

Aus der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Autoantikörper gegen natives und citrulliniertes hnRNP-DL
definieren das "Fenster des Behandlungserfolgs" und
identifizieren Risikopersonen für die Entwicklung einer
rheumatoiden Arthritis

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Bianka Marklein

Datum der Promotion: 25.06.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abstract (Deutsch)	3
Abstract (Englisch)	5
1 Einleitung	7
2 Methoden	14
2.1 Protein Macroarray als Scening neuer Biomarker	14
2.2 Generierung der rekombinanten hnRNPs als His-tag Fusionsproteine und Aufarbeitung/Immundetektion von Proteinen aus Synovialgewebe	14
2.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Immunoaffinitätsreinigung von α -hnRNP-Autoantikörpern	18
2.4 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie und Immunhistochemische Analyse	20
2.5 Datenbanksichtung und Globaler Sequenzvergleich.....	21
3 Ergebnisse und Diskussion	23
4 Schlussfolgerungen	30
Literatur	31
Eidesstattliche Versicherung	40
Auszug aus der Journal Summary List	43
Publikation	44
Lebenslauf	80
Publikationsliste	82
Danksagung	83

Abstract (Deutsch)

Hintergrund:

Autoantikörper gegen das native und citrullinierte heterogene nukleäre Ribonukleoprotein-D-like (hnRNP-DL; JKTBP) wurden bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) und rheumatoider Arthritis (RA) und im Tiermodell analysiert. Genetische, klinische und diagnostische Aspekte bei der RA wurden analysiert und die autoantigenen Strukturen sowie posttranslationalen Modifikationen charakterisiert, über die gegebenenfalls ein krankheitsspezifischer Nachweis erfolgen kann, um RA-Risikopersonen zu identifizieren sowie Behandlungserfolg und -möglichkeiten aufzuzeigen.

Methoden:

Durch Protein-Makroarray Untersuchungen konnten α -hnRNP-DL-Autoantikörper spezifisch bei RA-Patienten identifiziert werden. Rekombinante, in *E. coli* exprimierte, hnRNP-DL-Proteine wurden in der ELISA-Technik verwendet und α -hnRNP-DL-Autoantikörper im Serum von SLE- und RA-Patienten sowie von Mäusen aus Tiermodellen gemessen. Die hnRNP-DL-Expression wurde durch indirekte Immunfluoreszenz, Immunoblot und Immunhistochemie in Synovialgewebe sowie in kultivierten Zellen analysiert.

Ergebnisse:

HnRNP-DL wurde als native oder citrullinierte Proteinvariante von Autoantikörpern von Patientenuntergruppen mit unterschiedlichem RA-Status erkannt. Bei SLE-Patienten wurden bei 58 % Seroreaktionen gegen strukturelle citrullinierungsabhängige Epitope (SCEs) von hnRNP-DL nachgewiesen, obwohl 98 % dieser Seren im Routinetest auf α -CCP2-Ak negativ waren. Zur Erkennung von RF-IgM/ α -CCP2-seronegativen Früh-RA-Patienten (24-46 %) und als Wert zur Einschätzung des Behandlungserfolgs wurde der „Citrullinated-Native-hnRNP-DL-Index“ (CN_{DL}-Index) als Differenzwert von α -cit-hnRNP-DL- und α -hnRNP-DL-OD-Signalen eingeführt. Hohe positive CN_{DL}-Werte korrelierten mit einem schwereren RA-Verlauf, dem Vorliegen von „shared-epitope“-Allelen und parenchymatösen Lungenveränderungen. Speziell bei SLE-Patienten, bei RA-Risikopersonen und bei den frühen RA-Kohorten wie EIRA wurde häufiger ein negativer CN_{DL}-Index

festgestellt und bei den EIRA-Patienten häufiger in der Gruppe, die auf Methotrexat (MTX)-Therapie ansprachen (87 %). Höhere native α -hnRNP-DL-Werte wurden mit geringeren Schmerzen assoziiert und speziell bei seronegativen RA-Patienten mit MTX- oder Etanercept-Therapieansprechen assoziiert. Im SLE-Mausmodell MRL/lpr zeigten die Ergebnisse, dass die Bildung von α -hnRNP-DL Autoantikörpern Toll-like-Rezeptor (TLR) 7- und TLR9-abhängig ist und durch Zytokine (Interleukin-1 α /-6, Tumor-Nekrose-Faktor- α) reguliert wird. Bei der Immunfluoreszenz färbten die α -hnRNP-DL-Autoantikörper spezifisch Stressgranula im Zytoplasma an. Immunhistochemische Analysen weisen auf eine zytoplasmatische Expression verstärkt im Grenzbereich von RA-Synovialgewebe hin, nicht aber bei Arthrose und normalem Kontrollgewebe und legen nahe, dass hnRNP-DL im rheumatoiden Gelenk citrulliniert ist.

Schlussfolgerungen:

HnRNP-DL ist ein neues Autoantigen bei RA- und SLE-Patienten. Es wird auch in Mausmodellen für entzündliche rheumatische Erkrankungen als Autoantigen erkannt. Anti-hnRNP-DL-Autoantikörper sind für die Differentialdiagnose der RA bedeutsam und zeigen einen prognostischen Wert für das therapeutische Ansprechen, vor allem in frühen Krankheitsstadien. Die Citrullinierung von hnRNP-DL führt zu Strukturepitopen (SCEs), die auch von α -CCP2-negativen SLE-Patienten erkannt werden. Durch kombinierte Betrachtung des nativen und citrullinierten Antigens, mittels CN_{DL} -Index, wurde die serodiagnostische RA-Früherkennung deutlich verbessert und ein Prädiktivparameter für das Therapieansprechen mit MTX oder Etanercept identifiziert.

Abstract (Englisch)

Background:

Autoantibodies against native and citrullinated heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like (hnRNP-DL; JKTBP) were analyzed in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA) and in animal models. Genetic, clinical and diagnostic aspects in RA were analyzed and the autoantigenic structures and post-translational modifications were characterized, which might be used for disease-specific detection to identify SLE-patients, RA-risk-individuals and therapy-success and -options.

Methods:

Protein macroarray studies identified α -hnRNP-DL-autoantibodies specifically in RA patients. Recombinant hnRNP-DL proteins expressed in *E. coli* were used in ELISA-technique to measure α -hnRNP-DL autoantibodies in serum of SLE-, RA-patients and mouse models. The hnRNP-DL expression was analyzed by indirect immunofluorescence, immunoblot and immunohistochemistry in synovial tissue and cultured cells.

Results:

HnRNP-DL was detected as native or citrullinated protein variant of autoantibodies from patient-subgroups with different RA-status. In SLE-patients, seroreactions against structural citrullination-dependent-epitopes (SCEs) of hnRNP-DL were detected in 58 %, although 98 % of these sera were negative for α -CCP2 routine assay. To detect RF-IgM/ α -CCP2-seronegative early RA-patients (24-46 %) and as a value to assess treatment success the "Citrullinated-Native-hnRNP-DL-index" (CN_{DL}-index), as a difference value of α -cit-hnRNP-DL and α -hnRNP-DL OD-signals, was introduced. High positive CN_{DL}-values correlated with a more severe RA-course, the presence of "shared-epitope" alleles and parenchymal lung changes. Specifically in SLE-patients, RA-at-risk-individuals, and early RA-cohorts such as EIRA a negative CN_{DL}-index was observed and more frequently in the EIRA-patients subgroup, responding to methotrexate (MTX) therapy (87 %). Higher native α -hnRNP-DL values were associated with lower pain and specifically in seronegative RA-patients, with MTX- or etanercept-therapy response. In the SLE-mouse-model MRL/lpr, results

showed that α -hnRNP-DL autoantibody formation is Toll-like-receptor (TLR) 7- and TLR9-dependent and regulated by cytokines (interleukin-1 α /-6, tumor-necrosis-factor- α). In immunofluorescence, the α -hnRNP-DL autoantibodies specifically stained stress granules in the cytoplasm. Immunohistochemical studies indicate cytoplasmic expression, enhanced in the peripheral region of RA synovial tissue, while not in osteoarthritis and normal control tissue, suggesting that hnRNP-DL is citrullinated in the rheumatoid joint.

Conclusions:

HnRNP-DL is a novel autoantigen in RA- and SLE-patients. It is also recognized as an autoantigen in mouse-models of inflammatory rheumatic diseases. Anti-hnRNP-DL-autoantibodies are significant for the differential diagnosis of RA and demonstrate prognostic value for therapeutic response, especially in early stages of disease. Citrullination of hnRNP-DL results in SCEs, that are also recognized by α -CCP2-negative SLE-patients. Combined analysis of native and citrullinated antigen using the CN_{DL}-index, significantly improved serodiagnostic early RA-detection and provided a predictive parameter for treatment response with MTX or etanercept.

1 Einleitung

Die Entstehung von Autoimmunerkrankungen lässt sich nicht auf einen bestimmten Mechanismus zurückführen. Vielmehr handelt es sich um ein komplexes Zusammenspiel einer Vielzahl von Mechanismen mit z. B. genetischem, immunologischem, mikrobiellem oder umweltbedingtem Ursprung. Bei systemischen, entzündlichen Erkrankungen unklarer Ursache wie der rheumatoiden Arthritis (RA) und dem systemischen Lupus erythematodes (SLE), sind Immunreaktionen gegen körpereigene, ubiquitär vorkommende Antigene wie z. B. Proteine und Nukleinsäuren nachweisbar, weswegen sie auch als Autoimmunerkrankungen bezeichnet werden^{1,2}.

Die rechtzeitige und spezifische Diagnose ist sehr wichtig, um frühzeitig eine effektive entzündungshemmende Therapie einleiten zu können und somit Folgeschäden zu verhindern. Insbesondere wegen der hohen volkswirtschaftlichen Bedeutung besteht in diesem Bereich ein großer Forschungsbedarf. Die Prävalenz von Autoimmunerkrankungen liegt in den Industrieländern bei 5-8 %, wobei die Häufigkeit in den letzten Jahren stetig zugenommen hat³. Allein in Deutschland sind rund 4-7 Millionen Menschen betroffen.

Die Charakterisierung der Autoimmunerkrankungen mit Hilfe von Antikörperreaktionen gegen körpereigene Strukturen ist von großer Bedeutung. Sie hat sich als eine Klassifizierungsstrategie für diese Erkrankungen etabliert, um therapeutische Möglichkeiten der Entzündungshemmung zu optimieren. Es ist deshalb essentiell, weitere entsprechende diagnostische Biomarker zu finden, ihre Antigenzielstruktur zu erkennen, die Krankheitsspezifität zu etablieren und optimale Methoden zu erarbeiten, wie diese Autoantikörper spezifisch und sensitiv detektiert werden können. Auf dieser Grundlage lässt sich dann leichter erforschen, wie man die Autoimmunreaktion abschwächen oder vielleicht auch verhindern kann.

Die RA ist eine chronisch-entzündliche Gelenkerkrankung und gehört nach derzeitigem Kenntnisstand zu den klassischen Autoimmunerkrankungen, bei denen pathologische Entzündungsprozesse als Ursache angesehen werden. Die genauen Begleitumstände, unter denen die natürliche Selbsttoleranz durchbrochen wird, sind noch nicht im Detail geklärt. Die Krankheit ist durch eine fortschreitende Zerstörung der Gelenke gekennzeichnet. Mit einer Prävalenz von 1 % ist die RA die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung⁴⁻⁶. Besonders häufig entsteht die Krankheit in der

fünftens Lebensdekade, wobei Frauen doppelt so häufig betroffen sind wie Männer⁷. Die genetische Veranlagung spielt neben den hormonellen Faktoren ebenfalls eine wichtige Rolle. Studien haben einen Zusammenhang zwischen der Schwere der RA und der Genetik der MHC-II-Moleküle des HLA-DR-4-Komplexes gezeigt⁵. Die Autoantikörperreaktion richtet sich mitunter spezifisch gegen Immunglobulin G, citrullinierte und andere hochkonservierte, ubiquitär exprimierte Autoantigene, in Ausnahmefällen auch organspezifisch gegen Knorpel-spezifische Autoantigene⁸. Die Pathogenese der RA ist komplex und multifaktoriell. Es wird eine Fehlreaktion des Immunsystems vermutet, bei der noch unbekannte Auslöser, wie Viren und Bakterien auf Makrophagen, autoreaktive T-Zellen und vor allem gegen autoantigene Strukturen gerichtete B-Zellen einwirken, so dass eine spezifische autoimmune Seroreaktion ausgelöst wird. Eine Besonderheit ist vor allem, dass Entzündungszellen wie Makrophagen zusammen mit Fibroblasten, T- und B-Zellen eine Interaktion eingehen, die gezielt den Gelenkknorpel und den gelenknahen Knochen angreift. Bei diesem Prozess wirken Zytokine als Steuerelemente, die die Entzündung aufrechterhalten. Interleukin (IL)-1 und -6 sowie der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) spielen in diesem Prozess eine Schlüsselrolle, weil ihre Blockade, z. B. mittels therapeutischer Antikörper, die Entzündung eindrucksvoll reduzieren kann. Diese Zytokin-Blockade beeinflusst in komplexer Weise die Bindung von Leukozyten an das Gefäßendothel im Rahmen der Migration von Leukozyten aus den Gefäßen in das Gewebe, reduziert die lokalen Entzündungsreaktionen mit Enzymfreisetzung und Gewebeerstörung im Gelenk, aber auch Akutphasereaktionen wie die Bildung von C-reaktivem Protein (CrP) in der Leber⁹.

