Register, BSRBR-RA¹⁰) Register näher betrachtet. Wir erwarteten Patienten mit ähnlichen demographischen Werten im Vergleich zu unserem Patientenkollektiv. In beiden Registern konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Medikation und einem erhöhten Lymphomrisiko hergestellt werden (73) (68). Eine Einschränkung besteht jedoch in den demographischen Werten der britischen Patientengruppen. Die TNF-naive Patientengruppe bestand im Durchschnitt aus einem größeren Männeranteil mit einem höheren Lebensalter. Beides Aspekte, die das Risiko für eine Lymphomerkkrankung erhöhen und somit die Vergleichbarkeit der Patientengruppen reduziert (152). Strangfeld et al. konnten auf Grundlage des deutschen Registers ein vermehrtes Auftreten von Non-Hodgkin-Lymphomen unter TNF α -Inhibitoren-Therapie im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung aufzeigen. In der Gegenüberstellung von TNF α -Inhibitoren behandelten und TNF-naiven Patienten zeigte sich allerdings ein leicht vermindertes Risiko für die Entstehung einer malignen Erkrankung (73). Im ersten Jahr der Behandlung konnten Malignome insgesamt etwas seltener unter TNF α -Inhibitoren therapierten Patienten festgestellt werden als bei denen, die mittels csDMARDs behandelt wurden. Eine mögliche Ursache dafür könnte das ausgedehntere Screeningprogramm zu Tumor- und Infektionserkrankungen vor dem Beginn mit einer Biologika-Therapie sein (73). Unsere Ergebnisse lassen dazu keine Aussage zu.

Im Gegensatz dazu ergaben sich in der Untersuchung von über 18.000 Patienten von Wolfe et al. 2004 Hinweise für eine erhöhte Lymphomrate unter Patienten mit TNF α -Inhibitoren-Therapie (70). Ebenso konnten Bongartz et al. nach Analyse von

⁹ <http://www.biologika-register.de/home/>

¹⁰ The Universtiy of Manchester, BSRBR-RA study, <http://www.bsrbr.org>

randomisierten Studien eine erhöhte Malignomentwicklung unter dosisabhängiger TNF α -Inhibitoren-Therapie feststellen (72). Die Dosierung wurde in unserer Untersuchung nicht berücksichtigt. Die Studien, die TNF α -Inhibitoren in Zusammenhang mit einer Lymphomentwicklung bringen, geben darüber hinaus die Krankheitsaktivität als möglichen Confounder an (69) (70).

Werden unterschiedliche Studien zum Einfluss von TNF α -Inhibitoren auf die Lymphomentwicklung betrachtet, kommt es wiederkehrend zu Interpretationsschwierigkeiten durch die unzureichend geklärte Bedeutung der Krankheitsaktivität. Es kann nicht verifiziert werden, ob das erhöhte Risiko für maligne Erkrankungen im Rahmen einer bestehenden RA-Erkrankung auf die Medikation, die chronische Entzündung, die genetische Prädisposition oder auf eine Kombination dieser Faktoren zurückzuführen ist (142). Zugleich gilt zu berücksichtigen, dass die beiden Aspekte, Biologika-Behandlung und Krankheitsaktivität, miteinander korrelieren und sich somit möglicherweise in Bezug auf die Entwicklung von monoklonalen Zellen und Leukämien gegenseitig bedingen (141). Unterstützt wird diese Aussage durch die Empfehlungen der britischen National guidelines from the National Institute for Health and Care Excellence, NICE¹¹, die eine Biologika-Therapie vorrangig für Patienten mit einer ausgeprägten Krankheitsaktivität, beispielsweise in Form eines DAS28 Wertes von über 5,1 empfehlen (68) (153). Unsere Untersuchung erlaubt keine Aussage zu dem Zusammenhang von Krankheitsschwere und bDMARDs, da die Patienten mit Biologika-Therapie nicht separat ausgewertet wurden.

Die Krankheitsaktivität wurde, wie in vielen anderen Studien (68) (73), mittels DAS28 objektiviert. Die Ergebnisse des Rabbit Registers erlauben den Verdacht einer Korrelation zwischen einem erhöhten DAS28-Wert und der Lymphombildung (73). In Bezug auf die Expansion von klonalen T-LGL-Zellen zeigt

¹¹ <https://www.nice.org.uk>

unsere Untersuchung keine vermehrte Krankheitsaktivität bei den betroffenen Patienten (DAS28-Wert: Median 2,6 vs. 2,8; $p=0,64$).

Wenn der Begriff der Krankheitsaktivität weitergreifend betrachtet wird, so fallen ebenso annähernd gleiche Werte für BSG, CRP und Rheumafaktor auf. Der rheumaspezifische Anti-CCP-Antikörper zeigte leicht - nicht signifikant - erhöhte Werte unter den T-LGL-Patienten auf (Median 83,0 U/ml vs. 48,0 U/ml; $p=0,58$). Der ANA-Wert war jedoch signifikant höher innerhalb der T-LGL-Patientengruppe (68,4% vs. 42,2%; $p=0,02$). Daraus kann vorerst keine Schlussfolgerung gezogen werden, da es sich um einen unspezifischen Marker handelt, welcher auch bei gesunden Personen nachgewiesen werden kann. Zudem besteht keine Korrelation zwischen erhöhten ANA Werten und der Entstehung von Malignomen (154). Ebenso konnten in unserer Auswertung nicht signifikant vermehrt Erosionen in der T-LGL-Patientengruppe nachgewiesen werden (88,9% vs. 78,2%; $p=0,22$). Denkbar ist die Möglichkeit einer höheren Krankheitsaktivität unserer Patienten vor Einleitung der TNF α -Inhibitoren-Therapie und einer Senkung des DAS28-Wertes unter TNF α -Inhibitoren-Therapie. Erosionen können durch die Medikation nicht rückgängig gemacht werden und bleiben somit dauerhaft radiologisch sichtbar zurück. Wäre eine Senkung des DAS28-Wertes unter TNF α -Inhibitoren-Therapie festzustellen (155), würde dies möglicherweise die Schwere der RA-Erkrankung in den Vordergrund der Ursachenforschung für die Entwicklung von klonalen Zellen und Malignomen rücken können.

Den Daten der Untersuchung von Mariette et al. (156) liegt das ‚French RATIO registry‘ zu Grunde. In einer prospektiven Studie wurden Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankung (RA, Psoriasis, Morbus Crohn, Sjögren Syndrom, Spondylitis ankylosans) unter TNF α -Inhibitoren-Therapie auf die Entstehung von Lymphomen hin untersucht. Eine TNF α -Inhibitoren-Therapie von unter zwei Jahren korrelierte mit der Entstehung von Lymphomen. Bei reiner Betrachtung der RA-Patienten konnte kein Zusammenhang zwischen der Verabreichungsdauer von TNF α -Inhibitoren und einer Lymphomentwicklung aufgezeigt werden. Kontrovers

dazu zeigten unsere Daten eine signifikante Korrelation zwischen der Verabreichungsdauer von TNF α -Inhibitoren und der monoklonalen T-LGL-Zellvermehrung (Median 2,0 Jahre vs. 0,5 Jahre; p=0,01). Der Vergleich lässt Platz für die Vermutung, dass die Expansion von monoklonalen T-LGL-Zellen einen anderen Trigger haben, als bislang untersuchte Lymphome in Zusammenhang mit RA. Zudem ist zu berücksichtigen, dass klonale T-Zellen möglicherweise keinen malignen Aspekt haben.

Seltener wird als Ursache für Lymphome die RA-Erkrankungsdauer beschrieben (140). Für die T-LGL-Expansion kann dieser Erklärungsansatz mit unseren Daten als Grundlage nicht bestätigt werden. Zwischen den Patientengruppen konnte eine annähernd gleiche Erkrankungsdauer (Median 12,0 Jahren vs. 11,0 Jahre; p=0,94) festgestellt werden. Dabei ist zu bedenken, dass je nach Behandlungseffekt Krankheitsaktivität und Erkrankungsdauer miteinander korrelieren können.

Auch die demographischen Daten unserer Studie lassen sich mit anderen Untersuchungen vergleichen. Insgesamt kann ein erhöhtes Risiko für Lymphome bei Männern im höheren Lebensalter festgestellt werden (152). Auch unsere Gruppe mit klonaler T-LGL-Expansion weist im Verhältnis einen etwas höheren Männeranteil mit höherem Lebensalter auf. Jedoch sind die Unterschiede zu den Patienten ohne klonale T-LGL-Zellexpansion nur marginal, sodass keine weiteren Schlussfolgerungen daraus gezogen werden können. Unsere Daten zur klonalen T-LGL-Zellvermehrung bei RA-Patienten ähneln denen in der Vergleichsstudie von Bateau et al. zur Allgemeinbevölkerung (80). Der dezent höhere Anteil weiblicher Patientinnen (68% vs. 55%) in unserer Kohorte kann durch das höhere RA-Erkrankungsrisiko unter Frauen erklärt werden.

In anderen Studien konnte der Zusammenhang zwischen vermehrten Komorbiditäten, fortgeschrittenem Lebensalter und Lymphomentwicklung aufgezeigt werden (73) (70). Diese Aspekte konnten, wenn auch nicht signifikant,

bei den T-LGL-Patienten unserer Untersuchung bestätigt werden. Vermehrte Komorbiditäten wurden in Form von Autoimmun- und Tumorerkrankungen festgestellt. Das Lebensalter war im Durchschnitt 2,7 Jahre höher als in der Vergleichsgruppe.

Da in den register-bezogenen Untersuchungen eine erheblich größere Patientenzahl untersucht wurde als in unserer Studie, enthalten die Ergebnisse eine größere Aussagekraft. Das Britische Register (68) hat zusätzlich den Vorteil einer langen Beobachtungszeit, sodass auch Langzeitfolgen beurteilt werden können. Ein wichtiger Unterschied besteht in den Einschlusskriterien der Patienten. Die Studien umfassen lediglich Patienten mit symptomatischen Malignomerkrankungen. Eine, zu unserer Studie vergleichbare, durchflusszytometrische Untersuchung der Zellen hat nicht stattgefunden, sodass die Identifizierung von Patienten mit monoklonalen T-LGL-Zellen oder einer T-LGL-Leukämie wahrscheinlich unterschätzt bleibt.

Auf molekulargenetischer Ebene wird eine positive Selektion der T-LGL-Zellen durch eine Dysregulation der Apoptose und einem dadurch entstehenden Überlebensvorteil der Zellen diskutiert. Insbesondere FAS und FAS-Liganden rücken dabei in den Vordergrund. Eine klonale T-LGL-Zellexpansion geht gehäuft mit erhöhten FAS- und FAS-Ligand-Werten einher, vergleichbar mit den Werten, die unter physiologischen Bedingungen bei aktivierten T-Zellen gefunden werden können. Dabei ist die Mehrheit der T-LGL-Zellen selbst resistent gegenüber dem FAS-induzierten Zelltod (94). Als Ursache hierfür werden Mutationen in dem Signalweg STAT diskutiert. Jedoch lassen sich diese nicht bei allen T-LGL-Patienten gleichermaßen und teilweise nur sehr vereinzelt nachweisen (96) (157) (158).

Bestätigt wird der Zusammenhang durch abnehmende FAS-Liganden-Werte bei Therapieansprechen (78). Zudem werden dem Zytokin, IL 15 und dem Platelet Derived Growth Factor (PDGF) eine tragende Rolle bei der Dysregulation des Zellzyklus zugeschrieben (93) (98) (99) (159).

Die Hypothese einer medikamentös getriggerten Zellselektion in Abhängigkeit von Grunderkrankung und genetischer Prädisposition wird durch mehrere Untersuchungen gestärkt (160) (161). Sowohl im Rahmen von Morbus Crohn als auch unter Psoriasispatienten, ebenfalls beides Autoimmunerkrankungen, scheint es bei Prädisposition unter immunmodulierender Medikation zu einem Anstieg der $\gamma\delta$ -T-Zellen kommen zu können (160) (161). 11 von 19 Patienten zeigten ebenfalls einen $\gamma\delta$ -T-LGL-Phänotyp in der FACS-Analyse auf. Die $\gamma\delta$ -T-LGL-Klone in unserer Studie haben einen sehr ähnlichen Immunphänotyp im Vergleich zu den hepatosplenischen $\gamma\delta$ -T-Zell-Lymphomen, von denen Belhadj et al. berichten (162). Das hepatosplenische $\gamma\delta$ -T-Zell-Lymphom ist äußerst selten. In bis zu 20% der Fälle sind Immunsuppressionen mit dem Auftreten des Lymphoms vergesellschaftet (163). Durch die TNF α -Inhibitoren bedingte Immunsuppression unserer Kohorte lässt sich eine Parallele ziehen.

Ob es sich bei der Zellexpansion vorrangig um eine genetische Disposition, um die Auswirkung der Grunderkrankung oder um Nebenwirkungen der Medikation handelt, bleibt unklar. Gegen die alleinige Wirkung der Medikation als Ursache spricht die Untersuchung von Mariette et al., in welcher Patienten mit einer Lymphomerkkrankung und TNF α -Inhibitoren-Therapie untersucht wurden. Ein Teil des Patientenkollektivs hatte als Indikation für die TNF α -Inhibitoren-Therapie eine Spondylarthritis, eine Erkrankung, welche nicht mit einem erhöhten Lymphomrisiko assoziiert ist. Auch unter immunmodulierender Medikation konnte in diesem Fall keine vermehrte Lymphomentwicklung festgestellt werden (156).

