

## **Ergebnisse**

### **Zur Diagnostik**

Laut Literatur erreicht keine der hier zu betrachtenden Autoreaktivitäten eine ausreichend hohe Spezifität, um die RA sicher zu diagnostizieren. Die frühe RA kann sogar nur durch klinische Symptomatik erkannt werden. Der RF, als einziger serologischer Parameter der ACR-Kriterien, wurde mit dem in der klinischen Diagnostik verwendeten IgM-ELISA bestimmt. In wenigen Kliniken wird seit kurzer Zeit auch die Messung der Citrullin-spezifischen Antikörper zur Diagnostik hinzugezogen. Die anderen Antikörper (Calreticulin, Calpastatin, BiP und RA33) sind zwar als RA-spezifisch beschrieben worden, spielen aber in der klinischen Diagnostik der Erkrankung noch keine Rolle. Die Untersuchungen wurden zunächst mit SF durchgeführt, in der Annahme, daß am Ort der akuten Ausprägung der Erkrankung, Antikörper für die verschiedenen Antigene zu finden sind. Patientenseren wurden im zweiten Schritt verwendet, um die Tauglichkeit der Tests für eine serologische Diagnostik zu ermitteln.

### **Nachweis der IgM-spezifischen Rheumafaktoren**

Es wurden die Gelenkpunktate von 200 Patienten untersucht und die Autoreaktivität im ELISA bestimmt. Rheumafaktor positiv waren 82 der 200 Patienten, von denen 67 der 89 Patienten mit Rheumatoider Arthritis RF-positiv waren. Die Sensitivität errechnete sich hierbei für Patienten mit Rheumatoider Arthritis zu 76% und die Spezifität zu 88%.

Es wurden die Seren von 281 Patienten untersucht und die Autoreaktivität mittels eines ELISAs bestimmt. Im ELISA waren 126 Patienten RF-positiv. 103 der 150 RA-Patienten reagierten positiv. Das entspricht einer Sensitivität von 69%, die Spezifität lag bei 82%.

Eine separat untersuchte Kohorte von 123 Seren von Patienten mit früher RA zeigte bei 72 Seren ein positives Ergebnis, was einer Sensitivität von 58% entspricht.

### **Nachweis der Citrullin-spezifischen Antikörper**

Es wurden die Gelenkpunktate von 192 Patienten untersucht und die Autoreaktivität anhand eines ELISAs bestimmt. Für 78 Patienten wurde eine Reaktivität oberhalb des Cut-Off im Citrullin-ELISA bestimmt. In der Gruppe der 86 RA-Patienten wurde in 69 Punktaten Reaktivität gegen Citrullin nachgewiesen, von denen annähernd 30% den Cut-Off um das 10-fache überstiegen. Die Sensitivität von 80%, bei einer Spezifität von 69%, für Gelenkpunktate von RA-Patienten war deutlich größer verglichen mit den Kontrollgruppen.

Die Untersuchung von 281 Seren ergab bei 99 ein positives Testergebnis im ELISA. 91 RA-Patienten von 150 reagierten positiv. Damit liegt die Citrullin-Sensitivität bei 61% und -Spezifität bei 94% für die RA.

Eine separat untersuchte Kohorte von 123 Seren von Patienten mit früher RA zeigte bei 50 Seren ein positives Ergebnis, was einer Sensitivität von 41% entspricht.

### **Nachweis der Calreticulin-spezifischen Antikörper**

Es wurden die Gelenkpunktate von 198 Patienten untersucht und die Autoreaktivität anhand von Immunoblots bestimmt. Auf Calreticulin reagierten 134 der 198 Patienten positiv, wovon in der Gruppe der Patienten mit Rheumatoider Arthritis 63 von 89 positiv waren. Die Sensitivität errechnete sich hierbei für Patienten mit Rheumatoider Arthritis zu 71% und die Spezifität zu 35%.

Die Untersuchung von 281 Seren ergab bei 133 ein positives Testergebnis auf dem Immunoblot. 83 RA-Patienten von 150 reagierten positiv. Damit liegt die Calreticulin-Sensitivität bei 55% und -Spezifität bei 62% für die RA.

Eine separat untersuchte Kohorte von 85 Seren von Patienten mit früher RA zeigte bei 13 Seren ein positives Ergebnis, was einer Sensitivität von 15% entspricht.

### **Nachweis der Calpastatin-spezifischen Antikörper**

Es wurden die Gelenkpunktate von 197 Patienten untersucht und die Autoreaktivität anhand von Immunoblots bestimmt. In der Synovialflüssigkeit von 78 Patienten wurde Autoreaktivität gegen Calpastatin nachgewiesen, wobei 49 Patienten mit RA von insgesamt 86 positiv reagierten.

Damit errechnete sich eine Sensitivität für Patienten mit Rheumatoider Arthritis von 57%, während die Spezifität 74% erreichte.

Die Untersuchung von 281 Seren ergab bei 103 ein positives Testergebnis auf dem Immunoblot. 68 RA-Patienten von 150 reagierten positiv. Damit liegt die Calpastatin-Sensitivität bei 45% und -Spezifität bei 73% für die RA.

Eine separat untersuchte Kohorte von 62 Seren von Patienten mit früher RA zeigte bei 29 Seren ein positives Ergebnis, was einer Sensitivität von 47% entspricht.

### **Nachweis der BiP-spezifischen Antikörper**

Es wurden die Gelenkpunktate von 202 Patienten untersucht und die Autoreaktivität anhand von Immunoblots bestimmt. Von diesen Patienten waren 63 BiP-positiv. Dies waren im einzelnen 36 von 92 Patienten mit Rheumatoider Arthritis und 27 von 110 Kontrollen.

Die Sensitivität betrug somit für Patienten mit Rheumatoider Arthritis 39% und die Spezifität 75%.

Die Untersuchung von 281 Seren ergab bei 147 ein positives Testergebnis auf dem Immunoblot. 95 RA-Patienten von 150 reagierten positiv. Damit liegt die BiP-Sensitivität bei 63% und -Spezifität bei 60% für die RA.

Eine separat untersuchte Kohorte von 123 Seren von Patienten mit früher RA zeigte bei 63 Seren ein positives Ergebnis, was einer Sensitivität von 51% entspricht.

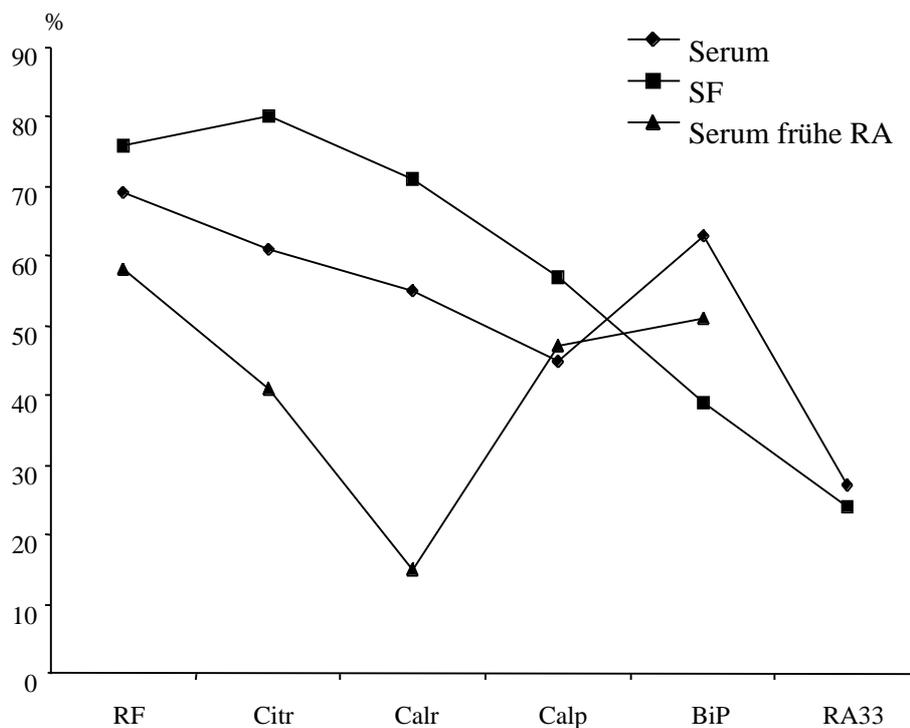
### Nachweis der RA33-spezifischen Antikörper

Es wurden die Gelenkpunktate von 201 Patienten untersucht und die Autoreaktivität mittels eines ELISAs bestimmt. Im ELISA zeigten nur 45 der 201 Proben eine Reaktivität gegen RA33, die oberhalb des Cut-Off lagen. Die größte Anzahl RA33-positiver Ergebnisse wurde mit 20 von 85 in der Gruppe der RA gefunden. Das entspricht einer Sensitivität von 24%, die Spezifität lag bei 78%.

Die Untersuchung von 281 Seren ergab bei 79 ein positives Testergebnis im ELISA. 40 RA-Patienten von 150 reagierten positiv. Damit liegt die RA33-Sensitivität bei 27% und - Spezifität bei 70% für die RA.

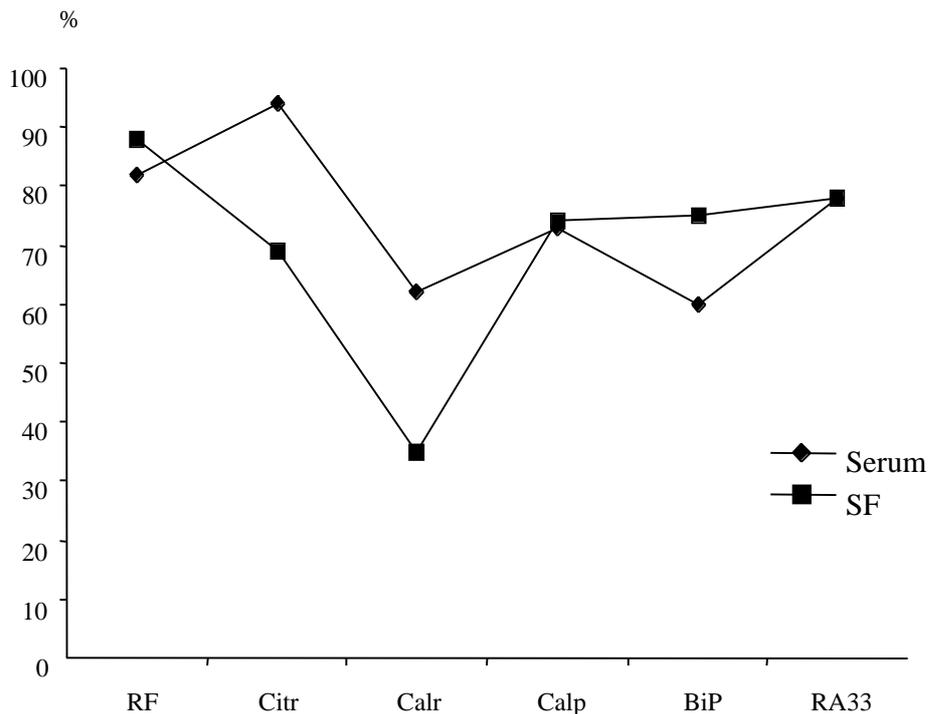
Der von Prof. G. Steiner (Wien) durchgeführte Immunoblot gegen RA33 mit den gleichen Seren war in der Spezifität dem ELISA-Test überlegen. Er lieferte für die RA die besseren Validitäten und Vorhersagewerte im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Sensitivität 24% und Spezifität 84%).

#### Spezifische Sensitivitäten der gemessenen Antikörper für die RA



**Abb. 4:** Spezifische Sensitivitäten der sechs Antikörper: RF (Rheumafaktor), Citr (Citullin-spezifische AK), Calr (Calreticulin-spezifische AK), Calp (Calpastatin-spezifische AK), BiP (BiP-spezifische AK) und RA33 (anti-RA33 AK) für die RA. Es wurden das Serum und die Synovialflüssigkeit von Patienten mit manifestierter RA und das Serum von Patienten mit früher RA gemessen.

## Spezifitäten der gemessenen Antikörper für die RA



**Abb. 5:** Spezifitäten der sechs Antikörper: RF (Rheumafaktor), Citr (Citullin-spezifische AK), Calr (Calreticulin-spezifische AK), Calp (Calpastatin-spezifische AK), BiP (BiP-spezifische AK) und RA33 (anti-RA33 AK) für die RA. Es wurden das Serum und die Synovialflüssigkeit von Patienten mit manifestierter RA gemessen.

### Autoreaktivitätsmuster

Da keiner der oben beschriebenen Antikörper eine eindeutige serologische Diagnostik zuläßt, wurden Antikörpermuster erstellt. Es sollte versucht werden, die Spezifität für RA zu erhöhen unter Beibehaltung einer guten Sensitivität. Zunächst wurden zwei Antikörperergebnisse miteinander verglichen, dann drei usw.; bis schließlich sechs Ergebnisse von Antikörpernacheinander miteinander verglichen wurden. Begonnen wurde mit den Antikörpern, die im Einzeltest die besten Ergebnisse zeigten. Bei sechs verschiedenen Autoantigen-spezifischen Antikörpern ergeben sich rein rechnerisch 64 verschiedene Muster, unter der Voraussetzung, daß nur zwei Zustände (+ (=Antikörper-positiv) oder - (=Antikörper-negativ)) berücksichtigt werden. Unter Zuhilfenahme der Zahlenwerte, die mittels ELISA gewonnen wurden, ließen sich natürlich beliebig viele Muster erstellen.

Die Untersuchung der 281 Seren zeigte 27 Muster, die ausschließlich bei RA-Patienten auftraten, d.h. bei dieser Kohorte eine Spezifität von 100% aufwiesen, und 58% dieser Patienten erfaßten.

**Tab. 1:** RA-spezifische Antikörpermuster im Serum und ihre Sensitivität für die RA.

Es werden alle 27 Muster gezeigt, die ausschließlich bei der Gruppe der RA-Patienten auftraten und bei keiner der Kontrollgruppen. 17 dieser Muster zeigen eine Sensitivität von über 1% für die RA.

Muster Nr.	RF	Citr-Ak	Calr-Ak	Calp-Ak	BiP-Ak	RA33-Ak	Sensitivität in %
1	-	-	-	+	+	+	0,7
2	-	-	+	+	+	+	0,7
3	+	-	+	-	+	+	0,7
4	+	-	+	+	+	-	2,7
5	+	-	-	+	+	+	0,7
6	+	-	+	+	+	+	2,0
7	-	+	-	-	+	-	1,4
8	-	+	+	-	-	-	1,4
9	-	+	+	-	+	-	0,7
10	-	+	+	-	+	+	0,7
11	-	+	+	+	-	-	1,4
12	-	+	+	+	+	-	2,0
13	-	+	+	+	-	+	0,7
14	+	+	+	-	-	-	3,3
15	+	+	+	-	+	-	7,3
16	+	+	-	-	-	+	1,4
17	+	+	-	-	+	+	3,3
18	+	+	+	-	-	+	0,7
19	+	+	+	-	+	+	3,3
20	+	+	-	+	-	-	0,7
21	+	+	-	+	+	-	6,0
22	+	+	+	+	-	-	3,3
23	+	+	+	+	+	-	5,3
24	+	+	-	+	+	+	2,7
25	+	+	+	+	-	+	1,4
26	+	+	+	+	+	+	2,7
27	-	-	-	+	+	-	0,7

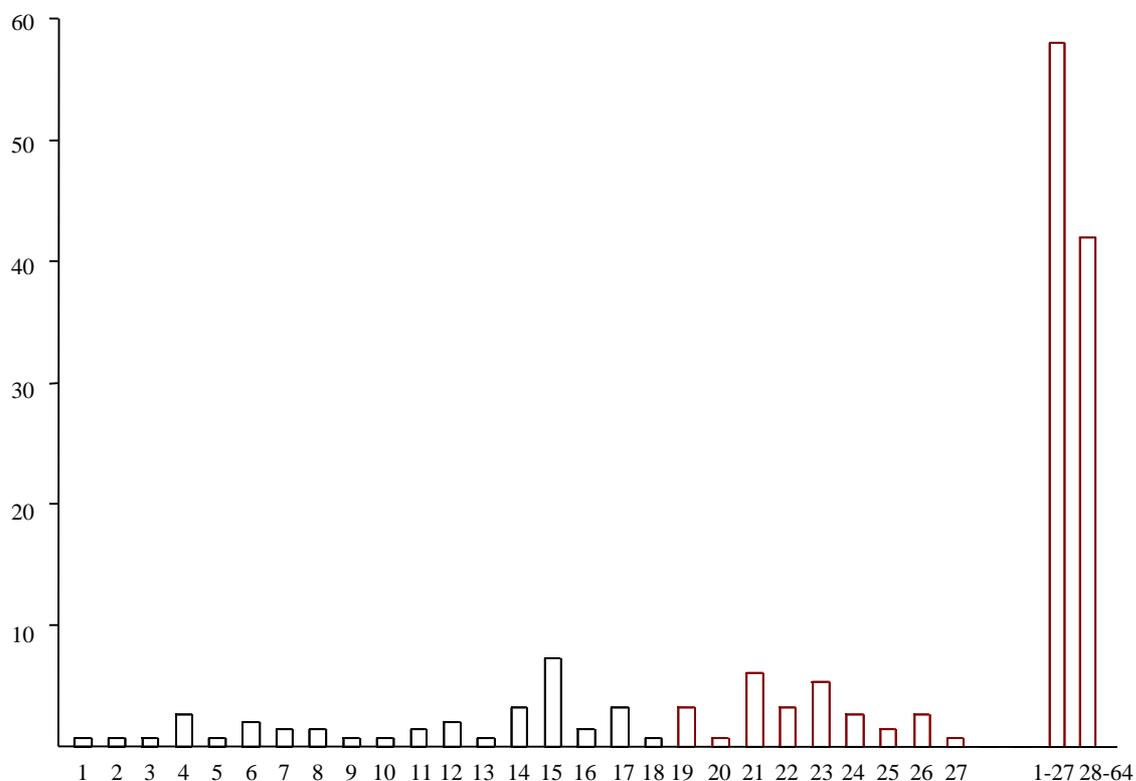
58% gesamt

Bei einer Spezifität von 100% wird eine Sensitivität von 58% gesamt erreicht. Das entspricht einem positiven Vorhersagewert von 100% und einem negativem von 67%.