Der chronische Entzündungsprozess führt zu einer Wucherung des Synovialgewebes, dem sogenannten Pannus. Diese histologische Veränderung bei der RA geht einher mit Knorpel- und Knochenzerstörung im Bereich der Gelenke. Dieser Pannus besteht in den aktiven Bereichen aus stark vaskularisiertem Entzündungsgewebe, das sich auf den Knorpel ausbreitet. An der Grenzfläche zum Knorpel und Knochen sind vor allem Makrophagen und Fibroblasten zu finden. In tieferen Bereichen dieses Gewebes, häufig auch in der Nähe von kleinen Gefäßen und Kapillaren, finden sich Ansammlungen von T-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen, die zu sogenannten lymphoide Follikeln anwachsen können und typisch für die RA sind. Es wird davon ausgegangen, dass diese immunologische Zellaktivität die Entzündung im Gelenk aufrechterhält und die krankheitstypischen Gelenkveränderungen hervorruft. Im

Laufe der Zeit werden so Knorpel, Knochen und auch der bindegewebige Stützapparat aus Bändern und Sehnen eines Gelenks zerstört^{10,11}.

Die Diagnose der RA erfolgt anhand von Klassifikationskriterien, die sich im Laufe der Zeit weiterentwickelt haben. Während die Klassifikationskriterien vom American College of Rheumatology von 1984¹² die Krankheit durch Spätstadium-Merkmale definierte, wobei vorrangig das klinische Krankheitsbild, die radiologischen Veränderungen und serologisch lediglich der Rheumafaktor einbezogen wurden, erfolgte im späteren Klassifizierungssystem von 2010¹³ eine Auslegung auf Merkmale der frühen Krankheitsstadien. Neben klinischen Merkmalen (Synovitiden in mehr als zwei Gelenkregionen, Dauer > 6 Wochen, Morgensteife \geq 60 Minuten) und Röntgenveränderungen werden bei den Laboruntersuchungen neben Rheumafaktoren (RF) auch α -citruillierte Protein/Peptid Antikörper (ACPA), erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und erhöhtes CrP gemessen. Auch weitere bildgebende Verfahren wie MRT, Sonografie oder Gelenkszintigraphie kommen mitunter in schwierig zu diagnostizierenden Fällen oder bei gezielteren Beurteilungen im Verlauf zum Einsatz^{13,14}.

Obgleich die Autoimmunität bei der RA seit Jahrzehnten erforscht wird, gibt es immer noch einen großen Bedarf an krankheitsspezifischen serologischen Markern, um die Frühdiagnose zu erleichtern und um neue Therapieansätze bzw. therapeutische Stratifizierung für bestehende Medikamente zu entwickeln.

Der Rheumafaktor und Antikörper gegen cyclische citruillierte Peptide (α -CCP) sind derzeit die im Alltag verwendeten serologischen Marker zur Diagnose der RA. Dabei werden jedoch rund 20 bis 25 % der Patienten als seronegative RA eingestuft (RF- und α -CCP2-Test negativ); in den frühen Phasen der Erkrankung sogar rund 30 %. Obgleich auch der sogenannte seropositive Befund nicht pathognomonisch für die RA ist und weitere Klassifikationskriterien benötigt werden, werden seronegative Patienten hinsichtlich der diagnostischen Sicherheit oft nur eingeschränkt und abwartend beurteilt. Insbesondere bei anfänglich milden klinischen Beschwerden werden sie häufig erst verspätet einer immunsuppressiven Therapie zugeführt. Damit besteht für Patienten mit seronegativem Ergebnis in der bisherigen Routinediagnostik eine Sensitivitätslücke. Man geht derzeit davon aus, dass für diese Patienten ein wichtiges Zeitfenster verpasst werden könnte, das innerhalb der ersten drei bis sechs Monate der Erkrankung liegt und eine effektive Intervention ermöglichen könnte^{15,16}.

Aus diesem Grund wird es als notwendig erachtet, weitere diagnostische Biomarker zu identifizieren, die die derzeitige serologische Sensitivitätslücke in allen Krankheitsstadien der RA schließen können, sodass die Erkrankung in den heute seronegativen Fällen frühzeitig erkannt und behandelt, das Fortschreiten der erosiven Erkrankung verzögert, der Krankheitsverlauf positiv beeinflusst wird, sogar bis hin zur Remission^{17,18} und somit die Entwicklung von Gelenkerosionen verhindert wird.

Mit der Anwendung verschiedener „Omics“-Techniken, hochauflösender bildgebender Techniken und der Untersuchung spezifischer Serummarker konnten viele Details der entzündungsabhängigen Pathogenese aufgeklärt werden. Die Diagnostik und Therapie der RA hat daher in den letzten Jahren einen enormen Fortschritt erfahren. Dabei wurden in den letzten Jahren viele Methoden zum Nachweis von Autoantikörpern auf ELISA-Basis weiterentwickelt, weil so Antigene auch in vielseitigen Veränderungen wie Mutationen (z. B. Vimentin) oder posttranslationaler Modifikation (z. B. Citrullinierung) rasch zur Anwendung kommen konnten und für die Frühdiagnostik unverzichtbar geworden sind. Somit ist die Messung von krankheitsspezifischen Autoantikörpern im Serum ein entscheidender diagnostischer Faktor geworden.

Aufgrund der großen Bedeutung der Autoantikörper für die Frühdiagnose und Behandlung und der unterschiedlichen Sensitivitäts- und Spezifitätslücken einzelner Marker empfiehlt sich, mehrere Serummarker zu kombinieren; aus Kostengründen allerdings mit einem mehrstufigen Vorgehen, da mit RF und ACPA bereits ca. 70 % der Patienten erfasst werden können^{19,20}. Neben der Anwendung in der Frühdiagnostik sind weitere Studien erforderlich, um eine Korrelation mit der Krankheitsaktivität und der Prognose der Progression, Komorbiditäten und Komplikationsraten der RA herzustellen. Zu den bekannten Autoantikörpern im Zusammenhang mit der RA gehören neben RF und ACPA auch Antikörper gegen mutierte und citrullinierte Formen des Vimentin (Anti-MCV-Antikörper), aber auch viele Autoantikörper, die, wenn überhaupt, meist nur differentialdiagnostisch in der Routine zum Einsatz kommen. Dazu gehören antinukleäre Antikörper (ANA), Antikeratin-Antikörper (AKA), Anti-Perinukleärer Faktor (APF), Anti-Fibronectin-Antikörper (AFA), Anti-Sa-Antikörper, Anti-Glucose-6-Phosphat-Isomerase (GPI)-Antikörper, Antikörper gegen carbamylierte und/oder acetylierte Proteine, Anti-BiP-Antikörper und Anti-Calcitostatin-Antikörper (ACAST), Anti-Collagen Typ II (CII)-

Antikörper und Antikörper gegen heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein (anti-hnRNP/RA33 Antikörper)⁶.

Das hnRNP-A2/B1 mit dem zugehörigen Autoantikörper RA33 gehört bereits zu den wichtigsten RA-relevanten Autoantigenen. Autoantikörper gegen hnRNP-Komplexe wurden bereits Anfang der achtziger Jahre erstmals bei Patienten mit SLE, RA und Mischkollagenose (mixed connective tissue disease; MCTD) gefunden^{21,22}. DANGLI et al. (1988)²³ identifizierten und charakterisierten diese als Antikörper gegen verschiedene hnRNP-Proteine. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von etwa 30 Proteinen, die Chromatin-assoziiert sind, in Verbindung mit RNA ihre Hauptfunktionen entfalten (Splice-Prozess, Transport reifer mRNA, Translationskontrolle) und sehr variabel ubiquitär exprimiert sind^{24,25}. Auch wenn diese Proteine in erster Linie im Zellkern angesiedelt sind, wurden auch spezifische strukturelle Motive gefunden, die ihnen die Fähigkeit verleihen, zwischen Zellkern und Zytoplasma zu pendeln. Weiter wurde gezeigt, dass die hnRNPs am Export verschiedener Proteine und der mRNA aus dem Zellkern beteiligt sind^{26,27}. Akindahunsi et al. (2005)²⁸ untersuchten verschiedene hnRNPs und versuchten anhand von Gen-Homologien die Verwandtschaftsverhältnisse zu charakterisieren. Diese Proteine zeigen einen modularen Aufbau, weisen konservierte Bereiche mit zwei RNA-Bindungsdomänen und einem C-terminalen Glycin-reichen Bereich auf, unterscheiden sich jedoch stark in den jeweils einzigartigen N-terminalen Regionen. Entsprechend der Ähnlichkeiten wurden die Proteine in eine A- und eine D-Untergruppe eingeteilt. Dabei konnte der A-Untergruppe das hnRNPA0, -A1, -A2 und -A3 und der D-Untergruppe das hnRNPA/B, -D und D-like zugeordnet werden²⁹⁻³¹.

Bereits 2008 wurde in der Arbeitsgruppe das hnRNP-D (AUF1) mit Hilfe von Protein-Makro-Array-Technologie identifiziert und als neue autoantigene Struktur bei verschiedenen rheumatischen Erkrankungen beschrieben³². In einer anderen früheren Studie wurde gezeigt, dass mit hnRNPs (-A1, -A2/B1 und -A3) restimulierte Splenozyten von Ratten, die eine Pristan-induzierte Arthritis (PIA) ausgebildet hatten, eine stark entzündliche und erosive Arthritis bei naiven Empfängerratten ausgelöst werden konnte, die klinisch und histologisch der RA ähnelt³³. Weiter wurde gezeigt, dass humane TNF- α transgene Mäuse, die eine erosive entzündliche Polyarthritits entwickeln, α -hnRNP-Autoantikörper aufweisen³⁴.

Diese Daten stützen die Hypothese einer pathogenen Rolle von hnRNPs bei erosiver Arthritis und legen nahe, dass die Autoimmunität gegen Nukleinsäure-assoziierte Autoantigene eine entscheidende Rolle bei der Krankheitsentstehung von PIA und entsprechend reaktiven RA-Patienten spielen könnte³⁵. Die intraperitoneale Injektion von hnRNPs induziert proinflammatorische Zytokine, die für die Arthritis-Entwicklung bei Ratten relevant sind, wobei TLR7 und -9 als Erkennungsrezeptoren für virale Einzelstrang-RNA bzw. unmethylierte, virale oder bakterielle DNA eine Rolle spielen, nicht aber TLR3 und -4, die bei der Erkennung von viraler Doppelstrang-RNA bzw. Lipopolysacchariden von Bakterien bedeutsam sind³⁶.

Innerhalb dieser Arbeit wurde ein weiterer Vertreter der D-Untergruppe, das hnRNP-D-like-Protein (auch hnRNP-DL oder JKTBP genannt) untersucht. Weil hnRNP-D und -DL einen engen Verwandtschaftsgrad aufweisen (Sequenzähnlichkeit von 89,1 %) ³⁷ mit ähnlichen strukturellen Merkmalen und Bindungseigenschaften³⁸, wurden vergleichbare autoantigene Eigenschaften vermutet. Ziel war dabei hnRNP-DL als neue autoantigene Struktur zu charakterisieren mit folgender Fragestellung: Kann die auf dem Array gefundene hnRNP-DL -Variante (AS 81-420), die so in der Natur nicht vorkommt, in nativer oder citrullinierter Form, als neuer Biomarker bei der rheumatoiden Arthritis (RA) fungieren und gibt es einen serodiagnostischen und klinischen Mehrwert für die RA-Therapie? Können Immundetektionen auf Zellen und Geweben oder die Analyse von Mausmodell-Seren Hinweise liefern, um den Ursprung dieser Autoantikörper aufzuklären?

Dazu wurden Lokalisationsstudien für die Expression von hnRNP-DL durchgeführt, die Einflüsse der wichtigsten entzündungsfördernden Zytokine bei der RA wie IL-1 α , IL-6 und TNF- α ^{39,40} die Proteinexpression in verschiedenen Zelllinien getestet und die Expression im Synovialgewebe analysiert. Bei Tiermodellen von RA und SLE wurden Autoantikörper gegen hnRNP-DL untersucht.

Der Schwerpunkt der Arbeit lag jedoch auf der Betrachtung von Autoantikörpern bei Patienten mit einer rheumatoiden Arthritis. Dazu wurden rekombinante hnRNP-Proteine aufgereinigt und ein Immuntest entwickelt, der eventuell für ein krankheitsspezifisches Nachweisverfahren verwendet werden kann oder als Grundlage für Weiterentwicklungen dient. Durch die kombinierte Betrachtung der nativen und citrullinierten Antigene sollte ein neuartiger diagnostischer Parameter erzeugt werden, der einerseits für seronegative Patienten die frühzeitige Diagnostik

verbessern könnte und außerdem als Marker für Prognose und Therapiewahl eine Bedeutung haben könnte.