Die Untersuchung von Morbus Crohn Patienten von Kelsen et al. wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Eine durchflusszytometrische Analyse vor und nach TNF α -Inhibitoren-Gabe zeigte eine Zellexpansion bei Patienten mit bereits zuvor erhöhten $\gamma\delta$ -T-Zell-Werten (160). Im Gegensatz dazu handelt es sich bei unserer Untersuchung um eine einmalige Bestimmung der T-LGL-Zellen. Es entsteht eine Limitation in Bezug auf die Aussagekraft, da weder ein kurzzeitiger

Anstieg von klonalen T-LGL-Zellen noch eine bereits vor TNF α -Inhibitoren-Therapie bestehende klonale T-Zell-Vermehrung ausgeschlossen werden kann. Sokol et al. empfehlen eine Kontrollanalyse der T-Zellen nach sechs Monaten zur Differenzierung von reaktiven und chronischen Expansionen (78). Ebenso mussten auch in der Analyse von Bateau et al. die T-LGL-Zellvermehrungen über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten nachzuweisen sein (80). Obwohl unser Studienprotokoll eine Kontrollanalyse nicht vorgesehen hat, sollte die Prüfung der monoklonalen Zellen im Verlauf diskutiert werden.

Bei der Diagnosestellung haben wir uns nach den in den meisten Studien verwendeten Kriterien gerichtet. Erforderlich dafür ist der Nachweis von mehr als 500 T-LGL-Zellen pro μ l, ein charakteristischer Immunphänotyp und Klonalität der T-Zellen (80) (107). Laut Literaturangaben lassen sich bei den Patienten mit T-LGL-Leukämie jedoch häufig Werte von über 2000 T-LGL-Zellen pro μ l finden (79) (107). Sollten nur geringere Zellzahlen, 400 bis 2000 Zellen pro μ l, nachgewiesen werden können, kann bei klonaler Abstammung und gleichzeitig bestehender charakteristischer Symptomatik und ggf. bestehender Autoimmunerkrankungen die Diagnose dennoch gestellt werden (77). Bei 19 Patienten unserer Studie können monoklonale T-LGL-Zellen nachgewiesen werden. Da es sich bei 18 Patienten um einen Zufallsbefund handelt und die Patienten keine diesbezüglichen Symptome aufzeigten, erscheint es sinnvoll, eher von einer monoklonalen T-LGL-Zellexpansion unklarer Signifikanz zu sprechen (89) (164) (103). Einer der Patienten war vor Studieneinschluss neutropen. Bei diesem wurde bereits vor Studieneinschluss die Diagnose einer T-LGL-Leukämie gestellt.

Prinzipiell stellen eine Neutropenie, ggf. mit Infektneigung, eine transfusionsbedürftige Anämie oder eine mit der T-LGL-Leukämie verbundene Erkrankung, wie eine RA, Therapieindikationen dar (107). Bei asymptomatischer T-LGL-Leukämie ist ein Zuwarten nach dem Prinzip ‚Watch and wait‘ vertretbar (107). In dieser Arbeit zeigte keiner der 19 Patienten eine Neutropenie zum

Zeitpunkt des Studieneinschlusses. Da die Studienteilnehmer aber eine RA haben, besteht formal bei allen die Indikation zur Therapie. Die Behandlung der RA steht jedoch weiterhin im Vordergrund.

Es bleibt festzuhalten, dass der Krankheitswert einer klonalen T-LGL-Zellexpansion in diesem Zusammenhang bisher nicht hinreichend geklärt ist (89) (165). Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Expansion von klonalen CD8-positiven T-Zellen auch in gesunden Patientenkollektiven auftritt (165) (166), sodass das Vorkommen von klonalen Zellverbänden nicht mit einer malignen Zellentartung gleichzusetzen ist (134). Nur in Zusammenschau mit weiteren Befunden kann die Zellvermehrung bewertet werden und eine Therapieindikation darstellen (102).

Durch unsere Untersuchung konnte nicht geklärt werden, ob die Entwicklung von monoklonalen T-LGL-Zellen eine Grunderkrankung oder vielmehr eine Reaktion auf die Autoimmunerkrankung darstellt. Zudem bleibt ebenfalls offen, ob es sich bei der Expansion der klonalen T-LGL-Zellen um eine Vorstufe der T-LGL-Leukämie handelt (102). Wahrscheinlich scheint eine gemeinsame Pathogenese, die im Verlauf durch unterschiedliche Mechanismen zur Ausprägung der zwei Krankheitsentitäten führt.

Unabhängig vom unzureichend geklärten Einfluss der TNF α -Inhibitoren zeigte sich in unserer Untersuchung, wenn auch nur grenzwertig signifikant, ein geringeres Vorkommen klonaler T-LGL-Zellen bei Patienten mit Interleukin-6-Rezeptorantagonisten-Therapie (5,3% vs. 23,4%; p=0,046). Interleukin 6 ist ein Zytokin, welches an unterschiedlichen pathophysiologischen Prozessen im Körper beteiligt ist. Unter anderem ist es an Zellinteraktionen zwischen B- und T-Zellen, an Entzündungsprozessen aber auch an der Aktivierung des JAK/STAT Signalweges beteiligt (167) (168). Drei Aspekte, die sowohl in der Pathogenese der RA als auch in der Entstehung einer T-LGL-Leukämie eine tragende Rolle spielen. Eine ausbleibende Aktivierung des JAK/STAT-Weges durch IL6-

Rezeptorantagonisten könnte ein Erklärungsansatz für die reduzierte Bildung von T-LGL-Leukämien sein. Ob IL6-Rezeptorantagonisten einer T-LGL-Zellexpansion jedoch tatsächlich entgegenwirken können, kann erst in weiteren Studien geklärt werden. Die Aussagekraft unserer Untersuchung ist in Bezug darauf beschränkt, da weniger als ein Viertel unserer gesamten Patientenkohorte jemals einen IL6-Rezeptorantagonisten erhalten haben. Unter den 19 Patienten mit klonaler T-LGL-Zellvermehrung war es nur ein Patient.

Eine weitere Einschränkung unserer Studie besteht in der retrospektiven Datenerhebung. Insgesamt gehen wir jedoch von einer hohen Qualität unserer Daten aus. Die Parameter wurden im Wesentlichen durch erfahrende Therapeuten aus einer Spezialambulanz bzw. einer Schwerpunktpraxis erhoben, wodurch das Risiko einer Verzerrung reduziert wurde, und die Daten gut miteinander zu vergleichen sind. Von Vorteil ist in diesem Zusammenhang auch die elektronische Patientenakte.

Die Herausforderung, eine Patientenkohorte mit klonaler T-LGL-Zellexpansion zu rekrutieren, ist uns gelungen. Aufgrund der Studienpopulationsgröße konnte eine im Verhältnis große Gruppe mit klonaler T-LGL-Zellvermehrung ausfindig gemacht werden, und die Prävalenz für klonale T-LGL-Zellen innerhalb einer RA-Population bestimmt werden.

Die signifikante Korrelation von $\text{TNF}\alpha$ -Inhibitoren und der monoklonalen Zellentwicklung ist unter Berücksichtigung der kleinen Studienpopulation zu betrachten. Festzuhalten bleibt, dass $\text{TNF}\alpha$ -Inhibitoren sehr effektiv in der RA-Therapie sind und zu einer erheblichen Linderung der Symptomatik beitragen können (155) (169). Der Erhalt der Lebensqualität übersteigt unserer Ansicht nach aktuell das Risiko an einer potentiell malignen Erkrankung durch die immunsuppressive Therapie zu erkranken. Allerdings muss die Entwicklung von monoklonalen T-LGL-Zellen als noch unbekanntes Nebenwirkung bedacht werden, weshalb wir eine Sensibilisierung der Behandler für Symptomatik und

Blutbildveränderungen unter TNF α -Inhibitoren-Therapie als mögliche Vorboten für die Bildung von monoklonalen Zellverbänden für wichtig erachten. Ob Patienten mit bereits bestehender T-Zell-Aberration von einem Verzicht auf eine TNF α -Inhibitoren-Therapie profitieren, ist zu diskutieren. Eine Untersuchung der T-LGL-Zellen mittels FACS-Analyse vor und nach TNF α -Inhibitoren-Therapie könnte weiteren Aufschluss über den konkreten Einfluss der TNF α -Inhibitoren geben.

8. Zusammenfassung

Dieser Arbeit liegt ein Kollektiv aus 527 RA-Patienten zugrunde. Der Fokus der Untersuchung lag zum einen auf der Bestimmung der T-Lymphozyten und ihrer Oberflächenantigene und zum anderen auf der Ermittlung der Prävalenz klonaler T-LGL-Zellen im Kollektiv. Untersucht wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie und PCR unter Hinzunahme eines Antikörpers gegen $\gamma\delta$ -TCR. Bei 19 Patienten konnte eine klonale T-LGL-Zellexpansion festgestellt werden. Das entspricht einer Prävalenz von 3,6%. 11 der 19 Patienten zeigten einen $\gamma\delta$ -positiven T-Zell-Rezeptor. Die Betroffenen werden aufgrund der fehlenden klinischen Symptomatik mit einer monoklonalen T-Zell-Expansion unklarer Signifikanz beschrieben.

Bei der Analyse möglicher Einflussfaktoren für die monoklonale T-LGL-Zellexpansion wurden demographische Daten, krankheitsbezogene Parameter, Laborwerte, der DAS28-Wert und die medikamentöse Therapie miteinbezogen. Die Auswertung erfolgte retrospektiv. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Assoziation zwischen der Entwicklung einer klonalen T-LGL-Zellvermehrung und einer TNF α -Inhibitoren-Therapie (84,2% vs. 56,9%; p=0,01) und deren Dauer (2,0 Jahre vs. 0,5 Jahre; p=0,01). In Bezug auf ihre rheumatische Erkrankung unterschieden sich die Patientengruppen nicht signifikant.

Die zu Beginn der Studie aufgestellten Ziele konnten erreicht werden. Es konnte die Prävalenz von monoklonalen T-LGL-Zellen innerhalb einer RA-Kohorte bestimmt werden und ein möglicher Zusammenhang mit der Therapie von TNF α -Inhibitoren aufgezeigt werden. Aufgrund der kleinen Patientengruppe mit einer klonalen T-LGL-Zellvermehrung ist der Zusammenhang mit TNF α -Inhibitoren mit Vorsicht zu betrachten. Der Einfluss weiterer Faktoren bleibt offen. Zur Validierung der Ergebnisse bedarf es prospektiver Untersuchungen mit größeren Patientenkollektiven. Allerdings geben unsere Ergebnisse schon jetzt Anlass dazu, bei Patienten mit Blutbildveränderungen oder Symptomen der Neutropenie unter TNF α -Inhibitoren-Therapie, eine T-LGL-Leukämie in Betracht zu ziehen.

9. Eigenanteil

Die Arbeit entstand in Zusammenarbeit mit dem Immunologischen Labor und der Pathologie Würzburg. Durch mich erfolgte zum einen die Auswahl der relevanten Patientendaten und Laborparameter und die folgende Datenerhebung aus der elektronischen Patientenakte sowie aus den Arztbriefen der Praxis Dr. Kleinert und Kollegen. Um die Daten der statistischen Analyse zugänglich zu machen, wurde eine Tabelle mit allen zu analysierenden Parametern erstellt und die Parameter standardisiert.

Die durch das immunologische Labor angefertigten Durchflusszytometrien wurden zunächst von mir ausgewertet und anschließend mit Frau Dr. Schwaneck besprochen. Die statistische Auswertung wurde durch Frau Renner und mich durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab in Fachzeitschriften publiziert.

- Scharbatke, E. C.; Junker, L.; Gadeholt, O.; Tony, H.-P.; Schmalzing, M.; „Felty-Syndrom und T-LGL-Leukämie bei Rheumatoider Arthritis. Wann muss man daran denken?“; 2016, Aktuelle Rheumatologie, Georg Thieme Verlag KG (113)
- Schwaneck, E. C.; Renner, R.; Junker, L.; Einsele, H.; Gadeholt, O.; Geissinger, E.; Kleinert, S.; Gernert, M.; Tony, H.-P. and Schmalzing, M.; „Prevalence and Characteristics of Persistent Clonal T Cell Large Granular Lymphocyte Expansions in Rheumatoid Arthritis: A Comprehensive Analysis of 529 Patients.“; 2018, Arthritis & Rheumatology (170)

- Schwaneck, E. C.; Renner, R.; Junker, L.; Tony, H.-P.; Kleinert, S.; Gernert, M.; Schmalzing, M.; Gadeholt, O.; „T cells, natural killer cells, and gammadeltaT cells in a large patient cohort with rheumatoid arthritis: influence of age and anti-rheumatic therapy.“; 2020, Scandinavian journal of rheumatology (171)

10. Geschlechtergerechte Sprache

Im Rahmen dieser Arbeit wird zugunsten der besseren Lesbarkeit auf die gleichzeitige Verwendung männlicher und weiblicher Sprachformen verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen, wenn nicht anders gekennzeichnet, gelten für beide Geschlechter.

11. Literaturverzeichnis

1. PJW Venables M, MB BChir, MD, FRCP, RN Maini B, MB BChir, FRCP, FMedSci, FRS. Clinical features of rheumatoid arthritis UpToDate: 2014.
2. Grassi W, De Angelis R, Lamanna G, Cervini C. The clinical features of rheumatoid arthritis. *European journal of radiology*. 1998;27 Suppl 1:S18-24. doi: 10.1016/s0720-048x(98)00038-2. PubMed PMID: 9652497.
3. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2001;358(9285):903-11. doi: 10.1016/S0140-6736(01)06075-5. PubMed PMID: 11567728.
4. Turesson C, Jacobsson L, Bergstrom U. Extra-articular rheumatoid arthritis: prevalence and mortality. *Rheumatology*. 1999;38(7):668-74. doi: 10.1093/rheumatology/38.7.668. PubMed PMID: 10461483.
5. Smitten AL, Simon TA, Hochberg MC, Suissa S. A meta-analysis of the incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2008;10(2):R45. doi: 10.1186/ar2404. PubMed PMID: 18433475; PubMed Central PMCID: PMC2453765.
6. Thomas E, Brewster DH, Black RJ, Macfarlane GJ. Risk of malignancy among patients with rheumatic conditions. *International journal of cancer*. 2000;88(3):497-502. PubMed PMID: 11054684.
7. Mellekjaer L, Linet MS, Gridley G, Frisch M, Moller H, Olsen JH. Rheumatoid arthritis and cancer risk. *European journal of cancer*. 1996;32A(10):1753-7. doi: 10.1016/0959-8049(96)00210-9. PubMed PMID: 8983286.