Die Sensitivität läßt sich auf Kosten der Spezifität weiter steigern. Unter Hinzuziehung von zwei Mustern, bei denen RA-Patienten (N=6/9) als auch an Kollagenose Erkrankte (N=1/1) zu finden sind, sinkt die Spezifität auf 98% und steigt die Sensitivität auf 68%. Damit liegt der positive Vorhersagewert bei 98% und der negative bei 73%.

## Sensitivitäten der RA-spezifischen Antikörpermuster

Sensitivität [%] der Muster für die RA im Serum bestimmt



**Abb. 6:** Es werden die Sensitivitäten aller RA-spezifischen Muster gezeigt. Die rechten Balken stellen die Sensitivität der 27 RA-Muster (58%) den restlichen 37 nicht spezifischen Mustern gegenüber, die 42% der RA-Patienten erfassen.

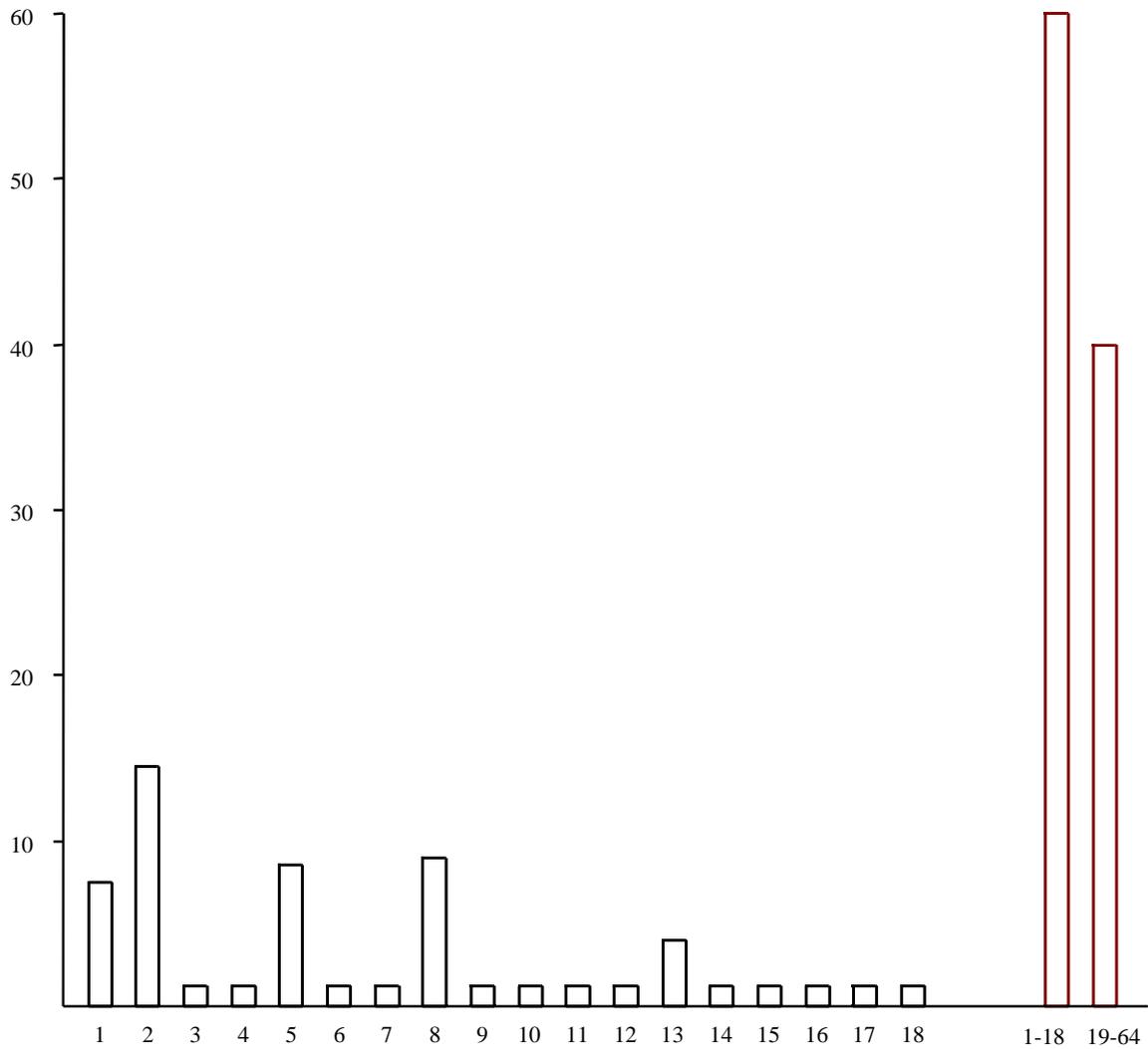
Die Untersuchung der Synovialflüssigkeiten zeigte 18 Muster, die ausschließlich bei RA-Patienten auftraten und 60% dieser Patienten erfaßten.

**Tab. 2:** RA-spezifische Antikörpermuster in der Synovialflüssigkeit und ihre Sensitivität für die RA.  
 Es werden alle 18 Muster gezeigt, die ausschließlich bei der Gruppe der RA-Patienten auftraten und bei keiner der Kontrollgruppen.

Muster Nr.	RF	Citr-Ak	Calr-Ak	Calp-Ak	BiP-Ak	RA33-Ak	Sensitivität in %
1	+	+	+	+	+	+	7,5
2	+	+	+	+	+	-	14,5
3	+	+	+	+	-	+	1,2
4	-	+	+	+	+	+	1,2
5	+	+	+	-	-	+	8,5
6	+	-	+	+	-	+	1,2
7	-	-	+	+	+	+	1,2
8	+	+	+	+	-	-	9,0
9	+	+	+	-	-	+	1,2
10	+	+	-	-	+	-	1,2
11	-	-	+	+	+	-	1,2
12	+	-	+	-	-	+	1,2
13	+	-	-	+	-	-	4,0
14	-	-	-	-	+	+	1,2
15	-	+	-	-	+	-	1,2
16	+	+	-	-	-	-	1,2
17	-	-	+	+	-	-	1,2
18	-	-	-	+	-	-	1,2
							60% gesamt

## Sensitivitäten der RA-spezifischen Antikörpermuster

Sensitivität [%] der Muster für die  
RA in der SF bestimmt



**Abb. 7:** Es werden die Sensitivitäten aller RA-spezifischen Muster gezeigt. Die rechten Balken stellen die Sensitivität der 18 RA-Muster (60%) den restlichen 46 nicht spezifischen Mustern gegenüber, die 40% der RA-Patienten erfassen.

Bei dem Vergleich der beiden Tabellen ist festzustellen, daß nur sieben RA-spezifische Muster im Serum als auch in der Synovialflüssigkeit zu finden sind.

**Tab. 3:** RA-spezifische Antikörpermuster im Serum und in der SF und ihre Sensitivität für die RA.

Es werden alle 7 Muster gezeigt, die ausschließlich in beiden untersuchten Kompartimenten bei der Gruppe der RA-Patienten auftraten und bei keiner der Kontrollgruppen.

RF	Citr-Ak	Calr-Ak	Calp-Ak	BiP-Ak	RA33-Ak	Sensitivität in % im Serum	Sensitivität in % in der SF
+	+	+	+	+	+	2,7	7,5
+	+	+	+	+	-	5,3	14,5
+	+	+	+	-	-	3,3	9,0
+	+	+	-	-	+	0,7	8,5
-	+	-	-	+	-	1,4	1,2
+	+	+	+	-	+	1,4	1,2
-	-	+	+	+	+	0,7	1,2
						16%	43%

### **Auswertungen der Autoreaktivitätsmuster mit logistischer Regression und CLASSIF 1**

Mit Hilfe einer logistischen Regression wurden die Wahrscheinlichkeiten einer richtigen Zuordnung in die Gruppe RA oder Kontrollen (SPO, SON, HEA, KGL) berechnet. Die Zuordnungswahrscheinlichkeiten wurden schrittweise mit den Variablen in der Reihenfolge Citr, RF, Calr, Calp und BiP erweitert. Jeder Schritt wurde mehrmals mit unterschiedlichen Patienten in den Lern- und Testgruppen ausgeführt. Zu erkennen war eine stetige Zunahme der gesamt richtig eingeordneten Patienten. Von Schritt zu Schritt näherten sich Sensitivität und Spezifität einander an.

Die erhobenen Daten wurden auch mit dem von Herrn Prof. G.K. Valet entwickelten Programm zur Clusteranalyse, CLASSIF 1, klassifiziert. Zuerst wurden die Ergebnisse von 20 randomisierten Patienten als Lernset eingegeben. Anhand dieser konnten sämtliche Patienten mittels CLASSIF 1 analysiert werden.

Die Auswertung ergab für die Synovialflüssigkeiten eine Spezifität von 88% und eine Sensitivität von 91%. Das ergibt einen positiven Vorhersagewert für die RA von 94% und einen negativen von 83%. Für die Seren sehen die Werte etwas schlechter aus mit einer Spezifität von 83% und einer Sensitivität von 77%. Der positive Vorhersagewert liegt bei 84% und der negative bei 75%.

Gegenüber dem Rheumafaktor als serologischem Marker liefert die Clusteranalyse ähnlich gute Resultate zur Trennung zwischen Patienten mit RA und ohne. Die Zusatzparameter erhöhen demnach zwar nicht die RA-Erkennung, sind aber für eine Krankheitsdifferenzierung nützlich. Bei der Analyse der SF konnten 10% der Patienten mit reaktiver Arthritis, 18% mit Osteoarthritis, 33% mit Psoriasis und 14% mit anderen rheumatischen Erkrankungen eindeutig identifiziert werden.

### RA-spezifische Autoantikörpermuster bei Patienten mit früher RA

Eine Erkrankungsdauer kleiner oder gleich einem Jahr wurde als frühe RA definiert. Dabei wurde der zeitliche Abstand der Erstdiagnose beziehungsweise dem anamnestisch ersten Auftreten charakteristischer Symptome bis zum Zeitpunkt der Untersuchung gemessen. Von den Patienten mit früher RA konnten auf Grund begrenzter Ressourcen bei insgesamt 61 Proben Untersuchungen auf RF, Citr-Ak, Calr-Ak, Calp-Ak, RA33-Ak als auch BiP-Ak durchgeführt werden.

Zwei Drittel aller Patienten mit früher RA (64%) exprimierte zwölf absolut RA-spezifische Autoantikörpermuster in der Sechsfachkombination. Acht dieser Muster decken aber nur 24% der Patienten mit manifesterter RA ab. Die 16 weiteren Muster, die die restlichen 34% der RA-Patienten zeigen, sind bei früher RA nicht nachweisbar. Auffällig ist das Fehlen einer Kombination bei der frühen RA, die Citr-AK aufweist ohne das Vorhandensein von RF. Nur bei manifesterter seronegativer RA treten auch Citr-Ak auf. Dieses Ergebnis sollte mit einer größeren Kohorte weiter überprüft werden.

**Tab. 4:** RA-spezifische Antikörpermuster im Serum und ihre Sensitivität für die frühe RA (fRA) und manifestierte RA (RA).

Es werden 8 Muster gezeigt, die ausschließlich in beiden untersuchten Gruppen der Patienten auftraten. Bei der manifestierten RA treten weitere 16 Muster auf, die nicht bei Patienten mit fRA zu finden sind.

RF	Citr-Ak	Calr-Ak	Calp-Ak	BiP-Ak	Sensitivität in % (fRA)	Sensitivität in % (RA)
+	+	+	-	-	1,6	4,0
+	+	-	-	-	11,3	1,4
+	+	-	-	+	9,7	3,3
+	+	-	+	-	8,0	0,7
+	+	-	+	+	16	8,7
+	-	+	+	+	1,6	4,7
+	-	-	+	+	3,2	0,7
-	-	+	+	+	1,6	0,7
					53%	24%

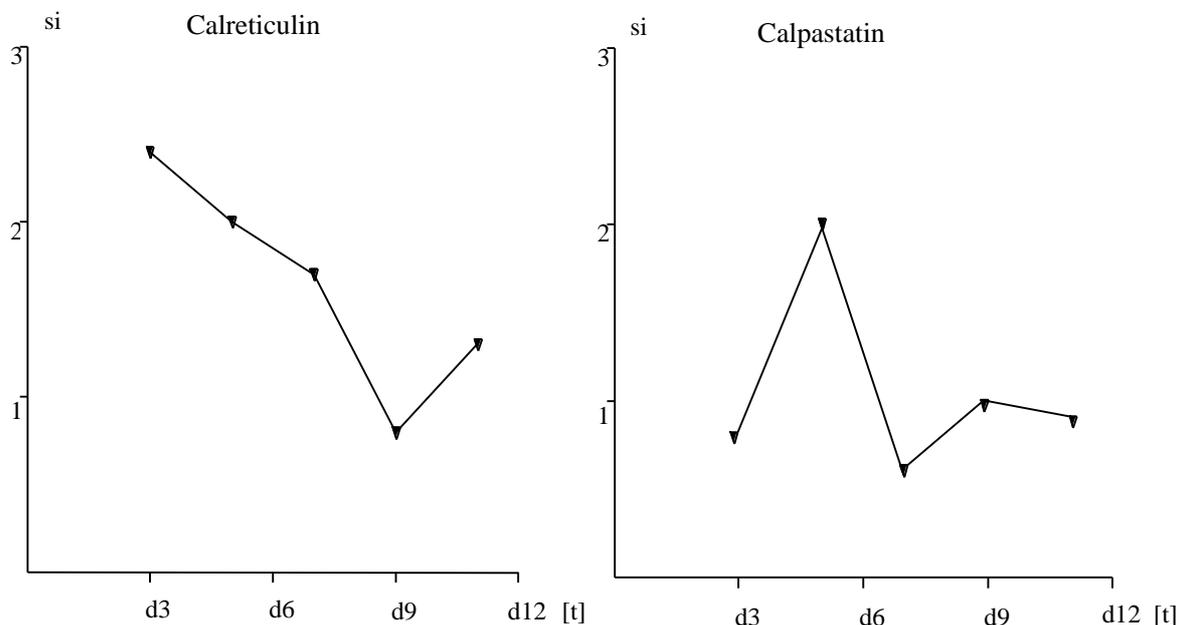
## **Zum Pathomechanismus**

Die Rolle der Autoantigene p205/IgG, Calreticulin, Calpastatin und BiP bei der Pathogenese der RA soll genauer untersucht werden. Welche Zelltypen sind mit diesen Autoantigenen assoziiert? Wo werden die Antigene verstärkt exprimiert und wo entfalten sie ihre Wirksamkeit? Die T-Zell-Reaktivität ist ein typisches Merkmal der RA. Daher liegt der Schwerpunkt dieser Untersuchungen auf antigenspezifische T-Zell-Klone.

## **Gedächtnis-Antwort oder schnelle Antwort vorstimulierter Zellen**

In diesen Versuchen sollte untersucht werden, ob die Proliferationsantwort gegen p205/IgG, Calreticulin und Calpastatin hauptsächlich eine sog. Gedächtnis-Antwort oder eine Antwort vorstimulierter Zellen ist. Da vorstimulierte T-Zellen bereits MHC Klasse II und den hochaffinen IL-2-Rezeptor exprimieren, sind sie schneller als unstimulierte T-Zellen in der Lage, nach einem Stimulus zu proliferieren. Wenn die genannten Antigene einen autoantigenen Charakter besitzen, sollte man bei RA-Patienten mit aktivierten T-Zellen eine schnelle Antwort erwarten. Die Untersuchung der Proliferationskinetik sollte darüber Auskunft geben, welche Art der Antwort hervorgerufen wird. Deshalb wurden PBMC von RA-Patienten über einen Zeitraum von zwölf Tagen inkubiert und von Tag drei bis Tag zwölf die T-Zell-Proliferation mittels <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbaus bestimmt. Bei einer akuten antigenspezifischen T-Zell-Reaktivität des jeweiligen Patienten würde ein Proliferationsmaximum innerhalb der ersten drei bis fünf Tage erwartet. Ein späteres Proliferationsmaximum spricht für eine Gedächtnis-Antwort von antigenspezifischen T-Zellen, die nicht akut stimuliert werden. T-Zellen von der Mehrzahl der RA-Patienten (10 von 13) zeigten nach p205/IgG-Stimulation die stärkste Proliferation am Tag drei, wie es für vorstimulierte T-Zellen typisch ist. Die anderen Patienten wiesen ein Proliferationsmaximum zwischen Tag sechs und acht auf, was für eine Antwort von Gedächtniszellen spricht. Die RA-Patienten, deren T-Zellen durch Calreticulin stimulierbar waren, hatten ihr Proliferationsmaximum zwischen Tag drei und fünf. Die RA-Patienten, deren T-Zellen durch Calpastatin stimulierbar waren, hatten ihr Proliferationsmaximum am Tag fünf. Dies weist darauf hin, daß vorstimulierte T-Zellen existieren, die schon in vivo Kontakt mit Calpastatin bzw. Calreticulin hatten. BiP-spezifische T-Zellen zeigten ihr Proliferationsmaximum am Tag 10, was einer Gedächtnis-Antwort entspricht. Es konnten keine Unterschiede zwischen PBMC und SFMC bezüglich ihrer Proliferationsantwort festgestellt werden.