2 Methoden

2.1 Protein Macroarray als Screening neuer Biomarker

Für die Untersuchung neuer Autoantigene bei der RA wurden hEX1-Protein-Makroarrays (engine GmbH, Hennigsdorf, Deutschland) analysiert. Diese Arrays sind aus der cDNA des menschlichen fötalen Gehirns abgeleitet worden⁴¹. Die Immundetektion wurde, wie vom Hersteller beschrieben, durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Blockierung unspezifischer Bindungen durch Inkubation in Block-Puffer (3 % w/v Milchpulver in TBST; 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.05 % Tween-20) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Probeninkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C in Block-Puffer, mit einer 1:50 Verdünnung. Nach drei Waschschrritten, für jeweils 20 Minuten in TBST-T (TBS mit 0.05 % Triton X-100), erfolgte die Inkubation mit Zweitantikörper, einem alkalische Phosphatase (AP)-konjugierten Ziege- α -human-IgG-Antikörper (A9544, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), für 2 Stunden bei Raumtemperatur, verdünnt in Block-Puffer. Nach drei Waschschrritten mit Inkubation für jeweils 20 Minuten in TBST-T wurden die Arrays für 10 Minuten mit AP-Puffer (1 mM MgCl₂, 100 mM Tris-Cl, pH 9.5) inkubiert. Die Entwicklung erfolgte durch fünfminütige Inkubation, mittels 0.125 mM Attophos (Roche, Basel, Schweiz) in AP-Puffer.

Die Arrays wurden mit einer CCD-Kamera (Fuji LAS 1000, Tokio, Japan) mit einer Anregungswellenlänge von 460 nm visualisiert und mit der AIDA-Software (Raytest, Berlin, Deutschland) analysiert. Dabei wurde jedem Spot ein Intensitätswert zugeordnet. Die positiven Spots wurden dann über ihre Lokalisation auf dem Array hinsichtlich ihrer Klonidentität identifiziert. Die komplette Prozessierung und Software-Auswertung der Arrays erfolgte von der Firma engine GmbH.

2.2 Generierung der rekombinanten hnRNPs als His-tag Fusionsproteine und Aufarbeitung/Immundetektion von Proteinen aus Synovialgewebe

Rekombinantes hnRNP-DL (UniProt NP_112740.1⁴²) wurde in zwei bakteriellen Klonen und jeweils in einem pRSET-Vektor (engine GmbH, Hennigsdorf, Deutschland) exprimiert. Es wurden zwei verschiedene Proteinfragmente von hnRNP-DL (Aminosäure 81-420 und 120-420) von mir exprimiert und aufgereinigt. Die längere

Variante wurde auf dem Array von Patientenseren detektiert. Die kurze Variante wurde nicht detektiert und wurde als Negativkontrolle verwendet. Weil auf dem Array kein Klon verfügbar war, der die komplette hnRNP-DL Sequenz (Aminosäure 1-420) repräsentierte, wurde dieser von mir selbst kloniert, transformiert, exprimiert und aufgereinigt. Dazu wurde die cDNA von hnRNP-DL (IRAU969E0262D) von Source BioScience (Nottingham, Vereinigtes Königreich) bezogen. Unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt:

Primer 1: GACGACGACAAGATGGAGGTCCCGCCCAG (Biolegio, Nijmegen, Niederlande)

Primer 2: GAGGAGAAGCCCGGTTAGTATGGCTGGTAATTG (Biolegio, Nijmegen, Niederlande)

Die PCR wurde mit Hilfe der Platinum® Pfx DNA Polymerase (Invitrogen, D-Karlsruhe) nach Herstellerprotokoll in einem GeneAmp® PCR System 9700 PCR-Cycler (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Das Endvolumen der Amplifikationsreaktion betrug jeweils 50µL. Nach der initialen Denaturierung der DNA bei 94 °C für 5 Minuten wurden folgende Schritte in 35 Zyklen periodisch durchlaufen: 20 Sekunden bei 95 °C; 20 Sekunden bei 55 °C; 90 Sekunden bei 68 °C. Die Auswertung erfolgte über Agarosegelelektrophorese. Dazu wurden jeweils 10 µL PCR-Produkt mit 2 µL sechsfach Probenpuffer (Fluka, Altmann Analytik München, Deutschland) über horizontale Gelelektrophorese in 2 %igen (w/v) Agarosegelen (Agarose GTQ, Roth, Karlsruhe, Deutschland) und bei 80 mV, in TAE-Puffer (Fluka, Altmann Analytik München, Deutschland) für 45 Minuten aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden durch Gelred (Biotium, Fremont, USA), welches 1:10000 direkt zum Gelansatz gegeben wurde, mittels UV-Filter in einem Gel-Dokumentationssystem visualisiert (G:Box, Syngene, Cambridge, UK). Das gewünschte Fragment wurde mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel extrahiert und nach Anleitung des Herstellers mit einem Kit-System aufgereinigt (QIAquick Gel Extraction Kit/QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland).

Die hnRNP-DL-Sequenz wurde mit dem pET-30 Ek/LIC-Vektor-Kit (Merck Millipore, Billerica, USA) nach Herstellerprotokoll kloniert. Für die Transformation wurden chemisch kompetente One-Shot™-BL21-(DE3)-pLysS Zellen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Anschließend erfolgte die Plasmidpräparation (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Klonierung wurde durch Sequenzierung überprüft (LGC Genomics, Berlin, Deutschland). Dieses damit erzeugte Protein (hnRNP-DL, Aminosäure 1-420) wurde in Vorexperimenten mit dem hnRNP-DL (Aminosäure 81-420) verglichen.

Als weiteres Kontrollprotein und zum Test auf Kreuzreaktivität wurde das bereits publizierte hnRNP-D in den Expressionsstamm BL21-(DE3)-pLysS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gemäß dem Herstellerprotokoll transformiert, exprimiert und aufgereinigt. Das hnRNP-D (AUF1)-Isoform p45, kloniert in den pTrcHis-Vektor (Life technologies; Carlsbad, USA), enthält die längste Transkriptvariante von AUF1 (UniProt NP_112738.1⁴²). Diese besteht aus 322 Aminosäuren (45 kDa) und wurde von Gary Brewer (School of Medicine, Wake Forest University, USA) zur Verfügung gestellt.

Für die Proteinexpression wurden jeweils 5 mL LB-Medium verwendet, das passend zur selektiven Vermehrung des Expressionsvektors mit Antibiotikum versetzt wurde (pET-30 Ek/LIC, 30 µg/mL Kanamycin; pRSET/pTrcHis, 50 µg/mL Ampicillin). Die Kulturen des Expressionsstammes (*E. coli* LysS oder -SCS1) wurden aus der Glycerolkultur (1 mL Übernachtskultur, 30 % Glycerin) im Expressionsmedium angeimpft und ca. 16 Stunden inkubiert. Diese Kultur wurde dann in 1 L LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum als Hauptkultur überführt und bei 37°C unter Schütteln bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600nm} = 0.4-0.6$) inkubiert. Dann erfolgte die Induktion der Expression des His-Tag-Fusionsproteins durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, Roth, Karlsruhe, Deutschland). Nach 4 Stunden wurden die Bakterienzellen bei 20.000 g für 10 Minuten pelletiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Die Aufreinigung erfolgte mittels Metallchelataffinitätschromatografie (IMAC) auf HisPur Cobalt Resin (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) nach Angaben des Herstellers unter denaturierenden Bedingungen, diskontinuierlich im sogenannten „Batch-Verfahren“ (hnRNP-DL/AUF1). Die Aufreinigung größerer Proteinmengen erfolgte kontinuierlich im Säulen-Verfahren mittels Flüssigchromatographie-Systems (ÄKTA prime, GE Healthcare, Chicago, USA).

Der Aufschluss erfolgte mit Ultraschall (5x jeweils 30 Sekunden auf Eis; Stufe 5, SONIFIER B-12, Branson Ultrasonics, Brookfield, Connecticut, USA). Das

Gesamtprotein wurde mit dem Bradford-Assay (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gemessen. Für die Kontrolle der Proteinexpression und der Reinigung wurden jeweils 20 µL Probe mit 4 µL sechsfach Probenpuffer⁴³ 5 Minuten aufgekocht und auf 12.5 %ige SDS-Polyacrylamidgelen mit 4 %igem Sammelgel in einer Gel-Apparatur (Mighty Small II, Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgetrennt und mittels InstantBlue™ (Abcam, Cambridge, UK) fixiert und angefärbt.

Neben den Fusionsproteinen wurden auch die Proteine aus humanem Synovialgewebe aufgearbeitet. Die Probe wurde von einem Patienten mit rheumatoider Arthritis gewonnen (Gelenkbiopsien, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie, Charité, Berlin). Die Lyse des Synovialgewebes wurde in M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent 78501; Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA) mit Zugabe von Proteaseinhibitor-Cocktail (P8340; Sigma, St. Luis, USA), bestehend aus 100 µM Na₃VO₄, 150 mM NaCl und 1 mM DTT, durchgeführt. Anschließend erfolgte die Homogenisierung mit einem Ultra Turrax (T25; IKA, Staufen, Deutschland) dreimal für jeweils 1 Minute. Der Aufschluss wurde abzentrifugiert (1 Minute, 17.000 g) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde dann weiter, dreimal für jeweils 1 Minute mit Ultraschall (VibraCell; Sonics and Materials, Danbury, USA) in 8M Harnstoff homogenisiert, um auch die schwerlöslichen Proteine aufzuarbeiten. Die Auftrennung erfolgte auf einem SDS-Gel, wobei jeweils 10 µg des Überstandes und des Pellet-Homogenats zusammen in einer Probenflasche aufgetragen wurden.

Für den immunologischen Nachweis der Proteine wurden diese nach der SDS-PAGE auf eine Nitrocellulosemembran (BA85; Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) übertragen. Der Proteintransfer erfolgte im Tank-Blot-Puffer (15 mM Tris, 0.1 mM Glycin) für 1 Stunde und 400 mA in einer Blotkammer (TE22; Hoefer, Holliston, USA) unter Rühren und Wasserkühlung. Danach wurde die Membran etwa 5 Minuten in Ponceau S-Lösung (destilliertes Wasser, 0.2 % w/v Ponceau S, 3 % w/v TCE, 3 % w/v Sulfosalicylsäure) inkubiert und anschließend mit Wasser gewaschen, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Die Membranen wurden getrocknet bei 4 °C gelagert. Zur immunologischen Detektion der Proteine auf der Nitrocellulosemembran wurde diese für 1 Stunde geblockt in 3% w/v Milchpulver in PBS, pH 7.4. Der Primärantikörper wurde in Block-Puffer verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dabei wurde ein α-hnRNP-DL-Antikörper (ARP40586_P050; 1:500; Aviva Systems Biology, San Diego, USA), ein α-hnRNP-DL-spezifisches Kaninchenserum

(Peptidmotiv MEDMNEYSNIEEFAEGSK, enthalten in allen hnRNP-DL-Isoformen, 1:100, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) oder ein Antikörper gegen deiminiertes Arginin (ABAP-Kit; 1:500; Modiquest, Oss, Niederlande) verwendet. Nach drei Waschschritten mit PBS, pH 7.4, 0.05 % Triton X-100 wurde die Membran eine Stunde lang mit einem α -Kaninchen IgG- oder α -Maus IgG-Peroxidase-Konjugat (Dako Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, USA) 1:1000 verdünnt in Waschpuffer mit fettfreier Milch (3 % w/v) inkubiert. Nach fünf Waschschritten von jeweils 5 Minuten mit Waschpuffer erfolgte die Entwicklung der Chemilumineszenz mit Roti Lumin Substrat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) entsprechend der Anweisungen des Herstellers.

Die gesamte beschriebene Protein- und DNA-technische Methodik, außer der Entnahme der Gelenkbiopsie vom Patienten, wurde von mir durchgeführt und ausgewertet.

2.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Immunoaffinitätsreinigung von α -hnRNP-Autoantikörpern

Es wurde ein nichtkompetitiver einseitiger Enzym-Immunoassay (ELISA) zum Autoantikörpernachweis durchgeführt. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit den aufgereinigten rekombinanten Proteinen durch passive Adsorption beschichtet (Nunc Maxisorp mit 96 Vertiefungen; Nalgene Nunc International, Rochester, NY).

Pro Vertiefung wurden 1 μ g Protein in einem Kopplungsvolumen von 100 μ L PBS eingesetzt. Um die Probenhintergrundkontrolle zu detektieren, wurden parallel entsprechende Vertiefungen nur mit Beschichtungspuffer inkubiert. Die Inkubation erfolgte 16-18 Stunden bei bei 4 °C.

Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (0.1 % v/v Tween20 in PBS, pH 7.4, 300 μ L/Vertiefung) und einem Blockierungsschritt (5 % w/v Milchpulver in PBS, pH 7.4, 200 μ L/Vertiefung) für 90 Minuten unter Schütteln wurden die Platten dann mit den Serumproben (1:200 Verdünnung in 1.5 % w/v BSA in PBS, pH 7.4, 100 μ L/Vertiefung) für 60 Minuten unter Schütteln inkubiert. Auf jeder Platte wurde jeweils eine Sekundärantikörperkontrolle mitgeführt, bei der nur Serumverdünnungspuffer pipettiert wurde. Die Platten wurden anschließend viermal mit Waschpuffer gewaschen und mit dem entsprechenden Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (α -human IgG, P0214, 1:5000; α -Maus IgG, P0260, 1:1000;

Dako Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, USA, verdünnt in 5 % w/v Milchpulver in PBS, pH 7.4, 100 µL/Vertiefung) 45 Minuten schüttelnd inkubiert. Danach wurden die Platten fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Die Entwicklung erfolgte über 5 Minuten mit 3.3',5.5'-Tetramethylbenzidin (TMB; Seramun, Heidese, Deutschland) (100 µL/Vertiefung) und das Abstoppen der Reaktion mit 0.5 M H₂SO₄ (100 µL/Vertiefung). Die Farbreaktion wurde mit einem SpectraFluor-Reader (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 450 nm und 620 nm als Referenzwellenlänge gemessen.