8. Gravalles EM. Bone destruction in arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2002;61 Suppl 2:ii84-6. PubMed PMID: 12379632; PubMed Central PMCID: PMC1766721.
9. Herold G, Mitarbeiter. *Innere Medizin eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Herold 2014. 1001 p.
10. Krüger K. Medikamentöse Therapie der rheumatoiden Arthritis und ihrer Komorbiditäten. *Der Internist*. 2018;59(4):341-51. doi: <https://doi.org/10.1007/s00108-018-0397-2>.
11. Smolen JS, Landewe R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Annals of the rheumatic diseases*. 2017;76(6):960-77. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-210715. PubMed PMID: 28264816.
12. Fiehn C, Holle J, Iking-Konert C, Leipe J, Weseloh C, Frerix M, et al. S2e-Leitlinie: Therapie der rheumatoiden Arthritis mit krankheitsmodifizierenden Medikamenten. *Zeitschrift für Rheumatologie* 2018;77(Sppl 2):35-53. Epub Online publiziert: 3. Juli 2018. doi: <https://doi.org/10.1007/s00393-018-0481-y>.
13. Gabriel SE, Crowson CS, O'Fallon WM. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, 1955-1985. *Arthritis and rheumatism*. 1999;42(3):415-20. doi: 10.1002/1529-0131(199904)42:3<415::AID-ANR4>3.0.CO;2-Z. PubMed PMID: 10088762.

14. Symmons DP. Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2002;16(5):707-22. doi: 10.1053/berh.2002.0257. PubMed PMID: 12473269.
15. Doran MF, Pond GR, Crowson CS, O'Fallon WM, Gabriel SE. Trends in incidence and mortality in rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, over a forty-year period. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(3):625-31. doi: 10.1002/art.509. PubMed PMID: 11920397.
16. Myasoedova E, Crowson CS, Kremers HM, Therneau TM, Gabriel SE. Is the incidence of rheumatoid arthritis rising?: results from Olmsted County, Minnesota, 1955-2007. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(6):1576-82. doi: 10.1002/art.27425. PubMed PMID: 20191579; PubMed Central PMCID: PMC2929692.
17. Wordsworth BP, Lanchbury JS, Sakkas LI, Welsh KI, Panayi GS, Bell JI. HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA class II region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(24):10049-53. doi: 10.1073/pnas.86.24.10049. PubMed PMID: 2481309; PubMed Central PMCID: PMC298641.
18. Huscher D, Merkesdal S, Thiele K, Zeidler H, Schneider M, Zink A, et al. Cost of illness in rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis and systemic lupus erythematosus in Germany. *Annals of the rheumatic diseases*. 2006;65(9):1175-83. doi: 10.1136/ard.2005.046367. PubMed PMID: 16540552; PubMed Central PMCID: PMC1798296.
19. Scheinecker C, Redlich K, Smolen JS. Cytokines as therapeutic targets: advances and limitations. *Immunity*. 2008;28(4):440-4. doi: 10.1016/j.immuni.2008.03.005. PubMed PMID: 18400186.

20. Beisel WR. Military Strategies for Sustainment of Nutrition and Immune Function in the Field: Overview of the Immune System and Other Host Defense Mechanisms Washington (DC): National Academies Press (US): Institute of Medicine (US) Committee on Military Nutrition Research.; 1999.
21. Opferman JT, Korsmeyer SJ. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nature immunology*. 2003;4(5):410-5. doi: 10.1038/ni0503-410. PubMed PMID: 12719730.
22. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003;423(6937):356-61. doi: 10.1038/nature01661. PubMed PMID: 12748655.
23. Cope AP. T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2008;10 Suppl 1:S1. doi: 10.1186/ar2412. PubMed PMID: 19007421; PubMed Central PMCID: PMC2582813.
24. Seemayer C, Distler O, Kuchen S. Die Rheumatoide Arthritis: Neuentwicklungen in der Pathogenese unter besonderer Berücksichtigung der synovialen Fibroblasten. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 2001;60(5). doi: 10.1007/s003930170030.
25. Schett G, Gravallese E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nature reviews Rheumatology*. 2012;8(11):656-64. doi: 10.1038/nrrheum.2012.153. PubMed PMID: 23007741; PubMed Central PMCID: PMC4096779.
26. Fassbender HG, Zorn K, Meyer-Scholten C. Klinisches Bild der Rheumatoiden Arthritis der Krankheitsursache auf der Spur 2008:[2-5 pp.].
27. FitzGerald O, Soden M, Yanni G, Robinson R, Bresnihan B. Morphometric analysis of blood vessels in synovial membranes obtained from clinically affected

and unaffected knee joints of patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1991;50(11):792-6. doi: 10.1136/ard.50.11.792. PubMed PMID: 1772295; PubMed Central PMCID: PMC1004560.

28. Silverman GJ, Carson DA. Roles of B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2003;5 Suppl 4:S1-6. doi: 10.1186/ar1010. PubMed PMID: 15180890; PubMed Central PMCID: PMC2833442.

29. Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *Journal of immunology*. 2001;167(8):4710-8. doi: 10.4049/jimmunol.167.8.4710. PubMed PMID: 11591802.

30. Goldblatt F, Isenberg DA. New therapies for rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental immunology*. 2005;140(2):195-204. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02744.x. PubMed PMID: 15807842; PubMed Central PMCID: PMCPmc1809355.

31. Edwards JC, Cambridge G. Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. *Rheumatology*. 2001;40(2):205-11. doi: 10.1093/rheumatology/40.2.205. PubMed PMID: 11257159.

32. D'Arena G, Rossi G, Vannata B, Deaglio S, Mansueto G, D'Auria F, et al. Regulatory T-Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia and Autoimmune Diseases. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012;4(1):e2012053. doi: 10.4084/MJHID.2012.053. PubMed PMID: 22973497; PubMed Central PMCID: PMC3435126.

33. Geiler T, Lorenz HM, Kalden JR, Manger B. Pathogenese der rheumatoiden Arthritis *Medizinische Klinik* 1997;92(6):347-53. doi: <https://doi.org/10.1007/BF03044776>.

34. Kampstra ASB, Toes REM. HLA class II and rheumatoid arthritis: the bumpy road of revelation. *Immunogenetics*. 2017;69(8-9):597-603. doi: 10.1007/s00251-017-0987-5. PubMed PMID: 28695293; PubMed Central PMCID: PMC5537318.
35. Panayi GS, Wooley P, Batchelor JR. Genetic basis of rheumatoid disease: HLA antigens, disease manifestations, and toxic reactions to drugs. *British medical journal*. 1978;2(6148):1326-8. doi: 10.1136/bmj.2.6148.1326. PubMed PMID: 719380; PubMed Central PMCID: PMC1608410.
36. Scherak O, Smolen JS, Mayr WR. HLA-DR antigens and disease patterns of rheumatoid arthritis. *Rheumatology international*. 1983;3(3):113-6. doi: 10.1007/bf00541190. PubMed PMID: 6608130.
37. Ronnelid J, Lysholm J, Engstrom-Laurent A, Klareskog L, Heyman B. Local anti-type II collagen antibody production in rheumatoid arthritis synovial fluid. Evidence for an HLA-DR4-restricted IgG response. *Arthritis and rheumatism*. 1994;37(7):1023-9. doi: 10.1002/art.1780370707. PubMed PMID: 8024611.
38. Massardo L, Gareca N, Cartes MA, Cervilla V, Gonzalez A, Jacobelli S. The presence of the HLA-DRB1 shared epitope correlates with erosive disease in Chilean patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2002;41(2):153-6. doi: 10.1093/rheumatology/41.2.153. PubMed PMID: 11886963.
39. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(9):2569-81. doi: 10.1002/art.27584. PubMed PMID: 20872595.
40. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification

of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1988;31(3):315-24. PubMed PMID: 3358796.

41. Schur PH, Moreland LW. General principles of management of rheumatoid arthritis in adults UpToDate: 2014.

42. Eissa M, El Shafey A, Hammad M. Comparison between different disease activity scores in rheumatoid arthritis: an Egyptian multicenter study. *Clinical rheumatology*. 2017;36(10):2217-24. doi: 10.1007/s10067-017-3674-x. PubMed PMID: 28534075.

43. Porter D, Gadsby K, Thompson P, White J, McClinton C, Oliver S. DAS28 and Rheumatoid Arthritis: The Need for Standardization. *Musculoskeletal care*. 2011;9(4):222-7. doi: 10.1002/msc.218. PubMed PMID: 21972039.

44. Farnig E, Friedrich JB. Laboratory diagnosis of rheumatoid arthritis. *The Journal of hand surgery*. 2011;36(5):926-7; quiz 8. doi: 10.1016/j.jhsa.2011.01.036. PubMed PMID: 21458927.

45. Egerer K, Feist E, Burmester G-R. Serologische Diagnostik der rheumatoiden Arthritis Antikörper gegen citrullinierte Antigene. *Deutsches Ärzteblatt* 2009;106(10):153-63. doi: 10.3238/arztebl.2009.0159.

46. Aletaha D, Alasti F, Smolen JS. Rheumatoid factor, not antibodies against citrullinated proteins, is associated with baseline disease activity in rheumatoid arthritis clinical trials. *Arthritis research & therapy*. 2015;17:229. doi: 10.1186/s13075-015-0736-9. PubMed PMID: 26307354; PubMed Central PMCID: PMC4549866.

47. Bukhari M, Lunt M, Harrison BJ, Scott DG, Symmons DP, Silman AJ. Rheumatoid factor is the major predictor of increasing severity of radiographic

erosions in rheumatoid arthritis: results from the Norfolk Arthritis Register Study, a large inception cohort. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(4):906-12. doi: 10.1002/art.10167. PubMed PMID: 11953966.

48. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(2):380-6. doi: 10.1002/art.20018. PubMed PMID: 14872479.

49. Manger B, Schulze-Koops H. *Checkliste Rheumatologie*. Georg Thieme Verlag 2012. 576 p.

50. Gadeholt O, Wech T, Schuh S, Scharbatke E, Ostermeier E, Tony HP, et al. Anti-CCP status determines the power Doppler oscillation pattern in rheumatoid arthritis: a prospective study. *Rheumatology international*. 2016;36(12):1671-5. doi: 10.1007/s00296-016-3548-6. PubMed PMID: 27507259.

51. McQueen FM, Stewart N, Crabbe J, Robinson E, Yeoman S, Tan PL, et al. Magnetic resonance imaging of the wrist in early rheumatoid arthritis reveals a high prevalence of erosions at four months after symptom onset. *Annals of the rheumatic diseases*. 1998;57(6):350-6. doi: 10.1136/ard.57.6.350. PubMed PMID: 9771209; PubMed Central PMCID: PMC1752612.

52. Fex E, Jonsson K, Johnson U, Eberhardt K. Development of radiographic damage during the first 5-6 yr of rheumatoid arthritis. A prospective follow-up study of a Swedish cohort. *British journal of rheumatology*. 1996;35(11):1106-15. doi: 10.1093/rheumatology/35.11.1106. PubMed PMID: 8948297.

53. van der Heijde DM, van Leeuwen MA, van Riel PL, Koster AM, van 't Hof MA, van Rijswijk MH, et al. Biannual radiographic assessments of hands and feet in a

three-year prospective followup of patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1992;35(1):26-34. doi: 10.1002/art.1780350105. PubMed PMID: 1731813.

54. Boini S, Guillemin F. Radiographic scoring methods as outcome measures in rheumatoid arthritis: properties and advantages. *Annals of the rheumatic diseases*. 2001;60(9):817-27. PubMed PMID: 11502606; PubMed Central PMCID: PMC1753828.

55. Goldberg J, Pinals RS. Felty syndrome. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 1980;10(1):52-65. PubMed PMID: 7414334.

56. Lard LR, Visser H, Speyer I, vander Horst-Bruinsma IE, Zwinderman AH, Breedveld FC, et al. Early versus delayed treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis: comparison of two cohorts who received different treatment strategies. *The American journal of medicine*. 2001;111(6):446-51. doi: 10.1016/s0002-9343(01)00872-5. PubMed PMID: 11690569.

57. Singh JA, Saag KG, Bridges SL, Jr., Akl EA, Bannuru RR, Sullivan MC, et al. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & rheumatology*. 2016;68(1):1-26. doi: 10.1002/art.39480. PubMed PMID: 26545940.

58. Feagan BG, Lam G, Ma C, Lichtenstein GR. Systematic review: efficacy and safety of switching patients between reference and biosimilar infliximab. *Aliment Pharmacol Ther*. 2019;49(1):31-40. doi: 10.1111/apt.14997. PubMed PMID: 30411382.

59. Genovese MC, Cohen S, Moreland L, Lium D, Robbins S, Newmark R, et al. Combination therapy with etanercept and anakinra in the treatment of patients with rheumatoid arthritis who have been treated unsuccessfully with

methotrexate. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(5):1412-9. doi: 10.1002/art.20221. PubMed PMID: 15146410.

60. Felson DT, Smolen JS, Wells G, Zhang B, van Tuyl LH, Funovits J, et al. American College of Rheumatology/European League against Rheumatism provisional definition of remission in rheumatoid arthritis for clinical trials. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(3):404-13. doi: 10.1136/ard.2011.149765. PubMed PMID: 21292833.

61. Avci AB, Feist E, Burmester GR. Biologicals in rheumatoid arthritis: current and future. *RMD Open*. 2015;1(1):e000127. doi: 10.1136/rmdopen-2015-000127. PubMed PMID: 26535144; PubMed Central PMCID: PMC4613149.