## Proliferationskinetik gegen Calreticulin und Calpastatin

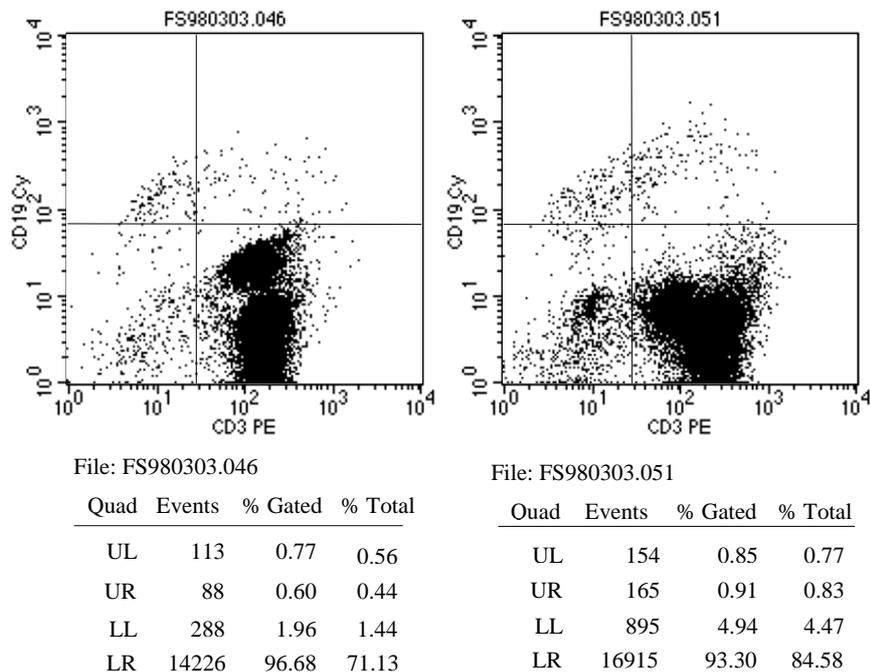


**Abb. 8:** Exemplarische Darstellung der Calreticulin- und Calpastatin-spezifischen T-Zell-Proliferationskinetik. Stimulationsindices der T-Zellen eines RA-Patienten gemessen an Tag 3 bis 12. Das Proliferationsmaximum liegt für Calreticulin bei Tag 3 bis 5 und für Calpastatin bei Tag 5.

### Analyse der Zellpopulationen, die durch p205/IgG zur Proliferation angeregt werden

Zur Klärung der Frage nach den Zelltypen, die durch die Antigenstimulation zur Proliferation angeregt werden, wurden PBMC von zehn RA-Patienten mit der p205/IgG-Fraktion GF II über einen Zeitraum von sechs Tagen inkubiert und täglich die Zellpopulationen markiert und gemessen. Parallel dazu erfolgte jeweils eine Inkubation mit PHA und eine Negativkontrolle. Um einen Überblick zu erhalten, ob in den Proliferationstests hauptsächlich T-Zellen vorhanden sind, wurden die Zellen doppelt mit anti-CD3 und anti-CD19-Antikörpern markiert. Die Messung und Analyse wurde am FACS durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß die Zellkulturbedingungen gut auf die Untersuchung von T-Zellen abgestimmt waren, da 95% aller Zellen T-Lymphozyten waren (d.h. sie sind CD3<sup>+</sup>) (Abb. 9). B-Zellen stellten nur einen Anteil von <2% an der Gesamtzellpopulation dar. Die Zunahme der CD3-Intensität (Verschiebung von  $2 \cdot 10^2$  zu  $3 \cdot 10^2$ ) zeigte eine Proliferation an.

### CD3/CD19-markierte Zellen ohne und mit p205/IgG-Stimulation

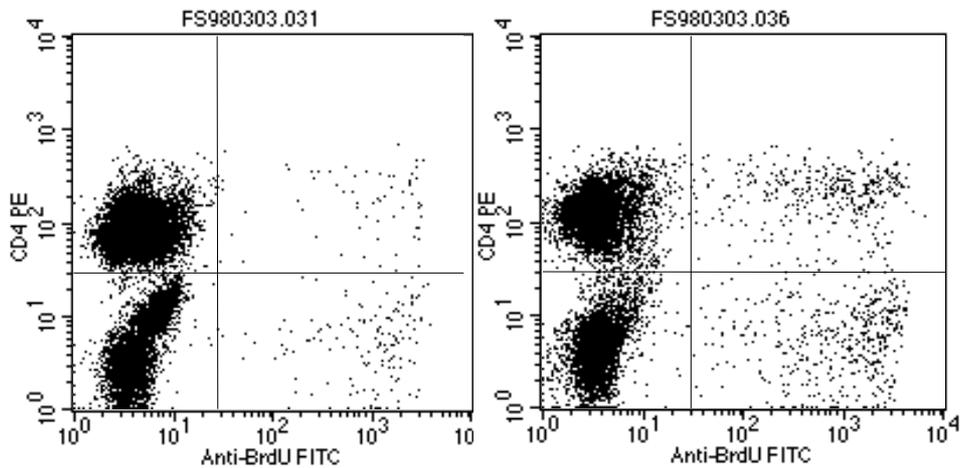


**Abb. 9:** Doppelanfärbung mit anti-CD3-PE und anti-CD19-CyPE (Quantum Red). Die linke Seite stellt eine Zellkultur ohne Antigen dar (Negativkontrolle). Rechts ist eine p205/IgG stimulierte Zellkultur zu sehen. 95% sind CD3<sup>+</sup> und <2% sind CD19<sup>+</sup>. Die Zunahme der CD3-Intensität (Verschiebung von ca.  $2 \times 10^2$  zu  $3 \times 10^2$ ) zeigt eine Proliferation an.

Zur Quantifizierung der Proliferation wurde 16 Stunden vor Beendigung der Inkubation anstelle von <sup>3</sup>H-Thymidin BrdU dazugegeben, das bei proliferierenden Zellen in die DNA eingebaut wird, d.h. BrdU-positive Zellen sind Zellen, die am letzten Tag der Inkubation proliferierten. Außerdem sollte die Zusammensetzung der T-Zell-Population genauer untersucht werden. Die entscheidende Frage war: Welche Zellen proliferieren unter Einfluß von p205/IgG? Nach der Markierung der Oberflächenproteine mit monoklonalen anti-CD3-, anti-CD4-, anti-CD8- und anti-CD19-Antikörpern und der Fixierung der Zellen wurde noch mit einem anti-BrdU-Antikörper markiert. Wie in den oben beschriebenen Versuchen festgestellt, war die p205/IgG-spezifische Proliferation am dritten Tag am stärksten. Es wurde zu dem Zeitpunkt der größte Anteil an BrdU-positiven Zellen ermittelt.

Beispielhaft sollen die Ergebnisse eines Patienten (Spender 11) genauer dargestellt werden. Insgesamt wurden durch die p205/IgG-Fraktion 8% der im Versuch eingesetzten PBMCs am Tag drei zur Proliferation angeregt. Von diesen 8% proliferierenden Zellen stellten mit 71% T-Zellen den Hauptanteil dar (Abb. 10-11). Das Verhältnis von proliferierenden CD4<sup>+</sup>- zu CD8<sup>+</sup>-Zellen ist fast 2:1 (hier proliferierten genau 45% CD4<sup>+</sup>- und 26% CD8<sup>+</sup>-Zellen). Im Versuchsansatz ohne Stimulation proliferierten 1% der PBMCs am Tag drei. Davon stellten mit 72% ebenfalls die T-Zellen den Hauptanteil dar. Das Verhältnis von CD4<sup>+</sup>- zu CD8<sup>+</sup>-Zellen betrug aber im Gegensatz zur p205/IgG-Stimulation 1:1 (35% CD4<sup>+</sup>- und 37% CD8<sup>+</sup>-Zellen).

### CD4/Anti-BrdU-markierte Zellen ohne und mit p205/IgG-Stimulation



File: FS980303.031

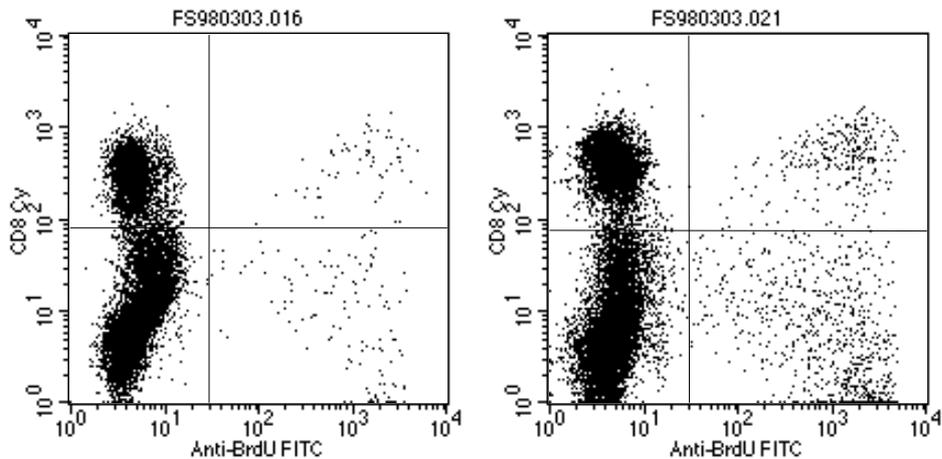
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	8068	58.96	40.34
UR	65	0.48	0.33
LL	5408	39.52	27.04
LR	143	1.05	0.71

File: FS980303.036

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	5863	55.03	38.97
UR	383	3.59	2.55
LL	3948	37.06	26.24
LR	460	4.32	3.06

**Abb. 10:** Doppelfärbung von PBMC mit anti-CD4-PE und anti-BrdU-FITC. BrdU<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Zellen (d.h. proliferierte T-Helfer-Zellen) sind jeweils im rechten oberen Quadranten (UR) dargestellt. Das linke Bild zeigt die Negativkontrolle und das rechte PBMC nach p205/IgG-Stimulation am Tag drei.

### CD8/Anti-BrdU-markierte Zellen ohne und mit p205/IgG-Stimulation



File: FS980303.016

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	4278	30.75	21.39
UR	64	0.46	0.32
LL	9442	67.86	47.21
LR	129	0.93	0.65

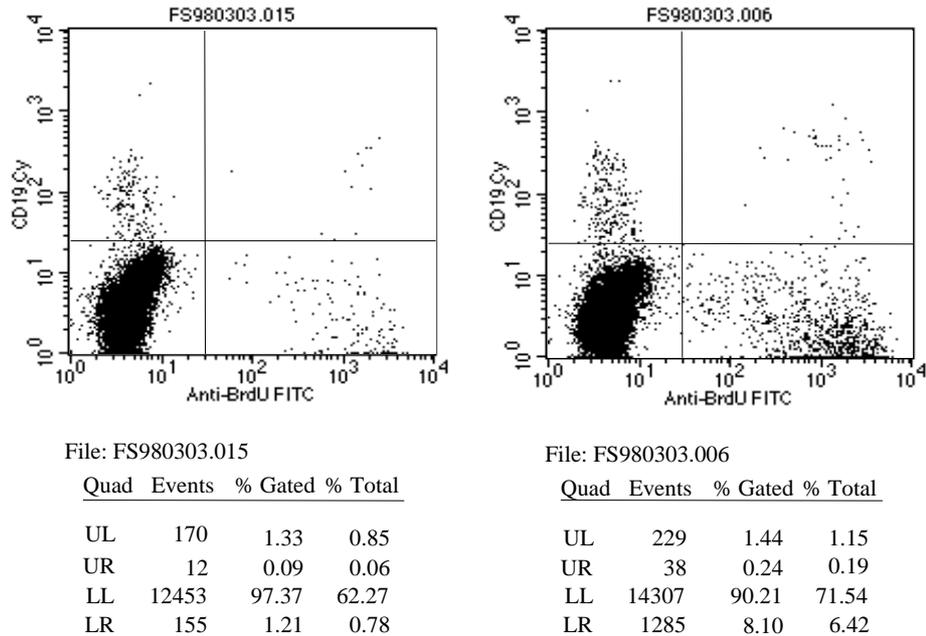
File: FS980303.021

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	4597	30.60	22.98
UR	282	1.88	1.41
LL	9359	62.30	46.79
LR	785	5.23	3.92

**Abb. 11:** Doppelfärbung von PBMC mit anti-CD8-CyPE und anti-BrdU-FITC. BrdU<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen (d.h. proliferierte CD8<sup>+</sup>-T-Zellen) sind jeweils im rechten oberen Quadranten (UR) dargestellt. Das linke Bild zeigt die Negativkontrolle und das rechte PBMC nach p205/IgG-Stimulation am Tag drei.

Die Proliferation von B-Zellen dagegen ist entsprechend des Versuchsansatzes sehr gering und wurde über anti-BrdU- und anti-CD19-Färbung ermittelt. 3% der proliferierenden Zellen nach p205/IgG-Stimulation waren am Tag drei CD19<sup>+</sup> (Abb. 12).

### CD19/Anti-BrdU-markierte Zellen ohne und mit p205/IgG-Stimulation



**Abb. 12:** Doppelfärbung von PBMC mit anti-CD19-CyPE und anti-BrdU-FITC. BrdU<sup>+</sup>- und CD19<sup>+</sup>-Zellen (d.h. proliferierte B-Zellen) sind jeweils im rechten oberen Quadranten (UR) dargestellt. Das linke Bild zeigt die Negativkontrolle und das rechte PBMC nach p205/IgG-Stimulation am Tag drei.

Die Mitogenstimulation mit PHA ließ 49% der PBMC proliferieren. Das Verhältnis von proliferierenden CD4<sup>+</sup>- zu CD8<sup>+</sup>-Zellen war fast genau 2:1 (61% CD4<sup>+</sup>- und 31% CD8<sup>+</sup>-Zellen). Der Anteil der proliferierenden B-Zellen betrug nur 2%.

Letztendlich kann aber über eine Restpopulation von Zellen noch keine exakte Aussage gemacht werden. 21% der proliferierenden Zellen aus unstimulierter Kultur, 26% aus p205/IgG-stimulierter Kultur und 6% aus PHA-stimulierter Kultur ließen sich zwar mit anti-CD3-Antikörpern markieren, aber nicht mit anti-CD4- bzw. CD8-Antikörpern. Dabei handelt es sich teilweise um dendritische Zellen.

Der Vergleich der zehn RA-Patienten zeigte, daß das Verhältnis von CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup>-Zellen teilweise sehr unterschiedlich sein kann. Bei acht von zehn Patienten stieg der Anteil der proliferierenden T-Helfer-Zellen im Vergleich zu den proliferierenden zytotoxischen T-Zellen nach p205/IgG-Stimulation um 25% bis über 100% an. Bei einem Patienten änderte sich dieses Verhältnis nicht und bei einem Patienten konnte wegen eines fehlenden Wertes (nicht gemessene Anzahl der CD8<sup>+</sup>-Zellen) keine Aussage dazu gemacht werden (Tab. 5).

**Tab. 5:** Anteil der proliferierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen von zehn RA-Patienten nach p205/IgG-Stimulation und in der Negativkontrolle am Tag drei.

<u>Patient</u>	<u>ohne Stimulation</u>			<u>nach GF II-Stimulation</u>		
	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	Verhältnis CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	Verhältnis CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
223	42%	18%	2:1	22%	10%	2 :1
232	25%	14%	2:1	53%	22%	2,5 :1
262	11%		?	45%	17%	2,5 :1
258	33%	33%	1:1	65%	34%	2 :1
253	74%	14%	5:1	32%	9 %	3,5 :1
285	22%	17%	1:1	66%	23%	2,8 :1
266	45%	15%	3:1	45%	6 %	7,5 :1
261	15%	15%	1:1	27%	14%	2 :1
299	44%	16%	3:1	64%	13%	4,9 :1
11	31%	33%	1:1	45%	26%	2 :1

p205/IgG regt in PBMC-Kulturen hauptsächlich T-Zellen zur Proliferation an. Der Anteil der T-Helfer-Zellen (CD4<sup>+</sup>) steigt im Vergleich zu den zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>).

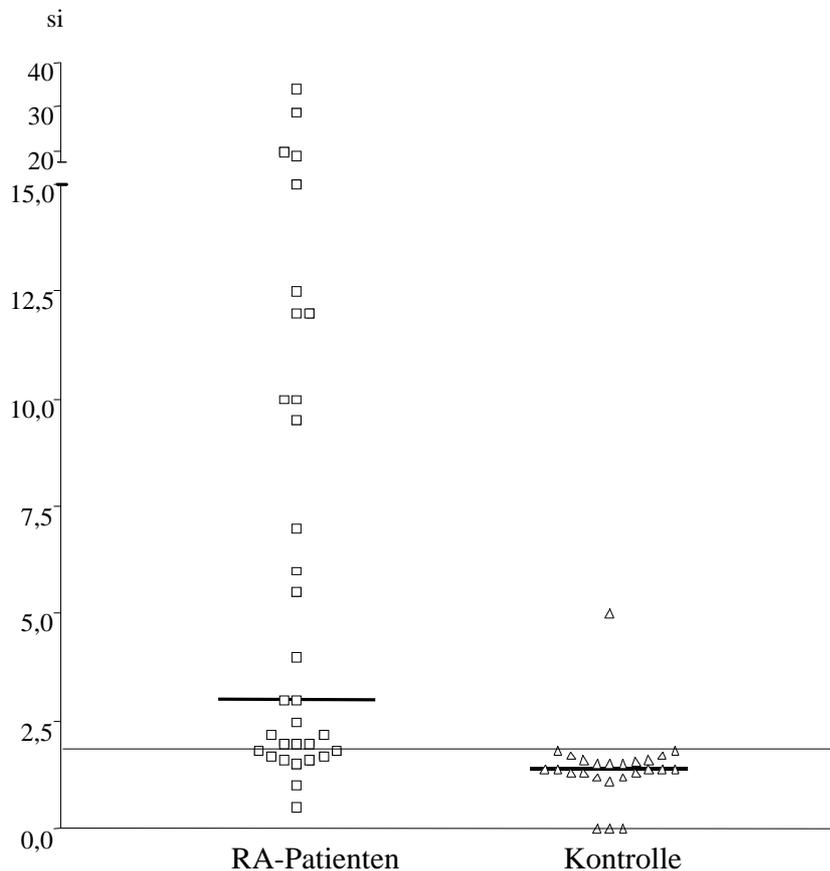
#### **Sensitivität und Spezifität von antigenspezifischen T-Zellen für die RA**

p205/IgG wurde in einer biologisch aktiven Form angereichert. Nach der quantitativen Proteinbestimmung nach Bradford wurde die Gesamtproteinkonzentration einmalig so eingestellt, daß damit reaktive T-Zellen stimuliert werden konnten. Im Proliferationstest wurden pro well 10<sup>5</sup> PBMC eingesetzt. Die Gesamtkonzentration an verwendetem Protein betrug 300ng pro well. Es wurden PBMC von RA-Patienten, von Gesunden und von Patienten mit anderen rheumatischen Erkrankungen eingesetzt. Als Kontrollantigen kam das 64k Protein zum Einsatz, und die Inkubation dauerte drei Tage. Das 64k Protein zeigte in einer früheren Studie eine T-Zell-Stimulierbarkeit bei RA-Patienten und ruft eine Antwort der Gedächtnis-Zellen hervor. PBMC gesunder Spender reagierten nicht auf p205/IgG oder auf das 64k-Protein. Ihre Proliferation unter p205/IgG-Einfluß und Kontrollantigen entsprach der Negativkontrolle.

