

**„Genetik und Immunologie der Antikörper gegen citrullinierte
Peptidantigene bei der rheumatoiden Arthritis“**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

von

Diplom-Biologen Robby Engelmann

geb. am 25.12.1981 in Oschatz

Gutachter: Prof. Dr. Müller-Hilke (Institut für Immunologie, Universität Rostock)
Prof. Dr. Schröder (Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock)

Datum der mündlichen Prüfung: 25.01.2010

There is no sadder sight in the world than to see a beautiful theory killed by a brutal fact.

(Thomas Henry Huxley)

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	5
2 Einführung	6
2.1 Autoimmunität - eine Erkrankung des Immunsystems	6
2.1.1 Toleranzinduktion und die Entstehung von Autoimmunität	6
2.1.2 Autoimmunerkrankungen etablieren sich durch das Zusammenwirken vieler Komponenten des Immunsystems	8
2.2 Rheumatoide Arthritis	11
2.2.1 Krankheitsbild	11
2.2.2 Antikörper gegen citrullinierte Peptidantigene	12
2.2.3 Die rheumatoide Arthritis ist mit dem Auftreten bestimmter HLA-DRB1 Allele assoziiert	15
3 Materialien und Methoden	19
3.1 Patienten	19
3.2 ELISA	19
3.2.1 Bestimmung des CCP Status	20
3.2.2 Subklassenspezifischer ELISA - Etablierung / Qualitätskontrolle	21
3.2.3 Subklassenspezifischer ELISA - Durchführung	22
3.2.4 Sequentieller ELISA	22
3.3 Bestimmung der Shared-Epitop Allele	24
3.3.1 Isolation genomischer DNA	24
3.3.2 Verwendete Oligonukleotide	26
3.3.3 HLA-DR Typisierung	27
3.3.4 Sequenzierung von HLA-DRB4 Promotor und -Spleißvariante . .	28
3.3.5 Sequenzierung der HLA-DRB1 Shared-Epitop Allele	31
3.4 Funktionelle Untersuchungen zu IgG4	32
3.4.1 Puffer und Lösungen	33
3.4.2 Antikörper	35
3.4.3 Isolation von IgG1 und IgG4 aus Seren von Allergiepateinten . .	35

3.4.4	<i>In-vitro</i> Generierung und Detektion von Immunkomplexen	37
3.4.5	Apoptose in B-Zell Populationen	38
3.4.6	Nachweis von ROS in humanen Neutrophilen	40
3.5	Statistik	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Charakteristika der RA Patienten Kohorte	42
4.2	IgG1 und IgG4 sind die dominierenden Subklassen unter den ACPAs .	42
4.2.1	Qualitätskontrolle des subklassenspezifischen ELISAs	42
4.2.2	Bestimmung der optimalen Serumverdünnung	44
4.2.3	CCP und MCV spezifische Autoantikörper korrelieren signifi- kant miteinander	45
4.2.4	Die ACPAs der IgG4 Subklasse sind auffällig erhöht	46
4.2.5	Antikörper gegen VZV und Gesamtserumspiegel von IgG4	48
4.2.6	Korrelation mit Krankheitsparametern	49
4.3	Das Erkennungsspektrum der Autoantikörper gegen MCV subklassifi- zieren die ACPA-positiven RA Patienten	50
4.4	Der Einfluss von HLA-DRB Allelen auf die Subklassenspiegel der ACPA	52
4.4.1	HLA-Typisierung	52
4.4.2	Die Frequenz der HLA-DRB4 Spleißvariante	58
4.5	Funktionelle Aspekte von IgG4	60
4.5.1	Aufreinigung von IgG und IgG1/4	60
4.5.2	IgG4 verhindert die Bildung von Immunkomplexen	62
4.5.3	Apoptose von Immunkomplex-stimulierten B-Zell Populationen .	65
4.5.4	Aktivierungsstatus von Neutrophilen nach Stimulation mit Im- munkomplexen	67
5	Diskussion	70
5.1	Die Subklassen der Autoantikörper gegen MCV und CCP	70
5.2	Die Kreuzreaktivität von MCV spezifischen Autoantikörpern gegen CCP subklassifiziert RA Patienten	72
5.3	Der Effekt von HLA-DRB Allelen auf die Subklassenspiegel der ACPA .	73
5.4	Der Einfluss von IgG in Immunkomplexen auf die Apoptose von B-Zellen	75
5.5	Aktivierung von Neutrophilen als Reaktion auf Immunkomplexen	77
6	Literaturverzeichnis	79

1 Zusammenfassung

Für die Diagnose der rheumatoiden Arthritis (RA) haben sich in den letzten 10 Jahren die Autoantikörper gegen citrullinierte Peptide (ACPA) etabliert. Obwohl diese für die Klinik von herausragender Bedeutung sind, ist bisher nur sehr wenig über ihre Entstehung und ihre Beteiligung an Pathogenese der RA bekannt. Beide Aspekte wurden in dieser Arbeit beleuchtet. In einem ersten Schritt wurde die IgG-Subklassenverteilung der Antikörper gegen zyklisch citrulliniertes Peptid (CCP) und mutiertes citrulliniertes Vimentin (MCV) bestimmt. Dabei konnte eine Korrelation der Titer beider untersuchten ACPA-Populationen für alle vier Subklassen gezeigt werden. Diese konnte sowohl auf eine Differenzierung der ACPA-produzierenden Plasmazellen im gleichen Milieu als auch auf eine Kreuzreaktivität von MCV-spezifischen Antikörpern gegen CCP zurückgeführt werden.

Des Weiteren wurden IgG1 und IgG4 als die dominierenden Subklassen beider Autoantikörperpopulationen identifiziert. Die in Titer und Frequenz erhöhte IgG4 Subklasse der ACPAs war auffällig, da IgG4 im Gesamtserum und unter den Antikörpern gegen das verbreitet vorkommende *Varicella zoster*-Virus den geringsten Anteil ausmachte. Der Klassenwechsel zu IgG4 benötigt eine T_H2 -Umgebung, die im chronisch entzündeten Gelenkbereich der RA Patienten nicht belegt ist. Dies lässt darauf schließen, dass der Klassenwechsel zu IgG4 in den autoreaktiven B-Zellen an anderer Stelle induziert wird.

Im zweiten Schritt wurde der Zusammenhang zwischen den hochpolymorphen und polygenen HLA-DRB Allelen und den Titern der ACPA-Subklassen untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass das Auftreten von HLA-DRB1*04 Allelen mit erhöhten Spiegeln der T_H1 -induzierten Subklassen IgG1 und IgG3 verbunden ist. Ich schlussfolgere, dass beide Subklassen im Gelenkbereich zur Komplementaktivierung und so zur RA-typischen Gelenkzerstörung beitragen können. Desweiteren konnte das DRB4-Gen als weiterer möglicher prädisponierender Faktor für die Entstehung von ACPAs identifiziert werden.

Zuletzt wurde die auffällige Subklasse IgG4 funktionell charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass IgG4-haltige Immunkomplexe zum einen die Apoptose autoreaktiver B-Zellen im Synovium reduzieren, damit eine erhöhte ACPA-Produktion bedingen und möglicherweise zu einem schwereren Verlauf der RA führen. Zum anderen kann IgG4 die phagozytose-induzierte Sekretion von knorpelzerstörenden Enzymen durch Neutrophile reduzieren, was den Verlauf mildern kann. Diese konträre Rolle bedarf einer weiteren Analyse in zukünftigen Studien.

2 Einführung

2.1 Autoimmunität - eine Erkrankung des Immunsystems

Etwa 5% der Bevölkerung von Europa und Nordamerika entwickeln im Laufe ihres Lebens eine Form der Autoimmunität. Bei diesen Patienten ist das Immunsystem derart gestört, dass es nicht mehr zwischen fremden und eigenen Strukturen unterscheiden kann. In der Folge werden Zellen und Gewebe des eigenen Organismus angegriffen und zerstört. Dies kann schließlich zu Organversagen und zum Tod führen.

2.1.1 Toleranzinduktion und die Entstehung von Autoimmunität

Die Unterscheidung von Selbst und Fremd wird durch die Rezeptoren des erworbenen Immunsystems vermittelt. Diese entstehen durch somatische Rekombination in deren Verlauf die in vielen Varianten vorhandenen V-, (D-) und J-Elemente der B- bzw. T-Zellrezeptor-Gene zufällig zusammengeführt werden. B-Zellen können ihre Rezeptorvielfalt zusätzlich noch durch somatische Hypermutation erweitern. Dadurch wird eine Vielfalt erzeugt, die einerseits notwendig ist, um auf das breite Spektrum an Pathogenen effektiv reagieren zu können. Andererseits sind aufgrund des zufälligen Charakters der Rezeptorerzeugung 20-50% aller T- und B-Zellrezeptoren potentiell autoreaktiv. Um dem entgegen zu wirken, haben sich Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz herausgebildet [Goodnow et al., 2005], die im Folgenden erläutert werden sollen.

2.1.1.1 Zentrale Mechanismen

In den zentralen lymphatischen Organen kann die Aktivierungsfähigkeit autoreaktiver Lymphozyten eingeschränkt werden (Anergie) oder sie werden in die Apoptose getrieben (klonale Deletion). Autoreaktive B-Zellen können außerdem zum erneuten Rearrangement ihrer Immunrezeptoren gebracht werden (receptor editing).

B-Zellen exprimieren nach einer produktiven V(D)J-Umlagerung auf ihrer Zelloberfläche membrangebundene Antikörper vom IgM und IgD-Typ als B-Zell-Rezeptor (BCR).

Wird dieser in naiven B-Zellen durch ein natives Selbst-Antigen sehr stark quervernetzt, so induziert die dadurch ausgelöste Signalkaskade ein Programm, was zur Reduktion von Homing-Rezeptoren führt. Damit kann diese B-Zelle ihre benötigten Nischen in den peripheren lymphatischen Organen nicht einnehmen. Außerdem wird die Expression des Rezeptors für den B-Zell-Aktivierungsfaktor (BAFF) reduziert [Mackay and Schneider, 2009]. Beides führt schließlich zum Absterben der potentiell autoreaktiven B-Zelle, da ihre benötigten Überlebenssignale ausbleiben. Darüber hinaus bleiben die Kernenzyme für die Genumlagerung, die Rekombinationsaktivierenden Gene (RAG) 1 und RAG2 exprimiert. Das ermöglicht die Akquirierung eines weniger selbstreaktiven BCR durch weitere V(D)J-Rekombinationen (receptor editing). Im Gegensatz zum BCR, der native Proteine erkennt, wird der T-Zell-Rezeptor (TCR) auf eine Erkennung von Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-gebundenen Proteinfragmenten selektioniert. Diese Positivselektion vollzieht sich im Cortex des Thymus. Im Anschluss wandern die Thymozyten in die Medulla, wo ihr TCR weiter getestet wird. Hier kontaktieren sie dendritische Zellen und medulläre, thymische Epithelzellen. Letztere präsentieren Antigene des gesamten Körpers (promiske Genexpression) über ihre MHC-Moleküle und sorgen damit dafür, dass autoreaktive T-Zellen aus dem Repertoire entfernt werden. Fehler in diesem Kontrollpunkt der zentralen Toleranz können zu einer sehr zerstörerischen Autoimmunität führen, welche multiple Organe betrifft. So führt die Mutation des Autoimmunregulator- (AIRE) Gens, welches für einen Großteil der promiskenen Genexpression verantwortlich ist, zu dem sehr seltenen, aber extrem aggressiven Autoimmunsyndrom „Autoimmune Polyendokrinopathie-Candidiasis-Ektodermale Dystrophie“ (APECED) [Gray et al., 2007]. Aufgrund der MHC-Abhängigkeit besteht auch die Hypothese, dass die Assoziation von bestimmten MHC-Allelen mit einer Vielzahl an Autoimmunerkrankungen auf eine defektive Präsentation von Autoantigenen im Thymus beruht.

2.1.1.2 Periphere Mechanismen

Autoreaktive Lymphozyten, welche diesen zentralen Mechanismen entkommen, müssen in der Peripherie weiter selektiert und kontrolliert werden. Für das T-Zell Kompartiment spielen die natürlichen regulatorischen T-Zellen eine große Rolle. Diese sind gekennzeichnet durch die Expression von CD4, CD25 und des Transkriptionsfaktors Foxp3 [Kim et al., 2007]. Ist dieser Transkriptionsfaktor mutiert, so kommt es im Menschen, ähnlich wie bei der AIRE-Defizienz, zu einer multiorganen Autoimmunreaktion (Immunodysregulation Polyendokrinopathie Enteropathie X-linked Syndrom

(IPEX-Syndrom)).

Ähnlich den T-Zellen entkommen bevorzugt gering-affine, autoreaktive B-Zellen den zentralen Toleranzmechanismen. Darüber hinaus können B-Zellen in der Peripherie ihr Erkennungsspektrum durch somatische Hypermutation verändern. Somit evolvierten auch für die B-Zellen eine Zahl peripherer Toleranzmechanismen. Hier soll lediglich einer genauer beleuchtet werden. Bei diesem nimmt der Fc gamma Rezeptor IIb (Fc γ RIIb) eine zentrale Rolle ein. Fc-Rezeptoren binden den Fc-Teil von Immunglobulinen und sind damit die Sensoren der Immunzellen für Antikörper und Immunkomplexe. Dabei führt die Mehrheit dieser Rezeptoren zu einer Aktivierung von Zellen [Nimmerjahn and Ravetch, 2008]. Fc γ RIIb stellt hier eine Ausnahme dar, denn er ist der einzige inhibitorische Fc-Rezeptor. Wird er über Immunkomplexe in den Signalweg des BCR einbezogen, so wirkt er einer Aktivierung entgegen. Außerdem kann die Quervernetzung von Fc γ RIIb ohne die Beteiligung des BCR Apoptose auslösen. Letzterer Mechanismus ist für naive und reife B-Zellen sowie Plasmablasten und Plasmazellen beschrieben und dient der Erzeugung neuer Plasmazellen im Knochenmark. Er kann aber auch in entzündeten Geweben - z.B. dem Pannus in der rheumatoiden Arthritis - einen distalen Kontrollpunkt der peripheren B-Zelltoleranz darstellen [Xiang et al., 2007]. Eine mögliche Beteiligung des Fc γ RIIb bei der Pathogenese der RA wurde z.B. von Radstake et al. belegt, die demonstrierten, dass Patienten mit einer speziellen Variante des Fc γ RIIb innerhalb von 6 Jahren zweifach stärkere radiologische Schäden entwickelten [Radstake et al., 2006].

2.1.2 Autoimmunerkrankungen etablieren sich durch das Zusammenwirken vieler Komponenten des Immunsystems

2.1.2.1 Das erworbene Immunsystem

2.1.2.1.1 autoreaktive T-Zellen Entkommen autoreaktive T-Zellen den beschriebenen Toleranzmechanismen, so entscheidet ihre Spezifität, welche Zielstrukturen sie angreifen und ihre Populationszugehörigkeit, welche Effektorfunktionen ausgeübt werden. T-Zellen können in zwei große Linien eingeteilt werden, die CD4⁺ T-Helferzellen (T_H) und die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (CTL).

Erstere können in den peripheren Lymphgeweben nach deren Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen in drei verschiedene Klassen differenzieren: T_H1, T_H2, T_H17. T_H1-Zellen sind Produzenten von proinflammatorischen Zytokinen, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interferon- γ (IFN- γ). Sie tragen damit in den Zielge-

weben zur chronischen Inflammation bei. T_H2 -Zellen sezernieren vor allem B-Zell-stimulierende Zytokine, wie Interleukin-4 (IL-4) und IL-5. Sie aktivieren autoreaktive B-Zellen zur Produktion von Autoantikörpern. Die vor kurzem beschriebenen T_H17 -Zellen sezernieren IL-17. Dies bewirkt in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen (Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen) die Produktion diverser proinflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6 und $TNF-\alpha$) und Chemokine. Diese Zytokine führen zu einer starken Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. Desweiteren sezernieren T_H17 -Zellen IL-21, welches in vielen chronischen Entzündungssituationen gefunden werden kann. Damit sind T_H17 -Zellen Schlüsselspieler bei der Etablierung vieler Autoimmunerkrankungen [Romagnani, 2008].

Die CTL dagegen können direkt Zielzellen abtöten. Am besten untersucht ist ihre Rolle bei dem autoimmunen (Typ-1) Diabetes. Hier werden CTL durch dendritische Zellen in den pankreatischen Lymphknoten aktiviert, wandern in den Pankreas ein und induzieren in den insulinproduzierenden β -Zellen Apoptose. Neben dieser direkten Wirkung besitzen sie auch eine modulatorische Rolle durch ihre Sekretion von Zytokinen und Chemokinen [Walter and Santamaria, 2005].

2.1.2.1.2 autoreaktive B-Zellen und Autoantikörper Die Beteiligung von autoreaktiven B-Zellen an Autoimmunreaktionen besteht hauptsächlich in der Produktion von Autoantikörpern. Diese Autoantikörper werden bei Autoimmunerkrankungen als Marker für die Diagnose und Prognose genutzt. Doch inwieweit sie auch direkt an der Pathogenese beteiligt sind, bleibt in vielen Fällen offen. Am besten untersucht ist diesbezüglich wohl der Systemische Lupus Erythematosus. Hier treten besonders Antikörper gegen Kern- und Zytoplasmabestandteile auf. Diese bilden mit ihren spezifischen Antigenen Immunkomplexe, welche sich u.a. an Gefäßwänden anlagern können, wodurch es zur Komplement- und Thrombozytenaktivierung kommt. Es wird eine Vaskulitis ausgebildet, die zu Organschäden, besonders in den Nieren führen kann. Welche Effektorfunktionen von den Autoantikörpern stimuliert werden, hängt von ihrem Isotyp ab. Immunglobuline (Ig) können fünf großen Gruppen zugeordnet werden. Während IgD nicht sezerniert wird, ist IgM in einer humoralen Immunantwort das erste freigesetzte Ig. Zu diesem Zeitpunkt der Immunreaktion hat noch keine Akkumulation somatischer Mutationen im Erkennungsbereich der Antikörper stattgefunden, weshalb IgM eine geringe Affinität zum Antigen besitzt. Dies wird ausgeglichen, indem es als Pentamer vorliegt. IgM hat eine starke komplementaktivierende Kapazität. Nach einem Klassenwechsel kann IgG, IgA und IgE gebildet werden. IgA ist das häu-

figste Ig in den Schleimhäuten, IgE kann Mastzellen zur Degranulation veranlassen und ist der seltenste Ig-Isotyp im Serum. Dagegen wird am häufigsten der IgG-Isotyp im Serum gefunden, welcher nochmals in vier Subklassen eingeteilt werden kann [Janeway et al., 2002]. Der Klassenwechsel zu IgG1 und IgG3 tritt vor allem in einer T_H1 -dominierten Umgebung auf. Dagegen führt die Stimulation durch T_H2 -Zellen zur Bildung von IgG2 und IgG4 [Stavnezer, 1996]. Unter den IgG-Subklassen besitzen IgG1 und IgG3 ähnliche immunologische Eigenschaften: beide sind in der Lage, die Komplementkomponente C1q zu binden und damit den klassischen Komplementweg zu aktivieren. Auch binden beide Subklassen an die Mehrzahl der verschiedenen Fc-Rezeptoren [Meulenbroek and Zeijlemaker, 2004].

Antikörper der IgG4 Subklasse nehmen aufgrund ihrer immunologischen und biochemischen Eigenschaften eine Sonderstellung ein [Aalberse and Schuurman, 2002]. So besitzen sie wegen ihrer geringen Affinitäten für die Komplementkomponente C1q und für Fc-Rezeptoren geringe Fähigkeiten zur Komplement- und Zellaktivierung. Damit sind sie kaum in der Lage, Entzündungsreaktionen auszulösen. Eine weitere Besonderheit ist die Unfähigkeit von IgG4, identische Antigene kreuz zu vernetzen. Wie kürzlich an gut charakterisierten monoklonalen Antikörpern gezeigt werden konnte, basiert dieses Phänomen auf einem IgG4 spezifischem Fab-Arm-Austausch [van der Neut et al., 2007]. Dabei sollen IgG4-Halb-moleküle - bestehend aus je einer leichten und einer schweren Kette - in stochastischer Weise ausgetauscht werden, so dass bispezifische Antikörper entstehen (Abbildung 2.1).

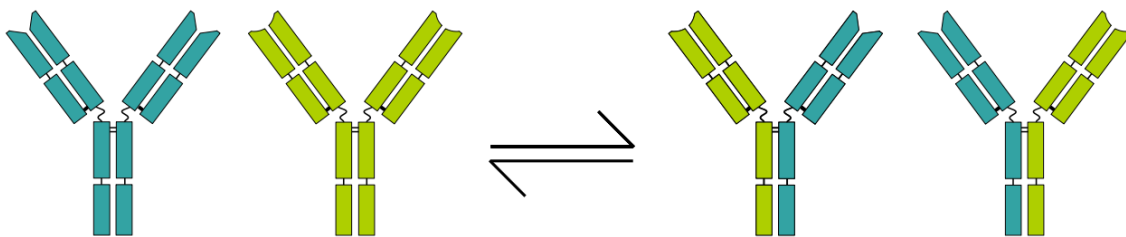


Abbildung 2.1: Schema - Fab Arm Austausch

2.1.2.2 Das angeborene Immunsystem

Die Zellen des angeborenen Immunsystems besitzen die Fähigkeit, über Mustererkennungsproteine sehr viele Typen von Pathogenen zu erkennen. Diese Rezeptoren

sind in ihrer Vielfalt jedoch begrenzt und besitzen kein Potential zur Autoerkennung. Allerdings können Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, wie Neutrophile und Makrophagen, durch autoreaktive Zellen des erworbenen Immunsystems ange lockt werden. In der entzündlichen Umgebung, wie sie bei Autoimmunerkrankungen gefunden werden kann, können sie chronisch aktiviert werden und tragen mit ihren Effektorfunktionen zur Zerstörung körpereigener Strukturen bei.

Neben den zellulären Komponenten spielen auch lösliche Faktoren eine Rolle. So können gebundene Autoantikörper die Komplementkaskade aktivieren, ein System von Proteasen, die sich durch Spaltung sukzessive gegenseitig aktivieren. Dabei entstehen jeweils zwei Spaltprodukte. Eines wird an die Zielstruktur fixiert und kann weitere Immunzellen über Komplementrezeptoren stimulieren. Das kleinere Fragment wirkt direkt als löslicher Entzündungsmediator.

Eine Autoimmunreaktion ist also meist ein komplexes Wechselspiel der Bestandteile des Immunsystems, welche sich gegenseitig beeinflussen und schließlich zur Gewebszerstörung und Erkrankung führen.

2.2 Rheumatoide Arthritis

2.2.1 Krankheitsbild

In den westlichen Industrieländern ist die rheumatoide Arthritis (RA) die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung, von der etwa 1-2 % der Bevölkerung betroffen sind. Ohne eine frühe und effektive Behandlung können in kurzer Zeit irreversible Gelenkschäden und damit einhergehende Einschränkungen der Bewegungs- und Arbeitsfähigkeit auftreten [Kary et al., 2004]. Sozioökonomisch kommen der frühen Diagnose und einer verlässlichen Prognose daher eine enorme Bedeutung zu. Seit 1988 wird die Diagnose auf Grund der ACR-Kriterien gestellt [Arnett et al., 1988], welche auch die Hauptsymptome der RA einschließen:

- Morgensteifigkeit
- Arthritis (Gelenkentzündung) in drei oder mehr Gelenkregionen
- Arthritis besonders an Hand- oder Fingergelenken
- Symmetrische Arthritis (beidseitiger, gleichzeitiger Befall der gleichen Gelenkregion)

- Subkutane Rheumaknoten
- Auftreten von Rheumafaktoren (gegen den konstanten Teil von IgG gerichtete Autoantikörper der IgM-Klasse)
- Radiologische Veränderungen der Gelenke (gelenknahe Osteoporose und Erosionen der betroffenen Gelenke)

2.2.2 Antikörper gegen citrullinierte Peptidantigene

Neben dem Rheumafaktor haben sich als weitere Marker für die Diagnose der RA - obwohl noch nicht als ACR-Kriterien aufgenommen - in den letzten 10 Jahren die Antikörper gegen citrullinierte Peptide (ACPA) etabliert. Sie sind bis zu 14 Jahre vor dem Auftreten erster Symptome nachweisbar [Nielen et al., 2004], ihr Auftreten korreliert mit einem aggressiveren Verlauf der RA [Nell-Duxneuner et al., 2009], und sie besitzen eine Spezifität von über 90% und eine Sensitivität von über 70% [Engelmann and Müller-Hilke, 2009].

2.2.2.1 Historie

Der Nachweis von Autoantikörpern ist in der Autoimmundiagnostik seit vielen Jahren unverzichtbar. Mittels indirekter Immunfluoreszenz, standardisierter ELISA oder Immunoblots können sowohl die Autoantikörper selbst, als auch ihre Titer schnell und relativ unaufwändig bestimmt werden. Für die Diagnose der RA werden verschiedene Autoantikörper herangezogen, von denen der Rheumafaktor als erster erkannt wurde. Weitere Beschreibungen von RA-spezifischen Autoantikörpern folgten im Jahre 1964 mit dem durch indirekte Immunfluoreszenz an Mundschleimhautzellen nachgewiesenen anti-Perinukleärem Faktor (APF) [Nienhuis and Mandema, 1964], im Jahre 1979 mit dem an Schnitten des Rattenösophagus identifizierten anti-Keratinantikörper (AKA) [Young et al., 1979] und 1994 mit dem anti-Sa Antikörper [Després et al., 1994].

Erst Ende der Neunziger Jahre wurde citrulliniertes Filagrin, ein Filament aggregierendes und mit Keratin assoziiertes Protein, als gemeinsames Antigen von APF und AKA identifiziert [Schellekens et al., 1998; Girbal-Neuhauser et al., 1999]. Vom citrullinierten Filagrin abgeleitete Peptide wurden dann für den zyklisch citrullinierten Peptid (CCP)-Assay genutzt.

Der anti-Sa Antikörper detektiert im Western Blot von Lysaten aus humanen Milz-, Plazenta- und Synovialgeweben eine Bande um ca. 50 kDa, die 2004 als citrulliniertes Vimentin identifiziert wurde [Vossenaar et al., 2004]. Da Vimentin aber nicht nur Citrullinierungen sondern auch Mutationen [Bang et al., 2007] enthält, werden vom mutierten citrullinierten Vimentin (MCV) abgeleitete Peptide in einem neueren Assay verwendet, der 2006 auf den Markt gekommen ist und seitdem an Bedeutung gewinnt.

2.2.2.2 Citrullinierung

Citrullin ist eine posttranslationale Modifikation der Aminosäure Arginin, bei der die endständige, positiv geladene Aminogruppe des Arginins abgespalten wird (Deimination). Dadurch verliert das Protein an dieser Stelle seine Ladung und intramolekulare Wechselwirkungen sowie die Tertiärstruktur des betroffenen Proteins können sich so verändern, dass es anfälliger gegenüber Degradation wird [György et al., 2006]. Möglicherweise verändern sich aber auch intermolekulare Wechselwirkungen, da citrullinierte Peptide im HLA-DRB1*0401 transgenen Mausmodell besser präsentiert werden können als die nicht modifizierten [Hill et al., 2003].

Für die RA ist das Auftreten der Antikörper gegen citrullinierte Peptidantigene (ACPA) spezifisch, nicht aber die Citrullinierung selber. So werden citrullinierte Peptide auch bei physiologischen Prozessen wie z.B. der Keratinisierung der Haut [György et al., 2006] und der Genregulation durch Histonmodifikation [Thompson and Fast, 2006] gebildet. Anders bei der Multiplen Sklerose, bei der citrulliniertes Myelin-basisches Protein gefunden wurde und deswegen die Citrullinierung mit pathologischen Prozessen assoziiert wird [Harauz and Musse, 2007].

An der eigentlichen Citrullinierungsreaktion sind Kalzium-abhängige Peptidylarginin-deiminasen (PADI) beteiligt, von denen im Menschen bisher 5 Typen beschrieben wurden: PADI1 bis PADI4 und PADI6, welche ein gewebsspezifisches Expressionsmuster aufweisen [Vossenaar et al., 2003]. Da bisher ausschließlich PADI2 und PADI4 im entzündeten Synovium beschrieben wurden, werden sie hauptsächlich für die Citrullinierung von synovialen Proteinen bei der RA verantwortlich gehalten [Foulquier et al., 2007]. Die Rolle von PADI4 wird dabei noch durch die genetische Assoziation mit der RA unterstrichen, auch wenn diese in der asiatischen Bevölkerung stärker als in der kaukasischen erscheint [Lee et al., 2007b]. Bemerkenswert ist ebenfalls das kürzlich beschriebene, RA-spezifische Auftreten von anti-PADI4 Antikörpern [Harris et al., 2008].

2.2.2.3 Bedeutung für die Pathogenese

Obwohl ACPAs als Marker im Rahmen der RA-Diagnostik und Prognose sehr wertvoll sind, ist nur wenig über ihre Entstehung oder ihre Beteiligung an der Pathogenese bekannt. Eine Möglichkeit der indirekten Untersuchung besteht darin, die Immunglobulinklassen der ACPAs zu analysieren, da ein Klassenwechsel der T-Zellhilfe bedarf und somit zugrunde liegende immunologische Prozesse widerspiegelt. So wurde beobachtet, dass der Übergang von undifferenzierter zu etablierter RA mit dem Auftreten von ACPAs verschiedener IgG Subklassen vergesellschaftet ist [Verpoort et al., 2006]. Obwohl das IgG1 immer die häufigste Subklasse zu bleiben scheint, sind in etwa 25 % der RA-Patienten IgG4 Antikörper gegen citrulliniertes Fibrin messbar, und der spezifische IgG4 Titer ist signifikant höher als der für IgG2 und IgG3 [Chapuy-Regaud et al., 2005]. Allerdings wurden die Subklassentiter gegen die beiden diagnostisch genutzten und standardisierten Antigene CCP bzw. MCV bisher nicht direkt miteinander verglichen. Dieser Vergleich soll im ersten Teil dieser Arbeit dargelegt werden.

