

Aus der Klinik für Kinderheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Prävalenz feto-maternaler Mikrochimerismen bei Patientinnen mit rheumatoider Arthritis
oder systemischem Lupus erythematoses und deren Einfluss auf den Krankheitsverlauf

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Marianne Jahn, geb. Kekow
aus Kiel

Magdeburg 2013

Kurzreferat

Prävalenz feto-maternaler Mikrochimerismen bei Patientinnen mit rheumatoider Arthritis oder systemischem Lupus erythematodes und deren Einfluss auf den Krankheitsverlauf

Magdeburg 2013, 69 Blatt, 3 Abbildungen, 35 Tabellen, 10 Anlagen

Während der Schwangerschaft kommt es zu einem diaplazentaren Austausch von mütterlichen und kindlichen Zellen. Einige dieser Zellen persistieren in dem jeweils anderen Organismus und werden dann als Mikrochimerismus (MC) bezeichnet. Um den Zeitpunkt der Geburt kann am häufigsten kindliche DNA im Blut der Mutter nachgewiesen werden, die physiologischer Weise nach Tagen bis Wochen verschwindet. Auffällig ist, dass bei einigen Frauen noch Jahre oder Jahrzehnte später ein MC nachgewiesen werden kann, auch wenn es keine Hinweise auf andere Quellen für den MC gibt, wie zum Beispiel Aborte oder Fremdbluttransfusionen.

Da in Studien bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen eine hohe Prävalenz von MC gefunden werden konnte, wird vermutet, dass sich das Auftreten von MC und die Entstehung von Autoimmunerkrankungen gegenseitig beeinflussen. Der Einfluss von MC auf den Langzeitverlauf von Autoimmunerkrankungen ist bisher kaum untersucht. Daher wurden in dieser Arbeit neben der Prävalenz des fetalen MC auch krankheitsspezifische Parameter und der Krankheitsverlauf in Abhängigkeit von einem nachgewiesenen MC untersucht. Stellvertretend für die große Gruppe der Autoimmunerkrankungen wurden die Krankheitsbilder rheumatoide Arthritis (RA) und der systemische Lupus erythematodes (SLE) gewählt. Die Untersuchung auf das DYS14-Gen, das auf dem Y Chromosom liegt und zum Nachweis des vom Sohn stammenden feto-maternalen MC genutzt wird, umfasste 73 Frauen mit RA, 16 Frauen mit SLE und 54 gesunde Kontrollen. Die Prävalenz des MC lag in der SLE Gruppe bei 31% und bei 18% in der RA Gruppe. Damit treten in beiden Gruppen signifikant häufiger MC auf als bei den Kontrollen (3,7%). Beim Vergleich der Krankheitsparameter in Abhängigkeit vom Vorliegen eines MC konnte weder in der RA Gruppe noch in der SLE Gruppe ein signifikanter Unterschied gefunden werden.

Schlüsselwörter

Feto-maternaler Mikrochimerismus

Rheumatoide Arthritis

Systemischer Lupus erythematoses

Autoimmunerkrankungen

Inhalt

Schlüsselwörter	III
Inhalt.....	IV
1 Einführung.....	1
1.1 Die rheumatoide Arthritis	1
1.1.1 Ätiologie und Pathogenese	1
1.1.2 Diagnostik und Therapie der rheumatoiden Arthritis	2
1.1.3 Rheumatoide Arthritis und Schwangerschaft.....	4
1.2 Der systemische Lupus erythematoses.....	4
1.2.1 Ätiologie und Pathogenese	5
1.2.2 Diagnostik und Therapie des systemischen Lupus erythematoses	6
1.2.3 Systemischer Lupus erythematoses und Schwangerschaft	7
1.3 Definition und Bedeutung des Chimerismus in der Medizin	8
1.4 Mikrochimerismus im mütterlichen Organismus	10
1.5 Mikrochimerismus bei gesunden Frauen.....	10
1.6 Nachweismöglichkeiten des feto-maternalen Mikrochimerismus.....	11
1.7 Nachweis des Mikrochimerismus während der Schwangerschaft	12
1.8 Langzeitpersistenz des Mikrochimerismus	13
1.9 Mikrochimerismus bei Autoimmunerkrankungen wie der systemischen Sklerose..	14
1.10 Zusammenfassung und Fragestellung	15
2 Patienten, Material und Methoden	16
2.1 Patienten	16
2.1.1 Patienten mit rheumatoider Arthritis.....	17
2.1.2 Patienten mit systemischem Lupus erythematoses	18
2.1.3 Kontrollgruppe	18
2.2 Material und Methoden	19
2.3 DNA -Extraktion	19
2.4 Bestimmung der DNA Konzentration mittels Spektrometer.....	20
2.5 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion	20
2.5.1 Nested PCRzum Nachweis fetaler DNA im mütterlichen Blut	21
2.6 Agarosegelelektrophorese	23

2.7	Chemikalien und Geräte	25
2.8	Erhebung der Krankheitsparameter der rheumatoiden Arthritis	27
2.8.1	Bestimmung des Rheumafaktors und der CCP-Antikörper	27
2.8.2	Beurteilung der Röntgenbilder	28
2.9	Erhebung der Krankheitsparameter des SLE.....	28
2.9.1	Bestimmung des ANA-Titers.....	28
2.9.2	Bestimmung der Anti-ds-DNA-Antikörper	29
2.9.3	Bestimmung der Komplementfaktoren (C3, C4) und der CH50	29
2.10	Statistische Auswertung	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Vergleich der Häufigkeit des Mikrochimerismus zwischen den untersuchten Gruppen	31
3.2	Analyse der RA Gruppe	33
3.3	Analyse der SLE Gruppe	38
3.4	Analyse der Kontrollgruppe	41
4	Diskussion	43
4.1	Nachweis des Y-Chromosoms mittels PCR im mütterlichen Blut.....	43
4.2	Prävalenz des feto-maternalen Mikrochimerismus in unterschiedlichen Kohorten ..	44
4.3	Mikrochimerismus bei rheumatoider Arthritis	49
4.4	Mikrochimerismus beim systemischen Lupus erythematodes	53
4.5	Schlussfolgerungen.....	56
5	Zusammenfassung.....	57
6	Literaturverzeichnis.....	58
7	Danksagungen	66
8	Erklärung.....	67
9	Lebenslauf	68
10	Anhang	69

Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
AG	Antigen
ANA	Antinukleäre Antikörper
Bp	Basenpaar(e)
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CCP-AK	Antikörper gegen zyklische citrullinierte Peptide
CD	Cluster of differentiation
CH 50	Hämolytische Aktivität des Komplementsystems
CRP	C-reaktives Protein
CTLA	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein
DAS	Disease Activity Score
DAZ	Deleted in azoospermia
DGRh	Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie
DMARD	Disease Modifying Antirheumatic Drug
DNA	Desoxyribonuklein-Säure
dsDNA-AK	Doppelstrang-DNA-Antikörper
DYS	Siehe TSPY
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EULAR	European League against Rheumatism
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
Gpt	Gigapartikel
HLA	Humanes Lymphozytenantigen
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
k.A.	Keine Angaben
Kb	Kilobasen

M	Molar (Mol/l)
MC	Mikrochimerismus
MCP	Metacarpophalangealgelenk
MTX	Methotrexat
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIP	proximales Interphalangealgelenk
RA	rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
Rh	Rhesusproteine
RNA	Ribonukleinsäure
Rö	Röntgen
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SRY	sex determining region of Y
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TNF α	Tumor-Nekrosefaktor alpha
TSPY	Testis Specific Protein, Y-linked

1 Einführung

Erkrankungen, bei denen sich die Abwehrmechanismen des Körpers gegen körpereigene Strukturen richten, werden als Autoimmunerkrankungen bezeichnet. Die Ursachen, die der Krankheitsentstehung zu Grunde liegen, sind noch weitgehend unklar. Die rheumatoide Arthritis (RA) und der systemische Lupus erythematoses (SLE) sind zwei Erkrankungen, die beispielhaft für die Gruppe der Autoimmunerkrankungen des rheumatischen Formenkreises stehen.

1.1 Die rheumatoide Arthritis

Die RA ist eine chronische Erkrankung der Gelenke, die 0,5% bis 1% der Bevölkerung betrifft. Im Verlauf der Erkrankung kann es zu einer Zerstörung von Gelenken kommen. Aber auch Sehnen, Sehnenscheiden, Schleimbeutel, sowie Augen und innere Organe können betroffen sein. Die RA ist in Deutschland die häufigste entzündliche Erkrankung der Gelenke. Die Krankheit entwickelt sich meist zwischen dem 25. und 50. Lebensjahr, kann aber auch in jedem anderen Lebensalter auftreten. Die Häufigkeit nimmt mit steigendem Alter zu. Frauen entwickeln drei Mal häufiger eine rheumatoide Arthritis als Männer [41].

1.1.1 Ätiologie und Pathogenese

Trotz intensiver Forschung ist die Ursache für die Entstehung der RA noch unbekannt. Es wird davon ausgegangen, dass eine unzureichende oder fehlgeleitete Immunantwort des Organismus auf bisher nicht identifizierte Antigene vorliegt. Als Antigene kommen Bakterien, Viren (z.B. das Epstein-Barr-Virus) oder körpereigene antigen wirkende Substanzen wie Kollagen in Frage. Die Forschung konnte in den letzten Jahren bestätigen, dass auch eine genetische Krankheitsdisposition besteht. Etwa 70% der Erkrankten tragen das Erbmerkmal HLA-DR4, das aber auch bei 30% der Normalbevölkerung gefunden werden kann [94].

Wie bei vielen anderen Autoimmunerkrankungen tritt die RA bei Frauen im Verhältnis 3:1 häufiger als bei Männern auf. Bei anderen Autoimmunerkrankungen ist dieses Verhältnis noch stärker ausgeprägt, zum Beispiel beim systemischen Lupus erythematoses (9:1) oder bei der Hashimotothyreoiditis (25:1 bis 50:1). Östrogene haben hierbei Einfluss auf die Krankheitsentwicklung, da sie auf Zellen einwirken, die an dem Entzündungsprozess beteiligt sind. B-Lymphozyten sind resistenter gegen Apoptose, wenn sie zuvor Östrogenen ausgesetzt

waren [63]. Auf T-Lymphozyten wirken Östrogene ebenfalls modulierend, indem die T-Lymphozyten-Antwort in Richtung Th2-Antwort verschoben wird [63].

Ob Nullipara ein eigenständiger Risikofaktor für die Erkrankung an einer RA ist, wird aufgrund der nicht eindeutigen Datenlage noch diskutiert [18, 37, 38, 40, 49, 86, 93]. Neben anderen konnten Guthrie et al. zeigen, dass nach Schwangerschaften das Risiko, an einer RA zu erkranken, signifikant im Vergleich zu Nullipara erniedrigt ist [31]. Ob orale Antikontrazeptiva oder das Stillen ein Risikofaktor für RA sind, konnte ebenfalls noch nicht eindeutig geklärt werden [18, 49, 93].

1.1.2 Diagnostik und Therapie der rheumatoiden Arthritis

Bei der körperlichen Untersuchung zeigen die Patienten im typischen Fall eine symmetrische Schwellung und Schmerzhaftigkeit der Hand-, Fingergrund- und/oder Fingermittelgelenke, die mit Bewegungseinschränkungen einhergehen. Ein Querdruckschmerz findet sich an den Metacarpophalangealgelenken (MCP) und/oder den Metatarsophalangealgelenken. Zu Beginn kommt es zu einer Synovitis, die ohne adäquate Therapie im längeren Verlauf zu irreversiblen Schäden an Knorpel und gelenknahem Knochen führt [41]. Die Diagnosestellung orientierte sich dabei bisher an den Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) von 1987. Eine RA galt beim Vorliegen von mindestens 4 der 7 Kriterien als gesichert [5].

1. Morgensteifigkeit der Gelenke von mindestens 1 h Dauer
2. Arthritis von 3 oder mehr Gelenkbereichen: Weichteilschwellung oder Erguss gleichzeitig an mindestens 3 Gelenken
3. Arthritis der Hand- oder Fußgelenke: Schmerzen und Schwellung von Handwurzelgelenken, PIP, MCP
4. Symmetrische Arthritis: Gleichzeitiger Befall desselben Gelenkbereichs beider Körperhälften
5. Subkutane Knoten über Knochenvorsprüngen oder Extensorflächen oder in juxtaartikulärem Bereich (Rheumaknoten)
6. Nachweis des Rheumafaktors (RF) im Serum
7. Typische Röntgenveränderungen der Hände: Gelenknahe Osteoporose u./o. Erosionen

2010 haben ACR und EULAR neue Klassifikationskriterien veröffentlicht, in denen die Spätsymptome der RA, wie zum Beispiel radiologische Veränderungen, an Bedeutung verlieren [2]. Laborchemische Entzündungsparameter und die Autoimmundiagnostik erhielten einen höheren Stellenwert, damit die RA schon in Frühstadien diagnostiziert werden kann. Bei der neuen Klassifikation werden Punktwerte von 0 bis 10 vergeben, ab 6 Punkten wird von einer RA gesprochen [2]:

- Gelenkbeteiligung: Art/Anzahl der betroffenen Gelenke (bis zu 5 Punkte)
- serologische Parameter: RF, CCP-AK (bis zu 3 Punkte)
- erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit oder Erhöhung des CRP (1Punkt)
- Beschwerdepersistenz von sechs Wochen oder länger (1 Punkt)

Bei einem akuten Erkrankungsbeginn sind typischerweise die Blutsenkungsgeschwindigkeit und das CRP erhöht. Zu den prognostisch ungünstigen Faktoren gehört die Präsenz von Autoantikörpern (RF, CCP-AK), das Auftreten von Knochenerosionen frühzeitig im Krankheitsverlauf und eine hohe allgemeine Entzündungsaktivität [28, 101, 102].

Der RF ist ein häufig bei der RA auftretender Autoantikörper, er tritt aber auch bei anderen Erkrankungen auf. Es handelt sich um einen Antikörper der Klasse IgM, der gegen die Fc-Region von IgG-AK gerichtet ist. Im Anfangsstadium der RA ist der RF oft noch nicht nachweisbar, im Verlauf der Erkrankung kann der RF aber bei 70-80% der Patienten gefunden werden. Ist der Titer des RF sehr hoch, ist der Krankheitsverlauf oft schwerer. Bleibt der RF im Verlauf negativ, obwohl die RA-Kriterien erfüllt sind, wird von einer seronegativen RA gesprochen. Auch bei 20% der Gesunden kann im höheren Lebensalter (60.-70. Lebensjahr) ein RF nachgewiesen werden [41]. Die CCP-AK sind hochspezifisch für RA und wurden daher in die neuen ACR Kriterien für die Klassifikation der RA einbezogen, um eine sichere und frühzeitige Diagnostik zu ermöglichen.

Das konventionelle Röntgen hat einen hohen Stellenwert in der Beurteilung der Zerstörung der knöchernen Gelenkanteile durch den chronischen Entzündungsprozess bei der RA. Durch verschiedene Scoring-Methoden können Veränderungen im Röntgenbild, zum Beispiel Erosionen an den Gelenken, semiquantitativ beurteilt werden [88]. Der mit Scoring-Methoden gemessene Destruktionsgrad der Gelenke korreliert mit der klinischen und serologischen Krankheitsaktivität, allerdings mit einer zeitlichen Verzögerung von sechs bis zwölf Monaten

[85, 89]. Eine einfache Methode zur globalen Bewertung des Destruktionsgrades ist die 1949 veröffentlichte Steinbrocker-Klassifikation [50, 88, 89]. Dabei erfolgt eine Einteilung der Gelenkveränderungen in vier Schweregrade:

- Grad 1: keine Veränderungen, evtl. gelenknahe Osteoporose
- Grad 2: Erosion, evtl. Osteoporose/Gelenkspaltverschmälerung
- Grad 3: Erosionen und Subluxation/Fehlstellung
- Grad 4: Ankylose

Das Stadium orientiert sich an dem am stärksten betroffenen Gelenk. Die radiologischen Veränderungen lassen aber nur bedingt auf die funktionelle Behinderung schließen [89].

Die medikamentöse Therapie der RA umfasst eine ausreichende Analgesie mit nicht-steroidalen Antiphlogistika und eine Reduzierung der Entzündungsaktivität durch Gabe von Glukokortikoiden, Basistherapeutika und Biologicals [41]. Zur Langzeittherapie eignen sich insbesondere die Basistherapeutika (auch „disease modifying anti rheumatic drugs“ genannt), die eine Remission bzw. Reduktion der Entzündung induzieren. Zu dieser Medikamentengruppe gehören: Azathioprin, Chloroquin-Präparate, Sulfasalazin, Gold-Präparate, Leflunomid und Methotrexat. Bei ungenügendem Ansprechen auf die Basistherapie können mit Biologicals gute Ergebnisse erzielt werden. Zu ihnen zählen: Adalimumab, Anakinra, Cimzia, Etanercept, Infliximab, Orenzia, Rituximab, Simponi und Tocilizumab.

1.1.3 Rheumatoide Arthritis und Schwangerschaft

Während der Schwangerschaft kommt es bei RA Patientinnen häufig zu einer Besserung der Gelenksymptomatik im dritten Trimenon. Bei mehr als 75% der RA-Patientinnen kommt es auch zu einer Verbesserung im ersten oder zweiten Trimenon. Als Ursache werden eine vermehrte IL-10 Expression (ein anti-inflammatorisches Zytokin), die α -Fetoprotein-Produktion und veränderte Zell-Interaktionen während der Schwangerschaft diskutiert. Nach der Entbindung kommt es bei 90% der RA Patientinnen aber innerhalb einiger Wochen oder Monate zu einem neuen Krankheitsschub mit einem Anstieg des RF-Titers [41].

1.2 Der systemische Lupus erythematodes

Der systemische Lupus erythematodes (SLE) gehört zu den entzündlichen Bindegewebserkrankungen (Kollagenosen), die nicht zu Gelenkdestruktionen führen.

Typisch ist der Multiorganbefall. Die Prävalenz des SLE liegt bei 5 Erkrankungen pro 10 000 Einwohner. Diese Autoimmunerkrankung ist gekennzeichnet durch das Auftreten von Autoantikörpern gegen Zellkernsubstanzen wie native Doppelstrang-DNA. Frauen sind bis zu 10-mal häufiger betroffen als Männer und das mittlere Manifestationsalter liegt zwischen dem 25.-35. Lebensjahr [41].

1.2.1 Ätiologie und Pathogenese

Die Entstehung des SLE ist ebenfalls noch unbekannt. Da es zu Exazerbationen eines SLE während einer viralen oder bakteriellen Infektion kommen kann, gelten mikrobielle Substanzen, zum Beispiel im Rahmen einer Epstein-Barr-Virusinfektion, als mögliche Krankheitsauslöser. Besondere Bedeutung hat die gestörte Immunabwehr in der Pathogenese des SLE. Es ist bekannt, dass die Interaktion zwischen B- und T-Lymphozyten gestört ist. Neben einer polyklonalen B-Lymphozyten-Aktivierung mit einem T-Lymphozyten-Suppressordefekt wurde eine gestörte Apoptose bei SLE Patienten nachgewiesen. Wie auch bei der RA tritt beim SLE eine familiäre Häufung auf. Bei den Verwandten von SLE-Erkrankten finden sich häufig serologische Autoimmunphänomene. Verschiedene Histokompatibilitätsantigene wie HLA-B8, -B15, -B19, -DR2 und -DR3 sind mit der Krankheit assoziiert [41].

Warum das weibliche Geschlecht so viel häufiger betroffen ist als das männliche, besonders während der fertilen Jahre, ist noch nicht vollends verstanden. Es konnten auf dem inaktiven X-Chromosom von Frauen Regionen gefunden werden, welche die Expression von CD40 Liganden auf den T-Zellen regulieren. Bei Frauen mit SLE waren diese Regionen im Vergleich zu gesunden Frauen öfter demethyliert, was zu einer vermehrten CD40 Liganden-Expression führt. Hierdurch kommt es zu vermehrten Aktivierungssignalen zwischen T-Zellen und B-Zellen [28]. Auch der Hormonmetabolismus weist bei Frauen und Männern mit SLE Besonderheiten auf, die zu der Krankheitsentwicklung beitragen können. Durch erhöhte Östrogen- und verringerte Androgenspiegel soll die Immunantwort der Körpers verstärkt sein. Zudem können weibliche Sexualhormone das Überleben von B-Zellen im peripheren Gewebe begünstigen und die Autoantikörperproduktion steigern [28].

1.2.2 Diagnostik und Therapie des systemischen Lupus erythematoses

Die Symptome des SLE sind sehr vielgestaltig. Die Krankheitsaktivität kann über die Jahre stark variieren. Der SLE kann viele verschiedene Organsysteme betreffen; es kann zu einer muskulokutanen, muskuloskelettalen, kardiovaskulären, renalen, zerebralen und gastrointestinalen Manifestation kommen. Auch das hämatologische System kann betroffen sein [28].

Aktive Phasen der Erkrankung sind gekennzeichnet durch Fieberschübe, Abgeschlagenheit und ein allgemeines Krankheitsgefühl. Auch können Hautveränderungen, Synovitiden und verschiedene viszerale Symptome Teil des Symptomkomplexes sein. Es können mehrere oder nur ein Organsystem betroffen sein, die Beteiligung verschiedener Organsysteme kann sich im Krankheitsverlauf ändern. Am häufigsten kommt es zu symmetrischen Synovitiden und Arthralgien, die denen der RA ähneln (90% der Patienten). Zudem finden sich oft Hautveränderungen (75% der Patienten), die sich als Erytheme, Plaques, Schleimhautläsionen oder Vaskulitiden (Hautulzerationen, Nekrosen, Gangrän) äußern. Die Beteiligung der Nieren bestimmt maßgeblich die Prognose des SLE. Durch eine Ablagerung von Immunkomplexen bildet sich eine Glomerulonephritis, die ohne adäquate Therapie eine schlechte Prognose hat. Bei jedem vierten Patient entwickelt sich im Laufe der Erkrankung eine Perikarditis. Eine weitere Schädigung des Herzens kann durch vaskuläre Veränderungen mit daraus resultierenden Ischämien entstehen. Auch organische Hirnbeteiligungen sind gefürchtete Manifestationen des SLE. Typische neurologische Komplikationen sind Krampfanfälle, Absenzen, Psychosen, Hirnnervenausfälle und Schlaganfälle.

Die ACR Klassifikationskriterien für SLE eignen sich besonders für die Diagnosestellung bei Patienten mit länger bestehender Krankheitsmanifestation [28, 72, 73].