Es wurden PBMC von 45 RA-Patienten in einem Proliferationstest auf p205/IgG-reaktive T-Zellen untersucht. 43 Patienten waren RF-positiv und zwei Patienten wiesen eine RF-negative RA auf. 70% (n=31) der RA-Patienten zeigten eine p205/IgG-stimulierte Proliferation in Kombination mit exogen zugeführtem IL-2. 5% (n=2) dieser Gruppe zeigten eine stark unterdrückte Reaktion mit IL-2. Die Proliferation lag unter der von der Negativkontrolle. Die übrigen 25% (n=12) reagierten nicht auf p205/IgG. Die Stimulationseffekte waren höher gegenüber der Kontrollgruppe. Die Sensitivität liegt somit bei 70%. Einer der zwei Patienten, die RF-negativ waren, zeigte keine Proliferationsantwort und der andere zeigte eine supprimierte Reaktion, d.h. die Stimulation war geringer als ohne Antigen. Von den Patienten mit anderen rheumatischen Erkrankungen (die genaue Charakterisierung dieser Gruppe siehe

Methodenteil) reagierten 5% (n=1) auf die p205/IgG-Fraktion. Dieser Patient wies eine Psoriasis-Arthritis auf. Die Spezifität p205/IgG-reaktiver T-Zellen für die RA liegt somit bei 96%.

### Stimulationsindices nach p205/IgG-Stimulation



**Abb. 13:** Es sind die Stimulationsindices von PBMC von 32 RA-Patienten und 26 Patienten anderer rheumatischer Erkrankungen dargestellt. Der Stimulationsindex von zwei stellt den cut off dar (waagerechte Markierung).

Für die Proliferationstests mit Calreticulin, Calpastatin bzw. BiP wurden pro well  $2 \cdot 10^5$  PBMC eingesetzt. Die Gesamtkonzentration an verwendetem Protein betrug  $0,3\mu\text{g}$  natives Calreticulin,  $0,1\mu\text{g}$  BiP bzw.  $0,1\mu\text{g}$  Calpastatin-Fragment pro well. Das verwendete Azethyl-Calpastatin-Fragment ist ein Peptid mit 27 AS aus dem Bereich von humanem Calpastatin AS 184-210. Dieses Teilstück weist eine stark hemmende Wirkung auf Calpain I und II auf. Es wurden PBMC von RA-Patienten, von Gesunden und von Patienten mit anderen rheumatischen Erkrankungen eingesetzt. Der Cut-Off für die Reaktivität auf das jeweilige Antigen wurde bei einem Stimulationsindex von zwei angesetzt. Er liegt somit doppelt so hoch über dem höchsten gemessenen Stimulationsindex der Negativkontrolle und ist damit signifikant ( $p < 0,0001$ , Whitney-U-Test). Ausgehend von dem festgelegten Cut-Off für eine stimulative Reaktivität (Verdopplung der cpm gegenüber der Negativprobe), wurde bei einer

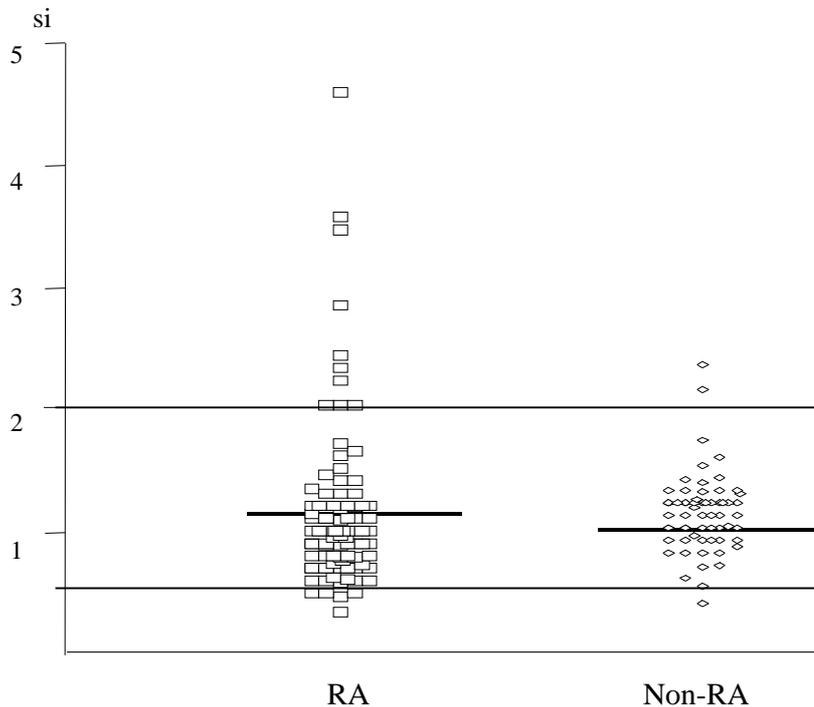
Halbierung der cpm gegenüber der Negativprobe (si 0,5) von einer spezifischen Suppression gesprochen.

Für die Untersuchung auf Calreticulin-spezifische T-Zellen wurden PBMC von 90 RA-Patienten in einem Proliferationstest verwendet. Das Screening zeigte, daß bei Calreticulin zehn der untersuchten RA-Patienten eine Reaktivität aufwiesen. Die maximalen Stimulationsindices blieben unter fünf. Vergleichbare Indices sind im Zusammenhang mit der RA auch bei anderen Antigenen bekannt. Die Werte unter Stimulation mit Synovialflüssigkeit bzw. p205/IgG liegen aber deutlich höher. Die T-Zellen von fünf untersuchten RA-Patienten zeigten eine Calreticulin-spezifische Suppression, die Proliferation sank auf die Hälfte des Mediumwertes (si 0,5). Diese antigenspezifische Suppression war auch in den Vergleichsgruppen zu beobachten.

Die Kontrollgruppe bestand aus 61 Non-RA-Patienten. Acht gesunden Probanden standen 9 Psoriasis-, 10 Sjögren-, 7 SLE-, 14 Sklerodermie- und 13 reaktive Arthritis-Patienten gegenüber. Jeweils ein Patient mit Psoriasisarthritis, Sjögrensyndrom, Sklerodermie und reaktiver Arthritis zeigte Stimulationsindices 0,5. Ein SLE Patient und ein gesunder Proband wurden mit einem Stimulationsindex von 0,6 getestet. Es scheint somit, daß suppressive Effekte Calreticulins nicht spezifisch für RA sind. Anders stellt es sich bei der stimulativen Wirkung dar. Von 61 Non-RA Proben sind lediglich die T-Zellen von zwei Patienten mit reaktiver Arthritis durch Calreticulin deutlich stimulierbar.

Die Sensitivität Calreticulin-spezifischer T-Zellen für RA lag, unter den geschilderten Bedingungen, bei 11%. Die Spezifität läßt sich mit 97% beziffern.

## Stimulationsindices nach Calreticulin-Stimulation



**Abb. 14:** Patientenscreening auf T-Zell-Reaktivität gegen Calreticulin.

PBMC von Patienten mit RA, Psoriasis, Sjögrensyndrom, SLE, Sklerodermie, reaktiver Arthritis sowie Gesunde wurden getestet. Alle Gruppen außer RA wurden zu Non-RA zusammengefasst. Der Cut-Off liegt für eine Stimulation bei zwei und für eine Suppression bei 0,5.

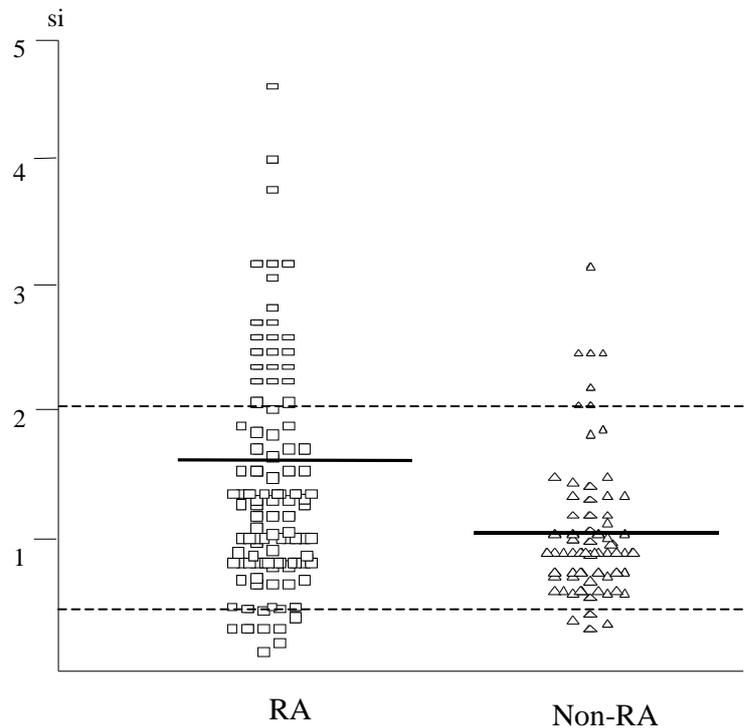
Die statistische Überprüfung erfolgte mit dem unpaarigen T-Test mit Korrektur nach Welch. Demnach ist die Proliferationsabweichung der RA-Kohorte signifikant gegenüber der Vergleichsgruppe ( $p < 0,001$  / F-Test:  $p < 0,0001$ ).

Um die Bedeutung von Calpastatin für die RA zu analysieren, wurden PBMC von 112 RA-Patienten in einem Proliferationstest auf Calpastatin-reaktive T-Zellen untersucht. Das Screening zeigte, daß bei 17% der untersuchten RA-Patienten eine Reaktivität gegenüber Calpastatin vorlag. Die maximalen Stimulationsindices blieben unter vier. Die T-Zellen von 12% der untersuchten RA-Patienten zeigten eine Calpastatin-spezifische Suppression, die Proliferation sank auf einen si 0,5. Diese antigenspezifische Suppression war auch mit 6% in der Non-RA-Gruppe zu beobachten.

Die Kontrollgruppe bestand aus 63 Non-RA-Patienten. Neun gesunden Probanden standen 15 Psoriasis-, 10 Sjögren-, 8 SLE-, 12 Sklerodermie- und 9 reaktive Arthritis-Patienten gegenüber. Von den Non-RA Proben sind ebenfalls die T-Zellen von 7,5% der Patienten durch Calpastatin deutlich stimulierbar. Zellen gesunder Probanden zeigten keinerlei Reaktion.

Die Sensitivität Calpastatin-spezifischer T-Zellen für RA lag, unter den geschilderten Bedingungen, bei 17%. Die Spezifität läßt sich mit 93% beziffern.

### Stimulationsindices nach Calpastatin-Stimulation



**Abb. 15:** Patientenscreening auf T-Zell-Reaktivität gegen Calpastatin.

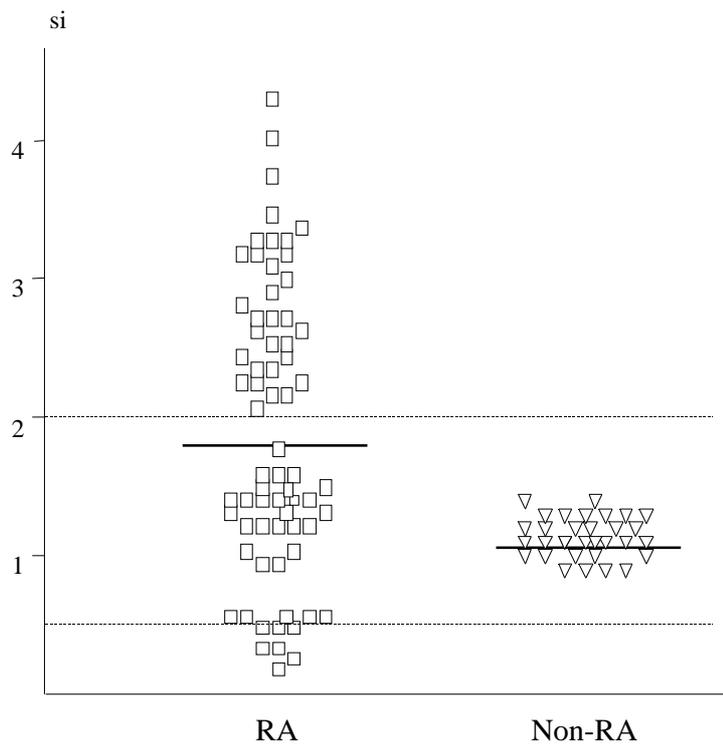
PBMC von Patienten mit RA, Psoriasis, Sjögrensyndrom, SLE, Sklerodermie, reaktiver Arthritis sowie Gesunde wurden getestet. Alle Gruppen außer RA wurden nochmals zu Non-RA zusammengefasst. Der Cut-Off liegt für eine Stimulation bei 2 und für eine Suppression bei 0,5.

Um BiP-reaktive T-Zellen zu untersuchen, wurden PBMC von 76 RA-Patienten in einem Proliferationstest eingesetzt. Das Screening zeigte, daß bei 59% der untersuchten RA-Patienten eine Reaktivität gegenüber BiP vorlag. Die maximalen Stimulationsindices blieben unter fünf. Die T-Zellen von 18% der untersuchten RA-Patienten zeigten eine BiP-spezifische Suppression, die Proliferation sank auf einen si 0,5.

Die Kontrollgruppe bestand aus 37 Non-RA-Patienten und Gesunden. Keiner dieser Probanden zeigte eine Reaktion auf BiP.

Die Sensitivität BiP-spezifischer T-Zellen für RA lag, unter den geschilderten Bedingungen, bei 59%. Die Spezifität läßt sich hier mit 100% beziffern.

## Stimulationsindices nach BiP-Stimulation



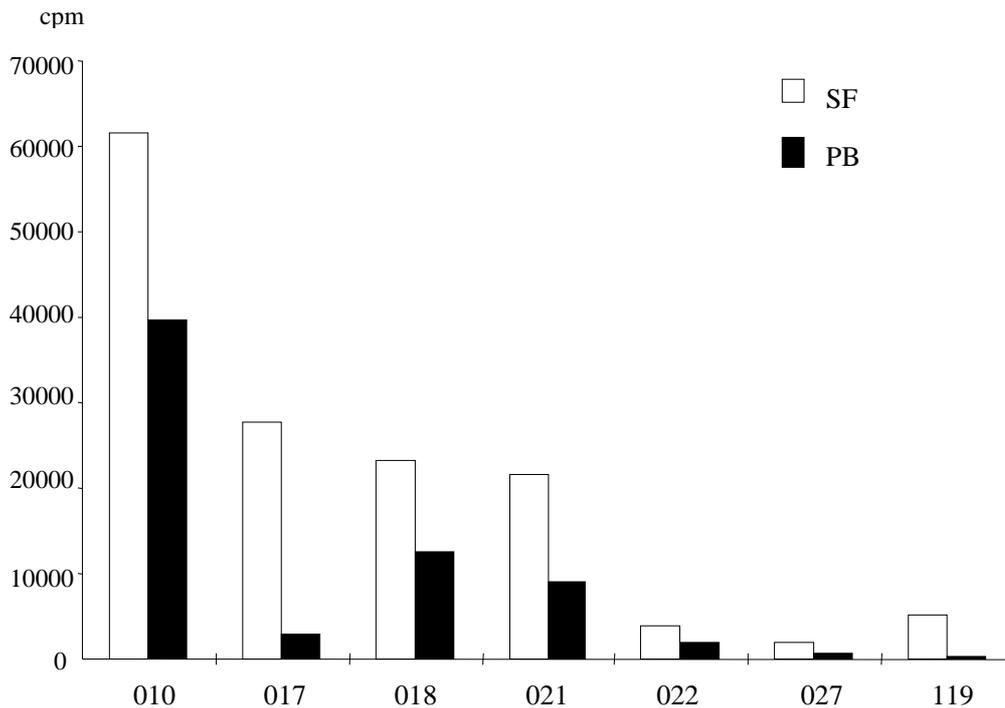
**Abb. 16:** Patientenscreening auf T-Zell-Reaktivität gegen BiP.

PBMCs von Patienten mit RA und Kontrollen (Psoriasis, Sjögrensyndrom, SLE, Sklerodermie, reaktiver Arthritis sowie Gesunde) wurden getestet. Nur die PBMC von RA-Patienten zeigten eine Reaktivität. Der Cut-Off liegt für eine Stimulation bei 2 und für eine Suppression bei 0,5.

### Reaktion von T-Zellen unterschiedlicher Kompartimente eines Spenders

Es sollte untersucht werden, ob p205/IgG-spezifische T-Zellen am Ort der Entzündung in größerer Anzahl als in der Peripherie zu finden sind, wie es zu erwarten wäre, wenn diesen T-Zellen eine pathogenetische Bedeutung für die RA zukäme. Deshalb wurden PBMC und SFMC von sieben RA-Patienten isoliert und mit p205/IgG stimuliert. Die Blutabnahme bei den Patienten erfolgte am selben Tag der Gelenkpunktion. Die Inkubationsdauer betrug drei Tage. Die Proliferationsantwort der SFMC war bei allen Patienten höher als die Antwort ihrer PBMC.