Für die Pathogenese der RA von ACPA-positiven Patienten postulieren Klareskog et al. ein dreistufiges Pathogenesemodell, welches sowohl genetische, immunologische und Umweltfaktoren integriert [Klareskog et al., 2008]. Die erste Phase umfasst die Etablierung der Immunantwort gegen citrullinierte Antigene. Rauchen verstärkt dabei die Apoptose und, wie kürzlich gezeigt, auch direkt die Aktivierung von PADI2 in der Lunge [Makrygiannakis et al., 2008]. Die entstehenden citrullinierten Antigene können dann besonders über den HLA-DRB1*0401-Komplex präsentiert werden [Hill et al., 2008], was zu einer Aktivierung autoreaktiver T-Zellen und über eine B-Zell-Stimulierung zur Ausschüttung von ACPAs führen kann. Dies erklärt auch die bei rauchenden RA-Patienten beobachteten höheren ACPA-Titer. Überdies führt Zigarettenkonsum zu einer höheren Wahrscheinlichkeit ACPA der IgA- sowie IgM-Klasse auszubilden. Darüber hinaus können andere Umwelteinflüsse zu einer gesteigerten Citrullinierung in anderen Geweben führen. Es bleibt allerdings offen, wie die autoreaktiven T-Zellen entstehen, wie die immunologische Toleranz durchbrochen wird und welche Bedeutung den regulatorischen T-Zellen zukommt.

Während der zweiten Phase soll es aufgrund einer Störung im Gelenkbereich (Traumata, Infektionen) zur gesteigerten Citrullinierung im Synovium kommen, woraufhin ACPAs ihre spezifischen Epitope erkennen und schließlich zur inflammatorischen Antwort beitragen. Damit einher geht die Beobachtung, dass ACPA-positive Patienten mit einer akuten Arthritis ein weitaus größeres Risiko besitzen eine RA zu entwickeln

als ACPA-negative.

In der dritten Phase chronifiziert die Entzündung. Immunkomplexe akkumulieren im Synovium, welche das Komplementsystem aktivieren. Durch Entzündungsmediatoren werden Makrophagen und Neutrophile angezogen und durch proinflammatorische Zytokine sowie Fc- und Komplement-Rezeptoren aktiviert. Es kommt zur Vasodilatation, Einwanderung aktivierter T-Zellen, die Synovialmembran hypertrophiert und es werden Enzyme produziert, welche Gelenkschäden verursachen. Am Ende steht ein sich selbst erhaltender Teufelskreis der Gelenkinflammation -und zerstörung.

Obwohl dieses Modell die bekannten Assoziationen von ACPA-positiver RA mit dem Rauchen und den shared-epitope tragenden Allelen des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse II [Heldt et al., 2003; Huizinga et al., 2005] zusammenführt, konnte bisher nicht hinlänglich erklärt werden, warum autoreaktive B-Zellen primär der peripheren Toleranzinduktion entkommen.

2.2.3 Die rheumatoide Arthritis ist mit dem Auftreten bestimmter HLA-DRB1 Allele assoziiert

Das Auftreten bestimmter Allele der HLA-Gene stellt den stärksten genetischen Risikofaktor für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen dar. So ist der Systemische Lupus Erythematoses und die Myasthenia Gravis mit dem Auftreten von HLA-DRB1*03 Allelen assoziiert, wohingegen die Multiple Sklerose mit HLA-DRB1*02 Allelen einher geht. Für die HLA Klasse I ist die Situation eingeschränkter. Hier tritt vor allem HLA-B27 Haplotyp in Erscheinung, welcher mit den Spondylarthriden und dem Reiter-Syndrom verbunden ist [Shiina et al., 2004].

Der HLA-Genkomplex (Abbildung 2.2) ist im Menschen auf Chromosom 6 gelegen. Er kodiert für die MHC-Moleküle der Klasse I und II, welche bei der Entwicklung und Aktivierung von T-Zellen eine große Rolle spielen. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf dem hochpolymorphen und polygenen HLA-DRB. Von diesen trägt das HLA-DRB1 die größte Variabilität mit insgesamt über 700 bekannten verschiedenen Allelen [Robinson et al., 2009], die in 18 Superhaplotypen eingeteilt werden können. Diese werden auf fünf unterschiedlichen allelischen Linien kodiert, welche nicht nur die jeweiligen HLA-DRB1 Sequenzen, sondern auch die Gene HLA-DRB3, -DRB4 oder -DRB5 sowie diverse HLA-DRB Pseudogene und DRA enthalten. Das nicht-polymorphe DRA Gen kodiert für die α -Kette des HLA-DR Moleküls, die mit jeder von den HLA-DRB Genen kodierten β -Kette ein Heterodimer bilden kann.

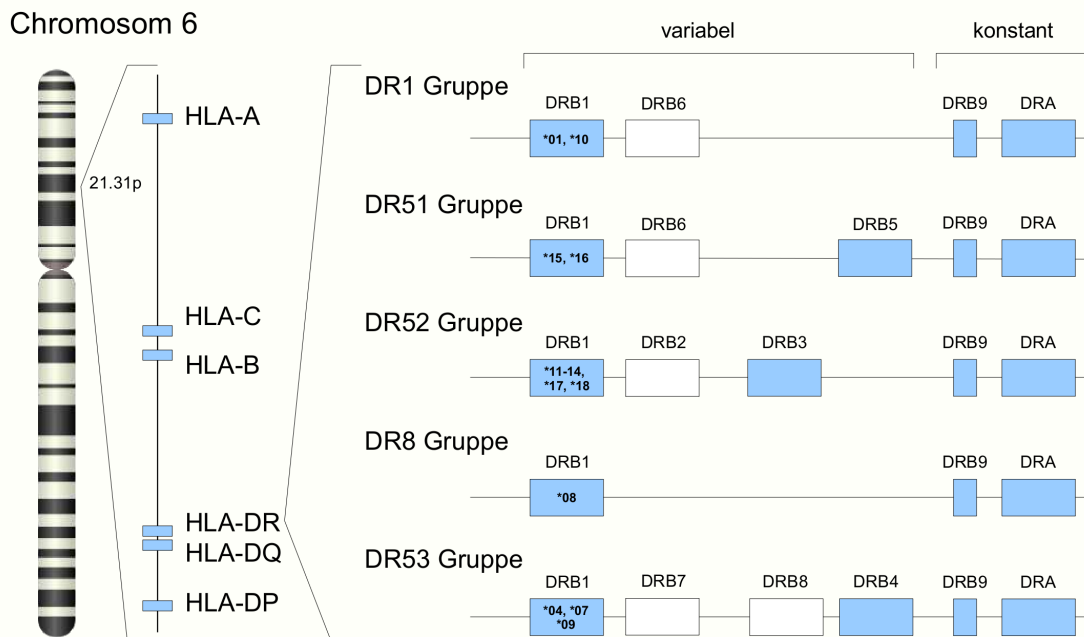


Abbildung 2.2: Übersicht der genomischen Organisation des HLA Komplexes. Die HLA Gene sind auf Chromosom 6 lokalisiert. Sie können in Klasse I (HLA-A, -B und -C), Klasse II (HLA-DP, -DQ und -DR) sowie Klasse III (nicht dargestellt) Gene unterteilt werden. Die Gene des HLA-DR werden gekoppelt in 5 allelischen Linien vererbt. blaue Boxen - proteincodierende Gene, weiße Boxen - Pseudogene.

Bezüglich der Assoziation mit der RA gibt es im Wesentlichen zwei diskutierte Modelle, die differentielle Expression [Baumgart et al., 1998] und die Epitopselektion [Gregersen et al., 1987]. Bei der differentiellen Expression geht man davon aus, dass es durch das Auftreten von Promotorvarianten in den RA-assoziierten Allelen zu einer erhöhten Expression von HLA Klasse II Molekülen kommt. Eine größere Dichte von MHC-II Proteinen auf der Oberfläche führt zu einem stärkeren Signal an der immunologischen Synapse, was die T-Zellaktivierung und Polarisierung verstärkt. Dagegen wird im Modell der Epitopselektion postuliert, dass das RA-assoziierte HLA-Allel das krankheitsauslösende Epitop präsentiert und damit autoreaktive T-Zellen aktiviert. In diesem Zusammenhang wurde auch das Shared-Epitop (SE) beschrieben (Abbildung 2.3). Den SE-Allelen ist an den Positionen 72-74 die Aminosäuresequenz RAA gemein. Dazu ist bekannt, dass nicht jedes SE-Allel das gleiche Risiko für die Entstehung einer RA vermittelt. Das führte zu einer Revision der ursprünglichen SE-

Hypothese. Eine aktuelle Klassifikation der SE-Allele nach du Montcel et al. teilt diese weiter entsprechend den Aminosäuren an den Positionen 70 und 71 ein (S1 - ARAA oder ERAA, S2 - KRAA, S3D - DRRAA, S3P - QRRAA). Auf diese Weise erreichten die Autoren eine Differenzierung zwischen Allelen, die entweder mit einem schweren bzw. milden Verlauf der RA korrelierten [du Montcel et al., 2005]. Auf Basis dieser Klassifikation untersuchten Gourraud et al. die Assoziation der vier SE-Allel-Gruppen mit dem Auftreten von ACPAs. Dabei konnten sie zeigen, dass die Allele der S2- und S3P-Gruppe mit dem Auftreten von ACPAs einher gingen, wohingegen S1 und S3D einen protektiven Effekt bezüglich des Vorkommens von ACPAs vermittelten [Gourraud et al., 2007].

Betrachtet man dagegen die bisher veröffentlichten Arbeiten zu den ACPA-Titern und den SE-Allelen, so basieren diese auf der ursprünglichen Definition des SE [Lee et al., 2007a], was eine Erklärung für die inkonsistenten Ergebnisse liefern könnte. Außerdem ist die Assoziation zwischen dem Auftreten von SE-Allelen und dem Titer der anti-CCP bzw. anti-MCV Antikörper der vier IgG-Subklassen bisher nicht analysiert worden. Diese beide wichtigen Aspekte sollen in der vorliegenden Arbeit beleuchtet werden.

Dazu wurde zunächst ein subklassenspezifischer ELISA für anti-CCP und anti-MCV Antikörper entwickelt, mit dem anschließend die spezifischen Titer der vier IgG-Subklassen im Serum von RA-Patienten bestimmt wurden. Außerdem wurde DNA aus peripheren Blutzellen der jeweiligen Patienten isoliert und sowohl eine HLA-Typisierung als auch eine Sequenzierung der SE-tragenden Region durchgeführt. Zum Schluss wurde IgG4 als auffällige Subklasse funktionell charakterisiert.

DRB1-Allele	DNA-Sequenz												Protein-Sequenz							
DRB1*010101	CTC	CTG	GAG	CAG	AGG	CGG	GCC	GCG	GTG	GAC	ACC	LLE	Q	R	R	A	A	V	D	T
DRB1*010201
DRB1*0103	A	.	.	A	G	C	GA	I	.	DE
DRB1*040101	A	K
DRB1*0402	A	.	.	A	G	C	GA	I	.	DE
DRB1*040301	A	E	.	.	.
DRB1*0404
DRB1*040501
DRB1*040701	A	E
DRB1*0408
DRB1*0411	A	E
DRB1*100101	G	.	.	T	R
DRB1*110101	T	.	.	A	G	C	F	.	D
DRB1*110201	A	.	.	A	G	C	GA	I	.	DE
DRB1*1103	T	.	.	A	G	C	GA	F	.	DE
DRB1*110401	T	.	.	A	G	C	F	.	D
DRB1*120101	A	.	.	A	G	C	.	C	.	.	.	I	.	D
DRB1*130101	A	.	.	A	G	C	GA	I	.	DE
DRB1*130201	A	.	.	A	G	C	GA	I	.	DE
DRB1*130301	A	.	.	A	G	C	A	I	.	DK
DRB1*1323	A	.	.	A	G	C	GA	I	.	DE
DRB1*1402
DRB1*150101	A	GC	I	.	A
DRB1*160101	T	.	.	A	G	C	.	C	.	.	.	F	.	D

Abbildung 2.3: Übersicht der DNA- und Proteinsequenz der SE Allele.

3 Materialien und Methoden

3.1 Patienten

Unsere Studien-Kohorte beinhaltete 115 RA Patienten aus Rostock sowie 13 aus Berlin. Alle Patienten erfüllten die revidierten Klassifikationskriterien des „American College of Rheumatology“ für die RA [Arnett et al., 1988]. Alle hier dargestellten Studien wurden von der lokalen Ethikkommission genehmigt. Alle Patienten gaben vor der Serumnahme ihr informiertes, schriftliches Einverständnis.

3.2 ELISA

Tabelle 3.1: Übersicht der Pufferzusammensetzungen für alle ELISA Applikationen.

Puffer	Zusammensetzung
PBS (10x)	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ PO ₄ 2,4 µg KH ₂ PO ₄ ad 1000 ml Aqua dest.
PBS (pH 7,4)	100 ml PBS (10x) 900 ml Aqua dest. pH einstellen
Waschpuffer	500 µl Tween-20 ad 1000 ml PBS
Probenpuffer (PBS / 1% BSA)	1 g BSA ad 100 ml PBS
Absättigungslösung (PBS / 2% BSA)	2 g BSA ad 100 ml PBS

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Puffer	Zusammensetzung
Elutionspuffer (100 mM Glycin-HCl-Puffer, pH 2,7)	0,755 g Glycin 0,585 g NaCl ad 200 ml Aqua dest. pH einstellen mit 0,1 N HCl
Neutralisationspuffer (1 M Tris-HCl-Puffer, pH 9,0)	24,2 g Tris ad 200 ml Aqua dest. pH einstellen mit 0,1 N HCl

3.2.1 Bestimmung des CCP Status

Die Bestimmung des CCP Status wurde mit dem Anti-CCP-ELISA (IgG) Kit der Firma EUROIMMUN entsprechend der beiliegenden Anleitung durchgeführt. Im Kit enthalten sind alle benötigten Materialien:

- Antigen-beschichtete Reaktionsgefäße in Form von Streifen á 8 Reaktionsgefäßen
- 5 Kalibratoren
- Positive und negative Kontrolle
- Konjugat (Peroxidase-markiertes Anti-Human-IgG (Kaninchen))
- Proben- und Waschpuffer
- Chromogen/Substrat-Lösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) / H₂O₂)
- Stopplösung (0,5 M H₂SO₄)

Für die qualitative Bestimmung wurden je 100 µl von Kalibrator 2, Positiv- und Negativkontrolle sowie die Patientenseren in einer Verdünnung von 1:100 in die beschichteten Reaktionsgefäße gegeben. Nach 60 min Inkubationszeit wurde dreimal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen. Danach wurden 100 µl Konjugatlösung je Reaktionsgefäß für 30 min zugegeben. Vor der 30 minütigen Farbreaktion mit je 100 µl Chromogen/Substrat wurde wie oben beschrieben gewaschen. Zuletzt wurde die Reaktion mit jeweils 100 µl Stopplösung beendet und die optische Dichte (OD) mit einem automatischen Plattenleser (Milenia Kinetic Analyser) bestimmt. Alle Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur. Galt $\frac{OD \text{ Patientenprobe}}{OD \text{ Kalibrator 2}} > 1$, so wurde das Serum als positiv für anti-CCP Antikörper eingestuft.

3.2.2 Subklassenspezifischer ELISA - Etablierung / Qualitätskontrolle

Ein IgG subklassenspezifischer ELISA wurde etabliert, indem kommerziell verfügbare ELISA Platten, die mit CCP- (EUROIMMUN), MCV- (ORGENTEC Diagnostika GmbH) bzw. VZV-Antigen (Virion\Serion GmbH) beschichtet waren, mit subklassenspezifischen Detektionsantikörpern (Tabelle 3.2) kombiniert wurden. Die verwendeten Puffer können der Tabelle 3.1 entnommen werden.

Tabelle 3.2: Detektionsantikörper für den subklassenspezifischen ELISA.

Reaktivität	Verdünnung	Bezugsquelle	Klon	Bestell-Nr.
α -human IgG1	1:15.000	The Binding Site	polyklonal	AP006
α -human IgG2	1:10.000	Serotec	HP6014	MCA515P
α -human IgG3	1:20.000	Serotec	HP6050	MCA516P
α -human IgG4	1:25.000	Serotec	HP6025	MCA2098P

In einem ersten Vorversuch wurde anhand der Kreuzreaktivität der subklassenspezifischen Antikörper gegen BSA (Platte beschichtet mit Absättigungslösung) die jeweils optimale Verdünnung bestimmt (siehe Tabelle 3.2). Anschließend wurde die Kreuzreaktivität jedes Detektionsantikörpers gegen die anderen Subklassen überprüft. Dazu wurden ELISA-Platten (Nunc Medisorb[®]) über Nacht bei 4 °C mit jeweils 100 μ l einer seriellen 1:2 Verdünnung in PBS mit Konzentrationen von 1 μ g/ml bis 15,6 ng/ml humanen Myelomaproteins IgG1-4 κ (Sigma-Aldrich) beschichtet. Alle weiteren Inkubationen wurden bei RT durchgeführt und die ELISA-Platte war in dieser Zeit mit einer adhäsiven Folie verschlossen.

Anschließend wurde zweimal mit Waschpuffer gewaschen und etwaige unspezifische Bindungsmöglichkeiten eine Stunde lang mit 150 μ l Absättigungslösung reduziert. Nach erneutem zweimaligem Waschen erfolgte die 1½ stündige Inkubation mit dem Detektionsantikörper (Tabelle 3.2). Danach wurden ungebundene Antikörper durch viermaliges Waschen entfernt und die Farbreaktion mit 100 μ l TMB durchgeführt. Diese wurde nach 20 Minuten mit 100 μ l Stopplösung beendet. Abschließend wurde die optische Dichte (OD) mit dem automatischen ELISA-Plattenleser durch die Endpunktmessung bei der spezifischen Wellenlänge von 450 nm abzüglich der Referenzwellenlänge von 650 nm bestimmt.

Weiterhin musste geprüft werden, ob die Detektionsantikörper für IgG1-4 ähnliche Bindungseigenschaften aufweisen. Dazu wurde der ELISA zur Spezifitätskontrolle derart modifiziert, dass die Beschichtung innerhalb eines größeren Konzentrationsbereichs (1 µg/ml - 1 ng/ml) lag, um die Detektions- und Sättigungsgrenzen einzuschließen. Es wurde ausschließlich mit dem jeweils spezifischen Subklassenantikörper detektiert.

3.2.3 Subklassenspezifischer ELISA - Durchführung

Zur Quantifizierung der CCP- und MCV-spezifischen Antikörper wurden die Patientenserum 1:400 für IgG1 und 1:20 für IgG2, IgG3 und IgG4 in Probenpuffer verdünnt. Zur Bestimmung der Menge an VZV-Antikörpern entsprechend 1:100 bzw. 1:5. 100 µl des verdünnten Serums wurden dann 1½ h bei RT, verschlossen mit einer adhäsive Folie, inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit je 200 µl Waschpuffer. Danach wurde für 1 h mit je 150 µl Absättigungslösung mögliche unspezifische Proteinbindungen besetzt. Nach zwei weiteren Waschschrten ließ man 100 µl der jeweiligen Verdünnung des Peroxidase-gekoppelten, subklassenspezifischen Antikörpers (Tabelle 3.2) 1½ h einwirken. Anschließend wurde erneut viermal gewaschen bevor 100 µl TMB in jede Vertiefung gegeben wurden. Die nun stattfindende Farbreaktion wurde nach 30 Minuten mit 100 µl 1 N H₂SO₄ gestoppt. Abschließend wurde die optische Dichte (OD) wie unter 3.2.2 beschrieben bestimmt. In jedem Einzeltest diente der IgG1-Wert des mitgelieferten Kontrollserums (R-50) als Interassay-Standard. Es wurden in allen Assays Duplikate angefertigt. Für den CCP, MCV und VZV spezifischen ELISA wurde jeweils eine OD von >0.211, >0.101 beziehungsweise >0.085 als positiv gewertet. Dies entsprach der 4-fachen minimalen OD der jeweiligen Messreihe.

3.2.4 Sequentieller ELISA

Um die Kreuzreaktivitäten der MCV- und CCP-spezifischen Antikörper untersuchen zu können, wurde ein sequentieller ELISA etabliert (Abbildung 3.1). Zunächst wurden die ausgewählten Seren so titriert, dass die gebundenen Antikörper eine zweifach höhere OD als die ungebundenen ergaben. Dies sollte Effekte minimieren, die sich aufgrund unterschiedlicher Titer bzw. Bindungsgleichgewichte hätten einstellen können. Die Seren wurden in Verdünnungen von 1:100 bis 1:12.800 für 1½ Stunden, der Überstand weitere 1½ Stunden in einem neuen Reaktionsgefäß bei RT inkubiert. Bei-

de wurden 1 Stunde mit Absättigungslösung behandelt und mit anti-IgG:HRP (CCP ELISA Kit) detektiert. Die anschließende Farbreaktion erfolgte mit TMB und wurde nach 15 Minuten gestoppt. Die OD wurde wie unter 3.2.2 bestimmt.

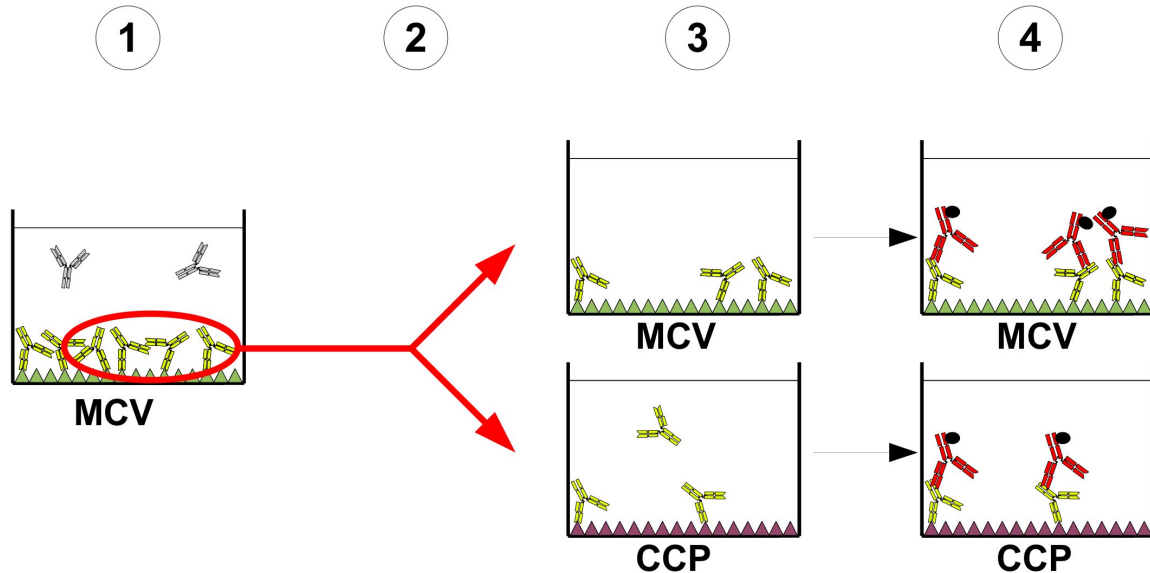


Abbildung 3.1: Schema zur Durchführung des sequentiellen ELISAs. 1 - Inkubation des Patientensersums, 2 - Elution, Neutralisation, 3 - Inkubation im zweiten Reaktionsgefäß, 4 - Detektion.

Für den sequentiellen ELISA wurden Verdünnungen zwischen 1:200 und 1:1.600 zur Bestimmung von anti-MCV und zwischen 1:800 und 1:12.800 für die anti-CCP Antikörper verwendet. Der erste ELISA wurde in Duplikaten durchgeführt, eine Probe diente zur Bestimmung der Referenz-OD für jedes Serum, die zweite wurde zur Isolation der spezifischen Antikörperpopulation, entweder anti-CCP oder anti-MCV, genutzt. Diese wurden mit 200 μl Elutionspuffer von der festen Phase gelöst und sofort mit 4,5 μl Neutralisationspuffer pro 100 μl Elutionspuffer versetzt. Somit befanden sich die eluierten Antikörper wieder in einer Lösung mit physiologischem pH, wodurch sie ihre ursprüngliche Faltung erneut einnehmen konnten. Das Eluat wurde zweigeteilt und je 100 μl auf eine neue CCP- und 100 μl auf eine MCV-beschichtete Platte gegeben. Die Detektion von IgG und IgG4 wurde wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben durchgeführt.

3.3 Bestimmung der Shared-Epitop Allele

3.3.1 Isolation genomischer DNA

Als Ausgangsmaterial diente die Zellkernfraktion aus peripheren Blut mononukleären Zellen (PBMC) der RA Patienten. Diese wurde bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Die Zusammensetzung aller Lösungen für die genetischen Methoden kann der Tabelle 3.3 entnommen werden. Die Isolation der genomischen DNA wurde mit dem QIAamp[®]DNA Blood Midi Kit auf zwei unterschiedlichen Wegen durchgeführt:

Das vorliegende Kernpellet wurde aufgetaut und in 5 ml Puffer G2 gut resuspendiert. Dazu wurden anschließend 95 μl der Proteinase K-Stammlösung (20 mg/ml) gegeben. Dieses Gemisch wurde für 30-60 Minuten im Wasserbad bei 50°C unter ständigen Schütteln inkubiert. Der Puffer G2 lysierte dabei die Kerne und denaturierte die Proteine, die Proteinase K verdaut letztere, so dass die genomische DNA schließlich von den assoziierten Proteinen befreit war und diese im weiteren Verlauf aus dem Gemisch entfernt werden konnten. Dazu wurde eine Genomic-tip 100/G mit 4 ml Puffer QBT equilibriert. Nachdem das DNA/Protein Gemisch 10 s bei maximaler Geschwindigkeit gevortext wurde, gab man es auf die Säule. Vortexen von genomischer DNA hat nur geringen Effekt auf die Größe der DNA, aber verbessert den Fluss der Probe durch das Säulenmaterial. War die Probe hindurch gesickert, wurde dreimal mit je 7,5 ml Puffer QC gewaschen. Anschließend eluierte man die gebundene DNA mit 5 ml, auf 50°C vorgewärmten, Puffer QF in ein frisches Auffanggefäß. Nun präzipitierte man die DNA durch Zugabe von 0,7 Volumenteilen Isopropanol, spulte sie mit Hilfe eines Glasstabes auf und gab sie in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml LiChrosolv[®] (Wasser für die Chromatographie, MERCK). Die Konzentration der isolierten genomischen DNA und die Qualitätsparameter (Absorption (A) bei einer Wellenlänge von 260 nm/A280, A260/A230) wurden mit dem NanoDrop[®]ND-1000 Spektrometer (Thermo Scientific, Softwareversion 3.3.0) bestimmt.

Auf Grund zum Teil geringer Ausbeuten an genomischer DNA mit der oben beschriebenen Methode wurde bei einem Teil der Proben auf die Aufreinigung per Säule verzichtet. Nach dem Verdau der Proteine durch die Proteinase K im Puffer G2 wurde die DNA umgehend mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol gefällt, auf einen Glasstab aufgespult und in Wasser gelöst.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen für alle genetischen Methoden.

Puffer	Zusammensetzung
TAE (50x)	121 g Tris-Base 28,6 ml Eisessig 9,3 g EDTA pH mit Eisessig einstellen auf 8,3 ad 500 ml Aqua dest.
TAE (1x)	20 ml TAE (50x) 980 ml Aqua dest.
SB (20x)	7,998 g NaOH 900 ml Aqua dest. pH mit Borsäure (ca. 39 g) einstellen auf 8,0 ad 1000 ml Aqua dest.
SB (1x)	50 ml SB (20x) 950 ml Aqua dest.
G2 (Denaturierung)	76,42 g $\text{CH}_5\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$ 11,17 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,63 g Tris-Base ad 600 ml Aqua dest. plus 250 ml 20%ige Tween-20 Lösung plus 50 ml 10%ige Triton X-100 Lösung pH einstellen auf 8,0 mit NaOH ad 1000 ml Aqua dest.
QBT (Equilibrieren)	43,83 g NaCl 10,46 g MOPS ad 800 ml Aqua dest. pH einstellen auf 7,0 mit NaOH plus 150 ml Isopropanol (abs.) plus 15 ml Triton X-100 (10%ig) ad 1000 ml Aqua dest.

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Puffer	Zusammensetzung
QC (Waschen)	58,44 g NaCl 10,46 g N-Morpholino-Pro- pansulfonsäure (MOPS) ad 800 ml Aqua dest. pH einstellen auf 8,3 mit NaOH plus 150 ml Isopropanol (abs.) ad 1000 ml Aqua dest.
QF (Eluieren)	73,05 g NaCl 6,06 g Tris-Base ad 800 ml Aqua dest. pH einstellen auf 8,5 mit HCl plus 150 ml Isopropanol (abs.) ad 1000 ml Aqua dest.

