

Material und Methoden

Material

Abkürzungen

BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indoxylsulfat
BiP	heavy chain binding protein
Bq	Becquerel
BrdU	Bromdeoxyuridin
Calp	Calpastatin
Calr	Calreticulin
Citr	Citrullin
cpm	counts per minute (gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Gy	Gray
IFN	Interferon
IL	Interleukin
HLA	humane Leukozytenantigene
HRP	Horseraddish Peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
Hsp	Heat Shock Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
mu	murine
NBT	Nitroblautetrazolonchlorid
NP-40	Nonidet P40
OA	Osteoarthrose
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate Buffered Saline
PHA	Phytohämagglutinin
PsoA	Psoriasis-Arthritis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RA	rheumatoide Arthritis
RA33	hnRNP A2 (heterogenous RiboNucleoprotein Particle A2)
reA	reaktive Arthritis
RF	Rheumafaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	R-Phycoerythrin
rpm	revolutions per minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate

SFMC	mononukleäre Zellen der Synovialflüssigkeit
SKL	Sklerodermie
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SSC	Systemische Sklerose
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	T cell growth factor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit

Anglizismen:

Cut-Off	Schwellenwert zur Bestimmung positiver oder negativer Testergebnisse
Kit	Gebrauchsfertige Zusammenstellung von Chemikalien, Lösungen, Materialien etc. z.B. für einen bestimmten Antikörper-Nachweis (Set)
Patterns	Muster
Screening	Untersuchung von Patientenmaterial auf bestimmte Parameter
Sublining	Areal unterhalb (dem Gelenklumen abgewandt) der synovialen Deckzellschicht der Synovialmembran
Well	Vertiefung einer Mikrotiterplatte

Chemikalien

Acrylamid (ultrapure)	Boehringer Mannheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
-Aminocaprinsäure	Calbiochem
Avidin/HRP	DAKO
Bisacrylamid (ultrapure)	Boehringer Mannheim
BrdU (Bromdeoxyuridin)	Boehringer Mannheim
CG-Medium (mit BSA, Glutamin & Transferrin, serumfrei)	Vitromex
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Serva
Fast-Blue-BB Salt	Sigma
Ficoll Separating Solution (density 1,077)	Seromed
Glycin	Serva
Hämatoxylin	Sigma
Harnstoff (ultrapure)	Boehringer Mannheim
Levamisol	Sigma
MARKER High Molecular Weight Range	Sigma
Mycoplasma Removal Agent (MRA)	ICN
Naphthol Phosphat	Sigma
N-Lauroyl-Sarcosin	Sigma
Nonidet P-40	Boehringer Mannheim
Penicillin-G / Streptomycin	Gibco BRL
PBS Dulbecco(phosphate-buffered-saline)_Mg ⁺⁺ Ca ⁺	Seromed
Ponceau S (Konzentrat, 2%)	Sigma
PVDF (Polyvinylidenfluorid), Porengröße 0,45µm	Millipore
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Serva
S-MEM (EAGLE)-Medium (mit Glutamin)	Gibco BRL
Substratsystem BCIP/ NBT	Sigma
TEMED	Serva
TMB One-Step-Substrate System	DAKO
Tris ((hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid)	Merck
Tween 20	Serva

Proteine

BiP (rec. Maus)	Stress Gen
BSA (bovine serum albumin)	Boehringer Ingelheim
Calpastatin-fragment (27 AS-peptid)	Sigma
DNase I	Boehringer Mannheim
FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco BRL
[³ H-Methyl]-Thymidin (spez. Aktivität 185 GBq/mmol)	Amersham pharmacia
Normalserum Kaninchen	DAKO
Normalserum Kaninchen, Ig-Fraktion	DAKO
Normalserum Ziege	DAKO
Phytohämagglutinin (PHA)	Boehringer Mannheim
rhuIL-2	Boehringer Mannheim
rhuIL15	Pharmingen
SDS Molekular Weight Marker	Sigma
TGF- 1 (Transforming Growth Factor- 1)	Boehringer Mannheim
TGF- Neutralizing Antibody	R&D Systems

Kits

Autostat II Rheumatoid Factor IgM Kit	COGENT DIAGNOSTICS
Latex-Agglutinationstest z. Bestimmung von RF im Serum	IMTEC
Enzymimmunoessay zur Bestimmung von Anti-RA33-Ak	IMTEC
Immunoscan RA (Citruillin-ELISA)	EURO-DIAGNOSTICA
OPTEIA Kits anti-huIL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- , IFN-	Pharmingen
Dako En Vision System HRP (AEC)	DAKO
Dako APAAP Kit System 40	DAKO

Antikörper

<u>Klonbezeichnung</u>	<u>Spezifität</u>	<u>Markierung</u>	<u>Herkunft</u>
Kaninchen	huIgM (Mu-Chains)	alkal. Phosphatase	DAKO
Kaninchen	huIgG (Gamma-Chains)	alkal. Phosphatase	DAKO
Kaninchen	huIgG,huIgM,huIgA	alkal. Phosphatase	DAKO
DK 25	huCD8	R-Phycoerythrin (RPE)	DAKO
MT 310	huCD4	RPE	DAKO
UCHT-4	huCD8	Quantum Red	Sigma
Q4120	huCD4	RPE	Sigma
SJ25-C1	huCD19	Quantum Red	Sigma
UCHT-1	huCD3	RPE	Sigma
L26	huCD20		DAKO
KP1	huCD68		DAKO
AS02	huCD90		Dianova
UPC-10	Isotyp muIgG2	Quantum Red	Sigma
MOPC-21	Isotyp muIgG1	RPE	Sigma
B44	BrdU (Bromdeoxyuridin)	FITC	BectonDickinson
Maus	huGrp78 monoclonal		Stress Gen
Maus	huCalreticulin monoclonal		Stress Gen
Kaninchen	huCalreticulin polyclonal		Stress Gen
Maus	huCalpastatin, Domain IV, monoclonal		Calbiochem
Ziege	muIgG	alkal. Phosphatase	Sigma
Ziege	raIgG	alkal. Phosphatase	Sigma
Maus	huIL15		Pharmlingen
Maus	huIL15	Biotin	Pharmlingen
Maus	huHLA-DP/DQ/DR monoklonal		Pharmlingen

Methoden

Den Untersuchungen wurde durch die Ethik-Kommission zugestimmt. Jegliche Arbeit mit humanen Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Es wurden sterile Lösungen und steriles Material verwendet und die Experimente unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C in einem mit 5% CO₂ begasten Brutschrank.

Isolierung von humanen PBMC bzw. SFMC

Die Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) bzw. mononukleärer Zellen der Synovialflüssigkeit (SFMC) erfolgte kurz nach der Entnahme, mindestens jedoch am gleichen Tag.