62. Navarro-Millan I, Sattui SE, Curtis JR. Systematic review of tumor necrosis factor inhibitor discontinuation studies in rheumatoid arthritis. *Clinical therapeutics*. 2013;35(11):1850-61 e1. doi: 10.1016/j.clinthera.2013.09.015. PubMed PMID: 24156821; PubMed Central PMCID: PMC3917677.

63. Schwaneck EC, Krone M, Kreissl-Kemmer S, Weissbrich B, Weiss J, Tony HP, et al. Management of anti-HBc-positive patients with rheumatic diseases treated with disease-modifying antirheumatic drugs-a single-center analysis of 2054 patients. *Clinical rheumatology*. 2018;37(11):2963-70. doi: 10.1007/s10067-018-4295-8. PubMed PMID: 30238380.

64. Albrecht K, Muller-Ladner U. Side effects and management of side effects of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2010;28(5 Suppl 61):S95-101. PubMed PMID: 21044440.

65. Strangfeld A, Zink A. [Safety of biologic therapy - results from the German biologics register RABBIT]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2014;139(37):1817-20. doi: 10.1055/s-0034-1370252. PubMed PMID: 25180996.

66. Mota L, Cruz B, Brenol C, Feldman Pollak D, da Rocha Castelar Pinheiro G, Laurindo I, et al. Safe use of biological therapies for the treatment of rheumatoid arthritis and spondyloarthritides. *Bras Reumatol Elsevier Editora Ltda* 2015;55((3)):281-309. Epub 27.11.2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbre.2014.06.006>.
67. Cohn HM, Dave M, Loftus EV, Jr. Understanding the Cautions and Contraindications of Immunomodulator and Biologic Therapies for Use in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2017;23(8):1301-15. doi: 10.1097/MIB.0000000000001199. PubMed PMID: 28708806; PubMed Central PMCID: PMC5731468.
68. Mercer LK, Galloway JB, Lunt M, Davies R, Low AL, Dixon WG, et al. Risk of lymphoma in patients exposed to antitumour necrosis factor therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register for Rheumatoid Arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2017;76(3):497-503. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-209389. PubMed PMID: 27502891; PubMed Central PMCID: PMC5446004.
69. Geborek P, Bladstrom A, Turesson C, Gulfe A, Petersson IF, Saxne T, et al. Tumour necrosis factor blockers do not increase overall tumour risk in patients with rheumatoid arthritis, but may be associated with an increased risk of lymphomas. *Annals of the rheumatic diseases*. 2005;64(5):699-703. doi: 10.1136/ard.2004.030528. PubMed PMID: 15695534; PubMed Central PMCID: PMC1755491.
70. Wolfe F, Michaud K. Lymphoma in rheumatoid arthritis: the effect of methotrexate and anti-tumor necrosis factor therapy in 18,572 patients. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(6):1740-51. doi: 10.1002/art.20311. PubMed PMID: 15188349.

71. Wolfe F, Michaud K. Biologic treatment of rheumatoid arthritis and the risk of malignancy: analyses from a large US observational study. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56(9):2886-95. doi: 10.1002/art.22864. PubMed PMID: 17729297.
72. Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *Jama*. 2006;295(19):2275-85. doi: 10.1001/jama.295.19.2275. PubMed PMID: 16705109.
73. Strangfeld A, Hierse F, Rau R, Burmester GR, Krummel-Lorenz B, Demary W, et al. Risk of incident or recurrent malignancies among patients with rheumatoid arthritis exposed to biologic therapy in the German biologics register RABBIT. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(1):R5. doi: 10.1186/ar2904. PubMed PMID: 20064207; PubMed Central PMCID: PMC2875631.
74. Kung M, Stork S, Angermann CE. [Cardiovascular comorbidity in rheumatic disease. Does sex play a role?]. *Herz*. 2005;30(6):512-21. Epub 2005/09/20. doi: 10.1007/s00059-005-2717-2. PubMed PMID: 16170682.
75. Listing J, Kekow J, Manger B, Burmester GR, Pattloch D, Zink A, et al. Mortality in rheumatoid arthritis: the impact of disease activity, treatment with glucocorticoids, TNFalpha inhibitors and rituximab. *Annals of the rheumatic diseases*. 2015;74(2):415-21. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204021. PubMed PMID: 24291654; PubMed Central PMCID: PMC4316844.
76. Metsios GS, Stavropoulos-Kalinoglou A, Treharne GJ, Nevill AM, Sandoo A, Panoulas VF, et al. Disease activity and low physical activity associate with number of hospital admissions and length of hospitalisation in patients with rheumatoid

arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2011;13(3):R108. doi: 10.1186/ar3390. PubMed PMID: 21714856; PubMed Central PMCID: PMC3218923.

77. Lamy J, Loughran TP. Clinical manifestations, pathologic features, and diagnosis of T cell large granular lymphocyte leukemia UpToDate. 2014:21.

78. Sokol L, Loughran TP, Jr. Large granular lymphocyte leukemia. *Oncologist*. 2006;11(3):263-73. doi: 10.1634/theoncologist.11-3-263. PubMed PMID: 16549811.

79. Loughran TP, Jr. Clonal diseases of large granular lymphocytes. *Blood*. 1993;82(1):1-14. PubMed PMID: 8324214.

80. Bateau B, Rey J, Hamidou M, Donadieu J, Morcet J, Reman O, et al. Analysis of a French cohort of patients with large granular lymphocyte leukemia: a report on 229 cases. *Haematologica*. 2010;95(9):1534-41. doi: 10.3324/haematol.2009.018481. PubMed PMID: 20378561; PubMed Central PMCID: PMC2930955.

81. Shah MV, Hook CC, Call TG, Go RS. A population-based study of large granular lymphocyte leukemia. *Blood cancer journal*. 2016;6(8):e455. doi: 10.1038/bcj.2016.59. PubMed PMID: 27494824; PubMed Central PMCID: PMC5022177.

82. Kawa-Ha K, Ishihara S, Ninomiya T, Yumura-Yagi K, Hara J, Murayama F, et al. CD3-negative lymphoproliferative disease of granular lymphocytes containing Epstein-Barr viral DNA. *The Journal of clinical investigation*. 1989;84(1):51-5. doi: 10.1172/JCI114168. PubMed PMID: 2544630; PubMed Central PMCID: PMC303951.

83. Shah A, Diehl LF, St Clair EW. T cell large granular lymphocyte leukemia associated with rheumatoid arthritis and neutropenia. *Clin Immunol.* 2009;132(2):145-52. Epub 2009/04/28. doi: 10.1016/j.clim.2009.03.515. PubMed PMID: 19394280.
84. Smith PR, Cavenagh JD, Milne T, Howe D, Wilkes SJ, Sinnott P, et al. Benign monoclonal expansion of CD8+ lymphocytes in HIV infection. *Journal of clinical pathology.* 2000;53(3):177-81. doi: 10.1136/jcp.53.3.177. PubMed PMID: 10823134; PubMed Central PMCID: PMC1731162.
85. Sabnani I, Zucker MJ, Tsang P, Palekar S. Clonal T-large granular lymphocyte proliferation in solid organ transplant recipients. *Transplantation proceedings.* 2006;38(10):3437-40. doi: 10.1016/j.transproceed.2006.10.045. PubMed PMID: 17175296.
86. Wolniak KL, Goolsby CL, Chen YH, Chenn A, Singhal S, JayeshMehta, et al. Expansion of a clonal CD8+CD57+ large granular lymphocyte population after autologous stem cell transplant in multiple myeloma. *American journal of clinical pathology.* 2013;139(2):231-41. doi: 10.1309/AJCP1T0JPBLSLAQF. PubMed PMID: 23355208.
87. Rose MG, Berliner N. T-cell large granular lymphocyte leukemia and related disorders. *Oncologist.* 2004;9(3):247-58. Epub 2004/06/01. PubMed PMID: 15169980.
88. Zhang R, Shah MV, Loughran TP, Jr. The root of many evils: indolent large granular lymphocyte leukaemia and associated disorders. *Hematological oncology.* 2010;28(3):105-17. doi: 10.1002/hon.917. PubMed PMID: 19645074; PubMed Central PMCID: PMC4377226.

89. Dhodapkar MV, Li CY, Lust JA, Tefferi A, Phyliky RL. Clinical spectrum of clonal proliferations of T-large granular lymphocytes: a T-cell clonopathy of undetermined significance? *Blood*. 1994;84(5):1620-7. PubMed PMID: 8068951.
90. Viny AD, Maciejewski JP. High rate of both hematopoietic and solid tumors associated with large granular lymphocyte leukemia Informa healthcare *Leukemia & Lymphoma*. 2015;56(2):503-4. doi: 10.3109/10428194.2014.927459.
91. Hajto T, Lanzrein C. Frequency of large granular lymphocytes in peripheral blood of healthy persons and breast cancer patients. *Cancer Immunology Immunotherapy Springer Verlag*. 1983;16:65-6.
92. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annual review of immunology*. 2003;21:139-76. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141107. PubMed PMID: 12414722.
93. Lamy T, Moignet A, Loughran TP, Jr. LGL leukemia: from pathogenesis to treatment. *Blood*. 2017;129(9):1082-94. doi: 10.1182/blood-2016-08-692590. PubMed PMID: 28115367.
94. Lamy T, Liu JH, Landowski TH, Dalton WS, Loughran TP, Jr. Dysregulation of CD95/CD95 ligand-apoptotic pathway in CD3(+) large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 1998;92(12):4771-7. PubMed PMID: 9845544.
95. Steinway SN, LeBlanc F, Loughran TP, Jr. The pathogenesis and treatment of large granular lymphocyte leukemia. *Blood Rev*. 2014;28(3):87-94. Epub 2014/04/01. doi: 10.1016/j.blre.2014.02.001. PubMed PMID: 24679833; PubMed Central PMCID: PMC4155502.
96. Koskela HL, Eldfors S, Ellonen P, van Adrichem AJ, Kuusanmaki H, Andersson EI, et al. Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic

leukemia. *The New England journal of medicine*. 2012;366(20):1905-13. doi: 10.1056/NEJMoa1114885. PubMed PMID: 22591296; PubMed Central PMCID: PMC3693860.

97. Loughran TP, Jr., Zickl L, Olson TL, Wang V, Zhang D, Rajala HL, et al. Immunosuppressive therapy of LGL leukemia: prospective multicenter phase II study by the Eastern Cooperative Oncology Group (E5998). *Leukemia*. 2015;29(4):886-94. doi: 10.1038/leu.2014.298. PubMed PMID: 25306898; PubMed Central PMCID: PMC4377298.

98. Mishra A, Sullivan L, Caligiuri MA. Molecular pathways: interleukin-15 signaling in health and in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(8):2044-50. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3603. PubMed PMID: 24737791; PubMed Central PMCID: PMC3989546.

99. Yang J, Liu X, Nyland SB, Zhang R, Ryland LK, Broeg K, et al. Platelet-derived growth factor mediates survival of leukemic large granular lymphocytes via an autocrine regulatory pathway. *Blood*. 2010;115(1):51-60. doi: 10.1182/blood-2009-06-223719. PubMed PMID: 19880494; PubMed Central PMCID: PMC2803691.

100. Capsoni F, Sarzi-Puttini P, Zanella A. Primary and secondary autoimmune neutropenia. *Arthritis research & therapy*. 2005;7(5):208-14. doi: 10.1186/ar1803. PubMed PMID: 16207350; PubMed Central PMCID: PMC1257445.

101. Papadaki HA, Eliopoulos AG, Kosteas T, Gemetzi C, Damianaki A, Koutala H, et al. Impaired granulocytopoiesis in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with increased apoptosis of bone marrow myeloid progenitor cells.

Blood. 2003;101(7):2591-600. doi: 10.1182/blood-2002-09-2898. PubMed PMID: 12517813.

102. Loughran TP, Jr., Starkebaum G, Kidd P, Neiman P. Clonal proliferation of large granular lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1988;31(1):31-6. PubMed PMID: 3345230.

103. Mohan SR, Maciejewski JP. Diagnosis and therapy of neutropenia in large granular lymphocyte leukemia. *Current opinion in hematology*. 2009;16(1):27-34. doi: 10.1097/MOH.0b013e32831c8407. PubMed PMID: 19057202.

104. Liu JH, Wei S, Lamy T, Epling-Burnette PK, Starkebaum G, Djeu JY, et al. Chronic neutropenia mediated by fas ligand. *Blood*. 2000;95(10):3219-22. PubMed PMID: 10807792.

105. Lamy T, Loughran TP. Large Granular Lymphocyte Leukemia. *Cancer Control*. 1998:25-33. doi: 10.1177/107327489800500103.

106. Moosig F, Schoch R, Kneba M. [T-large granular lymphocyte leukaemia. An important differential diagnosis to Felty's syndrome]. *Z Rheumatol*. 2006;65(5):447-51. doi: 10.1007/s00393-005-0013-4. PubMed PMID: 16450150.

107. Lamy T, Loughran TP, Jr. How I treat LGL leukemia. *Blood*. 2011;117(10):2764-74. doi: 10.1182/blood-2010-07-296962. PubMed PMID: 21190991; PubMed Central PMCID: PMC3062292.

108. Bourgault-Rouxel AS, Loughran TP, Jr., Zambello R, Epling-Burnette PK, Semenzato G, Donadieu J, et al. Clinical spectrum of gammadelta+ T cell LGL leukemia: analysis of 20 cases. *Leuk Res*. 2008;32(1):45-8. doi: 10.1016/j.leukres.2007.04.011. PubMed PMID: 17544120.