3.3.2 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 3.4: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz
5'DRB4(intron1)	5'-GAGGCCGCCCCGTGTGACCGG-3'
3'DRB4(exon2)	5'-CACAACCCCGTAGTTGTATCTGCAGTA-3'
splice_exon_2	5'-CACCTCGGCCCGCCTCCG-3'
5'W-DRB4	5'-GATCGCTAGCCTTTAAAGAAGACAATTG- TTTCAGAG-3'
3'ATG-DRB	5'-GAGCTTCAGACACACGATGCTGGAG-3'
5'S-DRB	5'-GATCGCTAGCTTTCAGAAGAGGACCTT-3'
rcGH56(*11*13*14)	5'-GGAGTACTCTACGTCTG-3'
rcGH104(*15*16)	5'-AGCCTAAGAGGGAGTGTCA-3'
rcGH102(*12)	5'-CTACGGGTGAGTGTTATTTTC-3'
rcCRX34(*10)	5'-GAGGAGGTTAAGTTTGAG-3'
rcCRX60(*01)	5'-GTGGCAGCTTAAGTTTG-3'

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Bezeichnung	Sequenz
rcGH59(*04)	5'-GGAGCAGGTTAAACATG-3'
GH46	5'-CCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCAG-3'
GH50	5'-TGCAGACACAACACTACGGGGTTGGGGAG-3'

3.3.3 HLA-DR Typisierung

Die Bestimmung der HLA-DRB1 Allele wurde mit dem Olerup SSP[®]DR low resolution Kit durchgeführt. Darin enthalten waren PCR-Platten mit 24 Reaktionsgefäßen. Jedes dieser beinhaltet zwei getrocknete Primerpaare. Eines amplifizierte ein invariables Genfragment außerhalb des MHC (Positivkontrolle für jede Reaktion). Mit Hilfe des anderen wurde eine sequenzspezifische PCR durchgeführt, welche die variablen Abschnitte der HLA-DRB1 Allele amplifizierte. Durch das Auftreten bzw. Ausbleiben dieser Fragmente in 23 PCR Reaktionen konnte auf die vorliegenden DRB1-Allele geschlossen werden. Desweiteren war im Kit ein PCR Mastermix enthalten, welcher die benötigten Nukleotide und Puffer für die PCR Reaktion beinhaltet.

Zur Durchführung wurde zunächst ein PCR Ansatz bestehend aus 84 µl Mastermix und 2,2 µl Taq Polymerase (peqGOLD Taq-DNA-Polymerase mit 5 units/µl; PeqLab) hergestellt. Daraus wurden 3 µl in das Reaktionsgefäß 24 gegeben und mit 7 µl Wasser aufgefüllt. Zum verbliebenen Ansatz wurden 54 µl der isolierten DNA mit einer Konzentration von 30 ng/µl und 132,8 µl Wasser gegeben. Von diesem kompletten PCR Ansatz wurden je 10 µl in die Reaktionsgefäße 1 bis 23 gegeben. Reaktionsgefäß 24 diente als Kontrolle ohne DNA, um eine mögliche Kontamination durch Fremd-DNA auszuschließen. Anschließend gab man die PCR Platte in einen Thermocycler und führte folgendes Programm aus:

Erst-Denaturierung	94 °C	2 min	1 Zyklus
Denaturierung	94 °C	10 s	10 Zyklen
Annealing und Verlängerung	65 °C	60 s	
Denaturierung	94 °C	10 s	
Annealing	61 °C	50 s	20 Zyklen
Extension	72 °C	30 s	
Kühlen	4 °C	∞	

Zur Visualisierung der entstandenen PCR-Produkte wurde ein 2%iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 2 g Agarose in 100 ml Elektrophese-Puffer (TAE bzw. SB, siehe Tabelle 3.3) gekocht bis man eine homogene Lösung erhielt. Nach einer kurzen Abkühlzeit wurden 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Carl-Roth GmbH) zu der noch flüssigen Agaroselösung gegeben. Diese wurde durch Schwenken gut gemischt und in die verschlossene, mit einem Kamm versehene Gelkammer gegossen. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde die Gelkammer in eine Elektrophese-kammer positioniert. In dieser waren 700 ml des jeweiligen Elektrophesepuffers sowie 20 µl Ethidiumbromid vorgelegt. Anschließend wurde der Kamm entfernt und die Proben der 24 PCR-Gefäße der Reihe nach in die Geltaschen gegeben. Als Größenstandard wurde eine 100 bp DNA-Leiter (peqGOLD 100 bp DNA-Leiter, peQLab) verwendet. Für die Elektrophese wurde eine Spannung von 10 V/cm (TAE) bzw. 22 V/cm (SB) eingestellt. Zur Auswertung wurden die aufgetrennten PCR-Produkte unter UV-Licht visualisiert und das Gel als digitales Bild archiviert.

3.3.4 Sequenzierung von HLA-DRB4 Promotor und -Spleißvariante

Für die Sequenzierung wurde zunächst der zu analysierende Abschnitt aus der genomischen DNA mittels PCR amplifiziert. Es wurde folgender PCR-Ansatz verwendet:

- 40 ng genomische DNA
- 3 µl MgCl₂ (25 mM)
- 1 µl dNTPs (je 2,5 mM)
- 3 µl Reaktionspuffer (10x)
- 1 µl Primermix (je 10 µM)
- 3 µl Taq Polymerase (5 units/µl)
- ad 30 µl dH₂O

Für die Amplifikation des HLA-DRB4-Promotors wurden die Primer 5'W-DRB4 und 3'ATG-DRB, für die Splice-Variante 5'DRB4(intron1) und 3'DRB4(exon2) genutzt. Die Sequenz aller verwendeten Oligonukleotide können der Tabelle 3.4 entnommen werden. Der beschriebene Ansatz wurde mit folgendem Programm im Thermocycler vervielfältigt:

Erst-Denaturierung	95 °C	10 min	1 Zyklus
Denaturierung	95 °C	1 min	
Annealing	65 °C	1 min	40 Zyklen

Extension	72 °C	1 min	
End-Extension	72 °C	10 min	1 Zyklus
Kühlen	4 °C	∞	

Die erhaltenen PCR Produkte wurden anschließend mit dem MSB[®] Spin PCRapace Kit (Invitek GmbH) entsprechend der beiliegenden Anleitung von Salzen, Enzym und Nukleotiden befreit. Dazu wurden die 30 µl der PCR Reaktion mit 250 µl des enthaltenen Bindepuffers gut vermischt. Diese Lösung wurde danach auf einen Spinfilter gegeben und drei Minuten mit 10.000*g zentrifugiert. Anschließend wurden die an die Filtermembran gebundenen PCR Fragmente mit 20 µl dH₂O durch Zentrifugation für eine Minute mit 9.500*g eluiert.

Im nächsten Schritt wurden wie unter 3.3.3 beschrieben je 2 µl der PCR Fragmente zusammen mit einer 1:3 und 1:6 verdünnten 100 bp Leiter elektrophoretisch in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und visualisiert. Dies diente zur Überprüfung der Aufreinigung und zur Abschätzung der Menge der PCR Fragmente.

Es folgte die Sequenzierung nach Sanger's Kettenabbruchmethode. In der Sequenzreaktion wurde das PCR-Fragment als Vorlage für die DNA-Polymerase eingesetzt. Im Reaktionsgemisch befanden sich neben den regulären Nukleotiden die entsprechenden Didesoxyribonukleotide. Diese sind durch vier verschiedene Fluoreszenzmarkierungen identifizierbar. Der Einbau eines Didesoxyribonukleotids führt zur Termination der Kettenverlängerung. Als Folge entsteht nach mehreren Zyklen von Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung ein Gemisch aus Fragmenten unterschiedlicher Länge, jedes am 3'-OH Ende mit einem Didesoxyribonukleotid. Das entstandene Fragmentgemisch wurde mittels Kapillargelelektrophorese entsprechend der Größe aufgetrennt und die zugehörigen Fluoreszenzen ausgelesen. Aus beiden Parametern ergibt sich schließlich die Basensequenz der Vorlage.

Der Ansatz für die Sequenzreaktion bestand aus:

- 25-100 fmol in ≤ 5 µl aufgereinigtes PCR Produkt
- 4 µl DTCS Quick Start Master Mix
- 1 µl Sequenzierprimer (3,2 µM)
- ad 10 µl dH₂O

Als Sequenzierprimer für den HLA-DRB4 Promotor wurde das Oligo 5'S-DRB, für die Spleißvariante splice_exon_2 verwendet. Die Sequenzreaktion wurde im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung	96 °C	20 s	
Annealing	50 °C	20 s	30 Zyklen
Extension	60 °C	4 min	
Kühlen	4 °C	∞	

Im Anschluss wurden die erhaltenen Fragmente für die Analyse im Beckman Coulter Sequenzer vorbereitet. Dazu wurden in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß 2 µl einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2), 2 µl einer 100 mM Na₂ – EDTA Lösung (pH 8,0) und 1 µl Glykogen (20 mg/ml, im Kit enthalten) vorgelegt. Dazu gab man die 10 µl der Sequenzreaktion und mischte gründlich. Dann wurden 60 µl eiskalten Ethanol (95 % v/v) hinzugefügt, gemischt und bei 18.000*g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entfernt, das Pellet mit 200 µl eiskalten Ethanol (70 % v/v) gewaschen und mit 18.000*g bei 4 °C für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet fünf Minuten luftgetrocknet. Zuletzt wurde es in 30 µl Sample Loading Solution gelöst und in eine 96-Well Platte zur Analyse im CEQ™ 8800 System von Beckman Coulter überführt (siehe Abbildung 3.2). Darin wurde mithilfe einer Kapillargelelektrophorese das Fragmentgemisch mit den vier unterschiedlichen terminalen Fluoreszenzmarkierungen aufgetrennt. Mit zugehörigen Software (CEQ 8000 Genetic Analysis System (v9.0.25)) wurde das Elektropherogramm sowie die resultierende Sequenz berechnet.

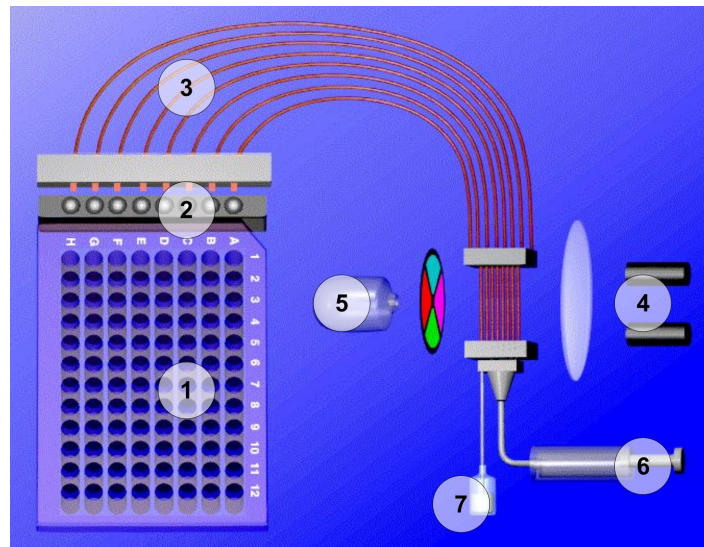


Abbildung 3.2: Aufbau des CEQ™ 8800 Systems. 1 - Probenplatte, 2 - Wasserbehälter (Ruheposition des Kapillar-Arrays), 3 - Kapillar-Array, 4 - Laser, 5 - Detektor mit optischen Filtern, 6 - Gelspritze, 7 - Abfallbehälter

3.3.5 Sequenzierung der HLA-DRB1 Shared-Epitop Allele

Für die Sequenzierung des Bereichs von HLA-DRB1 Exon 2, welcher für die Shared-Epitop Region codiert, wurde dieser DNA Abschnitt zunächst mit GH46 als Forward-Primer und GH50 als Reverse-Primer amplifiziert. Dazu wurde folgender PCR Ansatz gewählt:

- 10 ng genomische DNA
- 1 μ l $MgCl_2$ (25 mM)
- 2,5 μ l dNTPs (je 2,5 mM)
- 1 μ l Reaktionspuffer (10x)
- 1 μ l DMSO (99,5 % p.a.)
- 1 μ l BSA (4 μ g/ μ l)
- 0,4 μ l Primermix (je 50 μ M)
- 0,25 μ l Taq Polymerase (5 units/ μ l)
- ad 10 μ l dH₂O

Dieser wurde mit folgendem Programm im Thermocycler amplifiziert:

Erst-Denaturierung	94 °C	7 min	1 Zyklus
--------------------	-------	-------	----------

Denaturierung	94 °C	45 s	
Annealing	61 °C	45 s	33 Zyklen
Extension	72 °C	45 s	
End-Extension	72 °C	7 min	1 Zyklus
Kühlen	4 °C	∞	

Anschließend wurde mit allelspezifischen Primern (Tabelle 3.4, Bezeichnung: rc*), wie unter 3.3.4 beschrieben, die Sequenzreaktion durchgeführt und im Beckman Coulter Sequenzer analysiert.

3.4 Funktionelle Untersuchungen zu IgG4

Zur Analyse von IgG4 in Immunkomplexen wurde beides benötigt, sowohl aufgereinigtes, multivalentes Antigen sowie entsprechende Mengen an spezifischem IgG4. Daraus ergaben sich zur direkten Untersuchung der citrullinierten Proteine zwei Probleme: Zum einen entwickeln nicht alle RA Patienten entsprechende Titer an ACPAs der IgG4-Subklasse. Darüber hinaus sind die Antigene (CCP bzw. MCV) nicht frei erhältlich.

Als geeigneteres Modell erweist sich hier die Verwendung von Seren aus Allergiepateinten, die sich einer spezifischen Immuntherapie (SIT) unterziehen. Diese entwickeln im Zuge der Immunisierung mit dem entsprechenden Allergen recht schnell hohe Titer an spezifischen IgG4 als auch IgG1. Seren von Wespen- und Bienengiftallergikern, die sich bereits mindestens ein Jahr einer SIT unterzogen haben, wurden von der Abteilung für Pulmologie der Universitätsklinik zur Verfügung gestellt.

Aus diesen wurden dann IgG1 und IgG4 isoliert und mit dem jeweiligen Allergen die Immunkomplexe *in-vitro* gebildet. Diese wurden dann zu verschiedenen B-Zellpopulationen gegeben und anschließend die Apoptose gemessen. Zusätzlich wurde der Einfluss von IgG4 in Immunkomplexen auf den Aktivierungsstatus, gemessen als Phagozytoseaktivität und Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, von Neutrophilen untersucht. Abbildung 3.3 gibt einen Überblick der Experimente.

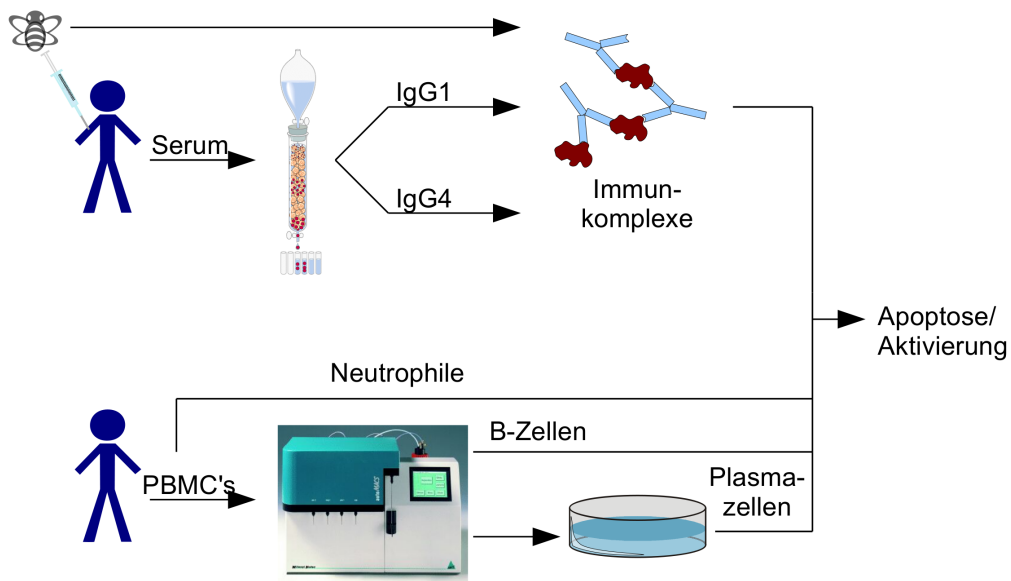


Abbildung 3.3: Arbeitsablauf der funktionellen Studien zu IgG4.

3.4.1 Puffer und Lösungen

Tabelle 3.5: Übersicht der Pufferzusammensetzungen für alle funktionellen Studien zu IgG4.

Puffer	Zusammensetzung
PBS	siehe Tabelle 3.1
Probenpuffer für die Chromatographie (50 mM Tris-HCl mit 0,15 M NaCl, pH 7,5)	6,05 g Tris 8,8 g HCl ad 1000 ml PBS pH auf 7,5 einstellen mit HCl
IgG-Elutionspuffer (0,1 M Zitronensäure)	10,5 g Zitronensäure*H ₂ O ad 500 ml Aqua dest.
IgG-Regenerationspuffer (0,1 M Glycin-HCl Puffer, pH 1,5)	1,877 g Glycin ad 250 ml Aqua dest. pH auf 1,5 einstellen mit HCl

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Puffer	Zusammensetzung
IgG-Reinigungspuffer (5 M Guanidinhydrochlorid)	47,765 g Guanidinhydrochlorid ad 100 ml PBS (alle 10 Zyklen)
IgG-Neutralisationspuffer (1 M Tris)	6,05 g Tris ad 50 ml Aqua dest.
BrCN-Sepharose-Block (0,2 M Glycin, pH 8,0)	3,75 g Glycin ad 250 ml Aqua dest. pH auf 8,0 einstellen mit NaOH
IgG1/4-Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO ₃ mit 0,5 M NaCl, pH 8,3)	8,4 g NaHCO ₃ 29,22 g NaCl ad 1000 ml Aqua dest. pH auf 8,3 einstellen mit NaOH
IgG1/4-Elutionspuffer (5 M NaI)	74,94 g NaI ad 100 ml Aqua dest.
Carbonat/Bicarbonat-Puffer pH 9,6	1,59 g Na ₂ CO ₃ 2,93 g NaHCO ₃ ad 1000 ml Aqua dest.
Zellkulturmedium (B-Zellen)	500 ml Iscove's Modifiziertes Dulbecco's Medium (IMDM) 1 % Penicillin/Streptomycin 10 % fötales Kälberserum
Zellkulturmedium (Neutrophile)	500 ml Dulbecco's Mo- difiziertes Eagle Medium (DMEM) 1 % Penicillin/Streptomycin
FACS-Puffer (PBS pH 7,4; 0,5% BSA; 0,1% NaN ₃)	2,5 g BSA 0,5 g NaN ₃ ad 500 ml PBS pH 7,4 steril filtrieren mit Filtereinheit (Nylonmembran, 0,2 µm Porengröße, NALGENE)

3.4.2 Antikörper

Tabelle 3.6: Antikörper für die Durchflusszytometrie.

Reaktivität	Klon	Markierung	Bezugsquelle	Bestell-Nr.
α -human CD15	MEM-158	FITC	Immunotools	21330153
α -human CD19	LT19	PE	Immunotools	21270194
α -human CD20	LT20	FITC	Miltenyi	130-091-108
α -human CD45	HI30	PE	BD	555483

3.4.3 Isolation von IgG1 und IgG4 aus Seren von Allergiekapatienten

3.4.3.1 Herstellung der Protein A - Säule für die Aufreinigung von IgG

Die Isolation von IgG aus humanen Serum erfolgte mit ProSep-vA High Capacity (Millipore), an PROSEP®gekoppeltes Protein A aus *Staphylococcus aureus*. Protein A bindet die Subklassen IgG1, IgG2 und IgG4. Eine C10/10 Chromatographiesäule (Pharmacia) wurde mit 2 ml dieser Matrix luftblasenfrei befüllt und mit Hilfe des oberen Adaptors das Säulenvolumen auf 3 ml eingestellt. Das verwendete ProSep-vA Volumen besaß eine Kapazität von 84 mg IgG. Die Lagerung der gefüllten Säule erfolgte bei 4 °C in PBS mit 0,05 % NaN₃.

3.4.3.2 Herstellung der Affinitätssäulen für die Isolation von IgG1 bzw. IgG4

Als feste Phase wurde hierfür BrCN-aktivierte Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. An diese wurde polyklonales, affinitätsgereinigtes Schaf anti-Human IgG4 (Binding Site, AU009) bzw IgG1 (Bindung Site, AU006) Serum gekoppelt. Dazu wurden zunächst 1,5 ml des jeweiligen Serums dialysiert: eine Spectra/Por®Membran (MWCO: 6-8.000, Durchmesser: 6,4 mm) wurde 30 min in Dialysepuffer equilibriert, mit dem jeweiligen Serum befüllt und zwei Mal gegen 250 ml IgG1/4 Kopplungspuffer bei 4 °C unter ständigem Rühren dialysiert. Anschließend wurde die Proteinmenge mit 1,7 mg für anti-IgG4 und 1,84 mg für anti-IgG1 bestimmt.

Vor der Kopplungsreaktion wurden 1,2 g der CNBr-aktivierten Sepharose auf einem Glasfilter 15 Mal mit jeweils 4 ml eiskalter 1 mM HCl gespült, drei Mal mit 4 ml IgG1/4-Kopplungspuffer gewaschen und die gequollene Sepharose auf ein Volumen von 2 ml eingestellt. Nachdem der Überstand entfernt wurde, gab man das dialysierte Serum dazu. Dieses wurde 2,5 h bei RT in einem Überkopfschüttler inkubiert. Abschließend wurde die im Überstand verbliebene Proteinmenge mit $<0,04$ mg/ml bestimmt. Nach dem Waschen mit 15 ml CNBr-Sepharose-Block wurde das Säulenmaterial 2 h lang mit 5 ml der Sepharose-Blocklösung im Überkopfschüttler inkubiert, um die verbliebenen reaktiven Gruppen zu besetzen.

Zuletzt wurde jeweils eine Chromatographiesäule wie unter Punkt 3.4.3.1 beschrieben befüllt und in IgG1/4-Probenpuffer mit 0,05 % NaN_3 gelagert.

3.4.3.3 Isolation von IgG aus Serum von Allergiepatienten unter SIT

Als Ausgangsmaterial dienten 2-4 ml Serum von Allergiepatienten, die sich seit mindestens einem Jahr einer spezifischen Immuntherapie unterzogen und einen entsprechend hohen Titer an allergenspezifischen IgG1 und besonders IgG4 ausgebildet haben sollten. Zunächst wurde das Serum 15 min mit $21.000 \times g$ zentrifugiert, um unlösliche Partikel zu entfernen, die im weiteren Verlauf die Affinitätsäulen verstopfen könnten. Der erhaltene Überstand wurde 1:3 in Probenpuffer verdünnt.

Der Flüssigkeitsstrom während der sich anschließenden Affinitätschromatographie wurde mit einer peristaltischen Pumpe (Pharmacia LKB Pump P-1) erzeugt. Die Flußgeschwindigkeit betrug 22 ml/h. Zunächst wurde die Protein A - Säule mit fünf Säulenvolumen Probenpuffer gewaschen und danach das verdünnte Serum appliziert. Mit Beginn der Probenauftragung wurde der Durchlauf in je 2 ml Aliquots aufgefangen und die Proteinmenge durch die Messung der Absorption bei 280 nm mittels NanoDrop[®]ND-1000 Spektrometer bestimmt. Anschließend wurde mit Probenpuffer gewaschen bis die Proteinmenge unter 0,02 mg/ml gesunken war. Nach der folgenden Elution mit IgG-Elutionspuffer wurden die IgG enthaltenden Aliquots vereint und mit 0,35 ml IgG-Neutralisierungspuffer pro ml Eluat auf einen physiologischen pH Wert justiert. Die so erhaltene Lösung wurde bei 4 °C in einer Spectra/Por[®] Membran (MWCO: 6-8.000, Durchmesser: 6,4 mm) drei Mal gegen jeweils 250 ml Probenpuffer dialysiert. Zuletzt wurde die Proteinkonzentration durch Absorptionsmessung bei 280 nm dokumentiert.

3.4.3.4 Aufreinigung von IgG4 und IgG1

Die Affinitätschromatographie zur Isolation von IgG1 und IgG4 wurde analog der IgG-Aufreinigung durchgeführt. Nach dem Einbau der entsprechenden Säule in das Flüssigkeitssystem wurde die gekoppelte Sepharose mit 5 Volumen Probenpuffer gewaschen bevor das Protein A gereinigte IgG (für die Isolation von IgG4) bzw. die IgG4 negative Fraktion (für die Isolation von IgG1) aufgetragen wurde. Die Elution erfolgte mit 5 M NaI. Nach der Dialyse wurde das affinitätsgereinigte IgG1 bzw. IgG4 mit einer Centricon Plus-20 Filtereinheit (MW=5000, Millipore Corporation) auf ein Volumen von 500 µl eingeeengt und die Proteinmenge bestimmt.

3.4.3.5 ELISA zur Überprüfung der Isolatreinheiten und des Bindungsvermögens der Antikörper

Eine ELISA-Platte (Nunc Medisorb®) wurde dazu mit Wespen- (ALK-Scherax, Code: 802, Proteinkonzentration 0,44 mg/ml in PBS) bzw. Bienengiftallergen (ALK-Scherax, Code: 801, Proteinkonzentration 0,52 mg/ml in PBS) beschichtet. Dabei wurde für ersteres eine Verdünnung von 1:1000, für das Bienengiftallergen von 1:500 verwendet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zwei Waschschritten und einer Stunde Absättigung möglicher unspezifischer Bindungsstellen wurden die dialysierten Isolate in einer Verdünnung von 1:50 für zwei Stunden aufgetragen. Nach erneutem Waschen gab man die IgG1- bzw. IgG4-spezifischen Antikörper (siehe Tabelle 3.2) dazu und inkubierte für weitere zwei Stunden. Zuletzt folgte die Farbreaktion mit TMB und das Einlesen der OD-Werte.

3.4.4 *In-vitro* Generierung und Detektion von Immunkomplexen

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl hitzeaggregierte als auch spezifische Immunkomplexe verwendet. Erstere wurden durch die Inkubation der jeweiligen IgG-Lösung bei 63°C für 30 min erzeugt, wodurch die enthaltenen Proteine sich zu Komplexen zusammenlagerten. Allerdings kommen die spezifischen Immunkomplexe dem *in-vivo* Zustand näher. Diese wurden durch zwei Stunden Inkubation des IgG1/4-Isolates mit dem jeweiligen Allergen bei 25°C und 500 U/min im Thermoschüttler (Eppendorf AG) generiert wurden.

Zur Messung der erhaltenen Immunkomplexe wurde ein bereits publiziertes ELISA-System in unserem Labor etabliert [Stanilova and Slavov, 2001]: C1q (Sigma-Aldrich)

wurde mit einer Konzentration von 10 µg/ml bei 4 °C über Nacht in Carbonat/Bicarbonat-Puffer an eine Nunc Medisorb® ELISA-Platte gekoppelt, gewaschen, blockiert und anschließend mit der jeweiligen Immunkomplex-Lösung für 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde mit α-human IgG:HRP(Fab-Fragment) (Biomol GmbH) detektiert, die Farbreaktion mit TMB durchgeführt und abschließend die OD-Werte wie unter 3.2.2 eingelesen.

3.4.5 Apoptose in B-Zell Populationen

3.4.5.1 Isolation von humanen naiven B-Zellen

Zunächst wurden über eine isopyknische Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation die PBMCs gewonnen: 15 ml steriles, endotoxin-getestetes Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare) wurde mit 35 ml einer 1:2 Verdünnung aus EDTA-Blut in PBS überschichtet. Es folgte ein Zentrifugationsschritt mit 400*g für 30 min ohne Bremse. Anschließend nahm man die Zellen der Interphase ab, worin die Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen zu liegen kommen. Die Erythrozyten und ein Großteil der Granulozyten sedimentieren im Pellet, die Thrombozyten verblieben aufgrund ihrer geringen Größe hauptsächlich in der Plasmaphase. Die abgenommenen Zellen der Interphase wurden anschließend mit PBS gewaschen, resuspendiert und die Zellzahl in der Neubauer Zählkammer bestimmt.

Anschließend folgte die Markierung der Zellen mit dem humanen B-Zell Isolationskit II (Miltenyi). Dazu wurde die Zellsuspension bei 300*g für 10 min zentrifugiert. Alle folgenden Volumenangaben beziehen sich auf 10⁷ Zellen. Wurde eine größere Anzahl an Zellen genutzt, passte man die Volumina an: doppelte Zellzahl bedeutet doppeltes Volumen. Das Pellet wurde in 40 µl MACS Running-Buffer (Miltenyi) je 10⁷ Zellen resuspendiert, 10 µl Biotin-Antikörper-Cocktail je 10⁷ Zellen hinzugegeben, gut gemischt und 10 min bei 2-8 °C inkubiert. Danach wurden 30 µl MACS Running-Buffer sowie 20 µl Anti-Biotin Microbeads je 10⁷ Zellen hinzugegeben, gut gemischt und für weitere 15 min bei 2-8 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1-2 ml MACS Running-Buffer gewaschen, in 500 µl MACS Running-Buffer pro 10⁸ Zellen resuspendiert und am autoMACS™ Separator mit dem Programm „Depletes“ in eine positive und eine negative Fraktion aufgetrennt. Von beiden wurde die Zellzahl bestimmt sowie Aliquots á 2*10⁵ Zellen für die Qualitätskontrolle entnommen.