Es wurde heparinisierendes Vollblut (Blutspenden für Forschungszwecke von Patienten der Rheumaklinik Bad Liebenwerda, der Charité-Universitätsmedizin Berlin und der Rheumaklinik in Kyritz) verwendet, sowie Gelenkpunktate, deren Abnahme aus therapeutischen Gründen erfolgte. Nach einer 1:2 Verdünnung des Materials mit PBS Dulbecco wurden 15ml Ficoll Separating Solution mit 35ml der Zellsuspension vorsichtig überschichtet und bei 900g 20 Minuten zentrifugiert. Direkt im Anschluß wurde der in der Grenzschicht liegende opaleszierende Lymphozytenring abgesaugt und zweimal mit PBS gewaschen (500g). Danach erfolgte die Resuspension in CG-Medium. Material, das von durchgeführten Leukaphoresen stammte, ist analog aufgearbeitet worden.

Zur Bestimmung der Zahl und Vitalität von Zellen wurde der Trypanblau-Test verwendet. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit 0,1% (w/v) Trypanblau / PBS 1:2 verdünnt und nach 2 min. in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Durchlichtmikroskop ausgezählt. Tote und beschädigte Zellen färben sich mit Trypanblau und können so von lebenden Zellen unterschieden werden.

Präparation von Zellsuspensionen aus Lymphknoten

Der frisch entnommene Lymphknoten wurde in einer 60 x 15mm Petrischale mit 10ml CG-Medium mittels Skalpell in möglichst kleine Stückchen zerteilt. Die so entstandenen Zellklumpen wurden mit 20ml CG-Medium in ein 50ml-Gefäß überführt und konnten durch mehrmaliges Aufsaugen und Ausspritzen erst mit einer Spritze mit einer 19-G Nadel und dann mit einem Pipetboy und einer 10ml-Pipette weiter zerkleinert werden. Anschließend wurde diese Zellsuspension durch eine mit Nylonwolle gefüllte Spritze gepreßt. Die Petrischale als auch die mit Nylonwolle gefüllte Spritze wurden sorgfältig mit CG-Medium nachgespült. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 500g wurden die Zellen noch einmal mit CG-Medium gewaschen und schließlich in CG-Medium resuspendiert.

Kryokonservierung von Zellen

Frisch aufgearbeitete mononukleäre Zellen wurden in einer Anzahl von 10⁶ bis 2 · 10⁷ in 1ml 6°C kaltem CG-Medium resuspendiert, in 1,8ml Kryoröhrchen überführt und 110µl DMSO zugegeben. Die Einfrieröhrchen wurden sofort im -80°C Tiefkühlschrank gelagert, so daß eine weitere Abkühlung von ca. 1°C/min erfolgte. Nach 24h wurden die Zellen in einen Stickstoff-Behälter umgelagert.

Bei Bedarf wurden die gefrorenen Zellen schnell bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, sofort mit kaltem Medium 1:20 verdünnt und bei 500g, 10min abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde dann zweimal mit PBS gewaschen und in 20°C warmem Medium resuspendiert.

T-Zell-Proliferationstest

Zur Untersuchung der Proliferation wurde die DNA-Synthese durch den Einbau von [³H-Methyl]-Thymidin bestimmt. 10⁵ Zellen wurden mit jeweils 1U Penicillin und Streptomycin und dem Antigen in 255µl CG-Medium in 96-Well-Mikrotiterplatten inkubiert. Jeder Ansatz wurde als Triplikat erstellt, um eventuelle Proliferationsschwankungen mitteln zu können. In jedem Versuch lief eine Negativkontrolle (Medium anstelle des Antigens) und eine Positivkontrolle (8µg Phytohämagglutinin (PHA) pro Well = Mitogen) mit. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank über einen versuchsabhängigen Zeitraum. 16 Stunden vor Ablauf der Inkubationszeit wurde [³H-Methyl]-Thymidin in einer radioaktiven Konzentration von 37kBq pro Well zugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einem Cell Harvester auf einen Glasfaserfilter transferiert und achtmal mit H₂O_{dest.} gewaschen. Auf diese Weise wurden die Zellen auf dem Filter fixiert und die nicht eingebauten Nukleotide entfernt. Der Filter wurde 20min bei 50°C getrocknet, der Filterboden abgeklebt und dann mit 30µl Szintillationsflüssigkeit pro Well bestückt. Nach Versiegelung des Filters erfolgte die Messung in counts per minute (cpm) im TopCount Mikroplate Scintillation Counter.

Nachweis von Zellpopulationen mittels Durchflußzytometrie

Markierung der Zellen mit R-Phycoerythrin- bzw. Quantum Red™-markierten Antikörpern

PBMCs wurden wie beim Proliferationstest mit verschiedenen Antigenen inkubiert. Als Negativkontrolle wurde anstelle des Antigens Medium und als Positivkontrolle Phytohämagglutinin eingesetzt. Je Ansatz wurden 12 Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte identisch belegt, um für die Antikörpermarkierung ausreichende Mengen an Zellen zur Verfügung zu haben.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die 12 Wells eines Ansatzes vereinigt und gut nachgespült, um geringstmögliche Zellverluste zu erzielen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 500g) und in 100µl PBS resuspendiert. Insgesamt befanden sich ca. 10⁶ Zellen in der jeweiligen Suspension. Nach Zugabe von 10µl Antikörperlösung (R-Phycoerythrin-, oder Quantum Red™-markiert) wurden die Zellen bei Raumtemperatur im Dunkeln 30min inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS/ BSA/ Azid gewaschen. Bei Doppelfärbungen wurde erst mit R-Phycoerythrin angefärbt und dann der gleiche Vorgang mit Quantum Red™ wiederholt ⁸¹.

Markierung der Zellen mit Fluorochrom-markierten Antikörpern

16 Stunden vor Beendigung der Inkubationszeit wurde den Zellen Bromdesoxyuridin (BrdU) zugegeben, so daß eine Endkonzentration von 10µM BrdU in den Wells der Mikrotiterplatte vorlag. BrdU wird bei proliferierenden Zellen anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut. Nach der oben beschriebenen Erstmarkierung der Zelloberflächenproteine wurden die Zellen

in 200µl PBS aufgenommen und schnell in 1ml eisgekühlten 70%igen Ethanol überführt. Die Fixierung erfolgte 1h auf Eis und dann 30min bei Raumtemperatur. Nach der Zentrifugation bei 500g wurden die Zellen in 500µl PBS aufgenommen und 500µl einer Lösung mit 2% Formaldehyd und 0.02% Tween 20 dazugegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Nach dem Waschen der Zellen am nächsten Tag mit PBS/ BSA/ Azid (jetzt bei 700g zentrifugieren) erfolgte eine 10min Inkubation in 1ml DNase-Puffer. Die Zellen wurden erneut mit PBS/ BSA/ Azid gewaschen und in 100µl PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 20µl Fluorochrom-markiertem Anti-BrdU und einer Inkubation von 30min bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde wieder mit PBS/ BSA/ Azid gewaschen. Die markierten Zellen sollten auch weiterhin möglichst wenig dem Licht ausgesetzt werden, da sonst der Fluoreszenzfarbstoff ausbleicht. Abschließend wurden die Zellen in PBS/ BSA/ Azid aufgenommen, bis zu 10 Tagen bei 4°C gelagert und mittels Durchflußzytometer gemessen⁸².