Alle ELISA-Inkubationsschritte wurden bei 200 rpm geschüttelt (Titramax; Fa. Heidolph Schwabach, Deutschland). Die Waschschrirte erfolgten automatisch (HydroFlex™, Tecan, Männedorf, Schweiz).

Die antigenspezifischen Cutoff-Werte wurden mittels sogenannter „receiver operating characteristic“ (ROC)-Analyse (GraphPad Software, Version 8.0.0, San Diego, Kalifornien, USA, www.graphpad.com) entweder im Vergleich zu anderen Krankheiten (außer SLE) oder im Vergleich zu normalen Kontrollen bestimmt, jeweils mit 98 % Spezifität. Entsprechend dieser Cutoff-Werte erfolgte die qualitative (positiv/negativ) Bewertung der Seren.

Zur Bestimmung der Serumreaktivität gegen die citrullinierten Formen der Antigene wurden die beschichteten ELISA-Platten in vitro citrulliniert, indem sie 3 Stunden bei 55 °C mit Kaninchen-Peptidyl-Arginin-Deiminase (PAD; Sigma; St. Louis, USA) in einer Menge von 60 mU pro Vertiefung in 100 mM Tris, 5 mM DTT und 10 mM CaCl₂ inkubiert wurden. Parallel wurden Kontrollen mitgeführt, bei denen nur Citrullinierungspuffer pipettiert wurde. Anschließend wurden die ELISA-Experimente wie beschrieben durchgeführt.

Zum Nachweis der Reaktivität gegen zyklische citrullinierte Peptide sowie des Rheumafaktors wurden kommerzielle ELISA-Kits (Euroimmun, Lübeck, Deutschland) gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet.

Für die statistische Analyse wurden der Mann-Whitney-Test, der Spearman-Korrelationstest oder die ROC-Analyse durchgeführt (GraphPad Software, Version 8.0.0, San Diego, Kalifornien USA, www.graphpad.com).

Für die Charakterisierung der Autoantikörper im Immunfluoreszenztest wurden spezifische hnRNP-DL (Aminosäure 81-420) und hnRNP-D (p45) mittels ELISA-Elutionstechnik isoliert und gereinigt, nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie. Das rekombinante Protein wurde, wie bereits

beschrieben, gekoppelt. Nach dem Blockierungsschritt wurden die Mikrotiterplatte mit einem RA-Patienten-Serumpool (10 RA-Seren, jeweils 1:25 verdünnt mit 1.5 % w/v BSA in PBS pH 7.4) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zur Entfernung der ungebundenen Komponenten folgten drei Waschschrte für jeweils 1 Minute (PBS-0.1 % v/v Tween20, 300 µl pro Vertiefung). Die Elution der proteinspezifisch gebundenen Antikörper erfolgte durch die Erniedrigung des pH-Wertes mit einem Glycin-Puffer (0.2 M Glycin-HCl, pH 2.4). Pro Vertiefung wurden 100 µL pipettiert und die Platte für 10 Minuten schüttelnd inkubiert. Bei Abnahme des Eluats aus den einzelnen Vertiefungen wurde mehrmalig resuspendiert, um die Ablösung der Antikörper zu verstärken. Das Eluat wurde gepoolt und mit 1:7 des Gesamtvolumens mit 1 M Tris, pH 8.8 zur Neutralisation versetzt. Anschließend erfolgte die Dialyse gegen PBS pH 7.4 (Membra-Cel™, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland).

Die Entwicklung, Durchführung und Auswertung der ELISA-Tests sowie die Immunoaffinitätsreinigung wurden von mir durchgeführt. Die α -CCP2-Untersuchung der SLE Seren wurde von Madeleine Jenning durchgeführt.

2.4 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie und Immunhistochemische Analyse

Die affinitätsgereinigten Antikörper wurden auf HEp-2 Zellen in einem indirekten Immunfluoreszenztest in Bezug auf α -nukleäre bzw. α -cytoplasmatische Antigenreaktion charakterisiert. Dabei wurde mit dem ANA HEp-2 Plus Kit (Generic Assays Dahlewitz, Deutschland) nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Die Objektträger wurden mit den affinitätsgereinigten α -hnRNP-D p45- oder α -hnRNP-DL-Antikörpern jeweils unverdünnt in PBS oder Kaninchen- α -RCK/p54-Antikörpern⁴⁴ (1:500; University of Florida, Gainesville, Florida, USA) nach Angaben des Herstellers über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Anschließend wurden die entsprechenden Sekundärantikörper gegen humane Antikörper (FITC-konjugierte α -Human-IgG Antikörpern; ANA HEp-2 plus; Generic Assays, Dahlewitz, Deutschland) bzw. gegen Kaninchen-Antikörper (polyklonalen Ziegen- α -Kaninchen-IgG (H+L)-Cy3 (1:50, 111-165-144, Dianova; Hamburg, Deutschland) inkubiert. Die Auswertung der Präparate erfolgte bei 400-facher Vergrößerung unter Verwendung der entsprechenden Wellenlängenfilter für die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (FITC: Anregungswellenlänge: 490 nm/

Emissionswellenlänge: 520 nm; Cy3: Anregung: 550 nm/ Emission: 570 nm) mit einem Fluoreszenzmikroskop Axiphot (Carl Zeiss; Jena, Deutschland).

HeLa-Zellen wurden ausplattiert und 1 Stunde mit 0,5 M Natriumarsenit behandelt⁴⁵. Als Primärantikörper wurden die affinitätsgereinigten α -hnRNP-DL-Antikörper unverdünnt, Kaninchen-Antikörper gegen humane hnRNP-D-Peptide³² in 1:1000, Maus α -ATXN2-Antikörper⁴⁶ in 1:200 und Maus α -hnRNP-A2/B1 (Acris Antibodies, San Diego, USA) in 1:500 Verdünnung in PBS getestet. Die Durchführung der Immunfärbung und die mikroskopische Auswertung erfolgte durch Franziska Welzel wie bereits beschrieben⁴⁷.

Weiter wurde humanes Synovialgewebe immunhistochemisch analysiert. Dazu wurde der α -hnRNP-DL-Antikörper (ARP4085_T100; Aviva Systems Biology; San Diego, USA) in einer Verdünnung von 1:50 auf einem Gewebemikroarray (TMA, Provitro, Berlin, Deutschland) analysiert. Dieser enthielt humane Synovialgewebe-Paraffinschnitte von Patienten mit rheumatoider Arthritis (n=10), Osteoarthritis (n=12) und von gesunden Spendern (n=4). Zur Visualisierung wurde das Novolink™ Polymer Detection System (RE-7140-CE; Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) verwendet. Die Objektträger wurden mit einem CX41-Mikroskop (Olympus, Tokio, Japan) in 20- bzw. 40-facher Vergrößerung analysiert.

Die Herstellung und die Immunfärbung der TMA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers durch die Firma Provitro (Berlin, Deutschland). Die Immunfluoreszenz-Analyse erfolgte von mir zusammen mit Franziska Welzel, Silvia Krobtsch und Madeleine Jenning. Die Immunhistochemische Analyse wurde von mir durchgeführt und zusammen mit Karl Skriner ausgewertet.

2.5 Datenbanksichtung und Globaler Sequenzvergleich

Mit Hilfe der Datenbank Gen-Bank-EMBL⁴⁸ wurden die DNA-Sequenzen analysiert. Die Primer-Sequenzen wurden mit dem BLASTn-Algorithmus⁴⁹ auf Spezifität geprüft. Weiter wurden die Aminosäuresequenzen der beiden hnRNP-Proteine hnRNP-D (Isoform A, 355 AS) und hnRNP-DL (Isoform 1, 420 AS) auf homologe Sequenzbereiche untersucht. Des Weiteren wurde humanes und murines hnRNP-DL auf Homologie analysiert. Das globale Sequenz-Alignment der Proteinsequenzen erfolgte nach dem Needleman-Wunsch-Algorithmus³⁷ mittels des Programms Needle (Version 2019⁵⁰), welches online über die EMBL-Website abgerufen wurde⁵¹.

Die Analysen wurden von mir durchgeführt.

3 Ergebnisse und Diskussion

Auf der Suche nach neuen Autoantikörpern als Biomarker, die speziell für die RA relevant sind, wurde als Screening-Verfahren die Protein-Macroarray-Technologie (hEx1, engine GmbH, Hennigsdorf, Deutschland) eingesetzt. Es wurden Seren von RA-Patienten und Kontrollseren von Arthrose (OA)-Patienten sowie von gesunden Blutspendern (n=20 je Gruppe; Charité, Berlin) vergleichend auf ihre Antikörper-Reaktivität gegen die, auf dem genannten Macroarray aufgebrachte humane Protein-Bibliothek untersucht⁵². Es wurden mehrere RA-spezifische Antigene identifiziert (Additional file 2: Tab. 1)⁵³. In Anbetracht von bereits publizierten Ergebnissen der Arbeitsgruppe zum hnRNP-A2/B1 und hnRNP-D^{32,54} wurde aus der Positivliste das eng verwandte Protein hnRNP-DL ausgewählt und im Rahmen dieser Arbeit im Detail untersucht. Innerhalb der getesteten Proteinbibliothek zeigte speziell der Klon, der ein Proteinfragment der Aminosäure 81-420 exprimiert, bei 20 % der getesteten RA-Patienten ein RA-spezifisches positives Signal. Weil das kürzere DL-Fragment (Aminosäure 120-420) ebenso auf dem Array vorhanden ist, jedoch nicht von den RA-Seren erkannt wurde, konnte die Region der Epitop-Bindung auf die Aminosäuren 81-119 eingegrenzt werden. Dieses Protein wurde hnRNP-DL_{mir} (major immunogenic region) genannt. Diese N-terminale Region ist hnRNP-DL-spezifisch und in anderen humanen Proteinen nicht zu finden (Additional file 1: Figure 1)⁵³. Obwohl die Antikörperbestimmung lange etabliert ist, wurden in den letzten 20 Jahren kaum neue Methoden auf diesem Sektor entwickelt. Neben Screening-Verfahren wie SEREX/SERPA oder Phage-Display stellen dabei die Protein- und Peptid-Arrays eine sehr effiziente und etablierte Standard-Strategie dar, um neue Biomarker zu finden⁵⁵. Die verwendeten kommerziell erhältlichen Protein-Arrays enthalten, bedingt durch die Generierung der hEX1 Klon-Bank⁴¹, auch zufällig entstandene Abbruchklone, wodurch verschiedene verkürzte Proteinvarianten desselben Proteins auf dem Array exprimiert werden. Dadurch kann einerseits ein neuer potentieller Biomarker gefunden werden und gleichzeitig bestimmte Epitope und im Vergleich mit deren, modifizierte Varianten herausgestellt werden⁵⁶ und Protein-Antikörper-, Protein-Ligand- oder Protein-Wirkstoff-Interaktionen detektiert werden. Zudem können auch Sekundär- und Tertiär-Strukturen analysiert werden, deren Darstellung bei reinen Peptid-Arrays kaum oder nur sehr eingeschränkt möglich ist. Durch die Heterogenität der antigenspezifischen Immunantworten zwischen den einzelnen Individuen, variiert

die Anzahl der identifizierten Autoantigene von Probe zu Probe in jeder untersuchten Gruppe. Um statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten sind daher eine gewisse Anzahl von Proben zu analysieren. Weil man nur eine Probe pro Array austesten kann, steigt dabei der experimentelle und wirtschaftliche Aufwand. Für die Validierung des Antigensets und Integration in die klinische Praxis ist daher diese Methode nicht praktikabel und ELISA-, Bead- oder Streifentest-basierte Methoden mehr geeignet. Dabei ist der ELISA-Test als sehr gut validierte und bewährte Methode anwendbar um Autoantikörper zu messen⁵⁷. Im Handel sind alle erforderlichen Reagenzien für die Durchführung des Tests als Kits erhältlich, so dass ein schneller Zugang in ein standardisiertes Verfahren möglich ist. Diese Methode wurde daher in dieser Arbeit eingesetzt, um den diagnostischen Wert der Autoantikörper zu analysieren.