109. Fruehauf S, Toplay J, Wilmes A, Ho AD. Durchflusszytometrische Diagnostik maligner hämatologischer Erkrankungen Sonderdruck aus: Zeller - zur Hausen Onkologie ecomed verlagsgesellschaft AG & Co. KG BD Biosciences 2001.
110. Semenzato G, Zambello R, Starkebaum G, Oshimi K, Loughran TP. The Lymphoproliferative Disease of Granular Lymphocytes: Updated Criteria for Diagnosis. *Blood*. 1997;89(1):256-60. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V89.1.256>.
111. Ohgami RS, Ohgami JK, Pereira IT, Gitana G, Zehnder JL, Arber DA. Refining the diagnosis of T-cell large granular lymphocytic leukemia by combining distinct patterns of antigen expression with T-cell clonality studies. *Leukemia*. 2011;25(9):1439-43. doi: 10.1038/leu.2011.107. PubMed PMID: 21617700.
112. Sandberg Y, Almeida J, Gonzalez M, Lima M, Barcena P, Szczepanski T, et al. TCRgammadelta+ large granular lymphocyte leukemias reflect the spectrum of normal antigen-selected TCRgammadelta+ T-cells. *Leukemia*. 2006;20(3):505-13. doi: 10.1038/sj.leu.2404112. PubMed PMID: 16437145.
113. Scharbatke EC, Junker L, Gadeholt O, Tony H-P, Schmalzing M. Felty-Syndrom und T-LGL-Leukämie bei Rheumatoider Arthritis. Wann muss man daran denken? *Aktuelle Rheumatologie*. 2016;41(02):5. doi: 10.1055/s-0035-1569281.
114. Saway PA, Prasthofer EF, Barton JC. Prevalence of granular lymphocyte proliferation in patients with rheumatoid arthritis and neutropenia. *The American journal of medicine*. 1989;86(3):303-7. doi: 10.1016/0002-9343(89)90300-8. PubMed PMID: 2919611.
115. Sienknecht CW, Urowitz MB, Pruzanski W, Stein HB. Felty's syndrome. Clinical and serological analysis of 34 cases. *Annals of the rheumatic diseases*.

1977;36(6):500-7. doi: 10.1136/ard.36.6.500. PubMed PMID: 596944; PubMed Central PMCID: PMC1000154.

116. Starkebaum G, Loughran TP, Jr., Gaur LK, Davis P, Nepom BS. Immunogenetic similarities between patients with Felty's syndrome and those with clonal expansions of large granular lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1997;40(4):624-6. doi: 10.1002/art.1780400406. PubMed PMID: 9125243.

117. Savola P, Bruck O, Olson T, Kelkka T, Kauppi MJ, Kovanen PE, et al. Somatic STAT3 mutations in the Felty syndrome: an implication for a common pathogenesis with large granular lymphocyte leukemia. *Haematologica*. 2017. doi: 10.3324/haematol.2017.175729. PubMed PMID: 29217783.

118. Rajala HL, Olson T, Clemente MJ, Lagstrom S, Ellonen P, Lundan T, et al. The analysis of clonal diversity and therapy responses using STAT3 mutations as a molecular marker in large granular lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2015;100(1):91-9. doi: 10.3324/haematol.2014.113142. PubMed PMID: 25281507; PubMed Central PMCID: PMC4281318.

119. Freimark B, Lanier L, Phillips J, Quertermous T, Fox R. Comparison of T cell receptor gene rearrangements in patients with large granular T cell leukemia and Felty's syndrome. *Journal of immunology*. 1987;138(6):1724-9. PubMed PMID: 3102595.

120. Liu X, Loughran TP, Jr. The spectrum of large granular lymphocyte leukemia and Felty's syndrome. *Current opinion in hematology*. 2011;18(4):254-9. Epub 2011/05/07. doi: 10.1097/MOH.0b013e32834760fb. PubMed PMID: 21546829; PubMed Central PMCID: PMCPmc4377227.

121. Neben MA, Morice WG, Tefferi A. Clinical features in T-cell vs. natural killer-cell variants of large granular lymphocyte leukemia. *European journal of haematology*. 2003;71(4):263-5. doi: 10.1034/j.1600-0609.2003.00136.x. PubMed PMID: 12950235.
122. Loughran TP, Jr., Starkebaum G. Large granular lymphocyte leukemia. Report of 38 cases and review of the literature. *Medicine*. 1987;66(5):397-405. PubMed PMID: 3626848.
123. Moignet A, Hasanali Z, Zambello R, Pavan L, Bareau B, Tournilhac O, et al. Cyclophosphamide as a first-line therapy in LGL leukemia. *Leukemia*. 2014;28(5):1134-6. doi: 10.1038/leu.2013.359. PubMed PMID: 24280867; PubMed Central PMCID: PMC4017255.
124. Cornec D, Devauchelle-Pensec V, Jousse-Joulin S, Marhadour T, Ugo V, Berthou C, et al. Long-term remission of T-cell large granular lymphocyte leukemia associated with rheumatoid arthritis after rituximab therapy. *Blood*. 2013;122(9):1583-6. Epub 2013/07/23. doi: 10.1182/blood-2013-03-491464. PubMed PMID: 23869084.
125. Dumitriu B, Ito S, Feng X, Stephens N, Yunce M, Kajigaya S, et al. Alemtuzumab in T-cell large granular lymphocytic leukaemia: interim results from a single-arm, open-label, phase 2 study. *The Lancet Haematology*. 2016;3(1):e22-9. doi: 10.1016/S2352-3026(15)00227-6. PubMed PMID: 26765645; PubMed Central PMCID: PMC4721315.
126. Sternberg A, Eagleton H, Pillai N, Leyden K, Turner S, Pearson D, et al. Neutropenia and anaemia associated with T-cell large granular lymphocyte leukaemia responds to fludarabine with minimal toxicity. *British journal of haematology*. 2003;120(4):699-701. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04148.x. PubMed PMID: 12588360.

127. Weide R, Heymanns J, Koppler H, Tiemann M, Huss B, Pfluger KH, et al. Successful treatment of neutropenia in T-LGL leukemia (T gamma-lymphocytosis) with granulocyte colony-stimulating factor. *Annals of hematology*. 1994;69(3):117-9. doi: 10.1007/bf01695691. PubMed PMID: 7522057.
128. Subbiah V, Viny AD, Rosenblatt S, Pohlman B, Lichtin A, Maciejewski JP. Outcomes of splenectomy in T-cell large granular lymphocyte leukemia with splenomegaly and cytopenia. *Experimental hematology*. 2008;36(9):1078-83. doi: 10.1016/j.exphem.2008.04.005. PubMed PMID: 18550263; PubMed Central PMCID: PMC3537502.
129. Osuji N, Matutes E, Tjonnfjord G, Grech H, Del Giudice I, Wotherspoon A, et al. T-cell large granular lymphocyte leukemia: A report on the treatment of 29 patients and a review of the literature. *Cancer*. 2006;107(3):570-8. doi: 10.1002/cncr.22032. PubMed PMID: 16795070.
130. Battiwalla M, Melenhorst J, Saunthararajah Y, Nakamura R, Mouldrem J, Young NS, et al. HLA-DR4 predicts haematological response to cyclosporine in T-large granular lymphocyte lymphoproliferative disorders. *British journal of haematology*. 2003;123(3):449-53. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04613.x. PubMed PMID: 14617004.
131. Nowakowski GS, Morice WG, Zent CS, Schwager SM, Li C, Markovic SN, et al. Initial Presentation and Prognostic Factors in 286 Patients with T-Cell Large Granular Lymphocyte Leukemia. *Blood*. 2006;108 (11): 300. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V108.11.300.300>.
132. Fachinformationsverzeichnis Deutschland. <http://www.fachinfo.de> [web page]. [updated Mai 2020]. Available from: <https://http://www.fachinfo.de>.

133. Haferlach T, Haferlach C, Kern W, Schnittger S, Bache U. Labordiagnostik in der Hämatologie - Vom Symptom zur Diagnose Deutscher Ärzteverlag 2011.
134. van Dongen J, Langerak A, Brüggemann M, Evan P, Hummel M, Lavender F, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003.
135. Peake I. The polymerase chain reaction. *Journal of clinical pathology*. 1989;42(7):673-6. doi: 10.1136/jcp.42.7.673. PubMed PMID: 2668341; PubMed Central PMCID: PMC1142012.
136. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*. 2012(63):e3998. doi: 10.3791/3998. PubMed PMID: 22664923; PubMed Central PMCID: PMC4846334.
137. Dougados M, Soubrier M, Antunez A, Balint P, Balsa A, Buch MH, et al. Prevalence of comorbidities in rheumatoid arthritis and evaluation of their monitoring: results of an international, cross-sectional study (COMORA). *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;73(1):62-8. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204223. PubMed PMID: 24095940; PubMed Central PMCID: PMC3888623.
138. Askling J, Fored CM, Brandt L, Baecklund E, Bertilsson L, Feltelius N, et al. Risks of solid cancers in patients with rheumatoid arthritis and after treatment with tumour necrosis factor antagonists. *Annals of the rheumatic diseases*. 2005;64(10):1421-6. doi: 10.1136/ard.2004.033993. PubMed PMID: 15829572; PubMed Central PMCID: PMC1755244.
139. Setoguchi S, Solomon DH, Weinblatt ME, Katz JN, Avorn J, Glynn RJ, et al. Tumor necrosis factor alpha antagonist use and cancer in patients with

rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(9):2757-64. doi: 10.1002/art.22056. PubMed PMID: 16947774.

140. Hellgren K, Baecklund E, Backlin C, Sundstrom C, Smedby KE, Askling J. Rheumatoid Arthritis and Risk of Malignant Lymphoma: Is the Risk Still Increased? *Arthritis & rheumatology*. 2017;69(4):700-8. doi: 10.1002/art.40017. PubMed PMID: 27992692.

141. Mercer LK, Regierer AC, Mariette X, Dixon WG, Baecklund E, Hellgren K, et al. Spectrum of lymphomas across different drug treatment groups in rheumatoid arthritis: a European registries collaborative project. *Annals of the rheumatic diseases*. 2017;76(12):2025-30. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-211623. PubMed PMID: 28822981; PubMed Central PMCID: PMC5705847.

142. Klein A, Polliack A, Gafter-Gvili A. Rheumatoid arthritis and lymphoma: Incidence, pathogenesis, biology, and outcome. *Hematological oncology*. 2018;36(5):733-9. doi: 10.1002/hon.2525. PubMed PMID: 29862535.

143. Baecklund E, Ekblom A, Sparen P, Feltelius N, Klareskog L. Disease activity and risk of lymphoma in patients with rheumatoid arthritis: nested case-control study. *Bmj*. 1998;317(7152):180-1. doi: 10.1136/bmj.317.7152.180. PubMed PMID: 9665898; PubMed Central PMCID: PMC28610.

144. Raval G, Mehta P. TNF-alpha inhibitors: are they carcinogenic? *Drug Healthc Patient Saf*. 2010;2:241-7. doi: 10.2147/DHPS.S7829. PubMed PMID: 21701636; PubMed Central PMCID: PMC3108710.

145. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1975;72(9):3666-

70. doi: 10.1073/pnas.72.9.3666. PubMed PMID: 1103152; PubMed Central PMCID: PMC433057.
146. Gerriets V, Khaddour K. Tumor Necrosis Factor (TNF) Inhibitors. StatPearls. Treasure Island (FL)2019.
147. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. Nature reviews Cancer. 2009;9(5):361-71. doi: 10.1038/nrc2628. PubMed PMID: 19343034.
148. Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. The Journal of experimental medicine. 1999;190(10):1375-82. doi: 10.1084/jem.190.10.1375. PubMed PMID: 10562313; PubMed Central PMCID: PMC2195698.
149. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. Nature. 2002;420(6917):860-7. doi: 10.1038/nature01322. PubMed PMID: 12490959; PubMed Central PMCID: PMC2803035.
150. Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. TNF: a master switch for inflammation to cancer. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library. 2008;13:5094-107. doi: 10.2741/3066. PubMed PMID: 18508572.
151. Zink A, Askling J, Dixon WG, Klareskog L, Silman AJ, Symmons DP. European biologicals registers: methodology, selected results and perspectives. Annals of the rheumatic diseases. 2009;68(8):1240-6. doi: 10.1136/ard.2008.091926. PubMed PMID: 18647854.
152. Smith A, Crouch S, Lax S, Li J, Painter D, Howell D, et al. Lymphoma incidence, survival and prevalence 2004-2014: sub-type analyses from the UK's Haematological Malignancy Research Network. British journal of cancer.

2015;112(9):1575-84. doi: 10.1038/bjc.2015.94. PubMed PMID: 25867256;
PubMed Central PMCID: PMC4453686.

153. NICE. Adalimumab, etanercept, infliximab, certolizumab pegol, golimumab, tocilizumab and abatacept for rheumatoid arthritis not previously treated with DMARDs or after conventional DMARDs only have failed <https://www.nice.org.uk/guidance/ta375/chapter/1-Recommendations> 26 January 2016, zuletzt aufgerufen am 10.10.2019.

154. Selmi C, Ceribelli A, Generali E, Scire CA, Alborghetti F, Colloredo G, et al. Serum antinuclear and extractable nuclear antigen antibody prevalence and associated morbidity and mortality in the general population over 15 years. *Autoimmunity reviews*. 2016;15(2):162-6. doi: 10.1016/j.autrev.2015.10.007. PubMed PMID: 26524640.

155. Boyadzhieva V, Stoilov N, Ivanova M, Petrova G, Stoilov R. Real World Experience of Disease Activity in Patients With Rheumatoid Arthritis and Response to Treatment With Various Biologic DMARDs. *Frontiers in pharmacology*. 2018;9:1303. doi: 10.3389/fphar.2018.01303. PubMed PMID: 30524277; PubMed Central PMCID: PMC6256982.

156. Mariette X, Tubach F, Bagheri H, Bardet M, Berthelot JM, Gaudin P, et al. Lymphoma in patients treated with anti-TNF: results of the 3-year prospective French RATIO registry. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(2):400-8. doi: 10.1136/ard.2009.117762. PubMed PMID: 19828563; PubMed Central PMCID: PMC2925048.

157. Rajala HL, Eldfors S, Kuusanmaki H, van Adrichem AJ, Olson T, Lagstrom S, et al. Discovery of somatic STAT5b mutations in large granular lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(22):4541-50. doi: 10.1182/blood-2012-12-474577. PubMed PMID: 23596048; PubMed Central PMCID: PMC3668487.