Lösungen

PBS/ BSA/ Azid	0,1% (w/v) NaN ₃ 1,0% (w/v) BSA in PBS Dulbecco pH 7,4
DNase-Puffer	100 mM NaCl 5 mM MgCl 10 mM Tris/ HCl pH 8 250 µg Dnase I (=500 U/ ml)

Durchflußzytometrische Analyse

Die Analyse der Zellen erfolgte am Durchflußzytometer (FACScalibur) unter Verwendung der Cell Quest Software (Beckton Dickinson). Zuerst erfolgte die Wahl der zu analysierenden Zellpopulation. Hierzu wurden die PBMCs aufgrund ihrer Streulichteigenschaften im Scattergramm (korrelierte Darstellung Seitwärtsstreulicht (Granularität) gegen Vorwärtsstreulicht (Größe)) elektronisch eingegrenzt ("gating"). Bei der anschließenden Analyse wurde eine Geräteeinstellung verwendet, die die Fluoreszenz (Autofluoreszenz und Fluoreszenz unspezifisch gebundener Kontroll-Antikörper) von unstimulierten und stimulierten mit Kontroll-Antikörpern markierten PBMCs in der unteren linken Ecke der "dot plot" Darstellung und somit am linken Rand der Histogramm-Darstellung zeigte. In einer laufenden Reihe wurde aus Gründen der praktischen Durchführung sowie der Vergleichbarkeit der Proben keine Änderung der Geräteeinstellung vorgenommen. Die Bestimmung der prozentualen Anteile markierter Zellen erfolgte durch eine Quadrantenstatistik des Gerätes.

HeLa S3-Zellen

Die HeLa-Zellen leiten sich von einem menschlichen Cervixkarzinom ab und werden seit 1951 in permanenter Kultur gehalten⁸³. Bei der von der ursprünglichen HeLa-Linie abgeleiteten HeLa S3-Kultur handelt es sich um eine an das Wachstum in Suspension adaptierte Zelllinie⁸⁴.

HeLa S3-Zellen wurden in 800ml-Plastikflaschen (100ml Medium Inhalt) bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank gehalten. Nach drei Tagen wurden 10ml entnommen und mit frischem Medium (5% FCS) 1:10 zur weiteren Kultur angesetzt. Die restlichen 90ml Zellsuspension wurden abzentrifugiert (JS 18, 10', 1400 rpm, bei RT), zweimal mit PBS gewaschen und das Pellet bis zur Proteinaufarbeitung eingefroren.

Isolierung von Proteinen aus HeLa S3-Zellen

Bei der Proteinaufarbeitung wurde besonderes Gewicht auf ein möglichst vollständiges, undegradiertes Spektrum aller vorhandenen Proteine gelegt. Dies wurde durch denaturierende Bedingungen erzielt. Daher enthielt der zum Zellaufschluß eingesetzte Puffer 1% N-Lauroyl-Sarcosin, 6M Harnstoff und 5% 2-Mercaptoethanol. Der Puffer bewirkt eine weitgehende Auffaltung von Proteinen, unterbindet Protein-Protein- und Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen und Proteaseaktivitäten, da aktive Zentren unter diesen Bedingungen ebenfalls nicht beständig sind. Um eine optimale Wirksamkeit der Komponenten zu erzielen, wurde in einem silikonisierten Dounce-Homogenisator homogenisiert und anschließend 15 Minuten bei 60°C im Wasserbad inkubiert.

Mit Cäsiumchlorid wurde eine spezifische Dichte von $\rho = 1,6\text{g/cm}^3$ eingestellt, so daß sich Proteine von Polysacchariden und Nukleinsäuren mit Hilfe der Ultrazentrifugation (SW40 Ti, 20.000rpm, 1h, 20°C) abtrennen ließen. Proteine mit $1,3\text{g/cm}^3$ floatierten, Polysaccharide mit $1,6\text{g/cm}^3$ blieben darunter, Nukleinsäuren (DNA mit $1,7\text{g/cm}^3$ und RNA mit $1,9\text{g/cm}^3$) pelletierten.

Für den Einsatz in der SDS-PAGE wurde das Float abgenommen und in einem Puffer homogenisiert, der sich vom ersten nur im Detergenz unterschied: NP40 wurde gegen N-Lauroyl-Sarcosin ausgetauscht, da letzteres in der SDS-PAGE das Laufverhalten stört. Anschließend wurde gegen 25mM Tris/HCl pH7,5 dialysiert, um Gardol und Cäsiumchlorid auszuwaschen. Die Dialyse erfolgte über kurze Diffusionswege und Dialysezeiten. Das Dialysat wurde mit zwei Teilen Ethanol bei -20°C gefällt, pelletiert und war in dieser Form für die SDS-PAGE einsetzbar. Es ließ sich aber auch gut über sehr lange Zeiten bei -20°C lagern.

SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese)

Die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS), Dithiothreitol (DTT) und Harnstoff durchgeführt⁸⁵.

Es wurden ausschließlich Vertikalgele eingesetzt. Nach dem Gießen wurde mit Wasser überschichtet. Um eine gleichmäßige und möglichst reproduzierbar vollständige Polymerisation zu erzielen, wurde das Gel eine Stunde lang bei 42°C ausgeheizt. Das Sammelgel wurde immer erst kurz vor dem Start gegossen, um einen scharfen pH- und

Leitonen-Sprung zwischen Trenn- und Sammelgel zu gewährleisten. Proteinproben wurden nach Aufnahme in Probenpuffer 2min bei 100°C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 200V über 16 Stunden. Die Elektrophoresekammer wurde mittels Wasserkühlung auf 15°C gekühlt, um einer ungleichmäßigen Erwärmung des Gels vorzubeugen.

Lösungen

Acrylamid-Stammlösung, 60% (verwendbar für Gele von 5-40% Acrylamid)

Acrylamid	60%	1kg
Bisacrylamid	1,5%	25g
H ₂ O		642ml

Atenschutz, neue Packung Acrylamid, Bisacrylamid einwiegen, Wasser zufügen, in Originalpackung im Wasserbad bei 40°C lösen, filtrieren

10% Ecklösung

Harnstoff	4 M	96g
1,5 M Tris/ HCl, pH 8,8	375mM	100ml
60% Acrylamid-Stammlösung	10%	67ml
25% SDS	0,1%	1,6ml
H ₂ O (auffüllen auf)		400ml

je 50 ml 10% Ecklösung 500µl 10% TEMED und 500µl 10% APS als Katalysator zugeben

Überschichtungspuffer

Harnstoff	4 M	96g
1,5 M Tris/ HCl, pH 8,8	375 mM	100ml
25% SDS	0.1%	1,6ml
H ₂ O (auffüllen auf)		400ml

5% Sammelgel

Harnstoff	4 M	96g
0,5 M Tris/ HCl, pH 6,8	125 mM	100ml
60% Acrylamidstammlösung	5%	13,2ml
25% SDS	0,1%	1,6ml
H ₂ O (auffüllen auf)		400ml