Das rekombinant exprimierte und gereinigte Protein wurde im ELISA mit Seren von verschiedenen RA-Kohorten (Risk-RA⁵⁸, mit/ohne RA-Diagnose n=34/28, Karolinska-Universitätskrankenhaus, Stockholm, Schweden; Risk-RA, mit/ohne Diagnose n=3/6, Universität Erlangen; frühe RA Kohorte, EIRA⁵⁹, n=404, Karolinska-Universitätskrankenhaus Stockholm, Schweden; frühe RA-Kohorte mit Lungenbeteiligung, LURA⁶⁰, n=106, Karolinska-Universitätskrankenhaus, Stockholm, Schweden; etablierte RA-Kohorte der Predict⁵², n=127, Charité), Patienten mit verschiedenen anderen rheumatischen Erkrankungen (SLE, n=89; Multiple Sklerose, Sklerodermie, Sjögren Syndrom, Morbus Bechterew, Psoriasis arthritis, Osteoarthritis, je n=20; reaktive Arthritis, n=7, Hietzing Klinik, Wien und Charité) und gesunden Kontrollen (n=86, Charité) auf Reaktivität getestet. In diesen Studien wurde die Mehrheit der IgG-Autoantikörper gegen hnRNP-DL_{mir} in Seren von Patienten mit SLE (36 %) und RA (6-21 %) gefunden. In geringerem Maße wurde das Vorkommen von Reaktivitäten auch bei Psoriasis Arthritis (15 %), Multipler Sklerose und Sklerodermie (jeweils 5 %) sowie bei gesunden Kontrollen (2 %) nachgewiesen⁵². Zur Bestätigung der ersten Proteinarray-Daten zeigte die ebenfalls gereinigte hnRNP-DL2-Isoform (Aminosäure 120-420), der die einzigartige N-terminale Region fehlt, eine deutlich geringere Seroreaktivität bei RA- (9 %) und SLE-Patienten (15 %) im Vergleich zur hnRNP-DL_{mir}-Variante. Weiter wurde auch die komplette hnRNP-DL1-Isoform (1-420) mit einer Auswahl von RA-Seren im ELISA getestet. Bei dieser Variante war die Reaktivität ebenfalls geringer. Vermutlich hängt diese Veränderung der Reaktivität mit der Tertiärstruktur des Proteins zusammen und es kommt während des nativen Kopplungsprozesses auf der ELISA-Platte zu

einer Umfaltung des Proteins, die das Epitop teilweise verdecken könnte. Zur genauen Charakterisierung eines Epitops in der Primär- und/oder Sekundärstruktur des Proteins könnte analog zu den Arbeiten von Jennings et al. 2020⁵⁶ ein Peptidscreening erfolgen und dazu ein standardisierter Peptid-ELISA-Test entwickelt werden. Es wurde jedoch auf eine solche Einschränkung der Epitop-Suche verzichtet und in dieser Arbeit die Immunreaktion des bereits identifizierten komplexeren Epitops charakterisiert und Einflüsse durch Citrullinierung näher untersucht.

Durch die Testung der verschiedenen RA-Kohorten konnte das Autoantikörperniveau bei verschiedenen Krankheitszuständen und Behandlungen geprüft werden. Die frühen RA-Kohorten (Risk-RA⁵⁸, 13 %/EIRA⁵⁹, 21 %) zeigten dabei höhere Sensitivitäten als die Kohorten mit längerer Krankheitsdauer und unter verschiedenen Therapien (LURA⁶⁰, 8 %/Predict (etablierte RA, Charité)⁵², 6 %).

Neben der unmodifizierten Form der klonierten und aufgereinigten hnRNP-DL Proteine wurden diese auch als citrulliniertes hnRNP-DL (cit-DL) untersucht, weil bekanntlich die citrullinierten Antigene RA-spezifische Autoantikörperziele sind, darunter auch citrulliniertes hnRNP-A2/B1³⁵. Die parallele Detektion des citrullinierten Antigens wurde dabei in den ELISA-Test integriert. Dabei war keine zusätzliche Antigenpräparation erforderlich, weil das Antigen direkt auf der ELISA-Platte citrulliniert wurde. Bei paralleler Austestung eines größeren Protein-Sets, wird die Durchführung und der Probenaufwand allerdings auch komplexer und ineffizient. Dabei könnte man versuchen mehrere Biomarker in einem Well zu detektieren und einen Multiplex-Test zu entwickeln, wie es beispielsweise für Diabetes Biomarker publiziert wurde⁶¹

In den Kohorten der frühen und auch der etablierten RA wurde bei cit-DL die höchste Sensitivität detektiert (64-100 %)⁵². Diese Beobachtungen geben eine Anregung für zukünftige Experimente, hnRNP-DL und cit-DL in Verlaufspuren des gleichen Patienten zu untersuchen, um die Stabilität dieser spezifischen Autoreaktivität im Rahmen der Chronifizierung sowie unter Therapie, insbesondere unter Blockade der Ausreifung neuer B-Zell-Klone durch Rituximab, zu betrachten.

Bei der Prüfung von SLE-Seren mit cit-DL wurden 58 % positiv getestet, die im α -CCP2 Test zu 98 % negativ waren⁵². Es werden demnach Strukturepitope durch Citrullinierung erzeugt und erkannt, die nicht nur die Citrullinierung selbst, sondern auch die Umgebungsstruktur miteinbeziehen. Diese strukturellen citrullinierten

Epitope (SCEs) sollten genauer analysiert werden, auch in Bezug auf die RA. Wir vermuten, dass eine vermehrte Bildung und strukturelle Veränderung solcher Proteinkomplexe zu einer pathogenen Reaktion und Autoimmunerkrankung führen kann, z. B. bei Entzündungsprozessen mit Überexpression von Interleukin (IL) 1- α und/oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), wenn dabei bakterielle oder auch körpereigene Peptidylarginindeiminasen (PADs) Modifikationen erzeugen. Möglicherweise können diese Modifikationen Änderungen der Faltungsstruktur im Rahmen von Entzündungsprozessen bewirken und so SCEs erzeugen. Bei weiteren Immunfluoreszenzanalysen konnte eine Verbindung zu Stressgranula und P-bodies (sogenannte „processing bodies“) als Orte von Aggregaten zytoplasmatischer mRNPs nachgewiesen werden⁵², die entzündliche Prozesse bei der RA fördern können und somit bereits publizierte Daten zu hnRNP-D (AUF1) unterstützen³². Wir vermuten, dass α -hnRNP-Autoantikörper, die gegen mRNA-Zerfallskomplexe gerichtet sind, Teil der Stressgranula sind. Bei der Untersuchung der EIRA-Seren konnte eine Assoziation von α -DL mit besserer Schmerzlinderung (VAS-Pain) auf verschiedene entzündungshemmende Therapien nach 6 Monaten gefunden werden (Additional file 1: Table 4)⁵³. Eine Rolle von hnRNP-DL und dagegen gerichtete Autoantikörper für die Arthritis und begleitende Schmerzreaktionen legen auch Mausmodelle nahe, da ein Fehlen von Toll-like-Rezeptor (TLR)-7/9 in entsprechenden Knockout-Krankheitsmodellen die Bildung von α -hnRNPs verhindert⁶² und TLR- und MyD88-Signaling am Schmerzpfad beteiligt sein können^{36,63}.

Um den Unterschied der Seroreaktionen einer Probe zwischen der citrullinierten und nicht-citrullinierten Epitop-Variante generell zu beschreiben, wurde die Differenz zwischen dem OD-ELISA Messwert α -cit-DL und α -DL bestimmt. Dadurch entstand der neue CN_{DL}-Index, durch den sich beschreiben lässt, ob die Reaktivität gegen die citrullinierte Proteinform überwiegt (positiver Wert) oder vornehmlich durch die native Form hervorgerufen wird (negativer Wert). Die Seroreaktion gegen native hnRNP-DL-Epitope wird durch Citrullinierung vermutlich kaum beeinflusst, denn die meisten der α -DL-positiven Seren binden in gleicher Weise oder mehr an die citrullinierte Proteinvariante. Bei Erhöhung der Reaktivität durch Citrullinierung wird offensichtlich eine Mischung aus α -DL- und α -cit-DL-Antikörpern auf dem citrullinierten Protein nachgewiesen. Es ist also wichtig, beide Proteinformen parallel zu messen. Diese Beziehung der Antikörperantwort gegen native und citrullinierte Formen des gleichen Proteins wurde in den meisten früheren Veröffentlichungen über

citrullinierte Proteine nicht vorgenommen. Kürzlich konnte die Bedeutung dieser Betrachtungsweise, dass Seroreaktionen gegen Modifikationen und Nativformen gleichzeitig untersucht werden müssen, von der Arbeitsgruppe und auch anderen gezeigt werden^{56,64}. Mit fortschreitender RA wurde der CN_{DL}-Index zunehmend positiv und korrelierte mit parenchymatösen Veränderungen in der Lunge und dem Vorhandensein von Shared Epitope (SE)-Allelen und identifizierte Personen mit dem Risiko, eine RA zu entwickeln⁵².

Anti-cit-DL kann vom Vorhandensein begünstigender Faktoren z. B. einer genetischen Veranlagung (SE), abhängen. Weiter könnten Faktoren wie Rauchen^{65,66}, chronische bakterielle Infektionen z. B. durch *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*⁶⁷ oder *Porphyromonas gingivalis*, die hnRNPs citrullinieren können⁵⁶, zu einer Überexpression von hnRNPs führen. Dafür spricht die hier gezeigte Überexpression und Citrullinierung von hnRNP-DL im Synovialgewebe von RA-Patienten⁵². In den hier untersuchten Tiermodellen sind solche begünstigenden Faktoren bisher nicht bekannt oder identifiziert, was erklären könnte, dass in den hier geprüften wichtigen RA- und SLE-Mausmodellen keine Autoantikörper-Reaktivitäten gegen cit-DL nachgewiesen werden konnte⁵². Um diese Vermutung zu bestätigen und die Bedeutung solcher Modifikationen weiter zu untermauern, sollten entsprechende Modellsituationen mit humanen SE-Genen in Mäusen experimentell untersucht werden.

Die höchsten CN_{DL}-Index Werte wurden in den RA-Kohorten festgestellt, wobei die höchsten, ausschließlich positiven Werte, bei der etablierten RA-Kohorte festgestellt wurden (Predict, Sensitivität: 100 %; Cutoff RA vs. gesunde Kontrollen und 72 %; Cutoff RA vs. andere Erkrankungen)⁵². Diese Kohorte beinhaltete Patienten mit einem langen Krankheitsverlauf und verschiedenen früheren Therapien.

Demgegenüber hatten 11-20 % der Patienten der frühen RA-Kohorten (Risk-RA/EIRA/LURA), SLE und auch einzelne Patienten anderer Erkrankungen, einen negativen CN_{DL}-Index. Bei diesen Patienten überwiegt die Reaktivität gegen das native Protein (α -DL) im Vergleich zum citrullinierten Protein (α -cit-DL). Bei der EIRA-Kohorte konnten signifikante, klinische Zusammenhänge gezeigt werden. Bei alleiniger Betrachtung von Patienten mit negativem CN_{DL}-Index zeigten, die erfolgreich mit MTX behandelten EIRA-Patienten die niedrigsten Werte (Additional file 1: Table 7)⁵³, das heißt die größte Dominanz der Reaktivität gegen das native

Protein im Vergleich zum citrullinierten hnRNP-DL. Generell korrelierte der CN_{DL}-Index positiv mit dem α -cit-DL, jedoch weniger signifikant in der seronegativen Gruppe. Weiter korrelierte dieser ausschließlich in der seronegativen Gruppe negativ mit der α -DL-Reaktivität. Auch die sogenannte „receiver operating characteristic“ (ROC)-Analyse zeigte in der seronegativen Gruppe die beste Assoziation der α -DL Seroreaktivität mit dem erfolgreichen Therapieansprechen auf MTX (Additional file 1: Table 6)⁵³.

Des Weiteren korrelierte α -DL weder mit α -CCP2 noch mit RF-IgM, im Gegensatz zu α -cit-DL (Additional file 1: Table 3-5)⁵³. Es wurde bereits veröffentlicht, dass seronegative Patienten oft eine mildere Form der RA aufweisen. Für RA-Patienten mit α -hnRNP-B1-Autoantikörpern konnte neben dem Bezug zur milden Erkrankung³⁵ auch die Assoziation zum besseren Ansprechen auf die Therapie mit MTX und α -TNF- α bereits gezeigt werden⁶⁸.

Dies könnte auch die gute diagnostische Performance für diesen weiteren α -hnRNP-Autoantikörper erklären, speziell in der seronegativen Gruppe der RA-Patienten⁵². Man kann spekulativ behaupten, dass es in Bezug auf RF-IgM/ α -CCP2 zwei verschiedene Krankheiten gibt, die seropositive und die seronegative RA-Gruppe. Im Allgemeinen weist die seropositive RA einen schwereren Krankheitsverlauf auf als die seronegative RA, bei der α -hnRNP-Autoantikörper mit einer milderen Erkrankung assoziiert sind^{35,69}.

Im RA-Mausmodell (SKG, Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist) kann, nach Einkreuzung des humanen SE, die Möglichkeit der Toleranzinduktion unter Verwendung von hnRNP-DL eingehender untersucht werden.

Bei künftigen therapeutischen Ansätzen sollten native RA-Autoantigene wie hnRNP-DL zur Toleranzinduktion, bei Personen mit einem Risiko an RA zu erkranken, genutzt werden. Durch Kombination unseres Biomarker-Sets (α -cit-DL, α -DL, CN_{DL}-Index) können je nach Kohorte RF IgM/ α -CCP2-seronegative RA-Patienten in unterschiedlichem Ausmaß detektiert werden. Innerhalb der Diagnostik können diese Autoantikörper, speziell in der seronegativen Gruppe, zur Vorhersage des Therapieerfolgs und des Schmerzniveaus nach sechsmonatiger Behandlung verwendet werden.