### p205/IgG-Stimulation von SFMC und PBMC



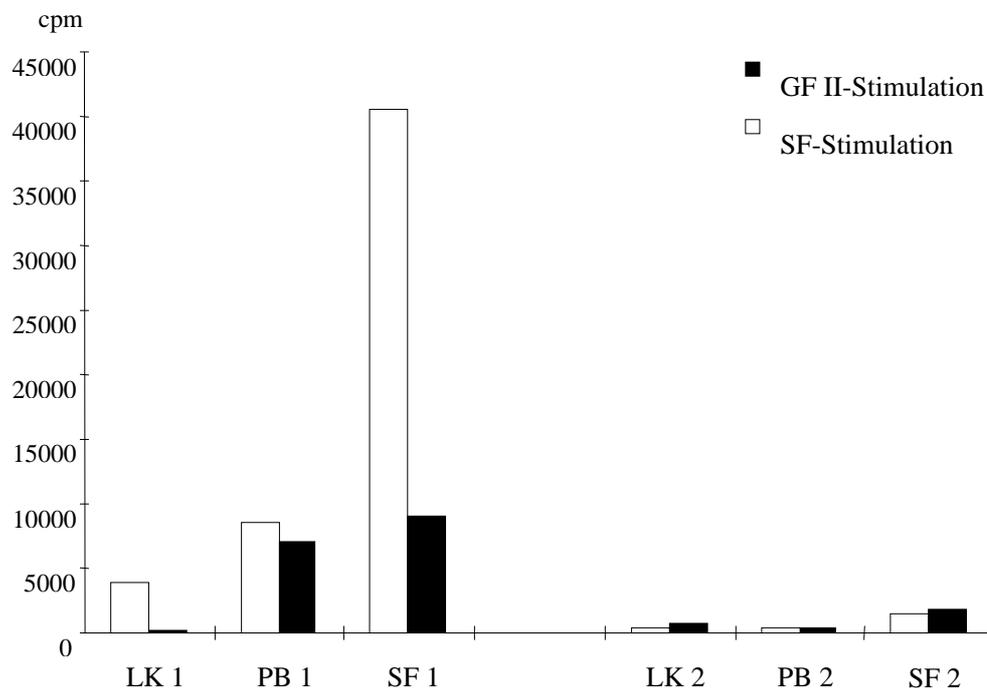
**Abb. 17:** Stimulation mit p205/IgG-Fraktion von SFMC und PBMC von sieben RA-Patienten. Die Proliferation ist in counts per minute (cpm) minus Hintergrund angegeben.

Außerdem wurden T-Zellen aus axillaren Lymphknoten von zwei RA-Patienten isoliert und bezüglich ihrer Proliferationsantwort auf p205/IgG mit PBMC und SFMC derselben Patienten verglichen. Die Zellen wurden mit p205/IgG als auch mit rheumatischer SF stimuliert und über drei Tage kultiviert.

Die SFMC der ersten RA-Patientin zeigten eine signifikant stärkere Proliferation als die T-Zellen des Lymphknotens (LK1), ( $p < 0,001$ , Fischer's Exakt-Test). Die Zellen reagierten teilweise bedeutend stärker auf angereichertes p205/IgG als auf SF.

Dieser Versuch wurde ebenso mit T-Zellen einer anderen RA-Patientin durchgeführt und erbrachte qualitativ das gleiche Ergebnis, jedoch mit generell niedrigeren Stimulationswerten. Zwischen der Stimulation mit SF oder p205/IgG gab es bei dieser Patientin keinen Unterschied. Die Ergebnisse zeigten für beide Patienten eine signifikant stärkere Proliferation der SFMC gegenüber den PBMC, wobei sich die Stimulationswerte der Patienten deutlich unterschieden.

## p205/IgG-Stimulation von SFMC, PBMC und Zellen eines axillaren Lymphknotens



**Abb. 18:** Proliferation von Zellen aus Lymphknoten (LK), aus Synovialflüssigkeit (SF) und peripherem Blut (PB) zweier RA-Patienten nach Stimulation mit SF und p205/IgG. Die Darstellung erfolgt in cpm minus Hintergrund-Proliferation.

Von sechs weiteren RA-Patienten wurden ebenfalls mononukleäre Zellen aus der Synovialflüssigkeit und PBMC gewonnen, um sie auf ihre Autoreaktivität gegenüber Calreticulin zu untersuchen. Dazu wurde humanes, natives Calreticulin verwendet. Die Messung erfolgte am fünften Tag.

Bei zwei RA-Patienten waren die SFMC autoreaktiv, ohne daß die PBMC proliferierten.

### **Effekt der Leukapherese auf die stimulatorische Wirkung von GF II auf T-Zellen**

Der Versuch sollte zeigen, ob die Leukapherese (Entfernung des Großteils der Lymphozyten aus dem peripheren Blut) einen biologischen Effekt auf die p205/IgG-induzierte Proliferation hat und ob sich danach zumindest zeitweise eine T-Zell-Population etabliert, auf die p205/IgG eine andere stimulatorische Wirkung ausübt. Es wurden PBMC einer RA-Patientin von der ersten und dritten Leukapherese isoliert, mit p205/IgG stimuliert und drei Tage inkubiert. Während die PBMC der ersten Leukapherese sehr stark proliferierten, ist die Proliferation der PBMC der dritten Leukapherese auf das Niveau des Hintergrundes gesunken. Die allgemeine Stimulationsfähigkeit wurde kaum beeinflusst, was mit PHA nachweisbar war. Eine Wiederholung der Behandlung mit fünf Leukapheresen nach zwei Monaten bei derselben Patientin zeigte, daß die T-Zell-Stimulation das Ausgangsniveau der ersten Messung fast wieder erreicht hatte. Im Laufe des erneuten Behandlungszyklus' nahm die

Proliferationsantwort mit jedem Meßpunkt ab. Im Gegensatz dazu zeigte die Antwort der SFMC, die nach der fünften Leukapherese des zweiten Zyklus' isoliert wurden, daß mit p205/IgG stimulierbare T-Zellen nach wie vor in einer großen Anzahl in der SF vorkamen.

### **Vergleich der stimulatorischen Wirkung von p205/IgG aus rheumatischer SF und aus traumatischer SF auf PBMC von RA-Patienten**

Es wurde die stimulatorische Wirkung von p205/IgG, die zum einen aus Synovialflüssigkeit von Patienten mit traumatischen Schädigungen und zum anderen aus Synovialflüssigkeit von RA-Patienten angereichert wurde, jeweils auf die PBMC derselben Patientengruppe untersucht. Die Proliferation wurde nach drei und acht Tagen gemessen. Die PBMC stammten von drei RA-Patienten. Das Proliferationsmaximum verschob sich bei diesen drei Probanden signifikant von Tag drei mit p205/IgG aus rheumatischer SF zu Tag acht mit p205/IgG aus traumatischer SF. Die statistische Überprüfung erfolgte mit dem Fischer's Exakt-Test ( $p < 0,001$ ). Das Proliferationsmaximum war ausschließlich abhängig von der Herkunft der p205/IgG-Fraktion (rheumatischen gegenüber traumatischen Ursprungs).

### **Korrelation zwischen der B- und T-Zell-Antwort gegenüber Calreticulin**

Bei 42 Patienten erfolgte sowohl eine Untersuchung auf Calreticulin-spezifische Autoantikörper im Serum, als auch die Überprüfung auf T-Zell-Reaktivität gegenüber Calreticulin. Die Proben für das Serum und das heparinisierte Vollblut, aus dem die PBMC isoliert wurden, entstammten der gleichen Blutentnahme.

Die Patientenpopulation ließ sich in 34 Patienten mit RA und in jeweils vier Patienten mit Sklerodermie bzw. Arthritis psoriatica unterteilen. Die beiden letztgenannten Gruppen zeigten bei allen Patienten eine negative B- und T-Zellantwort gegenüber Calreticulin. Von den RA-Patienten waren 75% Calreticulin-Ak-positiv. Wohingegen auf T-Zell-Ebene nur bei vier RA-Patienten Calreticulin-reaktive T-Zellen nachgewiesen wurden (12%). Drei dieser Patienten besaßen auch Calreticulin spezifische Antikörper.

### **T-Zell-Restriktion gegenüber MHC-Klasse II**

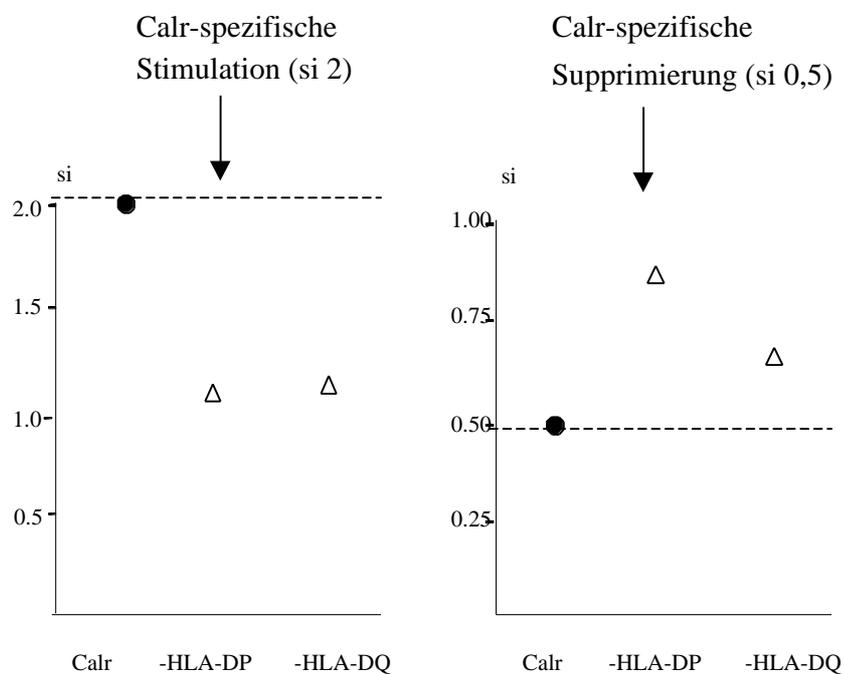
PBMC von acht RA-Patienten wurden unter Bedingungen kultiviert, die äquivalent zu den Proliferationstests mit Calreticulin, Calpastatin bzw. BiP waren. Zusätzlich wurden jeweils PBMC mit blockierenden Konzentrationen von Anti-HLA-DP-, -DQ- und -DR-Antikörpern (400µg/ml) versetzt. Hiermit sollte überprüft werden, ob durch Blockierung dieser für die Antigenpräsentation zuständigen Strukturen Veränderungen in der antigenspezifischen T-Zell-Proliferation auftreten.

Die Anti-HLA-Antikörper bewirkten bei Calreticulin-stimulierten Kulturen heterogene Veränderungen der T-Zell-Proliferation, wobei sich hier zwei Reaktionsmuster herauskristallisierten. Bei den Spendern, deren Stimulationsindex größer als eins war, kam es, in mehr oder weniger stark ausgeprägter Form, durch Anti-HLA-DP- bzw.-DQ-Antikörper zu einer Reduzierung des Stimulationsindex. Es kann somit angenommen werden, daß die Inhibition der Antigenpräsentation bei B-Zellen, Monozyten und Macrophagen zu einer Hemmung der Calreticulin-spezifischen T-Helferzell-Proliferation führte.

Im Fall von zwei RA-Patienten, die suppressiv auf Calreticulin reagierten (si 0,5), führten dieselben Antikörper zu einer Erhöhung des Stimulationsindex. Durch Blockierung der Antigenpräsentation via MHC-Klasse II-Moleküle kam es hier zu einer verstärkten Proliferation, was mit dem Vorhandensein Calreticulin-spezifischer Suppressorzellen erklärt werden könnte.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es bei der Patientenpopulation, in welcher die T-Zellen suppressiv auf Calreticulin reagierten, durch die Anti-HLA-DP- und -DQ-Antikörper zu einer Verstärkung der T-Zell-Proliferation kam, wohingegen bei den T-Zellen, die durch Calreticulin stimuliert wurden, eine Inhibition stattfand. Aufgrund der Inhibition der Antigenpräsentation über Anti-MHC-Antikörper konnte somit nachgewiesen werden, daß die T-Zell-Proliferation prinzipiell HLA-restringiert ist.

### HLA-Restriktion der T-Zell-Proliferation nach Calreticulin-Stimulation



**Abb. 19:** HLA-Restriktion der T-Zell-Proliferation nach Calr-Stimulation. Exemplarisch ist die HLA-Restriktion für einen RA-Patienten dargestellt, dessen T-Zellen Calr-spezifisch stimuliert wurden (si 2). Die T-Zellen eines weiteren RA-Patienten waren Calr-spezifisch supprimiert (si 0,5).

**links:** Durch die Blockierung der MHC-Klasse II-Moleküle mit -HLA-DP/DQ auf den antigenpräsentierenden Zellen kam es im Fall der T-Zellen des Patienten, die vorher durch Calr stimuliert wurden, zu einem Verlust dieser Eigenschaft (der Stimulationsindex fällt auf Werte zwischen 1 und 1,5).

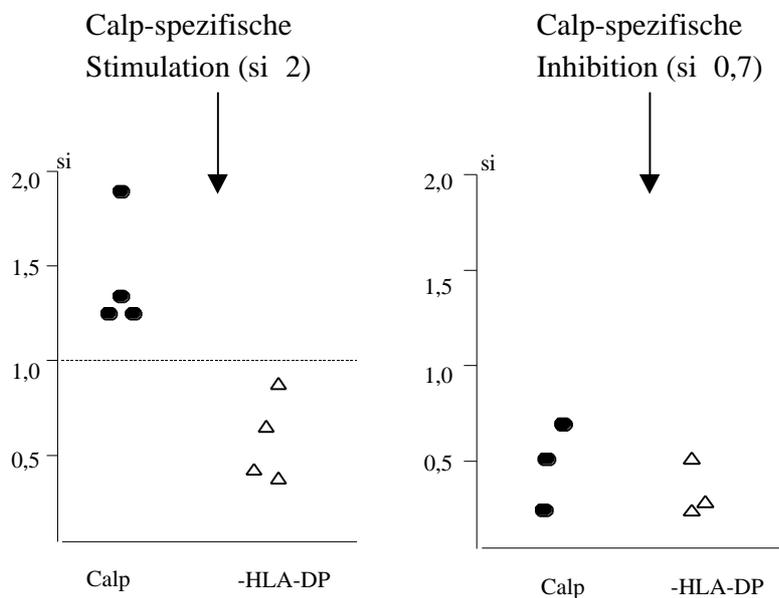
**rechts:** Bei den T-Zellen, die durch Calr supprimiert waren, führten dieselben -MHC-Antikörper zu einer Abschwächung dieser Suppression.

Bei Calpastatin-stimulierten Kulturen, deren Stimulationsindex größer als eins war, kam es, in mehr oder weniger stark ausgeprägter Form, durch Anti-HLA-DP-Antikörper zu einer Reduzierung des Stimulationsindex'. Es kann somit angenommen werden, daß die Inhibition der Antigenpräsentation bei B-Zellen und Monozyten zu einer Hemmung der Calpastatin-spezifischen T-Helferzell-Proliferation führte.

Im Fall von drei RA-Patienten, die suppressiv auf Calpastatin reagierten, führten HLA-Antikörper zu keiner weiteren Änderung des Stimulationsindex'.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es bei der Patientenpopulation, die durch Calpastatin stimuliert wurde, durch die Anti-HLA-DP-Antikörper zu einer Inhibition kam. Aufgrund der Inhibition der Antigenpräsentation über Anti-MHC-Antikörper konnte somit nachgewiesen werden, daß die T-Zell-Proliferation teilweise HLA-restringiert ist.

### HLA-Restriktion der T-Zell-Proliferation nach Calpastatin-Stimulation



**Abb. 20:** HLA-Restriktion der T-Zell-Proliferation nach Calpastatin-Stimulation

**links:** Inhibition von nichtproliferierenden und proliferierenden Zellen mit Anti-HLA-DP

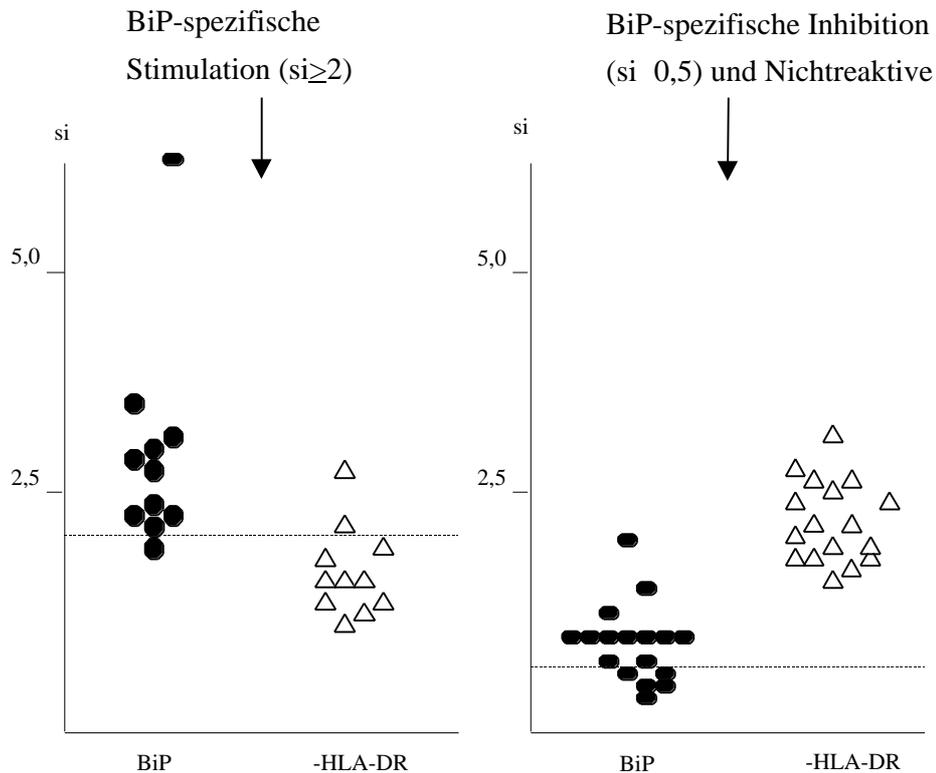
**rechts:** keine nennenswerte Veränderung bei supprimierten Zellen

In BiP-stimulierten Kulturen kam es bei den Spendern, deren Stimulationsindex größer als eins war, durch Anti-HLA-DR-Antikörper zu einer Reduzierung des Stimulationsindex. Es kann somit angenommen werden, daß die Inhibition der Antigenpräsentation B-Zellen und APC zu einer Hemmung der BiP-spezifischen T-Helferzell-Proliferation führte.