Probenpuffer

Harnstoff	6 M	90g
0,5 M Tris/ HCl, pH 6,8	62,5 mM	100ml
Dithiotreitol	0,1%	250mg
25% SDS	0,5%	5ml
Glycerin	6%	20g
H ₂ O (auffüllen auf)		250ml

Elektrodenpuffer 10fach konzentriert

Tris	20 mM	150g
Glycin	190 mM	715g
SDS	0,1%	50g
H ₂ O (auffüllen auf)		5l

Färbelösung

- 1 Teil Coomassie-Stammlösung (0,5% in 50% HOAc)
- 2 Teile Methanol
- 2 Teile Wasser

Entfärber

- 10% HOAc, 20% MeOH in H₂O

Western Blot, semi dry

Western Blotting erfolgte nach dem semi-dry-Verfahren nach Khyse-Andersen ⁸⁶. Es wurde ein diskontinuierliches System verwendet, bei dem je drei stark (300mM Tris) und drei schwach (25mM Tris) gepufferte Anodenfilter und sechs Kathodenfilter (-Aminocaprinsäure) zum Einsatz kamen. Die Puffer enthielten 20% Methanol, um ein osmosebedingtes Quellen des Gels zu verhindern. Der Transfer wurde bei 0,8mA/cm² über 2,5 Stunden durchgeführt. Als Transfermembran wurde PVDF (Polyvinylidenfluorid) verwendet. Die PVDF-Membran besitzt eine Porengröße von 0,45µm und ist somit gut geeignet, Proteine >10kD zu halten.

Lösungen

Anodenpuffer, stark

Tris	300mM
Methanol	20%

Anodenpuffer, schwach

Tris	25mM
Methanol	20%

Kathodenpuffer

-Aminocaprinsäure	40mM
Methanol	20%

Färbelösung

Ponceau S	0,2% (w/ v)
Trichloressigsäure	3%

Sulfosalicylsäure 3%

Entfärber H₂O

Immunoblot

Das Blockieren der Membran erfolgte mit PBS (5% BSA und 1% NP-40, 1h). Anschließend wurde mit PBSN gewaschen. Die Blotstreifen wurden mit dem Erstantikörper bzw. Serum über zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgte nach Waschschritten mit Alkalische Phosphatase-gekoppelten Zweitantikörpern. Der Alkalische Phosphatase-gekoppelte humane anti-IgG-Antikörper wurde 1:500 verdünnt eine

Stunde bei Raumtemperatur eingesetzt. Zum Sichtbarmachen der Reaktionen wurde ein Substratsystem mit 5-Bromo-4-chloro-3-indoxylphosphat (BCIP) verwendet, wobei ein Indigofarbstoff entstand. Die Oxidation von der Leuko- zur Indigoform wurde durch Nitroblautetrazolonchlorid (NBT) beschleunigt.

Lösungen

PBS, pH 7,4

Wasch- und Verdünnungslösung

PBSN (0,1% NP-40 und 2,5% BSA in PBS)

Blockierer

BSA 5%

NP-40 1%

in PBS

Substratfärbung:

Alkalische Phosphatase-Puffer, pH 9,5

Tris 100 mM

NaCl 100 mM

MgCl₂ 5 mM

Präparation der Antigene BiP, Calreticulin und Calpastatin für Immunoblots

Zunächst wurden 60mg HeLa-Gesamtprotein auf vier präparativen (1,5mm Dicke) 10%igen Polyacrylamid-(SDS-)Gelen aufgetrennt. Anschließend wurde jeweils der Mittelteil des Gels mit dem Marker geblottet und immunologisch umgesetzt. Auf dem Western Blot wurde das gesuchte Protein, wie BiP, Calreticulin oder Calpastatin mit spezifischen Antikörpern lokalisiert, und die entsprechende Bande aus den nicht geblotteten, Coomassie-gefärbten Gelen ausgeschnitten. Die gleichen Banden von zwei Gelen wurden gepoolt und erneut in einem 1,5mm-Polyacrylamid-(SDS-)Gel 10%ig bzw. 7,5%ig aufgetrennt, anschließend geblottet und immunologisch umgesetzt. So entstand eine Säuberung und Anreicherung des Proteins, und die Seren und Gelenpunktate konnten auf die einzelnen Autoreaktivitäten BiP, Calreticulin und Calpastatin untersucht werden. Unter diesen Bedingungen wies z.B. BiP eine relative molekulare Masse von 78k, Calreticulin 63k und Calpastatin 125k auf.