Innerhalb dieser Arbeit wurden α -DL-Autoantikörper bei systemischen Autoimmunerkrankungen analysiert und meist bei RA und SLE und deren

Tiermodellen detektiert. Zudem wurden diese in Stressgranulas, im RA-Synovium nachgewiesen und MYD88, TL7/9 und Zytokin-Abhängigkeit gezeigt. Anti-native DL-Autoantikörper wurden als Marker der frühesten RA-Krankheitsphase detektiert, vor Entwicklung der ACPA-Reaktivität und liefern Hinweise auf Therapieerfolg und geringere Schmerzintensität bei der RA. Durch Citrullinierung von DL entstehen Strukturepitope (SCE-Epitope) die von CCP2-negativen SLE-Patienten erkannt werden. Durch Analyse von Delta-DL wurde der CN_{DL} -Index eingeführt, als ein korrigierter Wert für das citrullinierte Signal, der im Verlauf der RA ansteigt und mit dem Vorhandensein von SE-Allelen, sowie bei parenchymalen Lungenveränderungen ansteigt. Bei RA-Risikopatienten ist α -cit-DL und Δ DL vor Beginn der Erkrankung signifikant spezifisch in der Patientengruppe mit Diagnose und ist somit bereits vor Ausbruch und im Frühstadium der RA detektierbar. Durch Messung von α -(cit)hnRNP-DL werden α -CCP2/RF-IgM seronegativen RA-Patienten detektiert und ein Lückenschluss von 32-100% (Cutoff vs. gesunde Kontrollen) je nach RA-Status erreicht.

4 Schlussfolgerungen

Diese neuen Daten verdeutlichen, dass hnRNP-DL ein neuartiges TLR7/9-abhängiges Autoantigen ist, das vor allem bei RA und SLE sowie bei Mausmodellen entzündlich-rheumatischer Erkrankungen eine Rolle spielt. Die Analysen der Mausmodelle zeigen, dass sich die Autoantikörper durch endogene und exogene Einflussfaktoren verändern und einen Zusammenhang bestimmter exogener Faktoren mit dem Vorhandensein von ACPA/SCE-Antikörpern bestehen könnte. Über TLR7 und -9 Aktivierung, welche eine besondere Bedeutung in der Pathogenese und Therapie der RA haben⁷⁰⁻⁷⁵, erfolgt die B-Zell-Aktivierung und Freisetzung der α -hnRNP-Autoantikörper. Beide sind notwendig für die Autoantikörper-Bildung. Nur wenn beide ausgeschaltet sind verschwindet der α -DL Autoantikörper und zeigen, dass DNA und RNA eine entscheidende Rolle bei der Pathophysiologie der RA zu spielen scheinen. Durch exogene Faktoren werden endogene Nukleinsäuren aus sterbenden Zellen freigesetzt und die Autoimmunreaktion gegen nukleinsäurebindende Proteine wie hnRNP-DL initiiert. Ein prädisponierender genetischer Hintergrund, insbesondere MHC II, ist dabei ein weiterer Trigger, aufgrund der Fähigkeit, endosomale TLRs zu aktivieren. Die aufgezeigte TLR-, MyD88- und Schmerz-VAS-Korrelation von α -DL zeigt eine mögliche Verbindung zu Schmerz-Signalkaskaden auf.

Insgesamt kann die kombinierte Messung nativer und citrullinierter Autoantikörper und die Einführung des neuen CN-Index dazu beitragen, die Sensitivitätslücke zu schließen, um eine optimierte Messung für frühzeitige Behandlungsstrategien aufzuzeigen, die mit den derzeitigen handelsüblichen α -citrullinierte Protein/Peptid Antikörper (ACPA)-Tests nicht messbar sind.

Weitere Studien sollten folgen, einschließlich der Epitop-Kartierung von hnRNP-DL, der genauen Identifizierung der *in vitro* citrullinierten Aminosäuren und der Citrullinierung von hnRNP-DL, die im RA-Synovialgewebe vorzukommen scheint. Zudem sollten weitere Mitglieder der hnRNP-Familie untersucht werden und insbesondere Seren im Rahmen von Therapiestudien und -verläufen, um entsprechend der Reaktivitäten, neue Untergruppen von RA-Patienten zu ermitteln. Außerdem sollte die klinische Bedeutung der SCEs genauer untersucht werden. Weiterhin sollten hnRNP-DL und weitere native Autoantigene in Mausmodellen als Therapieansätze zur Toleranzinduktion bei RA und SLE näher erforscht werden.

Literatur

1. McInnes, I. B.; Schett, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **2011**, *365* (23): 2205-2219.
2. Vollmar, A.; Dingermann, T.; Zünsdorf, I.: *Immunologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart **2005**: 3, 107, 143-144.
3. Merrheim, J.; Villegas, J.; Van Wassenhove, J.; Khansa, R.; Berrih-Aknin, S.; le Panse, R.; Dragin, N. Estrogen, estrogen-like molecules and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* **2020**, *19* (3): 102468.
4. Steiner, G. Auto-antibodies and autoreactive T-cells in rheumatoid arthritis: pathogenetic players and diagnostic tools. *Clin Rev Allergy Immunol* **2007**, *32* (1): 23-36.
5. Silman, A. J.; Pearson, J. E., Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* **2002**, *4 Suppl 3*: S265-72.
6. Fang, Q.; Ou, J.; Nandakumar, K. S. Autoantibodies as Diagnostic Markers and Mediator of Joint Inflammation in Arthritis. *Mediators Inflamm* **2019**: 2019:6363086.
7. Weyand, C. M.; Schmidt, D.; Wagner, U.; Goronzy, J. J. The influence of sex on the phenotype of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **1998**, *41* (5): 817-822.
8. Steiner, G.; Conrad, K.; Hiepe, F. Autoantigene. In: Ganten, D.; Ruckpaul, K.; Gay, S.; Kalden, J. R. (Eds.). *Molekularmedizinische Grundlagen von rheumatischen Erkrankungen*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg **2003**: 123-164.
9. Male D.: *Immunologie auf einen Blick*. Urban & Fischer Verlag der Elsevier GmbH, München **2005**: 69-81,93-94.
10. Neidhart, M.; Kuchen, S.; Gay, R. E.; Gay, S. Immunogenetik der Arthritis. In: Ganten, D.; Ruckpaul, K.; Gay, S.; Kalden, J. R. (Eds.). *Molekularmedizinische Grundlagen von rheumatischen Erkrankungen*, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg **2003**: 19-29.

- 11.** Cajas, J.; Casallas, A.; Medina, Y. F.; Quintana, G.; Rondón, F. Pannus and rheumatoid arthritis: Historic and pathophysiological evolution. *Revista Colombiana de Reumatología (English Edition)* **2019**, *26* (2): 118-128.
- 12.** Arnett, F. C.; Edworthy, S. M.; Bloch, D. A.; McShane, D. J.; Fries, J. F.; Cooper, N. S.; Healey, L. A.; Kaplan, S. R.; Liang, M. H.; Luthra, H. S. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **1988**, *31* (3): 315-324.
- 13.** Aletaha, D.; Neogi, T.; Silman, A. J.; Funovits, J.; Felson, D. T.; Bingham, C. O.; Birnbaum, N. S.; Burmester, G. R.; Bykerk, V. P.; Cohen, M. D.; Combe, B.; Costenbader, K. H.; Dougados, M.; Emery, P.; Ferraccioli, G.; Hazes, J. M.; Hobbs, K.; Huizinga, T. W.; Kavanaugh, A.; Kay, J.; Kvien, T. K.; Laing, T.; Mease, P.; Ménard, H. A.; Moreland, L. W.; Naden, R. L.; Pincus, T.; Smolen, J. S.; Stanislawska-Biernat, E.; Symmons, D.; Tak, P. P.; Upchurch, K. S.; Vencovský, J.; Wolfe, F.; Hawker, G. Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* **2010**, *62* (9): 2569-2581.
- 14.** Schneider, M.; Baseler, G.; Funken, O.; Heberger, S.; Kiltz, U.; Klose, P.; Krüger, K.; Langhorst, J.; Mau, W.; Oltman, R.; Richter, B.; Seitz, S.; Sewerin, P.; Tholen, R.; Weseloh, C.; Witthöft, M.; Specker, C. S3-Leitlinie: Management der frühen rheumatoiden Arthritis. *Z Rheumatol* **2020**, *79* (Suppl 1): S5.
- 15.** Shapiro, S. C. Biomarkers in Rheumatoid Arthritis. *Cureus* **2021**, *13* (5): e15063.
- 16.** Gavrilă, B. I.; Ciofu, C.; Stoica, V. Biomarkers in Rheumatoid Arthritis, what is new? *J Med Life* **2016**, *9* (2): 144-148.
- 17.** Heidari, B. Rheumatoid Arthritis: Early diagnosis and treatment outcomes. *Caspian J Intern Med* **2011**, *2* (1): 161-170.
- 18.** Wu, C. Y.; Yang, H. Y.; Luo, S. F.; Lai, J. H. From Rheumatoid Factor to Anti-Citrullinated Protein Antibodies and Anti-Carbamylated Protein Antibodies

for Diagnosis and Prognosis Prediction in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci* **2021**, 22 (2): 686.

19. Feist, E.; Egerer, K.; Burmester, G. R. Autoantibody profile in rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* **2007**, 66 (3): 212-4, 212-218.

20. Egerer, K.; Feist, E.; Burmester, G. R. The serological diagnosis of rheumatoid arthritis: antibodies to citrullinated antigens. *Dtsch Arztebl Int* **2009**, 106 (10): 159-163.

21. Fritzler, M. J.; Ali, R.; Tan, E. M. Antibodies from patients with mixed connective tissue disease react with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein or ribonucleic acid (hnRNP/RNA) of the nuclear matrix. *J Immunol* **1984**, 132 (3): 1216-1222.

22. Zouali, M.; Eyquem, A. Antibodies to heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in sera from patients with rheumatic autoimmune diseases. *J Clin Immunol* **1984**, 4 (3): 209-219.

23. Dangli, A.; Guialis, A.; Vretou, E.; Sekeris, C. E. Autoantibodies to the core proteins of hnRNPs. *FEBS Lett* **1988**, 231 (1): 118-124.

24. Steiner, G.; Skriner, K.; Smolen, J. S. Autoantibodies to the A/B proteins of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex: novel tools for the diagnosis of rheumatic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* **1996**, 111 (4): 314-319.

25. Dreyfuss, G.; Matunis, M. J.; Piñol-Roma, S.; Burd, C. G. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* **1993**, 62: 289-321.

26. Nakielny, S.; Dreyfuss, G., Nuclear export of proteins and RNAs. *Curr Opin Cell Biol* **1997**, 9 (3): 420-429.

27. Suzuki, M.; Iijima, M.; Nishimura, A.; Tomozoe, Y.; Kamei, D.; Yamada, M. Two separate regions essential for nuclear import of the hnRNP D nucleocytoplasmic shuttling sequence. *FEBS J* **2005**, 272 (15): 3975-87.

28. Akindahunsi, A. A.; Bandiera, A.; Manzini, G. Vertebrate 2xRBD hnRNP proteins: a comparative analysis of genome, mRNA and protein sequences. *Comput Biol Chem* **2005**, 29 (1): 13-23.

- 29.** Kamei, D.; Yamada, M., Interactions of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like protein JKTBP and its domains with high-affinity binding sites. *Gene* **2002**, 298 (1): 49-57.
- 30.** Kawamura, H.; Tomozoe, Y.; Akagi, T.; Kamei, D.; Ochiai, M.; Yamada, M. Identification of the nucleocytoplasmic shuttling sequence of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like protein JKTBP and its interaction with mRNA. *J Biol Chem* **2002**, 277 (4): 2732-2739.
- 31.** Kamei, D.; Tsuchiya, N.; Yamazaki, M.; Meguro, H.; Yamada, M. Two forms of expression and genomic structure of the human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like JKTBP gene (HNRPDL). *Gene* **1999**, 228 (1-2): 13-22.
- 32.** Skriner, K.; Hueber, W.; Süleymanoglu, E.; Höfler, E.; Krenn, V.; Smolen, J.; Steiner, G., AUF1, the regulator of tumor necrosis factor alpha messenger RNA decay, is targeted by autoantibodies of patients with systemic rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* **2008**, 58 (2): 511-20.
- 33.** Hoffmann, M. H.; Skriner, K.; Herman, S.; Baumann, C.; Steiner, C. W.; Ospelt, C.; Meyer, B.; Gleiss, A.; Pfatschbacher, J.; Niederreiter, B.; Tuncel, J.; Zanoni, G.; Steiner, G. Nucleic acid-stimulated antigen-presenting cells trigger T cells to induce disease in a rat transfer model of inflammatory arthritis. *J Autoimmun* **2011**, 36 (3-4): 288-300.
- 34.** Hayer, S.; Tohidast-Akrad, M.; Haralambous, S.; Jahn-Schmid, B.; Skriner, K.; Trembleau, S.; Dumortier, H.; Pinol-Roma, S.; Redlich, K.; Schett, G.; Muller, S.; Kollias, G.; Smolen, J.; Steiner, G. Aberrant expression of the autoantigen heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-A2 (RA33) and spontaneous formation of rheumatoid arthritis-associated anti-RA33 autoantibodies in TNF-alpha transgenic mice. *J Immunol* **2005**, 175 (12): 8327-8336.
- 35.** Konig, M. F.; Giles, J. T.; Nigrovic, P. A.; Andrade, F. Antibodies to native and citrullinated RA33 (hnRNP A2/B1) challenge citrullination as the inciting principle underlying loss of tolerance in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **2016**, 75 (11): 2022-2028.