Zur Überprüfung der Reinheit und Phänotypisierung wurden die Zellen beider Fraktionen wie folgt gefärbt: Panel 1: CD27:FITC, CD19:PE, CD38:PE/Dy64, CD138:APC;

Panel 2: CD20:FITC, CD19:PE. Die genauen Angaben zu den verwendeten Antikörpern können der Tabelle 3.6 entnommen werden. Alle Färbungen wurden in FACS-Puffer auf Eis durchgeführt. Die Zellen in jedem Ansatz wurden in einem Gesamtvolumen von 20 μl mit je 3 μl Antikörper sowie 1 μl humanen AB-Normalserum (PromoCell GmbH) 20 min inkubiert. Das humane Normalserum wurde 5 min vor den Antikörpern zur Absättigung unspezifischer Bindemöglichkeiten von Immunglobulinen auf den Zellen, z.B. an Fc-Rezeptoren, appliziert. Nach der Markierung wurden die Zellen mit 500 μl FACS-Puffer gewaschen und am FACSCalibur™ (BD Biosciences) Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit WinMDI (v2.9) bzw. R (v2.9.1).

3.4.5.2 Bestimmung der Apoptoserate von Immunkomplex-stimulierten B-Zellen

Zunächst wurden die frisch isolierten B-Zellen in 200 μl Zellkulturmedium mit einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ausgesät. Dazu wurden jeweils 20 μl Immunkomplex-, Antigenlösung oder PBS gegeben. Als Positivkontrolle dienten B-Zellen, welche mit Staurosporin (Sigma-Aldrich GmbH) stimuliert wurden. Dies ist ein Kinase-Inhibitor, der aus dem Pilz *Streptomyces staurospores* isoliert und häufig als Agenz zur Apoptoseinduktion genutzt wird [Antonsson and Persson, 2009].

Nach zwölf Stunden Inkubation wurden die B-Zellen zur durchflusszytometrischen Analyse der Apoptose mit Annexin-V:FITC und 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) gefärbt. Das Lektin Annexin-V bindet bei der Präsenz von Ca^{2+} -Ionen Phosphatidylserin mit hoher Affinität und kann damit als Marker für die frühe Apoptose genutzt werden. Denn ein frühes Ereignis während der Apoptose ist die Translokation von Phosphatidylserin von der inneren zur äußeren Seite der Zellmembran [van Engeland et al., 1998]. Allerdings könnten in dem Zellgemisch ebenfalls nekrotische Zellen vorhanden sein, die aufgrund der durchlässigen Membran auch Annexin-V binden könnten. Zur Differenzierung wird hier der Zellfarbstoff 7-AAD verwendet, der nicht membran-gängig ist und somit nur in nekrotischen Zellen oder während der späten Apoptose eindringen kann. Dann interkaliert er in die DNA und kann durchflusszytometrisch detektiert werden.

Für die Markierung wurden die stimulierten Zellen zunächst bei 300*g sieben Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurden sie in einem Gemisch aus 30 μl Annexin-V Bindepuffer, 3 μl Annexin-V:FITC (Immunotools GmbH) und 3 μl 7-AAD (Sigma-Aldrich GmbH) resuspendiert. Nach 15 Minuten Inkubation wurden die B-Zellen er-

neut bei 300*g zentrifugiert, in 400 µl FACS-Puffer aufgenommen und umgehend am Durchflusszytometer analysiert.

3.4.6 Nachweis von ROS in humanen Neutrophilen

3.4.6.1 Isolation von Neutrophilen

Humane Neutrophile wurden aus dem peripheren Blut freiwilliger Spender isoliert. Dazu wurden 5 ml heparinisiertes Vollblut mit 20 ml vorgekühltem Erythrozyten-Lysepuffer (Qiagen GmbH) 15 Minuten lang auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erst mit 20 ml eisgekühltem Erythrozyten-Lysepuffer und danach mit 50 ml PBS gewaschen. Darauf nimmt man die Zellen in 35 ml PBS auf und überschichtet 15 ml Ficoll-Paque™ Plus mit ihnen.

Nach der Dichtegradientenzentrifugation (siehe Abschnitt 3.4.5.1) entfernt man den Überstand komplett und resuspendiert die im Pellet angereicherten Neutrophilen. Diese wurden dann mit einer Zelldichte von $2,5 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ in Zellkulturmedium ausgesät und eine Stunde lang wie unter 3.4.5.2 beschrieben mit den Immunkomplexen stimuliert.

3.4.6.2 Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies

Der Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wurde mit 1,2,3-Dihydrorhodamin (DHR) durchgeführt. Diese Substanz ist membrangängig und wird durch ROS in ein grün-fluoreszierendes Reaktionsprodukt umgewandelt, welches im Anschluss durchflusszytometrisch gemessen werden kann.

Je $5 \cdot 10^5$ stimulierte Neutrophile wurden bei 37 °C für 5 min in 5 µM DHR inkubiert. Als Positivkontrolle dienten mit 200 ng/ml PMA stimulierte Neutrophile. Anschließend wurden die Zellen in 400 µl FACS-Puffer aufgenommen und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) umgehend am Durchflusszytometer analysiert.

3.4.6.3 Phagozytose-Assay

Als Phagozytosesubstrat wurden grün-fluoreszierende, amine-modifizierte Latexpartikel mit einem Durchmesser von einem µm (Sigma-Aldrich GmbH, L1030) verwendet, welche zuvor eine Stunde lang bei 37 °C in einer 5%igen BSA-Lösung inkubiert wurden. Diese Latexpartikel wurden in einem Verhältnis von 1:30 Neutrophilen:Partikel zu den Immunkomplex-stimulierten Neutrophilen gegeben und eine Stun-

de bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit je 500 µl FACS-Puffer gewaschen, in 400 µl desselbigen aufgenommen und die MFI umgehend durchflusszytometrisch bestimmt.

3.5 Statistik

Da die Werte für die Subklassentiter nicht der Normalverteilung folgten, wurde zur Bestimmung des Signifikanzlevels für Gruppenvergleiche der Mann-Whitney-Test genutzt bzw. die Spearman-Korrelation für alle Analysen verwendet, bei denen die Subklassentiter untereinander oder mit anderen Parametern verglichen wurden. Mit dem Fisher-Exakt-Test wurden die Odds ratios, das 95 % Konfidenzintervall sowie die Signifikanzlevel für den Vergleich der negativen und positiven Seren für die jeweiligen Subklassen berechnet. Die Signifikanzlevel sind in der vorliegenden Arbeit mit # ($p < 0,1$), * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$) angegeben.

Alle statistischen Berechnungen und Graphen wurden mit der Open-Source Software R (v2.9.2) [[R Development Core Team, 2009](#)] bzw. OpenOffice Calc (v3.1.1) erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristika der RA Patienten Kohorte

Die untersuchte Patientenkohorte bestand aus 127 RA Patienten. Von ihnen waren 94 (74 %) positiv und 33 (26 %) negativ für anti-CCP Antikörper. Der Anteil der weiblichen Patienten betrug 70 % und spiegelte damit circa die normale Geschlechterverteilung von drei zu eins bei den RA Patienten wieder. Das Alter lag zwischen 26 und 91 Jahren mit einem Mittelwert von 62,9 Jahren, die Krankheitsdauer im Bereich zwischen drei und 44 Jahren mit einem Mittelwert von 14,5 Jahren.

Hinsichtlich der Krankheitsparameter konnte von 66 Patienten die Blutsenkungsgeschwindigkeit und die Serumkonzentration des C-reaktiven Proteins ermittelt werden. Erstere füllte einen Bereich von 7 mm/h bis 100 mm/h. Der Mittelwert lag bei 40,8 mm/h. Die Konzentration des CRP lag zwischen 3 mg/l und 105,5 mg/l bei einem Mittel von 24,3 mg/l. Der DAS28 wurde lediglich von 29 Patienten erhalten und befand sich zwischen 2,9 und 7,6 im Mittel bei 5,48.

4.2 IgG1 und IgG4 sind die dominierenden Subklassen unter den ACPAs

4.2.1 Qualitätskontrolle des subklassenspezifischen ELISAs

Für die Qualitätskontrolle sind zwei Aspekte zu berücksichtigen. Zum einen muss die Spezifität der Subklassenantikörper überprüft werden. Dazu wurde mittels ELISA die Kreuzreaktivität jedes subklassenspezifischen Antikörpers gegen alle vier IgG Subklassen getestet. Wie man in Abbildung 4.1 erkennen kann, zeigt das anti-IgG1 polyklonale Serum geringe Kreuzreaktivität gegen IgG2, -3 und -4 (Spalte 1 unten, Spalte 5). Diese unspezifische Reaktion ist am stärksten gegen IgG4, gefolgt von IgG3 und IgG2. Doch ist sie zum einen in jeder getesteten Verdünnung der beschichteten IgG Subklassen um mindestens die Hälfte geringer als die spezifische. Zum Anderen wurde zur Bestimmung der spezifischen IgG1 Titer der ACPAs eine höhere Serumverdünnung verwendet als für die anderen Subklassen. Somit hat diese unspezifische

Reaktivität nur eine untergeordnete Bedeutung für die eigentlichen Versuchen. Die monoklonalen Detektionsantikörper gegen IgG2, -3 und -4 weisen keinerlei Kreuzreaktivität gegen eine andere Subklasse auf. Eine Kreuzreaktivität gegen BSA als Blockierungsreagenz ist in keinem Fall zu erkennen (Reihe 1).

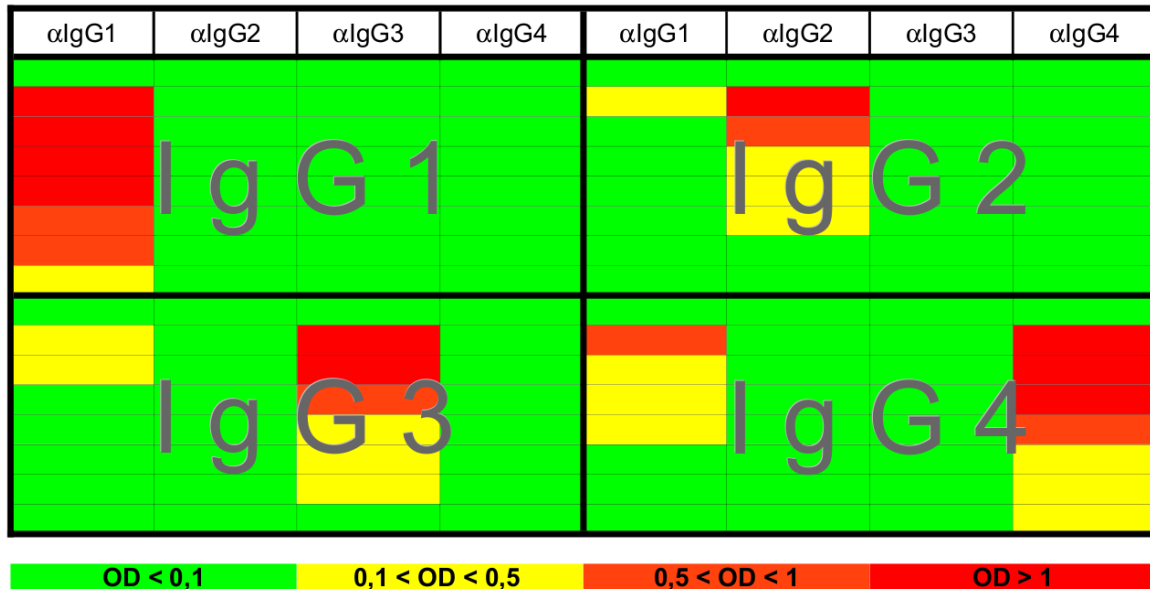


Abbildung 4.1: Die subclassenspezifischen Antikörper für IgG2-4 zeigen keine Kreuzreaktivität gegen andere Subklassen, allein das polyklonale anti-IgG1 Serum erkennt in geringem Maß IgG2, -3 und -4. Beschichtung Reihe 1: 2% BSA, Beschichtung R2-R8: Serielle 1:2 Verdünnung der IgG Subklassen Proteine (graue Schrift) beginnend bei 1:1.000 (1 μ g/ml) bis 1:64.000 (15,6 ng/ml). Der Kopf der Heatmap gibt den verwendeten Subklassenantikörper an.

Als weiteres Qualitätsmaß wurden die Bindungseigenschaften der Detektionsantikörper verglichen. Das sollte gewährleisten, dass die OD die Menge an gebundenen Autoantikörpern widerspiegelt und nicht die unterschiedlichen Affinitäten der verwendeten Detektionsantikörper. Die in Abbildung 4.2 dargestellten Titerkurven zeigen für alle vier Antikörper eine vergleichbare OD im Bereich der Sättigung und unterhalb der Detektionsgrenze. Allein der Graph für IgG2 ist stärker in Richtung der höheren Konzentration der Beschichtung verschoben. In diesem Fall muss von einer höheren Detektionsgrenze ausgegangen werden. Außerdem ist der Anstieg der Kurven innerhalb des linearen Bereichs annähernd identisch. Nur anti-IgG1 zeigt einen leicht flacheren Verlauf. Die Versuche zur Qualitätskontrolle belegen somit die vergleichbaren Bindungseigenschaften sowie die Spezifität der Detektionsantikörper.

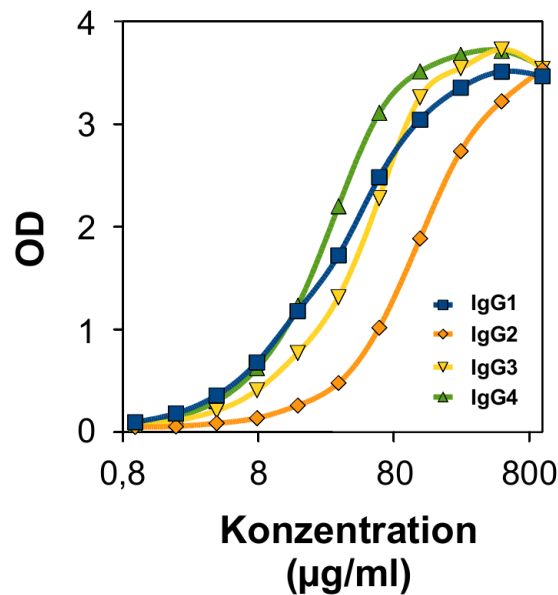


Abbildung 4.2: Die Titerkurven aller Detektionsantikörper weisen einen nahezu identischen Verlauf auf. Dargestellt ist die jeweilige OD gegen die Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) der vier IgG Subklassen.

4.2.2 Bestimmung der optimalen Serumverdünnung

Aufgrund der hohen OD-Werte für die anti-CCP Antikörper (22 Seren mit einer OD über 1,5) bei einer 1:200 Serumverdünnung wurden diese zu einem späteren Zeitpunkt zusätzlich bei einer 1:400 Verdünnung gemessen. Damit sollte sichergestellt werden, dass man sich hier nicht im Bereich der Sättigung für eine Vielzahl der Seren befand. Abbildung 4.3 zeigt die Korrelation beider Bestimmungen für anti-MCV und anti-CCP Antikörper. Die OD-Werte für die MCV-spezifischen IgG1 Antikörper dagegen befanden sich bereits bei der 1:200 Serumverdünnung im mittleren Bereich des Assays, was der Rangkorrelationskoeffizient von 0,93 zeigt (Vergleich CCP: 0,7). Der Anstieg von 0,46 weist zusätzlich auf die Linearität des ELISAs im gemessenen Bereich hin: doppelte Verdünnung bedeutete halbe OD. IgG1 wurde also im Folgenden mit einer 1:400 Serumverdünnung bestimmt. Für die anderen Subklassen wurde das Serum 1:20 verdünnt. Somit ist IgG1 nicht mit IgG2, -3 und -4 vergleichbar. Doch letztere sind auf die gleiche Art und Weise nachgewiesen worden und somit untereinander vergleichbar.

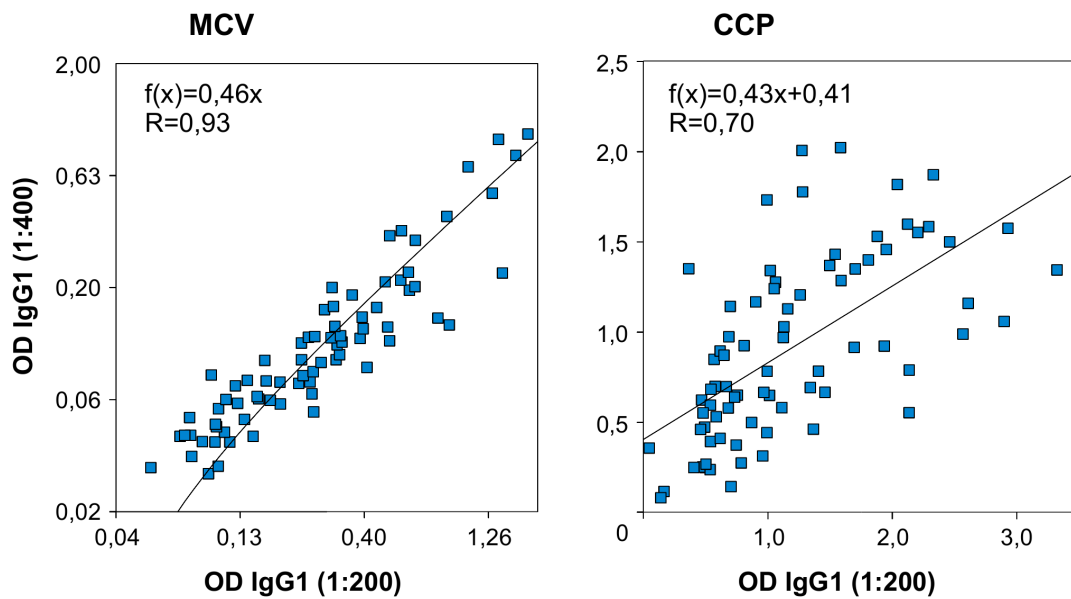


Abbildung 4.3: Die Titer der IgG1 anti-MCV und anti-CCP Antikörper zweier Serumverdünnungsstufen korrelieren signifikant ($p < 0,001$). Im XY-Diagramm sind die OD-Werte für die 1:200 gegen die 1:400 Serumverdünnung aufgetragen. Jeder Punkt entspricht einem der 77 getesteten RA Patienten. Desweiteren sind die lineare Regressionsgleichung und der Rangkorrelationskoeffizient R angegeben.

4.2.3 CCP und MCV spezifische Autoantikörper korrelieren signifikant miteinander

Zunächst sollte die Frage beantwortet werden, wie sich die Antikörpertiter der IgG Subklassen gegen CCP bzw. MCV zueinander verhalten. Dazu wurden die entsprechenden ODs als Indikator für die Titer verwendet und direkt miteinander korreliert (Abbildung 4.4). Es zeigten sich hier für alle vier Subklassen signifikante Korrelationen zwischen anti-CCP und anti-MCV ($p < 0,001$). Die Beziehung war für die Antikörper der Klasse IgG4 am stärksten ($R = 0,73$). Es folgten IgG3 ($R = 0,58$), IgG1 ($R = 0,53$) und IgG2 ($R = 0,37$). Die vergleichsweise schwache Korrelation zwischen CCP und MCV-spezifischen IgG2 kann dabei aus den geringen Titern der spezifischen Antikörper dieser Subklasse resultieren.

Die beobachtete Korrelation zwischen anti-MCV und anti-CCP Antikörpern kann entweder durch eine gemeinsame Regulation der produzierenden Plasmazellen oder aus Kreuzreaktivitäten resultieren. Im folgenden wurden beide Möglichkeiten untersucht.

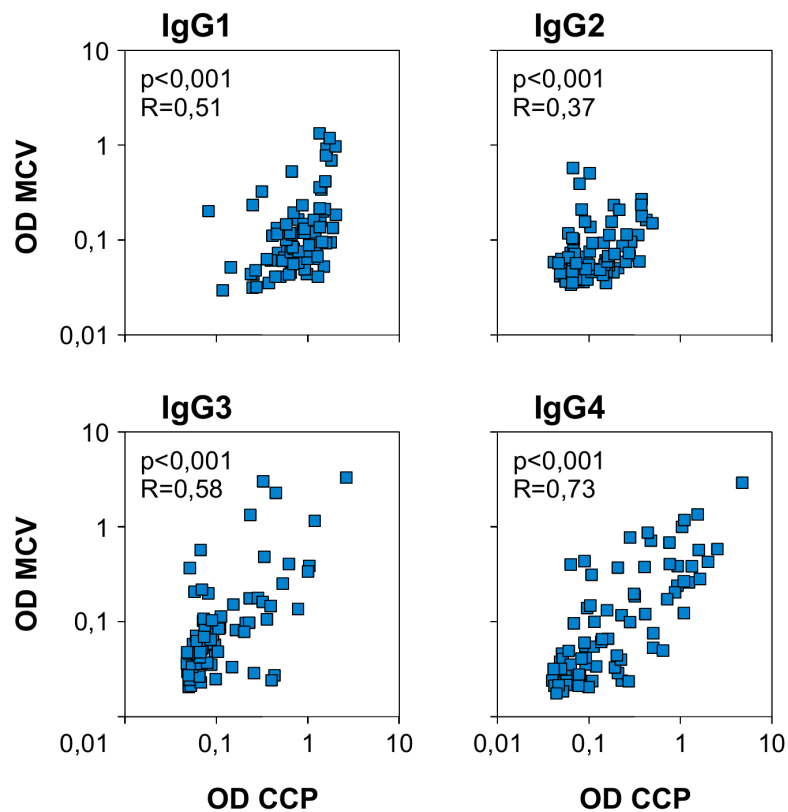


Abbildung 4.4: Die Titer der anti-MCV und anti-CCP Antikörper jeder Subklasse korrelieren signifikant miteinander wobei IgG4 die stringenteste Korrelation aufweist. Im XY-Diagramm sind die OD-Werte für die anti-MCV gegen die anti-CCP Antikörper der vier IgG Subklassen aufgetragen. Jeder Punkt entspricht einem der 77 getesteten RA Patienten. Desweiteren ist der Rangkorrelationskoeffizient R angegeben.

4.2.4 IgG1 stellt die dominante Subklasse unter den Antikörpern gegen CCP und MCV in RA, doch IgG4 ist auffällig erhöht

Einen Hinweis auf eine gemeinsame Regulation kann die Isotyp-Verteilung liefern, da der Klassenwechsel aktivierter, naiver B-Zellen abhängig ist von Mediatoren in deren Mikroumgebung. Dazu wurden die Spiegel der CCP- und MCV-spezifischen Antikörper der IgG Subklassen untersucht. Die entsprechenden ODs sind in Abbildung 4.5 zusammengefasst. Die Mediane der ODs der anti-CCP Antikörper betragen 0,849, 0,095, 0,085, 0,158 sowie 0,095, 0,061, 0,064, 0,065 für die MCV spezifischen Antikörper der jeweiligen Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4. Auch wenn die ODs dies für anti-MCV nicht verdeutlichen, sind die spezifischen IgG1-Titer erwartungsgemäß am höchsten. Denn die Patientenserum wurden für die IgG1-Bestimmung 20fach

stärker verdünnt als bei den drei anderen Subklassen. Interessanterweise ist der anti-CCP spezifische IgG4 Titer signifikant ($p = 0,008$) höher als diejenigen für IgG2 und IgG3. Betrachtet man die Situation bei den MCV spezifischen Subklassen, so ist der Median der IgG4 Titer nur marginal erhöht. Jedoch kann man aus der Lage des oberen Quartils (IgG2 - 0,1, IgG3 - 0,15, IgG4 - 0,28) ablesen, dass mehr Patienten einen erhöhten IgG4 Spiegel aufweisen als IgG2 oder IgG3.

Doch nicht nur die Titer, sondern auch die Frequenz der positiven Seren für anti-CCP und anti-MCV Antikörper der Subklassen IgG2, -3 und -4 spiegelte die beschriebene Verteilung wieder. Während 33 der 77 untersuchten Patienten CCP spezifische Antikörper der IgG4 Subklasse trugen, waren es jeweils nur 14 bzw. 20 für IgG2 und IgG3. Die Unterschiede zwischen IgG4 und IgG3 bzw. zwischen IgG4 und IgG2 waren statistisch signifikant im exakten Fischer-Test mit Odds Ratios von jeweils 2,12 (95% Konfidenzintervall: 1,03 - 4,49, $p = 0,04$) und 3,35 (95% Konfidenzintervall: 1,53 - 7,61, $p = 0,001$). Betrachtet man die anti-MCV Antikörper, so konnten 33 Patienten als IgG4-positiv klassifiziert werden, doch lediglich 20 waren IgG2-positiv und 26 IgG3-positiv. Daraus ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen IgG4 und IgG2 ($p = 0,04$) mit einer Odds ratio von 2,12 (95% Konfidenzintervall: 1,03 - 4,49). IgG4 und IgG3 unterschieden sich jedoch nicht (Odds ratio = 1,5, 95% Konfidenzintervall: 0,7 - 3,26, $p = 0,28$).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für die beiden Zielantigene, CCP und MCV, IgG1 die dominante IgG Subklasse darstellt, gefolgt von IgG4.

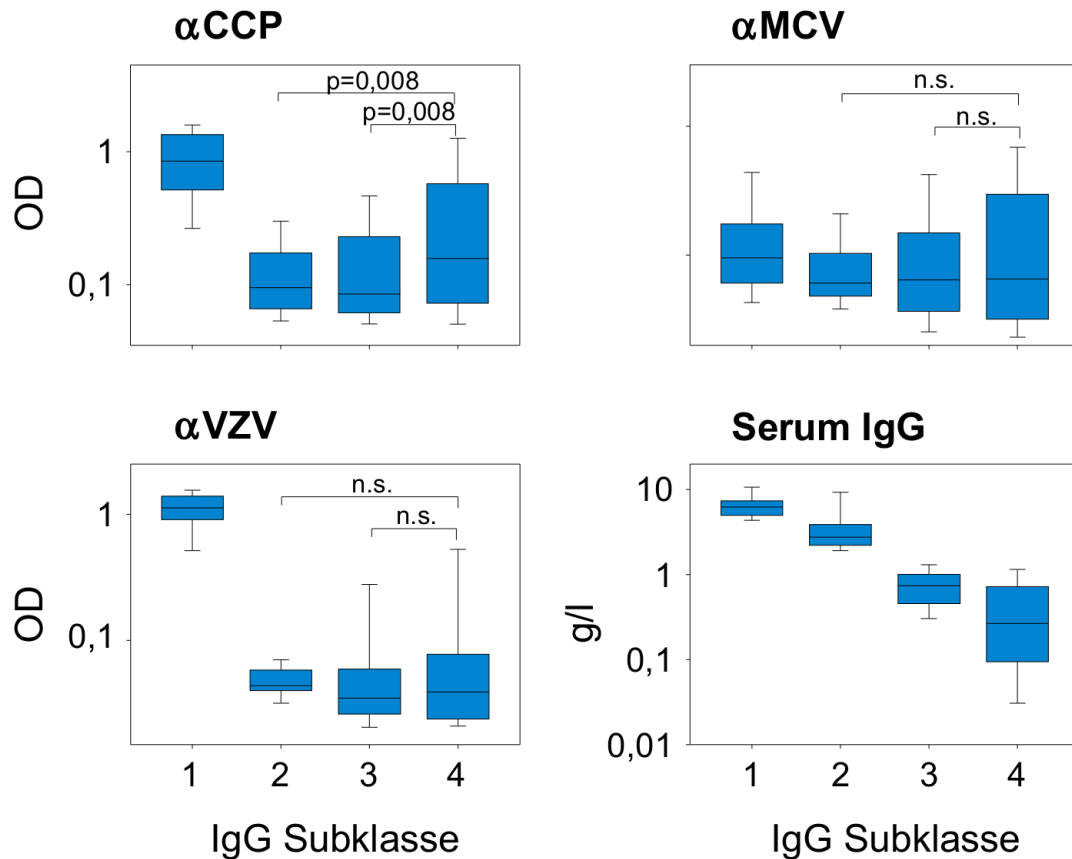


Abbildung 4.5: IgG1 gefolgt von IgG4 sind die dominanten Subklassen beider getesteter ACPA Populationen in der RA. Die Boxplots zeigen die ODs der verschiedenen IgG Subklassentiter gegen CCP (*oben links*), MCV (*oben rechts*) und VZV (*unten links*). Für die Analyse der ACPA-Subklassen wurden 77 RA Seren in einer Verdünnung von 1:400 (IgG1) und 1:20 (IgG2, IgG3, IgG4) getestet. Für die Untersuchung der VZV-spezifischen Antikörper wurden 19 RA Seren mit Verdünnungen von 1:100 (IgG1) bzw. 1:5 (IgG2, IgG3 and IgG4) getestet. Boxplot (*unten rechts*) demonstriert die Gesamtsubklassenspiegel von 10 Patienten. Die Boxen zeigen das 25%-, 75%-Quantil sowie den Median der ODs für die vier IgG Subklassen, die Whisker das 5% bzw. das 95% Quantil. Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney U-Test berechnet. n.s. - nicht signifikant.

4.2.5 Antikörperantworten gegen *Varicella zoster* und Gesamtserumspiegel sind nicht in Richtung IgG4 verschoben

Um zu untersuchen, ob die Dominanz von IgG4 über IgG2 und IgG3 spezifisch für beide Autoantikörpertypen oder ein allgemeines Charakteristikum der Immunantwort in RA-Patienten ist, wurde zusätzlich die IgG Subklassenverteilung gegen das verbreitete *Varicella zoster* Virus ($n = 19$) und der Gesamtserumspiegel ($n = 10$) für

IgG1 bis IgG4 (Abbildung 4.5) analysiert. Dafür wurden die hochtitrigen Seren für anti-MCV und -CCP jeder Subklasse berücksichtigt.