Proteinreinigungsschema

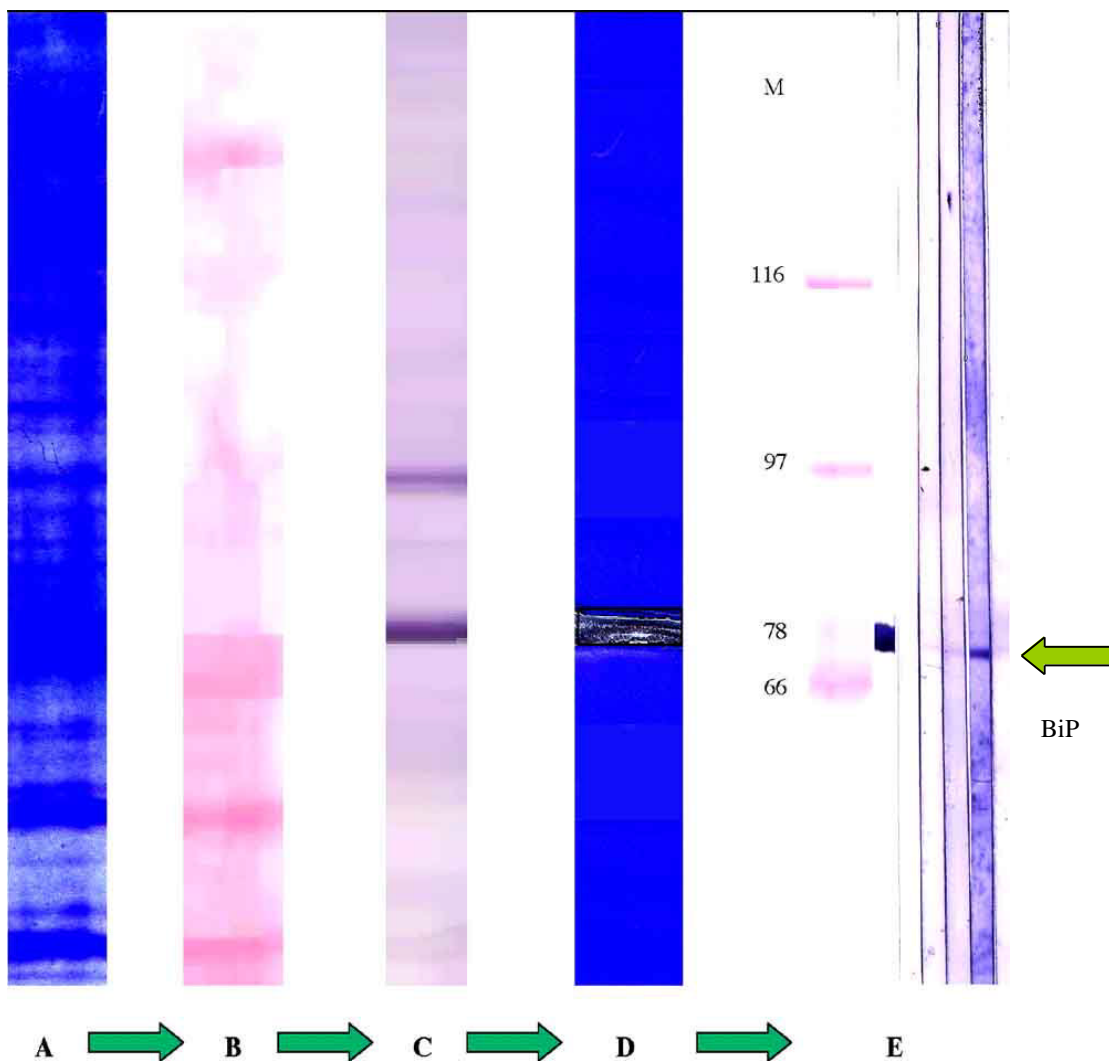


Abb. 2: Darstellung der Proteinaufreinigung und -anreicherung (exemplarisch für BiP).

- A:** Coomassie-gefärbtes Polyacrylamid-Gel nach SDS-PAGE mit Gesamtprotein aus HeLa-Zellen
- B:** Ponceau S-gefärbter Western-Blot von A
- C:** Immunumsetzung mit spezifischen Antikörpern für BiP
- D:** SDS-PAGE Gesamtprotein (A): die Proteinbande wurde entsprechend der Immunumsetzung ausgeschnitten
- E:** Ponceau S-gefärbter Western-Blot nach Auftragen von BiP-Banden aus D auf SDS-PAGE mit Marker Immunumsetzung von E mit Positiv- und Negativkontrolle und vier Patientenseren

Rheumafaktor, Citrullin, RA33 (hnRNP A2)

Für die Untersuchungen der Gelenkpunktate und Seren auf die oben genannten Antigene wurden kommerzielle Kits verwendet.

Ermittlung der Eichkurven

Für die Standardkurven von Citrullin, RA33 und dem Rheumafaktor wurden Standardproben aus dem Kit verwendet oder eine Verdünnungsreihe aus einem deklariertem Material hergestellt. Für alle 3 Parameter wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450nm gegen eine Referenz von 620nm gemessen. Die Eichkurven wurden aus den Doppelbestimmungen von mindestens 5 Meßpunkten ermittelt.

Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Rheumafaktoren

Der Autostat II Rheumatoid Factor IgM Kit ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) für die Diagnostik von IgM Rheumafaktoren in menschlichem Serum. Das Ergebnis ist durch einen Farbumschlag gekennzeichnet, der auf einer Reaktion von Enzym und Substrat beruht. Die Wells sind mit humanem IgG beschichtet und werden mit verdünntem Patientenserum bestückt. Der IgM Rheumafaktor bindet an das Antigen. Nach der Inkubation bei Raumtemperatur und Auswaschen ungebundenen Materials wird Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Anti-IgM-Antikörper hinzugegeben, der sich an den IgM Rheumafaktor bindet. Nach weiterer Inkubation und Waschschrinen wird Tetra-Methyl-Benzidine-Substrat (TMB) in jedes Well gegeben. Das Vorhandensein von konjugiertem-IgM RF-IgG-Komplex färbt das Substrat blau. Nach Hinzugabe der Stop-Lösung verfärbt sich das Substrat gelb. Es entsteht ein Farbumschlag, dessen Farbintensität proportional zu der Konzentration von IgM Rheumafaktor in der Probe ist. Dieser wird photometrisch bestimmt. Die Standards sind kalibriert gegen "The First British Standard For Rheumatoid Arthritis Serum". Die Ablesung der Konzentration von IgM-Antikörpern in IU/ml erfolgte aus der Eichkurve. Werte größer als 24IU/ml (Cut-Off) waren als erhöht anzusehen.

Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Citrullin-spezifischen Antikörpern

Der Euro-Diagnostica Immunoscan RA Kit ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) für die in vitro-Diagnostik von Antikörpern in menschlichem Serum, das gegen synthetische Peptide gerichtet ist, die modifizierte Arginin-Reste enthalten. Der Test verwendet Mikrotiterplatten, die mit einem modifizierten synthetischen Peptid (Antigen) beschichtet sind. Die Wells werden mit verdünntem Patientenserum bestückt und inkubiert. Wenn spezifische Antikörper vorhanden sind, werden sich diese an das Antigen in den Wells binden. Ungebundenes Material wird durch mehrere Waschschrinen entfernt und jeder gebundene Antikörper wird durch die Zugabe von HRP-Anti-Human IgG-Konjugat markiert. Nach erneutem Waschen wird anschließend mit Substrat inkubiert. Bei einer Reaktion von Antikörpern wird das Ergebnis mittels eines blauen Farbumschlages angezeigt, der proportional zur Quantität von gebundenen Antikörpern ist, und nach Zugabe von Stoplösung nach gelb umschlägt und photometrisch gemessen werden kann.

Die Ablesung der Konzentration von Citrullin-spezifischen Antikörpern in U/ml erfolgte aus der Eichkurve. Werte größer als 50U/ml (Cut-Off) waren als erhöht anzusehen.

Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Anti-RA33-Antikörpern

Das Prinzip des Tests beruht auf der Immobilisierung von rekombinantem RA33 an die feste Phase von Mikrotiterstreifen (Polystyren) und anschließender Bindung der Anti-RA33-Antikörper. Der Nachweis der so gebundenen Antikörper erfolgt mittels eines enzymmarkierten Antikörpers, der gegen humanes IgG gerichtet ist und mit dem Enzym Peroxydase gekoppelt ist. Nach Zugabe einer Substratlösung entwickelt sich ein Farbstoff, dessen Farbintensität proportional der Konzentration und/ oder der Aktivität der Antikörper ist.

Die Ablesung der Konzentration Anti-RA33-Antikörper in U/ml erfolgte aus der Eichkurve. Werte größer als 25U/ml (Cut-Off) waren als erhöht anzusehen.

Präparation von nativem Calreticulin

Die Präparation von Calreticulin als auch der mit p205/IgG angereicherten Fraktion wurden von Dr. G. Hausdorf durchgeführt.

Die HeLa-Zellen wurden als gefrorenes Pellet in Phosphatpuffer homogenisiert. Nach dem Abzentrifugieren des Homogenats konnte der Überstand einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen werden. Die produktthaltige Fraktion wurde gegen Startpuffer für eine Ionenaustauschchromatographie dialysiert. Nachdem eine Q-Sepharose-Säule mit dem Dialysat beladen und mit einem Kochsalzgradienten eluiert wurde, konnte die produktthaltige Fraktion nochmals für die Beladung einer Hydroxylapatit-Säule dialysiert werden. Die Hydroxylapatit-Säule wurde mit einem Phosphat-Gradienten eluiert. Das Produkt war in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese einbandig (bei Beladung mit bis zu 1µg Protein pro Bahn und Coomassie-Färbung). Die Identifizierung während der Präparation erfolgte mit Anti-Calreticulin-Antikörpern vom Kaninchen; die Identifizierung des Produktes durch N-terminale Proteinsequenzierung (Abteilung Proteinanalytik MDC, Berlin-Buch). Das Produkt war in Pufferlösung eingefroren, bei -80°C zu lagern.