158. Teramo A, Gattazzo C, Passeri F, Lico A, Tasca G, Cabrelle A, et al. Intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to maintain the JAK/STAT pathway aberrantly activated in T-type large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 2013;121(19):3843-54, S1. doi: 10.1182/blood-2012-07-441378. PubMed PMID: 23515927.
159. Zhang R, Shah MV, Yang J, Nyland SB, Liu X, Yun JK, et al. Network model of survival signaling in large granular lymphocyte leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(42):16308-13. doi: 10.1073/pnas.0806447105. PubMed PMID: 18852469; PubMed Central PMCID: PMC2571012.
160. Kelsen J, Dige A, Schwindt H, D'Amore F, Pedersen FS, Agnholt J, et al. Infliximab induces clonal expansion of gammadelta-T cells in Crohn's disease: a predictor of lymphoma risk? *PLoS One*. 2011;6(3):e17890. doi: 10.1371/journal.pone.0017890. PubMed PMID: 21483853; PubMed Central PMCID: PMC3069033.
161. Kelsen J, Dige A, Christensen M, D'Amore F, Iversen L. Frequency and clonality of peripheral gammadelta T cells in psoriasis patients receiving anti-tumour necrosis factor-alpha therapy. *Clinical and experimental immunology*. 2014;177(1):142-8. doi: 10.1111/cei.12331. PubMed PMID: 24635218; PubMed Central PMCID: PMC4089163.
162. Belhadj K, Reyes F, Farcet JP, Tilly H, Bastard C, Angonin R, et al. Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma is a rare clinicopathologic entity with poor outcome: report on a series of 21 patients. *Blood*. 2003;102(13):4261-9. doi: 10.1182/blood-2003-05-1675. PubMed PMID: 12907441.
163. Ashmore P, Patel M, Vaughan J, Wiggill T, Willem P, van den Berg E, et al. Hepatosplenic T-cell lymphoma: A case series. *Hematology/oncology and stem cell*

therapy. 2015;8(2):78-84. doi: 10.1016/j.hemonc.2014.09.006. PubMed PMID: 25450840.

164. Singleton TP, Yin B, Teferra A, Mao JZ. Spectrum of Clonal Large Granular Lymphocytes (LGLs) of alphabeta T Cells: T-Cell Clones of Undetermined Significance, T-Cell LGL Leukemias, and T-Cell Immunoclonal. American journal of clinical pathology. 2015;144(1):137-44. doi: 10.1309/AJCPJ57YTEGLIUOI. PubMed PMID: 26071471.

165. Bigouret V, Hoffmann T, Arlettaz L, Villard J, Colonna M, Ticheli A, et al. Monoclonal T-cell expansions in asymptomatic individuals and in patients with large granular leukemia consist of cytotoxic effector T cells expressing the activating CD94:NKG2C/E and NKD2D killer cell receptors. Blood. 2003;101(8):3198-204. doi: 10.1182/blood-2002-08-2408. PubMed PMID: 12480700.

166. Fitzgerald JE, Ricalton NS, Meyer AC, West SG, Kaplan H, Behrendt C, et al. Analysis of clonal CD8+ T cell expansions in normal individuals and patients with rheumatoid arthritis. Journal of immunology. 1995;154(7):3538-47. PubMed PMID: 7897233.

167. Burger R. Impact of interleukin-6 in hematological malignancies. Transfus Med Hemother. 2013;40(5):336-43. doi: 10.1159/000354194. PubMed PMID: 24273487; PubMed Central PMCID: PMC3822278.

168. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. Clinical science. 2012;122(4):143-59. doi: 10.1042/CS20110340. PubMed PMID: 22029668.

169. Hyrich KL, Deighton C, Watson KD, Consortium BCC, Symmons DP, Lunt M, et al. Benefit of anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis patients with moderate

disease activity. *Rheumatology*. 2009;48(10):1323-7. doi: 10.1093/rheumatology/kep242. PubMed PMID: 19706737; PubMed Central PMCID: PMC2744336.

170. Schwaneck EC, Renner R, Junker L, Einsele H, Gadeholt O, Geissinger E, et al. Prevalence and Characteristics of Persistent Clonal T Cell Large Granular Lymphocyte Expansions in Rheumatoid Arthritis: A Comprehensive Analysis of 529 Patients. *Arthritis & rheumatology*. 2018;70(12):1914-22. doi: 10.1002/art.40654. PubMed PMID: 29938921.

171. Schwaneck EC, Renner R, Junker L, Tony HP, Kleinert S, Gernert M, et al. T cells, natural killer cells, and gammadeltaT cells in a large patient cohort with rheumatoid arthritis: influence of age and anti-rheumatic therapy. *Scandinavian journal of rheumatology*. 2020;49(1):8-12. doi: 10.1080/03009742.2019.1634755. PubMed PMID: 31556339.

12. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: T-Large-Granular-Lymphozyt im peripheren Blut (Bildmitte), Abbildung aus (113) mit Lizenzierung des Georg Thieme Verlags | 25 |
| Abbildung 2: Exemplarische Darstellung der Dotplots der ersten Durchflusszytometrie | 49 |
| Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der Dotplots des ersten Röhrchens der zweiten Durchflusszytometrie | 50 |
| Abbildung 4: Exemplarische Darstellung der Dotplots des zweiten Röhrchens der zweiten Durchflusszytometrie | 52 |
| Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Dotplots des dritten Röhrchens der zweiten Durchflusszytometrie | 53 |
| Abbildung 6: Exemplarische Darstellung einer polyklonalen Fragmentlängenanalyse | 60 |
| Abbildung 7: Exemplarische Darstellung einer monoklonalen Fragmentlängenanalyse mit leicht polyklonalem Hintergrund | 60 |
| Abbildung 8: Analyseschritte der Untersuchung | 95 |

13. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: ACR/EULAR-Klassifikationskriterien der RA von 2010 | 7 |
| Tabelle 2: RA-Medikamente und Dosierungen (132) | 38 |
| Tabelle 3: Antikörper und Farbstoffe | 40 |
| Tabelle 4: Reagenzien | 41 |
| Tabelle 5: Materialien und Geräte | 42 |
| Tabelle 6: Primer | 55 |
| Tabelle 7: Geräte | 56 |
| Tabelle 8: Ablauf der DNA-Vervielfältigung nach dem BIOMED Protokoll | 59 |
| Tabelle 9: Allgemeine Charakteristika aller Studienteilnehmer | 64 |
| Tabelle 10: Laborparameter aller Studienteilnehmer | 65 |
| Tabelle 11: Lymphozytensubpopulationen im Lymphozytengate aller Studienteilnehmer | 67 |
| Tabelle 12: Medikamentöse Therapie aller Studienteilnehmer | 69 |
| Tabelle 13: Medikation bei Studieneinschluss aller Studienteilnehmer | 70 |
| Tabelle 14: Komorbiditäten aller Studienteilnehmer | 71 |
| Tabelle 15: Allgemeine Charakteristika der Patienten ohne klonale T-LGL- Zellexpansion | 72 |
| Tabelle 16: Laborparameter der Patienten ohne klonale T-LGL-Zellexpansion | 73 |
| Tabelle 17: Lymphozytensubpopulationen im Lymphozytengate der Patienten ohne klonale T-LGL-Zellexpansion | 74 |
| Tabelle 18: Medikamentöse Therapie der Patienten ohne klonale T-LGL- Zellexpansion | 75 |
| Tabelle 19: Medikation bei Studieneinschluss der Patienten ohne klonale T-LGL- Zellexpansion | 76 |
| Tabelle 20: Komorbiditäten der Patienten ohne klonale T-LGL-Zellexpansion | 77 |
| Tabelle 21: Allgemeine Charakteristika der Patienten mit klonaler T-LGL- Zellexpansion | 79 |
| Tabelle 22: Laborparameter der Patienten mit klonaler TLGL-Zellexpansion | 81 |

| | |
|--|----|
| Tabelle 23: Lymphozytensubpopulationen im Lymphozytengate der Patienten mit klonaler T-LGL-Zellexpansion | 82 |
| Tabelle 24: Medikamentöse Therapie der Patienten mit klonaler T-LGL-Zellexpansion | 84 |
| Tabelle 25: Medikation bei Studieneinschluss der Patienten mit klonaler T-LGL-Zellexpansion | 85 |
| Tabelle 26: Komorbiditäten der Patienten mit klonaler T-LGL-Zellexpansion | 86 |
| Tabelle 27: Allgemeine Charakteristika der Patientenkollektive im Vergleich | 88 |
| Tabelle 28: Laborparameter der Patientenkollektive im Vergleich | 89 |
| Tabelle 29: Lymphozytensubpopulationen der Patientenkollektive im Vergleich | 90 |
| Tabelle 30: Medikamentöse Therapie der Patientenkollektive im Vergleich | 92 |
| Tabelle 31: Medikation bei Studieneinschluss der Patientenkollektive im Vergleich | 93 |
| Tabelle 32: Komorbiditäten der Patientenkollektive im Vergleich | 94 |

14. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| ACPA | Anti-citrullinated Protein Antibodies (Anti-CCP-AK) |
| ACR | American College of Rheumatology |
| ANA | Antinukleäre Antikörper |
| bDMARDs | biologische DMARDs, Biologika |
| BMI | Body Mass Index |
| BSG | Blutsenkungsgeschwindigkeit |
| ca. | Circa |
| CCP-AK | Cyclisch-Citrulliniertes Peptid-Antikörper |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CDAI | Clinical disease activity index |
| COPD | Chronic obstructive pulmonary disease |
| CRP | C-reaktives Protein |
| csDMARDs | konventionell synthetische DMARDs |
| CT | Computertomographie |
| DAS28 | Disease Activity Score 28 |
| DMARD | Disease-modifying anti-rheumatic drug |
| DNA | deoxyribonucleic acid |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| EDTA | Ethylendiaminetetraacetat |
| EKG | Elektrokardiogramm |
| ENA | extrahierbare nukleäre Antigene |
| EULAR | European League Against Rheumatism |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorting |
| FCS | Fetal calf serum |
| FSC | Forward scatter |
| G-CSF | Granulocyte-colony stimulating factor |
| HLA | Humanes Leukozytenantigen |
| IFN | Interferon |

| | |
|-------------------|--|
| IL | Interleukin |
| JAK | Janus Kinase |
| MCP | Metacarpophalangealgelenke |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| mM | Millimolar |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| MTP | Metatarsophalangealgelenke |
| MTX | Methotrexat |
| NICE | National guidelines from the National Institute for Health and Care Excellence |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| NSAR | Nichtsteroidales Antirheumatikum |
| NYHA | New York Heart Association |
| PBS | Phosphoate buffered saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PDGF | Platelet Derived Growth Factor |
| PIP | proximale Interphalangealgelenke |
| RA | Rheumatoide Arthritis |
| RANKL | Receptor Activator of NF-κB Ligand |
| RF | Rheumafaktor |
| Rpm | Revolutions per minute |
| SDAI | Simplified disease activity index |
| SSC | Side scatter |
| STAT | Signal Transducer and Activator of Transcription |
| T-LGL | T-Large Granular Lymphocyte |
| TLR | Toll-like Rezeptor |
| TNF | Tumor-Nekrose-Faktor |
| tsDMARDs | targeted synthetic DMARDs |
| TZR/ TCR | T-Zell-Rezeptor/ t-cell-receptor |
| μl | Mikroliter |

°C

Grad Celsius

15. Anhang

15.1. Patienteninformation und Aufklärung

Universitätsklinikum Würzburg

Medizinische Klinik und Poliklinik II

Direktor: Prof. Dr. H. Einsele

Rheumatologie/ Klinische Immunologie

Leiter: Prof. Dr. H.-P. Tony



Med. Klinik und Poliklinik II (ZIM), Oberdürrbacher Str. 6, 97080 Würzburg

Seite 1/5
1/5

Patienteninformation und Aufklärung

Sehr geehrte Patientin,
Sehr geehrter Patient,

Zunächst möchten wir uns für Ihr Interesse an unserer Studie bedanken! Wir hoffen, durch diese Studie ein besseres Verständnis für die Rheumatoide Arthritis und damit gelegentlich einhergehende Veränderungen des Blutbildes zu erlangen. Nachfolgend finden Sie Informationen zur Natur und zum Ablauf der Studie sowie zu Ihren Rechten als Teilnehmer/in sowie auch zum Datenschutz innerhalb der Studie. Sollten Sie an dieser Studie teilnehmen wollen, möchten wir Sie bitten, Ihr Einverständnis durch eine Unterschrift auf dem dieser Studie beiliegenden Einverständnisbogen zu dokumentieren. Vielen Dank!

Name der Studie:

Prävalenz der T-LGL-Leukämie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Beschreibung der Studie und des genauen Ablaufs:

Ziel der Studie ist es, herauszufinden, bei wie vielen Patientinnen und Patienten mit Rheumatoider Arthritis Veränderungen des Blutbildes vorliegen, die die Diagnose einer niedrig malignen T-Zell-Leukämie erlauben. T-Zellen sind bestimmte Lymphozyten (weiße Blutkörperchen), die als Teil der menschlichen Immunabwehr im Blut nachzuweisen sind. Selten vermehren sich einzelne T-Zellen im Blut so, dass von einer niedrig malignen T-Zell-Leukämie gesprochen wird. Für die betroffenen Patientinnen und Patienten ist diese Erkrankung oft harmlos, kann jedoch auch schwerwiegende Folgen haben, wie etwa eine Neigung zu Infektionen. Es ist bekannt, dass viele Patienten, die an einer solchen T-LGL-Leukämie leiden auch eine Rheumatoide Arthritis haben. Es ist jedoch nicht bekannt, bei wie vielen Patienten mit Rheumatoider Arthritis diese Leukämie nachgewiesen werden kann. Diese Studie soll dazu dienen, die Häufigkeit dieser T-Zell-Veränderung festzustellen bei Menschen, die an einer Rheumatoiden Arthritis leiden.