Die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) ist als ein allgemeiner Entzündungsmarker in den aktiven Krankheitsphasen erhöht. Das CRP ist vornehmlich bei einer zusätzlich auftretenden Serositis erhöht. Weitere Werte, die zur Diagnostik und Differenzierung von anderen Kollagenosen bestimmt werden, sind Antikernfaktoren (ANA), die Komplementfaktoren, bzw. deren Verbrauch, (C3, C4, CH50) und die Antikörper gegen Doppelstrang-DNA (dsDNA-AK) [41].

Für die Behandlung akuter Krankheitsschübe eignen sich Glukokortikoide in hoher Dosierung. In der Langzeittherapie des SLE sollten Glukokortikoide in inaktiven Phasen

aufgrund des Nebenwirkungsspektrums vermieden oder nur niedrig dosiert werden. Zur Langzeittherapie werden, ähnlich wie bei der RA, Basistherapeutika eingesetzt. Bei hochaktiven Situationen mit drohendem Organversagen kommen Zytostatika wie Cyclophosphamid zur Anwendung [41].

1.2.3 Systemischer Lupus erythematodes und Schwangerschaft

Die Schwangerschaft bei Patientinnen mit SLE ist mit besonderen Risiken für Mutter und Kind verbunden, weshalb früher oft von Schwangerschaften bei Erkrankten abgeraten wurde. Durch verbesserte Überwachungs- und Therapiemöglichkeiten ist heute eine Schwangerschaft trotz SLE vertretbar. Anders als bei der RA führt die Schwangerschaft jedoch zu einer Zunahme der Krankheitsaktivität. Die Plazenta und der Fetus können zu Zielen der mütterlichen Autoantikörper werden. Dadurch kann es zu einem Abort oder zu spezifischen Syndromen der passiv erworbenen Autoimmunität kommen, wie z.B. dem neonatalen Lupus-Syndrom. Die Prognose für Mutter und Kind sind am besten, wenn der SLE 6 bis 12 Monate vor Empfängnis in Remission ist [41].

1.3 Definition und Bedeutung des Chimerismus in der Medizin

Das Wort Chimär entstammt der griechischen Mythologie, in der das Wort Χίμαιρα ein Wesen beschreibt, das aus verschiedenen Lebewesen besteht, wie zum Beispiel einer Ziege, einem Löwen und einer Schlange. In der Medizin wurde der Begriff erstmals durch Anderson und Billingham im Jahr 1951 verwendet [23]. Sie bezeichneten mit dem Begriff Chimär einen Organismus, dessen Zellen von zwei oder mehr Zygoten abstammen, dabei aber ein einheitliches Individuum darstellt [19]. Zygoten sind diploide Zellen, die durch die Verschmelzung haploider Gameten entstehen [24]. 1969 veröffentlichte Ford eine Übersichtsarbeit zu Mosaiken und Chimären, in denen er den unterschiedlichen Ursprung für Chimerismen beschreibt [29].

Der Begriff Chimär oder auch Chimerismus kommt in verschiedenen Disziplinen der Medizin, den Naturwissenschaften und auch den Geisteswissenschaften vor. Diese Arbeit beschränkt sich auf die Betrachtung des Chimerismus in der Medizin.

Heute wird mit dem Begriff Chimär allgemein ein Organismus bezeichnet, der aus Zellen unterschiedlicher Herkunft besteht [19]. Chimäre im menschlichen Organismus können in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden: Blutgruppenchimäre, Immunchimäre und Strahlungschimäre. Blutgruppenchimäre können zum Beispiel zweieiige Zwillinge sein, bei denen plazentare Gefäßanastomosen vorliegen: Erythrozyten und Blut bildende Zellen können dabei zwischen den Zwillingen ausgetauscht werden. Bei jedem Zwilling finden sich dadurch Erythrozyten mit unterschiedlichen Blutgruppenmerkmalen.

Immunchimäre treten auf, wenn auf einen immunkompetenten Organismus in der Neonatalperiode lymphatische Zellen übertragen werden und eine Immuntoleranz gegen die Histokompatibilitätsantigenprodukte des Spenderstammes gebildet wird. Da das Immunsystem noch nicht vollständig entwickelt ist, kommt es dabei nicht zu einer Host-versus-Graft-Reaktion, sondern zu einer endogenen Toleranz der Histokompatibilitäts-AG der Graft-Zellen, die zuvor appliziert wurden. Strahlungschimären entstehen, wenn die eigene physiologische Immunabwehr durch hohe Dosen ionisierender Strahlung zerstört wird und ein neues Immunsystem entwickelt wird, z.B. bei einer Knochenmarktransplantation [19].

Kommen nur geringe Mengen organismusfremder Zellen oder DNA im Organismus vor, werden sie als Mikrochimerismus (MC) bezeichnet. Die freie DNA oder noch intakte fremde Zellen können im Blut des Empfängers zirkulieren oder sich in unterschiedlichen Geweben

einnisten [69]. Die Entstehung eines MC kann vielfältige Ursachen haben, die in natürlich und iatrogen eingeteilt werden. Die häufigste Quelle für einen natürlichen MC ist der bidirektionale Blutaustausch zwischen Mutter und Kind in der Schwangerschaft [79], ebenso kann es auch bei Mehrlingsschwangerschaften und Aborten zum Blutaustausch kommen. Doch auch bei manchen Frauen, die keinen Sohn haben, kann männliche DNA gefunden werden [108]. Als Quelle kommen dabei unbemerkte Spontanaborte, nicht entwickelte männliche Zwillinge und Geschlechtsverkehr in Frage.

Im Bereich der Transfusionsmedizin konnten erste Erfahrungen zum Chimerismus gesammelt werden, als die Blutübertragung von Mensch zu Mensch möglich wurde. Voraussetzung für erfolgreiche Bluttransfusionen war das 1900 entdeckte AB0-Blutgruppensystem, das bis heute neben weiteren Merkmalen die Kompatibilität von Blut und Gewebe bestimmt [35]. Bei AB0-inkompatiblen Transfusionen treten Alloantikörper (Isoagglutinine) gegen die AB0-Blutgruppenantigene auf, die sehr lange persistieren können. Klinisch relevante Alloantikörper gegen Blutgruppenantigene treten erst nach einer Immunisierung infolge von Transfusion oder Schwangerschaft auf, es bedarf also einer etwas größeren Menge Blut [35]. Bluttransfusionen können zudem immunmodulatorische Effekte haben. Durch verschiedene Blutprodukte kann es zu einer leichten Immunsuppression kommen, die zu einer niedrigeren Abstoßungsrate von transplantierten Organen führt und die Rezidivrate bei Autoimmunerkrankungen wie dem Morbus Crohn senken kann [35].

Bei der Transfusion von mononukleären Zellen hängt die Persistenz der Leukozyten von verschiedenen Faktoren ab: Menge der allogenen Leukozyten, Immunkompetenz des Empfängers, Unterschiede in den Antigenen von Spender und Empfänger sowie die weitgehend fehlende Übereinstimmung der humanen Leukozyten Antigene (HLA) [84].

Bei malignen Erkrankungen des Blutes ist die Knochenmarktransplantation ein möglicher kurativer Ansatz. Bei der Knochenmarktransplantation erhält der Empfänger immunkompetente Zellen von einem Spender. Zuvor ist das eigene Immunsystem des Empfängers durch ionisierende Strahlung und / oder Chemotherapie zerstört worden. Bei der Auswahl des Spenders muss auf eine möglichst große Übereinstimmung der Oberflächenantigene zwischen Spender und Empfänger geachtet werden, um das Risiko einer Graft-versus-Host-Reaktion oder auch einer Host-versus-Graft-Reaktion zu minimieren. Die Transfusionsmedizin hat daher lange nach Markern gesucht, um einen Chimerismus im Organismus nach der Knochenmarktransplantation detektieren können [35].

1.4 Mikrochimerismus im mütterlichen Organismus

Die Toleranz von allogenen Gewebe ist ein Forschungsschwerpunkt in der Neonatologie. Der Fetus wird von der Mutter toleriert, obwohl es sich um semi-allogenes Gewebe handelt. Das mütterliche Immunsystem erkennt die HLA-Antigene des Vaters und bildet Antikörper gegen diese Antigene. Damit es nicht zu einem Abbruch der Schwangerschaft kommt, muss das mütterliche Immunsystem den Fetus aktiv tolerieren. Dazu gibt es verschiedene Mechanismen, die die Immunantwort unterdrücken [45]. Trotzdem haben Frauen, die einen weitestgehend HLA-kompatiblen Fetus haben, während und nach der Schwangerschaft häufiger MC als Frauen mit HLA-inkompatiblen Feten [15]. Im Tiermodell konnte zudem beobachtet werden, dass allogene MC schneller aus dem Organismus verschwinden als syngene MC [14]. Es wird vermutet, dass feto-maternale MC aus diesem Grund wesentlich länger persistieren können als MC, die durch Fremdbluttransfusionen oder Geschlechtsverkehr entstehen. Es gibt Hinweise, dass zelluläre MC das Geschlecht nachfolgender Kinder beeinflussen können. Studien deuten darauf hin, dass es Unterschiede bei der Vererbung von geschlechtsabhängigen HLA-Allelen auf männliche und weibliche Nachkommen gibt [55]. Mütter scheinen nach der Geburt eines Sohnes weibliche Feten besser tolerieren zu können als männliche, was in einer Studie von Komlos et al. gezeigt werden konnte. Hier lag der Anteil von Mädchen nach der Geburt eines Sohnes bei 75% [54].

1.5 Mikrochimerismus bei gesunden Frauen

Die häufigste Quelle für einen MC ist die Schwangerschaft. Die Plazenta ist vor der Geburt die Schnittstelle zwischen Mutter und Kind. Die Entstehung eines MC durch feto-maternalen oder materno-fetalen Blutaustausch ist ein physiologischer Prozess, ebenso wie der fetofetale-Blutaustausch bei Mehrlingsschwangerschaften und bei Aborten. Mittels verschiedener Methoden kann nachgewiesen werden, dass fetale Zellen im mütterlichen Organismus zirkulieren [69]. Bei schwangeren Frauen konnten von Lo et al. 1997 fetale DNA durch das Y-Chromosom im mütterlichen Vollblut, Plasma und Serum nachweisen [65]. Die überwiegende Mehrzahl der Studien befassen sich mit dem Vorkommen männlicher DNA im weiblichen Blut, da das Y-Chromosom methodisch vergleichsweise einfach detektiert werden kann. Mittlerweise kann auch fetale RNA im mütterlichen Plasma nachgewiesen werden. Dies wird für verschiedene pränatale Tests genutzt.

Der Austausch von fetalen und mütterlichen Zellen beginnt schon früh in der Schwangerschaft, wie Schröder et al. bereits 1974 nachweisen konnten. Dabei werden vom Kind mehr Zellen auf die Mutter übertragen als umgekehrt [90, 91]. Lo et al. konnten zeigen, dass weniger mütterliche Zellen oder freie DNA im Nabelschnurblut gefunden werden konnte als kindliche Zellen oder freie DNA zum gleichen Zeitpunkt im mütterlichen Blut [105]. Während der Schwangerschaft sind ab der 4.-5. Gestationswoche fetale DNA und Zellen nachweisbar [3, 98]. Nach der 24. Gestationswoche steigt die Konzentration stetig an und hat zum Zeitpunkt der Geburt den höchsten Wert [3]. Im dritten Trimenon liegt der Anteil von Frauen ohne nachweisbaren MC nur noch bei 10-20% [105]. Nach der Entbindung sinkt die Konzentration wieder bis unter die Nachweisgrenze. Durch Nutzung unterschiedlicher Methoden (z.B. PCR oder FISH) unterschieden sich auch die gemessenen Konzentrationen und die Zeitpunkte, bis kein MC mehr nachweisbar war. Bei den Zellen, die in den mütterlichen Organismus übertreten, handelt es sich hauptsächlich um Stammzellen, unreife Erythrozyten oder Lymphozyten [22].

1996 konnten Bianchi et al. Jahrzehnte nach der Schwangerschaft fetale DNA im mütterlichen Blut nachweisen. Sie untersuchten das Vorkommen männlicher DNA bei Schwangeren und bei Frauen, deren Geburt eines Sohnes zwischen 6 Monaten und 27 Jahren zurücklag. Sie fanden bei 13 von 19 Schwangeren die DNA des männlichen Fetus und bei 6 der 8 Frauen, die bereits vor längerer Zeit entbunden hatten [12].

1.6 Nachweismöglichkeiten des feto-maternalen Mikrochimerismus

Der Nachweis von Chimären im Organismus kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Die heute gängigste Methode ist der Nachweis durch die PCR. Als 1997 bekannt wurde, dass neben fetalen kernhaltigen Zellen auch fetale freie DNA im Blut der Mutter gefunden werden kann [65], kam dem MC-Nachweis mittels PCR eine noch größere Rolle zu. Freie, organismusfremde DNA kommt in größerem Umfang im Blut vor als organismusfremde intakte Zellen [13, 66, 68]. Während der Schwangerschaft konnten sowohl freie DNA als auch fetale Zellen ab der vierten Gestationswoche von Illanes et al. und Nguyen Huu et al. nachgewiesen werden [44, 80].

Zum Nachweis von MC in Zellverbänden, wie der Haut, der Lunge, der Leber und vielen anderen Geweben kann die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) genutzt werden [27, 46]. Die intakten zellulären MC siedeln sich in verschiedenen Geweben an und können dort mittels FISH nachgewiesen werden. Beispiele hierfür sind: Loubiere im Blut [70], Lambert et

al.[61] im Gewebe der Nieren und des Herzens, Kaplan et al. [48] in Gehirn und Lunge, Zhou et al. in der Leber [109] oder Nelson et al. im Pankreas [78]. Arlett et al. konnten 1998 fetale DNA in Hautläsionen bei Frauen mit systemischer Sklerose nachweisen [7]. Auch in entzündlich veränderten Speicheldrüsen von Patientinnen mit Sjögren Syndrom konnten Kuroki et al. 2002 mittels FISH MC nachweisen [60].

1.7 Nachweis des Mikrochimerismus während der Schwangerschaft

Die Untersuchung von MC im Organismus der Mutter während der Schwangerschaft ist von besonderem Interesse, da sie eine Möglichkeit für nicht-invasive diagnostische Tests darstellt. Bei der Suche nach MC während der Schwangerschaft ist die Prävalenz des MC von der Gestationswoche abhängig [33, 80]. Kou fand eine Zunahme der Konzentration von fetalen kernhaltigen Zellen mit einem Maximum im zweiten Trimenon und einen Abfall der Konzentration bis zum Ende der Schwangerschaft. Post partum waren nach wenigen Wochen nur noch vereinzelt MC nachweisbar; nach 3 Monaten konnten keine MC mehr nachgewiesen werden [59]. Hamada et al. wiesen MC in Form von kernhaltigen Zellen ab der 15. Schwangerschaftswoche (SSW) nach. Mit zunehmendem Gestationsalter stieg der Anteil der fetalen Zellen im mütterlichen Blut ebenfalls an, von 1:100 000 Zellen während der Schwangerschaft auf 1:10 000 Zellen am Ende der Schwangerschaft [33]. Nach der Entbindung können sowohl fetale Zellen als auch fetale freie DNA zunehmend seltener nachgewiesen werden. Lo et al. zeigten, dass fetale DNA bereits zwei Stunden nach der Entbindung bei den meisten Frauen aus dem Blut eliminiert wurde [67]. Dazu nutzen sie den Nachweis des SRY Gens auf dem Y Chromosom mittels PCR bei 12 Frauen zu verschiedenen Zeitpunkten kurz nach der Geburt ihres Sohnes. Die Elimination von MC nach der Geburt konnten Studien von Ariga et al. [3], Osada et al.[81], Thomas et al. [99] und Hamada et al. [34] zeigen.

Barleben et al. zeigen das Auftreten des MC bei gesunden Frauen unter der Geburt und damit assoziierter Schwangerschaftskomplikationen einen typischen Verlauf mit Anstieg der Prävalenz bis zur Geburt und anschließendem Abfall. 1-2 Monate vor der Geburt wiesen alle Frauen ein MC auf, zum Zeitpunkt der Geburt noch 70% der Frauen. 1 Tag post partum wurden noch bei 48%, zwei Tage später bei 25%, 3-6 Tage nach Entbindung bei 21% MC nachgewiesen. Bei 4% der Frauen, deren Entbindung mehr als 4 Jahre zurück lag, wiesen sie einen MC nach [11]. Die dabei verwendete Methode zum Nachweis des MC gleicht dabei der hier verwendeten, sodass ein direkter Vergleich zwischen den Daten möglich ist.

1.8 Langzeitpersistenz des Mikrochimerismus

Neben dem zeitlich unmittelbaren Effekt von Mikrochimerismen auf den Organismus, zum Beispiel im Rahmen von Toleranz des Feten und Schwangerschaftskomplikationen, kann auch eine Langzeitpersistenz von MC eine große Bedeutung für den Organismus haben. Besonders bei Patientinnen mit Autoimmunkrankheiten wird vermutet, dass fremde DNA Autoimmunreaktionen des Körpers induziert oder begünstigt.

Ein weiterer Ansatzpunkt dieser Überlegungen ist, dass ein verändertes Apoptoseverhalten bei Autoimmunerkrankungen die Persistenz von MC ermöglichen könnte [20]. Der Abbau von apoptotischen Zellen ist ein wichtiger Vorgang zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase und der Reaktion auf Gewebeuntergang. Die Aufnahme apoptotischer Zellen hat einen antiinflammatorischen Effekt. Der Aufnahmeprozess von apoptotischen Zellen durch phagozytierende Zellen kann in verschiedene Phasen unterteilt werden. Zunächst muss ein Kontakt zwischen beiden Zellen stattfinden. Apoptotische Leukozyten kommen mit Phagozyten in Kontakt, wenn sie im Blutstrom durch die Milz und die Leber zirkulieren. Durch die Sekretion eines chemotaktischen Signals werden die Monozyten von den apoptotischen Zellen angelockt.

Der zweite Schritt besteht darin, dass die phagozytierenden Zellen die absterbenden Zellen erkennen. Dies wird durch eine Änderung der Zusammensetzung der Zellmembran der absterbenden Zelle ermöglicht. Durch die Änderungen an der Zelloberfläche kann die phagozytierende Zelle direkt an die absterbende Zelle binden oder aber ein Serumprotein (Opsonin) dient als Bindeglied zwischen den Zellen. Zu den Mechanismen, die dem Aufnahmevorgang zugrunde liegen, gibt es bisher erst wenig Erkenntnisse [25]. Fournie beschrieb, dass freie DNA im Plasma ein Marker für den Zelluntergang sein könnte [30] und vermutet, dass die fetalen Zellen beim Eintritt in den mütterlichen Organismus zerstört würden oder deren Apoptose induziert wird [21]. 2000 untersuchten Halicka et al., wie zirkulierende DNA während der Apoptose in Apoptosekörperchen gespeichert wird und vor einem Abbau durch das mütterliche Immunsystem geschützt bleibt [32]. Die Apoptosekörperchen mit fetaler DNA konnten von Bischoff et al. im mütterlichen Plasma nachgewiesen werden und Y-Chromosom-spezifische Gene konnten aus dem Inhalt der Körperchen amplifiziert werden [14].

1.9 Mikrochimerismus bei Autoimmunerkrankungen wie der systemischen Sklerose

Die systemische Sklerose ist eine Autoimmunerkrankung, die pathogenetisch eine große Ähnlichkeit mit einer Graft-vs-Host-Reaktion zeigt und Frauen achtmal häufiger als Männer betrifft. Aufgrund dieser Ähnlichkeit wurde schon seit vielen Jahren nach einem Zusammenhang zwischen MC und der Erkrankung gesucht [8]. Die systemische Sklerose ist auch die erste Autoimmunerkrankung, bei der ein gehäuftes Auftreten von MC nachgewiesen werden konnte. In einer Studie untersuchten Nelson et al. 16 gesunde Kontrollen, 17 Sklerodermie-Patientinnen und 17 gesunde Schwestern der teilnehmenden Sklerodermie-Patientinnen. Zum Nachweis des MC wurde eine Sequenz auf dem Y-Chromosom mittels PCR amplifiziert. Im Blut der Sklerodermie-Patientinnen konnten signifikant ($p=0,0007$) mehr fetale DNA Äquivalente gefunden werden als bei den Kontrollen. Die Geburt des jüngsten Sohns lag bei den Kontrollen im Durchschnitt 15,4 Jahre zurück, bei den Sklerodermie-Patientinnen 18,5 Jahre [77].

Artlett et al. untersuchten Unterschiede bei der Vererbung von HLA Klasse I und II Haplotypen bei 37 Sklerodermie-Patientinnen und 42 gesunden Frauen. Bei 70% der Sklerodermie-Patientinnen konnten HLA II Allele gefunden werden, die entweder mit denen ihrer Söhne oder ihrer Mütter kompatibel waren. Bei gesunden Frauen lag der Anteil mit 21% deutlich niedriger [6]. Nelson et al. konnten zeigen, dass eine HLA-Kompatibilität zwischen an Sklerodermie erkrankter Mutter und ihren Kindern häufiger auftritt [77]. Die Ergebnisse von Artlett et al. können die These unterstützen, dass HLA kompatible MC besser vom Organismus toleriert werden und so länger persistieren. Dass mit steigender HLA Kompatibilität auch mehr MC toleriert werden, konnte bereits im Tierversuch bestätigt werden [15].

Es gibt Studien, die darauf hinweisen, dass Immunreaktionen im mütterlichen Organismus von aktivierten fetalen T-Lymphozyten getriggert werden können [61], was einen Einfluss auf eine Vielzahl von Autoimmunerkrankungen haben kann. Es gibt aber auch Überlegungen, ob der MC nur ein Indikator eines Entzündungsprozesses ist, ohne einen Effekt auf die Pathogenese zu haben [9]. Im Vergleich zur Sklerodermie zeigen Studien zu MC bei biliärer Zirrhose und Sjögren Syndrom keine sichere Assoziation von Erkrankung und MC [71, 100].

1.10 Zusammenfassung und Fragestellung

Die pathophysiologischen Mechanismen bei der Entstehung von Autoimmunerkrankung sind vielgestaltig und nicht vollständig verstanden. Frauen erkranken häufiger als Männer an Autoimmunerkrankungen und Schwangerschaften haben häufig einen Einfluss auf Verlauf und Epidemiologie der Erkrankung. Da der feto-maternale MC über viele Jahre im mütterlichen Organismus persistieren kann, wird ein Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen vermutet. Studien zum MC bei Autoimmunerkrankungen zeigen bisher widersprüchliche Ergebnisse. Durch unterschiedliche Methoden und Einschlusskriterien für die Patienten sind die Ergebnisse eingeschränkt vergleichbar. Ein Vergleich der MC Prävalenzen zwischen verschiedenen Erkrankungen war ebenfalls bisher nicht möglich. Ob das Auftreten eines MC ein krankheitsmodellierenden Effekt hat, ist bisher unklar.