- 36.** Lacagnina, M. J.; Watkins, L. R.; Grace, P. M. Toll-like receptors and their role in persistent pain. *Pharmacol Ther* **2018**, *184*: 145-158.
- 37.** Needleman, S. B.; Wunsch, C. D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol* **1970**, *48* (3): 443-453.
- 38.** Bandiera, A.; Medic, N.; Akindahunsi, A. A.; Manzini, G. In-vitro dual binding activity of a evolutionarily related subgroup of hnRNP proteins. *Mol Cell Biochem* **2005**, *268* (1-2): 121-127.
- 39.** McInnes, I. B.; Schett, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* **2007**, *7* (6): 429-442.
- 40.** Srirangan, S.; Choy, E. H. The role of interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* **2010**, *2* (5): 247-56.
- 41.** Büssow, K.; Cahill, D.; Nietfeld, W.; Bancroft, D.; Scherzinger, E.; Lehrach, H.; Walter, G. A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library. *Nucleic Acids Res* **1998**, *26* (21): 5007-5008.
- 42.** Consortium, U. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res* **2021**, *49* (D1): D480-D489.
- 43.** Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227* (5259): 680-685.
- 44.** Lian, S.; Fritzler, M. J.; Katz, J.; Hamazaki, T.; Terada, N.; Satoh, M.; Chan, E. K. Small interfering RNA-mediated silencing induces target-dependent assembly of GW/P bodies. *Mol Biol Cell* **2007**, *18* (9): 3375-87.
- 45.** Nonhoff, U.; Ralser, M.; Welzel, F.; Piccini, I.; Balzereit, D.; Yaspo, M. L.; Lehrach, H.; Krobitsch, S. Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules. *Mol Biol Cell* **2007**, *18* (4): 1385-1396.
- 46.** Kaehler, C.; Isensee, J.; Nonhoff, U.; Terrey, M.; Hucho, T.; Lehrach, H.; Krobitsch, S. Ataxin-2-like is a regulator of stress granules and processing bodies. *PLoS One* **2012**, *7* (11): e50134.

- 47.** Welzel, F.; Kaehler, C.; Isau, M.; Hallen, L.; Lehrach, H.; Krobitsch, S. FOX-2 dependent splicing of ataxin-2 transcript is affected by ataxin-1 overexpression. *PLoS One* **2012**, *7* (5): e37985.
- 48.** Kanz, C.; Aldebert, P.; Althorpe, N.; Baker, W.; Baldwin, A.; Bates, K.; Browne, P.; van den Broek, A.; Castro, M.; Cochrane, G.; Duggan, K.; Eberhardt, R.; Faruque, N.; Gamble, J.; Diez, F. G.; Harte, N.; Kulikova, T.; Lin, Q.; Lombard, V.; Lopez, R.; Mancuso, R.; McHale, M.; Nardone, F.; Silventoinen, V.; Sobhany, S.; Stoehr, P.; Tuli, M. A.; Tzouvara, K.; Vaughan, R.; Wu, D.; Zhu, W.; Apweiler, R. The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res* **2005**, *33* (Database issue): D29-33.
- 49.** Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **1990**, *215* (3): 403-410.
- 50.** Madeira, F.; Park, Y. M.; Lee, J.; Buso, N.; Gur, T.; Madhusoodanan, N.; Basutkar, P.; Tivey, A. R. N.; Potter, S. C.; Finn, R. D.; Lopez, R. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res* **2019**, *47* (W1): W636-W641.
- 51.** Rice, P.; Longden, I.; Bleasby, A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* **2000**, *16* (6): 276-277.
- 52.** Marklein, B.; Jennings, M.; Konthur, Z.; Häupl, T.; Welzel, F.; Nonhoff, U.; Krobitsch, S.; Mulder, D. M.; Koenders, M. I.; Joshua, V.; Cope, A. P.; Shlomchik, M. J.; Anders, H. J.; Burmester, G. R.; Hensvold, A.; Catrina, A. I.; Rönnelid, J.; Steiner, G.; Skriner, K. The citrullinated/native index of autoantibodies against hnRNP-DL predicts an individual "window of treatment success" in RA patients. *Arthritis Res Ther* **2021**, *23* (1): 239.
- 53.** Marklein, B.; Jennings, M.; Konthur, Z.; Häupl, T.; Welzel, F.; Nonhoff, U.; Krobitsch, S.; Mulder, D. M.; Koenders, M. I.; Joshua, V.; Cope, A. P.; Shlomchik, M. J.; Anders, H. J.; Burmester, G. R.; Hensvold, A.; Catrina, A. I.; Rönnelid, J.; Steiner, G.; Skriner, K. Additional file 1 and 2; In supplement to: Marklein, B. et al. The citrullinated/native index of autoantibodies against hnRNP-DL predicts an individual "window of treatment success" in RA patients. *Arthritis Res Ther* **2021**, *23* (1): 239.

- 54.** Skriner, K.; Steiner, G.; Sommergruber, W. H.; Sinski, A.; Smolen, J. S. Anti-RA33 autoantibodies may recognize epitopes in the N-terminal region of hnRNP-A2 (RA33). *Clin Exp Rheumatol* **1994**, *12 Suppl 11*: 79-82.
- 55.** Aziz, F.; Smith, M.; Blackburn, J. M. Autoantibody-Based Diagnostic Biomarkers: Technological Approaches to Discovery and Validation. In: Khan, W. A. (Ed.). *Autoantibodies and Cytokines.*, IntechOpen, London UK **2018**: 159-187.
- 56.** Jennings, M.; Marklein, B.; Ytterberg, J.; Zubarev, R. A.; Joshua, V.; van Schaardenburg, D.; van de Stadt, L.; Catrina, A. I.; Nonhoff, U.; Häupl, T.; Konthur, Z.; Burmester, G. R.; Skriner, K. Bacterial citrullinated epitopes generated by *Porphyromonas gingivalis* infection-a missing link for ACPA production. *Ann Rheum Dis* **2020**, *79* (9): 1194-1202.
- 57.** Yadav, S.; Kashaninejad, N.; Masud, M. K.; Yamauchi, Y.; Nguyen, N. T.; Shiddiky, M. J. A. Autoantibodies as diagnostic and prognostic cancer biomarker: Detection techniques and approaches. *Biosens Bioelectron* **2019**, *139*: 111315.
- 58.** Catrina A. Abstract #1758, Development of ultrasound detectable arthritis among ACPA positive subjects with musculoskeletal symptoms: The RISK RA prospective study. Presented at: American College of Rheumatology/ Association of Rheumatology Professionals Annual Meeting; Nov. 9-13, **2019**; Atlanta.
- 59.** Stolt, P.; Bengtsson, C.; Nordmark, B.; Lindblad, S.; Lundberg, I.; Klareskog, L.; Alfredsson, L.; EIRA study group Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases. *Ann Rheum Dis* **2003**, *62* (9): 835-841.
- 60.** Reynisdottir, G.; Karimi, R.; Joshua, V.; Olsen, H.; Hensvold, A. H.; Harju, A.; Engström, M.; Grunewald, J.; Nyren, S.; Eklund, A.; Klareskog, L.; Sköld, C. M.; Catrina, A. I. Structural changes and antibody enrichment in the lungs are early features of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* **2014**, *66* (1): 31-39.

- 61.** Zhao, Z.; Gu, Y.; Cheng, J.; Yu, L. Development of a Simple Multiplex Electrochemiluminescence (ECL) Assay for Screening Pre-Type 1 Diabetes and Multiple Relevant Autoimmune Diseases. In: Khan, W. A. (Ed.). *Autoantibodies and Cytokines.*, IntechOpen, London UK **2018**: 189-202.
- 62.** Nickerson, K. M.; Christensen, S. R.; Shupe, J.; Kashgarian, M.; Kim, D.; Elkon, K.; Shlomchik, M. J. TLR9 regulates TLR7- and MyD88-dependent autoantibody production and disease in a murine model of lupus. *J Immunol* **2010**, *184* (4): 1840-1848.
- 63.** Liu, F.; Wang, Z.; Qiu, Y.; Wei, M.; Li, C.; Xie, Y.; Shen, L.; Huang, Y.; Ma, C. Suppression of MyD88-dependent signaling alleviates neuropathic pain induced by peripheral nerve injury in the rat. *J Neuroinflammation* **2017**, *14* (1): 70.
- 64.** Rönnelid, J.; Hansson, M.; Mathsson-Alm, L.; Cornillet, M.; Reed, E.; Jakobsson, P. J.; Alfredsson, L.; Holmdahl, R.; Skriner, K.; Serre, G.; Lundberg, K.; Klareskog, L. Anticitrullinated protein/peptide antibody multiplexing defines an extended group of ACPA-positive rheumatoid arthritis patients with distinct genetic and environmental determinants. *Ann Rheum Dis* **2018**, *77* (2): 203-211.
- 65.** Yan-Sanders, Y.; Hammons, G. J.; Lyn-Cook, B. D. Increased expression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (hnRNP) in pancreatic tissue from smokers and pancreatic tumor cells. *Cancer Lett* **2002**, *183* (2): 215-220.
- 66.** Zou, T.; Rao, J. N.; Liu, L.; Xiao, L.; Yu, T. X.; Jiang, P.; Gorospe, M.; Wang, J. Y. Polyamines regulate the stability of JunD mRNA by modulating the competitive binding of its 3' untranslated region to HuR and AUF1. *Mol Cell Biol* **2010**, *30* (21): 5021-5032.
- 67.** König, M. F.; Abusleme, L.; Reinholdt, J.; Palmer, R. J.; Teles, R. P.; Sampson, K.; Rosen, A.; Nigrovic, P. A.; Sokolove, J.; Giles, J. T.; Moutsopoulos, N. M.; Andrade, F. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* **2016**, *8* (369): 369ra176.

- 68.** Sieghart, D.; Studenic, P.; Alasti, F.; Aletaha, D.; Smolen, J. S.; Steiner, G. Anti-RA33 (hnRNP-A2/B1) Autoantibodies Are Associated with the Therapeutic Response to Methotrexate and Anti-TNF Treatment in Patients with Rheumatoid Arthritis. Presented at: ACR/ARHP Annual Meeting; Nov. 3-8, **2017**; San Diego, CA.
- 69.** Nell, V. P.; Machold, K. P.; Stamm, T. A.; Eberl, G.; Heinzl, H.; Uffmann, M.; Smolen, J. S.; Steiner, G. Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **2005**, 64 (12): 1731-1736.
- 70.** Kim, W.; Kim, T. H.; Oh, S. J.; Kim, H. J.; Kim, J. H.; Kim, H. A.; Jung, J. Y.; Choi, I. A.; Lee, K. E. Association of TLR 9 gene polymorphisms with remission in patients with rheumatoid arthritis receiving TNF- α inhibitors and development of machine learning models. *Sci Rep* **2021**, 11 (1): 20169.
- 71.** Fischer, A.; Abdollahi-Roodsaz, S.; Böhm, C.; Niederreiter, B.; Meyer, B.; Yau, A. C. Y.; Lönnblom, E.; Joosten, L. A. B.; Koenders, M.; Lehmann, C. H. K.; Dudziak, D.; Krönke, G.; Holmdahl, R.; Steiner, G. The involvement of Toll-like receptor 9 in the pathogenesis of erosive autoimmune arthritis. *J Cell Mol Med* **2018**, 22 (9): 4399-4409.
- 72.** Huang, Q. Q.; Pope, R. M. The role of toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* **2009**, 11 (5): 357-364.
- 73.** Swain, N.; Tripathy, A.; Padhan, P.; Raghav, S. K.; Gupta, B. Toll-like receptor-7 activation in CD8+ T cells modulates inflammatory mediators in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* **2022**, 42 (7): 1235-1245.
- 74.** Ramos-González, E. J.; Bastian, Y.; Castañeda-Delgado, J. E.; Zapata-Zúñiga, M.; Gómez-Moreno, M.; Castillo-Ortiz, J. D.; Ramos-Remus, C.; Enciso-Moreno, J. A. Overexpression of TLR7 and TLR9 Occurs Before Onset Symptoms In First-Degree Relatives of Rheumatoid Arthritis Patients. *Arch Med Res* **2022**, 53 (1): 86-92.
- 75.** Elshabrawy, H. A.; Essani, A. E.; Szekanecz, Z.; Fox, D. A.; Shahrara, S. TLRs, future potential therapeutic targets for RA. *Autoimmun Rev* **2017**, 16 (2): 103-113.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Bianka Marklein, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Autoantikörper gegen natives/citrulliniertes hnRNP-DL definieren das "Fenster des Behandlungserfolgs" und identifizieren Risikopersonen für die Entwicklung einer rheumatoiden Arthritis; Autoantibodies against native/citrullinated hnRNP-DL define the "window of treatment success" and identify people at risk for developing rheumatoid arthritis

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation als Top-Journal

Publikation:

Bianka Marklein, Madeleine Jennings, Zoltán Konthur, Thomas Häupl, Franziska Welzel, Ute Nonhoff, Sylvia Krobitch, Debbie M. Mulder, Marije I. Koenders, Vijay Joshua, Andrew P. Cope, Mark J. Shlomchik, Hans-Joachim Anders, Gerd R. Burmester, A. Hensvold, Anca I. Catrina, Johan Rönnelid, Günter Steiner, Karl Skriner, The citrullinated/native index of autoantibodies against hnRNP-DL predicts an individual “window of treatment success” in RA patients, *Arthritis Research & Therapy*, 14.09.2021

Beitrag im Einzelnen:

Die Zellkulturarbeiten und Immunfluoreszenzfärbung der HeLa-Zellen, sowie Unterstützung bei der Mikroskopie erfolgte von Franziska Welzel. Die erzeugten Daten wurden von mir in Abbildung 4A dargestellt. Die Herstellung und die Immunfärbung der TMA erfolgte durch die Firma Provitro. Diese wurden von mir analysiert und zusammen mit Karl Skriner ausgewertet. Die erzeugten Daten wurden von mir in Abbildung 4B dargestellt. Die Produktion, Prozessierung und Analyse der Protein-Macro-Arrays erfolgte durch die Firma engine GmbH. Die Autoantigen-Liste wurde von mir in den Ergänzungsdaten dargestellt. Alle weiteren Experimente (Methodenteil) habe ich durchgeführt und dokumentiert. Die Spearman-

Korrelationen der EIRA-Kohorte wurden von Johan Rönnelid durchgeführt. Die erzeugten Daten wurden von mir in Tabelle 3 und -4 der Ergänzungsdaten dargestellt. Alle weiteren Daten, Abbildungen und Tabellen und die Ergänzungsdaten, wurden von mir erzeugt, ebenso die statistischen Auswertungen, die für die Publikation verwendet wurden. Bei der Publikationsentstehung haben Karl Skriner, Madeleine Jennings, Thomas Häupl, Günter Steiner und Sarah Ohrndorf mitgewirkt, in Form von Korrekturlesen und Verbesserungsvorschlägen.