Um die T-LGL zu diagnostizieren, werden die T-Zellen im Blut mittels Durchflusszytometrie untersucht, bei der bestimmte Oberflächenmerkmale der Zellen bestimmt werden können. Sollten sich auffällige T-Zellen nachweisen lassen, wird mit der schon vorhandenen Blutprobe eine molekulargenetische Untersuchung der T-Zellen angeschlossen, um das Vorliegen einer sogenannten T-LGL-Leukämie nachzuweisen.

Den teilnehmenden Patientinnen und Patienten wird zu Beginn der Studie einmalig 30ml zusätzliches Blut abgenommen und im Labor der Uniklinik in Würzburg untersucht. Es werden Merkmale untersucht, die zur rheumatologischen Standarddiagnostik gehören: Rheumafaktor, ACPA (Anti-CCP-Antikörper), ANA, Immunglobuline und Entzündungswerte. Es wird dabei bei einigen Patienten eine genetische Untersuchung des HLA-Typs erfolgen. Zudem wird anhand der schon vorhandenen Arztberichte dokumentiert, wie lange die teilnehmenden Patientinnen und Patienten schon an der Rheumatoiden Arthritis leiden, wie alt und welchen Geschlechts sie sind und wie die Erkrankung bisher therapiert wurde.

Rheumatologie / Klinische Immunologie

Leiter:
Prof. Dr. H.-P. Tony

Oberarzt:
Dr. M. Schmalzing

Sekretariat / Anmeldung
Frau Backmund/
Frau Metz
Tel. (0931) 201-40100
Fax (0931) 201-640100

Rheumatologische Ambulanz
Tel. (0931) 201-40100
Fax (0931) 201-640100

Station M43
(0931) 201-44311
(Ärzte)
(0931) 201-44300
(Pflege)
Fax (0931) 201-644310

Studienzentrale
Tel. (0931) 201-40110
Fax (0931) 201-640110

Immunologisches Labor
Tel. (0931) 201-40712
Fax (0931) 201-640712

Rheumazentrum
Tel. (0931) 201-40105
Fax (0931) 201-640105

www.klinik.uni-wuerzburg.de/medizin2



Welche Risiken bestehen für die teilnehmenden Patientinnen und Patienten?

Sie stimmen einer zusätzlichen Abnahme von 30ml Blut zu. Daraus entsteht für Sie in der weit überwiegenden Mehrzahl der Fälle kein gesundheitliches Risiko. Sollten in Ihrem Blut auffällige T-Zellen gefunden werden, bitten wir Sie um eine zweite Blutabnahme (20ml Blut) für weitere Untersuchungen dieser Zellen sowie zur HLA-Typisierung. Dies kann im Rahmen eines Routine-Termins bei Ihrem Rheumatologen geschehen.

Welcher Nutzen kann sich für teilnehmende Patientinnen und Patienten ergeben?

In der genauen Untersuchung der T-Zellen kann das Vorliegen einer T-Zell-Leukämie bei Ihnen auffallen. Daraus können sich Konsequenzen sowohl für die Therapie Ihrer Gelenksbeschwerden oder eventuell bestehenden Blutbildveränderungen ergeben. Zum Beispiel kann eine Anämie (Blutarmut) oder eine Armut an weißen Blutkörperchen mit dem Vorliegen einer T-LGL-Leukämie der T-Zellen zusammenhängen. Durch die Diagnose könnten diese eventuell wirksam therapiert werden. Eventuell gibt es beispielsweise Möglichkeiten, Ihre antirheumatische Therapie so anzupassen, dass neben den Gelenksbeschwerden auch die malignen T-Zellen davon erfasst werden.

Sollte sich bei Ihnen eine T-LGL-Leukämie nachweisen lassen, würde man zudem möglicherweise Ihr Differentialblutbild in engeren Abständen kontrollieren. Dieses Wissen kann Ihnen und Ihrem Arzt helfen, die für Sie angemessenen Kontrollabstände festzulegen.

Datenschutz:

Im Rahmen der Studie werden personalisierte Daten erhoben. Das heißt, für die Rheumatologie der Uniklinik in Würzburg als auswertendes Zentrum ist es möglich, die einzelnen Blutproben und Krankheitsgeschichten den Namen des jeweiligen Patienten zuzuordnen. Die Daten werden jedoch zum Zwecke der Veröffentlichung anonymisiert. Es wird für Außenstehende nicht möglich sein, Ihre Identität zu ermitteln.

Die Studienteilnahme ist freiwillig und Sie können Ihr Einverständnis jederzeit zurückziehen.

Die Studienteilnahme ist freiwillig und beeinflusst Ihre Therapie aufgrund der Rheumatoiden Arthritis nicht. Sollten Sie später nach erfolgtem Studieneinschluss Bedenken haben und Ihr Einverständnis zurückziehen wollen, ist dies ohne Angabe von Gründen möglich.

Sollten Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich an:

Dr. med. E.C. Scharbatke
Universitätsklinikum Würzburg
Medizinische Klinik II
Rheumatologie und klinische Immunologie
Tel: 0931-201-40100

EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG

Studientitel: Prävalenz der T-LGL-Leukämie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Ich habe die Patienteninformation zur oben genannten Studie erhalten und hatte ausreichend Zeit, sie zu lesen. Ich hatte Gelegenheit Fragen zu stellen, die mir in ausreichender Weise beantwortet wurden.

Ich erteile hiermit mein Einverständnis, an der genannten Studie teilzunehmen und einmalig bis zu 30ml Blut sowie Unterlagen meine Erkrankung betreffend zu wissenschaftlichen Zwecken zur Verfügung zu stellen. Meine persönlichen Daten dürfen durch die Uniklinik Würzburg nur in anonymisierter Form veröffentlicht werden.

Ich stimme einer Aufbewahrung der Untersuchungsergebnisse auch über die Zeit von 10 Jahren hinaus zu.

Mir ist bewusst, dass die Teilnahme an dieser Studie freiwillig ist.

Ich kann mein Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie jederzeit ohne Angabe von Gründen zurückziehen. Ich kann zusätzlich mein Einverständnis zur Nutzung meiner Daten jederzeit zurückziehen.

Name des Patienten/in, Ort, Datum

Unterschrift des Patientin/en

Sollte ich mein Einverständnis zur Teilnahme an der Studie widerrufen, dürfen meine Daten weiter verwendet werden.

Ja

Nein

Name des aufklärenden Ärztin/Arztes

Unterschrift des aufklärenden Ärztin/Arztes

Patientenversion

EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG

Studientitel: Prävalenz der T-LGL-Leukämie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Ich habe die Patienteninformation zur oben genannten Studie erhalten und hatte ausreichend Zeit, sie zu lesen. Ich hatte Gelegenheit Fragen zu stellen, die mir in ausreichender Weise beantwortet wurden.

Ich erteile hiermit mein Einverständnis, an der genannten Studie teilzunehmen und einmalig bis zu 30ml Blut sowie Unterlagen meine Erkrankung betreffend zu wissenschaftlichen Zwecken zur Verfügung zu stellen. Meine persönlichen Daten dürfen durch die Uniklinik Würzburg nur in anonymisierter Form veröffentlicht werden.

Ich stimme einer Aufbewahrung der Untersuchungsergebnisse auch über die Zeit von 10 Jahren hinaus zu.

Mir ist bewusst, dass die Teilnahme an dieser Studie freiwillig ist.

Ich kann mein Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie jederzeit ohne Angabe von Gründen zurückziehen. Ich kann zusätzlich mein Einverständnis zur Nutzung meiner Daten jederzeit zurückziehen.

Name des Patienten/in, Ort, Datum

Unterschrift des Patientin/en

Sollte ich mein Einverständnis zur Teilnahme an der Studie widerrufen, dürfen meine Daten weiter verwendet werden.

Ja

Nein

Name des aufklärenden Ärztin/Arztes

Unterschrift des aufklärenden Ärztin/Arztes

Version für die Uniklinik Würzburg

Schweigepflichtentbindung

Studientitel: Prävalenz der T-LGL-Leukämie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Hiermit entbinde ich die Praxis Kleinert/Rapp/Schuch/Wendler von der Schweigepflicht gegenüber der Rheumatologie der Uniklinik Würzburg.

Meine medizinischen Daten dürfen zur Nutzung im Rahmen der o.g. Studie weitergegeben werden. Die Weitergabe nicht-anonymisierter Daten an Dritte durch die Uniklinik ist dabei explizit ausgeschlossen.

Name, Datum

Zur Archivierung in der Praxis

15.2. Studienprotokoll

MEDIZINISCHE KLINIK UND POLIKLINIK II, UNIVERSITÄT WÜRZBURG

Prävalenz der T-LGL-Leukämie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

| | |
|----------------------------|---|
| Protokoll Version: | Version 4 |
| Datum: | 20.06.13 |
| Wissenschaftliche Leitung: | Dr. med. E.C. Scharbatke Prof. Dr. med. H.-P. Tony |

Synopse

| | |
|-----------------------|---|
| TITEL | Prävalenz der T-LGL bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis |
| SPONSOR | |
| DATUM VERSION | 19.06.13 |
| ZIELE | Differenzierte Untersuchung der T-Zellpopulationen von Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA) hinsichtlich der Prävalenz von T-Zell-Leukämien (insbesondere T-LGL) sowie möglicher Risikofaktoren hierfür. |
| BEGRÜNDUNG DER STUDIE | Die Prävalenz von T-LGL bei Patienten mit RA ist nicht bekannt, jedoch weiß man, dass ca. 25% der Patienten mit T-LGL an einer RA leiden oder ähnliche Symptome zeigen. Ziel ist es erstens die Prävalenz dieser T-Zell-Leukämie bei RA-Patienten zu ermitteln und zweitens Risikofaktoren für das Vorliegen einer T-LGL bei RA-Patienten herauszuarbeiten. |
| ANZAHL DER PROBANDEN | 1000 Patienten |
| ZIELPOPULATION | Patienten mit einer Rheumatoiden Arthritis |
| DAUER DER STUDIE | Die Rekrutierung dauert ca. ein Jahr. |
| ANZAHL DER ZENTREN | Monozentrisch. |
| BEURTEILUNG DER DATEN | Erfassung der rheumatologischen Diagnosen sowie weiterer Diagnosen der Patienten. Erhebung/Erfassung des Antikörperstatus (ACPA und Rheumafaktor) Untersuchung der peripheren T-Zell-Population mittels Durchflusszytometrie (FACS). |

Inhaltsverzeichnis

1. Hintergrund
2. Ziele der Studie
3. Studienpopulation
 - 3.1. Zielpopulation
 - 3.2. Einschlusskriterien
 - 3.3. Ausschlusskriterien
4. Analyse der Blutproben
 - 4.1. Immunphänotypisierung
 - 4.2. Serumproben
 - 4.3. HLA-Typisierung
 - 4.4. Klonalitätsanalyse in ausgewählten Fällen
5. Untersuchung des Zytokinprofils in ausgewählten Fällen
6. Erhebung klinischer Daten der Patienten
7. Auswertung der Daten
 - 7.1. Immunphänotypisierung
 - 7.2. Serumproben
 - 7.3. Klonalitätsanalyse
 - 7.4. Klinische Daten
8. Einverständnis
9. Ethik
10. Publikation der Daten
11. Literatur
12. Abkürzungen

1. Hintergrund

1977 wurde erstmals ein Syndrom beschrieben, das mit einem erhöhten Anteil peripher zirkulierender klonaler T-LGL-Zellen sowie Neutropenie einhergeht. Auch eine Thrombopenie oder Anämie sowie Splenomegalie sind mögliche Folgen. Die Zellen können sowohl klassische T-LGL sein, die CD3 positiv sind, als auch NK-Zellen ähneln. LGL-Leukämien der NK-Zellreihe sind extrem selten und nehmen regelhaft einen schweren Verlauf. Es soll in der aktuellen Untersuchung jedoch der Fokus allein auf CD3-positive T-LGL-Leukämien gelegt werden.

T-LGL-Leukämien sind seltene, zumeist benigne verlaufende hämatologische Neoplasien. Der typische Immunphänotyp einer T-LGL-Leukämie ist CD3+, CD8+, CD57+. Einige Varianten sind jedoch beschrieben. Es gibt keine Geschlechtsprädisposition. Der Inzidenzspitzen liegt um das 60. Lebensjahr, die Erkrankung kann jedoch in jedem Lebensalter auftreten.

Etwa die Hälfte der Betroffenen Patienten leidet an rekurrenden Infektionen. Die meisten Patienten sind neutropen. Diese Neutropenie wird jedoch bei Patienten mit RA oft als Ausdruck der RA selbst oder als Nebenwirkung der Therapie interpretiert. Da zudem Patienten ohne Neutropenie oftmals ein vordergründig normales Blutbild aufweisen, werden sie regelhaft übersehen, was ein Grund für die letztlich unbekannte Prävalenz der Erkrankung ist. Im Einzelfall kann es nur anhand des klinischen Verlaufs möglich sein, klinisch nicht signifikante klonale T-Zell-Populationen von einer T-LGL-Leukämie zu unterscheiden.

Ein Drittel der Patienten zeigt Symptome einer Rheumatoiden Arthritis oder wurde mit einer solchen diagnostiziert. Auch Assoziationen mit anderen Autoimmunerkrankungen und insbesondere auch dem bei der Rheumatoiden Arthritis vorkommenden Felty-Syndrom sind beschrieben und weitgehend unverstanden. Das Felty-Syndrom wurde erstmals 1924 als Trias aus Rheumatoider Arthritis, Leukopenie und Splenomegalie beschrieben. Aus heutiger Sicht könnte es sich vorwiegend um Patienten handeln, die an einer T-LGL in Assoziation mit einer Rheumatoiden Arthritis leiden.