Unter den anti-VZV Antikörpern war allein IgG1 bei einer Serumverdünnung von 1:100 zu detektieren. Für sie lag der Median der ODs bei 1,123. Betrachtete man die anderen drei Subklassen bei einer 1:5 Verdünnung des Serums, so war mit Medianen von 0,044, 0,035 und 0,039 für IgG2 bis IgG4 keine dieser Subklassen substantiell vorhanden. Vervollständigend existierten auch keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen. Die Gesamtserumspiegel wichen mit mittleren Konzentrationen von 6,24, 2,75, 0,74 und 0,266 g/l für IgG1 bis IgG4 ebenfalls nicht von den Normwerten ab.

Somit lässt sich abschließend festhalten, dass die erhöhten IgG4-Spiegel spezifisch für die ACPAs im Serum von RA-Patienten sind.

4.2.6 Korrelation mit Krankheitsparametern

Nach der Untersuchung der immunologischen Eigenschaften von anti-MCV und anti-CCP Antikörpern wurde nun der Zusammenhang zwischen den Subklassentitern der untersuchten ACPAs mit den erhaltenen Krankheitsparametern Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und C-reaktives Protein (CRP)-Konzentration analysiert. Beide Parameter sind ein Maß für den systemischen Inflamationsgrad und werden zur Abschätzung der aktuellen Krankheitsaktivität genutzt.

Die Titer von IgG3 anti-MCV ($P = 0,02$, $R = 0,29$) und anti-CCP ($p = 0,03$, $R = 0,27$) sowie IgG4 anti-MCV ($p = 0,01$, $R = 0,31$) korrelierten mit der Serum CRP Konzentration. Für IgG4 anti-CCP Antikörper war lediglich eine Tendenz ($p = 0,08$) zu erkennen. Die BSG war in der hier untersuchten Patientenkohorte signifikant mit anti-MCV Antikörpern der Subklassen IgG2 ($p = 0,02$, $R = 0,28$) und IgG4 ($p = 0,02$, $R = 0,28$) korreliert. Es läßt sich resümieren, dass beide Parameter der Krankheitsaktivität besser mit den Antikörpern gegen MCV korrelierten.

Zuletzt wurde untersucht, wie sich die Krankheitsdauer auf die Autoantikörperspiegel auswirkt. Überraschenderweise waren die IgG4 Titer gegen beide Zielantigene umso geringer, je länger die Diagnose der RA bestand (anti-MCV: $p = 0,02$, $R = -0,28$; anti-CCP: $p = 0,001$, $R = -0,41$). Die anderen drei ACPA-Subklassen korrelierten nicht mit der Krankheitsdauer.

4.3 Das Erkennungsspektrum der Autoantikörper gegen MCV subklassifizieren die ACPA-positiven RA Patienten

Anschließend wurde die potentielle Kreuzreaktivität untersucht. Dazu wurde ein sequentieller ELISA entwickelt. Der erste Schritt bestand aus der Isolation von entweder MCV- oder CCP-spezifischen Antikörpern aus dem Serum von RA Patienten. Dies wurde durch die Elution der gebundenen Antikörper von der jeweiligen ELISA-Platte bewerkstelligt. Im zweiten Schritt wurden die eluierten Antikörper erneut an eine mit MCV oder CCP beschichtete ELISA-Platte gebunden (Abbildung 3.1). Die Entwicklung der ersten Platte identifiziert nicht eluierte Antikörper, welche einen Anteil von 18% im Fall von MCV bzw. 19% bei anti-CCP ausmachten und somit vergleichbar waren. Die Entwicklung der zweiten ELISA Platten ergab die Anteile von sowohl an das spezifische Antigen bindenden Antikörper als auch den Anteil der Kreuzreagierenden. Erstere machten im Mittel 29% der MCV- und 49% der CCP spezifischen Antikörper aus.

Der Anteil der CCP spezifischen Antikörper, die mit MCV kreuzreagierten war mit durchschnittlich 11,5% nur marginal messbar. Hier stellten nur die Patienten vier und fünf eine Ausnahme dar, in denen eine Kreuzerkennung wahrscheinlich war. Ebenso verhielt sich die Fähigkeit der MCV spezifischen Antikörper CCP zu binden bei den Patienten 1-8. Sie betrug im Mittel 10%. Demgegenüber kreuzreagierten diese bei den Patienten 8-16 z.T. sogar stärker mit CCP. Hier lag die durchschnittliche Bindung bei 44%. Demzufolge konnte man durch die Kreuzreaktivität der anti-MCV Antikörper die ACPA⁺ RA-Patienten in zwei Gruppen teilen, eine mit einem weiten und eine mit einem begrenzten Erkennungsspektrum.

Um beide Gruppen näher zu charakterisieren wurden die verfügbaren allgemeinen, klinischen und genetischen Daten betrachtet. Jedoch konnte kein Unterschied hinsichtlich des Alters ($p = 0,26$), der Krankheitsdauer ($p = 0,65$), BSG ($p = 0,86$), CRP ($p = 0,92$), DAS28 ($p = 0,86$), der HLA-DRB1 Haplotypen oder des SE-Status ($p = 0,7$) erkannt werden. Nur der IgG1 Titer gegen CCP zeigte signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen ($p = 0,02$) mit einer mittleren OD von 0,91 für die Patienten mit einem begrenztem und 1,58 für solche mit einem breitem Erkennungsspektrum. Da IgG4 wegen seines Fab Arm Austausches besonders geeignet scheint, breite ACPA Spezifitäten zu untersuchen, wurde der sequentielle ELISA für 3 Patientenseren wiederholt, jedoch nur IgG4 spezifisch detektiert. Während anti-CCP spezifische ACPAs erneut nur marginal mit MCV reagierten, bindet anti-MCV spezifisches IgG4 aus allen

drei Proben substantiell an CCP. Dies bestätigt die breitere Spezifität von anti-MCV spezifischen ACPAs auch für die IgG4 Subklasse.

Es lässt sich also resümieren, dass die Titer von anti-MCV und anti-CCP Antikörpern miteinander korrelieren. Dieser Zusammenhang konnte sowohl auf eine gemeinsame Regulation der produzierenden Plasmazellen (siehe Subklassenverteilung) als auch (zum Teil) auf eine Kreuzreaktivität beider Antikörperpopulationen zurückgeführt werden.

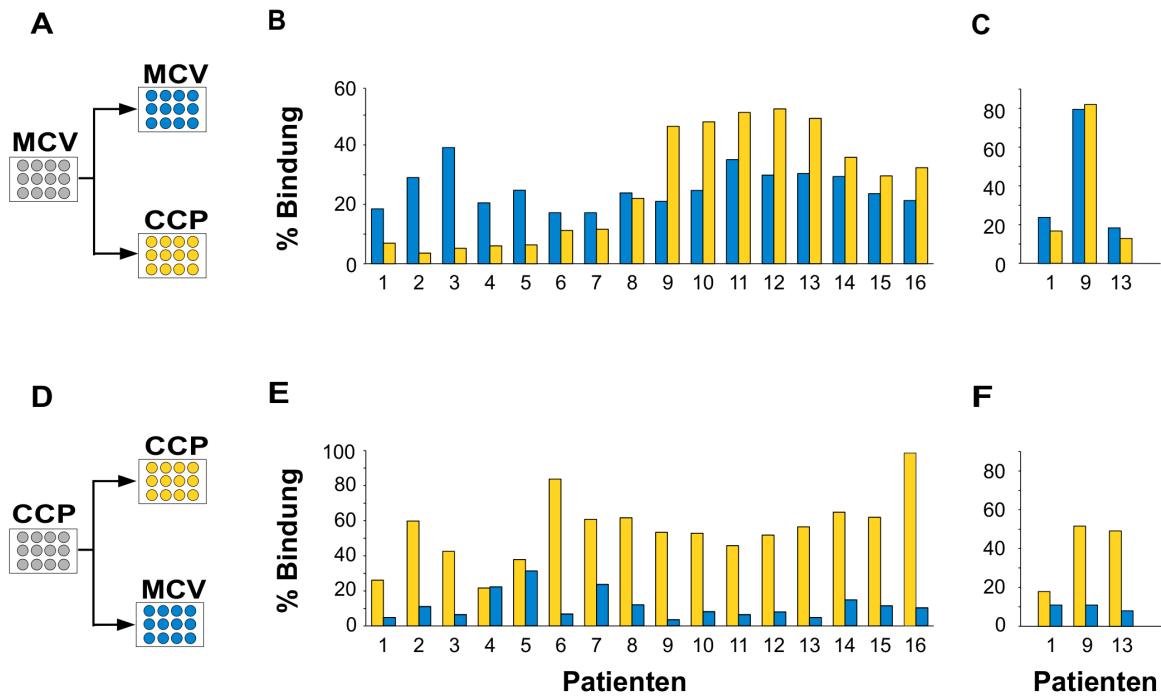


Abbildung 4.6: Die Anti-MCV Diversität subklassifiziert ACPA⁺ RA Patienten in zwei Gruppen. MCV- (A) und CCP-spezifische Antikörper (D) wurden aus dem Serum von 16 RA Patienten mittels ELISA Platten isoliert. Die Eluate wurden zweigeteilt und jede Hälfte auf eine neue ELISA-Platte gegeben, welche entweder mit MCV oder CCP beschichtet war. 100% Bindung auf der zweiten Platte entspricht der halben OD, die auf der Ausgangsplatte gemessen wurde (B) und (E). (C) und (F) sind Replikate von (B) und (E) bei denen IgG4 spezifisch detektiert wurde.

4.4 Der Einfluss von HLA-DRB Allelen auf die Subklassenspiegel der ACPA

4.4.1 HLA-Typisierung

Die Grobtypisierung wurde für 125 RA Patienten erfolgreich vorgenommen. Abbildung 4.7 zeigt beispielhaft die Agarosegele für die Patienten 107 und 116. Hier waren deutlich die technischen Kontrollen bei 430 bp (Spuren 2-9, 11-18, 20-23) bzw. 515 bp (Spuren 1, 10 und 19) zu erkennen. In keinem der analysierten Gele wurde eine Bande in der Negativkontrolle detektiert (Spur 24). Für den Patienten 107 waren Typisierungsbanden in den Spuren 1 (DRB1*01), 8 (DRB1*04) und 22 (DRB4) zu erkennen. Das Agarosegel nach der Typisierung des Patienten 107 zeigte spezifische Banden in den Spuren 6, 15, 16, 17. Dies ließ auf ein DRB1*13 Allel schließen, mit dem gekoppelt das DRB3-Gen (Spur 21) vererbt wurde. Die Typisierungsbande in Spur 10 entsprach HLA-DRB1*10 auf dem anderen Allel.

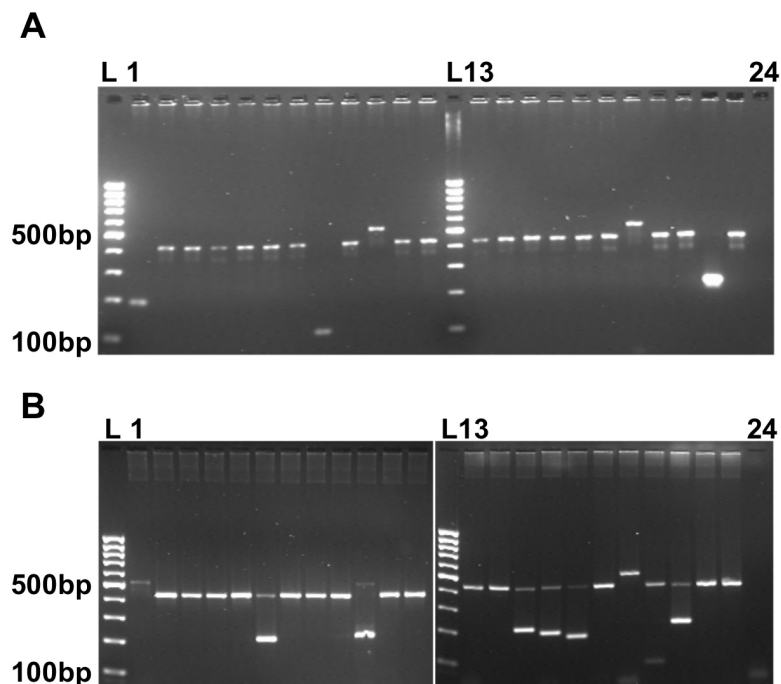


Abbildung 4.7: Agarosegele der HLA-Typisierung zeigen klare Kontroll- und Typisierungsbanden. (A) Agarosegel von Patient 116 zeigt Typisierungsbanden in den Spuren 1 (HLA-DRB1*01), 8 (HLA-DRB1*04) und 22 (HLA-DRB4), (B) Agarosegel von Patient 107 zeigt Typisierungsbanden in den Spuren 6, 15, 16, 17 (HLA-DRB1*13), 10 (HLA-DRB1*10) und 21 (HLA-DRB3).

Von den typisierten Proben waren zwei Patienten homozygot für DR1 (1,6%) und 21 für DR4 (16,8%), 29 Patienten trugen genau ein DR1- (23,2%) und 58 genau ein DR4-Allel (46%). 79 Patienten besaßen mindestens ein DR4-Allel (63,2%), womit dieser Haplotyp am häufigsten vertreten war. Von den DR1- und DR4-Heterozygoten trugen 14 die Kombination $DR1/DR4$.

Stratifizierte man die typisierten Patienten in $ACPA^+$ (n=77) und $ACPA^-$ (n=48), so fanden sich in der positiven Gruppe 88 *04-Allele, in der zweiten Gruppe lediglich 12. Somit war erwartungsgemäß unter den $ACPA$ -positiven Patienten das *04-Allel signifikant häufiger vertreten ($p < 0,0001$; Odds ratio: 10,88; 95% Konfidenzintervall: 5,3 - 24) [Snir et al., 2009].

Hinsichtlich der Krankheitsaktivität konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit den Genotypen DRx/DRx , $DR4/DRx$ und $DR4/DR4$ gefunden werden. Die entsprechenden Mediane lagen hier bei 31 (n=41), 36,2 (n=52) und 30,7 mm/h (n=15) für die Blutsenkungsgeschwindigkeit bzw. 16,75 (n=44), 10,12 (n=53) und 23,86 g/l (n=14) für die CRP-Spiegel. Betrachtete man die SE Allele konnte ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,04 nur für die BSG zwischen den Gruppen SE/SE (Median: 30,1 mm/h) und SE/x (Median: 43 mm/h) festgestellt werden. Keine Unterschiede wurden dagegen beim Vergleich der $DR1^-$ mit den $DR1^+$ Patienten gefunden, weder für die BSG noch für die CRP-Konzentration.

Im Weiteren sollte untersucht werden, welchen Einfluss das Auftreten von SE Allelen des HLA-DRB1 Gens, des prominentesten genetischen Risikofaktors für die Entwicklung einer RA, auf die gemessenen Subklassentiter hat. Entsprechend der SE-Hypothese beruht die Assoziation des HLA-DRB1 Gens mit der RA auf der Epitopselektion: die SE-Allele besitzen eine Sequenzgemeinschaft im Bereich der peptidbindenden Grube, welche die Präsentation arthritogener Peptide begünstigen soll. Daher wurden im Folgenden die RA-Patienten nach dem Vorhandensein von RA assoziierten SE-Allelen (S3P und S2) [Gourraud et al., 2007] stratifiziert. Zur Bestimmung der vorliegenden SE-Allele wurde die entsprechende Region in der genomischen DNA jedes Patienten sequenziert. Abbildung 4.8 zeigt beispielhaft drei Elektropherogramme von unterschiedlichen HLA-DRB1*04 homozygoten Patienten. Jeder trug eine andere Kombination von SE-Allelen.

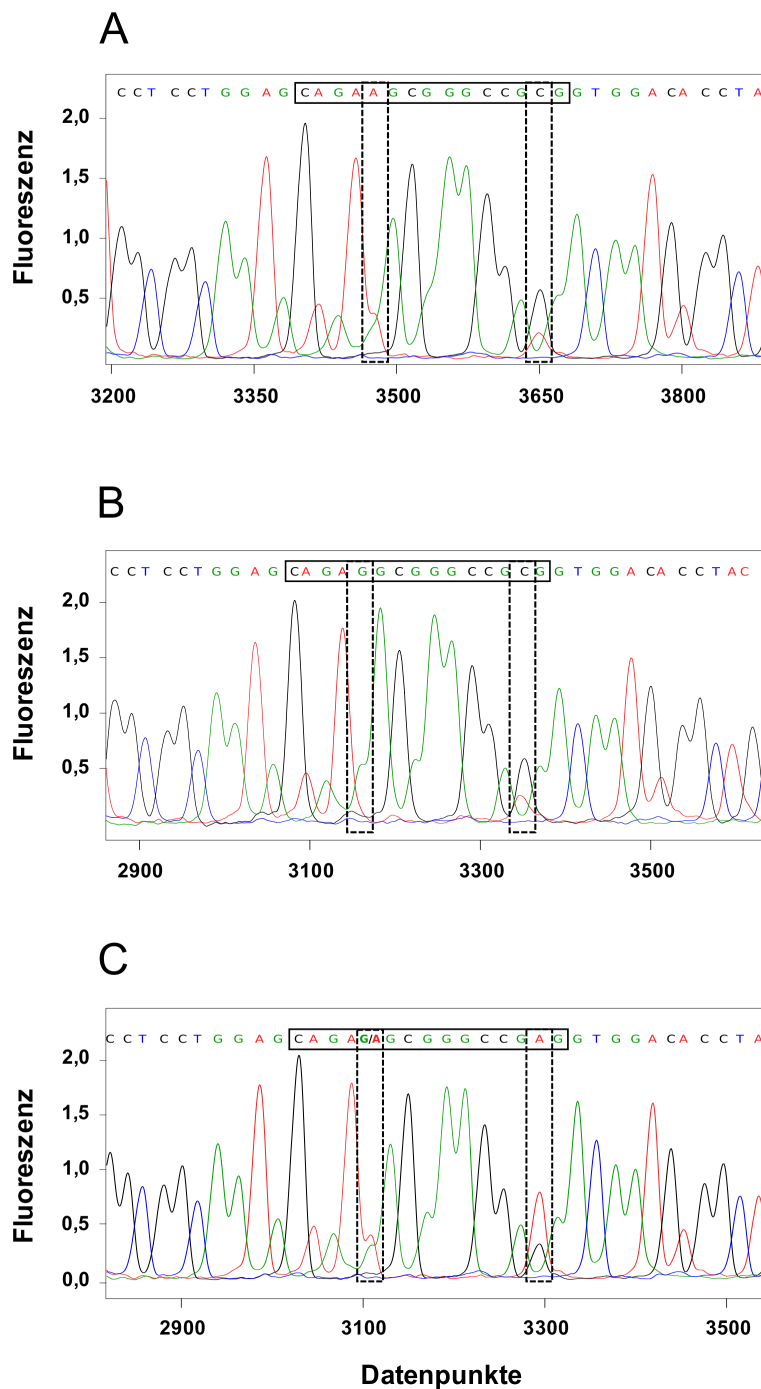


Abbildung 4.8: Elektropherogramme von drei unterschiedlichen SE-Allelkombinationen in RA Patienten, die homozygot für HLA-DRB1*04 typisiert wurden. (A) Patient 06 (S^2/S^2), (B) Patient 24 (S^{3P}/S^{3P}), (C) Patient 60 (S^2/x). Geschlossene Boxen kennzeichnen den Bereich des SE, unterbrochene Boxen zeigen die Stellen der Sequenzvariabilität.

Zum Vergleich der Subklassentiter der ACPAs wurden die Patienten in drei Gruppen stratifiziert: X/X ($n = 6$), SE/X ($n = 33$) sowie SE/SE ($n = 32$) (Abbildung 4.9). Für die Subklasse IgG1 konnte eine Tendenz zu höheren Titern gegen MCV bei den SE homozygoten verglichen mit den heterozygoten Patienten gefunden werden (Mediane: 0,122 vs. 0,076; $p=0,074$). Die CCP-spezifischen IgG1 Antikörper erreichten sowohl in der SE/X - als auch in der SE/SE -Gruppe mit Medianen von 0,79 respektive 0,919 höhere Spiegel als bei den X/X -Seren, die einen Median von 0,378 für die OD aufwiesen. Die p-Werte betragen hier jeweils 0,043 und 0,016. Desweiteren war ein signifikanter Unterschied zwischen CCP spezifischem IgG2 der SE homozygoten vs. heterozygoten Patienten zu verzeichnen mit einer medianen OD von 0,137 gegenüber 0,082 und einem p-Wert von 0,036. Auch konnte ein signifikanter Unterschied der anti-CCP IgG4-Antikörper ($p = 0,45$) zwischen der SE-negativen (Median = 0,076) und homozygot SE (Median = 0,15) Gruppe erkannt werden.

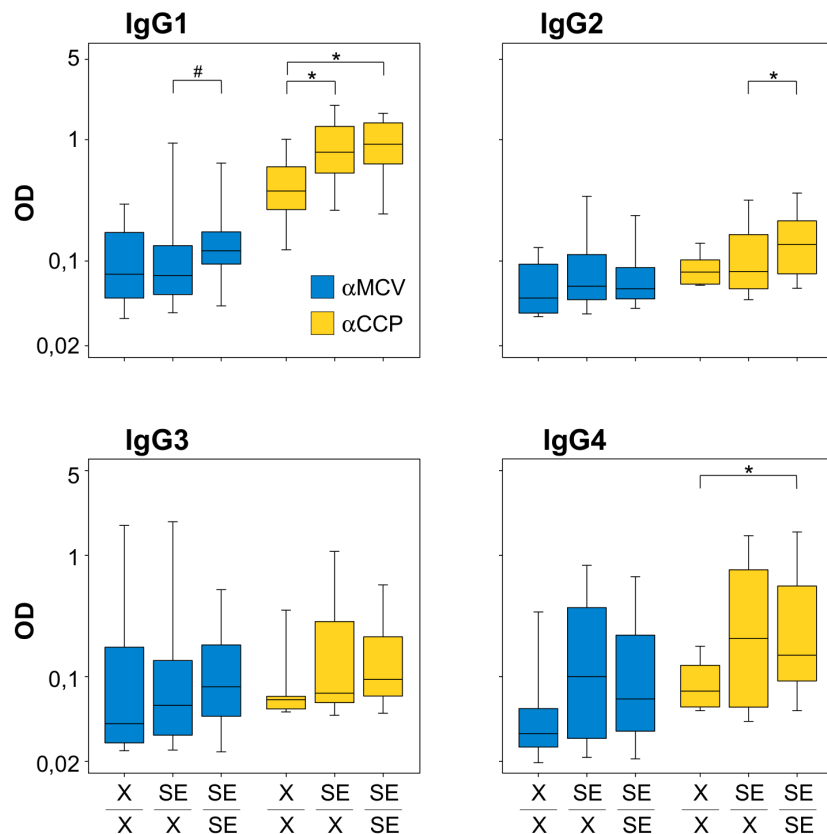


Abbildung 4.9: Das Auftreten von SE Allelen beeinflusst die ACPA Subklassentiter.

Die RA Patienten wurden entsprechend dem Auftreten von SE-Allelen in drei Gruppen eingeteilt und die ACPA Subklassentiter verglichen. (X/X)=6, $n(SE/X)$ =33, $n(SE/SE)$ =32. Die Boxen zeigen das 25%- und 75%-Quantil sowie den Median der ODs für die vier IgG Subklassen. Die Whisker geben das 5% bzw. das 95% Quantil an.

Den Hauptanteil der SE Allele machten in unserer Kohorte erwartungsgemäß die *04 und *01-Allele aus [Fries et al., 2002]. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, welchen Einfluss jedes dieser beiden Allele auf die Subklassentiter hat.

Dazu wurden die Patienten zunächst nach dem Auftreten des HLA-DRB1*04-Haplotyps in drei Gruppen unterteilt: X/X ($n=10$), $DR4/X$ ($n=46$) und $DR4/DR4$ ($n=21$). Zwischen diesen wurden anschließend die Subklassentiter der anti-CCP sowie anti-MCV Antikörper verglichen (Abbildung 4.10). Für IgG1 zeigten sich hier signifikant höhere Titer in der $DR4/DR4$ -Patientengruppe verglichen mit den Patienten, die nur ein einziges DR4-Allel besaßen. Dies galt für Antikörper gegen beide Zielantigene mit Medianen von jeweils 0,08 vs. 0,159 ($p=0,038$) für anti-MCV und 0,745 vs. 1,059 ($p=0,089$) für anti-CCP. Auch beim anti-MCV IgG2 lagen die DR4-Homozygoten mit einem Median

von 0,142 signifikant über den Heterozygoten, welche eine mediane OD von 0,08 aufwiesen ($p=0,02$). Betrachtete man die IgG3 Subklasse, zeigten sich beim Vergleich zwischen $DR4/X$ - und $DR4/DR4$ -Gruppe ebenfalls klare Unterschiede mit Medianen von 0,05 vs. 0,098 für anti-MCV ($p=0,004$) und 0,07 vs. 0,202 für anti-CCP ($p=0,0002$). Auch die Menge an anti-CCP spezifischen IgG3 unter den X/X -Patienten lag mit einer medianen OD von 0,069 unter der $DR4/DR4$ -Gruppe ($p=0,07$). Interessanterweise waren bei den IgG4 Antikörpern gegen beide Zielantigene keinerlei auffällige Unterschiede zu erkennen.

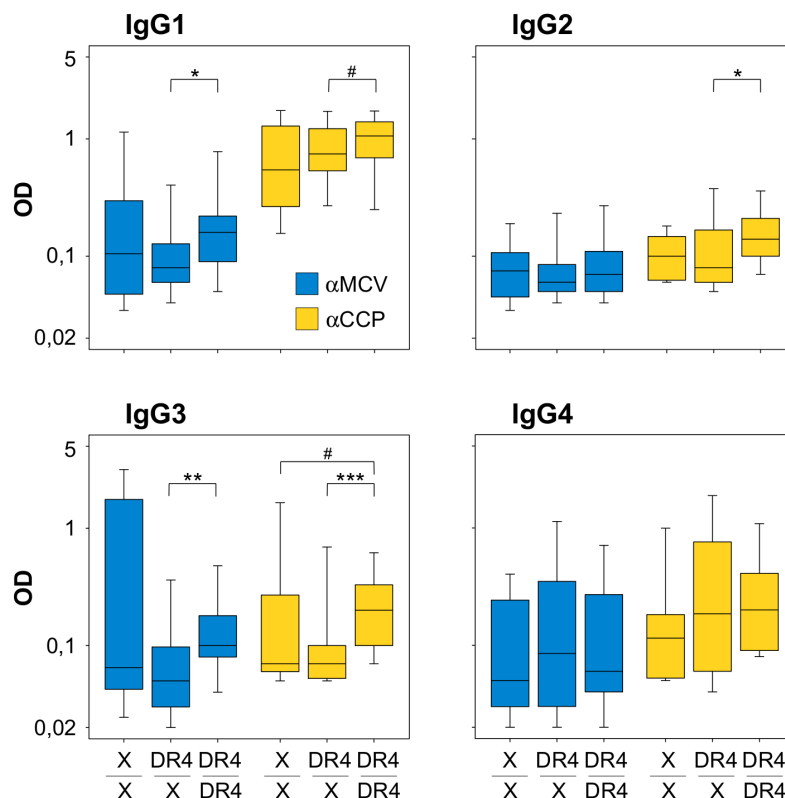


Abbildung 4.10: Die Subklassentiter von IgG1 bis IgG3 sind in DR4 homozygoten Patienten im Vergleich zu den Heterozygoten signifikant erhöht. $n(X/X)=10$, $n(DR4/X)=46$, $n(DR4/DR4)=21$. Die Boxen zeigen das 25%- und 75%-Quantil sowie den Median der ODs für die vier IgG Subklassen. Die Whisker geben das 5% bzw. das 95% Quantil an.

Zuletzt wurden die Patienten nach dem Auftreten von HLA-DRB1*01 gruppiert. Dabei wurden in Abbildung 4.11 nur die Gruppen $DR1/X$ und $DR1/X$ gegenüber gestellt, da lediglich zwei Patienten homozygot für DR1 waren. Hier konnte für keine der IgG Subklassen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

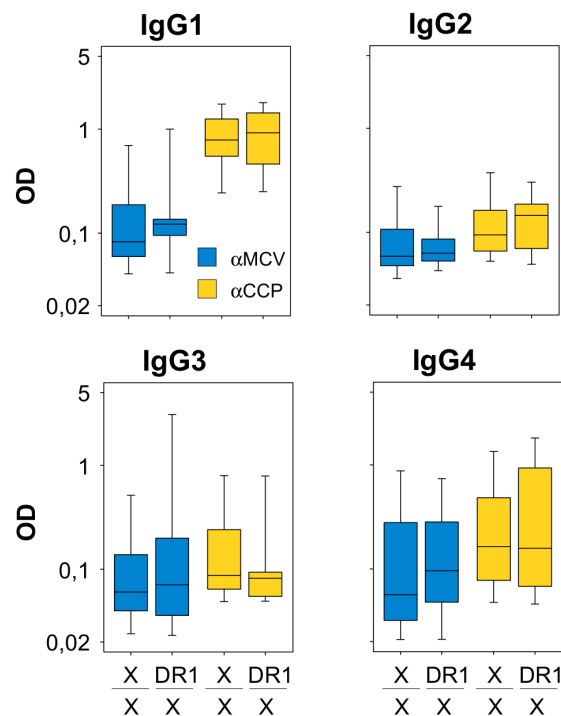


Abbildung 4.11: Das Auftreten von DR1 in RA Patienten korreliert nicht mit erhöhten Subklassentitern. $n(X/x)=60$, $n(DR1/x)=17$. Die Boxen zeigen das 25%- und 75%-Quantil sowie den Median der ODs für die vier IgG Subklassen. Die Whisker geben das 5% bzw. das 95% Quantil an.