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses eines feto-maternalen MC auf die Krankheitsbilder rheumatoide Arthritis und systemischer Lupus erythematodes. In dieser Arbeit werden neben der Prävalenz des MC auch krankheitsspezifische Parameter und der Krankheitsverlauf in Abhängigkeit von einem MC untersucht. Für den Nachweis des MC im mütterlichen Blut wurde bei den untersuchten Kohorten dieselbe Methode verwendet. Dadurch ist ein direkter Vergleich der Prävalenz des MC bei RA, SLE und gesunden Kontrollen möglich. Die Analyse der Daten von 143 Frauen ermöglichte die Untersuchung eines Einflusses von MC auf den Krankheitsverlauf. Die Ergebnisse werden mit anderen Studien hinsichtlich Krankheitsbildern, Studiendesign und Methoden verglichen.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

Für die Untersuchung wurden Frauen angeschrieben, die entweder an einer RA oder an einem SLE erkrankt waren, sowie gesunde Probandinnen für die Kontrollgruppe. Alle zu untersuchenden Frauen wurden über Inhalt und Ziel der Studie, Zweck der Blutentnahme, sowie über die Freiwilligkeit der Studienteilnahme und über die Gewährleistung des Datenschutzes aufgeklärt. Alle Probandinnen erhielten einen Informationsbogen über die geplanten Untersuchungen (**Anlage 1**). Mittels eines Fragebogens wurden anamnestische Daten wie frühere Geburten, Komorbiditäten und der Erhalt von Bluttransfusionen erfragt, sowie der Krankheitsverlauf erfasst (**Anlage 2**).

Voraussetzung für die Teilnahme war die Unterzeichnung einer Einverständniserklärung (**Anlage 3**). Für die geplante Untersuchung lag ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg vor.

Die Einschlusskriterien in allen drei Gruppen waren:

- Geburt von mindestens einem Sohn
- Zeitpunkt der Geburt des ersten Sohnes lag vor dem Zeitpunkt der Diagnosestellung der RA bzw. des SLE

Die Ausschlusskriterien in allen drei Gruppen waren:

- Erhalt von Fremdbluttransfusionen oder Organtransplantationen
- Fehlgeburtlichkeit

Für alle Probandinnen wurden das Alter zum Untersuchungszeitung, das Alter bei Geburt des jüngsten und des ältesten Sohns und die Anzahl der Söhne bzw. Töchter ermittelt.

2.1.1 Patienten mit rheumatoider Arthritis

Im Zeitraum 2006 bis 2010 wurden Patientinnen mit bekannter RA angeschrieben. Dabei konnte das RABBIT-Register genutzt werden. In diesem Register bringt die Klinik für Rheumatologie in Vogelsang-Gommern im Rahmen einer bundesweiten Dokumentation RA-Patienten zur Langzeitdokumentation ein. Durch die Nutzung dieser Datenbank konnten insbesondere Patienten mit mehrjährigem Krankheitsverlauf angesprochen werden. Mittels eines Fragebogens wurde postalisch erfragt, ob die Patientinnen die Einschlusskriterien erfüllten (**Anlage 2**). Dabei wurde gezielt nach Anzahl der Geburten von Söhnen und Töchtern und Fehlgeburten gefragt. Desweiteren wurden die Patientinnen nach Fremdbluttransfusionen, Komorbiditäten, Krankheitsverlauf und Erkrankungen der Kinder befragt.

Von 300 Rheumapatientinnen aus der Datenbank der Klinik für Rheumatologie in Vogelsang-Gommern, die angeschrieben wurden, antworteten 146 Patientinnen. Davon erfüllten 73 alle Einschlusskriterien. Etwa die Hälfte der angeschriebenen Patientinnen hatte eigenanamnestisch Fremdbluttransfusionen erhalten oder hatte keine Söhne.

Anhand der Patientenakten und der Röntgenbilder wurde die Diagnose RA nochmals überprüft. Die Kriterien der Diagnosestellung orientieren sich dabei an den ACR-Kriterien von 1987 [5].

Zur Charakterisierung der Patienten wurden zusätzlich erfasst:

- Alter der Patientin bei Diagnosestellung
- RF, CCP-AK
- Basistherapeutika/Biological-Therapie
- Ausmaß der Gelenkzerstörung im Röntgenbild nach Steinbrockerklassifikation

2.1.2 Patienten mit systemischem Lupus erythematoses

Im Zeitraum 2009 bis 2010 wurden 80 SLE-Patientinnen angeschrieben. Die Patientinnen befanden sich in der Klinik für Rheumatologie in Vogelsang-Gommern in Behandlung und konnten durch eine Datenabfrage der Ambulanz-Software ermittelt werden. Mit einem Fragebogen wurde dann postalisch erfragt, ob die Patientinnen die Einschlusskriterien erfüllten (**Anlage 2**). Dabei wurde gezielt nach Anzahl der Geburten von Söhnen und Töchtern und Fehlgeburten gefragt. Desweiteren wurden die Patientinnen nach Fremdbluttransfusionen, Komorbiditäten, Krankheitsverlauf und Erkrankungen der Kinder befragt. Von 30 Patientinnen wurde der Fragebogen vollständig ausgefüllt zurück gesendet. 16 Patientinnen erfüllten alle Einschlusskriterien und wiesen keine Ausschlusskriterien auf. Die Diagnosestellung wurde durch Sichtung der Patientenakten überprüft. Die Abgrenzung zu anderen Kollagenosen orientierte sich dabei an den revidierten ACR-Kriterien von 1997 [42]. Zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs und der Schwere der Erkrankung wurden zusätzlich erfasst:

- Alter des Patienten bei Diagnosestellung
- Anti-ds-DNA-AK
- Komplementfaktoren C3, C4
- hämolytische Aktivität des Komplementsystems CH50
- löslicher IL2-Rezeptor
- immunsuppressive Therapie

2.1.3 Kontrollgruppe

52 Frauen aus der Kontrollgruppe wurden aus dem Mitarbeiterkreis der Universitätsfrauenklinik Magdeburg rekrutiert, 2 Frauen waren ambulante Patientinnen der Klinik für Rheumatologie Vogelsang-Gommern, die zum Ausschluss einer Autoimmunerkrankung vorstellig waren. Bei ihnen waren bis zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Autoimmunerkrankungen bekannt, aber alle hatten zu einem früheren Zeitpunkt mindestens einen Sohn geboren. Die Frauen der Kontrollgruppe entstammten aus einer vorangegangenen Studie zur Prävalenz des MC unter der Geburt und damit verbundene Geburtskomplikationen. Die Ergebnisse zur MC Prävalenz wurden freundlicher Weise von Maria Barleben bereit gestellt [11].

2.2 Material und Methoden

Die Entnahme von peripher-venösem Blut für die Untersuchung auf MC erfolgte in der Universitätsfrauenklinik Magdeburg, in der Klinik für Rheumatologie in Vogelsang-Gommern oder bei den Hausärzten der Patientinnen. Entnommen wurde einmalig 4 ml Blut in einer EDTA-Küvette. Innerhalb von höchstens zwei Tagen (Lagerung bei Raumtemperatur) wurden die Blutproben aufgearbeitet.

Laborparameter für die Erfassung des Krankheitsverlaufs der Patientinnen wurden bei Routineuntersuchungen in der Klinik für Rheumatologie in Vogelsang-Gommern bestimmt. Die Entnahmebedingungen für die Blutproben zur Feststellung eines MC waren bei der RA Gruppe, der SLE Gruppe und der Kontrollgruppe identisch.

2.3 DNA -Extraktion

Die genomische DNA wurde unter Verwendung des QIAamp® DNA Blood Midi Kit der Firma QIAGEN, Hilden, Deutschland, extrahiert. Die Präparation erfolgte entsprechend den Herstellerangaben aus frischen oder aufgetauten und homogenisierten Blutproben. Folgende Arbeitsschritte wurden durchgeführt:

2 ml EDTA-Blut wurden mit 200 µl QIAGEN Protease und 2,4 ml AL Puffer (Lyse-Puffer) vermischt. Während der Inkubation im Wasserbad (10 min, 70°C) wurden die zellulären Bestandteile des Blutes lysiert.

Anschließend wurde das Blut mit 2 ml 100%igem unvergälltem, wasserfreien Ethanol gemischt und in die QIAamp Midi Spin Säulen pipettiert.

Das Einbringen der Proben in die Midi Säule erfolgte in 2 Schritten à 3 ml mit anschließender Zentrifugation der Säulen bei 1850 g für 3 Minuten. Bei diesem Vorgang wird die DNA an eine Silicamembran in der Säule gebunden.

Anschließend wurde die Membran nacheinander mit jeweils 2 ml der Puffer AW1 bzw. AW2 gespült (Zentrifugation mit 3220 g für 3 min). Durch Zugabe von 300 µl AE Puffer, 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, sowie einem anschließenden Zentrifugationsschritt (3220 g für 5 Minuten) wurde die DNA von der Säule eluiert.

2.4 Bestimmung der DNA Konzentration mittels Spektrometer

Im Anschluss an die Extraktion der DNA wurde die DNA-Konzentration und Reinheit im Eluat mit Hilfe eines UV-Spektralphotometers gemessen. Die DNA-Konzentration kann mit dieser Methode aus der gemessenen optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260nm, der Verdünnung und einem spezifischen Multiplikationsfaktor berechnet werden.

10 µl der DNA-Lösung wurden nach Nullwertbestimmung mit AE Puffer in die Quarzküvette gefüllt. Die Messung der Extinktion der DNA erfolgt bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Die Bestimmung der Reinheit erfolgte anhand des Quotienten aus E_{260}/E_{280} , der zwischen 1,7 und 1,9 liegen sollte.

2.5 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde Mitte der 1980er Jahre von Kary Mullis entwickelt, der 1993 den Nobelpreis für seine Entwicklung erhielt [74]. In nur wenigen Jahren wurde die PCR zu einer der wichtigsten Methoden der Molekularbiologie. Mit Hilfe der PCR können definierte DNA-Fragmente nachgewiesen und vervielfältigt werden. Benötigt werden dazu eine thermostabile Polymerase (Taq-Polymerase), eine geringe Menge Ausgangs-DNA (Template-DNA), zwei Oligonukleotidprimer (Sense- und Antisense-Primer), Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTP), Pufferlösung und $MgCl_2$ in einer bestimmten Konzentration. Im Thermocycler läuft die PCR dann in mehreren Schritten ab. Zunächst wird bei der Denaturierung die Template-DNA auf 94°C erhitzt, wodurch die beiden Stränge der DNA getrennt werden. Im zweiten Schritt, dem Annealing, lagert sich das Primerpaar an die DNA-Stränge an. Die Temperatur muss dazu konstant beim Temperaturoptimum gehalten werden, das für den jeweiligen Primer spezifisch ist. Im dritten Schritt, der Elongation, erfolgt die Zweistrangsynthese der DNA bei einer Temperatur, die dem Arbeitsoptimum der Taq-Polymerase entspricht. Die dNTP komplementieren dabei die einzelsträngige Template-DNA, so dass wieder Doppelstrang-DNA entsteht. Die Menge der gewünschten DNA-Fragmente wird bei diesem Schritt durch die entstehenden PCR-Produkte unter optimalen Bedingungen maximal verdoppelt. Durch eine Wiederholung der Zyklen steigt die Ausbeute an identischen PCR-Produkten annähernd exponentiell an. Eine Darstellung der PCR-Produkte ist mit der Agarose-Gelelektrophorese mit Einbau eines interkalierenden Farbstoffs möglich.

2.5.1 Nested PCR zum Nachweis fetaler DNA im mütterlichen Blut

Da bei der Erhöhung der Zykluszahl auch die Fehlhybridisierungen zunehmen, eignet sich für den Nachweis sehr kleiner Mengen Template-DNA die Methode der nested PCR. Durch Nutzung eines zweiten Primerpaares, das innerhalb der Bindungsstellen des ersten Primerpaares ansetzt, wird die PCR sensitiver und Nebenprodukte werden reduziert (Abbildung 1).

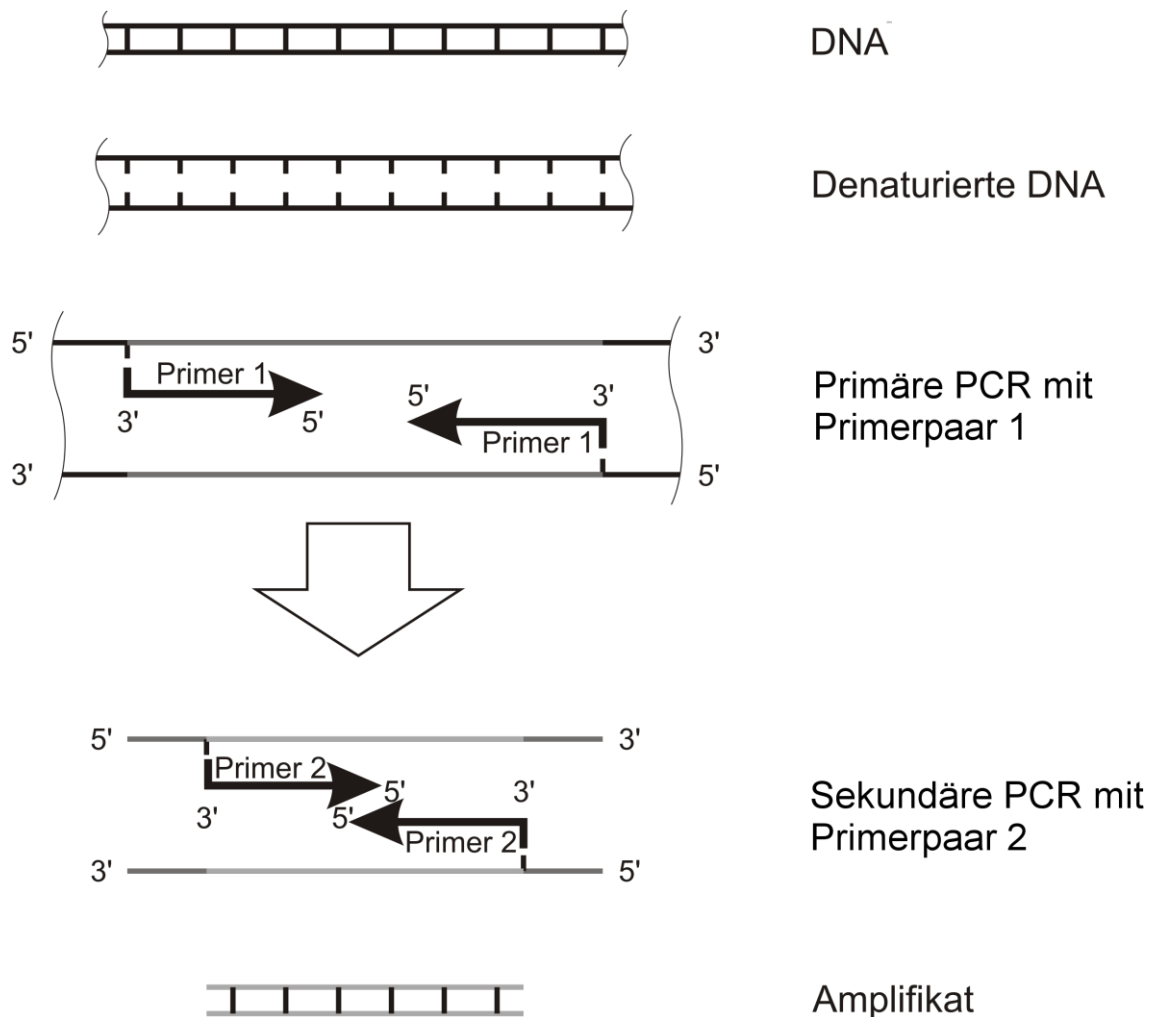


Abbildung 1: Funktionsweise der nested PCR

Zum Nachweis männlicher DNA kann eine Sequenz amplifiziert werden, die auf dem kleinen Arm des Y-Chromosoms liegt und ein Teil des Gens *DYS 14* (auch *TSPY* genannt) ist. Das humane *TSPY*-Gen wurde 1987 von Arnemann et al. beschrieben [4]. Für die Amplifikation in der primären und sekundären PCR wurden Primerpaare mit folgenden Sequenzen verwendet:

primäre PCR:

Y3forward: 5´ - ATG CGG CAG AGA AAC CCT TG - 3´

Y3reverse: 5´ - TAA GGC CTC CTG TGT TCA CG - 3´

sekundäre PCR:

Y4forward: 5´ - CAG AAG CGA GTT CAG AGC AG - 3´

Y4reverse: 5´ - TTC TGA GGC TGA CTG CAC TG - 3´

Zu den Primereigenschaften gehören eine Länge von 20 Basen, ein GC-Anteil von 55%, sowie eine Schmelztemperatur von 59,4 °C.

Bei der ersten PCR mit den Primern Y3R und Y3F entsteht ein 278 bp langes Fragment, das als Template für eine zweite PCR genutzt wird. Die bei der zweiten PCR verwendeten Primer Y4R und Y4F amplifizieren ein 186 bp langes Fragment [104]. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes der ersten und der zweiten PCR unterscheiden sich nur im Mengenverhältnis und im Reaktionsvolumen, die PCR Bedingungen sind in **Tabelle 1** dargestellt. Im Thermoprofil unterschied sich für beide PCR nur in der Anzahl der Zyklen. Das Profil ist in **Tabelle 2** aufgeführt. Die Primerpaare wurden von der Firma MWG (Ebersberg, Deutschland) bezogen und aliquotiert als Stammlösung in einer Konzentration von 100 pmol/µl bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert. Alle Arbeitsschritte zur Zubereitung des Reaktionsansatzes wurden zur Vermeidung von Kontaminationen in einer Plexiglasbox durchgeführt. Nur die DNA bzw. die Amplifikate aus der ersten PCR wurden außerhalb der Box zugefügt.

Als Kontaminations-Kontrolle wurden Aqua dest., als Positivkontrolle DNA eines männlichen DNA Spenders in einer Verdünnung von 1:20.000 mitgeführt. Die Wasserkontrolle der ersten PCR wurde auch in der zweiten PCR mitgeführt.

Die Laborräume, in denen die DNA aus dem Patientenserum extrahiert und die PCR durchgeführt wurde, wurden nur von weiblichem Personal genutzt um Kontaminationen weitestgehend zu vermeiden.

Tabelle 1: Reaktionsansatz für die primäre und sekundäre PCR

Komponenten	primäre PCR (Y3F, Y3R)	sekundäre PCR (Y4F, Y4R)
H ₂ O	32,3µl	12,3 µl
PCR-Puffer (10x)	5 µl	2 µl
dNTP-Mix (2mM)	4 µl	2 µl
Primer (je 20 pm/µl)	je 1 µl	je 0,5 µl
MgCl ₂ (50mM)	1,5 µl	0,6 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	0,1 µl
Template-DNA	5 µl	2 µl
Reaktionsvolumen	50 µl	20 µl

Tabelle 2: Thermoprofil zur spezifischen Amplifikation

	Primäre PCR		sekundäre PCR	
Denaturierung	5 min	94°C	5 min	94°C
Denaturierung	1 min	94°C	1 min	94°C
Annealing	1 min	63°C	1 min	63°C
Elongation	1 min	72°C	1 min	72°C
Anzahl Zyklen	35		25	
Elongation	10 min	72°C	10 min	72°C
Anzahl Zyklen	35		25	

2.6 Agarosegelelektrophorese

Zur Darstellung der PCR-Produkte wurden 10µl jedes PCR-Produktes mit 3µl eines farbmarkierten Gelladepuffers vermischt und auf das Agarosegel aufgetragen. Dem 2%igen Agarosegel in 1xTBE-Puffer wurde bei der Herstellung im Verhältnis 0,25 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Zur Identifizierung der PCR-Produkte wurde zusätzlich ein 100 Basenpaar-Längenstandard auf das Gel aufgetragen. Das Agarosegel wurde in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit Elektrodenpuffer (1 x TBE) übergossen. Bei einer Spannung von 100 V wanderten die PCR-Produkte durch die Gelmatrix. Die negativ geladene DNA wurde im elektrischen Feld zur Anode gezogen. Durch die unterschiedliche Länge der DNA-Fragmente wandern die PCR-Produkte unterschiedlich weit durch das Gel. Unter UV-

Licht fluoresziert das Ethidiumbromid im Gel, das sich zwischen der DNA angelagert hat. Die Größe der Fragmente lässt sich anhand des 100 Basenpaar-Längenstandards beurteilen. Mit einer Kamera mit integriertem Rotfilter wurden die Gele zur Dokumentation fotografiert. Die Fotografie des Gels der ersten PCR zeigt noch Banden von Nebenprodukten und die Bande bei 278 bp ist noch nicht eindeutig zu sehen (**Abbildung 2**). Bei der zweiten PCR wurden die Nebenprodukte reduziert, wodurch die Spezifität und die Sensibilität gesteigert wurde. Die gesuchte Bande bei 186 bp konnte deutlich sichtbar gemacht werden (**Abbildung 3**).

