

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Autoantigene bei der Rheumatoiden Arthritis

Im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin eingereichte Dissertation

von
Frank Schumann
aus Berlin
2003

praktische Durchführung: Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Mitte
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und
Klinische Immunologie

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Blankenstein
2. Gutachterin: PD Dr. rer. nat. Berek
Disputation: 05.07.2004

In Liebe und Dankbarkeit für

Boris

und

meine Eltern!

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Einleitung	6
Rheumatoide Arthritis	6
Pathogenese und Krankheitsverlauf	6
Autoreaktive Heterogenität der RA	8
B-Zell-Autoreaktivität	9
T-Zell-Autoreaktivität	10
Ubiquitäre Autoantigene	12
IgG (Rheumafaktor)	12
Citrullin	13
Calreticulin	13
Calpastatin	14
BiP (Heavy Chain Binding Protein)	14
RA 33	15
Problemstellung	16
Verbesserung und Vereinfachung der Diagnostik	16
Besseres Verständnis des Pathomechanismus	16
Material und Methoden	17
Material	17
Abkürzungen	17
Chemikalien	19
Proteine	20
Kits	20
Antikörper	21
Methoden	22
Isolierung von humanen PBMC bzw. SFMC	22
Präparation von Zellsuspensionen aus Lymphknoten	22
Kryokonservierung von Zellen	22
T-Zell-Proliferationstest	23
Nachweis von Zellpopulationen mittels Durchflußzytometrie	23
Markierung der Zellen mit R-Phycoerythrin- bzw. Quantum Red TM -markierten Antikörpern	23
Markierung der Zellen mit Fluorochrom-markierten Antikörpern	23
Durchflußzytometrische Analyse	24
HeLa S3-Zellen	25
Isolierung von Proteinen aus HeLa S3-Zellen	25

SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese)	25
Western Blot, semi dry	27
Immunoblot	27
Präparation der Antigene BiP, Calreticulin und Calpastatin für Immunoblots	28
Rheumafaktor, Citrullin, RA33 (hnRNP A2)	30
Ermittlung der Eichkurven	30
Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Rheumafaktoren	30
Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Citrullin-spezifischen Antikörpern	30
Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Anti-RA33-Antikörpern	31
Präparation von nativem Calreticulin	31
Präparation einer mit nativem p205/IgG angereicherten Fraktion	31
Zytokin-ELISA	32
Immunhistochemie	33
Anfertigung von Einfachfärbungen	33
Anfertigung von Doppelfärbungen	33
Patienten-Populationen	34
Untersuchungen der T-Zell-Reaktivität	34
Untersuchungen der B-Zell-Reaktivität (Autoreaktivitätsscreening)	35
Randomisierung der Patienten	36
Berechnung diagnostischer Kenngrößen	37
Ergebnisse	38
Zur Diagnostik	38
Nachweis der IgM-spezifischen Rheumafaktoren	38
Nachweis der Citrullin-spezifischen Antikörper	38
Nachweis der Calreticulin-spezifischen Antikörper	39
Nachweis der Calpastatin-spezifischen Antikörper	39
Nachweis der BiP-spezifischen Antikörper	39
Nachweis der RA33-spezifischen Antikörper	40
Autoreaktivitätsmuster	41
Auswertungen der Autoreaktivitätsmuster mit logistischer Regression und CLASSIF 1	46
RA-spezifische Autoantikörpermuster bei Patienten mit früher RA	47
Zum Pathomechanismus	48
Gedächtnis-Antwort oder schnelle Antwort vorstimulierter Zellen	48
Analyse der Zellpopulationen, die durch p205/IgG zur Proliferation angeregt werden	49
Sensitivität und Spezifität von antigenspezifischen T-Zellen für die RA	53
Reaktion von T-Zellen unterschiedlicher Kompartimente eines Spenders	58
Effekt der Leukapherese auf die stimulatorische Wirkung von GF II auf T-Zellen	60

Vergleich der stimulatorischen Wirkung von p205/IgG aus rheumatischer SF und aus traumatischer SF auf PBMC von RA-Patienten	61
Korrelation zwischen der B- und T-Zell-Antwort gegenüber Calreticulin	61
T-Zell-Restriktion gegenüber MHC-Klasse II	61
T-Zell-Epitopmapping	64
Zytokin-Sekretionsassay	68
Analyse möglicher RF-Induktion durch p205/IgG	71
Immunisierung eines Kaninchens mit p205-1 bzw. p205-3 zur Erzeugung eines Antiserums	71
p205-3 regt zur RF-Produktion in vitro an	72
Immunhistologie	73
Diskussion	79
Verbesserung und Vereinfachung der Diagnostik	79
Ausblick	82
Besseres Verständnis des Pathomechanismus	83
Antigen-spezifische T-Zell-Proliferation	83
Antigen-spezifische T-Zell-Populationen	86
Ausblick	91
Zusammenfassung	93
Literaturverzeichnis	94
Conclusion	102
Danksagung	103
Eidesstattliche Erklärung	104
Veröffentlichungen	105