Wie hier gezeigt werden konnte, führt das Auftreten von SE Allelen zu erhöhten ACPA Subklassentitern. Dieser Effekt konnte der HLA-DRB1*04-Gruppe zugesprochen werden. Für DR1 konnten keine Unterschiede zwischen DR1-positiven und -negativen Patienten festgestellt werden, obwohl hier ebenfalls eine RA assoziierte SE Sequenz vorliegt. Somit scheint ein Spezifikum bei den Trägern der HLA-DRB1*04 Allelgruppe vorzuliegen, welches unabhängig vom SE mit höheren ACPA Titern korreliert.

4.4.2 Die Frequenz der HLA-DRB4 Spleißvariante ist in ACPA-negativen RA-Patienten erhöht

Ein Spezifikum der allelischen Linie DR53, welche die Allele *04, *07 und *09 einschließt, ist die Existenz des HLA-DRB4 Gens (siehe Abbildung 2.2), dessen Organisation in Abbildung 4.12A dargestellt ist. Das HLA-DRB4 Gen besteht aus sechs

Exons und es ist eine Splicevariante bekannt, bei der ein Einzelnukleotidaustausch in der Spliceakzeptorstelle des ersten Introns zu einem Verbleiben dieser Intronsequenz in der mRNA führt, wodurch kein funktionelles HLA-DRB4 Protein gebildet werden kann. Der Bereich der Splicestelle wurde für die Untersuchung sequenziert. Die drei möglichen Kombinationen sind als Elektropherogramme in Abbildung 4.12 dargestellt.

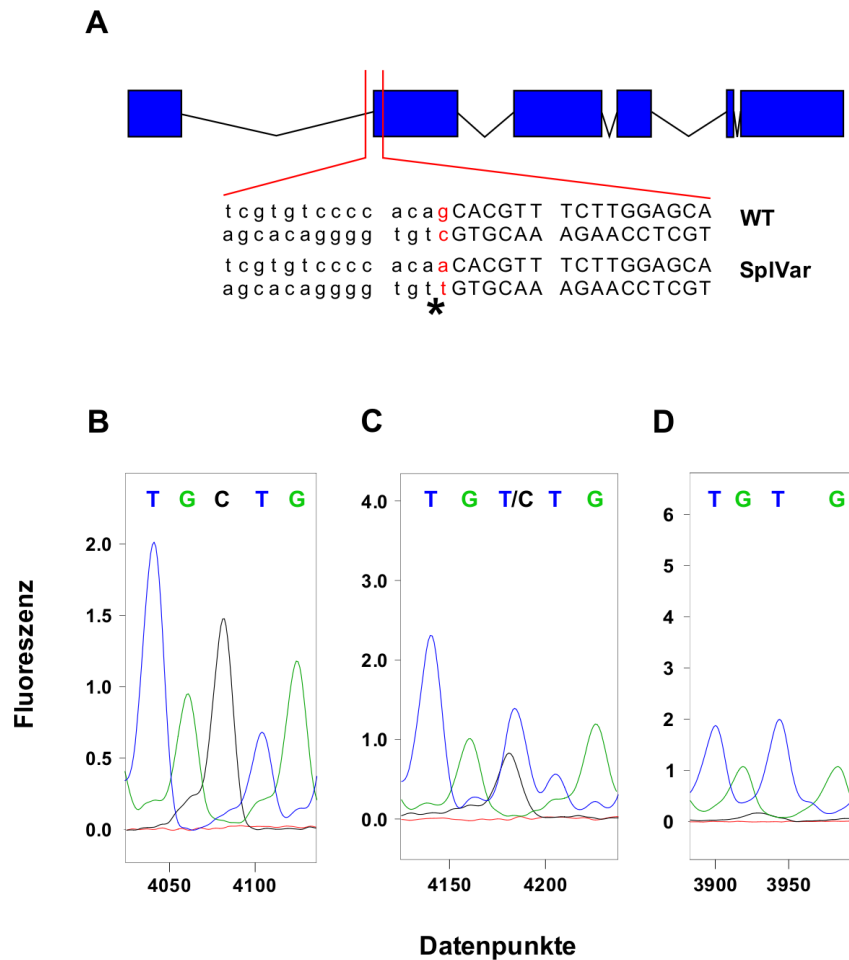


Abbildung 4.12: Elektropherogramme zur Sequenzierung der Spleißvariante. (A) proportionale Organisation des HLA-DRB4 Gens (Exon vierfach stärker, Introns entsprechend geringer gewichtet), Stern - 3'-Spleißstelle. (B) Patient 20.067 (homozygot WT), (C) Patient 77 (heterozygot), (D) Patient 108 (homozygot SplVar).

Anschließend wurde für alle *04, *07 und *09-Allele die Anzahl der Splicevarianten bestimmt. Unter den CCP-positiven RA Patienten wurden vier Spleißvarianten nach-

gewiesen, 99 Allele entsprachen der Wildtypausprägung. Von den CCP-negativen besaßen ebenfalls vier die Spleißvariante, jedoch nur 17 Allele die normal exprimierte Variante. Somit ist die Spleißvariante in den CCP-negativen Gruppe mit einer Odds Ratio von 5,7 überrepräsentiert ($p = 0,028$, 95% Konfidenzintervall: 0,97 - 33,8).

4.5 Funktionelle Aspekte von IgG4

IgG4 ist für funktionelle Studien eine sehr interessante Subklasse. Es besitzt zum einen die Fähigkeit zum Fab-Arm-Austausch, wodurch es monovalent werden kann und die Bildung von Immunkomplexen behindert. Zum anderen ist es unter den ACPAs in Frequenz und Titer gegenüber IgG2 und IgG3 erhöht. Im Folgenden soll der Effekt von IgG4 in Immunkomplexen auf die Apoptose von B-Zellen untersucht werden. Die Apoptose autoreaktiver B-Zellen ist für die periphere Toleranzinduktion von Bedeutung. In diesem Prozess bilden Immunkomplexe einen negativen Rückkopplungsmechanismus besonders auf Plasmazellen, in denen durch die Aktivierung des $Fc\gamma RIIb$ der gerichteten Zelltod ausgelöst wird. Darüber hinaus soll der Einfluss von IgG4 in Immunkomplexen auf die Aktivierung von Neutrophilen untersucht werden. Mit beiden Versuchsansätzen soll die Frage untersucht werden, ob und an welcher Stelle ACPAs der IgG4-Subklasse eine Rolle bei der Pathogenese der RA einnehmen könnten.

4.5.1 Aufreinigung von IgG und IgG1/4

Zur Gewinnung von IgG1 und IgG4 aus dem Serum von Allergie-Patienten wurde zunächst Gesamt-IgG über eine Protein A Säule gewonnen, aus diesem dann die IgG1 bzw. IgG4-Fraktion. Dazu wurde zunächst IgG4 affinitätschromatographisch aufgereinigt, anschließend aus dem Durchlauf (IgG4-negative Fraktion) das IgG1 gewonnen. Abbildung 4.13 zeigt das Chromatogramm einer IgG-Isolation.

Fraktionen à 2 ml wurden ab Beginn der Probenauftragung gesammelt und die Proteinmenge (Absorption bei 280 nm) bestimmt. Für die IgG Gewinnung der Probe A_08_w wurden 2,7 ml Serum eingesetzt. Mit zwei Fraktionen Verzögerung ist das erste Serumprotein im Durchfluss messbar. Nach der Applikation der verdünnten Serumprobe wurde solange gewaschen bis die Proteinkonzentration gegen Null ging (Fraktion 12). Anschließend wurde das Protein A-gebundene IgG in den Fraktionen 13-15 eluiert, neutralisiert und dialysiert. Die Ausbeute an IgG betrug schließlich 34,5 mg (Erwartungswert: 34 mg IgG bei einer mittleren Serumkonzentration in Er-

wachsenen von 12,5 mg/ml [Janeway et al., 2002]). Die Menge des gewonnenen IgG4 aus den IgG-Isolaten entsprach nach der Dialyse und dem Konzentrieren des Dialysats ebenfalls den Erwartungswerten von 0,08 mg/ml Serum bis 1,4 mg/ml Serum.

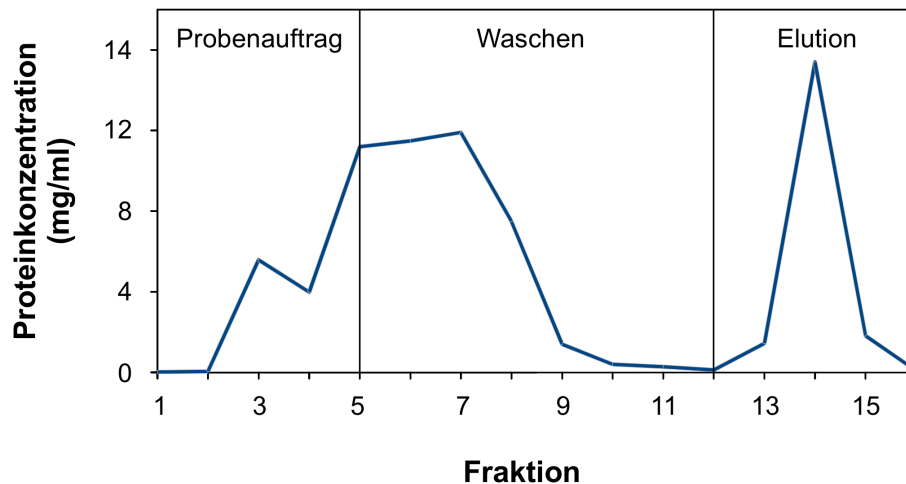


Abbildung 4.13: Chromatogramm einer Aufreinigung von IgG aus dem Allergiepatienten A_08_w). Aufgetragen ist die Proteinmenge in den konsekutiven Fraktionen im Verlauf der drei Phasen der Affinitätschromatographie.

Als nächstes wurden die gewonnenen IgG1- und IgG4-Fractionen auf Reinheit sowie Bindungsfähigkeit überprüft. Dazu wurde ein ELISA durchgeführt, bei dem das jeweilige Allergen an die ELISA-Platte absorbiert und anschließend die Isolate inkubiert wurden. Detektiert wurde mit den subklassenspezifischen Antikörpern gegen IgG1 und IgG4 (Tabelle 3.2). Abbildung 4.14 zeigt die Mengen an allergenspezifischen IgG1 und IgG4 in den Isolaten. Die mittlere OD für IgG1 in den IgG1-Isolaten betrug 0,69, für IgG4 in der IgG1-Fraktion lediglich 0,02. In keinem der IgG1-Isolate konnten substantielle Mengen an Verunreinigungen durch IgG4 gefunden werden. Die mittlere OD für IgG4 in den IgG4-Isolaten betrug 0,72, für IgG1 konnte hier ein Mittelwert von 0,11 ermittelt werden. Der Anteil an IgG4 betrug 86,7% im Vergleich zum mittleren Anteil von IgG4 am Gesamt-IgG im Serum von 3,7%. Auffällig sind hier die Bienengift-spezifischen Subklassen der Probe A_09: In dieser sind sehr große Mengen an allergenspezifischem IgG4, jedoch kaum IgG1 enthalten.

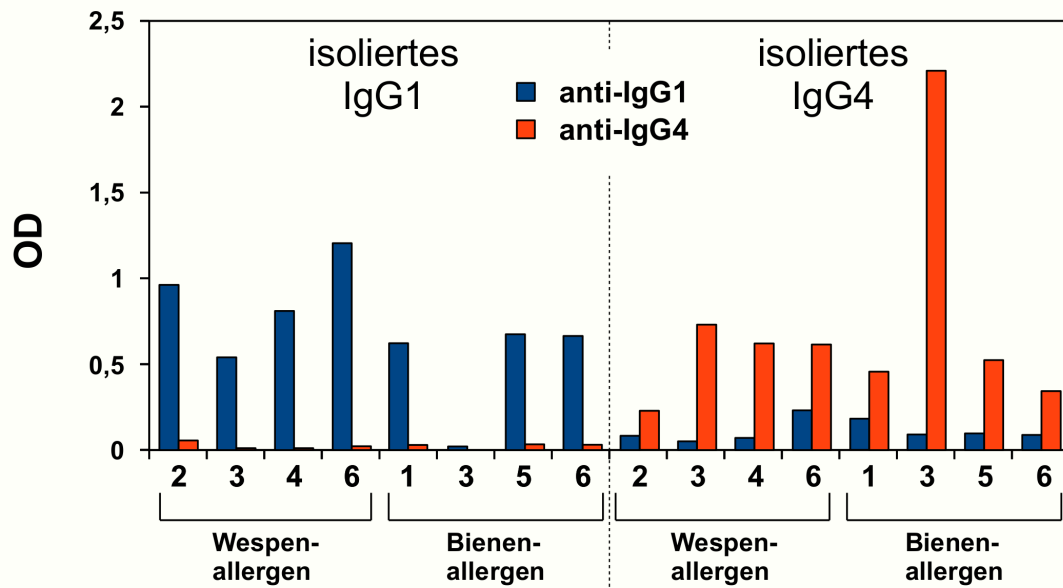


Abbildung 4.14: Überprüfung von Reinheit und Bindungsvermögen der isolierten IgG1 (links) und IgG4 Fraktionen (rechts) aus dem Serum von Allergie-Patienten. Die Isolate wurden auf einer Allergen-beschichteten ELISA-Platte inkubiert und mit peroxidasegekoppelten Antikörpern gegen IgG1 bzw. IgG4 entwickelt. Angegeben ist die mittlere OD einer Doppelbestimmung.

4.5.2 IgG4 verhindert die Bildung von Immunkomplexen

Im nächsten Schritt wurden Immunkomplexe *in-vitro* aus den isolierten IgG1- und IgG4-Antikörpern mit dem jeweils spezifischem Allergen generiert. Um die Bildung von Immunkomplexen zu überprüfen, wurden diese mittels ELISA detektiert. Zu bedenken ist dabei, dass die Wespen- bzw. Bienenallergen spezifischen Antikörper nur einen geringen Teil aller isolierten Immunglobuline ausmachen.

In Abbildung 4.15A ist der Nachweis der spezifischen Immunkomplexe für die IgG1-Aufreinigungen von Allergiepatient 5 und 6 dargestellt. Vier Mischungsverhältnisse von IgG1 und dem spezifischem Allergen wurden ausgetestet, um den Punkt der optimalen Immunkomplexbildung zu bestimmen. Mit dem isolierten IgG1 von Patient 6 konnten in den ersten beiden Verhältnissen Immunkomplexe detektiert werden. Die OD für die Komplexe aus Wespenallergen und isoliertem IgG1 lag hier im Mittel um 0,08 höher als bei der PBS Kontrolle. Für die Probe des Patienten 5 konnten bei jedem getesteten Mischungsverhältnis Immunkomplexe mit einem mittleren

OD-Unterschied zur PBS-Kontrolle von 0,05 nachgewiesen werden. Immunkomplexe ließen sich also aus dem isolierten IgG1 und sowohl Bienen- als auch Wespengift generieren.

Der entsprechende Test mit IgG4 wies jedoch bei keinem der Mischungsverhältnisse Immunkomplexe auf (Abbildung 4.15B). Daher wurde für das nächste Experiment IgG1 und IgG4 zu gleichen Teilen verwendet (Abbildung 4.15C, links). Hier konnten klar Immunkomplexe generiert werden. Die OD für die spezifischen Immunkomplexe lag durchschnittlich 0,07 über der PBS-Kontrolle. Zusätzlich wurde die Bildung von Komplexen von IgG4 des Patienten 6 durch Inkubation mit einem Gemisch beider Antigene analysiert. Auch hier fanden sich keine Immunkomplexe (Abbildung 4.15C, rechts).

Als Kontrolle wurden Immunkomplexe aus den isolierten IgG1- bzw. IgG4-Antikörpern durch Hitzeeinwirkung generiert. Hier konnte ein größerer Anteil an Immunkomplexen bestimmt werden, denn die Zusammenlagerung erfolgte - im Gegensatz zu den spezifischen Immunkomplexen - unabhängig von der Spezifität der Antikörper. Entsprechend war der Unterschied zwischen den hitzebehandelten und naiven Proben mit einem Mittel von 0,11 größer als bei den spezifischen Immunkomplexen.

Bisher konnte gezeigt werden, dass nach der Affinitätschromatographie die IgG1- und IgG4-Fractionen bindungsfähige Antikörper entsprechender Reinheit enthielten und auch Immunkomplexe gebildet werden konnten.

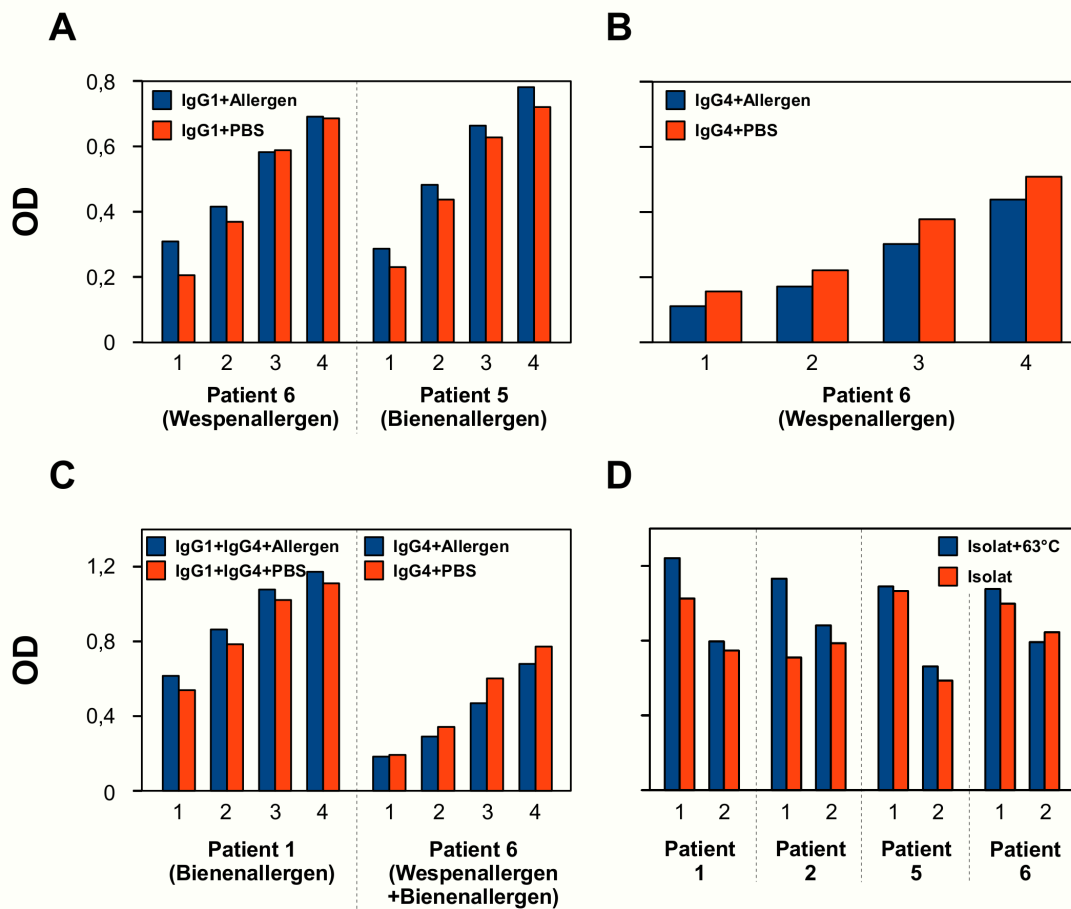


Abbildung 4.15: IgG4 verhindert die Bildung von Immunkomplexen *in-vitro*. (A) Immunkomplexe wurden aus verschiedenen Mischungsverhältnissen von isolierten IgG1 und Allergenlösung bzw. PBS gebildet (1 - 1 μ l:19 μ l Allergen bzw. PBS, 2 - 2 μ l:18 μ l, 3 - 5 μ l:15 μ l, 4 - 10 μ l:10 μ l). Nach zwei Stunden Inkubation wurden die Immunkomplex-Lösungen im C1q-ELISA analysiert und die mittlere OD aus zwei Replikaten berechnet. (B) Immunkomplexe wurden aus verschiedenen Mischungsverhältnissen von IgG4-Isolat und Allergenlösung bzw. PBS erzeugt und wie unter (A) bestimmt. (C, links) Immunkomplexe wurden aus verschiedenen Mischungsverhältnissen von IgG1, IgG4 und Allergenlösung bzw. PBS (1 - 0,5 μ l IgG1 + 0,5 μ l IgG4 + 19 μ l Allergen bzw. PBS, 2 - 1 μ l + 1 μ l + 18 μ l, 3 - 2,5 μ l + 2,5 μ l + 15 μ l, 4 - 5 μ l + 5 μ l + 10 μ l) wie unter (A) gebildet und nachgewiesen. (C, rechts) Immunkomplexe wurden wie unter (A) erzeugt, jedoch mit einem Gemisch aus Wespen- und Bienenallergen (Konzentration jeweils 0,3 mg/ml). Anschließend wurde die Menge an Immunkomplexen wie unter (A) bestimmt. (D) Hitzeaggregierte Immunkomplexe wurden durch Inkubation der angegebenen isolierten Antikörper (1 - IgG1, 2 - IgG4) bei 63°C für eine halbe Stunde erzeugt und die OD im C1q-ELISA bestimmt.

4.5.3 Apoptose von Immunkomplex-stimulierten B-Zell Populationen

Als nächstes wurden B-Zellen aus dem peripheren Blut aufgereinigt, um diese mit den erhaltenen Immunkomplexen zu stimulieren. Dabei kam eine negative Selektionsstrategie zur Anwendung: die Ausgangszellen wurden mit einem Antikörpergemisch inkubiert, das alle Granulozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen markierte. Anschließend wurden diese mit magnetischen Partikeln markiert und im autoMACS in die Positivfraktion eluiert. Die B-Zellen dagegen befanden sich in der durchlaufenden Negativfraktion. Die Abbildung 4.16 zeigt die Anteile der B-Zellen in der Ausgangspopulation ($12 \cdot 10^7$ Zellen) der PBMCs (8,5 % - entsprachen $12 \cdot 10^6$ B-Zellen) sowie in der Positiv- (1,7 % - entsprachen $0,76 \cdot 10^6$ B-Zellen) und Negativfraktion (95,5% - entsprachen $3 \cdot 10^6$ B-Zellen).

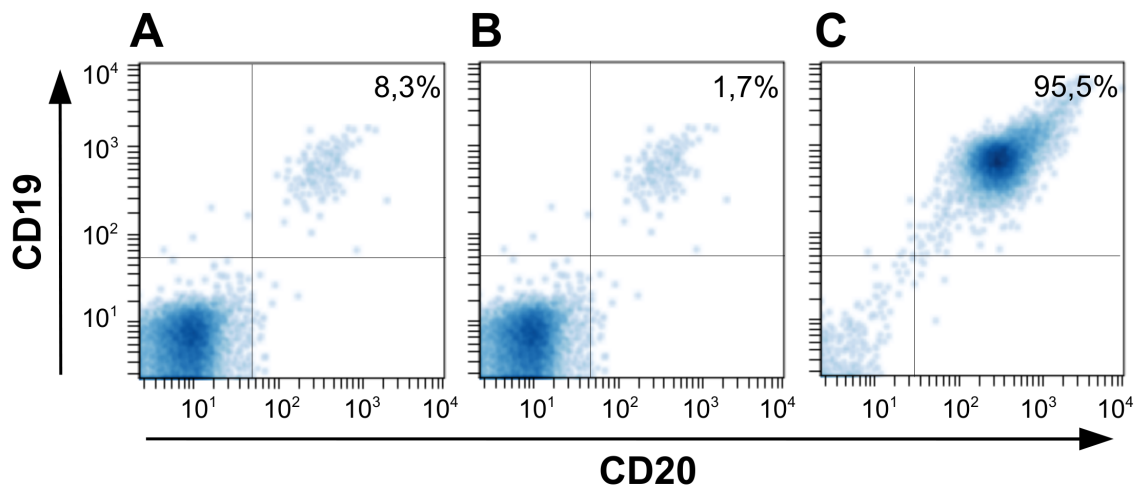


Abbildung 4.16: B-Zellen konnten mit großer Reinheit isoliert werden. B-Zellen der (A) Ausgangspopulation (PBMC) sowie der (B) Positiv- und (C) Negativfraktion nach der autoMACS Isolation wurden mit den B-Zellmarkern CD19 (PE) und CD20 (FITC) markiert und im FACSCalibur analysiert.

Die isolierten Zellen wurden ausplattiert und mit den *in-vitro* generierten Immunkomplexen inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Annexin-V sowie 7-AAD markiert und durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 4.17). Als Positivkontrolle dienten Staurosporin-stimulierte Zellen, die erwartungsgemäß den höchsten medianen Anteil apoptotischer Zellen von 6% aufwiesen. Mit Immunkomplexen aus IgG1 und Bienenallergen konnte jedoch verglichen mit der PBS-Kontrolle keine Apoptose induziert werden. Auch die Stimulation mit IgG1 allein - also ohne Immunkomplexe - führ-

te nicht zum vermehrten Zelltod. Die Mediane lagen hier jeweils bei -1,15% bzw. -0,65%. Einzig die hitzeaggregierten Immunkomplexe aus IgG1 schienen die Anzahl apoptotischer Zellen marginal um 3,2% zu erhöhen. Für das hitzeaggregierte IgG4 lag die Apoptoserate lediglich bei 0,2%, was mit beiden Kontrollen ohne Hitzeaggregation (-HA) vergleichbar war. Hier konnte lediglich eine Steigerung der Apoptose um durchschnittlich 0,3% beobachtet werden. Es zeigte also ein geringer Teil der naiven, peripheren B-Zellen einen erhöhten programmierten Zelltod nach Stimulation mit dem hitzeaggregiertem IgG1, jedoch nicht mit den spezifischen Immunkomplexen. Dieser Effekt konnte nicht bei den IgG4-haltigen Immunkomplexen gesehen werden.

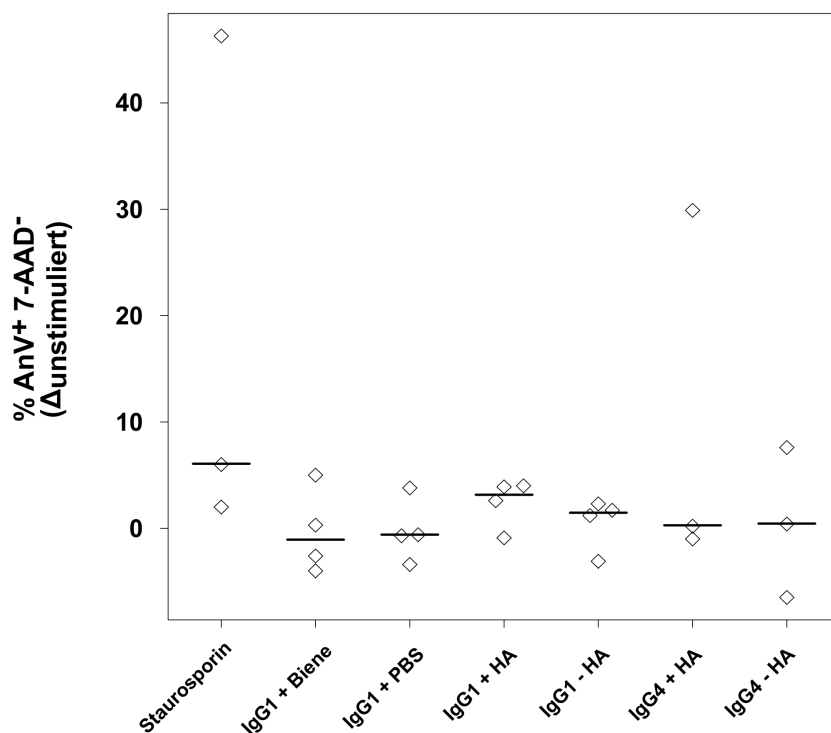


Abbildung 4.17: In einem geringen Teil der naiven, peripheren B-Zellen konnte durch Stimulation mit hitzeaggregiertem IgG1 Apoptose ausgelöst werden, jedoch nicht mit den IgG4-haltigen Immunkomplexen. Dargestellt ist die Differenz des Anteils der apoptotischen B-Zellen (AnV positive, doch 7-AAD negative Zellen) nach 12 Stunden Stimulation mit Immunkomplexen und der Kontrolle mit PBS. Jeder Punkt einer Gruppe entspricht einem biologischen Replikat. Horizontale Linien kennzeichnen den Median.

4.5.4 Aktivierungsstatus von Neutrophilen nach Stimulation mit Immunkomplexen

Zuletzt sollte der Einfluss von Immunkomplexen auf den Aktivierungsstatus von Neutrophilen untersucht werden. Dazu wurden Neutrophile aus dem peripheren Blut gesunder Spender angereichert, ausplattiert und mit den angegebenen Immunkomplexen stimuliert. Anschließend wurde die Phagozytoseaktivität (Abbildung 4.18) sowie die Produktion von ROS (Abbildung 4.19) bestimmt.