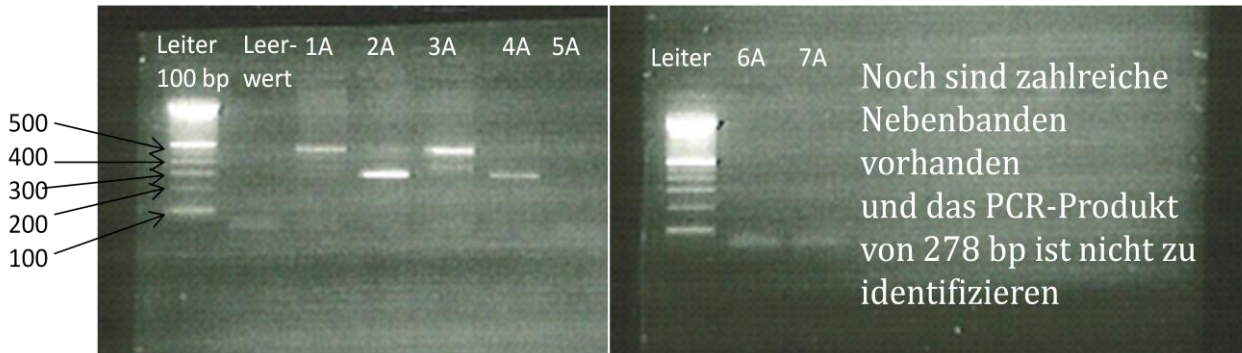


Abbildung 2: Gelfoto der primären PCR

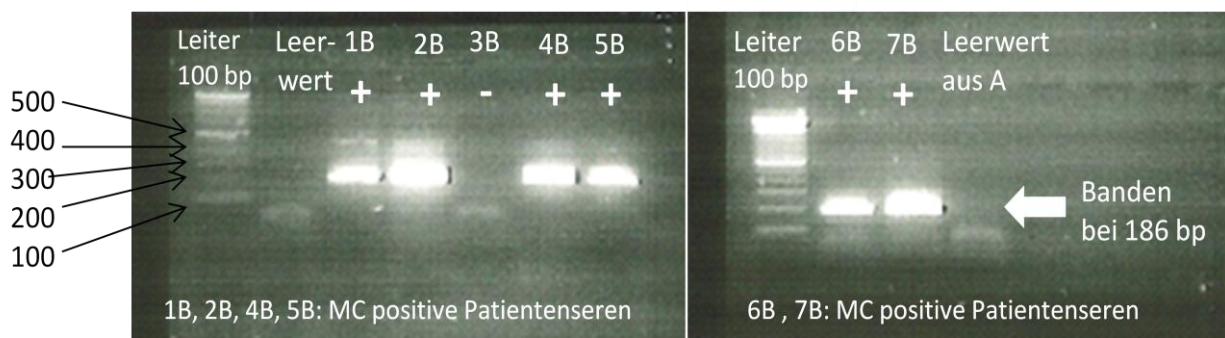


Abbildung 3: Gelfoto der sekundären PCR

Jede PCR mit Patientenserum wurde mindestens einmal wiederholt, um das Ergebnis der ersten PCR zu bestätigen. Im Falle nicht eindeutiger Ergebnisse wurde die PCR ein weiteres Mal wiederholt.

2.7 Chemikalien und Geräte

Für DNA-Extraktion und die nested PCR wurden die aufgelisteten Chemikalien (**Tabelle 5**) und Geräte (**Tabelle 6**) verwendet.

Tabelle 5: Chemikalien für DNA Extraktion und PCR

Chemikalie	Hersteller
100 bp DNA-Leiter	Promega Madison, WI USA
10x PCR-Puffer MgCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
5 x TBE-Puffer	Tris-HCl/ Borsäure/Na ₂ EDTA; Promega Madison, WI USA
Agarose	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany
Ampuwa® - Wasser für Injektions- zwecke	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Germany
Desoxynukleotid-Triphosphat Set	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Ethanol 100%	Boehringer, Mannheim, Germany (Roche)
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim, Germany (Roche)
Lysis-Puffer (155 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 0,1 mM Na ₂ EDTA; pH 7,4)	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
MgCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Oligonucleotid-Primer	MWG, Ebersberg, Germany
Gelladepuffer Orange G 15% Ficoll 400	Sigma Aldrich, Germany
QIAamp DNA Blood Mini Kit®	Qiagen, Hilden, Germany
SE-Puffer (75mM NaCl, 25 mM Na ₂ EDTA)	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
TE-Puffer (10mM Tris)	Invitrogen, Karlsruhe, Germany

Tabelle 6: Geräte für DNA Extraktion und PCR

Gerät	Hersteller
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Germany
Elektrophorese System	Gilson, Middleton, WI USA
Feinwaage Typ BP 3100P	Sartorius, Göttingen, Germany
Gel-Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen, Germany
Horizon 58®	
Heizplatte/Magnetrührer	Sigma Aldrich, Germany
iCycler Thermal Cycler	BIO RAD, München, Germany
Mini Zentrifuge	BIO RAD, München, Germany
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Germany
Plexiglas-Arbeitshaube	Fritz Gössner GmbH, Hamburg, Germany
Sofortbildkamera Polaroid®	Polaroid, Offenbach, Germany
Ultraspect 300 UV/Visible	
Spektralphotometer	Pharmacia Biotech, Cambridge, England
UV Lampe (Transilluminator)	Hofer, Holliston, MA USA
Vortex-Genie®2	Scientific Industries, USA
Wasserbad E10	Dinkelberg Analytics, Gablingen, Germany

2.8 Erhebung der Krankheitsparameter der rheumatoiden Arthritis

Zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs wurden der RF, die CCP-AK und der Grad der Gelenkdestruktion im Röntgenbild analysiert. Diese Krankheitsparameter sind Bestandteil der Routinediagnostik ambulanter und stationärer Patienten der Klinik für Rheumatologie in Vogelsang-Gommern.

2.8.1 Bestimmung des Rheumafaktors und der CCP-Antikörper

Zur Bestimmung des Rheumafaktors (RF-IgM) wird ein immunturbidimetrischer Latextest (COBAS MIRA S Analysator) genutzt. Der Test wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Bei einer Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen RF im Patientenserum und mit Latexpartikeln sensibilisiertem, denaturiertem humanen IgG kommt es zur Agglutination. Die Agglutination wird als Absorptionsänderung erkannt und anhand einer Kalibrationskurve bestimmt.

Referenzbereich: RF < 25 U/ml (negativ)

Die Bestimmung der CCP-AK erfolgt mit einem Anti-CCP ELISA Kit der Firma A. Menarini Diagnostics (Berlin, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben. Bei diesem Test dient ein Mikrotiterplatten-ELISA der quantitativen in-vitro-Bestimmung humaner IgG Antikörper gegen CCP. Vorhandene CCP-AK in der Probe binden dabei an zyklische zitruillierte Peptide auf der ELISA-Platte. Nach einer 30 minütigen Zugabe eines Konjugats, eines mit Meerrettichperoxidase markierten Anti-Human-IgG-AK und einer einstündigen Inkubation der Mikrotiterplatte wird nach einem erneuten Waschzyklus das Substrat zugefügt. An die Platte gebundene AK führen zu einer Färbung, die photometrisch bei 450 nm gemessen wird.

Referenzbereich: Anti-CCP-AK <25 U/ml (negativ)

2.8.2 Beurteilung der Röntgenbilder

Der Destruktionsgrad der Gelenke wurde mit dem Steinbrocker-Index bewertet [85, 88]. Dazu wurden Röntgenbilder der Hände und Vorfüße ausgewählt, die im Rahmen der ambulanten oder stationären Diagnostik und Behandlung der Patientinnen angefertigt wurden. Es wurde stets das aktuelle Röntgenbild befundet. Bei der Einteilung der Destruktion der Gelenke in die vier Steinbrocker Stadien kann es zu interindividuellen und intraindividuellen Unterschieden bei der Beurteilung kommen [50]. Daher wurden alle Röntgenbilder mit einem Rheumatologen zusammen wiederholt geblindet in Bezug auf MC+ oder MC- ausgewertet. Um das Steinbrocker Stadium in ein Verhältnis zur Erkrankungsdauer setzen zu können, wurde das Zeitintervall zwischen Aufnahmezeitpunkt der Röntgenbilder und Erkrankungsbeginn ermittelt. Aufgrund der vergleichsweise geringen Fallzahlen wurde auf komplexere Auswerteverfahren wie den Sharp-Heijden-Score verzichtet.

2.9 Erhebung der Krankheitsparameter des SLE

Zur Charakterisierung der SLE-Patienten wurden ANA, Anti-ds-DNA-AK, Komplementfaktoren (C3, C4), CH50 und der lösliche IL2-Rezeptor bestimmt. Die Blutproben der Patientinnen wurden im Rahmen des diagnostischen Routinelabors in der Klinik für Rheumatologie in Vogelsang-Gommern gewonnen.

2.9.1 Bestimmung des ANA-Titers

Die Bestimmung des ANA-Titers wurde mit dem KALLESTAD Hep-2-Zelllinien-Substrat der Firma BIORAD (München, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Dieser Test beruht auf einer indirekten Immunfluoreszenstechnik, bei der eine Antigen-Antikörper-Reaktion auf der Oberfläche von humanen Epithelzellen (Hep-2) stattfindet. Im Patientenserum vorhandene antinukleäre AK binden an immobilisierte Antigene und können mikroskopisch auf einem Objektträger sichtbar gemacht werden.

Bewertung im Labor:

1:80-1:320 (++++):	Graubereich
1:640-1:1280 (+++):	positiv
>1:2560 (++++):	stark positiv

2.9.2 Bestimmung der Anti-ds-DNA-Antikörper

Zur Bestimmung von AK gegen doppelsträngige, native DNA im Patientenserum wurde ein Anti-ds-DNA-ELISA (IgG) Kit der Firma EUROIMMUN (Lübeck, Deutschland) verwendet und entsprechend Herstellerangaben durchgeführt. In den Proben vorhandene Anti-ds-DNA-Ak binden an in den Kavitäten vorhandene Antigene. Bei der folgenden Substrat-Inkubation werden Peroxidase-markiertes anti-Human-IgG und Chromogen-Lösung hinzu gegeben, wonach bei einer Wellenlänge von 450 nm die photometrische Auswertung der Farbintensität in den Kavitäten der Mikrotiterplatte erfolgt.

Referenzbereich der quantitativen Auswertung: Anti-ds-DNA < 100 RE/ml (negativ)

2.9.3 Bestimmung der Komplementfaktoren (C3, C4) und der CH50

Die Bestimmung der Komplementfaktoren C3 und C4 ist bei Immunkomplexerkrankungen indiziert. Der Test beruht auf einem turbidimetrischen Messprinzip. Dabei binden C3 und C4, wenn sie in der Probe vorhanden sind, an ein zugefügtes Reagenz, wodurch es zu einer Aggregation kommt. Der Grad der Aggregation ist dabei proportional zur Komplementkonzentration in der Probe. Die Bestimmung wurde mit den Kits Quantex C3 bzw. C4 der Firma Biokit (Barcelona, Spanien) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

Referenzbereich: C3: 0,9-1,8 g/l

 C4: 0,1-0,4 g/l

CH50 gilt als Screeningtest für einen Komplementverbrauch. Die Bestimmung von CH50 basiert auf einem in vitro-Liposomen-Immunoassay und erfolgte entsprechend der Herstellerangaben (Autokit CH50 der Firma Wako Chemicals, Neuss, Deutschland). Das Patientenserum wird mit Liposomen und Substrat gemischt, wodurch es zu einer Bindung von Antikörpern aus dem Reagenz an die Dinitrophenylgruppe auf den Liposomen kommt. Durch diesen Antigen-Antikörperkomplex werden die Komplementkomponenten in der Probe aktiviert. Durch die aktivierten Komplementkomponenten kommt es zu einer Freisetzung von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH), was zu einer Reduktion von NAD zu NADH führt. Durch diesen Reduktionsvorgang kommt es zu einem Absorptionsanstieg, der proportional zur Komplementaktivität in der Probe ist.

Referenzbereich: CH50: 23-46 U/ml

2.10 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde die Software SPSS 18.0 genutzt. Stetige Parameter wurden auf Normalverteilung getestet und Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, Maximum und das 95% Konfidenzintervall angegeben. Der Unterschied wurde mittels student-T-Test auf Signifikanz getestet. Für den statistischen Vergleich qualitativer Merkmale wird der exakte Fischer-t-Test genutzt.

Es erfolgte eine Beratung erfolgte durch Dr. Röhl des Instituts für Biometrie und Medizinische Informatik der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich der Häufigkeit des Mikrochimerismus zwischen den untersuchten Gruppen

Der Anteil von Frauen mit MC unterschied sich stark zwischen der RA Gruppe, der SLE Gruppe und den gesunden Kontrollen (**Tabelle 7**). Von 72 RA Patientinnen waren 13 MC positiv (18%). Von 16 SLE Patientinnen waren 5 MC positiv (31%). Unter den 52 gesunden Kontrollen waren 2 MC positiv (4%). Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ist die Prävalenz von MC bei Patientinnen mit RA und SLE signifikant erhöht (RA vs. Kontrollen: $p=0,02$; SLE vs. Kontrollen: $p=0,006$). Die Prävalenz des MC ist bei SLE Patientinnen im Vergleich zu RA Patientinnen bei kleiner Fallzahl nicht signifikant erhöht ($p=0,30$).

Tabelle 7: Häufigkeiten des Mikrochimerismus in den untersuchten Gruppen

	RA ¹	SLE ^{2,3}	Kontrollen	Gesamt
Anzahl MC neg	59 (81,9%)	11 (68,7%)	52 (96,3%)	122
Anzahl MC pos	13 (18,1%)	5 (31,3%)	2 (3,7%)	20
Gesamt	72	16	54	142

¹RA vs. Kontrollen: $p(\text{zweiseitig}) = 0,023$, ²SLE vs. Kontrollen: $p(\text{zweiseitig}) = 0,006$,

³RA vs.SLE: $p(\text{zweiseitig}) = 0,303$

Das Durchschnittsalter zum Untersuchungszeitpunkt war mit 62 Jahren bei der RA Gruppe am höchsten. Die SLE Patientinnen waren mit 55 Jahren im Durchschnitt 7 Jahre jünger. Das Durchschnittsalter der Kontrollen lag bei 40 Jahren. In der RA Gruppe waren die MC positiven Patientinnen im Durchschnitt älter als die MC negativen, in der SLE Gruppe ist dies Verhältnis umgekehrt (**Tabelle 8**).

Der Krankheitsbeginn lag in der RA Gruppe bei 43 Jahren, in der SLE Gruppe bei 55 Jahren. Das Durchschnittsalter in der Kontrollgruppe lag mit 40 Jahren unter dem der beiden anderen Gruppen. Das Alter bei Geburt des ersten Sohns unterschied sich kaum zwischen den Gruppen (RA/SLE 24 Jahre, Kontrollen 25 Jahre). In der RA Gruppe waren die zuletzt geborenen Söhne am ältesten (37 Jahre), die jüngsten Söhne der SLE Patientinnen waren 30 Jahre. Die insgesamt jüngeren Kontrollen hatten im Durchschnitt vor 15 Jahren ihren jüngsten Sohn geboren (**Tabelle 9,10,11**).

Tabelle 8: Alter zum Zeitpunkt verschiedener Lebensereignisse in den untersuchten Gruppen

	RA	SLE	Kontrollen
Untersuchungszeitpunkt	61,7	55,3	40,4
Krankheitsbeginn	43,3	46,9	.
Geburt des 1. Sohns	23,7	24,7	25,8
Geburt des jüngsten Sohns	25,5	26,4	25,5
Alter des jüngsten Sohns	37,3	29,8	14,9

Tabelle 9: Alter der RA Patientinnen zum Zeitpunkt verschiedener Lebensereignisse

	MC neg	MC pos	Gesamt
Untersuchungszeitpunkt	61,2	66,0	61,7
Krankheitsbeginn	43,3	43,3	43,3
Geburt des 1. Sohns	23,4	25,4	23,7
Geburt des jüngsten Sohns	24,0	27,5	25,5
Alter des jüngsten Sohns	37,0	38,6	37,3

Tabelle 10 : Alter der SLE Patientinnen zum Zeitpunkt verschiedener Lebensereignisse

	MC neg	MC pos	Gesamt
Untersuchungszeitpunkt	57,1	51,2	55,3
Krankheitsbeginn	49,1	42,6	46,9
Geburt des 1. Sohns	26,4	24,0	24,7
Geburt des jüngsten Sohns	30,5	26,4	29,8
Alter des jüngsten Sohns	30,5	28,0	29,8

Tabelle 11: Alter der Kontrollen zum Zeitpunkt verschiedener Lebensereignisse

	MC pos	MC neg	Gesamt
Untersuchungszeitpunkt	40,7	31	40,4
Geburt des 1. Sohns	25,6	30	25,7
Geburt des jüngsten Sohns	k.A.	k.A.	k.A.
Alter des jüngsten Sohns	14,8	18,4	14,9

3.2 Analyse der RA Gruppe

72 Patientinnen mit RA wurden über die Studie aufgeklärt und nahmen an der genetischen Untersuchung teil. Bei 13 Patientinnen konnte ein MC wiederholt detektiert werden (MC pos). Bei 59 Patientinnen wurde hingegen kein MC gefunden (MC neg). Damit liegt der Anteil von MC positiven Patientinnen in der RA-Gruppe bei 18% (vs. Kontrollen: $p=0,023$).

Das Durchschnittsalter der MC negativen Patientinnen lag bei $61,2\pm 11,1$ Jahren. Sie bekamen ihren ersten Sohn mit durchschnittlich $23,4\pm 4,7$ Jahren und den jüngsten Sohn mit $24,0\pm 4,7$ Jahren (**Tabellen 12, 15, 16**). Die Geburt des jüngsten Sohnes lag $37,0\pm 11,4$ Jahre zurück (**Tabelle 17**). Die MC negativen Patientinnen erkrankten mit durchschnittlich $43,3\pm 12,2$ Jahren (**Tabelle 13**). Zwischen der Geburt des ersten Sohnes und dem Beginn der Erkrankung lagen im Schnitt $19,8\pm 10,7$ Jahre (**Tabelle 14**).

Bei den Patientinnen, die MC positiv getestet wurden, lag das Durchschnittsalter bei $66,0\pm 9,0$ Jahren. Das Alter bei Geburt des ersten Sohnes betrug $25,4\pm 5,0$ Jahre, das Alter bei der Geburt des jüngsten Sohns betrug $38,6\pm 6,1$ Jahre (**Tabellen 12, 15, 16**). Die Geburt des jüngsten Sohnes lag $38,6\pm 6,1$ Jahre zurück (**Tabelle 17**). Das Erkrankungsalter lag bei $43,3\pm 10,7$ Jahren. Die MC positiven Patientinnen erkrankten $18,7\pm 9,6$ Jahre nach der Geburt des ersten Sohnes an RA (**Tabelle 13, 14**).

Die MC positiven und MC negativen Patientinnen der RA-Gruppe weisen hinsichtlich des Durchschnittsalters, dem Alter bei Geburt des ersten Sohnes, dem Erkrankungsalter und der Dauer bis zum Erkrankungsbeginn nach Geburt des ersten Sohnes keine signifikanten Unterschiede auf (**Tabelle 12, 13**).

MC positive Patientinnen haben im Durchschnitt mehr Söhne geboren als MC negative Patientinnen (Durchschnitt 1,5 Söhne/Pat. vs. 1,2 Söhne/Pat., $p = 0,218$ **Tabelle 18**). Von den MC negativen Patientinnen haben 82,5% nur einen Sohn geboren. 17,5% haben 2 Söhne, der Durchschnitt lag bei 1,2 Kindern. Die MC positiven Patientinnen haben in 63,6% der Fälle einen Sohn geboren, jeweils 18,1% haben 2 oder 3 Söhne, der Durchschnitt lag bei 1,5 Kindern (**Tabelle 18**).

Tabelle 12: Alter der RA Patientinnen zum Untersuchungszeitpunkt

	MC neg	MC pos	Gesamt
Gültige Fälle/Anzahl Patienten	59/59	13/13	72/72
Mittelwert	61,2	66,0	61,7
95% Konfidenzintervall des Mittelwertes	58,3 / 64,1	58,6 / 69,5	59,2 / 64,3
Standardabweichung	11,1	9,0	10,7
Minimum	41	48	41
Maximum	84	76	84

Tabelle 13: Alter der RA Patientinnen bei Erstdiagnose

	MC neg	MC pos	Gesamt
Gültige Fälle/Anzahl Patienten	53/59	11/13	54/72
Mittelwert	43,3	43,3	43,3
95% Konfidenzintervall des Mittelwertes	40,0 / 46,7	36,1 / 50,4	40,4 / 46,3
Standardabweichung	12,2	10,6	11,9
Minimum	18	24	18
Maximum	72	59	72

Tabelle 14: Jahre zwischen Geburt des ersten Sohns und Krankheitsbeginn der RA

	MC neg	MC pos	Gesamt
Gültige Fälle/Anzahl Patienten	53 / 58	11 /13	64 / 72
Mittelwert	19,8	18,7	19,6
95% Konfidenzintervall des Mittelwertes	17,0 / 22,8	12,3 / 25,2	17,0 / 22,3
Standardabweichung	10,677	9,572	10,4
Minimum	0	0	0
Maximum	37	29	37

Tabelle 15: Alter der RA Patientinnen bei Geburt des ersten Sohns

	MC neg	MC pos	Gesamt
Gültige Fälle/Anzahl Patienten	53/59	11/13	64/72
Mittelwert	23,4	25,4	23,7
95% Konfidenzintervall des Mittelwertes	22,9 / 24,6	22,0 / 28,8	22,5 / 24,9
Standardabweichung	4,7	5,1	4,7
Minimum	18	20	18
Maximum	38	35	38

Tabelle 16: Alter der RA Patientinnen bei Geburt des jüngsten Sohns

	MC neg	MC pos	Gesamt
Gültige Fälle/Anzahl Patienten	56/58	11/13	67/72
Mittelwert	24,0	27,5	24,5
95% Konfidenzintervall des Mittelwertes	22,7 / 25,2	24,4 / 30,5	23,4 / 25,7
Standardabweichung	4,7	4,5	4,8
Minimum	24	20	24
Maximum	38	35	38

Tabelle 17: Alter des jüngsten Sohns der RA Patientinnen zum Untersuchungszeitpunkt

	MC neg	MC pos	Gesamt
Gültige Fälle/Anzahl Patienten	53/59	11/13	64/72
Mittelwert	37,0	38,6	37,3
95% Konfidenzintervall des Mittelwertes	33,9 / 40,1	34,4 / 42,7	34,6 / 39,9
Standardabweichung	11,4	6,1	10,6
Minimum	5	30	5
Maximum	59	47	59

Tabelle 18: Anzahl der Söhne der RA Patientinnen

	1	2	3	Gesamt
MC neg	47 (82,5%)	10 (17,5%)	0 (0%)	57 (100%)
MC pos	7 (63,6%)	2 (18,1%)	2 (18,1%)	11 (100%)
Gesamt	54 (79,4%)	12 (17,6%)	2 (2,9%)	68 (100%)

Der Vergleich der serologischen Parameter zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. CCP-AK negative Krankheitsverläufe kamen bei MC positiven Patientinnen häufiger vor als bei MC negativen Patientinnen ($p=0.37$) vor (**Tabelle 20**). Ein besonders hoher RF Titer ließ sich bei MC positiven Frauen hingegen häufiger finden als bei MC negativen Frauen (**Tabelle 21**). Auch die Anzahl der Fälle, in denen eine Therapie mit Biologicals auf Grund besonders schwerer Erkrankung durchgeführt wurde, unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (68% der MC neg vs. 77% der MC pos) (**Tabelle 19**).

Die röntgenologischen Gelenkdestruktionen zum Untersuchungszeitpunkt wurden anhand des Steinbrocker Stadiums bewertet. Dabei zeigten die MC negativen Patientinnen im Durchschnitt mit 3,0 ein niedrigeres Steinbrocker Stadium als die MC positiven Patientinnen mit 3,2 ohne statistische Signifikanz (**Tabelle 22**).