Präparation einer mit nativem p205/IgG angereicherten Fraktion

Das Ausgangsmaterial für die Präparation war eine Sammelprobe von insgesamt 11 Synovialflüssigkeit verschiedener RA-Patienten. Nach einer 1:2 Verdünnung mit 0,2M Phosphatpuffer (pH 7,5) wurde die SF 15min bei 40°C mit Hyaluronidase versetzt (50mg/l verdünnter SF), um die Viskosität zu verringern. Danach erfolgte eine Dialyse über Nacht bei 4°C gegen 0,1M Phosphat-Citrat-Puffer (pH 4,0). Nach einer Zentrifugation von 18,000rpm mit einem Beckman JA20-Rotor wurde das Pellet (Pel) gelagert und der Überstand (Ü) auf eine Cibacron Blue Sepharose-Säule (CBS) (Affi-Blue 10/10, Pharmacia) gegeben, um das Albumin zu binden. Bei diesem Arbeitsschritt wurden drei Fraktionen gewonnen: Durchlauf (D CBS), Eluat (E CBS) und Waschdurchlauf (W CBS). Das Eluat bestand hauptsächlich aus Albumin. Zur Bindung des IgG wurde der Durchlauf der Cibacron Blue Sepharose-Säule auf eine Protein A Sepharose-Säule gegeben. Das Eluat (E Prot A) bestand hauptsächlich aus IgG. Der Durchlauf (D Prot A) beinhaltete weniger als 0,5% IgG und wurde mittels Gelfiltration (GF) an Sephacryl (Sephacryl S-300 HR in einer C25x100 Säule, Pharmacia) analysiert. Vier Fraktionen konnten separiert werden: GF 0 beinhaltete sehr hochmolekulare Proteine, GF I beinhaltete hauptsächlich Proteine mit einem Molekulargewicht von 600k, GF

II hatte den größten Anteil an 200k-Proteinen und GF III war die Fraktion mit Proteinen, die ein Molekulargewicht von 70k hatten. Die Proteinmengen der einzelnen Fraktionen wurde semiquantitativ nach Bradford bestimmt ⁸⁷.

Die folgenden synthetischen Peptide p205-1 bis 3 wurden von der Firma Henklein nach den schon veröffentlichten Sequenzen hergestellt ⁸⁸. Der N-Terminus wurde mittels Cystein verlängert.

p205-1 H₂N-C-D I N G G G A T L P Q P L Y Q T A A V L T A G F A-CONH₂

p205-2 H₂N-C-Q A N I D A N P T D K S L G L Y P T G G Y P I-CONH₂

p205-3 H₂N-C-Y V D G V E V H N A K-CONH₂

Ein Kontrollpeptid 4 wurde mit einer zufälligen Sequenz synthetisiert und am N-Terminus ebenfalls mit Cystein gekoppelt.

Peptid 4 (p205-4) H₂N-C-R N E E A S K Q L E S S R Q L A S R-CONH₂

Die Peptide wurden kovalent an BSA gekoppelt. Ihre Bindung erfolgte bifunktional mit SMCC (Succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexan-1-carboxylat). Pro BSA-Molekül werden statistisch gesehen 10 Peptidmoleküle angelagert.

Zytokin-ELISA

Zur Bestimmung der Zytokinkonzentration in den Kulturüberständen fanden standardisierte Kits der Firma Pharmingen für Interleukin 2, 4, 5, 10 sowie TNF- und IFN- Verwendung.

Die mit monoklonalen Antikörpern, spezifisch für die entsprechenden Zytokine, beschichteten ELISA-Platten wurden mit den Standards und den zu testenden Proben inkubiert. Es folgte die Zugabe von monoklonalen, biotinylierten Antikörpern gegen das Zytokin, wodurch ein Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex entstand. Danach wurde mit Streptavidin-HRP Konjugat inkubiert. Das entsprechende Substrat dazu war Tetramethylbenzidin in Verbindung mit Wasserstoffperoxid, dessen Umsetzung nach Ablauf der Inkubationszeit mit Stopplösung beendet wurde, woraufhin die Messung im ELISA-Reader möglich war.

Zur IL-15 Bestimmung wurden folgende Einzelkomponenten genutzt, die zu einem ELISA nach dem „Sandwich“-Prinzip kombiniert wurden: monoklonaler Anti-IL-15-Antikörper, rekombinantes humanes IL-15, biotinylierter monoklonaler Anti-IL-15-Antikörper, HRP-konjugiertes Avidin und DAKO-TMB-One-Step-Substrat. Die zu jeder Komponente angegebenen Inkubationszeiten, Inkubationsbedingungen sowie die einzusetzenden Konzentrationen waren jedoch von großer Spannweite oder erwiesen sich als unbrauchbar. Infolgedessen mußte der ELISA erst etabliert werden.

50µl pro well, eines mit 4µg/ml in PBS gelösten spezifischen, monoklonalen IL-15 Antikörpers, wurden auf 96-Well-ELISA Platten aufgetragen, mit einer Folie verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit 1% BSA und 20% FCS, gelöst in PBS, blockiert. Dies erfolgte mit 200µl pro well für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit 0,05% Tween in PBS wurde die Standardreihe mit rekombinantem humanen IL-15 (1000pg; 500pg; 250pg; 125pg; 62,5pg; 31,2pg;15,6pg) als Duplikat angelegt. 100µl der Standards und der Proben, die 1:5 verdünnt

wurden, konnten nun aufgetragen werden. Alle Verdünnungen wurden in der Blockierlösung, versetzt mit 0,05% Tween 20, durchgeführt. Die Inkubation erfolgte 3 Stunden im Brutschrank. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte die Zugabe von je 100µl eines biotinylierten, monoklonalen IL-15 Antikörpers mit der Konzentration von 2,5µg/ml. An die einstündige Inkubation bei 37°C anschließend, wurde fünfmal gewaschen und mit 100µl pro well HRP konjugiertem Avidin (1:4000 verdünnt) 30 Minuten inkubiert. Nach dem Waschen folgte der letzte Schritt mit der Zugabe von 100µl/well DAKO-TMB-One-Step-Substrat und dem Stoppen nach 50 minütiger Umsetzungszeit. Die Stopplösung bestand aus einnormaler Salzsäure und dreinormaler Schwefelsäure. Innerhalb von 30min mußte am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450nm gegen 620nm gemessen werden.

Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Anfärbungen wurden Gefrierschnitte von Synovialgewebe verwendet. Das Gewebe entstammte arthroskopischen Eingriffen, die in der Rheumaklinik Bad Dübren (Dr. B. Förster), den KMG-Kliniken Kyritz (Orthopädie, OÄ Dr. Seyfert, Dr. Reutermann) und in der Rheumaklinik Berlin-Buch (PD Dr. J. Zacher) durchgeführt wurden. Nachdem das Synovialgewebe präparativ mittels Scalpell aufgearbeitet wurde (Entfernung von Fett und Bindegewebe), konnte die relativ saubere Synovialmembran in tissue-teck (Einbettmedium für Gefrierschnitte) bei -80°C gelagert werden. Zur jeweiligen Untersuchung war es möglich, 4-6µm dünne Gewebeschnitte mit einem Microtom anzufertigen, die auf Objektträger transferiert wurden. Nach Trocknung und Fixierung über 90 Sekunden in einem Gemisch aus Methanol und Aceton folgte ein halbstündiger Blockierungsschritt. Hierzu wurde entsprechend der Spezies (Maus oder Kaninchen), aus welcher der Erstantikörper gewonnen wurde, Kaninchen bzw. Ziegenserum in einer Verdünnung von 1:10 genutzt. Es schloß sich ein fünfminütiger Peroxidaseblock an.

Anfertigung von Einfachfärbungen

Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte über eine Stunde. Ein entsprechender mit HRP gekoppelter Zweitantikörper wurde für 20 Minuten hinzugefügt. Danach konnten die Substratumsetzung (AEC) und eine HE-Färbung durchgeführt werden. Zwischen allen o. g. Schritten mußten die Schnitte mit einem Puffer gewaschen werden. Der Puffer bestand aus 50 µM TRIS-Puffer (pH 7,6) mit einem zehnprozentigen BSA-Anteil.

Anfertigung von Doppelfärbungen

Je nach seiner Spezifität folgte eine unterschiedlich lange Inkubationsphase mit dem Erstantikörper (CD68 10min, CD20/CD3 und CD90 60min). Es wurde gewaschen und für 30 Minuten der Zweitantikörper (Anti-Maus) hinzugefügt. Nach erneutem Waschen erfolgte die Inkubation mit einem Gemisch aus alkalischer Phosphatase und Anti-alkalischer Phosphatase (APAAP). Die beiden letztgenannten Schritte wurden wiederholt, bevor das Substrat durch die alkalische Phosphatase umgesetzt werden konnte. Als Substrat wurden Fast-Red bzw. Fast-Blue eingesetzt, letzteres als kurz zuvor angesetztes Gemisch aus 10mg Fast-Blue BB-salt, 5mg Naphthol-AS-Phosphat und 0,8mg Levamisol gelöst in

Dimethylformamid und gepuffert in 10ml 0,1M TRIS (pH 9,2). Die Umsetzung des Substrates wurde unter dem Lichtmikroskop beobachtet und nach 20 Minuten gestoppt.

Zur Anfärbung eines zweiten Antigens auf dem Gewebeschnitt fand, nach einstündiger Inkubation mit dem Erstantikörper, ein mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelter Zweitantikörper Verwendung. Dieser Antikörper wirkte 20 Minuten ein. Anschließend erfolgte die Umsetzung des AEC-Substrates (Amino-Ethylcarbazol), die wiederum unter dem Lichtmikroskop beobachtet wurde, um sie zum richtigen Zeitpunkt zu beenden. Bei Bedarf schloß sich zur Färbung der Zellkerne eine HE (Hämatoxylin-Eosin) Färbung an.

Patienten-Populationen

Untersuchungen der T-Zell-Reaktivität

45 Patienten mit gesicherter Diagnose einer rheumatoiden Arthritis standen für die Versuche zur Verfügung. Blutproben für die Aufarbeitung von PBMCs wurden mit dem Einverständnis der Patienten entnommen. Wenn SF aus therapeutischen und Lymphknoten aus diagnostischen Gründen entnommen wurden, so stand das Material auch erst nach erfolgter Einwilligung zur Verfügung. Die Patienten erhielten entsprechend des Krankheitsverlaufes eine unterschiedliche Medikation. In dieser RA-Gruppe waren 43 Personen RF-positiv und zwei -negativ (37 Frauen, 8 Männer; der Altersdurchschnitt lag bei 50 Jahren). Die Patienten der ersten Kontrollgruppe (d.h. keine RA) wiesen verschiedene Krankheiten auf. Vier Patienten hatten das Sjögren-Syndrom (Sjö), fünf einen Systemischen Lupus Erythematoses (SLE), vier eine Psoriasis-Arthritis, vier eine nicht-spezifische Monoarthritis, zwei eine Lyme Borreliose (Nachweis von *Borrelia burgdorferi* mit PCR⁸⁹), vier eine Spondylarthropathie, zwei eine Mischkollagenose und ein Patient hatte eine reaktive Arthritis. Die Gruppe setzte sich aus 15 Frauen und 11 Männern zusammen (der Altersdurchschnitt lag bei 48 Jahren). Die zweite Kontrollgruppe bestand aus fünf weiblichen und drei männlichen gesunden Probanden in einem Alter von 42 Jahren.

Zur Klärung der Manifestation der RA, d.h. an welchem Ort reaktive Zellen trotz Therapie wirksam bleiben und die Erkrankung aufrechterhalten, wurden SFMC und PBMC einer Leukapherese-Patientin sowie SFMC, PBMC und Zellen eines peripheren Lymphknotens von zwei weiteren Patienten untersucht. Die Leukapherese-Patientin war resistent gegenüber herkömmlicher Medikation. Diese Form der Immunbehandlung wurde in zwei Zyklen innerhalb von zwei Monaten durchgeführt. Jeder Zyklus bestand aus drei bis vier Leukapheresen in zweitäglichem Abstand. Bei der Leukapherese wird das Blut des Patienten durch eine Apparatur geleitet, in der mononukleäre Zellen weitgehend abzentrifugiert werden. Der Patient erhält das Plasma und die Erythrozyten zurück. Zwei Patienten mit RA wurden axillare Lymphknoten entnommen, um ein bösartiges Lymphom auszuschließen. Die histopathologischen Untersuchungen zeigten unspezifische entzündliche Veränderungen, aber keine Anzeichen für ein bösartiges Lymphom.

Untersuchungen der B-Zell-Reaktivität (Autoreaktivitätsscreening)

Das Autoreaktivitätsscreening wurde unter meiner Anleitung und in enger Zusammenarbeit mit Frau Dr. Behrens und Herrn Bergholz durchgeführt.

Insgesamt wurden Seren von 281 Patienten auf Autoantikörpermuster getestet. Die Auswahl und ihre Aufteilung in die Gruppen erfolgte nach den einzelnen Diagnosen.