Zur Messung der Phagozytose wurden fluoreszierende, BSA-beschichtete Latexpartikel zusammen mit den Immunkomplexen zu den Zellen gegeben. Nach zwei Stunden Inkubation wurde der Anteil phagozytotisch aktiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei wurden nur die Granulozyten anhand der Eigenschaften im Forward- und Sideward-Scatter betrachtet. Die erhaltenen Daten wurden auf die jeweiligen Kontrollen ohne Immunkomplexe (IgG1 ohne Allergen bzw. IgG4/IgG1 ohne Allergen) bezogen. Die Werte der unstimulierten sowie der PMA-behandelten Neutrophilen wurde auf den Mittelwert der oben genannten Kontrollen normalisiert.

Wie erwartet wiesen die unstimulierten Neutrophilen im Median keine Erhöhung der Phagozytoseaktivität auf (0,9-fach), wohingegen PMA einen Anstieg um das 3,5-fache auslöste. Die Immunkomplexe aus IgG1 und Bienen- bzw. Wespenallergen zeigten eine um das 1,7- bzw. 3,3-fache gesteigerte Phagozytose. Bientoxin allein induzierte die Aufnahme der Latexpartikel nicht (1,12-fach). Auch das Wespenallergen sorgte durchschnittlich lediglich für einen 1,23-fachen Anstieg der Phagozytose. Schlossen die Immunkomplexe IgG4 mit ein, so reduzierte sich die Partikelaufnahme durch die Neutrophilen im Median auf 0,65- bzw. 1,68-fach für Bienen- bzw. Wespenallergen. IgG4 in den Immunkomplexen reduzierte demnach die Phagozytose von Neutrophilen verglichen mit den Immunkomplexen, die ausschließlich IgG1 enthielten.

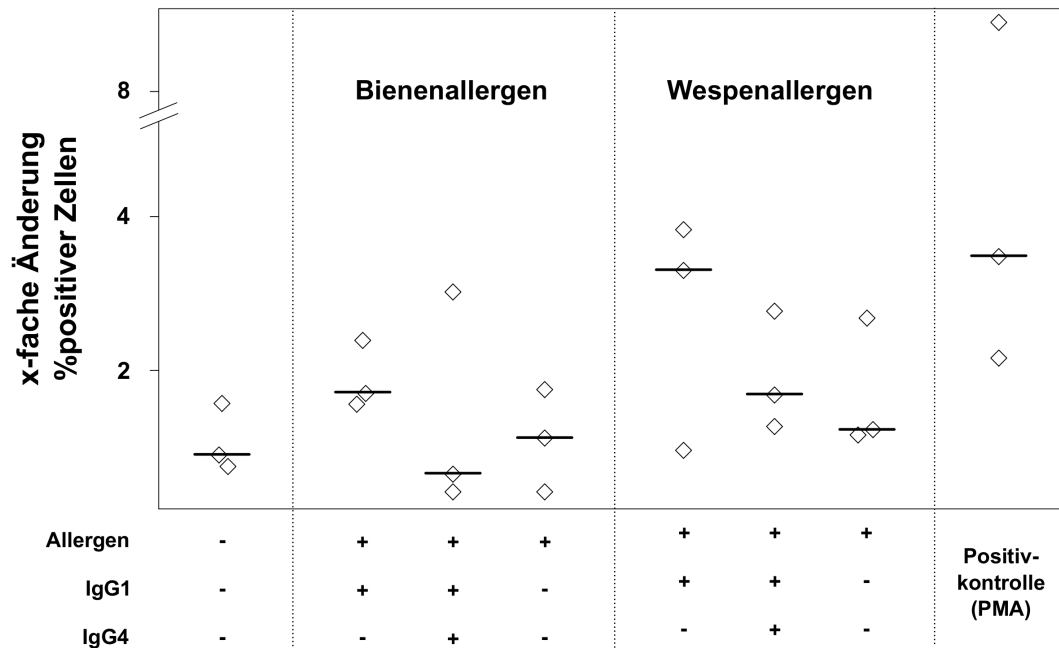


Abbildung 4.18: Das Vorhandensein von IgG4 in Immunkomplexen reduziert die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen. Neutrophile wurden mit den angegebenen Immunkomplexen versetzt und der Anteil phagozytotisch aktiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Daten wurden auf die jeweiligen Kontrollen ohne Immunkomplexe (IgG1 ohne Allergen bzw. IgG4/IgG1 ohne Allergen) bezogen. Die Werte der unstimulierten sowie der PMA-behandelten Neutrophilen wurde auf den Mittelwert der genannten Kontrollen normalisiert. Jeder Datenpunkt einer Gruppe entspricht einem biologischen Replikate. Die horizontalen Linien geben den Median wieder.

Als zweites Maß für die Aktivierung von Neutrophilen sollte der Einfluss von IgG4 in Immunkomplexen auf die Produktion von ROS untersucht werden. Dazu wurde den Zellen nach einer Stunde Inkubation mit den Immunkomplexen DHR zugefügt und die MFI durchflusszytometrisch bestimmt. Auffällig ist hier die starke ROS-Induktion durch das Bienenallergen, welche im Median 1,36-fach höher lag als in den Kontrollen ohne Immunkomplexe. Die Bindung des Allergens in IgG1-Immunkomplexen sorgte dagegen für eine nahezu vollständige Blockade der ROS-Produktion, welche hier lediglich 1,1-fach erhöht war. Beinhalteten die Immunkomplexe IgG4, so wurde das Bienenallergen nur teilweise neutralisiert und konnte ROS noch um das 1,16-fache induzieren. Für das Wespenallergen wurde ein solcher Effekt nicht beobachtet. Hier lag die ROS-Induktionen mit Medianen von 0,98-, 0,99- und 1,07-fach in allen Ansätzen sehr

niedrig und waren mit der PBS-Kontrolle (1,02-fach) vergleichbar. Die Stimulation mit Immunkomplexen führte also nicht zu einer verstärkten Aktivierung von ROS, doch es konnte gezeigt werden, dass IgG4 eine geringere Kapazität besitzt, Antigen zu neutralisieren.

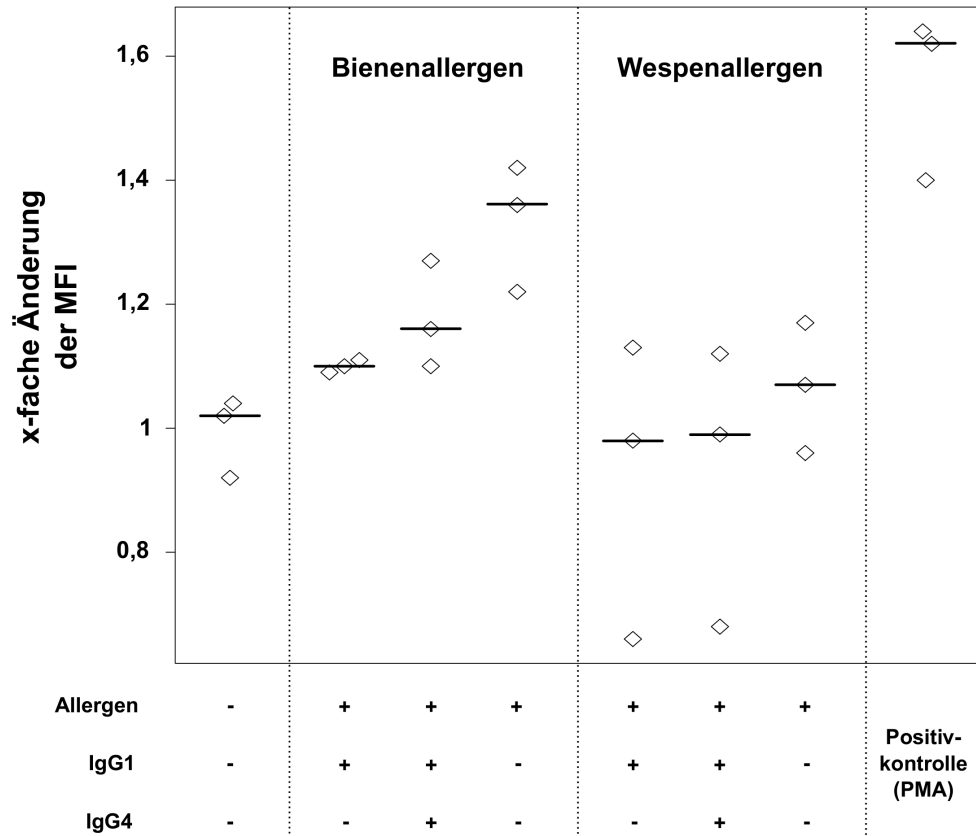


Abbildung 4.19: IgG1-Immunkomplexe neutralisieren Bientoxin besser als IgG4-haltige Immunkomplexe. Neutrophile wurden mit den angegebenen Immunkomplexen versetzt und die produzierte Menge an ROS durchflusszytometrisch bestimmt. Die Daten wurden auf die jeweiligen Kontrollen ohne Immunkomplexe (IgG1 ohne Allergen bzw. IgG4/IgG1 ohne Allergen) bezogen. Die Werte der unstimulierten sowie der PMA-behandelten Neutrophilen wurde auf den Mittelwert der genannten Kontrollen normalisiert. Jeder Datenpunkt einer Gruppe entspricht einem biologischen Replikat. Die horizontalen Linien geben den Median wieder.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Subklassenantwort der ACPAs gegen zwei verschiedene citrullinierte Zielantigene analysiert. In unserer 127 RA Patienten umfassenden Studienkohorte betrug der Anteil anti-CCP positiver Patienten 74%. Dies ist geringfügig höher als die in der Literatur angegebenen Werte von 55% bis 72% [Engelmann and Müller-Hilke, 2009; Mathsson et al., 2008]. Aufgrund des bekannten Zusammenhangs von ACPA-Positivität mit einem schwereren Krankheitsverlauf sind auch die erhöhten Durchschnittswerte der Krankheitsparameter DAS28, CRP und BSG erklärbar. Hinsichtlich des Alters, der Krankheitsdauer und der Geschlechterverteilung sind die hier akquirierten RA-Patienten mit anderen Studien vergleichbar [Dejaco et al., 2006; Bos et al., 2009].

5.1 Die Subklassen der Autoantikörper gegen MCV und CCP

In früheren Untersuchungen konnte bereits eine Korrelation zwischen den anti-CCP und anti-MCV Titern für IgG gezeigt werden [Bang et al., 2007; Mathsson et al., 2008]. Die vorliegende Arbeit dehnt das vorhandene Wissen auf die IgG Subklassen aus. Hier konnte eine signifikante Korrelation zwischen den anti-CCP und anti-MCV Titern für jede der vier IgG Subklassen demonstriert werden. Es stellte sich die Frage, worauf dieser Zusammenhang beruht. Zwei Szenarien sind dabei vorstellbar: zum einen könnten die aktivierten, reifen B-Zellen einer ähnlichen Mikroumgebung und damit einer ähnlichen Stimulation ausgesetzt sein, was letztlich zur Etablierung einer vergleichbaren Subklassenverteilung führt. Zum anderen könnten beide Antikörperpopulationen die gleichen Epitope erkennen. Demnach würden also CCP-spezifische Antikörper auch an MCV binden und umgekehrt. Beide Szenarien wurden hier untersucht.

In den ersten Experimenten konnte gezeigt werden, dass IgG1 und IgG4 in Frequenz und Titer die dominierenden Subklassen sowohl der anti-CCP als auch der anti-MCV Antikörper in RA Patienten darstellten. Während IgG1 allgemein die häufigste IgG Subklasse ist, sind die im Vergleich zu IgG2 und IgG3 erhöhten IgG4 Titer außer-

gewöhnlich. Bisher wurde die Subklassenverteilung von ACPAs nur in einer Studie untersucht [Chapuy-Regaud et al., 2005]. In dieser wurde jedoch citrulliniertes Fibrin als Zielantigen verwendet und keines der standardisierten Antigene, die im CCP- oder MCV-Test Anwendung finden. Die Antikörper gegen citrulliniertes Fibrin wiesen ebenfalls eine Subklassenverteilung von IgG1 > IgG4 > IgG3 > IgG2 auf.

In Publikationen anderer Autoren zu den ACPAs wurden unterschiedliche Serumverdünnungen bei der Messung der Subklassen verwendet, wodurch die dominierenden Subklassen nicht bestimmt werden konnten. Eine Arbeit verfolgte die Subklassentiter der ACPAs in Patienten, die aus einer undifferenzierter Arthritis eine RA entwickelten [Verpoort et al., 2006]. Dabei zeigten die Autoren, dass beim Übergang zur etablierten RA ein vermehrter Klassenwechsel stattfand und damit mehr Immunglobulinklassen unter den ACPAs gefunden werden konnten. Außerdem demonstrierten die Autoren, dass sieben Jahre nach der RA-Diagnose die Titer von IgG2, IgG3 und IgG4 signifikant gesunken waren. Anders in den eigenen Analysen zum Einfluss der Krankheitsdauer auf die Subklassentiter. Hier konnte ein Absinken der anti-CCP und anti-MCV Titer mit zunehmender Erkrankungsdauer lediglich für IgG4 gefunden werden. Außerdem veränderte sich die Anzahl der vorhandenen Subklassen nicht. Eine mögliche Erklärung für das Absinken der Subklassentiter für IgG4 zeigt eine Studie von Bos und Kollegen auf. Sie demonstrierten eine Abnahme der anti-CCP Titer, besonders der IgG4 Subklasse, bei RA-Patienten unter anti-TNF α -Therapie [Bos et al., 2009]. Somit ist davon auszugehen, dass die in meiner Arbeit gefundene negative Korrelation zwischen den ACPAs der IgG4-Subklasse mit der Erkrankungsdauer ebenfalls auf die Behandlung zurückzuführen ist. Allerdings erfolgte die Serumnahme in den hier untersuchten RA-Patienten vor der Gabe von Biologika. Somit wäre die Reduktion von IgG4 auf die Basistherapie, z.B. mit Methotrexat, zurückzuführen.

Betrachtet man andere Autoimmunerkrankungen, so treten erhöhte IgG4 Titer auch bei den ANCA in der Wegener Granulomatose [Holland et al., 2004] und bei anti-dsDNA Antikörpern im Sjögren Syndrom auf [Blanco et al., 1992]. Dagegen überwiegen die Subklassen IgG2 und IgG3 bei den anti-dsDNA Antikörpern in Patienten mit Systemischen Lupus Erythematosus [Blanco et al., 1992]. In der hier untersuchten RA-Patientenkohorte scheint die Antikörperantwort in Richtung IgG1 und IgG4 spezifisch für die ACPAs zu sein und keine generelle Tendenz zum IgG4 Klassenwechsel vorzuliegen. Das belegt zum einen, dass die Gesamtserumspiegel der Normalverteilung von IgG1 > IgG2 > IgG3 > IgG4 folgen. Zum anderen ist die IgG4 Subklasse unter den spezifischen Antikörpern gegen das verbreitet vorkommende *Varicella zoster*-

Virus vernachlässigbar. Da sowohl anti-MCV als auch anti-CCP eine vergleichbare Subklassenverteilung zeigen, kann dies als Hinweis dafür interpretiert werden, dass die jeweiligen aktivierten B-Zellen entweder lokal im Pannus oder im Zuge ihrer Differenzierung vergleichbaren Stimuli ausgesetzt sind. Ob allerdings ektopische Keimzentren, wie sie im Pannusgewebe der RA Patienten beschrieben wurden [Magalhaes et al., 2002], diese Umgebung bieten können oder ob Autoantikörper-produzierende Plasmazellen zentral generiert werden, bietet auch heute noch Diskussionsstoff. Im Hinblick auf die Etablierung der ACPA Antwort sprechen erhöhte IgG4 Titer bei der RA für das Wirken einer T_H2 Mikroumgebung [Stavnezer, 1996]. Dies stellt eine bisher vernachlässigte Komponente bei der Pathogenese der RA dar. Jedoch spielen auch andere Faktoren bei der Ausbildung einer bestimmten Subklassenantwort eine Rolle. So beeinflusst die Art und Menge des Antigens sowie der Ort des Auftretens den Klassenwechsel [Stavnezer, 1996]. Ob diese Komponenten im Kontext der RA ebenfalls an der Ausbildung dieser spezifischen Subklassenverteilung beteiligt sind, könnte einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Studien bieten.

5.2 Die Kreuzreaktivität von MCV spezifischen Autoantikörpern gegen CCP subklassifiziert RA Patienten

Neben der gemeinsamen Regulation sollten auch die gegenseitigen Kreuzreaktivitäten beider ACPA-Populationen untersucht werden. In der Tat konnte hier für eine Untergruppe der RA Patienten eine Erkennung von CCP durch MCV-spezifische Autoantikörper gezeigt werden. Es kann zwar nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, dass sich einige Antikörper nach dem Elutionsprozess nicht vollständig zurückfalteten, so erlangte doch ein Großteil der Antikörper seine Bindungsfähigkeit zurück. Die Korrelation der anti-CCP und anti-MCV Titer scheint also auf ein Zusammenspiel von gemeinsamer Regulation und Kreuzreaktivität zurückzugehen.

Während im CCP-Test zwei citrullinierte, vom Filagrin abgeleitete Peptide genutzt werden, die auf maximale Spezifität und Sensitivität für die RA Diagnose optimiert sind, enthält das MCV als natürliches Antigen viele verschiedene Citrullinierungsstellen. Im Vimentin können 43 Argininreste gefunden werden, von denen zehn Citrullinierungsstellen experimentell bestätigt wurden [Bang et al., 2007]. Der geringe Abstand von 17 dieser Argininreste legt nahe, dass hier mehr als eine Citrullinierungsstelle innerhalb eines B-Zell Epitops vorliegen können. Im Falle einer partiellen Citrullinierung erhöht sich die Anzahl der möglichen Epitope nochmals. Es ist da-

her anzunehmen, dass MCV eine größere Zahl von Autoantikörpern binden kann als CCP. Dafür spricht ebenfalls die geringfügig höhere Sensitivität des MCV Assays bei der Diagnose der RA gegenüber dem CCP [Mathsson et al., 2008].

Die hier vorliegenden Daten zur Kreuzreaktivität unterstützen dieses Konzept weiter. Während lediglich zwei CCP-Isolate signifikant an MCV binden, erkennen MCV-spezifische Autoantikörper in der Hälfte der 18 untersuchten Patientenserum ebenfalls CCP. Darüber hinaus ist die Bindung von anti-MCV an CCP sogar stärker als an MCV selbst. Es erkennen also entweder alle der MCV-Antikörper auch CCP oder nur ein Teil. In jedem Fall ist die Summe der Affinitäten gegen CCP höher als gegen MCV. Betrachtet man dagegen ausschließlich die IgG4 Subklasse, welche aufgrund des Fab Arm Austausches monovalent sein kann, so zeigt sich in den kreuzreagierenden Proben in der Tat eine geringere Affinität.

Desweiteren legen die Ergebnisse eine Subklassifizierung der ACPA positiven Patienten in eine Gruppe mit breitem und eine mit begrenztem Erkennungsspektrum der anti-MCV Antikörper nahe. Bisher konnten jedoch keine Unterschiede hinsichtlich klinischer Parameter oder SE Status zwischen beiden aufgespürt werden. Doch es bleibt in einer größeren Kohorte zu analysieren, ob sich beide Gruppen im Krankheitsverlauf bzw. Therapieresponse unterscheiden.

5.3 Der Effekt von HLA-DRB Allelen auf die Subklassenspiegel der ACPA

Es konnte in mehreren Studien demonstriert werden, dass das Vorhandensein von SE-Allelen die Ausbildung einer RA begünstigt [Morgan et al., 2008; Hughes et al., 2008]. Allerdings ist bekannt, dass nicht alle SE-Allele das gleiche Risiko vermitteln und mit verschiedenen Krankheitsentitäten der RA verbunden sind. So konnte gezeigt werden, dass Raucher mit SE-Allelen ein besonders hohes Risiko besitzen, eine ACPA-positive RA zu entwickeln [van der Helm-van Mil et al., 2007]. Dagegen konnte dieser Zusammenhang für die ACPA-negative RA nicht bestätigt werden. In diesem Fall ist eine Assoziation mit HLA-DRB1*03 gegeben [Irigoyen et al., 2005].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von HLA-DRB1*04 und *01 - als SE-tragende Allele - auf die Subklassentiter der ACPAs untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das Auftreten des SE am auffälligsten mit einem erhöhten IgG1-Spiegel einhergeht. Für HLA-DRB1*04 stellte sich eine Assoziation mit erhöhten APCA Titern der IgG1- und IgG3-Subklasse heraus. Dies belegt, dass HLA-DRB1*04 vor allem die

T_H1-Komponente der RA verstärkt. Obwohl das HLA-DRB1*01-Allel ebenfalls das SE trägt, hatte es dagegen keinen Einfluss auf die Subklassentiter der ACPAs. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass sich die jeweiligen SE-Allele im Beitrag zur Pathogenese unterscheiden.

Die mit dem Auftreten von HLA-DRB1*04 assoziierten Subklassen IgG1 und IgG3 besitzen ein starkes Potential zur Aktivierung des klassischen Komplementsweges [Janeway et al., 2002]. Desweiteren konnten citrulliniertes Fibrinogen enthaltende Immunkomplexe in der Hälfte der ACPA-positiven RA-Patienten sowohl im Serum als auch im Synovium nachgewiesen werden. Diese kolokalisierten mit der Komplementkomponente C3, was für eine aktive Beteiligung an der Synovitis spricht [Zhao et al., 2008]. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Serum von RA-Patienten einen zytotoxischen Effekt auf Chondrozyten ausübt [Mettal et al., 1992] und die Komplementkomponente C1s direkt kollagenolytisch wirken kann [Nakagawa et al., 1999]. Zusammengefasst lässt sich also ein neues Modell postulieren, welches eine mechanistische Erklärung für die Assoziation zwischen dem Auftreten von SE-Allelen und einem aggressiv-erosiven Verlauf der RA [Gorman et al., 2004] liefern könnte: die SE-Allele - unter ihnen besonders DR4 - fördern den Klassenwechsel der ACPAs zu IgG1 und IgG3. Vor allem Autoantikörper gegen citrulliniertes Kollagen wären dafür prädestiniert, an Knorpelbestandteile zu binden [Koivula et al., 2005]. Es kommt zur Bindung und Aktivierung von Komplement, was schlussendlich zum Abbau von Knorpelmatrix durch C1s sowie zur vermehrten Rekrutierung von Neutrophilen durch C5a führen kann. Der Knorpel ist auf Grund des Fehlens von Komplementinhibitoren, die normalerweise auf Körperzellen die Komplementaktivierung regulieren, besonders anfällig gegenüber fehlgeleiteten Komplementkomponenten. Neben dem klassischen wird auch dem alternativen Komplementweg eine Rolle bei der Pathogenese der RA zugeschrieben, doch wie dieser aktiviert wird ist bisher nicht völlig geklärt [Solomon et al., 2005].

Für die Titer an CCP-spezifischen IgG4 konnte lediglich eine schwache Korrelation mit dem Auftreten von SE-Allelen gefunden werden. Hier scheinen andere genetische Faktoren den Subklassenwechsel zu begünstigen. Die Ausbildung einer IgG4-Antwort ist abhängig von einer T_H2-Mikroumgebung mit IL-4 als stimulierendes Zytokin [Stavnezer, 1996]. Im Synovium von RA-Patienten dominiert jedoch ein T_H1-Milieu mit großen Mengen proinflammatorischer Zytokine, wie IFN γ [McInnes and Schett, 2007]. Dies legt nahe, dass die Generierung von IgG4-produzierenden Plasmazellen an anderer Stelle stattfindet, z.B. in den peripheren lymphatischen Organen.

Ein interessanter Ansatzpunkt, die Assoziation der SE-Allele mit der RA zu erklären stammt aus dem Kollagen-induzierten Arthritis-Modell der Maus. Dabei wird in anfälligen Mausstämmen eine Arthritis durch Injektion von Typ-II-Kollagen in kompletten Freund's Adjuvans ausgelöst. Taneja et al. verglichen in diesem Modell transgene Mäuse, in denen der endogenen MHC-Klasse-II Locus ausgeschaltet wurde und stattdessen entweder humanes HLA-DRB1*0401 (RA-assoziiertes SE-Allel) oder *0402 (protektives SE-Allel) exprimiert wurden. Nach der Induktion der Arthritis fanden sie im Thymus der *0402 Transgenen eine geringere Anzahl an T-Zellen, was sie als mögliche Deletion autoreaktiver Zellen interpretierten. Dafür sprach außerdem, dass diese Tiere keine Arthritis entwickelten. Damit konnte eine Beteiligung der verschiedenen SE-Allele an der Ausbildung unterschiedlicher T-Zell Rezeptorrepertoires demonstriert werden [Taneja et al., 2008].

Über das beschriebene Mausmodell hinaus, in dem Unterschiede zwischen dem Vorhandensein eines protektiven SE-Allels und eines RA-assoziierten Allels gezeigt wurden, bestanden in den hier vorgelegten Analysen zusätzlich Differenzen zwischen zwei als assoziiert beschriebenen SE-Allelgruppen, dem HLA-DRB1*04 und dem HLA-DRB1*01. Lediglich für HLA-DRB1*04 konnte ein Einfluss auf die Subklassentiter der ACPAs gezeigt werden, für HLA-DRB1*01 jedoch nicht. Dies legt nahe, dass ein Spezifikum der *04-Allele, und nicht das SE per se, für die gezeigten Effekte auf die Subklassentiter der ACPAs verantwortlich ist.

Betrachtet man die Unterschiede zwischen den allelischen Linien von *01 und *04 (siehe Abbildung 2.2), so fällt das HLA-DRB4 Gen auf, welches nur in der *04-Linie vorhanden ist. Wie bereits erwähnt, ist für das HLA-DRB4 eine Splice-Variante bekannt, bei der durch einen Einzelnukleotidaustausch in der Spliceakzeptorstelle das erste Intron in der mRNA verbleibt und damit kein funktionelles Protein gebildet werden kann. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Splice-Variante in den ACPA-positiven RA Patienten seltener gefunden werden. Dies könnte bedeuten, dass nicht nur die SE-Allele, sondern auch das DRB4 die Entstehung von ACPAs fördert.

5.4 Der Einfluss von IgG in Immunkomplexen auf die Apoptose von B-Zellen

Die erhöhten Titer der IgG4 Subklasse unter den ACPAs sind auffällig. Um diese Subklasse funktionell charakterisieren zu können, wurden Seren von Allergiepateinten unter spezifischer Immuntherapie verwendet, da IgG4 während dieser Behandlung

induziert wird. Im Kontext der spezifischen Immuntherapie ist IgG4 als blockierender Antikörper beschrieben, der das Allergen bindet, jedoch zu keiner Aktivierung von Immunzellen führt [Aalberse et al., 2009]. Daher sollte hier die interessante Frage nach der Bedeutung von IgG4 bei Autoimmunprozessen untersucht werden. Im klinischen Umfeld sind zwei Extreme bekannt. Das Auftreten einer spezifischen IgG4-Defizienz ist zwar sehr rar, da eine solche häufig mit weiteren Subklassendefizienzen koexistiert, doch bietet sie den Hinweis, dass ein Fehlen von IgG4 mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber kapsel-tragenden Bakterien einher geht [Knutsen, 2006]. Auf der anderen Seite steht die Hyper-IgG4 Erkrankung, die gekennzeichnet ist von organbegrenzter Inflammation mit Infiltration von IgG4⁺ Plasmazellen und Fibrose [Neild et al., 2006]. Soweit konnte eine aktive pathologische Rolle von IgG4 nur beim bullösen Pemphigoid gezeigt werden [Mihai et al., 2007].

Während IgG1 viele der immunologischen Effekte wie die Aktivierung des klassischen Komplementwegs, Fc γ R-abhängige Phagozytose, antikörperabhängige Zytotoxizität, Degranulation sowie die Freisetzung von Entzündungsmediatoren vermittelt, scheint IgG4 die inerteste Subklasse zu sein [Nimmerjahn and Ravetch, 2008].

Ein indirekter Effekt könnte dabei aus dem für IgG4 beschriebenen Fab-Arm Austausch resultieren, welcher den Antikörper monovalent machen kann [van der Neut et al., 2007]. Dadurch wären diese nicht mehr fähig, identische Antigene kreuzzuvernetzen, was die Bildung von Immunkomplexen behindert. Im Synovium von RA-Patienten, wo ACPAs und citrullinierte Antigene in großen Mengen vorkommen, können damit IgG4-haltige Immunkomplexe den Fc γ RIIB auf autoreaktiven B- und Plasmazellen nicht stimulieren. Das Resultat wäre eine gestörte periphere B-Zell Toleranz [Ravetch and Nussenzweig, 2007], da diese autoreaktiven Zellen nicht effizient entfernt werden könnten. In der Tat ist eine Variante des Fc γ RIIB mit einer reduzierten Aufnahme von Immunkomplexen verbunden und wurde vor kurzem als starker Prädiktor von Gelenkschäden bei der RA beschrieben [Radstake et al., 2006].