Da der Grad der Gelenkdestruktion von der Erkrankungsdauer abhängig ist, wurde das Intervall zwischen Krankheitsbeginn und Zeitpunkt der Aufnahme des befundeten Röntgenbildes ermittelt. Dabei hatten MC neg Patientinnen im Durchschnitt mit 16,5 Jahren (Standardfehler 1,2, Standardabweichung 8,9, Median 15, Min 2, Max 41 Jahren) ein kürzeres Zeitintervall als MC positive Patientinnen mit 19,4 Jahren (Standardfehler 2,9, Standardabweichung 9,6, Median 18, Min 4, Max 35 Jahren) (**Tabelle 23**).

Um das Steinbrocker-Stadium abhängig von der Erkrankungsdauer darzustellen, wurde auch der Quotient aus Steinbrocker-Stadium und Erkrankungsjahren gebildet (MC neg 0,3, MC pos 0,2). Dabei zeigte sich, dass die Quotienten in Anhängigkeit bei MC positiven und MC negativen Patientinnen nahezu identisch sind. Das im Durchschnitt höhere Steinbrocker-Stadium lässt sich durch die längere Erkrankungsdauer bei höherem Durchschnittsalter erklären.

Tabelle 19: CCP-AK, RF und Biological-Therapie bei RA Patientinnen

	MC neg	MC pos
CCP AK positiv	47/54 (87%)	9/12 (75%)
RF positiv	42/56 (75%)	9/12 (75%)
Biological-Therapie	40/59 (68%) ¹	10/13 (77%) ¹

¹ $p= 0,742$

Tabelle 20: Vorkommen von CCP Antikörpern in der RA Gruppe

	CCP-AK negativ	CCP-AK positiv			Gesamt
	0-25 IU/ml	26-100 U/ml	101-1000 IU/ml	>1000 IU/ml	
Anzahl MC neg	7 (13%)	9 (17%)	23 (43%)	15 (28%)	54 (100%)
Anzahl MC pos	3 (25,0%)	1 (8%)	5 (42%)	3 (25%)	12 (100%)
gesamt	10 (15,2%)	10 (15%)	28 (42%)	18 (27%)	66 (100%)

Tabelle 21: Vorkommen des Rheumafaktors in der RA Gruppe

	RF negativ		RF positiv		Gesamt
	0-20 IU/ml	21-100 IU/ml	>100 IU/ml		
Anzahl MC neg	13 (23,6%)	31 (56,4%)	11 (20,0%)		55 (100,0%)
Anzahl MC pos	3 (25,0%)	3 (25,0%)	6 (50,0%)		12 (100,0%)
gesamt	16 (23,9%)	34 (50,7%)	17 (25,4%)		67 (100,0%)

Tabelle 22: Verteilung der Steinbrocker Stadien in der RA Gruppe

Steinbrocker Stadium	MC neg	MC pos
1	6 (10%)	1 (8%)
2	11 (22%)	2 (15%)
3	16 (30%)	3 (23%)
4	22 (37%)	7 (53%)

Tabelle 23: RA: Jahre zwischen Erkrankungsbeginn und befundeter Röntgenaufnahme abhängig vom Steinbrocker Stadium

	Steinbrocker Stadium							
	Grad 1		Grad 2		Grad 3		Grad 4	
	MC neg	MC pos	MC neg	MC pos	MC neg	MC pos	MC neg	MC pos
Mittelwert	11	16	14,1	4	15,8	15	20,0	24,7
Standard-abweichung	6,8	.	7,8	.	8,3	10,1	9,5	7,0
Median	11,5	16	12	4	15	13	20	25
Minimum	2	16	6	4	6	6	6	16
Maximum	20	16	34	4	39	26	43	35

3.3 Analyse der SLE Gruppe

16 Patientinnen mit SLE wurden auf das Vorliegen von MC untersucht. Von den 16 Patientinnen konnte bei 5 Patientinnen ein MC nachgewiesen werden. Der Anteil von MC positiven Frauen liegt damit bei 31%. Das Durchschnittsalter der MC negativen SLE Patientinnen 57 Jahre, zum Zeitpunkt der Erstdiagnose waren sie 49 Jahre alt. Bei der Geburt des ersten Sohns waren sie durchschnittlich 26 Jahre alt. Ihren jüngsten Sohn haben sie mit 27 Jahren bekommen und erkrankten 22 Jahre später an SLE (**Tabelle 24-28**). Die MC positiven Frauen waren durchschnittlich 51 Jahre alt und waren bei Erkrankungsbeginn 43 Jahre alt. Das Alter bei der Geburt des ältesten Sohns lag bei 24 Jahren und für den jüngsten Sohn bei 26 Jahren. Durchschnittlich erkrankten die MC positiven Frauen 19 Jahre nach der Geburt des ersten Sohns (**Tabelle 24-28**). Mit 60% hat die Mehrheit der MC positiven Patientinnen zwei Söhne geboren, unter den MC negativen Patientinnen hingegen haben 91% nur einen Sohn ($p= 0.214$); Durchschnitt MC neg: 1,1 Söhne/Pat. vs. MC pos: 1,4 Söhne/Pat (**Tabelle 29**).

Tabelle 24: Alter der SLE Patientinnen zum Untersuchungszeitpunkt

	MC neg	MC pos	Gesamt
Gültige Fälle/Anzahl Patienten	11/11	5/5	16/16
Mittelwert	57,1 (3,675)	51,2 (3,441)	55,2 (2,736)
95% Konfidenzintervall des Mittelwertes	48,9 / 65,5	41,6 / 60,7	49,8 / 60,7
Standardabweichung	11,622	7,694	10,240
Minimum	45	42	42
Maximum	82	58	82

Tabelle 25: Alter der SLE Patientinnen bei der Erstdiagnose

	MC neg	MC pos	Gesamt
Gültige Fälle/Anzahl Patienten	10/11	5/5	15/16
Mittelwert	49,1 (4,5)	42,6 (3,8)	46,9 (3,3)
95% Konfidenzintervall des Mittelwertes	39,0 / 59,2	32,1 / 53,1	40,0 / 54,0
Standardabweichung	14,1	8,4	12,6
Minimum	27	35	27
Maximum	75	54	75

Tabelle 26: Alter der SLE Patientinnen bei Geburt des ersten Sohns

	MC neg	MC pos	Gesamt
Gültige Fälle/Anzahl Patienten	10/11	4/6	14/16
Mittelwert	26,4 (1,6)	24,0 (2,4)	24,7 (1,3)
95% Konfidenzintervall des Mittelwertss	22,7 / 30,1	16,3 / 31,7	22,8 / 28,7
Standardabweichung	5,2	4,8	5,045
Minimum	22	18	18
Maximum	38	31	38

Tabelle 27: Alter der SLE Patientinnen bei Geburt des jüngsten Sohns

	MC neg	MC pos	Gesamt
Gültige Fälle/Anzahl Patienten	10/11	4/5	14/16
Mittelwert	26,7 (1,6)	25,5 (2,0)	26,4
95% Konfidenzintervall des Mittelwertes	23,0 / 30,4	19,1 / 31,9	23,6 / 29,1
Standardabweichung	5,2	4,0	4,8
Minimum	22	22	22
Maximum	38	31	38

Tabelle 28: Alter des jüngsten Sohns der SLE Patientinnen zum Untersuchungszeitpunkt

	MC neg	MC pos	Gesamt
Gültige Fälle/Anzahl Patienten	10/11	4/6	14/16
Mittelwert	30,5 (3,9)	28,0 (4,4)	29,8 (3,0)
95% Konfidenzintervall des Mittelwertes	21,6 / 39,4	13,8 / 42,2	23,3 / 36,3
Standardabweichung	12,4	8,9	11,3
Minimum	18	18	18
Maximum	57	36	57

Tabelle 29: Anzahl der Söhne der SLE Patientinnen

	1	2	3	Gesamt
MC neg	10 (91%)	1 (9%)	0 (0%)	11 (100%)
MC pos	3 (60%)	2 (40%)	0 (0%)	5 (100%)

Der Vergleich der serologischen Parameter zeigte bei den SLE Patientinnen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der ANA-Titer, der Anti-Doppelstrang-DNA-Antikörper oder der Komplementanalyse (C3, C4, CH50) (**Tabelle 30**).

Organmanifestationen des SLE traten in der MC negativen Gruppe am häufigsten an den Gelenken (70%), an der Haut (60%) oder in Form einer Sicca-Symptomatik auf. Bei 30 % der Patientinnen kam es zu einer ZNS-Beteiligung. Die MC positiven Frauen hatten eher milde Formen der Organmanifestation (80% Sicca-Symptomatik, 60% Gelenkbeteiligung). Eine ZNS-Beteiligung oder eine Nierenbeteiligung zeigten 20% (**Tabelle 31**). Eine Hautbeteiligung trat nur bei MC negativen Patientinnen auf.

Tabelle 30: Serologische Parameter der SLE Patientinnen

	Fallnummer	ANA ¹	Anti-ds-DNA AK ²	C3 ³	C4 ⁴	CH50 ⁵	IL2R ⁶
MC negativ	1	+++	340	1,39	0,30	51,9	579
	2	++	17	1,55	0,30	43,6	546
	3	+++	432	1,34	0,33	56,9	293
	4	+++	Neg	1,25	0,28	48,7	538
	5	+++	Neg	1,47	0,23	59,1	275
	6	++	75
	7	++	14	1,18	0,20	42,1	.
	8	+++	20	0,94	0,17	49,7	479
	9	+++	333	1,06	0,17	54,8	.
	10	+++	33	1,35	0,13	55,9	480
	Gesamt n	10	10	9	9	9	7
MC positiv	1	++	Neg	1,45	0,22	52,7	705
	2	++++
	3	+++	44	1,50	,35	60,9	664
	4	++	Neg
	Gesamt n	4	3	2	2	2	2
	Gesamt n	14	13	11	11	11	9

Normbereiche: ¹1:80-1:320 (+++), 1:640-1:1280 (+++), >1:2560 (++++); ² < 100 RE/ml; ³ 0,9-1,8 g/l; ⁴ 0,1-0,4 g/l; ⁵ 23-46 U/ml; ⁶ 223-710 U/ml.

(Siehe auch 2.2. Material und Methoden)

Tabelle 31: Organbeteiligung der SLE Patientinnen

	Sicca-Symptomatik	Nierenbeteiligung	Hautbeteiligung	ZNS-Beteiligung	Gelenkbeteiligung
MC neg (n=10)	2 (20%)	0 (0%)	6 (60%)*	3 (30%)	7 (70%)
MC pos (n=5)	4 (80%)	1 (20%)	0 (0%)*	1 (20%)	3 (60%)
Gesamt	6/15	1/15	6/15	4/15	10 (67%)

* = p ≤ 0,05

3.4 Analyse der Kontrollgruppe

54 gesunde Frauen hatten sich nach der Aufklärung zur Teilnahme an der Untersuchung bereit erklärt und Blutproben abgegeben. Von den 54 Frauen wurden 2 positiv auf das DYS14-Gen getestet. Dies entspricht einem Anteil von 3,7%.

Das Durchschnittsalter der Frauen lag zum Untersuchungszeitpunkt bei 40,4 Jahren. Die beiden MC positiven Patientinnen waren 31 und 36 Jahre alt. Im Durchschnitt waren die Frauen zum Zeitpunkt der Geburt ihres ersten Sohnes 25,8 Jahre alt. Die Geburt des jüngsten Sohnes lag zum Untersuchungszeitpunkt zwischen 20 Tagen und 39 Jahren zurück, im Durchschnitt 14,9 Jahre (**Tabellen 32-34**).

8 Frauen gaben, einen Abort gehabt zu haben. Die Aborte lagen dabei zwischen 15 und 31 Jahren zurück. Alle Frauen mit Aborten waren MC negativ. Von zwei Frauen wurde bei der Frage nach Erkrankungen eine Arthritis angegeben, eine Frau gab eine Autoimmunthyreoiditis an. Bei diesen drei Frauen konnte kein MC nachgewiesen werden.

Tabelle 32: Alter der Kontrollen zum Untersuchungszeitpunkt

	MC neg	MC pos	Gesamt
Gültige Fälle/Anzahl Patienten	32/52	1/2	33/54
Mittelwert	40,7	31	40,4
95% Konfidenzintervall des Mittelwertes	37,1 / 44,3	.	36,9 / 43,9
Standardabweichung	9,9	.	9,9
Minimum	23	31	23
Maximum	61	31	61

Tabelle 33: Alter der Kontrollen bei der Geburt des ersten Sohns

	MC neg	MC pos	Gesamt
Gültige Fälle/Anzahl Patienten	31	1	32
Mittelwert	25,61	30	25,75
Standardabweichung	4,2	.	4,2
Minimum	19	30	19
Maximum	34	30	34

Tabelle 34: Alter des jüngsten Sohns der Kontrollen

	MC neg	MC pos	Gesamt
Gültige Fälle/Anzahl Patienten	51	2	53
Mittelwert	14,8	18,4	14,9
Standardabweichung	10,7	24,9	11,1
Minimum	0	1	0
Maximum	39	36	39

4 Diskussion

Die Schwangerschaft ist die häufigste Quelle für einen natürlich erworbenen MC, da über die Plazenta der Austausch von Zellen ermöglicht wird [79]. Seit mehr als 30 Jahren wird das Auftreten von MC in verschiedenen Geweben mit unterschiedlichen Methoden untersucht, wobei durch die zur Verfügung stehenden Nachweisverfahren wie die PCR heute zuverlässig auch sehr geringe Mengen männlicher DNA im weiblichen Organismus nachgewiesen können. Im Zentrum der Forschung stehen meist Fragestellungen aus den Bereichen der Transfusionsmedizin, der Onkologie, der Transplantationsmedizin und der Neonatologie. Aktuell stellt die Isolierung kindlicher DNA aus dem mütterlichen Blut eine neue, nicht-invasive diagnostische Möglichkeit zur vorgeburtlichen Feststellung einer Trisomie 21 dar [26, 52]. Doch auch der Einfluss des MC auf die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Der Vergleich von Daten zur Prävalenz des MC ist bisher nur bedingt möglich, da sich die angewendeten Nachweisverfahren in der Sensitivität und Spezifität teils stark unterscheiden und durch unterschiedliche Ein- und Ausschlusskriterien die Quellen für MC vielseitig sein können (**Tabelle 35**).

4.1 Nachweis des Y-Chromosoms mittels PCR im mütterlichen Blut

Zum Nachweis eines MC mit der PCR können Sequenzen auf dem Y-Chromosom amplifiziert werden. Dazu eignen sich die Zielsequenzen SRY, DYS14 (auch TSPY genannt) oder DAZ. Vorteil des Gens DYS14 ist, dass es eine große Anzahl an Kopien aufweist. Ein Nachweis dieser Sequenz hat daher eine hohe Sensitivität [110]. Aus diesem Grund wurde für den Nachweis des MC in der vorliegenden Arbeit eine Sequenz des DYS14 Gens amplifiziert. Um die Sensitivität der Methode weiter zu erhöhen, wurde die PCR als nested PCR durchgeführt. Zur Optimierung von Sensitivität und Spezifität der PCR wurden die PCR-Bedingungen mehrfach variiert, bis anhand von Verdünnungsreihen ein Nachweis von MC bis zu Konzentrationen von 1: 40 000 männlichem zu weiblichem Vollblut zuverlässig möglich war. Dies entspricht einem Mischungsverhältnis von 1: 48 000 männlichen zu weiblichen Leukozyten im Blut. Die extrahierte DNA aus dem Patientenserum wurde mindestens zwei Mal mittels PCR auf das DYS14 Gen untersucht. Bei nicht eindeutigen Ergebnissen wurde die Probe ein weiteres Mal untersucht.

Für die Sensitivität und Spezifität der Methode spielt auch die Länge der Zielsequenz eine wichtige Rolle. Chiu et al. konnten 2005 zeigen, dass, wenn mit der real-time PCR nach fetaler DNA gesucht wird, die Amplifizierung kleiner Fragmente zuverlässiger als der Nachweis größerer Amplifikate gelingt. Dies deutet darauf hin, dass fetale DNA im mütterlichen Organismus eher in kleineren Fragmenten vorliegt (<450 bp) [21]. Die in der vorliegenden Arbeit amplifizierten Fragmente haben eine Größe von 278 bp bei der ersten und 186 bp bei der nested PCR und liegen damit in einem Bereich, der sich gut für die Amplifizierung eignet.

Lee et al. untersuchten 2001 die Unterschiede bei der Quantifizierung von freier DNA im Serum- und in Plasmaproben [64]. In Serumproben fanden sie eine 20-fach höhere Konzentration von freier DNA als in zellfreien Plasmaproben, da es durch die Koagelbildung in der Serummonovette zu einer vermehrten Freisetzung von DNA kommt. Entsprechend der Fragestellung ist zur Quantifizierung von freier DNA zellfreies Plasma vorzuziehen, zur Detektion von einem MC wird aber die Nutzung von Serum oder Vollblut bevorzugt, da die Sensitivität höher ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden RA und SLE Patientinnen auf das Vorkommen des DYS14-Gens (Teil des Testis-spezifischen Proteins auf dem Y-Chromosom) im peripheren Blut getestet. DYS14 wird hierbei zum Nachweis des vom Sohn stammenden feto-maternalen MC genutzt. Die in der Arbeit angewendete Methode bietet nur die Möglichkeit, das Auftreten eines MC qualitativ, aber nicht quantitativ zu erfassen. Generell ist eine Quantifizierung des MC in Organewebe oder Blut möglich. Aufgrund des sehr geringen Anteils der chimären Zellen im mütterlichen Organismus und der hohen Gefahr von Verunreinigungen der Proben mit männlicher DNA wurde in dieser Arbeit jedoch auf eine Quantifizierung verzichtet.

4.2 Prävalenz des feto-maternalen Mikrochimerismus in unterschiedlichen Kohorten

In der RA Gruppe lag der Anteil von Frauen mit MC bei 18% und war damit signifikant höher ($p=0,02$) als bei den Kontrollen (3,7%). Die Prävalenz des MC lag in der SLE Gruppe bei 31% und war damit ebenfalls gegenüber der Kontrollgruppe hochsignifikant erhöht ($p=0,006$). Im Vergleich zur RA Gruppe ist die Prävalenz in der SLE Gruppe erhöht, erreicht aber keine Signifikanz.

In der Literatur finden sich je nach Methodik und Auswahl der Patienten für den MC im

peripheren Blut für eine RA Prävalenz zwischen 18% bei Yan et al. und 42% bei Rak et al. [87, 108]. Für den SLE lassen sich ebenso in der Literatur unterschiedliche Angaben zum MC im peripheren Blut finden: 0% bei Miyashita [71] und 50% bei Mosca et al. [72]. Dabei ist ein direkter Vergleich der Studien aufgrund verschiedener Faktoren erschwert: Unterschiede finden sich hinsichtlich der Einschlusskriterien (wie Bluttransfusionen oder Aborte) und Vollständigkeit der Angaben zum Alter der Patientinnen, zur Erkrankungsdauer, zur Anzahl der Söhne oder zur der Krankheitsschwere (**Tabelle 35, Seite 48**).

Neben Schwangerschaften gelten gerade Aborte als bedeutende Quelle für einen fetomaternalen MC. Während der Schwangerschaft können größere Mengen Blut zwischen Mutter und Kind ausgetauscht werden, zudem wird das semiallogene Material im Blut langsamer entfernt, wie Yan und Lambert zeigen konnten [108]. Um eine bestmögliche Vergleichbarkeit der Prävalenz für einen MC zu gewährleisten, kam in der vorliegenden Arbeit der Erstellung von Einschlusskriterien eine besonders große Bedeutung zu. Dadurch konnten andere MC-Quellen als die Geburt eines Sohnes weitestgehend ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Auswahl des Patientenguts Bluttransfusionen berücksichtigt, da bei der Übertragung von Blutbestandteilen die Kinetik der Entfernung fremder Zellen und DNA aus dem Organismus bisher nicht abschließend geklärt ist. Zudem ist nicht unmittelbar bekannt, ob es sich bei einer Transfusion um einen weiblichen oder männlichen Spender gehandelt hat. Auch bei Kenntnis des durchschnittlichen Anteils an männlichen Blutspendern kann keine zuverlässige Aussage zur Beeinflussung der Prävalenz des MC gemacht werden, weshalb Bluttransfusionen abschließend als Ausschlusskriterium gewertet wurden. In dieser Arbeit führte der Ausschluss von transfundierten Patientinnen dazu, dass etwas 50% der anfänglich angeschriebenen Patientinnen ausgeschlossen werden mussten. Dieser hohe Anteil kann darin begründet sein, dass Patientinnen, die seit vielen Jahren an RA leiden, oft Gelenkersatzoperationen hatten, bei denen die Gabe von Fremdblut nötig war. Bei den SLE Patientinnen können durch Blutbildveränderungen Fremdbluttransfusionen indiziert sein. Viele der hier untersuchten Patientinnen berichteten von Fremdbluttransfusionen im Rahmen gynäkologischer Eingriffe. Bei den gesunden Frauen bestand in der Regel nur selten die Indikation zur Fremdblutübertragung, zum Beispiel unter der Geburt oder nach Unfällen mit großem Blutverlust. Die Auskunft über Fremdbluttransfusionen in der Vergangenheit erfolgte anamnestisch. Bei vielen Patientinnen

lag der Zeitpunkt der letzten Fremdbluttransfusion bereits mehrere Jahre zurück, so dass die Anamneseerhebung fehlerbehaftet ist.