Im Fall von 17 RA-Patienten, die suppressiv auf BiP reagierten, führte derselbe Antikörper zu einer Erhöhung des Stimulationsindex'.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es bei der Patientenpopulation, die durch BiP stimuliert wurden, unter Anti-HLA-DR-Antikörper-Zugabe eine Inhibition stattfand und im Gegenzug suppressierte PBMC stimuliert wurden.

## HLA-Restriktion der T-Zell-Proliferation nach BiP-Stimulation



**Abb. 21:** HLA-Restriktion der T-Zell-Proliferation

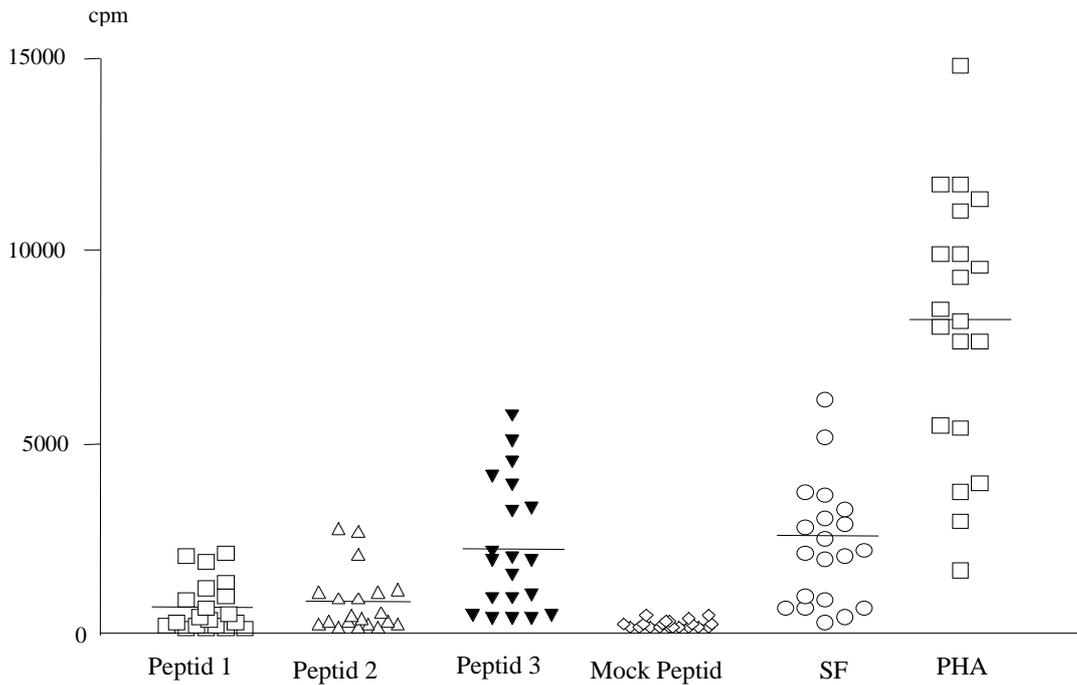
**links:** Durch die Blockierung der MHC-Klasse II-Moleküle mit dem -HLA-DR-Antikörper kam es im Fall der T-Zellen der Patienten, die vorher durch BiP stimuliert wurden, zu einem Verlust dieser Eigenschaft (der Stimulationsindex fällt)

**rechts:** Bei den T-Zellen, die durch BiP supprimiert waren, führte der -HLA-DR-Antikörper zu einer Abschwächung dieser Suppression.

### T-Zell-Epitopmapping

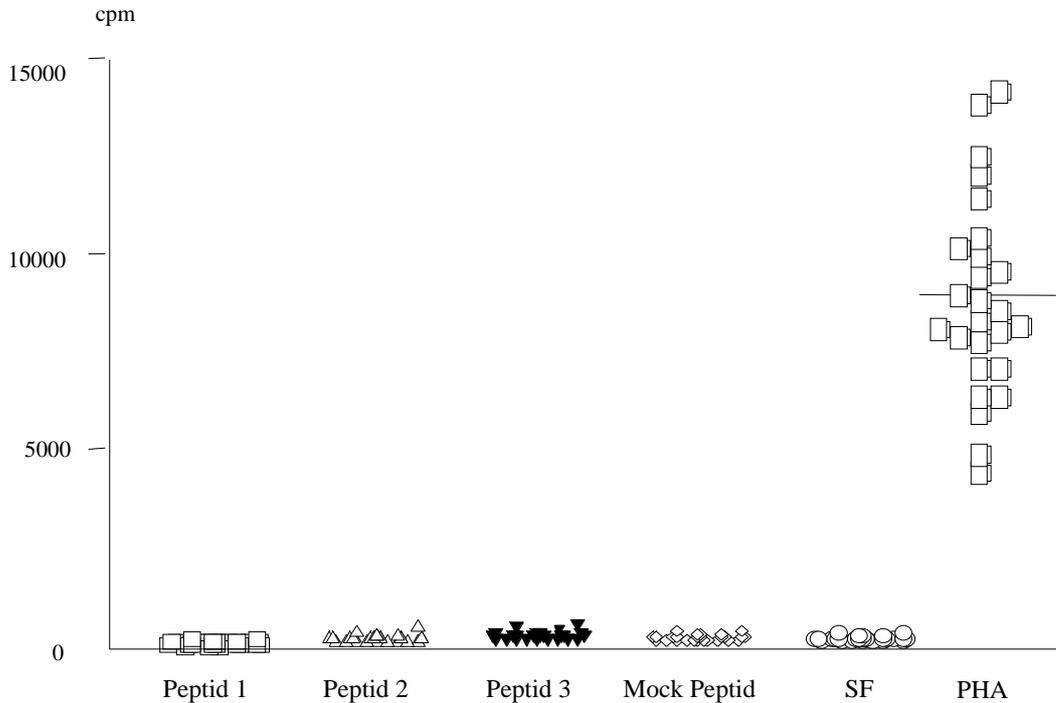
Die PBMC von 20 RA-Patienten wurden mit rheumatischer Synovialflüssigkeit und mit den synthetischen Peptiden p205-1, p205-2 und p205-3 stimuliert. Die Peptide könnten zur Charakterisierung möglicher T-Zell-Epitope für p205/IgG beitragen. Die Peptide sind an BSA gekoppelt (BSA zu Peptid im Verhältnis 1:10). Das Peptid p205-3, dessen Sequenz identisch zur IgG-Sequenz der schweren Kette ist und in dem Bereich liegt, der als Ziel für Rheumafaktoren bekannt ist ( $H_2N-C-Y V D G V E V H N A K-CONH_2$ ), stimulierte die T-Zellen von sieben RA-Patienten. Die Proliferation gleicht der bei der Stimulation mit SF. Die zwei anderen Peptide (p205-1 und p205-2) bewirkten eine geringere Proliferation der T-Zellen derselben Patienten, während ein Peptid mit stochastischer Sequenz (p205-4) keine T-Zellen stimulierte. Die Zellen der RA-Patienten, die nicht auf SF reagierten, zeigten auch keine Reaktion auf eines der Peptide.

### p205/IgG-Peptidmapping mit RA-Patienten



**Abb. 22:** Proliferation von PBMC mittels Stimulation durch drei synthetische Peptide (p205-1, p205-2, p205-3), SF und PHA. Die Zellen stammen von 20 RA-Patienten. Die Proliferation ist in cpm minus Hintergrund dargestellt.

### p205/IgG-Peptidmapping mit NON-RA-Patienten



**Abb. 23:** Proliferation von PBMC mittels Stimulation durch drei synthetische Peptide (p205-1-3), SF und PHA. Die Zellen stammen von 26 Patienten mit rheumatischen Erkrankungen (kein RA). Als Marker für die Reaktionsfähigkeit der Zellen diente PHA. Die Proliferation ist in cpm minus Hintergrund dargestellt.

Zur Klärung eventueller T-Zell-Epitope bei dem Autoantigen BiP wurde von der Firma JERINI die BiP-Sequenz synthetisiert. Es wurden 128 20mer Peptide produziert, die sich jeweils um 15 AS überlappen. Die N-Termini wurden acetyliert. Nach dem Auslösen der Peptide aus der Cellulosemembran wurden sie zu jeweils einem Mix von fünf Peptiden vereinigt und im Proliferationstest eingesetzt (die Gesamtkonzentration der Peptidmixture entsprach 25ng pro well, d.h. 5ng Peptid wurden pro well eingesetzt). Parallel dazu konnten die gleichen Peptide in ihrer nicht acetylierten Form Verwendung finden.

**Tab. 6:** Beladung der Mikrotiterplatte mit den Peptidmischen

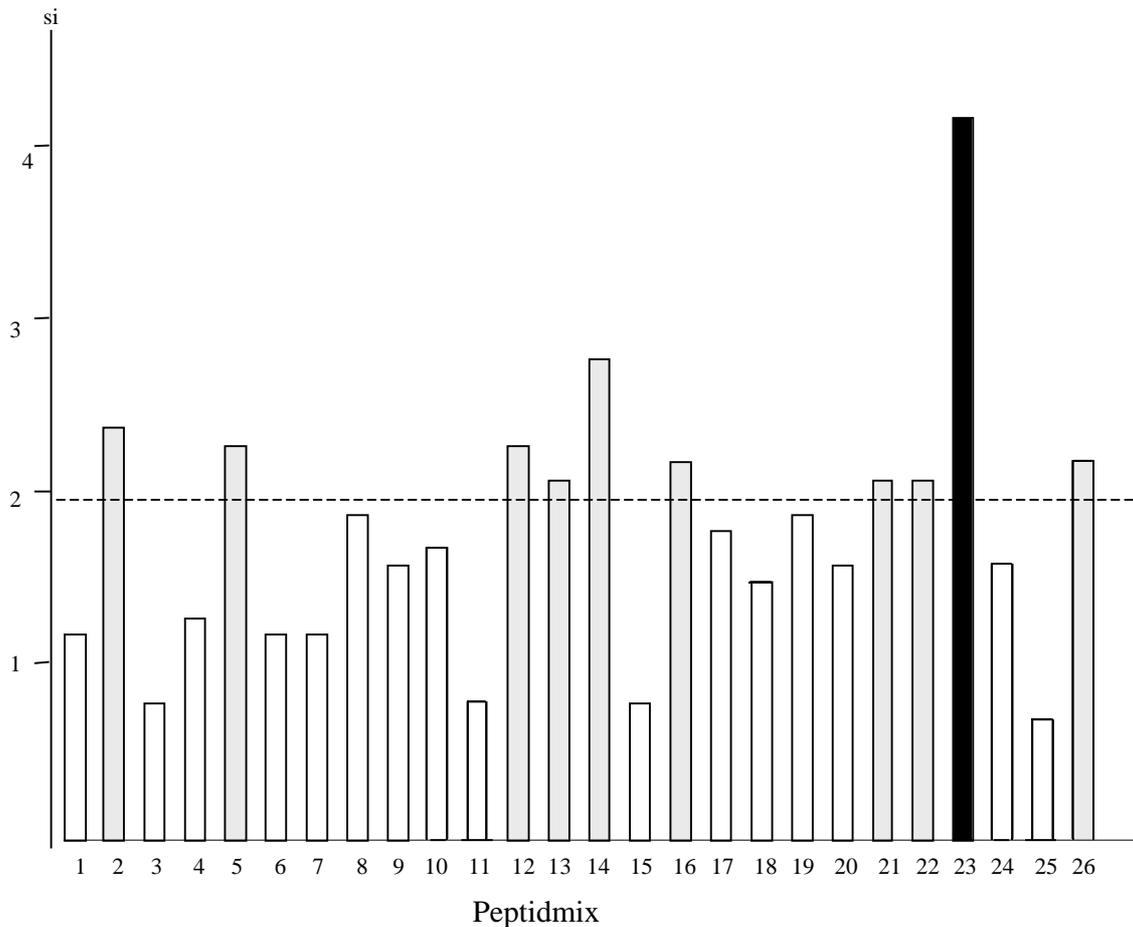
	<b>1-3</b>	<b>4-6</b>	<b>7-9</b>	<b>10-12</b>
<b>A</b>	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4
<b>B</b>	MIX 5	MIX 6	MIX 7	MIX 8
<b>C</b>	MIX 9	MIX 10	MIX 11	MIX 12
<b>D</b>	MIX 13	MIX 14	MIX 15	MIX 16
<b>E</b>	MIX 17	MIX 18	MIX 19	MIX 20
<b>F</b>	MIX 21	MIX 22	MIX 23	MIX 24
<b>G</b>	MIX 25	MIX 26		
<b>H</b>			Medium	PHA

**Tab. 7:** Nummer der Peptide, die pro Mix vorhanden sind

<b>MIX</b>	<b>Peptid</b>	<b>MIX</b>	<b>Peptid</b>	<b>MIX</b>	<b>Peptid</b>
1	1-5	10	46-50	19	91-95
2	6-10	11	51-55	20	96-100
3	11-15	12	56-60	21	101-105
4	16-20	13	61-65	22	106-110
5	21-25	14	66-70	23	111-115
6	26-30	15	71-75	24	116-120
7	31-35	16	76-80	25	121-125
8	36-40	17	81-85	26	126-128
9	41-45	18	86-90		

Auf Grund des enormen Materialverbrauchs an PBMC konnten bisher nur drei RA-Patienten getestet werden. Bei allen drei Patienten zeigte sich das gleiche Bild.

## T-Zell- Epitopmapping für BiP



**Abb. 24:** Stimulationsindices von PBMC nach Stimulierung mit BiP-Peptiden.

Grau unterlegte Ansätze haben eine proliferative Wirkung (Der cut off von  $si = 2$  wird überschritten).

Der schwarz unterlegte Ansatz 23 zeigt die höchste Stimulation.

10 Ansätze weisen eine erhöhte Proliferation der PBMC auf. Den höchsten stimulativen Effekt bei den drei Patienten zeigt der Mix 23. Nach Abzug der überlappenden Frequenzen und einer weiteren Kontrolle konnte ein reaktives Epitop mit 10 AS gefunden werden (SYAYSLKNQI).

## Zytokin-Sekretionsassay

Zur weiteren Charakterisierung der antigenspezifischen T-Zell-Proliferation wurden Aliquots der Mediumüberstände der Proliferationsansätze 16 Stunden vor der Radioaktivitätsmessung der Thymidineinbaurate entnommen und im ELISA ihr Zytokingehalt untersucht. Zum Einsatz kamen jeweils ELISAs für IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-15, TNF- und IFN- .

Da die Zytokinmengen unter den hier gewählten Versuchsbedingungen nicht mit üblicherweise publizierten Daten vergleichbar sind, wurde als High Control das Lektin PHA verwendet. In den Positivkontrollen, unter PHA-Stimulation, erreichte die Konzentration der bestimmten Zytokine regelmäßig den maximal mit dem ELISA detektierbaren Wert (300pg/ml für IFN- , 500pg/ml für IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- und 1000pg/ml für IL-15). IL-4 und -5 waren in den vom jeweiligen Antigen beeinflussten Proben nur in Spuren vorhanden.

IL-10 konnte in antigenhaltigen Proben in z.T. hohen Konzentrationen (Maximalwert 150pg/ml) gefunden werden. Bei p205/IgG-Stimulation erreichten die Maximalwerte 50pg/ml.

TNF- -Konzentrationen waren relativ niedrig. Sie erreichten bei Calpastatin- und BiP-Stimulation maximal 10pg/ml, bei Calreticulin-Stimulation 90pg/ml und bei p205/IgG-Stimulation 100pg/ml.

Ähnliches gilt für IL-2. Die maximale Konzentration lag hier für BiP bei 20pg/ml, für Calpastatin bei 35pg/ml, für p205/IgG bei 60pg/ml und für Calreticulin bei 145pg/ml.

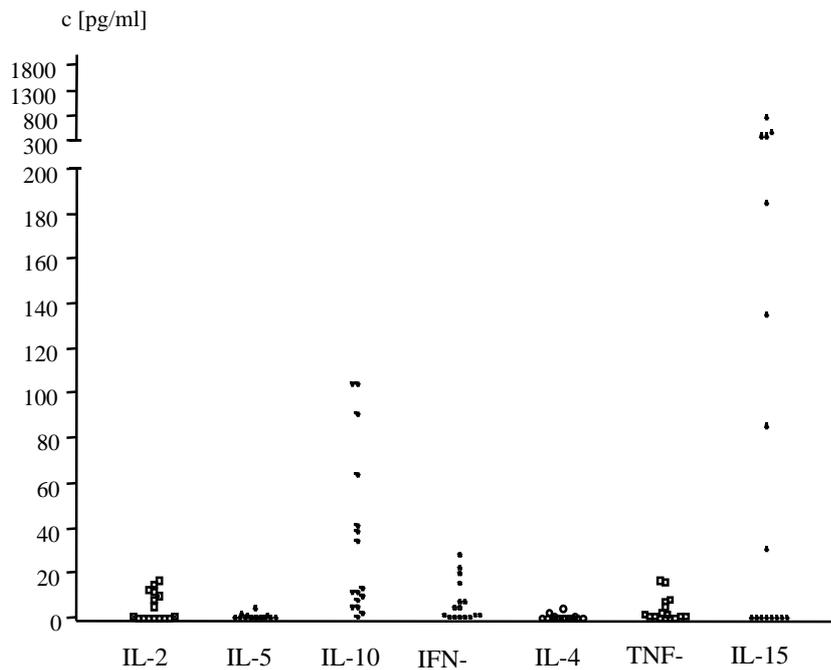
IFN- ist in den Überständen eindeutig nachweisbar gewesen. Die Werte lagen zwischen 10 und 150 pg/ml.

IL-15 wurde in hohen Konzentrationen (für Calpastatin und BiP 500pg/ml und Calreticulin maximal 730-970pg/ml) in antigenhaltigen Proben gefunden.

Die PBMC der RA-Patienten sezernierten somit vor allem IL-15. IL-10, TNF- , IFN- als auch IL-2 konnten in geringeren Mengen nachgewiesen werden. IL-4 und IL-5 kamen praktisch nicht vor. Von besonderem Interesse sind hierbei die hohen Konzentrationen des proinflammatorischen IL-15, was eine Schlüsselrolle dieses Zytokins bei der RA nahelegt. Bedeutsam ist auch das Vorhandensein von IFN- in den Kulturüberständen.