Zur Überprüfung dieser Hypothese haben wir IgG1 und IgG4 aus Allergiepateinten isoliert, die sich einer spezifischen Immuntherapie unterzogen haben. Die Reinheit und Bindungsfähigkeit der isolierten Antikörper konnte mittels ELISA gezeigt werden. Anschließend wurden aus den isolierten Antikörpern und dem jeweiligen Allergen Immunkomplexe gebildet. Hierbei konnten sowohl mit IgG1 als auch dem Gemisch aus IgG1 und IgG4 Immunkomplexe nachgewiesen werden. IgG4 allein bildete keine Immunkomplexe, was als einen weiteren Beleg für die Bispezifität von IgG4 interpretiert werden kann. In den eigenen Experimenten wurden spezifische Immunkomplexe

aus IgG1 sowie hitzeaggregierte Immunkomplexe aus IgG1 oder IgG4 getestet. Dabei führte die Stimulation mit hitzeaggregiertem IgG1 zu einer geringfügig gesteigerten Apoptoserate, welche bei IgG4 nicht erkannt werden konnte. Dies deutet auf die Richtigkeit unserer Arbeitshypothese hin, doch die Effekte waren sehr gering. Es ist in Folgeversuchen nötig, den Einfluss von IgG4 in Immunkomplexen ebenfalls in Plasmazellen zu zeigen. Diese können jedoch nur schwer aus dem peripheren Blut von Spendern gewonnen werden, da ihr Anteil lediglich 0,8% beträgt [Boekel et al., 2007]. Ein Ausweg wäre die in-vitro Differenzierung von Plasmazellen aus naiven B-Zellen [Huggins et al., 2007]. Dies soll in zukünftigen Experimenten durchgeführt werden.

5.5 Aktivierung von Neutrophilen als Reaktion auf Immunkomplexen

Zuletzt wurde der Einfluss von IgG4-haltigen Immunkomplexen auf die Aktivierung von Neutrophilen untersucht. Diese stellen mit 90% den Hauptteil der Zellen im Synovium von RA-Patienten [Hollingsworth et al., 1967]. Zudem können Neutrophile direkt zur Gelenkzerstörung beitragen. Sie exprimieren Elastase, Kollagenase und Gelatinase, drei Enzyme mit unterschiedlicher Spezifität beim Abbau von Kollagen. Darüber hinaus können sie durch die Produktion von ROS zur Gewebszerstörung führen. Wie hier demonstriert werden konnte, führten lösliche Immunkomplexe nicht zu einer Steigerung der Produktion von ROS. Diese Beobachtung ist im Einklang mit einer Studie, die den Effekt von löslichen und unlöslichen Immunkomplexen auf die Aktivierung der ROS-Produktion untersuchte [Fossati, 2002]. Auffällig war allerdings eine Erhöhung der ROS-Produktion durch das Bienenallergen allein, welche durch die Zugabe von spezifischem IgG1 neutralisiert werden konnte. Die Neutralisierung war jedoch weniger effizient, wenn IgG4 vorhanden war. Dieser Effekt könnte direkt aus einer gestörten Immunkomplexbildung resultieren. Aber es ist auch denkbar, dass durch die zufällige Natur des Fab Arm Austauschs von IgG4 weniger spezifische Allergenbindungsstellen vorhanden waren: IgG1 besitzt zwei Bindungsstellen für das Allergen, bispezifisches IgG4 möglicherweise nur eine.

Als weiteres Maß für die Aktivierung von Neutrophilen durch Immunkomplexe wurde die Phagozytose betrachtet. Diese ist in Neutrophilen nicht ausschließlich mit einer Aufnahme von extrazellulärem Material verbunden, sondern auch beteiligt an einem Weg der Freisetzung von kollagen-zerstörenden Enzymen: zunächst werden Partikel, z.B. Immunkomplexe, durch Endozytose in Phagosomen aufgenommen. Es folgt

die Fusion der Phagosomen mit Enzym-beladenen Lysosomen und die entstehenden Phagolysosomen werden schlussendlich wieder zur Plasmamembran geleitet und deren Inhalt wird entlassen [Kitsis and Weissmann, 1991]. In den hier durchgeführten Experimenten nehmen die Neutrophilen die Latexpartikel zusammen mit den Immunkomplexen auf. Dadurch konnte gezeigt werden, dass bei Stimulation mit IgG4-enthaltenden Immunkomplexen die Phagozytoseaktivität im Vergleich zu den Immunkomplexen mit nur IgG1 reduziert ist. Übertragen auf die RA kann dies eine herabgesetzte Gelenkzerstörung bei Patienten mit großen Mengen an ACPAs der IgG4-Subklasse bedeuten. Um dies zu untersuchen, müssen in einer RA Studienkohorte mit verfügbaren Daten zur Gelenkerosion die ACPA-Subklassentiter bestimmt werden.

6 Literaturverzeichnis

- R.C. Aalberse and J. Schuurman. Igg4 breaking the rules. *Immunology*, 105(1):9–19, 2002. [10](#)
- R.C. Aalberse, S.O. Stapel, J. Schuurman, and T. Rispens. Immunoglobulin g4: an odd antibody. *Clinical & Experimental Allergy*, 39(4):469–77, 2009. [76](#)
- A. Antonsson and J.L. Persson. Induction of apoptosis by staurosporine involves the inhibition of expression of the major cell cycle proteins at the g(2)/m checkpoint accompanied by alterations in erk and akt kinase activities. *Anticancer Research*, 29(8):2893–8, 2009. [39](#)
- F.C. Arnett, S.M. Edworthy, D.A. Bloch, D.J. McShane, J.F. Fries, N.S. Cooper, L.A. Healey, S.R. Kaplan, M.H. Liang, and H.S. Luthra. The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 31(3):315–24, 1988. [11](#), [19](#)
- H. Bang, K. Egerer, A. Gaultier, K. Luthke, P.E. Rudolph, G. Fredenhagen, W. Berg, E. Feist, and G.R. Burmester. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 56(8):2503–11, 2007. [13](#), [70](#), [72](#)
- M. Baumgart, V. Moos, D. Schuhbauer, and B. Müller. Differential expression of major histocompatibility complex class II genes on murine macrophages associated with t cell cytokine profile and protective/suppressive effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12):6936–40, 1998. [16](#)
- F. Blanco, J. Kalsi, C.T. Ravirajan, P. Speight, A.R. Bradwell, and D.A. Isenberg. Igg subclasses in systemic lupus erythematosus and other autoimmune rheumatic diseases. *Lupus*, 1(6):391–9, 1992. [71](#)
- E.T. Boekel, C.E. Siegert, G.-J. Vrieling, V.C. Van Dam, A. Ceelen, and W. De Kieviet. Analyses of cd27++ plasma cells in peripheral blood from patients with bacterial

- infections and patients with serum antinuclear antibodies. *Journal of Clinical Immunology*, 27(5):467–76, 2007. 77
- W.H. Bos, G.M. Bartelds, M. Vis, A.R. van der Horst, G.J. Wolbink, R.J. van de Stadt, D. van Schaardenburg, B.A.C. Dijkmans, W.F. Lems, M.T. Nurmohamed, L. Aarden, and D. Hamann. Preferential decrease in IgG4 anti-citrullinated protein antibodies during treatment with tumour necrosis factor blocking agents in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 68(4):558–63, 2009. 70, 71
- S. Chapuy-Regaud, L. Nogueira, C. Clavel, M. Sebbag, C. Vincent, and G. Serre. Igg subclass distribution of the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated fibrin. *Clinical & Experimental Immunology*, 139(3):542–50, 2005. 14, 71
- C. Dejaco, W. Klotz, H. Larcher, C. Duftner, M. Schirmer, and M. Herold. Diagnostic value of antibodies against a modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 8(4):R119, 2006. 70
- N. Després, G. Boire, F.J. Lopez-Longo, and H.A. Ménard. The sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 21(6):1027–33, 1994. 12
- S.T. du Montcel, L. Michou, E. Petit-Teixeira, J. Osorio, I. Lemaire, S. Lasbleiz, C. Pierlot, P. Quillet, T. Bardin, B. Prum, F. Cornelis, and F. Clerget-Darpoux. New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis & Rheumatism*, 52(4):1063–8, 2005. 17
- R. Engelmann and B. Müller-Hilke. Antikörper gegen citrullinierte peptidantigene in klinik und forschung. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 68(6):485–90, 2009. 12, 70
- G. Fossati. Insoluble and soluble immune complexes activate neutrophils by distinct activation mechanisms: changes in functional responses induced by priming with cytokines. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61(1):13–9, 2002. 77
- C. Foulquier, M. Sebbag, C. Clavel, S. Chapuy-Regaud, R. Al Badine, M.-C. Méchin, C. Vincent, R. Nachat, M. Yamada, H. Takahara, M. Simon, M. Guerrin, and G. Serre. Peptidyl arginine deiminase type 2 (pad-2) and pad-4 but not pad-1, pad-3, and pad-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis & Rheumatism*, 56(11):3541–53, 2007. 13

- J.F. Fries, F. Wolfe, R. Apple, H. Erlich, T. Bugawan, T. Holmes, and B. Bruce. HLA-DRB1 genotype associations in 793 white patients from a rheumatoid arthritis inception cohort: Frequency, severity, and treatment bias. *Arthritis & Rheumatism*, 46(9):2320–9, 2002. 56
- E. Girbal-Neuhauser, J.J. Durieux, M. Arnaud, P. Dalbon, M. Sebbag, C. Vincent, M. Simon, T. Senshu, C. Masson-Bessière, C. Jolivet-Reynaud, M. Jolivet, and G. Serre. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 162(1):585–94, 1999. 12
- C.C. Goodnow, J. Sprent, B. Fazekas de St Groth, and C.G. Vinuesa. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature*, 435(7042):590–7, 2005. 6
- J.D. Gorman, R.F. Lum, J.J. Chen, M.E. Suarez-Almazor, G. Thomson, and L.A. Criswell. Impact of shared epitope genotype and ethnicity on erosive disease: A meta-analysis of 3,240 rheumatoid arthritis patients. *Arthritis & Rheumatism*, 50(2):400–12, 2004. 74
- P.A. Gourraud, P. Dieude, J.F. Boyer, L. Nogueira, A. Cambon-Thomsen, B. Mazieres, F. Cornelis, G. Serre, A. Cantagrel, and A. Constantin. A new classification of HLA-DRB1 alleles differentiates predisposing and protective alleles for autoantibody production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 9(2):R27, 2007. 17, 53
- D.H.D. Gray, I. Gavanescu, C. Benoist, and D. Mathis. Danger-free autoimmune disease in aire-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(46):18193–8, 2007. 7
- P.K. Gregersen, J. Silver, and R.J. Winchester. The shared epitope hypothesis. an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 30(11):1205–13, 1987. 16
- B. György, E. Tóth, E. Tarcsa, A. Falus, and E.I. Buzás. Citrullination: A posttranslational modification in health and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(10):1662–77, 2006. 13

- G. Harauz and A.A. Musse. A tale of two citrullines—structural and functional aspects of myelin basic protein deimination in health and disease. *Neurochemical Research*, 32(2):137–58, 2007. 13
- M.L. Harris, E. Darrah, G.K. Lam, S.J. Bartlett, J.T. Giles, A.V. Grant, P. Gao, W.W. Scott Jr, H. El-Gabalawy, L. Casciola-Rosen, K.C. Barnes, J.M. Bathon, and A. Rosen. Association of autoimmunity to peptidyl arginine deiminase type 4 with genotype and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 58(7):1958–67, 2008. 13
- C. Heldt, J. Listing, O. Sozeri, F. Blasing, S. Frischbutter, and B. Müller. Differential expression of hla class ii genes associated with disease susceptibility and progression in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 48(10):2779–87, 2003. 15
- J.A. Hill, S. Southwood, A. Sette, S.M. Jevnikar, D.A. Bell, and E. Cairns. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated hla-drb1*0401 mhc class ii molecule. *Journal of Immunology*, 171(2):538–41, 2003. 13
- J.A. Hill, D.A. Bell, W. Brintnell, D. Yue, B. Wehrli, A.M. Jevnikar, D.M. Lee, W. Hueber, W.H. Robinson, and E. Cairns. Arthritis induced by posttranslationally modified (citrullinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(4):967–79, 2008. 14
- M. Holland, P. Hewins, M. Goodall, D. Adu, R. Jefferis, and C.O. Savage. Anti-neutrophil cytoplasm antibody igg subclasses in wegener’s granulomatosis: a possible pathogenic role for the igg4 subclass. *Clinical & Experimental Immunology*, 138(1):183–92, 2004. 71
- J.W. Hollingsworth, E.R. Siegel, and W.A. Creasey. Granulocyte survival in synovial exudate of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory joint diseases. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 39(5):289–96, 1967. 77
- J. Huggins, T. Pellegrin, R.E. Felgar, C. Wei, M. Brown, B. Zheng, E.C.B. Milner, S.H. Bernstein, I. Sanz, and M.S. Zand. Cpg dna activation and plasma-cell differentiation of cd27– naive human b cells. *Blood*, 109(4):1611–9, 2007. 77
- L.B. Hughes, D. Morrison, J.M. Kelley, M.A Padilla, L.K.Vaughan, A.O. Westfall, H. Dwivedi, T.R. Mikuls, V.M. Holers, L.A. Parrish, G.S. Alarcón, D.L. Conn, B.L.

- Jonas, L.F. Callahan, E.A. Smith, G.S. Gilkeson, G. Howard, L.W. Moreland, N. Patterson, D. Reich, and S.L. Bridges. The HLA-DRB1 shared epitope is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in african americans through european genetic admixture. *Arthritis & Rheumatism*, 58(2):349–58, 2008. 73
- T.W.J. Huizinga, C.I. Amos, A.H.M. van der Helm-van Mil, W. Chen, F.A. van Gaalen, D. Jawaheer, G.M.T. Schreuder, M. Wener, F.C. Breedveld, N. Ahmad, R.F. Lum, R.R.P. de Vries, P.K. Gregersen, R.E.M. Toes, and L.A. Criswell. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the hla-drb1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis & Rheumatism*, 52(11):3433–8, 2005. 15
- P. Irigoyen, A.T. Lee, M.H. Wener, W. Li, M. Kern, F. Batliwalla, R.F. Lum, E. Massarotti, M. Weisman, C. Bombardier, E.F. Remmers, D.L. Kastner, M.F. Seldin, L.A. Criswell, and P.K. Gregersen. Regulation of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis: Contrasting effects of HLA-DR3 and the shared epitope alleles. *Arthritis & Rheumatism*, 52(12):3813–8, 2005. 73
- C.A. Janeway, P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 5. edition, 2002. 10, 61, 74
- S. Kary, J. Fritz, H.U. Scherer, and G.R. Burmester. Do we still miss the chance of effectively treating early rheumatoid arthritis? new answers from a new study. *Rheumatology*, 43(7):819–20, 2004. 11
- J.M. Kim, J.P. Rasmussen, and A.Y. Rudensky. Regulatory t cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nature Immunology*, 8(2):191–7, 2007. 7
- E. Kitsis and G. Weissmann. The role of the neutrophil in rheumatoid arthritis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (265):63–72, 1991. 78
- L. Klareskog, J. Ronnelid, K. Lundberg, L. Padyukov, and L. Alfredsson. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annual Reviews of Immunology*, 26:651–75, 2008. 14
- A.P. Knutsen. Spectrum of antibody deficiency disorders with normal or near-normal immunoglobulin levels. *Pediatric Asthma, Allergy & Immunology*, 19(1):51–62, 2006. 76

- M.-K. Koivula, S. Aman, A. Karjalainen, M. Hakala, and J. Risteli. Are there auto-antibodies reacting against citrullinated peptides derived from type I and type II collagens in patients with rheumatoid arthritis? *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(10):1443–50, 2005. [74](#)
- H.S. Lee, P. Irigoyen, M. Kern, A. Lee, F. Batliwalla, H. Khalili, F. Wolfe, R.F. Lum, E. Massarotti, M. Weisman, C. Bombardier, E.W. Karlson, L.A. Criswell, R. Vlietinck, and P.K. Gregersen. Interaction between smoking, the shared epitope, and anti-cyclic citrullinated peptide: A mixed picture in three large north american rheumatoid arthritis cohorts. *Arthritis & Rheumatism*, 56(6):1745–53, 2007a. [17](#)
- Y.H. Lee, Y.H. Rho, S.J. Choi, J.D. Ji, and G.G. Song. Padi4 polymorphisms and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis. *Rheumatology International*, 27(9):827–33, 2007b. [13](#)
- F. Mackay and P. Schneider. Cracking the BAFF code. *Nature Reviews Immunology*, 9(7):491–502, 2009. [7](#)
- R. Magalhaes, P. Stiehl, L. Morawietz, C. Berek, and V. Krenn. Morphological and molecular pathology of the B cell response in synovitis of rheumatoid arthritis. *Virchows Archiv*, 441(5):415–27, 2002. [72](#)
- D. Makrygiannakis, M. Hermansson, A.-K. Ulfgren, A.P. Nicholas, A.J.W. Zendman, A. Eklund, J. Grunewald, C.M. Skold, L. Klareskog, and A.I. Catrina. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in B cells. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67(10):1488–92, 2008. [14](#)
- L. Mathsson, M. Mullazehi, M.C. Wick, O. Sjoberg, Vollenhoven R. van, L. Klareskog, and J. Ronnelid. Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: Higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis & Rheumatism*, 58(1):36–45, 2008. [70](#), [73](#)
- I.B. McInnes and G. Schett. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Immunology*, 7(6):429–42, 2007. [74](#)
- D. Mettal, K. Brune, and J. Mollenhauer. Cytotoxic effects of rheumatoid arthritis sera on chondrocytes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1138(2):85–92, 1992. [74](#)

- A.J. Meulenbroek and W.P. Zeijlemaker. *The Human IgG Subclasses*. Texas Calbiochem Corporation, Netherlands, 2004. ISBN 90-5267-011-0. 10
- S. Mihai, M.T. Chiriac, J.E. Herrero-Gonzalez, M. Goodall, R. Jefferis, C.O. Savage, D. Zillikens, and C. Sitaru. Igg4 autoantibodies induce dermal-epidermal separation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11(5):1117–28, 2007. 76
- A.W Morgan, L. Haroon-Rashid, S.G Martin, H.-C. Gooi, J. Worthington, W.Thomson, J.H Barrett, and P. Emery. The shared epitope hypothesis in rheumatoid arthritis: evaluation of alternative classification criteria in a large UK caucasian cohort. *Arthritis & Rheumatism*, 58(5):1275–83, 2008. 73
- K. Nakagawa, H. Sakiyama, T. Tsuchida, K. Yamaguchi, T. Toyoguchi, R. Masuda, and H. Moriya. Complement c1s activation in degenerating articular cartilage of rheumatoid arthritis patients: immunohistochemical studies with an active form specific antibody. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 58(3):175–81, 1999. 74
- G.H. Neild, M. Rodriguez-Justo, C. Wall, and J.O. Connolly. Hyper-igg4 disease: report and characterisation of a new disease. *BMC Medicine*, 4:23, 2006. 76
- V. Nell-Duxneuner, K. Machold, T. Stamm, G. Eberl, H. Heinzl, E. Hoefler, J.S. Smolen, and G. Steiner. Autoantibody profiling in patients with very early rheumatoid arthritis - a follow-up study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2009. doi: 10.1136/ard.2008.100677. 12
- M.M. Nielen, D. van Schaardenburg, H.W. Reesink, R.J. van de Stadt, I.E. van der Horst-Bruinsma, M.H. de Koning, M.R. Habibuw, J.P. Vandenbroucke, and B.A. Dijkmans. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis & Rheumatism*, 50(2):380–6, 2004. 12
- R.L. Nienhuis and E. Mandema. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis; the antiperinuclear factor. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 23:302–5, 1964. 12
- F. Nimmerjahn and J.V. Ravetch. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 8(1):34–47, 2008. 8, 76

- R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2009. URL <http://www.R-project.org>. ISBN 3-900051-07-0. 41
- T.R. Radstake, B. Franke, M.H. Wenink, K.C. Nabbe, M.J. Coenen, P. Welsing, E. Bonvini, S. Koenig, W.B. van den Berg, P. Barrera, and P.L. van Riel. The functional variant of the inhibitory fcγ receptor iib (cd32b) is associated with the rate of radiologic joint damage and dendritic cell function in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 54(12):3828–37, 2006. 8, 76
- J.V. Ravetch and M. Nussenzweig. Killing some to make way for others. *Nature Immunology*, 8(4):337–9, 2007. 76
- J. Robinson, M.J. Waller, S.C. Fail, H. McWilliam, R. Lopez, P. Parham, and S.G.E. Marsh. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl_1):D1013–7, 2009. 15
- S. Romagnani. Human th17 cells. *Arthritis Research & Therapy*, 10(2):206, 2008. 9
- G.A. Schellekens, B.A. de Jong, F.H. van den Hoogen, L.B. van de Putte, and W.J. van Venrooij. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(1):273–81, 1998. 12
- T. Shiina, H. Inoko, and J.K. Kulski. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens*, 64(6):631–49, 2004. 15
- O. Snir, M. Widhe, C. von Spee, J. Lindberg, L. Padyukov, K. Lundberg, A. Engstrom, P.J. Venables, J. Lundeberg, R. Holmdahl, L. Klareskog, and V. Malmstrom. Multiple antibody reactivities to citrullinated antigens in sera from patients with rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1 alleles. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 68(5):736–43, 2009. 53
- S. Solomon, D. Kassahn, and H. Illges. The role of the complement and the fcγ system in the pathogenesis of arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 7(4):129–35, 2005. 74

- S.A. Stanilova and E.S. Slavov. Comparative study of circulating immune complexes quantity detection by three assays—cif-elisa, c1q-elisa and anti-c3 elisa. *Journal of Immunological Methods*, 253(1-2):13–21, 2001. [37](#)
- J. Stavnezer. Immunoglobulin class switching. *Current Opinion in Immunology*, 8(2):199–205, 1996. [10](#), [72](#), [74](#)
- V. Taneja, M. Behrens, E. Basal, J. Sparks, M.M. Griffiths, H. Luthra, and C.S. David. Delineating the role of the hla-dr4 β shared epitope in susceptibility versus resistance to develop arthritis. *Journal of Immunology*, 181(4):2869–77, 2008. [75](#)
- P.R. Thompson and W. Fast. Histone citrullination by protein arginine deiminase: is arginine methylation a green light or a roadblock? *ACS Chemical Biology*, 1(7):433–41, 2006. [13](#)
- A.H.M. van der Helm-van Mil, K.N. Verpoort, S. le Cessie, T.W.J. Huizinga, R.R.P. de Vries, and R.E.M. Toes. The HLA-DRB1 shared epitope alleles differ in the interaction with smoking and predisposition to antibodies to cyclic citrullinated peptide. *Arthritis & Rheumatism*, 56(2):425–32, 2007. [73](#)
- K.M. van der Neut, J. Schuurman, M. Losen, W.K. Bleeker, P. Martinez-Martinez, E. Vermeulen, T.H. den Bleker, L. Wiegman, T. Vink, L.A. Aarden, M.H. De Baets, J.G. van de Winkel, R.C. Aalberse, and P.W. Parren. Anti-inflammatory activity of human igg4 antibodies by dynamic fab arm exchange. *Science*, 317(5844):1554–7, 2007. [10](#), [76](#)
- M. van Engeland, L.J.W. Nieland, F.C.S. Ramaekers, B. Schutte, and C.P.M. Reutelingsperger. Annexin V-Affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31(1):1–9, 1998. [39](#)
- K.N. Verpoort, C.M. Jol van der Zijde, E.A. Papendrecht van der Voort, A. Ioan-Facsinay, J.W. Drijfhout, M.J. van Tol, F.C. Breedveld, T.W. Huizinga, and R.E. Toes. Isotype distribution of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis reflects an ongoing immune response. *Arthritis & Rheumatism*, 54(12):3799–3808, 2006. [14](#), [71](#)
- E.R. Vossenaar, A.J.W. Zendman, W.J. van Venrooij, and G.J.M. Pruijn. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *BioEssays*, 25(11):1106–18, 2003. [13](#)

- E.R. Vossenaar, N. Després, E. Lapointe, A. van der Heijden, M. Lora, T. Senshu, W.J. van Venrooij, and H.A. Ménard. Rheumatoid arthritis specific anti-sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Research & Therapy*, 6(2):R142–50, 2004. 13
- U. Walter and P. Santamaria. CD8+ t cells in autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*, 17(6):624–31, 2005. 9
- Z. Xiang, A.J. Cutler, R.J. Brownlie, K. Fairfax, K.E. Lawlor, E. Severinson, E.U. Walker, R.A. Manz, D.M. Tarlinton, and K.G.C. Smith. Fcγmariib controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nature Immunology*, 8(4):419–29, 2007. ISSN 1529-2908. 8
- B.J. Young, R.K. Mallya, R.D. Leslie, C.J. Clark, and T.J. Hamblin. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *British Medical Journal*, 2(6182):97–9, 1979. 12
- X. Zhao, N.L. Okeke, O. Sharpe, F.M. Batliwalla, A.T. Lee, P.P. Ho, B.H. Tomooka, P.K. Gregersen, and W.H. Robinson. Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 10(4):R94, 2008. 74

Tabellarischer Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Robby Engelmann

**Geburtstag,
Geburtsort:** 25.12.1981, Oschatz

Familienstand: ledig

fachliche Qualifikationen

Promotion:

11/2006 bis 11/2009 Doktorand in der Arbeitsgruppe „Klinische Immunologie“ des Instituts für Immunologie der Uniklinik Rostock. Forschungsthema: Antikörper gegen citrullinierte Peptidantigene bei der rheumatoiden Arthritis

06/2008 bis 07/2008 erfolgreiche Projektausschreibung und Betreuung einer amerikanischen Austauschstudentin über das RISE-Programm des DAAD. Thema: „In-vitro expression of RHOB in macrophages and its implications for the pathology of osteoarthritis“

03/2008 Teilnahme an der 4th Spring School on Immunology in Ettal (Dauer: 7 Tage)

Studium:

10/2003 bis 09/2006 Hauptstudium Biologie Dipl. in Leipzig (Spezialisierungsrichtungen: Neurobiologie, Genetik, Immunbiologie, Informatik); abgeschlossen mit dem akademischen Grad Diplom-Biologe (Gesamtnote: 1,7)
Thema der Diplomarbeit: „Aspekte der glialen Expression von Intermediärfilamenten und Reissnerscher Substanz während der Ontogenese der Zebrabärblings“

11/2005 bis 02/2006 Betreuung des zoologischen Grundpraktikums (LA) als studentische Hilfskraft

10/2001 bis 10/2003 Grundstudium Biologie Dipl. in Leipzig; abgeschlossen mit Vordiplom (Gesamtnote: 1,5)

Schulbildung:

1992 bis 2000 Besuch des Pestalozzi-Gymnasiums in Oschatz, abgeschlossen mit Abitur (Gesamtnote 2,1)

1988 bis 1992 Besuch der Grundschule in Dahlen

Publikationen

Begutachtete Publikationen:

Engelmann R, Brandt J, Eggert M, Karberg K, Krause A, Neeck G und Mueller-Hilke B. The anti-Mutated Citrullinated Vimentin response classifies RA patients into broad and narrow responders. *Journal of Rheumatology* 2009; im Druck.

Hecker M, Goertsches RH, Engelmann R, Thiesen H-J und Guthke R. Integrative modeling of transcriptional regulation in response to antirheumatic therapy. *BMC Bioinformatics* 2009; 10(1):262.

Engelmann R, Brandt J, Eggert M, Karberg K, Krause A, Neeck G and Mueller-Hilke B. IgG1 and IgG4 are the predominant subclasses among auto-antibodies against two citrullinated antigens in RA. *Rheumatology* 2008;47(10):1489-1492.

Reviewartikel:

Engelmann R und Müller-Hilke B. Antikörper gegen citrullinierte Peptidantigene in Klinik und Forschung. *Zeitschrift für Rheumatologie* 2009; 68(6):485-90.

Posterbeiträge:

Engelmann R, Brandt J, Eggert M, Karberg K, Krause A, Neeck G und Mueller-Hilke B. Antibodies against citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Zeitschrift für Rheumatologie* 2008;67:RA1.04 (Poster zum 36. Kongress der DGRh).

Engelmann R und Müller-Hilke B (2009) "RA1.01 Antibodies against citrullinated peptide antigens and HLA haplotypes in rheumatoid arthritis". *Zeitschrift für Rheumatologie* 2009; 68(Suppl 1):1-104 (Poster zum 37. Kongress der DGRh).

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bedanken bei ...

...	Prof. Dr. Brigitte Müller-Hilke	für die Ermöglichung dieser Arbeit sowie die hervorragende Betreuung und ausgiebigen Diskussionen
...	Prof. Dr. Martin Eggert	für die vielen hilfreichen Tipps in allen Belangen während der Pausen an frischer Luft
...	allen Kooperationspartnern aus der Klinik	für die Bereitstellung von Patientenseren
...	Michael Hecker	für die tatkräftige Hilfe bei den zahlreichen und kniffligen statistischen Fragen
...	Prof. Dr. Schröder	für die Geduld sich in das doch recht fachfremde Thema einzudenken
...	Dr. Lorenz	für die kurze Einführung in die Affinitätschromatographie und die anregenden Unterhaltungen zur Mittagszeit
...	Sandra Mahr	für die gute Unterstützung während meines Arbeitsbeginns hier in Rostock
...	Juliane, Diana und Martina	für die vielen lockeren Gespräche und die hin und wieder nötigen, entspannten Pausen
...	allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Immunologie	für das gute Arbeitsklima bei dem diese Arbeit entstehen durfte
...	Dr. Fredenhagen	für die Anregungen zum MCV während der Kongresse
...	meinen Eltern	für ihre nie enden wollende Unterstützung
...	und Freunden	für die vielen entspannenden Stunden bei Bier, Kubb und Feiern nach getaner Arbeit
...	allen vergessenen Seelen	die einen Dank genauso verdient haben, wie alle anderen

Erklärung gemäß § 7 (3) b) und c) der Promotionsordnung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Des Weiteren erkläre ich hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Ort, Datum

Name