Neben den Einschlusskriterien spielt auch die Zusammensetzung der Kohorten eine wichtige Rolle für die Aussagekraft der Ergebnisse. Dazu erhobene Daten bezüglich des Alters zum Beobachtungszeitpunkt und bei Erkrankungsbeginn, sowie die Daten zur Anzahl der Söhne dienten der Charakterisierung der Kohorten. Insgesamt 143 Frauen, davon 72 Frauen mit RA, 16 Frauen mit SLE und 54 gesunde Kontrollen, wurden untersucht. Das Durchschnittsalter der untersuchten Frauen mit RA lag bei 61,7 Jahren, das durchschnittliche Alter bei Beginn der Erkrankung lag bei den MC positiven und negativen Patientinnen bei 43,3 Jahren. Das Durchschnittsalter der SLE Patientinnen lag bei 55,3 Jahren. Das Alter bei Krankheitsbeginn liegt bei 49,3 Jahren für MC negative und bei 42,6 Jahren für MC positive Patientinnen. Da es sich bei den Kontrollen um arbeitstätige Frauen handelte, lag der Altersdurchschnitt mit 40,4 Jahren deutlich unter den beiden anderen Gruppen. Bei gesunden Frauen hat sich in anderen Studien zeigen lassen, dass der MC mit zunehmender Zeit nach der Entbindung verschwindet [59, 105]. Folglich würde eine jüngere Kontrollgruppe eine höhere Prävalenz des MC haben als eine Kontrollgruppe von Frauen mit höherem Durchschnittsalter. Der Unterschied zu den Erkrankten würde dann eine noch höhere Signifikanz aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit haben MC positive Frauen sowohl in der SLE als auch in der RA Gruppe mehr Söhne geboren als MC negative Frauen (SLE: Durchschnitt MC neg: 1,09 Söhne/Pat. vs. MC pos: 1,4 Söhne/Pat., $p = 0.214$; RA: Durchschnitt 1,5 Söhne/Pat. vs. 1,2 Söhne/Pat., $p = 0.218$). Die höhere durchschnittliche Anzahl von Söhnen bei MC positiven Patientinnen könnte damit erklärt werden, dass bei mehr Schwangerschaften eine häufigere und längere Übertragung von fetalen Zellen auf die Mutter stattfindet. In der SLE Gruppe wurden besonders wenige Kinder geboren, was darin begründet sein kann, dass bei einem SLE bis vor wenigen Jahren von Schwangerschaften abgeraten wurde, da die Erkrankung mit einem erhöhten Gesundheitsrisiko für die Frau und einem hohen Risiko für das Kind verbunden ist.

Die Tatsache, dass eine Frau bereits an einer RA oder einem SLE erkrankt ist, kann den Schwangerschaftsverlauf schon von Beginn an beeinflussen. Schwere Krankheitsverläufe können dazu führen, dass sich die Frau gegen leibliche Kinder entscheidet. Auch durch die medikamentöse Therapie kann es nötig werden, den Zeitpunkt der Schwangerschaft zu verschieben. Um diesen Einfluss minimieren zu können, wurden für diese Arbeit Frauen

gesucht, bei denen der Zeitpunkt der Geburt des ersten Kindes vor der Diagnosestellung lag. Das Durchschnittsalter bei der Geburt des ersten Sohns war bei den Patientinnen mit RA und SLE in der vorliegenden Untersuchung nahezu identisch.

Mit dem Auftreten von MC nach Schwangerschaften befassten sich auch Khosrotehrani et al. und führten 2003 eine Metaanalyse von 11 Arbeiten zum fetalen zellulären MC durch [51]. Eingeschlossen wurden Studien zu MC im mütterlichen Gewebe unabhängig von Alter und Erkrankungen der Patientinnen. Sie fanden keine Unterschiede zwischen Frauen mit MC und ohne MC bezüglich folgender Merkmale: Anzahl der Geburten und Schwangerschaften und Anzahl der männlichen Nachkommen. Unterschiede fanden sie hinsichtlich der Fehlgeburten. Fehlgeburten in der Anamnese waren signifikant ($p=0,02$) mit dem Vorkommen von MC assoziiert. Außerdem konnten in Gewebeproben von Frauen mit Autoimmunerkrankungen mehr fetale MC nachgewiesen werden als in Geweben von Frauen ohne Autoimmunerkrankungen ($p = 0,01$).

Bei der Betrachtung der Zusammensetzung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kohorte ist auch zu beachten, dass die RA und die SLE Patientinnen aus dem Patientengut eines Fachkrankenhauses rekrutiert wurden. Daher ergab sich eine Auswahl von Patientinnen mit schwerem und langem Krankheitsverlauf. Sollte davon ausgegangen werden, dass schwer erkrankte Patientinnen gehäuft einen MC aufweisen, ergäbe die hier ermittelte Prävalenz für einen MC einen oberen Grenzwert.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den beiden Autoimmunerkrankungen RA und SLE durch Anwendung der gleichen Methode und Auswahl geeigneter Einschlusskriterien angestrebt. Eine Übertragung der Ergebnisse auf die Gesamtheit der RA oder SLE Patientinnen bedarf einer weitaus größeren, repräsentativen Stichprobe, die auch Patientinnen mit mildereren Krankheitsverläufen einbezieht.

Table 35 Übersicht über Studien zu MC bei RA und SLE Patienten

<i>Autor</i>	<i>Jahr</i>	<i>Erkrankung</i>	<i>Anzahl Probanden/ Proben</i>	<i>Methode</i>	<i>% MC positiv</i>	<i>Erkrankungsdauer/ Durchschnittsalter</i>	<i>Bluttransfusionen in Anamnese</i>
Atkins et al. [10]	2010	RA	19 Rheumaknoten von 15 Patienten	PCR, Gewebe	13/15 (87%) Patienten, 14/19 (74%) Knoten	22,5 Jahre / Alter: 66 Jahre	eingeschlossen
Hromadnikova et al. [43]	2008	Kollagenosen	15 Synovialproben von RA Patienten; 19 Hautbiopsate von 14 Gesunden	PCR, Gewebe	5/13 Synovialproben (38%), 4/10 (40%) Hautbiopsate	16,4 Jahre / Alter: 55,5 Jahre	unbekannt
Johnson et al. [47]	2001	SLE	1 Patient, davon 44 Proben, 11 gesunde Frauen als Kontrollen	FISH, Gewebe	100% des auffälligen Gewebes, 0% des normalen Gewebes; 0/11 der Kontrollen	1 Jahr/ Alter: 33 Jahre	unbekannt
Kremer Hovinga et al. [57]	2007	SLE	7 Patienten, 48 Organproben, 146 Proben von 34 gesunden Frauen	FISH, Gewebe	7/7 Patienten, 15/34 (44%) Kontrollen	7 Jahre/ Alter: 41 Jahre; Kontrollen Alter: 47 Jahre	ausgeschlossen
Kremer Hovinga et al. [56]	2006	SLE	57 Nierenbiopsate von 49 SLE Patienten, 51 Proben von gesunden Frauen	FISH, Gewebe	27/49 Patienten (55%), 29/57 SLE Biopsate (51%); Kontrollbiopsate 13/51 (25%)	Alter: Patienten 31 Jahre	eingeschlossen 31% mit Fremdbluttransfusionen
Mosca et al. [72]	2003	SLE	22 Patienten, 60 Proben, 24 Kontrollen	PCR, Vollblut	11/22 Patienten (50%), 12/24 Kontrollen (50%)	Alter: 44 Jahre; Kontrollen Alter: 48 Jahre	ausgeschlossen
Rak et al. [87]	2009	RA	Für DRB1*01 MC: 33 RA, 46 Kontrollen; Für DRB1*04 MC: 48 RA, 64 Kontrollen	PCR, PBMCs	DRB1*01 MC: 10/33 (30%), Kontrollen 2/46 (4%) DRB1*04 MC: 20/48 (40%), Kontrollen 5/64 (8%)	Alter: 57 Jahre; Kontrollen Alter: 52 Jahre	Eingeschlossen; 17%, Kontrollen: 13%
Yan et al. [107]	2006	RA, JIA	25 schwangere Patienten	PCR, PBMCs	100% der Patienten mit Gelenkmanifestationen, 50% der Patientin mit RA Aktivität	Alter: 33 Jahre	unbekannt
Yan et al. [111]	2011	RA	52 Patienten, 34 Kontrollen	PCR, PBMCs	9/52 (17%) für QKRAA MC, Kontrollen 1/34 (3%); 21/52 (40%) für QRRAA MC, Kontrollen 3/34 (18%)	Alter: 51 Jahre Kontrollen: Alter: 42 Jahre	unbekannt
Yan et al. [108]	2005	RA	71 RA; 49 HC inkl. Frauen ohne Söhne	PCR, PBMCs	18% RA, 24% HC	Alter 33 Jahre (Median)	unbekannt

4.3 Mikrochimerismus bei rheumatoider Arthritis

In der RA Gruppe wurde der Einfluss des MC auf den Krankheitsverlauf von 72 Patientinnen untersucht. Bei 18% der Patientinnen konnte ein Y-chromosomaler MC im peripheren Blut nachgewiesen werden. Im Vergleich mit gesunden Kontrollen ist der Anteil MC positiver RA Patientinnen signifikant erhöht.

2005 verfassten Yan et al. eine Studie zum MC bei RA. Sie haben die Häufigkeit von MC bei 71 RA Patientinnen und 49 gesunden Frauen verglichen, wobei Daten zur Krankheitsschwere oder Krankheitsdauer für die Patientinnen nicht angegeben wurden. Frauen mit Aborten wurden nicht ausgeschlossen. Zwischen den gesunden und den erkrankten Frauen fanden sich kaum Unterschiede bei der Prävalenz des MC (24% vs. 18%) [108]. Bei der Arbeit von Yan et al. sind die Ergebnisse zur MC Prävalenz in der Untergruppe der RA Patientinnen ohne Aborte mit der vorliegenden Arbeit vergleichbar. In beiden Untersuchungen liegt die ermittelte Prävalenz des MC bei 18%.

Um einen möglichen Einfluss des MC auf den Krankheitsverlauf zu erkennen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Patientencharakteristika analysiert. Das Durchschnittsalter war bei MC positiven und MC negativen Patientinnen annähernd gleich, wodurch der Einfluss des Alters auf den MC beim Vergleich MC positiver und MC negativer Patientinnen innerhalb der RA Gruppe entfällt. Auch das Alter bei Krankheitsbeginn zeigte keine signifikanten Unterschiede bei annähernd gleichem Alter bei der ersten Entbindung eines Sohns.

Der Zeitraum, in dem die Mutter theoretisch einem fetalen MC ausgesetzt war, kann unterschiedlich berechnet werden. Wird bei der Berechnung der Zeitspanne als Startpunkt die Geburt des jüngsten Sohns genutzt, wird ein möglichst kurzes Intervall berechnet. Dabei würde die Elimination der semiallogenen DNA noch weniger fortgeschritten sein, als wenn der Zeitpunkt der Geburt des ältesten Sohns genommen wird. Würde dieser Zeitpunkt genutzt, wäre das Zeitintervall entsprechend länger. Dies spiegelt die maximale Zeitspanne wider, in der sich der Organismus der Frau mit dem MC auseinandersetzt. In dieser Arbeit wurden beide Fälle betrachtet, ohne dass dabei ein signifikanter Unterschied bei den Ergebnissen gezeigt werden konnte. Ein krankheitsmodulierender Einfluss des MC hätte sich unter anderem durch einen Unterschied beim Erkrankungsalter zeigen können, wurde in dieser Arbeit jedoch nicht gefunden. In der Literatur finden sich keine Arbeiten dazu, ob das Erkrankungsalter vom MC abhängt.

Allgemein gibt es für die Beurteilung der Krankheitsschwere mehrere Parameter. Hierbei gibt es Merkmale, die konstant vorliegen und solche, die abhängig von der Krankheitsaktivität sind, also stark schwanken können. Da in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf die Untersuchung der Langzeitpersistenz des MC gelegt wurde, wurden die Krankheitsparameter dementsprechend ausgewählt. Sie umfasst Autoantikörper, Röntgenbefund und die medikamentöse Therapie. Hinsichtlich der CCP-AK und des RF zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit vom MC. Die Gelenkdestruktion, gemessen am Steinbrocker-Index, wurde als Indikator für die Krankheitsprogression über einen langen Krankheitszeitraum gewählt. MC negative Patientinnen zeigten ein etwas niedrigeres Steinbrocker-Stadium als die MC positiven Patientinnen. Da das niedrigere Steinbrocker-Stadium der MC negativen Patientinnen mit einer kürzeren Erkrankungsdauer und einem niedrigeren Durchschnittsalter einher geht, konnte auch hieraus kein Einfluss auf den Krankheitsverlauf abgeleitet werden.

Einen anderen Ansatz wählten Rak et al. zur Beschreibung der Krankheitsschwere in Abhängigkeit von einem MC. Die Krankheitsaktivität wurde mit dem DAS28-Score gemessen. Sie fanden bei der Untersuchung der Schwere des Krankheitsverlaufs in Abhängigkeit von der Persistenz von MC keinen Zusammenhang [87]. Für die vorliegende Studie stellte sich der DAS28-Score als ungeeignet dar, da dieser eher eine Momentaufnahme der Krankheitsaktivität ist [41].

Ein bisher kaum beachteter Einflussfaktor auf den Krankheitsverlauf ist die medikamentöse Therapie. Sie beeinflusst den Krankheitsverlauf nachhaltig und kann einen möglichen krankheitsmodulierenden Einfluss des MC verschleiern. In dieser Arbeit wurden aufgrund der häufig schweren Krankheitsverläufe viele Patientinnen mit Biologicals behandelt. Die Therapieentscheidung für Biologicals kann dabei als Indikator für einen besonders schweren Krankheitsverlauf gewertet werden. Um die Kohorten weiter zu charakterisieren, wurde der Anteil der Patientinnen ermittelt, bei denen Biologicals Teil der Therapie waren. MC positive und MC negative RA Patientinnen erhielten zu annähernd gleichen Anteilen Biologicals. Bei einem starken krankheitsmodulierenden Einfluss des MC hätten sich hier Unterschiede abbilden können. Eine Analyse der RA-Therapie bei Angabe der MC Prävalenz ist in bisherigen Studien nicht veröffentlicht worden.

Weitaus besser beschrieben als die Langzeitpersistenz des MC ist das physiologische Auftreten eines MC während der Schwangerschaft. Durch die Bedeutung für die Gynäkologie und die Neonatologie standen bisher Untersuchungen bei gesunden Frauen oder RA Patientinnen während der Schwangerschaft und unmittelbar postpartal im Vordergrund. Grundlage für die Annahme, dass MC einen krankheitsmodulierenden Einfluss auf die RA haben könnten, ist die Beobachtung, dass es während der Schwangerschaft oft zu einer Besserung der RA kommen kann, wenn die Mutter vermehrt semiallogenen Zellen ausgesetzt ist [39] [107]. Innerhalb von drei Monaten nach der Entbindung kommt es aber oft zu einem Wiederaufflammen der Entzündungsaktivität [82].

Um die Reaktion des Immunsystems bei RA besser zu verstehen, untersuchten Nelson et al. 1993 den Einfluss von semiallogenen Zellen auf den Organismus anhand von HLA-II-Molekülen [75]. Bei der RA sind sogenannte „shared epitopes“ bekannt, die auf dem mit der Krankheit assoziierten HLA-DRB1 Allel liegen [75]. Bei der RA spielen dabei die Allele aus der DRB1*04 oder der DRB*01 Familie eine große Rolle. Nelson et al. konnten zeigen, dass eine Ungleichheit von RA-spezifischen HLA-II-Molekülen Einfluss auf die Krankheitsaktivität hat. Je mehr Unterschiede zwischen den HLA-II-Molekülen von Mutter und Kind bestanden, desto stärker kam es zu einer Verbesserung der Erkrankung. Bei sehr ähnlichen oder gleichen HLA-Typen konnte sogar eine Verschlechterung der Erkrankung beobachtet werden [75]. Auch Guthrie et al. fanden in ihrer Arbeit Hinweise, dass der Einfluss einer Schwangerschaft auf den Krankheitsverlauf abhängig vom HLA-Genotyp der Frauen variiert [31]. Wie genau sich diese Epitope auf die Krankheitsentstehung auswirken, ist noch nicht vollständig geklärt. Als pathophysiologische Faktoren werden die Präsentation von bestimmten Antigenen, die Ausbildung des T-Zell-Rezeptor-Repertoires sowie die Produktion von Antikörpern gegen zitrullinierte Proteine diskutiert [75].

Bei Patientinnen, die eine Besserung der RA-Symptome während der Schwangerschaft hatten, konnten Yan et al. quantitativ und qualitativ mehr kindliche DNA im Organismus der Mutter nachweisen als bei Patientinnen mit gleichbleibenden Beschwerden [107]. In diesem Zusammenhang liefert eine Arbeit von Rak et al. interessante Daten. Sie haben in ihrer 2009 veröffentlichten Arbeit untersucht, ob Frauen, die kein HLA-Allel mit „shared epitope“ aufwiesen, durch MC ein „shared epitope“ erhalten können. Dazu wurden alle untersuchten Frauen HLA-DRB1 und HLA-DQB1 typisiert. Die Frauen, die kein HLA-DRB1*01 Allel aufwiesen, wurden auf das Vorliegen von DRB1*01 MC untersucht. Bei Patientinnen mit RA

konnten qualitativ und quantitativ signifikant mehr MC gefunden werden (30%; n 10/30) als bei den gesunden Kontrollen (4%; n 2/46). Ähnliche Daten konnten auch bei der Untersuchung der HLA-DRB1*04 MC gefunden werden. Die Suche nach MC mit Allelen, die keinen Zusammenhang mit RA haben, ergab keinen Unterschied zwischen den Gruppen [87]. Diese Studien weisen darauf hin, dass der MC postpartum einen protektiven Effekt aufweist. Ob der MC selbst für diesen protektiven Effekt verantwortlich ist oder der Nachweis eher ein Marker für eine durchlässigere immunologische Barriere zwischen Mutter und Kind ist, bleibt unklar.

Neben der Untersuchung von peripherem Blut finden sich in der Literatur verschiedene Arbeiten zum MC in anderen Geweben. Bei der RA steht das Synovialgewebe im Mittelpunkt der aktivierten Immunreaktion. Sollten MC an der Pathogenese der RA ursächlich beteiligt sein, wäre ein vermehrtes Vorkommen von MC in diesem Gewebe wahrscheinlich. Hromadnikova et al. haben Synovialgewebe und Hautbiopsien, die im Rahmen operativer Eingriffe entnommen wurden, von Patientinnen mit RA auf das Vorkommen von männlicher DNA untersucht. Dazu verwendeten sie Proben von 19 RA Patientinnen, die durchschnittlich 55,2 Jahre alt waren und zuvor Söhne geboren hatten, und verglichen die Ergebnisse mit denen von RA Patientinnen ohne Kinder oder nur Töchtern. Die Erkrankungsdauer lag im Durchschnitt bei 16,4 Jahren (Minimum 3, Maximum 32 Jahre). Es wurde mit der PCR ein Teil des SRY Gens amplifiziert und nachgewiesen. Bei den Patientinnen mit Söhnen konnte im Synovialgewebe bei 5 von 13 Frauen (38,5%) und in 4 der 10 Hautbiopsien (40%) männliche DNA nachgewiesen werden. Bei den Proben der vier Frauen, die keinen Sohn geboren haben, konnte keine männliche DNA nachgewiesen werden. Eine Schwäche dieser Studie ist, dass keine Kontrollen, wie z.B. Arthrosepatienten, eingeschlossen wurden. Bluttransfusionen als Quelle für den MC wurden nicht ausgeschlossen [43].

Atkins et al. untersuchten 2010 Rheumaknoten von RA-Patientinnen auf das Vorkommen von männlicher DNA [10]. Dazu wiesen sie mittels PCR eine Y-Chromosom-spezifische Sequenz (DYS14) bei 15 Patientinnen nach. In 14 von 19 Gewebeproben (73,7%) aus den Rheumaknoten konnte ein MC detektiert werden. Unter den Patientinnen waren auch Frauen, die keine Söhne geboren hatten. Bei ihnen gab es auch keine Hinweise auf vorangegangene Aborte. Im Durchschnitt erkrankten die Patientinnen im Alter von 43 Jahren. Bei Probanden mit den höchsten MC Konzentrationen im Gewebe konnten die niedrigsten CCP-AK-

Konzentrationen gefunden werden. Bezüglich der Gelenkdestruktion im Röntgenbild konnte kein Zusammenhang mit dem Auftreten eines MC gefunden werden [10].

Zusammenfassend steht die im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Prävalenz des MC bei einer RA im Einklang mit bisherigen Arbeiten, wobei die direkte Vergleichbarkeit mit vorhandenen Arbeiten eingeschränkt ist. Bei der Analyse der Patientencharakteristika und der Krankheitsparameter ließ sich weder ein positiver noch ein negativer Einfluss des MC finden.

4.4 Mikrochimerismus beim systemischen Lupus erythematodes

Die Untersuchung von 16 SLE Patientinnen auf einen MC zeigte mit 31% MC positiven Patientinnen eine signifikant höhere Prävalenz im Vergleich zu den Kontrollen (3,7%). Das ein MC bei Frauen mit SLE vorkommt, wurde bereits von Abbud Filho M et al. (2002), Johnson et al. (2001) und Mosca et al. (2000, 2003) beschrieben [1, 47, 71, 72]. Die geringen Fallzahlen dieser Studien lassen jedoch keine sicheren Aussagen zum Einfluss des MC auf den Krankheitsverlauf zu. In der Literatur fand bisher besonders das Auftreten eines maternalem MC im Zusammenhang mit dem neonatalen Lupussyndrom Beachtung [95, 96].

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen MC positiven und MC negativen SLE Patientinnen für verschiedene Merkmale. Das Durchschnittsalter von MC positiven Patientinnen lag bei 51 Jahren und für MC negative Patientinnen bei 57 Jahren. Auch das Alter bei Krankheitsbeginn zeigte mit 43 (MC pos) bzw. 49 Jahre (MC neg) kaum Unterschiede bei annähernd gleichem Alter der Patientinnen bei Entbindung des ersten Sohnes (MC pos 24 Jahre bzw. MC neg 26 Jahre) und des jüngsten Sohnes (MC pos 25,5 Jahre bzw. MC neg 27 Jahre).

Zum Vergleich kann die Arbeit von Mosca et al. betrachtet werden. Sie untersuchten 22 Patientinnen mit SLE und 24 gesunde Kontrollen auf das Vorkommen von MC und den Krankheitsverlauf. In dieser Studie wurden Frauen mit Bluttransfusionen in der Anamnese ausgeschlossen. Von den 22 SLE Patientinnen waren 14 Frauen bereits vor der Entbindung des ersten Kindes an SLE erkrankt. Zwischen der Geburt des jüngsten Sohns und dem Untersuchungszeitpunkt lagen im Durchschnitt 16 Jahre. Bei acht Frauen ging der Krankheitsbeginn den Schwangerschaften voraus. Zum Nachweis des MC wurde eine Sequenz auf dem Y Chromosom mittels nested PCR amplifiziert. Bei 50% der SLE Patientinnen und auch bei 50% der gesunden Kontrollen wurde ein MC detektiert. Auch die Anzahl der chimären Zellen im Blut unterschied sich zwischen den Gruppen nicht signifikant.

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit fanden Mosca et al. damit keinen Unterschied zwischen gesunden und erkrankten Frauen [72].