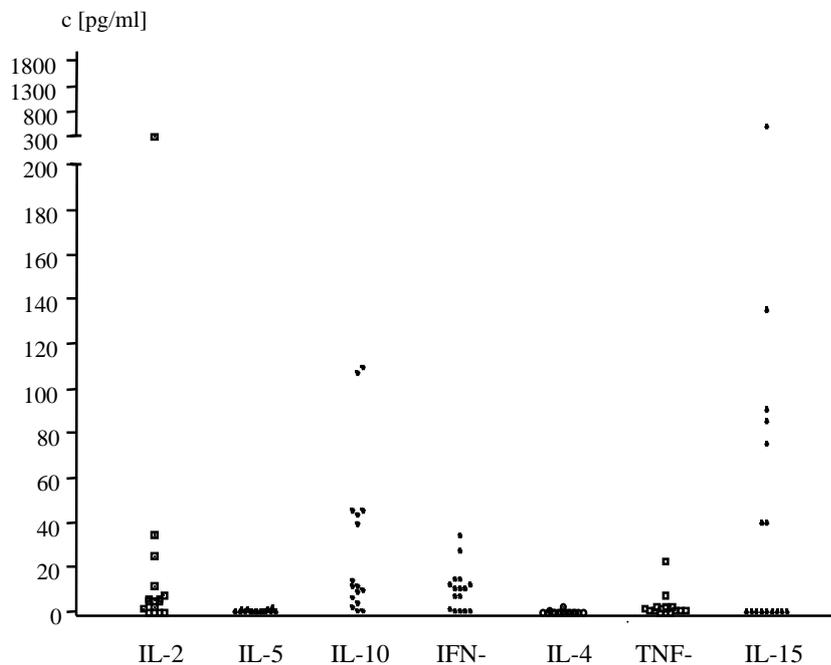
Die Zugabe von rekombinantem IL-2 zu PBMC bewirkte eine verstärkte IL-5 und IFN- Sekretion, wodurch die gemessenen Konzentrationen maximale Werte, vergleichbar mit den Proben unter PHA-Stimulation, erreichten. In den Ansätzen ohne IL-2 kam das TH-2 Zytokin IL-5 dagegen praktisch nicht vor. Diese deutliche Veränderung der Zytokinkonzentration unter IL-2 Einfluß trat bei IL-10 und TNF- nicht auf.

## Zytokinprofil nach Calreticulin-Stimulation



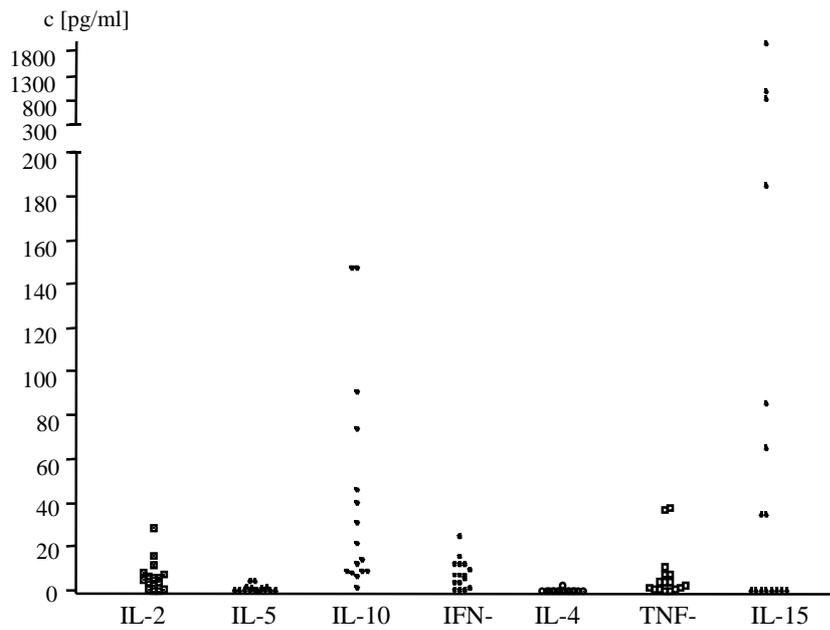
**Abb. 25:** Zytokinsekretionsassay der Calreticulin-spezifischen T-Zell-Proliferation von 16 RA-Patienten. Konzentration der Zytokine in den Kulturüberständen aus Proliferationsversuchen mit Calreticulin nach Abzug der Werte der Negativkontrollen. Auffällig sind einige hohe IL-15-Konzentrationen. IL-10 und IFN- wurden ebenfalls sezerniert. IL-2 und TNF- traten in geringeren Mengen auf.

## Zytokinprofil nach Calpastatin-Stimulation



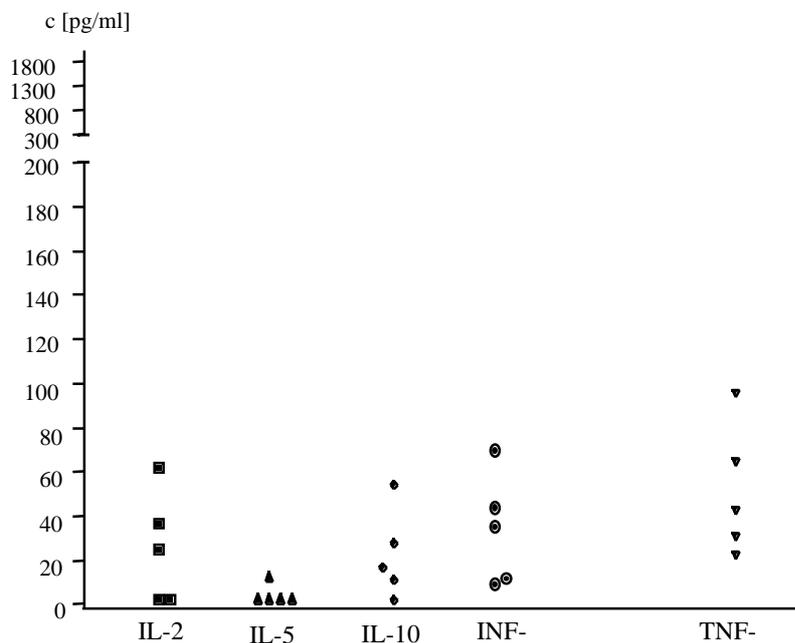
**Abb. 26:** Zytokinsekretionsassay der Calpastatin-spezifischen T-Zell-Proliferation von 16 RA-Patienten. Konzentration der Zytokine in den Kulturüberständen aus Proliferationsversuchen mit Calpastatin nach Abzug der Werte der Negativkontrollen. Auffällig sind einige hohe IL-15-Konzentrationen. IL-10 wurde ebenfalls sezerniert. IFN-, IL-2 und TNF- traten in geringeren Mengen auf.

### Zytokinprofil nach BiP-Stimulation



**Abb. 27:** Zytokinsekretionsassay der BiP-spezifischen T-Zell-Proliferation von 16 RA-Patienten. Konzentration der Zytokine in den Kulturüberständen aus Proliferationsversuchen mit BiP nach Abzug der Werte der Negativkontrollen. Auffällig sind einige hohe IL-15-Konzentrationen. IL-10 wurde ebenfalls stark sezerniert. IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$  traten in ähnlichen Mengen auf.

### Zytokinprofil nach p205/IgG-Stimulation



**Abb. 27:** Zytokinsekretionsassay der p205/IgG-spezifischen T-Zell-Proliferation von 5 RA-Patienten. Konzentration der Zytokine in den Kulturüberständen aus Proliferationsversuchen mit p205/IgG nach Abzug der Werte der Negativkontrollen. TNF- $\alpha$  weist die höchsten Konzentrationen auf. INF- $\gamma$  und IL-2 zeigen höhere Werte als bei den anderen drei Antigenen.

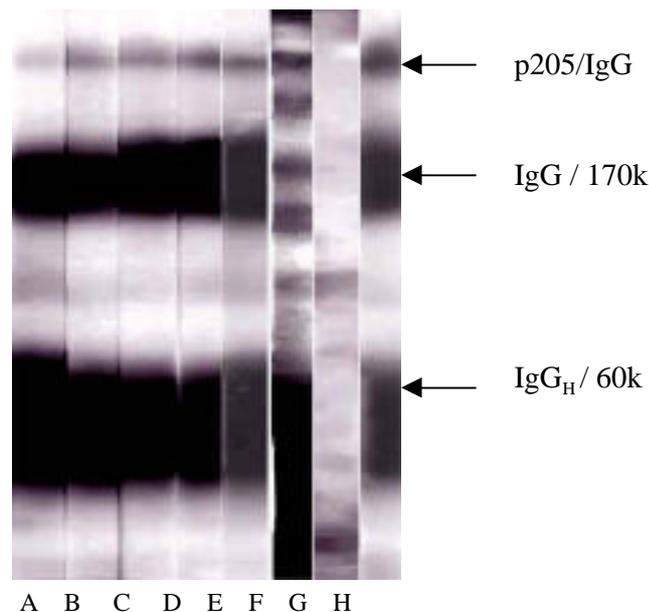
Die Zytokinprofile der Kulturüberstände antigenstimulierter PBMC ähneln sich sehr stark. Mit IFN- und IL-10 (kein IL-4, IL-5) treten die typischen Th1 Zytokine auf. TNF- kann auch von T-Zellen sezerniert werden. Dagegen spricht aber das fehlende IL-4. Darum ist anzunehmen, daß dieses Zytokin hier nur von Monozyten sezerniert wird.

### Analyse möglicher RF-Induktion durch p205/IgG

#### Immunisierung eines Kaninchens mit p205-1 bzw. p205-3 zur Erzeugung eines Antiserums

Das Kaninchenserum gegen das Peptid p205-1 bzw. p205-3 wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Porstmann entwickelt. Die Kaninchen wurde subcutan immunisiert und zweimal intravenös geboostert. Das Tier, das gegen p205-3 immunisiert wurde, bildete daraufhin "Rheumafaktoren" (IgG-Antikörper), die serologisch nachgewiesen wurden. Diese Rheumafaktoren als auch monoklonale humane Rheumafaktoren reagierten im Immunoblot mit p205/IgG. RF-haltige Seren von RA-Patienten reagierten im Immunoblot mit p205/IgG. Nach RF-Absorption reagierten diese Seren schwächer mit p205/IgG.

#### Immunoblot zur Detektion von p205/IgG



**Abb. 29:** Immunoblot mit Gesamtprotein aus rheumatischer SF.

A-E: monoklonale humane Rheumafaktoren

F: Kaninenserum p205-3 (immunisiert)

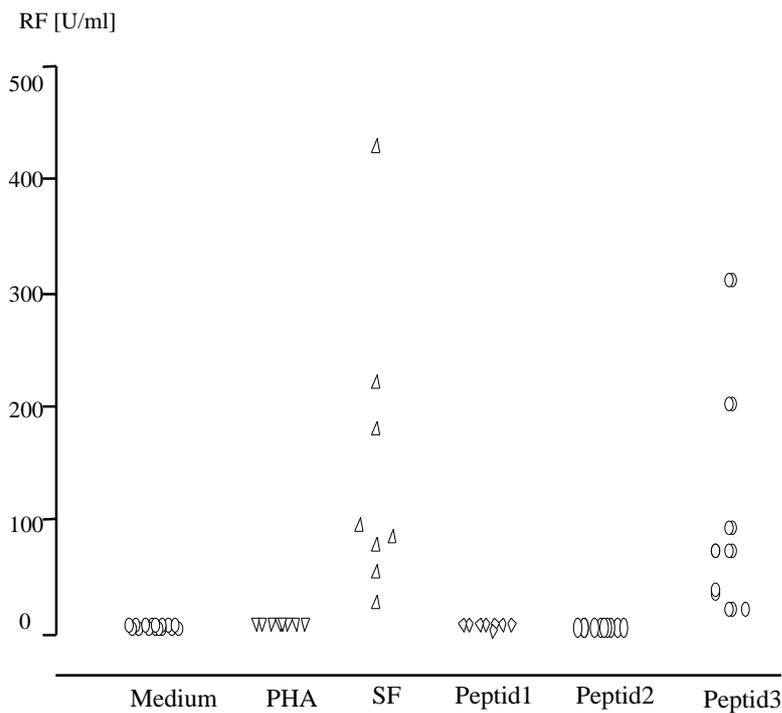
G: Negativkontrolle Präimmunserum Kaninchen

H: Negativkontrolle (nur Zweitantikörper -hu-IgA, IgG, IgM)

### p205-3 regt zur RF-Produktion in vitro an

Die synthetischen Peptide p205-1-3 wurden wie beschrieben zusammen mit PBMC von RA-Patienten im Proliferationstest eingesetzt. Als Kontrolle dienten PHA und SF. Die Kulturen wurden 12 Tage inkubiert und dann im Überstand die Rheumafaktoren gemessen. Bei den meisten der Patienten konnten in den Ansätzen mit p205-3 und SF Rheumafaktoren nachgewiesen werden. Die Peptide p205-1 und -2 führten zu keiner RF-Produktion.

### RF-Produktion mittels SF und p205-3



**Abb. 30:** RF-Produktion nach Stimulation mit p205-3 und SF. Peptid 1 und 2 regen nicht zur RF-Produktion an.

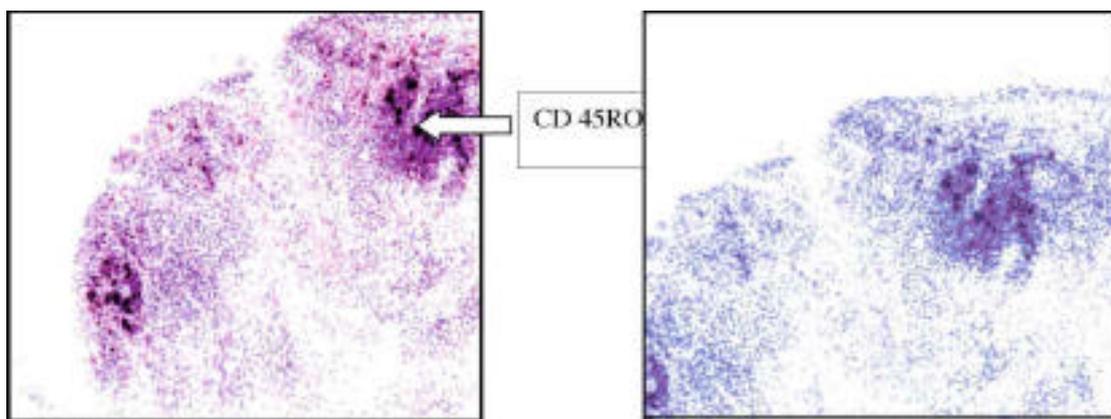
## Immunhistologie

Bei der RA werden viele Antigene in der Synovialmembran überexprimiert, darunter einige Autoantigene und Streßproteine <sup>90</sup>. Es stellte sich somit die Frage, ob die hier jeweils untersuchten Autoantigene in bestimmten Bereichen der Synovialmembran lokalisiert sind oder mit speziellen Zellen assoziiert.

Synovialgewebe von zehn RA-Patienten und fünf Kontrollproben (Osteoarthritis, Osteoarthritis mit Begleitsynovitis, reaktive Arthritis und chronische Synovitis) wurde daher immunhistochemisch analysiert.

Als Zellmarker dienten: CD90 (Fibroblasten), CD68 (Makrophagen), CD20 (B-Zellen), CD3 (T-Zellen), CD4 (Helfer T-Zellen), CD8 (zytotoxische T-Zellen), CD45RO (Gedächtnis-T-Zellen).

Wie erwartet bildeten makrophagenähnliche (CD68+) und fibroblastenähnliche (CD90+) Synoviozyten die verdickte synoviale Deckzellschicht (synovial lining layer), welche den Abschluß des Synovialgewebes in Richtung Gelenklumen bildet. CD68+ Zellen traten in geringerem Umfang und diffuser Verteilung auch in der Sublining-Schicht auf. Die bei den RA-Patienten meist massiven T-Zellinfiltrate waren ebenfalls in der Sublining-Schicht lokalisiert, wobei die T-Zellen folliculäre Strukturen bildeten oder sich in hoher Zahl, ausgehend von den oft vorhandenen Blutgefäßen, über das Gewebe verteilten. Die Subklassifizierung der T-Zell-Population ergab, daß sie zu einem großen Teil aus CD4+ T-Helferzellen bestand, aber auch CD8+ zytotoxische T-Zellen konnten nachgewiesen werden. Viele T-Zellen zeigten eine Differenzierung zu Gedächtniszellen mit dem Marker CD45RO. B-Zellen traten nur in einigen der untersuchten Gewebe auf und bildeten dann Formationen, die an Lymphfollikel aus lymphatischen Organen erinnern. Hier trat dann z.T. auch eine räumliche Assoziation zu T-Zellen auf.



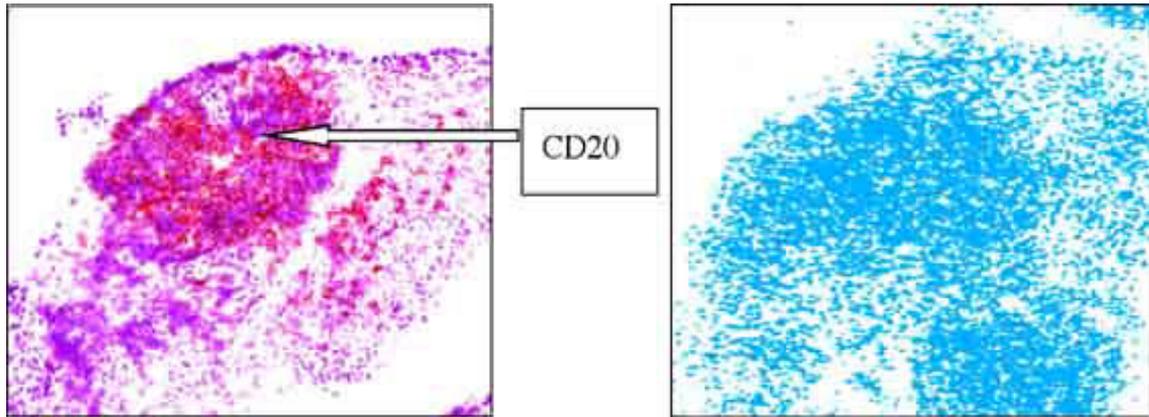
**Abb. 31 A**

**B**

Leukozyteninfiltration der rheumatoiden Synovialmembran (dargestellt durch monoklonale Antikörper mit AEC-Substrat, HE-Färbung).