2. Ziel der Studie

Ziel der Querschnittsuntersuchung ist es die Prävalenz von T-LGL bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis zu untersuchen. Es sollen ferner Patientenkollektive mit einem erhöhten Risiko für diese Erkrankung identifiziert werden. Dadurch soll ein Beitrag geleistet werden, den pathogenetischen Zusammenhang von T-LGL-Leukämien und Rheumatoider Arthritis sowie auch dem Felty-Syndrom aufzuklären. An ausgewählten Patienten mit klonalen T-Zell-Populationen soll zudem das Zytokinprofil von T-LGL-Zellen bei Rheumatoider Arthritis untersucht werden.

3. Studienpopulation

3.1. Zielpopulation

Patienten mit Rheumatoider Arthritis. Die Patienten müssen die ACR-Kriterien aus 2010 zur Diagnose einer Rheumatoiden Arthritis erfüllen.

3.2. Einschlusskriterien

Zum Einschluss in die Studie müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

1. Patienten mit gesicherter Rheumatoider Arthritis, die die ACR-Kriterien für RA aus 2010 erfüllen.
2. Alter über 18 Jahre
3. Jegliche antirheumatische Therapie ist möglich. Auch Patienten, die keine spezifische Therapie der RA erhalten können eingeschlossen werden, sofern die Diagnose gesichert ist.

3.3. Ausschlusskriterien

1. Fehlende Einwilligungsfähigkeit.
2. Alter unter 18 Jahren.

4. Analyse der Blutproben

Im Rahmen der Untersuchung erfolgt bei allen Patienten eine einmalige Blutentnahme von je 10ml Serum und 20ml EDTA-Blut. Werden in der Durchflusszytometrie auffällige T-Zellen gefunden, soll eine weitere Blutabnahme (20ml EDTA-Blut) zur Klonalitätsanalyse und HLA-Typisierung erfolgen.

4.1. Immunphänotypisierung

Die Immunphänotypisierung wird mittels 8-Farben-Durchflusszytometrie durchgeführt. Es werden pro Patient 10ml EDTA-Blut hierzu benötigt.

Folgende Antikörper werden eingesetzt:

Zum Screening der Proben werden die nachfolgenden Antikörper eingesetzt:

CD3; CD4; CD8; CD16; CD56; CD57; CD45; Gamma-Delta-T-Zellrezeptor.

Sollten sich Auffälligkeiten ergeben, wird ein weiteres Panel mit zusätzlich folgenden Antikörpern gefärbt: CD5, CD2, CD7, CD45Ra, CD45R0, CD25.

4.2. Serumproben

Zur Bestimmung serologischer Parameter der Rheumatoiden Arthritis und anderer Autoimmunerkrankungen werden pro Patient 10 ml Serum benötigt. Es werden folgende Parameter bestimmt: Rheumafaktor, Antinukleäre Antikörper, Anticitrullinierte Antikörper; CRP; Blutsenkungsgeschwindigkeit. Es sollen in ausgewählten Fällen auch Immunglobulin-Titer bestimmt werden.

4.3. HLA-Typisierung

Bei denjenigen Patienten, die klonale T-Zell-Populationen aufweisen soll eine HLA-Typisierung durch die Transfusionsmedizin unseres Hauses erfolgen. Hierzu wird das Blut der Abnahme bei Studieneinschluss verwendet, falls noch ausreichend vorhanden. Alternativ kann hierzu eine zweite Blutentnahme bei den betroffenen Patienten notwendig sein.

4.4. Klonalitätsanalyse in ausgewählten Fällen

Bei denjenigen Proben, in denen sich eine Expansion von T-LGL-Zellen mittels Durchflusszytometrie nachweisen lässt, soll anschließend eine Klonalitätsanalyse erfolgen. Hierzu werden die T-Zell-Rezeptoren mittels PCR untersucht.

5. Untersuchung des Zytokinprofils in ausgewählten Fällen

Bei ausgewählten Patienten mit nachgewiesener klonaler T-Zell-Population soll ein differenziertes Zytokinprofil der klonalen T-Zellen erstellt werden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Prelog in der Kinderklinik der Universität Würzburg. Hierzu sollen bei diesen Patienten ggf. Zellkulturen angelegt werden.

6. Erhebung klinischer Daten der Patienten

Auf Basis der standardmäßigen rheumatologischen Untersuchungen der Patienten (rheumatologischer Arztbrief, etc.) sollen Daten zum Verlauf der Rheumatoiden Arthritis, zu weiteren Erkrankungen der Patienten sowie zum Therapieverlauf erhoben werden. Von Interesse sind hier neben der Erkrankungsdauer und -schwere vor allem medikamentöse Therapien mit potentieller Wirkung auch auf eine T-LGL-Leukämie wie MTX, Ciclosporin A oder auch Biologika.

7. Auswertungen

7.1. Immunphänotypisierung

Bei allen Patienten werden periphere T-Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Es werden sowohl typische wie auch aberrante Immunphänotypen, die auf eine T-LGL-Leukämie hinweisen können untersucht. Es werden dazu die unter 4.1 aufgeführten Antikörper verwandt.

7.2. Serumproben

Bestimmung serologischer Parameter: Rheumafaktor, ACPA, ANA, CRP und Immunglobuline. Die Serumanalysen dienen dem Abgleich mit den Ergebnissen der Immunphänotypisierung, um mögliche Korrelationen von T-Zell-Anomalien mit anderen serologischen Merkmalen aufzudecken.

7.3. Klonalitätsanalyse

Um eine benigne, reaktive Vermehrung von T-LGL-Zellen im Blut der untersuchten Patienten von einer klonalen T-Zell-Expansion im Sinne einer T-LGL-Leukämie zu unterscheiden, werden bei Patienten mit auffälligem durchflusszytometrischen Befund Klonalitätsanalysen der T-Zell-Rezeptoren durchgeführt.

7.4. Biometrische Analysen

Das primäre Ziel der Studie ist die Untersuchung der Prävalenz von T-LGL bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis.

Weiterhin sollen die bei Studieneinschluss erhobenen klinischen Daten genutzt werden, um Hypothesen bezüglich möglicher prädisponierender Faktoren für das Auftreten einer T-LGL-Leukämie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis zu generieren. Von Interesse sind dabei Daten zur Erkrankung des Patienten sowie zur medikamentösen Therapie. Erhoben und in die Analyse einbezogen werden das Geschlecht und Alter sowie das Erstmanifestationsalter und relevante

Komorbiditäten, zudem der Serostatus hinsichtlich Rheumafaktor, ANA und ACPA sowie die quantitative Bestimmung des CRPs. Ferner wird der letzte durch den betreuenden Arzt erhobene DAS28 als Maß der Krankheitsaktivität einbezogen. Ein weiterer klinischer Parameter in der Auswertung ist das Vorhandensein von Erosionen. Letzteres wird anhand vorhandener Dokumentation erhoben.

Berechnung aufzudeckender Unterschiede und Beschreibung der statistischen Analysen

N. Berliner [1] berichtet von einer Studie mit 1000 RA-Patienten. In dieser Studie wiesen 0.6% der Patienten eine „large granular lymphocyte proliferation“ bei der Knochenmark-Untersuchung auf (Studie: PA Saway et al [2]) Andererseits wurden in der Medizinischen Klinik und Poliklinik II in Würzburg bei einer Analyse mittels Durchflusszytometrie unter 20 neutrotopen (?) RA-Patienten bei 3 Patienten eine T-LGL diagnostiziert wurde. Dies entspräche einem Anteil von $p_1 = 0.15$ (15%)! Daher scheint es durchaus realistisch, im Gegensatz zu den älteren Angaben in der Literatur von einem tatsächlichen T-LGL Anteil von $p_1 = 0.05$ (5%) in der Grundpopulation der RA-Patienten auszugehen.

Analyse aufzudeckender Unterschiede bei 1000 Patienten,

Betrachtet man das einseitige Testproblem

$H_0 : p \leq p_0 = 0.006$ versus $H_1 : p > p_0$

So liefern 1000 Patienten eine **Power von 80%**, um mittels einseitigem exaktem Binomialtest zum Signifikanzniveau 0.05 die Nullhypothese abzulehnen, wenn der tatsächliche Anteil **0.0136 (1.36%)** ist. Weiterhin liefern 1000 Patienten eine **Power von 90%**; die Nullhypothese abzulehnen, wenn der tatsächliche Anteil **0.0154 (1.54%)** ist.

Statistische Analysen

Es sind ausführliche deskriptive Datenanalysen geplant. Dabei werden die Maßzahlen zur Charakterisierung der Verteilung in der Studienpopulation wie Häufigkeiten, Lageparameter, Streuungsparameter gemäß dem Skalenniveau der Variablen gewählt. Für den Anteil der Patienten mit T-LGL-Leukämie wird ein zweiseitiges 95%-Konfidenzintervall nach Wilson mit Stetigkeitskorrektur berechnet. Unter der Annahme, dass ein Stichprobenanteilswert von 0.006 (0.6%) wie bei Saway et al ermittelt wird, ermöglichen 1000 Patienten mit RA die Berechnung eines Konfidenzintervalls mit der Breite 0.0113 (untere und obere Grenze: 0.0024 , 0.0137). Unter der Annahme, dass ein Stichprobenanteilswert von 0.05 (5%) ermittelt wird, ein hier als hypothetisch angenommener Wert (siehe oben), ermöglichen 1000 Patienten mit RA die Berechnung eines Konfidenzintervalls mit der Breite 0.0282 (untere und obere Grenze: 0.0377 , 0.0659). Für explorative univariate Analysen hinsichtlich möglicher Assoziationen des Auftretens einer T-LGL-Leukämie mit Alter, Geschlecht sowie mit Faktoren der RA-Erkrankung (Erstmanifestationsalter, Komorbiditäten, Serostatus hinsichtlich Rheumafaktor, ANA, ACPA, CRP, DAS28) werden Fisher's exakter Test sowie der Zweistichproben T-Test bzw. der Mann-Whitney Test angewendet. Stichprobenanteile für T-LGL-Leukämie in der Größenordnung 0.05 (5%) ermöglichen bei 1000 Patienten auch Stärke und Richtung des Einflusses mehrerer Variablen auf die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer T-LGL-Leukämie bei RA-Patienten im Rahmen einer multiplen logistischen Regression zu untersuchen. Dazu nehmen wir wieder einen Anteil von 5% für T-LGL-Leukämien in der Grundpopulation der RA-Patienten an. Nimmt man

entweder eine metrische, approximativ normalverteilte Variable X_1 als hauptsächlich interessierenden Einflussfaktor an und setzen als Effektstärke einen Odds-Ratio von 2.0 (Vergleich der T-LGL Raten für Patienten mit $X_1 = \mu + \sigma$ versus $X_1 = \mu$) oder eine dichotome Variable Y_1 als hauptsächlich interessierenden Einflussfaktor an und setzen als Effektstärke einen Odds-Ratio von 3.0 (Vergleich der T-LGL Raten für Patienten mit $Y_1 = 1$ versus $Y_1 = 0$) voraus, dann sichern 1000 Patienten jeweils eine Power von 90%, diese Effekte bei einem Signifikanzniveau von 0.05 als signifikante Veränderung der T-LGL-Rate und damit X_1 bzw. Y_1 als signifikante unabhängige Einflussfaktoren aufzudecken. Hierbei wurde jeweils ein Wert von 0.5 für den multiplen Korrelationskoeffizient zwischen der hauptsächlich interessierenden Einflussvariable und den übrigen unabhängigen Variablen im Modell angenommen.

[1] N. Berliner: Large granular lymphocyte leukemia in rheumatoid arthritis
2013 Wolters Kluwer UpToDate Official reprint from UpToDate®

[2] PA Saway, EF Prasthofer, JC Barton: Prevalence of granular lymphocyte proliferation in patients with rheumatoid arthritis and neutropenia

8. Einverständnis

Die Teilnahme an dieser Untersuchung ist freiwillig. Es besteht kein Zusammenhang zwischen der Therapie der Patienten und der Teilnahme an der Studie.

9. Ethik

Das Protokoll, die Patienteninformation und die Einverständniserklärung werden bei der lokalen unabhängigen Ethikkommission der Universitätsklinik Würzburg eingereicht.

10. Publikation der Daten

Die Universität Würzburg wird die Ergebnisse oder Teile der Ergebnisse der Studie in wissenschaftlichen Fachzeitschriften publizieren.

11. Literatur

1. TP Jr Loughran: Clonal diseases of large granular lymphocytes. In: blood 1993; 82: 1-14.
2. Michal G. Rose, Nancy Berliner: T-Cell Large Granular Lymphocyte Leukemia and Related Disorders. In: The Oncologist 2004; 9: 247-258.
3. Lubomir Sokol, Thomas P. Loughran Jr: Large Granular Lymphocyte Leukemia. In: The Oncologist 2006; 11: 263-373.

12. Abkürzungen

| | |
|------|---|
| ACPA | Anti Citrullinated Protein Antibodies (Vormals als Anti-CCP bezeichnet) |
| ANA | Antinukleäre Antikörper |
| CRP | C-reaktives Protein |
| HLA | Humanes Leukozytenantigen |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| RA | Rheumatoide Arthritis |

RF
T-LGL

Rheumafaktor
T-Large Granular Lymphocyte

Danksagung

In erster Linie danke ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Tony für die Überlassung des Themas und die abschließende Korrektur der Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Schwaneck für die zuverlässige Unterstützung, die konstruktiven Vorschläge und den stetigen Austausch, welche mir das wissenschaftliche Arbeiten und Schreiben erleichtert haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Kleinert und seinen Kollegen für die Bereitstellung der zusätzlichen Patientendaten und der damit verbundenen Vergrößerung unseres Patientenkollektivs.

Den Mitarbeitern des Immunologischen Labors der Medizinischen Poliklinik der Universitätsklinik Würzburg möchte ich für die Unterstützung bei der Erstellung der FACS-Analysen danken. Ein großes Dankeschön geht an Frau Renner für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Mutter und meinem Partner, die zu jeder Zeit für Diskussionen offen waren, obwohl es für sie ein unbekanntes Fachgebiet war, mir immer wieder ermutigende Worte zugesprochen und mich uneingeschränkt und liebevoll unterstützt haben.