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich keine signifikanten statistischen Unterschiede bezüglich folgender serologischer Parameter: ANA-Titer, der Anti-Doppelstrang-DNA-Antikörper oder der Komplementanalyse (C3, C4, CH50) in Abhängigkeit von einem MC. Die oben genannte Arbeit von Mosca et al. zeigt ebenfalls keine Korrelation zwischen der Schwere des Krankheitsverlaufs, gemessen mit dem European Consensus Lupus Activity Measurement (ECLAM), und der Präsenz fetaler MC [72]. In Bezug auf den fehlenden Zusammenhang zwischen Krankheitsschwere und MC bestätigt diese Arbeit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, auch wenn sich die Methode zur Ermittlung der Krankheitsschwere unterscheidet.

Da beim SLE der Organbefall von besonderem klinischen und prognostischen Interesses ist, wurde in dieser Arbeit die Organbeteiligung retrospektiv anhand der Patientenakten erfasst. MC positive und MC negative Patientinnen zeigten unterschiedliche Muster des Organbefalls. Aussagen zur Krankheitsschwere bleiben dabei aufgrund der geringen Fallzahlen unbeachtet. In der Literatur wurden Gewebe befallener Organe bei SLE häufiger untersucht als peripheres Blut. Der Anteil MC positiver Proben lag dabei zwischen 50% und 55% [56, 57] und damit im Trend höher als bei Blutuntersuchungen. Kremer Hovinga et al. haben das Vorkommen von MC in Nieren von gesunden Frauen und Frauen mit SLE untersucht. Dabei haben sie vermehrt MC in Nierenbiopsaten der Patientinnen mit SLE gefunden [56]. Auch in anderen Geweben konnten MC gefunden werden, so zum Beispiel in Darm und Lunge [57]. Kremer Hovinga et al. formulierten aus ihren Ergebnissen die Hypothese, dass chimäre Zellen am Reparaturmechanismus von geschädigtem Gewebe beteiligt seien. Dabei würden die chimären Progenitorzellen zu parenchymalen Zellen reifen, wodurch sie die Fähigkeit bekämen, sich in Zellverbände einzugliedern und Gewebedefekte zu reparieren. Der bevorzugten Untersuchung von Gewebeproben SLE-befallener Organe auf MC geht die Überlegung voraus, dass in diesen Gewebe quantitativ mehr MC zu finden sein kann.

Zum Pathomechanismus einer möglichen systemischen Wirkung des MC gaben Kremer Hovinga et al. 2007 ein Review heraus, in dem sie die Rolle der MC bei SLE zusammenfassen [58]. Nach Kremer Hovinga et al. könne der MC eine Graft-vs-Host Reaktion auslösen, wobei unter anderem T-Lymphozyten als MC aufträten. Unterstützt wird diese Hypothese durch Versuche, die bereits 1980 von Via und Shearer durchgeführt wurden

[103]. Via und Shearer injizierten paternale T-Lymphozyten in den Organismus von SLE Maus-Modellen, woraufhin sie eine Graft-vs-Host-Reaktion beobachteten. Wenn es sich beim MC um immunkompetente T-Zellen handelt, was zumindest bei einem kleinen Teil der nachgewiesenen MC der Fall ist [56], könnte eine Graft-vs-Host-Reaktion vermittelt werden [58]. Ebenso könne das Auftreten eines MC als Auslöser einer Host-vs-Graft Reaktion betrachtet werden [58]. Dabei würden die Antigene der chimären Zellen eine Immunantwort als direkte Reaktion auf den MC provozieren oder als Kreuzreaktion durch molekulares Mimikry. Um eine Host-vs-Graft-Reaktion auszulösen, müsste der Körper den MC als fremd erkennen. Während der Schwangerschaft sind die Mütter vor einer Immunreaktion gegen fetale Zellen noch weitestgehend geschützt. Wenn dieser Schutz verloren geht, da die Toleranzmechanismen nach der Entbindung entfallen, würden Reaktionen gegen fetale Zellen beginnen. Die fetalen Zellen könnten sich in der Zwischenzeit bereits in Zellverbände eingemischt haben. Dieses Szenario konnten die Daten von Kremer Hovinga et al. bestätigen [56]. Theoretisch sollte die Host-vs-Graft-Reaktion auf die Zellverbände begrenzt bleiben, in denen MC vorkommen. Dies würde zu einer lokal und temporär begrenzten Reaktion führen. Nur wenn die MC durch eine Reaktion des Immunsystems nicht erfolgreich zerstört werden können, könne dies zu einer chronischen Stimulation des Immunsystems führen. Dazu könne es zum Beispiel kommen, wenn eine gestörte Funktion der NK Zellen oder CD8 Lymphozyten aufträte [58].

In ihrer Hypothese zur chronischen Reaktion durch MC formulieren Kremer Hovinga et al., dass durch Mimikry zwischen fetalen und mütterlichen Zellen auch eigene Zellen als antigen erkannt würden. Die Entwicklung eines molekularen Mimikry sei nicht ungewöhnlich, da sich fetale und mütterliche Zellen stark ähneln, aber doch unterschiedlich genug seien, um eine Reaktion des Immunsystems auszulösen [58, 97]. Ein Nachweis dieser Hypothese erweist sich unter anderem als schwierig, da die antigen wirkenden Zellen zum Zeitpunkt des Krankheitsbeginns schon lange aus Blut oder Gewebe verschwunden sein können.

Ein weiterer interessanter Ansatz, die Langzeitpersistenz des MC zu erklären, entstand durch die Beobachtung, dass die Apoptose, die der Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz dient, beim SLE Besonderheiten aufweist. Dazu beschrieben Erwig et al. (2008), dass apoptotische Zellen eine zentrale Rolle bei der Toleranz von B- und T-Lymphozyten spielten, die gegen gewebespezifische und ubiquitäre Autoantigene gerichtet seien und so eine systemische Autoimmunität unterhielten. In Apoptose befindliche Zellen im Rahmen der

Gewebehomöostase sind eine potente Quelle für autoantigen-wirkendes Material, das bei Störung im Abbau einen Krankheitswert bekommen kann. Die Interaktion von apoptotischen Zellen und phagozytierenden Zellen ist dabei ein weiterer Faktor [25]. Hinweise auf eine fehlerhafte Beseitigung der Apoptosekörperchen bei SLE konnten Morgan und Botto finden, die C1q-null Mäuse untersuchten [16, 17, 106]. Die Mäuse mit einem C1q-Defekt wiesen einen gestörten Abbau apoptotischer Zellen auf und entwickelten eine Autoimmunerkrankung, die dem Krankheitsbild des SLE ähnelte. C1q bindet an apoptotische Zellen, ein Fehlen von C1q im Serum führt dazu, dass die Aufnahme dieser Zellen durch Makrophagen nicht mehr möglich ist. Auch ein Fehlen von C3b verschlechtert die Möglichkeit zur Aufnahme. In der Zusammenschau scheint das Auftreten des MC bei SLE Patientinnen durch veränderte Immunreaktionen des Körpers begünstigt zu sein. Bisher konnte jedoch keine Studie zeigen, dass sich der MC vor- oder nachteilig auf die Erkrankung auswirken kann.

4.5 Schlussfolgerungen

Die Bedeutung des MC für den Organismus ist erst in Ansätzen verstanden und ist weiterhin Gegenstand der Forschung. Einen diagnostischen Wert haben chimäre Zellen bereits im Monitoring der Zellpopulation nach Stammzelltransplantation oder bei der nicht-invasiven Pränataldiagnostik. Bei den Autoimmunerkrankungen wird der Einfluss des natürlich erworbenen MC durch die transplazentale Übertragung von immunkompetenten Zellen zwischen Mutter und Fetus während der Schwangerschaft unter zahlreichen Aspekten untersucht, ohne dass die bisherigen Ergebnisse eine klare diagnostische oder therapeutische Bedeutung zeigen. Obwohl in den letzten Jahren durch verschiedene Studien wichtige Erkenntnisse zum MC gewonnen wurden, bleibt die Frage nach Ursachen und Folgen weiterhin unbeantwortet [62, 79]. Es gibt Hinweise, dass der MC nur ein Epiphänomen bei Autoimmunerkrankungen ist, ohne dass er die klinische Manifestation der Erkrankung beeinflusst. Es bleibt offen, ob der Nachweis des MC ein prognostisch bedeutsamer Faktor ist. Die medikamentöse Therapie selbst könnte einen Einfluss auf den MC haben. Erkenntnisse dazu könnten an Patienten gewonnen werden, die milde Krankheitsverläufe mit fehlender Immunsuppression haben oder deren Erkrankung noch unbehandelt ist. Das Auftreten von MC könnte auch eine Folge der Erkrankung sein als ihr Mitauslöser. Die veränderten Immunreaktionen können eine Langzeitpersistenz von MC ermöglichen, ohne dass die MC den Krankheitsverlauf modellierten [8, 9].

5 Zusammenfassung

Während der Schwangerschaft kommt es zu einem diaplazentaren Austausch von mütterlichen und kindlichen Zellen. Die Zell-DNA oder sogar gesamte Zellen können persistieren und werden als Mikrochimerismus (MC) bezeichnet. Da in Studien bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen eine hohe Prävalenz von MC gefunden werden konnte, könnten sich das Auftreten von MC und die Entstehung von Autoimmunerkrankungen gegenseitig beeinflussen. Der Einfluss von MC auf den Langzeitverlauf von Autoimmunerkrankungen ist bisher kaum untersucht, daher wurden in dieser Arbeit neben der Prävalenz des fetalen MC auch krankheitsspezifische Parameter und der Krankheitsverlauf in Abhängigkeit von einem nachgewiesenen MC untersucht.

Insgesamt 143 Frauen, davon 54 gesunde Kontrollen, 72 Frauen mit rheumatoider Arthritis (RA) und 16 Frauen mit systemischem Lupus erythematodes (SLE) wurden auf Mikrochimerismen untersucht. Alle Frauen hatten mindestens einen Sohn geboren und die Patientinnen erfüllten die Krankheitskriterien für RA bzw. SLE. Wichtige Ausschlusskriterien waren Fehlgeburten und Fremdbluttransfusionen in der Anamnese. Zum Nachweis des MC wurde mittels nested PCR ein Teil des Testis-spezifischen Proteins amplifiziert, welches auf dem Y-Chromosom im mütterlichen peripheren Blut gefunden werden kann.

In der RA Gruppe lag der Anteil von Frauen mit MC bei 18% (13 von 72 Patientinnen) und damit signifikant höher als bei gesunden Kontrollen (3,7%, $n=54$, $p=0,02$). Das Durchschnittsalter der Frauen mit RA lag bei 61,7 Jahren. Das Alter bei Beginn der Erkrankung lag bei MC negativen und positiven RA Patientinnen bei 43,3 Jahren.

In der SLE Gruppe war die MC Prävalenz bei 31% und damit gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p=0,006$). Das Durchschnittsalter der SLE Patientinnen lag bei 55,3 Jahren. Das Alter bei Krankheitsbeginn lag für MC positive Patientinnen bei 42,6 Jahren, für MC negative bei 49,1 Jahren. Auch im Vergleich zur RA Gruppe war die Prävalenz in der SLE Gruppe erhöht, erreichte aber keine Signifikanz. In der RA sowie der SLE Gruppe haben MC positiven Frauen durchschnittlich mehr Söhne als MC negative Frauen. Ein Einfluss des MC auf den Krankheitsverlauf und die Krankheitsschwere ließ sich bei einer Analyse krankheits-spezifischer Parameter nicht nachweisen. Die Beobachtung, dass die Prävalenz des feto-maternalen MC krankheitsabhängig ist, unterstützt die Annahme, dass die veränderte Immunreaktion bei Autoimmunerkrankungen die Langzeitpersistenz von MC beeinflussen kann.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Abbud Filho M, Pavarino-Bertelli EC, et al. Systemic lupus erythematosus and microchimerism in autoimmunity. *Transplant. Proc.* 34. 2951-2952 (2002).
- [2] Aletaha D, Neogi T, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann. Rheum. Dis.* 69. 1580-1588 (2010).
- [3] Ariga H, Ohto H, et al. Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Transfusion* 41. 1524-1530 (2001).
- [4] Arnemann J, Epplen JT, et al. A human Y-chromosomal DNA sequence expressed in testicular tissue. *Nucleic Acids Res.* 15. 8713-8724 (1987).
- [5] Arnett FC, Edworthy SM, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31. 315-324 (1988).
- [6] Artlett CM, Welsh KI, et al. Fetal-maternal HLA compatibility confers susceptibility to systemic sclerosis. *Immunogenetics* 47. 17-22 (1997).
- [7] Artlett CM, Smith JB, et al. Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 338. 1186-1191 (1998).
- [8] Artlett CM. Microchimerism in health and disease. *Curr. Mol. Med.* 2. 525-535 (2002).
- [9] Artlett CM. Pathophysiology of fetal microchimeric cells. *Clin. Chim. Acta* 360. 1-8 (2005).
- [10] Atkins CJ, Chan WFN, et al. The Clinical Features of 13 Women with Microchimerism in Rheumatoid Nodules. *Arthritis Rheum* 62. 1060 (2010).
- [11] Barleben M. Kinetik des Auftretens fetaler DNA im mütterlichen Blut während und nach der Schwangerschaft. Magdeburg, Univ., Med. Fak., Diss. (2012).
- [12] Bianchi DW, Zickwolf GK, et al. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93. 705-708 (1996).
- [13] Bianchi DW, Williams JM, et al. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am. J. Hum. Genet.* 61. 822-829 (1997).
- [14] Bischoff FZ, Sinacori MK, et al. Cell-free fetal DNA and intact fetal cells in maternal blood circulation: implications for first and second trimester non-invasive prenatal diagnosis. *Hum. Reprod. Update* 8. 493-500 (2002).

- [15] Bonney EA , Matzinger P. The maternal immune system's interaction with circulating fetal cells. *J. Immunol.* 158. 40-47 (1997).
- [16] Botto M. C1q knock-out mice for the study of complement deficiency in autoimmune disease. *Exp. Clin. Immunogenet.* 15. 231-234 (1998).
- [17] Botto M, Dell'Agnola C, et al. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat. Genet.* 19. 56-59 (1998).
- [18] Brun JG, Nilssen S, et al. Breast feeding, other reproductive factors and rheumatoid arthritis. A prospective study. *Br. J. Rheumatol.* 34. 542-546 (1995).
- [19] Bundschuh G, Schneeweiss B, et al, Chimäre. *Lexikon der Immunologie*, 228-229 (1992).
- [20] Burger JA, Zvaifler NJ, et al. Fibroblast-like synoviocytes support B-cell pseudoemperipolesis via a stromal cell-derived factor-1- and CD106 (VCAM-1)-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* 107. 305-315 (2001).
- [21] Chiu RW, Rainer TH, et al. Circulating nucleic acid analysis: diagnostic applications for acute pathologies. *Acta Neurochir. Suppl.* 95. 471-474 (2005).
- [22] Covone AE, Mutton D, et al. Trophoblast cells in peripheral blood from pregnant women. *Lancet* 2. 841-843 (1984).
- [23] D. Anderson, R. E. Billingham, G. H. Lampkin, P. B. Medawar. The use of skin grafting to distinguish between monozygotic and dizygotic twins in cattle. *Heredity* 379-397 (1951).
- [24] Drexler C , Wagner T. Blood group chimerism. *Curr. Opin. Hematol.* 13. 484-489 (2006).
- [25] Erwig LP , Henson PM. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 15. 243-250 (2008).
- [26] Fan HC, Gu W, et al. Non-invasive prenatal measurement of the fetal genome. *Nature* 487. 320-324 (2012).
- [27] Fanning PA, Jonsson JR, et al. Detection of male DNA in the liver of female patients with primary biliary cirrhosis. *J. Hepatol.* 33. 690-695 (2000).
- [28] Firestein G, Budd C et al. *Kelly's textbook of rheumatology Vol.II.* Saunders (2008).
- [29] Ford CE. Mosaics and chimaeras. *Br. Med. Bull.* 25. 104-109 (1969).

- [30] Fournie GJ, Martres F, et al. Plasma DNA as cell death marker in elderly patients. *Gerontology* 39. 215-221 (1993).
- [31] Guthrie KA, Dugowson CE, et al. Does pregnancy provide vaccine-like protection against rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum.* (2010).
- [32] Halicka HD, Bedner E, et al. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp. Cell Res.* 260. 248-256 (2000).
- [33] Hamada H, Arinami T, et al. Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. *Hum. Genet.* 91. 427-432 (1993).
- [34] Hamada H, Arinami T, et al. Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood after delivery. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 170. 1188-1193 (1994).
- [35] Hans-Dieter Lippert, Willy A. Flegel, *Naturwissenschaftliche Grundlagen. Kommentar zum Transfusionsgesetz (TFG) und den Hämotherapie-Richtlinien*, Berlin. (2002).
- [36] Hans-Dieter Lippert, Willy A. Flegel., Eds. *Kommentar zum Transfusionsgesetz (TFG) und den Hämotherapie-Richtlinien*. Springer, Berlin (2002).
- [37] Hazes JM, Dijkmans BA, et al. Pregnancy and the risk of developing rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 33. 1770-1775 (1990).
- [38] Heliövaara M, Aho K, et al. Parity and risk of rheumatoid arthritis in Finnish women. *Br. J. Rheumatol.* 34. 625-628 (1995).
- [39] Hench PS. Effect of Jaundice on Rheumatoid Arthritis. *Br. Med. J.* 2. 394-398 (1938).
- [40] Hernandez Avila M, Liang MH, et al. Reproductive factors, smoking, and the risk for rheumatoid arthritis. *Epidemiology* 1. 285-291 (1990).
- [41] Hettenkofer H, Droste U. *Rheumatologie : Diagnostik - Klinik - Therapie ; 155 Tabellen*. Stuttgart; New York : Thieme (2003).
- [42] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 40. 1725 (1997).
- [43] Hromadnikova I, Zlacka D, et al. Fetal cells of mesenchymal origin in cultures derived from synovial tissue and skin of patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 75. 563-566 (2008).
- [44] Illanes S, Denbow M, et al. Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Early Hum. Dev.* 83. 563-566 (2007).

- [45] Jiang SP , Vacchio MS. Multiple mechanisms of peripheral T cell tolerance to the fetal "allograft". *J. Immunol.* 160. 3086-3090 (1998).
- [46] Johnson KL, Zhen DK, et al. The use of fluorescence in situ hybridization (FISH) on paraffin-embedded tissue sections for the study of microchimerism. *BioTechniques* 29. 1220-1224 (2000).
- [47] Johnson KL, McAlindon TE, et al. Microchimerism in a female patient with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 44. 2107-2111 (2001).
- [48] Kaplan J , Land S. Influence of maternal-fetal histocompatibility and MHC zygosity on maternal microchimerism. *J. Immunol.* 174. 7123-7128 (2005).
- [49] Karlson EW, Mandl LA, et al. Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurses' Health Study. *Arthritis Rheum.* 50. 3458-3467 (2004).
- [50] Kaye JJ, Fuchs HA, et al. Problems with the Steinbrocker staging system for radiographic assessment of the rheumatoid hand and wrist. *Invest. Radiol.* 25. 536-544 (1990).
- [51] Khosrotehrani K, Johnson KL, et al. The influence of fetal loss on the presence of fetal cell microchimerism: a systematic review. *Arthritis Rheum.* 48. 3237-3241 (2003).
- [52] Kitzman JO, Snyder MW, et al. Noninvasive whole-genome sequencing of a human fetus. *Sci. Transl. Med.* 4. 137ra76 (2012).
- [53] Klippel JH, Stone JH, et al. *Primer on the Rheumatic Diseases.* Springer (2008).
- [54] Komlos L, Livni E, et al. Mode of inheritance of HLA haplotypes locus A,B in siblings of different sexes. *Am. J. Reprod. Immunol.* 29. 224-230 (1993).
- [55] Komlos L, Korostishevsky M, et al. Possible sex-correlated transmission of maternal class I HLA haplotypes. *Eur. J. Immunogenet.* 24. 169-177 (1997).
- [56] Kremer Hovinga IC, Koopmans M, et al. Chimerism occurs twice as often in lupus nephritis as in normal kidneys. *Arthritis Rheum.* 54. 2944-2950 (2006).
- [57] Kremer Hovinga IC, Koopmans M, et al. Tissue chimerism in systemic lupus erythematosus is related to injury. *Ann. Rheum. Dis.* 66. 1568-1573 (2007).
- [58] Kremer Hovinga IC, Koopmans M, et al. Chimerism in systemic lupus erythematosus--three hypotheses. *Rheumatology (Oxford)* 46. 200-208 (2007).

- [59] Kuo PL. Frequencies of fetal nucleated red blood cells in maternal blood during different stages of gestation. *Fetal. Diagn. Ther.* 13. 375-379 (1998).
- [60] Kuroki M, Okayama A, et al. Detection of maternal-fetal microchimerism in the inflammatory lesions of patients with Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 61. 1041-1046 (2002).
- [61] Lambert NC, Erickson TD, et al. Quantification of maternal microchimerism by HLA-specific real-time polymerase chain reaction: studies of healthy women and women with scleroderma. *Arthritis Rheum.* 50. 906-914 (2004).
- [62] Lambert N, Nelson JL. Microchimerism in autoimmune disease: more questions than answers? *Autoimmun Rev* 2. 133-139 (2003).
- [63] Lang TJ. Estrogen as an immunomodulator. *Clin. Immunol.* 113. 224-230 (2004).
- [64] Lee TH, Montalvo L, et al. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion* 41. 276-282 (2001).
- [65] Lo YM, Corbetta N, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350. 485-487 (1997).
- [66] Lo YM, Tein MS, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Genet.* 62. 768-775 (1998).
- [67] Lo YM, Zhang J, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am. J. Hum. Genet.* 64. 218-224 (1999).
- [68] Lo YM. Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic applications. *Clin. Chem.* 46. 1903-1906 (2000).
- [69] Lo YM, Lau TK, et al. Quantitative analysis of the bidirectional fetomaternal transfer of nucleated cells and plasma DNA. *Clin. Chem.* 46. 1301-1309 (2000).
- [70] Loubiere LS, Lambert NC, et al. Maternal microchimerism in healthy adults in lymphocytes, monocyte/macrophages and NK cells. *Lab. Invest.* 86. 1185-1192 (2006).
- [71] Miyashita Y, Ono M, et al. Y chromosome microchimerism in rheumatic autoimmune disease. *Ann. Rheum. Dis.* 59. 655-656 (2000).
- [72] Mosca M, Curcio M, et al. Correlations of Y chromosome microchimerism with disease activity in patients with SLE: analysis of preliminary data. *Ann. Rheum. Dis.* 62. 651-654 (2003).