**Abb. 31 A:** perivaskuläre Ansammlung von CD45RO+-Zellen (×50)

**Abb. 31 B:** dazugehörige Negativprobe (Isotypkontrolle)



**Abb. 32 A**

**B**

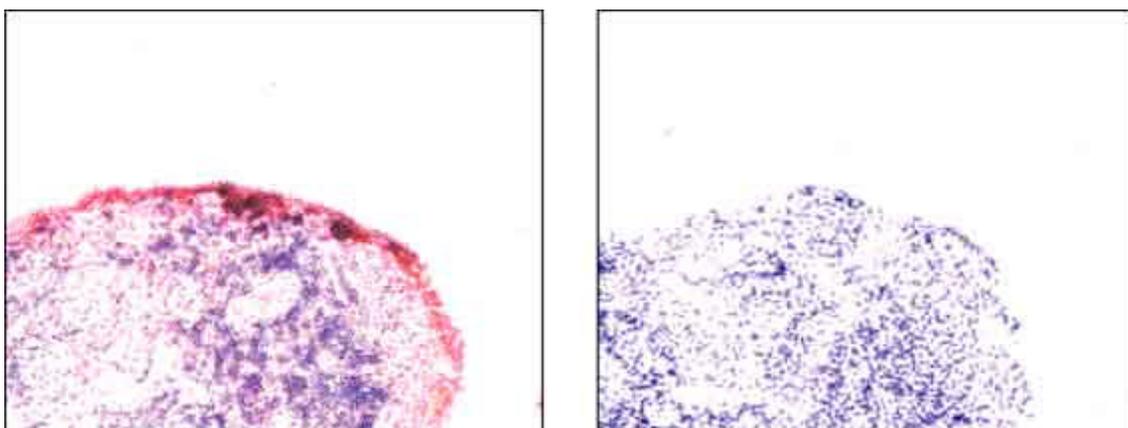
Leukozyteninfiltration der rheumatoiden Synovialmembran (dargestellt durch monoklonale Antikörper mit AEC-Substrat, HE-Färbung).

**Abb. 32 A:** follikelartige Anordnung von CD20<sup>+</sup>-Zellen (×100)

**Abb. 32 B:** dazugehörige Negativproben (Isotypkontrolle)

Obwohl Calreticulin, Calpastatin und BiP in allen Zellen und diversen Lokalisationen vorkommen, wurde durch Variation der immunhistochemischen Methoden die Sensitivität der Anfärbung reduziert, so daß der spezifische Antikörper das jeweilige Antigen praktisch nur in überexprimierten Arealen markierte.

Calreticulin konnte stark überexprimiert in der synovialen Deckzellschicht gefunden werden (Abb. 33). In der Sublining-Schicht kam es nur in reduziertem Maße vor. In Gewebsarealen, die dem Gelenklumen abgekehrt waren, war es unter den angewendeten Bedingungen kaum mehr nachweisbar. Mit spezifischen monoklonalen Antikörpern konnten infiltrierende Entzündungszellen und Bindegewebszellen (Fibroblasten) angefärbt werden.



**Abb. 33 A**

**B**

**Abb. 33 A:** Calreticulinüberexpression im Bereich der synovialen Deckzellschicht bei der RA (×200) AEC-Färbung mit folgender HE-Färbung

**B:** Negativprobe (AEC und HE-Färbung, ×200)

Desweiteren sollten in Doppelfärbungen zwischen Calreticulin einerseits und CD3, CD20, CD68 und CD90 andererseits, eventuelle Assoziationen zwischen dem Antigen und den in der Synovialmembran vorhandenen Zellen aufgezeigt werden.

Ergebnis war, daß der CD68-Marker und Calreticulin die gleichen Areale und Zellen anfärbte. Deshalb wurden zusätzlich in zwei direkt aufeinanderfolgenden Gewebeschnitten Calreticulin und CD68 einzeln angefärbt, so daß eine Kolokalisation zwischen diesen makrophagenähnlichen antigenpräsentierenden Zellen und Calreticulin nachgewiesen werden konnte.

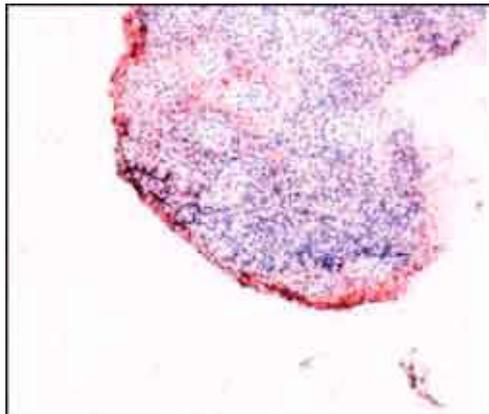
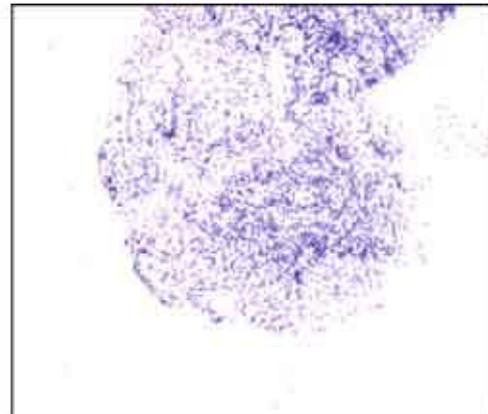


Abb.34 A



B

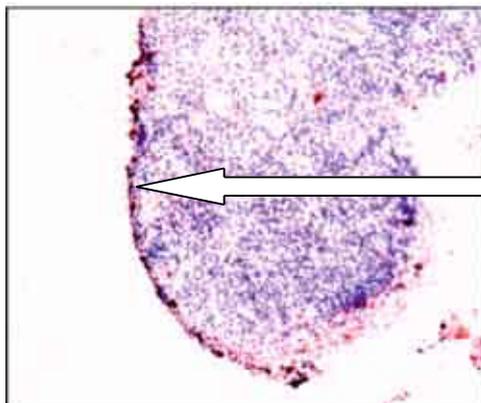
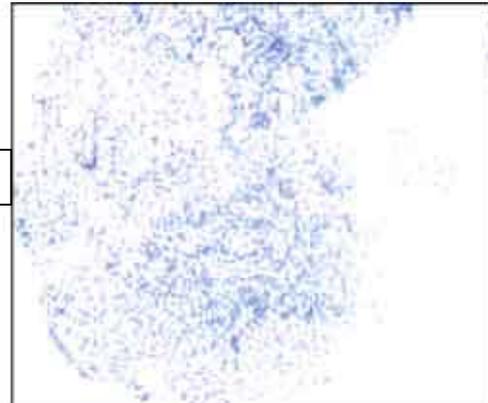


Abb. 35 A

CD68



B

**Abb. 34** und **35**: In aufeinanderfolgenden Gewebeschnitten wurden Calreticulin (**Abb. 34 A**, AEC-Färbung, HE-Färbung,  $\times 100$ ) und CD68<sup>+</sup>-Zellen (**Abb. 35 A**, fast-red, HE-Färbung,  $\times 100$ ) markiert. Es wurden jeweils die gleichen Areale angefärbt.

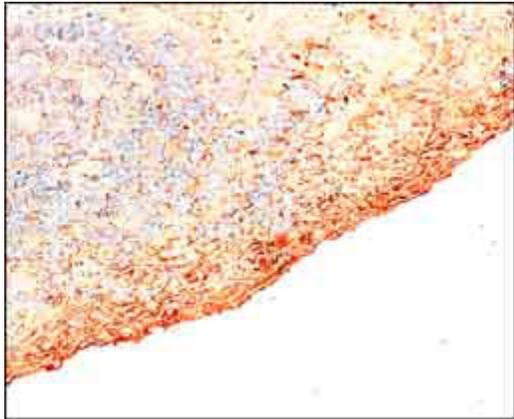
**Abb. 34 B** und **35 B**: entsprechende Negativkontrollen.

#### Kontrollproben:

Bei der Probe eines Patienten mit chronischer Synovitis/reaktiver Arthritis zeigte sich eine ähnliche Überexpression Calreticulins in der Deckzellschicht wie bei den RA-Patienten. Die Gewebeschnitte von Patienten mit Osteoarthritis, die z.T. eine Begleitsynovitis aufwiesen, zeigten dieses Verhalten nicht. In der nicht vergrößerten Deckzellschicht ließ sich Calreticulin kaum bzw. überhaupt nicht darstellen. Lediglich im Sublining trat es in geringem Umfang

auf. Die dünne Deckzellschicht wurde auch durch makrophagenähnliche Zellen gebildet. T-Zellen kamen meist nicht oder nur in geringer Anzahl perivaskulär vor. Infolgedessen ließ sich bei Osteoarthritis keine Assoziation von Calreticulin und einzelnen Zellgruppen nachweisen.

Calpastatin konnte stark überexprimiert in der synovialen Deckzellschicht gefunden werden. In der Sublining-Schicht kam es nur noch in reduziertem Maße vor.



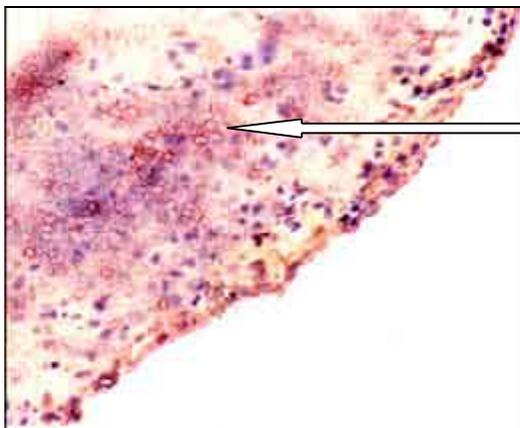
**Abb. 36 A**



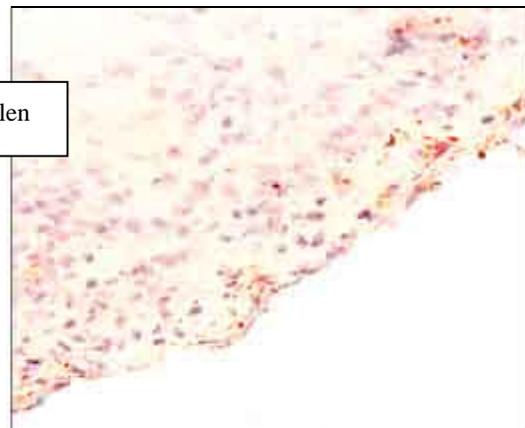
**B**

**Abb. 36 A:** Calpastatin -Überexpression (rotbraun) im Bereich der Deckzellschicht. Im Bereich des T-Zell-Follikel (fast blue) ist keine vermehrte Calpastatinproduktion nachweisbar (AEC und fast blue-Färbung, x200).

**B:** Isotypkontrolle



**Abb. 37 A**



**B**

**Abb. 37 A:** Calpastatin -Überexpression (rotbraun) im Bereich der Deckzellschicht. Im Bereich der B-Zellen (fast red) ist keine vermehrte Calpastatinproduktion nachweisbar (AEC und fast red-Färbung + HE-Färbung, x200).

**B:** Isotypkontrolle

Das Ergebnis der immunhistologischen Untersuchungen war, daß Calpastatin ähnlich wie Calreticulin nur vermehrt in der synovialen Deckschicht in Verbindung mit Fibroblasten nachweisbar ist. Es besteht keine Co-Lokalisation mit B- oder T-Zellen.

Kontrollproben:

Bei den erwähnten Vergleichsproben konnte Calpastatin in dieser Form nicht nachgewiesen werden. Lediglich bei einer Synovitis war eine schwache, diffuse Anfärbung des gesamten Schnittes möglich.

Da oben die jeweiligen Zelltypen schon dargestellt wurden, sollen hier nur Anfärbungen mit BiP gezeigt werden. BiP konnte stark überexprimiert in der synovialen Deckzellschicht und in der Subliningschicht gefunden werden. Bei Osteoarthrosegewebe war BiP ebenfalls in der Deckzellschicht zu finden, wenn auch in geringerem Maße. In der Sublining-Schicht kam es nur noch vereinzelt vor. In Gewebsarealen, die dem Gelenklumen abgekehrt waren, war es unter den angewendeten Bedingungen kaum mehr nachweisbar.

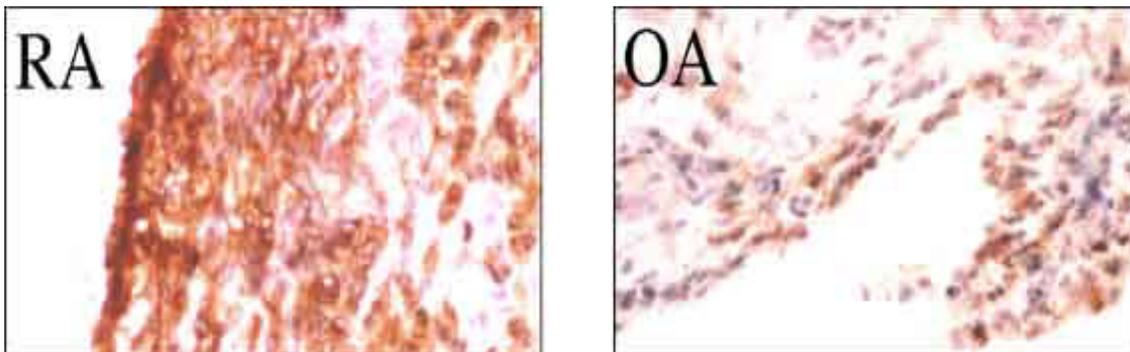


Abb. 38 A

B

Abb. 38 A: BiP-Anfärbung (rot-braun) der Deck- und Subliningschicht bei RA (AEC und HE-Färbung, x200).

B: BiP-Anfärbung hauptsächlich der Deckschicht (fleckhaft) bei OA (AEC und HE-Färbung, x200).

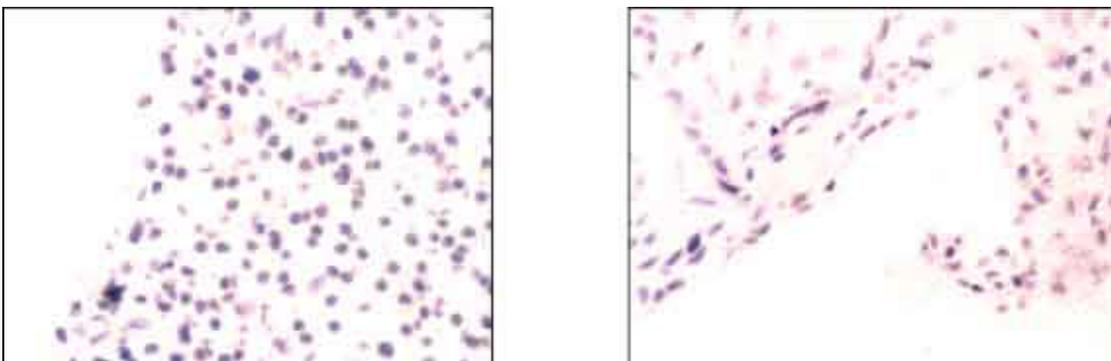


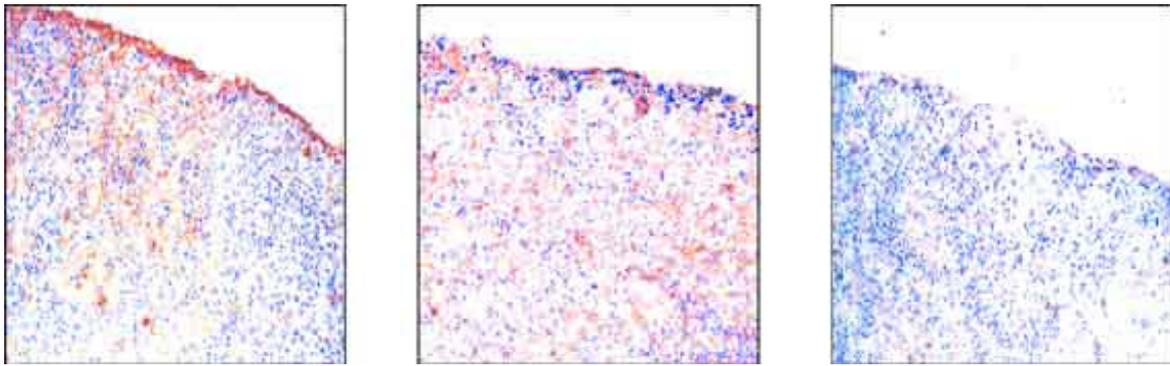
Abb. 39 A

B

Abb. 39: Negativkontrollen für Abb. 38 A und B

Bei dem vierten Antigen wurden in Einzelfärbungen die zwei p205/IgG Peptide 1 und 3 angefärbt. Das zum Nachweis der Peptide benutzte Serum wurde durch die oben erwähnte Immunisierung von Kaninchen mit Peptid 1 (DINGGGATLPQPLYQTAGVLTAGFA) und Peptid 3 (YVDGVEVHNAK) hergestellt. Das Peptid 3 besitzt dabei eine Sequenzanalogie zur schweren Kette des humanen IgG und ist das stärkste bekannte T-Zell-Antigen bei der RA, wohingegen bei Peptid 1 diese Eigenschaften nicht nachweisbar sind. Peptid 3 war in der

synovialen Deckzellschicht überexprimiert, bei Peptid 1 wurde eine diffuse Anfärbung des Sublinings beobachtet.



**Abb. 40 A**

**B**

**C**

**Abb. 40 A:** p205-Peptid 3 wird in der Deckzellschicht exprimiert.

**Abb. 40 B:** p205-Peptid 1 ist schwach in der gesamten Membran zu finden.

**Abb. 40 C:** Kontrolle mit Präimmunserum.

(AEC-und HE-Färbung, ×100)