A: Rheumatoide Arthritis (RA)	N=150 (53%) (davon 8 juvenile RA)
B: Kontrollen	N=131 (47%)
B ₁ : Kollagenosen	N=61 (22%) (22 Kollagenosen, 4 Sjögren Syndrom, 6 Sklerodermie, 18 SLE, 11 Vaskulitiden)
B ₂ : SPO	N=32 (11%) (17 Psoriasisarthr., 8 Morbus Bechterew, 7 reakt. Arthr.)
B ₃ : Sonstige	N=33 (12%) (u.a. Gicht, Glykogenosen, Osteoarthrosen, reakt. Arthr. nach Trauma)
B ₄ : Gesunde	N=5 (2%)

Dabei wurde darauf geachtet, eine ungefähr äquivalente Zahl an Patienten mit Rheumatoider Arthritis (150 Patienten, 53%) und Kontrollen (131 Patienten, 47%) zu erhalten. Die Kontrollen wurden noch einmal in vier Untergruppen aufgeteilt. Mit dieser Aufteilung konnte gewährleistet werden, daß zum Einen sowohl die Testgruppe als auch die Kontrollgruppe annähernd gleich groß sind und daß zum Anderen in dem Kontrollkontingent genügend andere Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis vorhanden sind, die es differenzialdiagnostisch, auch im Hinblick auf den Mustervergleich, von der RA abzugrenzen gilt.

Die Gelenkpunktate wurden von der Rheumaklinik Bad Liebenwerda, Dr. J.-M. Engel, zur Verfügung gestellt. Die Synovialflüssigkeiten wurden bei klinischer Indikation zur Entlastung der betroffenen Gelenke und zur Serumanalyse entnommen, anschließend eingefroren und asserviert.

Es wurden die Gelenkpunktate von 214 Patienten untersucht, deren Diagnose gesichert waren. Davon hatten 98 Patienten eine RA. Die anderen 116 Patienten gehörten anderen Erkrankungsgruppen an und dienten als Kontrolle, die wiederum in 4 Untergruppen unterteilt wurde. Die Gruppierung unterscheidet sich von der Unterteilung der Seren, da eine Zunahme der Synovialflüssigkeit nur bei bestimmten Erkrankungen zu verzeichnen ist. Die insgesamt untersuchten Gruppen umfaßten damit folgende Erkrankungen:

A:	Rheumatoide Arthritis (RA)	N= 98 (45,8%)
B:	Kontrollen	N=116 (54,2%)
B ₁ :	Reaktive Arthritis (reA)	
B ₂ :	Arthrose (OA)	
B ₃ :	Psoriasis-Arthritis (PsoA)	
B ₄ :	Andere rheumatische und nicht-rheumatische Gelenkerkrankungen (Andere)	

Alters- und Geschlechterverteilung der Patienten

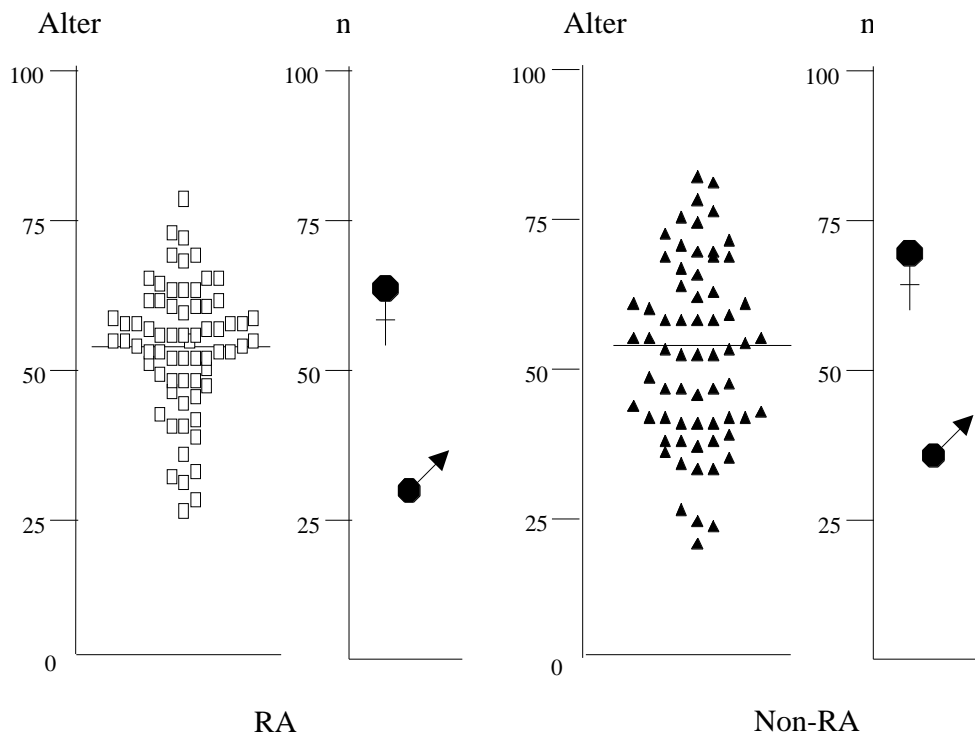


Abb. 3: Das Alter der Patienten variierte in der Gruppe mit RA zwischen 25 und 80 Jahren. In der Gruppe der Non-RA waren die Patienten zwischen 20 und 84 Jahren. Die Abbildungen mit der Altersverteilung zeigen, daß das durchschnittliche Alter der Patienten bei ca. 55 Jahren lag. Für die beiden Gruppen gab es hierbei keinen Unterschied. Die Gruppen RA und Non-RA waren in der Anzahl annähernd gleich groß. Die Verteilung der Geschlechter weiblich zu männlich war in beiden Gruppen ca. 2:1.

Eine separate Kohorte von 123 Patienten mit früher RA wurde ebenfalls auf die entsprechenden Antikörper untersucht. Der Vergleich mit den Kontrollen erweist sich als schwierig, da es sich bei diesen um jeweils manifestierte Erkrankungen handelt.

Randomisierung der Patienten

Die Anordnung der Seren und Punktate in den Testreihen wurde randomisiert und die Tests einfach blind durchgeführt. Die Auswertung der Immunoblots erfolgte nacheinander durch zwei unabhängig voneinander arbeitende Beobachter. Das bedeutet, daß die einzelnen Gruppen in den pro Tag stattfindenden Testreihen ihrer Größe nach repräsentativ verteilt waren und daß die Diagnosen den Beobachtern beim Bewerten der Immunoblotstreifen nicht bekannt war. Das mehrmalige Testen der Seren auf verschiedenen Immunoblots versuchte die Qualität der Blots als Bias auszuschließen. War das Ergebnis unklar, wurde der Test wiederholt. Diese Anordnung ermöglichte eine größtmögliche Objektivierung der Ergebnisse.

Berechnung diagnostischer Kenngrößen

Für die klinische Beurteilung eines Befundes werden verschiedene Kriterien ermittelt. Die diagnostische Spezifität gibt Auskunft darüber, mit welcher Wahrscheinlichkeit bei einem nicht Erkrankten ein negatives Testergebnis gefunden wird.

$$\text{Diagnostische Spezifität} = \frac{\text{Richtig negative Testergebnisse}}{\text{Alle nicht an RA Erkrankte}} \cdot 100$$

Die diagnostische Sensitivität gibt die Wahrscheinlichkeit an, daß bei Erkrankung das Testergebnis positiv ausfällt.

$$\text{Diagnostische Sensitivität} = \frac{\text{Richtig positive Testergebnisse}}{\text{Alle an RA Erkrankte}} \cdot 100$$