- [73] Mosca M , Bombardieri S. Disease-specific quality indicators, guidelines, and outcome measures in systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin. Exp. Rheumatol.* 25. 107-113 (2007).
- [74] Mullis K, Faloona F, et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1. 263-273 (1986).
- [75] Nelson JL, Hughes KA, et al. Maternal-fetal disparity in HLA class II alloantigens and the pregnancy-induced amelioration of rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 329. 466-471 (1993).
- [76] Nelson JL. Maternal-fetal immunology and autoimmune disease: is some autoimmune disease auto-alloimmune or allo-autoimmune? *Arthritis Rheum.* 39. 191-194 (1996).
- [77] Nelson JL, Furst DE, et al. Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet* 351. 559-562 (1998).
- [78] Nelson JL, Gillespie KM, et al. Maternal microchimerism in peripheral blood in type 1 diabetes and pancreatic islet beta cell microchimerism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104. 1637-1642 (2007).
- [79] Nelson JL. Naturally acquired microchimerism: for better or for worse. *Arthritis Rheum.* 60. 5-7 (2009).
- [80] Nguyen Huu S, Dubernard G, et al. Feto-maternal cell trafficking: a transfer of pregnancy associated progenitor cells. *Stem Cell. Rev.* 2. 111-116 (2006).
- [81] Osada H, Doi S, et al. Detection of fetal HPCs in maternal circulation after delivery. *Transfusion* 41. 499-503 (2001).
- [82] Ostensen M, Villiger PM, et al. Interaction of pregnancy and autoimmune rheumatic disease. *Autoimmun. Rev.* (2011).
- [83] Ostensen M , Villiger PM. The remission of rheumatoid arthritis during pregnancy. *Semin Immunopathol* 29. 185-191 (2007).
- [84] Petz, Lawrence, Bone Marrow Transplantation. *Clinical practice of transfusion medicine*, 772-776 (1996).
- [85] Pincus T, Larsen A, et al. Comparison of 3 quantitative measures of hand radiographs in patients with rheumatoid arthritis: Steinbrocker stage, Kaye modified Sharp score, and Larsen score. *J. Rheumatol.* 24. 2106-2112 (1997).
- [86] Pope JE, Bellamy N, et al. The lack of associations between rheumatoid arthritis and both nulliparity and infertility. *Semin. Arthritis Rheum.* 28. 342-350 (1999).

- [87] Rak JM, Maestroni L, et al. Transfer of the shared epitope through microchimerism in women with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 60. 73-80 (2009).
- [88] Rau RW, S. Bildgebende Verfahren in der Rheumatologie: Scoring-Methoden bei der rheumatoiden Arthritis. *Zeitschrift fuer Rheumatologie* 62. 555; 555-565; 565 (2003).
- [89] Regan-Smith MG, O'Connor GT, et al. Lack of correlation between the Steinbrocker staging of hand radiographs and the functional health status of individuals with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 32. 128-133 (1989).
- [90] Schroder J, Tiilikainen A, et al. Fetal leukocytes in the maternal circulation after delivery. I. Cytological aspects. *Transplantation* 17. 346-354 (1974).
- [91] Schroder J. Transplacental passage of blood cells. *J. Med. Genet.* 12. 230-242 (1975).
- [92] Smith EL, Shmerling RH. The American College of Rheumatology criteria for the classification of systemic lupus erythematosus: strengths, weaknesses, and opportunities for improvement. *Lupus* 8. 586-595 (1999).
- [93] Spector TD, Roman E, et al. The pill, parity, and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 33. 782-789 (1990).
- [94] Stastny P. HLA-D and Ia antigens in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 21. S139-43 (1978).
- [95] Stevens AM, Hermes HM, et al. Myocardial-tissue-specific phenotype of maternal microchimerism in neonatal lupus congenital heart block. *Lancet* 362. 1617-1623 (2003).
- [96] Stevens AM, Hermes HM, et al. Maternal and sibling microchimerism in twins and triplets discordant for neonatal lupus syndrome-congenital heart block. *Rheumatology (Oxford)* 44. 187-191 (2005).
- [97] Stevens AM, Tsao BP, et al. Maternal HLA class II compatibility in men with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 52. 2768-2773 (2005).
- [98] Thomas MR, Williamson R, et al. Y chromosome sequence DNA amplified from peripheral blood of women in early pregnancy. *Lancet* 343. 413-414 (1994).
- [99] Thomas MR, Tutschek B, et al. The time of appearance and disappearance of fetal DNA from the maternal circulation. *Prenat. Diagn.* 15. 641-646 (1995).
- [100] Toda I, Kuwana M, et al. Lack of evidence for an increased microchimerism in the circulation of patients with Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 60. 248-253 (2001).

- [101] van Venrooij WJ , Pruijn GJ. Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2. 249-251 (2000).
- [102] van Venrooij WJ, Hazes JM, et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. *Neth. J. Med.* 60. 383-388 (2002).
- [103] Via CS , Shearer GM. T-cell interactions in autoimmunity: insights from a murine model of graft-versus-host disease. *Immunol. Today* 9. 207-213 (1988).
- [104] Vogel T , Schmidtke J. Structure and function of TSPY, the Y-chromosome gene coding for the "testis-specific protein". *Cytogenet. Cell Genet.* 80. 209-213 (1998).
- [105] Walknowska J, Conte FA, et al. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet* 1. 1119-1122 (1969).
- [106] White S, Rosen A. Apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Rheumatol.* 15. 557-562 (2003).
- [107] Yan Z, Lambert NC, et al. Prospective study of fetal DNA in serum and disease activity during pregnancy in women with inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 54. 2069-2073 (2006).
- [108] Yan Z, Lambert NC, et al. Male microchimerism in women without sons: quantitative assessment and correlation with pregnancy history. *Am. J. Med.* 118. 899-906 (2005).
- [109] Zhou L, Yoshimura Y, et al. Two independent pathways of maternal cell transmission to offspring: through placenta during pregnancy and by breast-feeding after birth. *Immunology* 101. 570-580 (2000).
- [110] Zimmermann B, El-Sheikhah A, et al. Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* 51. 1598-1604 (2005).
- [111] Yan Z, Aydelotte T, et al. Acquisition of the Rheumatoid Arthritis HLA Shared Epitope Through Microchimerism. *Arthritis Rheum.* 63(3). 640–644 (2011).

7 Danksagungen

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Thomas Brune dafür danken, dass er mir die Arbeit an dieser Promotionsarbeit ermöglicht hat. Er hat mich mit seinem Wissen und seinem Engagement sehr gefördert.

Allen Patientinnen aus der Klinik für Rheumatologie Vogelsang-Gommern und Probanden aus dem Mitarbeiterkreis der Universitätsfrauenklinik Magdeburg, die sich bereit erklärt haben, an dieser Studie teil zu nehmen, möchte ich ganz besonders danken. Den Mitarbeitern der Klinik für Rheumatologie Vogelsang-Gommern möchte ich für die Unterstützung bei den Blutentnahmen bedanken. Mein Dank gilt auch Frau Sibille Brüggemann, die mir bei der Rekrutierung von Patienten sehr geholfen hat.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Humangenetik und des Forschungslabors der Universitätskinderklinik Magdeburg möchte ich für die Unterstützung bedanken. Frau Dr. rer. nat. Sibylle Jakubiczka hat meine Arbeit im Forschungslabor der Humangenetik Magdeburg ermöglicht und begleitet.

Ganz besonders möchte ich mich auch für die Unterstützung von Frau Dr. rer. nat. Susanne Drynda bedanken. Sie hat meine Laboruntersuchungen unterstützt und Anregungen bei der Auswertung der Ergebnisse gegeben.

Auch bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich bei meiner Promotion unterstützt haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

8 Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Prävalenz feto-maternaler Mikrochimerismen bei Patientinnen mit rheumatoider Arthritis oder systemischem Lupus erythematoses und deren Einfluss auf den Krankheitsverlauf

in der Klinik für Kinderheilkunde der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. Thomas Brune, Frau Dr. S. Jakubiczka und Frau Dr. S. Drynda

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 04.10.2013

9 Lebenslauf

Marianne Monika Traute Gerda Jahn, geb. Kekow

Geboren am 22.05.1987 in Kiel

Schulbildung

1993 – 1996	Grund- und Hauptschule Suchsdorf, Kiel
1996 – 1997	Grundschule am Weinberg, Gommern
08/1997 – 04/2006	Norbertus - Gymnasium, Magdeburg, Abschluss: Abitur
09/2002 – 01/2003	University City Highschool, San Diego, Kalifornien, USA

Hochschulausbildung

09/2006 – 12/2012	Studium der Humanmedizin Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus , Technische Universität Dresden
08/2008	1. Staatsexamen
10/2012 – 12/2012	2. Staatsexamen, Erteilung der Approbation
Seit 2009	Beginn der experimentellen wissenschaftlichen Arbeit bei Prof. Dr. med. habil. Thomas Brune (Universitätskinderklinik Magdeburg)
01/2013	Tätigkeit als Assistenzärztin am Klinikum Offenbach

Praktisches Jahr

08/2011 – 07/2012	1. Terial: Pädiatrie im Krankenhaus Freital, Weißeritztal-Kliniken 2. Terial: Innere Medizin im Krankenhaus St. Josephstift, Dresden 3. Terial: Chirurgie in der Uniklinik Magdeburg
-------------------	--

Famulaturen

02/2010 – 03/2010	Fachkrankenhaus Lostau
07/2009 – 08/2009	Anästhesie, Fachkrankenhaus Vogelsang-Gommern
02/2011 – 03/2011	Innere Medizin, Elblandkliniken Radebeul
02/2009 – 03/2009	Rheumatologie, Fachkrankenhaus Vogelsang-Gommern

10 Anhang

- 1 Anschreiben RA Patientinnen
 Anschreiben SLE Patientinnen
- 2 Fragebogen RA Patientinnen
 Fragebogen SLE Patientinnen
- 3 Einverständniserklärung
- 4 Beispiel Röntgenbilder RA
 Steinbrocker 1
 Steinbrocker 2
 Steinbrocker 3
 Steinbrocker 4

1 Anschreiben RA Patientinnen

OTTO-VON-GUERICKE-UNIVERSITÄT MAGDEBURG

Medizinische Fakultät

Zentrum für Kinderheilkunde
Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie

Direktor: Prof. Dr. med. G.Jorch



PD Dr. Thomas Brune • Zentrum für Kinderheilkunde
Gerhard-Hauptmann-Str. 35 • D-39108 Magdeburg

An:



Sehr geehrte Frau , Vogelsang, den
vor einiger Zeit hat eine Pilotstudie gezeigt, dass bei 20% gesunder Mütter noch 5 Jahre nach der Geburt eines Kindes dessen Zellen im Blut der Mutter nachweisbar sind (ein so genannter Mikrochimärismus). Diese Zellen könnten auch die Ursache für die Entstehung von rheumatischen Erkrankungen sein.

In einer neuen Studie wollen wir daher der Frage nachgehen, ob sich im Blut von Rheumapatientinnen Zellen von deren Kindern häufiger nachweisen lassen als bei Frauen, die nicht unter einer rheumatoiden Arthritis leiden. Die Studie findet mit Unterstützung der Klinik für Rheumatologie in Vogelsang statt.

Dafür benötigen wir Ihre Mitarbeit! Sie würden uns sehr helfen, wenn Sie die beiliegende Einverständniserklärung unterschreiben und in dem frankierten und adressierten Rückumschlag an uns zurück senden. Am Telefon haben Sie uns bereits Fragen zu ihrer Erkrankung beantwortet.

Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Falls Sie nicht teilnehmen möchten, entstehen Ihnen hieraus keine Nachteile. Wir möchten ausdrücklich betonen, dass alle Informationen, die Ihre Person betreffen, streng vertraulich behandelt werden. Alle im Rahmen der Studie anfallenden Daten werden nur in anonymisierter Form gespeichert, d.h. ohne Namen und andere persönliche Daten. Die Belange der ärztlichen Schweigepflicht und des Datenschutzes werden voll gewahrt. Auch im Falle von Veröffentlichungen wird der Datenschutz vollumfänglich gewahrt. Der Studie hat die Ethikkommission der Otto-von-Guericke-Universität zugestimmt.

Für Ihre Mithilfe möchten wir uns schon jetzt ganz herzlich bedanken. Für Rückfragen stehen wir jederzeit zur Verfügung unter Tel.: 039200/67300 (Sekretariat der Klinik für Rheumatologie Vogelsang).

Mit freundlichen Grüßen,

PD Dr. Th. Brune
Universitätskinderklinik

Marianne Kekow
cand. med.

1 Anschreiben SLE Patientinnen

OTTO-VON-GUERICKE-UNIVERSITÄT MAGDEBURG

Medizinische Fakultät

Zentrum für Kinderheilkunde
Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie
Direktor: Prof. Dr. med. G.Jorch



PD Dr. Thomas Brune • Zentrum für Kinderheilkunde
Gerhard-Hauptmann-Str. 35 • D-39108 Magdeburg

Sehr geehrte Frau

Es ist bekannt, dass Schwangerschaften einen Einfluss auf die Entstehung von Autoimmunerkrankungen haben, so zum Beispiel auch auf die Entstehung eines systemischen Lupus erythematodes (SLE). Während der Schwangerschaft werden Zellen zwischen Mutter und Kind ausgetauscht. Sie verschwinden in der Regel aber schon bald nach der Entbindung aus dem Blut. Bei einigen Frauen sind diese Zellen aber noch Jahrzehnte später im Blut nachweisbar.

Wir konnten in einer Pilotstudie herausfinden, dass bei Patientinnen, die an rheumatoider Arthritis leiden, mehr Frauen noch Bestandteile aus den kindlichen Zellen in sich tragen als bei gesunden Frauen (Mikrochimerismus genannt).

Nun interessiert es uns sehr, ob bei Frauen mit SLE auch ein solcher Mikrochimerismus vorliegt. Bisher haben wir zu wenige Frauen untersuchen können, um aufschlussreiche Ergebnisse zu bekommen.

Daher möchten wir Sie bitten, an unserer Studie teilzunehmen.

Wir suchen Frauen, die mindestens einen Sohn geboren haben und an einem SLE leiden. Zudem sollten Sie noch nie fremdes Blut in einer Transfusion verabreicht bekommen haben.

Wenn Sie Interesse haben, werden wir Ihnen einen Fragebogen zuschicken, in dem wir Ihnen Fragen zu Ihrer Erkrankung stellen. Zudem brauchen wir ein Röhrchen Blut von Ihnen. In Ihrem Blut wollen wir dann nach Zellen ihrer Kinder suchen. Dies ist auch möglich, wenn Ihre Schwangerschaft schon viele Jahre zurück liegt. Die Blutentnahme könnte bei Ihrem nächsten Termin bei Ihrem Hausarzt oder in Vogelsang durchgeführt werden.

Vielen Dank für Ihr Interesse! Für Rückfragen stehen wir jederzeit zur Verfügung (Tel.: 0391/67490 oder E-Mail: thomas.brune@medizin.uni-magdeburg.de).

Mit freundlichen Grüßen;

PD Dr. Th. Brune
Universitätskinderklinik

Marianne Kekow
cand. med.

Prof. Dr. J. Kekow
Rheumaklinik Vogelsang

OTTO-VON-GUERICKE-UNIVERSITÄT MAGDEBURG
Medizinische Fakultät

Zentrum für Kinderheilkunde
Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie
Direktor: Prof. Dr. med. G.Jorch

PD Dr. Thomas Brune • Zentrum für Kinderheilkunde
Wiener Straße • D-39112 Magdeburg



Studie zur Untersuchung des Einflusses von Schwangerschaften auf die Entstehung von Autoimmunerkrankungen

Probandenfragebogen:

Ihre Initialen: _____ Geburtsjahr: _____

Leiden oder litten Sie an einer rheumatoiden Arthritis?

Nein Ja .

Waren Sie schon einmal schwanger: Nein Ja .

Wenn ja, füllen Sie bitte die folgenden Zeilen für jedes Kind einzeln aus:

	Geburtsdatum	Geschlecht
1		m <input type="checkbox"/> w <input type="checkbox"/>
2		m <input type="checkbox"/> w <input type="checkbox"/>
3		m <input type="checkbox"/> w <input type="checkbox"/>
4		m <input type="checkbox"/> w <input type="checkbox"/>

Haben Sie schon einmal Fremdbluttransfusionen bekommen? Nein Ja .

Wenn ja, wann? Bitte ungefähres Datum angeben:

Haben Sie noch weitere Erkrankungen? Nein Ja .

Wenn ja, welche?:

Bitte wenden!

Seite 2

Die folgenden Fragen beziehen sich auf den Verlauf ihrer Rheumaerkrankung. Sie brauchen die Fragen nicht zu beantworten, wenn Sie nicht an einer rheumatoiden Arthritis erkrankt sind.

-Seit wann haben Sie Beschwerden? (Bitte Jahr angeben)

-Wann wurde die rheumatoide Arthritis bei Ihnen von einem Arzt diagnostiziert?

-Traten bei Ihnen rheumatische Beschwerden schon vor Eintritt der ersten Schwangerschaft auf?

-Wie haben sich die Beschwerden nach der Schwangerschaft entwickelt?

	<u>Schwach</u>	<u>gleich</u>	<u>stark</u>
Während der Schwangerschaft	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gleich nach der Schwangerschaft	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1 Jahr nach der Geburt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5 Jahre nach der Geburt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10 Jahre nach der Geburt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Die folgenden Fragen beziehen sich auf eine mögliche Erkrankung Ihres Sohnes/Ihrer Söhne. Bitte beziehen Sie sich auf den Sohn, der am schwersten erkrankt ist, falls sie mehrere Söhne haben.

Leidet Ihr Sohn an einer der folgenden Erkrankungen?

	<u>Ja</u>	<u>Nein</u>
-Rheumatoide Arthritis (RA)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Psoriasis-Arthritis (Schuppenflechten-Gelenkrheuma)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Kollagenose (z.B. Lupus erythematodes)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Morbus Bechterew	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Sjögren-Syndrom	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Morbus Crohn/ Colitits ulzerosa (entzündliche Darmerkrankung)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

-andere chronische Erkrankungen, bitte angeben:

Vielen Dank für die Beantwortung des Fragebogens!

Bitte schicken Sie uns den Fragebogen in dem bereits frankierten und adressierten Briefumschlag zurück.

Mit freundlichen Grüßen,

PD Dr. Th. Brune
Universitätskinderklinik

Marianne Kekow
cand. med.

2 Fragebogen SLE Patientinnen

OTTO-VON-GUERICKE-UNIVERSITÄT MAGDEBURG
Medizinische Fakultät

Zentrum für Kinderheilkunde
Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie
Direktor: Prof. Dr. med. G.Jorch

PD Dr. Thomas Brune • Zentrum für Kinderheilkunde
Wiener Straße • D-39112 Magdeburg



An:

Studie zur Untersuchung des Einflusses von Schwangerschaften auf die Entstehung von Autoimmunerkrankungen

Probandenfragebogen:

Ihr Geburtsjahr: _____

Leiden oder litten Sie an einem systemischen Lupus erythematoses (SLE)?

Nein Ja .

Waren Sie schon einmal schwanger: Nein Ja .

Wenn ja, füllen Sie bitte die folgenden Zeilen für jedes Kind einzeln aus:

	Geburtsdatum	Geschlecht
1		m <input type="checkbox"/> w <input type="checkbox"/>
2		m <input type="checkbox"/> w <input type="checkbox"/>
3		m <input type="checkbox"/> w <input type="checkbox"/>
4		m <input type="checkbox"/> w <input type="checkbox"/>

Haben Sie schon einmal Fremdbluttransfusionen bekommen?

Nein

Ja .

Wenn ja, wann? Bitte ungefähres Datum angeben:

Haben Sie noch weitere Erkrankungen?

Nein

Ja .

Wenn ja, welche?:

Bitte wenden!

Seite 2

Die folgenden Fragen beziehen sich auf den Verlauf ihrer SLE-Erkrankung. Sie brauchen die Fragen nicht zu beantworten, wenn Sie nicht an SLE erkrankt sind.

-Seit wann haben Sie Beschwerden? (Bitte Jahr angeben)

-Wann wurde der SLE bei Ihnen von einem Arzt diagnostiziert?

-Traten bei Ihnen Beschwerden schon vor Eintritt der ersten Schwangerschaft auf?

-Wie haben sich die Beschwerden nach der Schwangerschaft entwickelt?

	<u>keine</u>	<u>schwache</u>	<u>starke Beschwerden</u>
Während der Schwangerschaft	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gleich nach der Schwangerschaft	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1 Jahr nach der Geburt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5 Jahre nach der Geburt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10 Jahre nach der Geburt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Die folgenden Fragen beziehen sich auf eine mögliche Erkrankung Ihres Sohnes/Ihrer Söhne. Bitte beziehen Sie sich auf den Sohn, der am schwersten erkrankt ist, falls sie mehrere Söhne haben.

Leidet Ihr Sohn an einer der folgenden Erkrankungen?

	<u>Ja</u>	<u>Nein</u>
-SLE	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Kollagenose	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-systemische Sklerodermie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Polymyositis/Dermatomyositis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-Gefäßentzündung (Vaskulitis)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

-andere chronische Erkrankungen, bitte angeben:

Vielen Dank für die Beantwortung des Fragebogens!

Bitte schicken Sie uns den Fragebogen in dem bereits frankierten und adressierten Briefumschlag zurück.

Mit freundlichen Grüßen,

PD Dr. Th. Brune
Universitätskinderklinik

Marianne Kekow
cand. med.

Prof. Dr. J. Kekow
Rheumaklinik Vogelsang

3 Einverständniserklärung RA Patientinnen/ SLE Patientinnen

OTTO-VON-GUERICKE-UNIVERSITÄT MAGDEBURG
Medizinische Fakultät

Zentrum für Kinderheilkunde
Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie
Direktor: Prof. Dr. med. G.Jorch



PD Dr. Thomas Brune • Zentrum für Kinderheilkunde
Gerhard-Hauptmann-Str. 35 • D-39108 Magdeburg



Betr. Studie: „Der Einfluss feto-maternaler Mikro-Chimärismen auf die Entstehung von Autoimmunerkrankungen“

Einverständniserklärung :

Ich bin bereit, an der oben genannten Studie teilzunehmen und erkläre mich mit der anonymen Auswertung meiner Daten zu wissenschaftlichen Zwecken einverstanden. Darüber hinaus bin ich damit einverstanden, dass mir dazu 10 ml Blut entnommen und auf das Vorhandensein von Zellen meines Kindes untersucht wird.

Unterschrift des Patienten: _____

4 Beispiel Röntgenbilder: Steinbrocker 1



4 Beispiel Röntgenbilder: Steinbrocker 2



4 Beispiel Röntgenbilder: Steinbrocker 3



4 Beispiel Röntgenbilder: Steinbrocker 4