Bianka Marklein: Hauptarbeit an Experimenten, Datenerzeugung und -auswertung sowie Abbildungserstellung und Verfassung der Publikation. Madeleine Jennings: Allgemeine Laborarbeit, α -CCP2-Test der SLE-Seren, Hilfe bei der Publikationsentstehung und beim Korrekturlesen. Zoltán Konthur: Vorgesetzter von Ute Nonhoff. Thomas Häupl: Zweitbetreuer der Promotion. Hilfe bei der Publikationsentstehung und beim Korrekturlesen. Franziska Welzel: Zellkultur, Stimulation und Immunfluoreszenzfärbung der HeLa-Zellen und Unterstützung bei der Mikroskopie. Ute Nonhoff: Produktion, Prozessierung und Analyse der Protein-Macro-Arrays. Sylvia Krobtsch: Vorgesetzte von Franziska Welzel. Debbie M. Mulder: Mausseren Balb/c (IL-1Ra^{-/-}) erhalten. Marije I. Koenders: Vorgesetzte von Debbie M. Mulder. Vijay Joshua: LURA-Serenkohorte mit klinischen Daten erhalten. Andrew P. Cope: Mausseren SKG (-/+ Zymosan) erhalten. Mark J. Shlomchik: Mausseren MRL-lpr (MyD88^{-/-})/ (TLR7^{-/-})/ (TLR9^{-/-})/ TLR7/9^{-/-}) erhalten. Hans-Joachim Anders: Mausseren C57BL/6 lpr (SIGIRR/TIR8^{-/-}) erhalten. Gerd R. Burmester: Erstbetreuer der Promotion. Aase Hensvold: Studienleiter für die schwedische Risk-RA Kohorte. Anca I. Catrina: Vorgesetzte von Vijay Joshua und Aase Hensvold und Initiator der schwedischen Risk-RA Kohorte. Johan Rönnelid: EIRA Kohorte mit klinischen Daten und statistischen Korrelationen erhalten. Günter Steiner: humane SLE-Seren und Seren anderer rheumatischer Erkrankungen erhalten und Unterstützung beim Korrekturlesen. Karl Skriner: Vorgesetzter von Bianka Marklein, Ideengeber und Hilfe bei der Publikationsentstehung und beim Korrekturlesen.

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2019** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"RHEUMATOLOGY"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 32 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Nature Reviews Rheumatology	8,803	16.625	0.020790
2	ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES	45,865	16.102	0.072930
3	Arthritis & Rheumatology	12,256	9.586	0.048650
4	RHEUMATOLOGY	20,501	5.606	0.028810
5	Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease	947	5.043	0.001510
6	OSTEOARTHRITIS AND CARTILAGE	17,124	4.793	0.024170
7	SEMINARS IN ARTHRITIS AND RHEUMATISM	6,553	4.751	0.011390
8	ARTHRITIS RESEARCH & THERAPY	17,130	4.103	0.025210
9	ARTHRITIS CARE & RESEARCH	16,426	4.056	0.020450
10	CURRENT OPINION IN RHEUMATOLOGY	4,791	4.006	0.007060

Publikation

Marklein et al. *Arthritis Research & Therapy* (2021) 23:239
<https://doi.org/10.1186/s13075-021-02603-x>

Arthritis Research & Therapy

RESEARCH ARTICLE

Open Access



The citrullinated/native index of autoantibodies against hnRNP-DL predicts an individual “window of treatment success” in RA patients

Bianka Marklein¹, Madeleine Jenning^{1,2}, Zoltán Konthur^{3,4,5}, Thomas Häupl¹, Franziska Welzel³, Ute Nonhoff³, Sylvia Krobtsch³, Debbie M. Mulder⁶, Marije I. Koenders⁶, Vijay Joshua⁷, Andrew P. Cope⁸, Mark J. Shlomchik⁹, Hans-Joachim Anders¹⁰, Gerd R. Burmester¹, Aase Hensvold^{7,11}, Anca I. Catrina⁷, Johan Rönnelid¹², Günter Steiner^{13,14} and Karl Skriner^{1,2*} 

Abstract

Background: There is a need for biomarker to identify patients “at risk” for rheumatoid arthritis (risk-RA) and to better predict the therapeutic response and in this study we tested the hypothesis that novel native and citrullinated heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP)-DL autoantibodies could be possible biomarkers.

Methods: Using protein macroarray and ELISA, epitope recognition against hnRNP-DL was analysed in sera from different developed RA disease and diagnosed SLE patients. Toll-like receptor (TLR) 7/9 and myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88)-dependency were studied in sera from murine disease models. HnRNP-DL expression in cultivated cells and synovial tissue was analysed by indirect immunofluorescence, immunoblot and immunohistochemistry.

* Correspondence: karl.skriner@charite.de

¹Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité — Universitätsmedizin Berlin, Charité Campus Mitte, Rheumatologisches Forschungslabor - AG Skriner, Charitéplatz 1 (intern Virchowweg 11, 5.OG, R011), 10117 Berlin, Germany

²German Rheumatism Research Centre, Leibniz Institute, 10117 Berlin, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Results: HnRNP-DL was highly expressed in stress granules, citrullinated in the rheumatoid joint and targeted by autoantibodies either as native or citrullinated proteins in patient subsets with different developed RA disease. Structural citrullination dependent epitopes (SCEs) of hnRNP-DL were detected in 58% of the SLE patients although 98% of these sera were α -CCP-2-negative. To obtain a specific citrullinated signal value, we subtracted the native antibody value from the citrullinated signal. The citrullinated/native index of autoantibodies against hnRNP-DL (CN_{DL}-Index) was identified as a new value for an “individual window of treatment success” in early RA and for the detection of RF IgM/ α -CCP-2 seronegative RA patients (24–46%). Negative CN_{DL}-index was found in SLE patients, risk-RA and early RA cohorts such as EIRA where the majority of these patients are DAS28-responders to methotrexate (MTX) treatment (87%). High positive CN_{DL}-values were associated with more severe RA, shared epitope and parenchymal changes in the lung. Specifically, native α -hnRNP-DL is TLR7/9-dependent, associated with pain and ROC analysis revealed an association to initial MTX or etanercept treatment response, especially in seronegative RA patients.

Conclusion: CN_{DL}-index defines people at risk to develop RA and the “window of treatment success” thereby closing the sensitivity gap in RA.

Keywords: Rheumatoid arthritis, ACPA, Anti-CCP, Rheumatoid factor, Shared epitope, Systemic lupus erythematosus, Autoantigens, Treatment

Background

More than 20 years ago heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) complexes were first described as autoimmune targets [1, 2]. These complexes associate with DNA and RNA and can stimulate Toll-like receptor (TLR) 7 and 9 [3–7]. Antibodies against these structures are characteristic for autoimmune disorders, such as systemic lupus erythematosus (SLE), progressive systemic sclerosis (scleroderma), primary Sjögren’s syndrome, HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP), multiple sclerosis (MS) and rheumatoid arthritis (RA) as well as for mouse models of lupus and arthritis [8–10].

In RA, the most specific anti-nuclear reactivity is directed against hnRNPs. Most prominent targets are hnRNP-A1 and hnRNP-A2/B1 proteins, which with hnRNP-A3 and hnRNP-A0 proteins form the subgroup of hnRNP-A/B proteins [11–15]. Autoantibodies against hnRNP-A2/B1 (RA33) occur in about 20–40% of RA, SLE and mixed connective tissue disease (MCTD) patients [16]. Autoantibodies to hnRNP-A1 can be found in RA, SLE and MCTD, but probably are cross-reacting α -hnRNP-A2/B1 antibodies [17]. Also, hnRNP-A2/B1 is citrullinated in the rheumatoid joint, and it can be targeted either as a citrullinated and/or native protein in distinct subsets of RA patients [18].

Previously, we have described autoantibodies directed to the TNF α regulatory protein hnRNP-D (AUF1) to occur in 33% of SLE, 20% of RA and 17% of MCTD patients [19]. Although predominantly localized in the nucleus, hnRNPs are exported additionally into the cytosol, where they form new autoimmune target structures in stress granules, P-bodies or RNA transport particles [19–21].

The hnRNP-D-like protein (hnRNP-DL) protein, which is also known as JKTBP, is related to the autoantigen hnRNP-D/AUF1. Due to its binding properties and structural features [22], hnRNP-DL,-D and -AB- form the D-subgroup of hnRNPs. These proteins exhibit a modular structure and conserved residues, two adjacent RNA binding domains (RBD) followed by a glycine-rich C-terminal auxiliary domain. However, they are very distinct in each of the unique N-terminal regions [23, 24].

HnRNP-DL acts as a transcription factor [25], participates in metabolism and biogenesis of mRNA [3], is able to shuttle between the nucleus and the cytoplasm and binds both to nuclear and cytoplasmic mRNAs [24], especially when containing AU-rich elements (AREs) as found within the 3’-UTR of many proto-oncogenes and cytokine mRNAs [26, 27]. Up to now, three alternatively spliced hnRNP-DL transcript variants have been described, hnRNP-DL isoform 1–3, whereas proteins only were described for isoform 1 and 2 [23]. Splenocytes from pristane-primed rats restimulated with hnRNPs (-A1,-A2/B1 and -A3) induce a highly inflammatory and erosive arthritis in naïve recipient rats [6]. Furthermore, human TNF α -transgenic mice, which develop a massive erosive inflammatory polyarthritis, generate α -hnRNP autoantibodies [28]. This supports the hypothesis of a pathogenic role of native hnRNPs in erosive arthritis and suggests that autoimmunity to nucleic acid-associated autoantigens has the potential to contribute to RA development [18]. HnRNPs may also induce pro-inflammatory cytokines, relevant for arthritis development in rats, which involve TLR7 and TLR9 but not TLR4 [6].

For α -hnRNP-A2/B1, clinical associations have already been shown for RA severity, with antibodies against the citrullinated protein occurring more frequently in

erosive RA and antibodies against the native protein in milder disease [18, 29]. For citrullinated peptides, it has already been shown that the formation of a delta value with the corresponding arginine peptide increased diagnostic sensitivity and indicated association to shared epitope (SE) [30].

In our study, the delta value of ELISA signals was evaluated as a possible biomarker to obtain a new clinical value, as the difference between the α -citrullinated and α -native protein value. hnRNPs were further investigated in the immunopathogenesis of RA, demonstrating the clinical relevance of autoantibodies, for predicting therapeutic success, early parenchymal changes in the lung, and SE in RA. For the first time, structural epitopes resulting from the citrullination process were investigated.

Material and methods

Patient sera

A total of 1010 sera were evaluated, including patients with early RA (EIRA cohort $n = 404$), early RA with lung association (LURA cohort $n = 106$), established rheumatoid arthritis (predict cohort $n = 127$), systemic lupus erythematosus ($n = 89$), multiple sclerosis ($n = 20$), reactive arthritis ($n = 7$), scleroderma ($n = 20$), Sjögren's syndrome ($n = 20$), psoriasis arthritis ($n = 20$), ankylosing spondylitis ($n = 20$), osteoarthritis ($n = 20$), people at risk for developing RA (Risk-RA cohort from Sweden $n = 62$; Risk-RA from Erlangen $n = 9$) and healthy control subjects ($n = 86$). The sera were derived from the serum bank of the 2nd Department of Medicine-Centre of Rheumatic Diseases, Hiezing Hospital (Vienna, Austria), and of the Department of Rheumatology at the Charité Universitätsmedizin (Berlin, Germany). Early RA sera from the Swedish EIRA [31] and LURA [32] cohort and Risk-RA patients were provided by the early arthritis clinic of Karolinska University Hospital in Stockholm, Sweden. Further, we obtained sera from Risk-RA also from the Institute of Rheumatology and Immunology of the University of Erlangen, Germany.

All patients with RA fulfilled the 1987 revised criteria of the American College of Rheumatology [33]. All patients with SLE met the 1982 criteria of the ACR [34], and all patients with MCTD met the criteria described by Alarcon-Segovia and Villarreal [35].

Mice sera

A total of 153 mice sera were evaluated. SKG Zymosan model ($n = 16$; King's College, London, England), MRL/lpr ($n = 20$), MRL lpr MyD88^{-/-} ($n = 20$), MRL/lpr TLR7^{-/-} ($n = 7$), MRL/lpr TLR9^{-/-} ($n = 4$), MRL/lpr TLR7/9^{-/-} ($n = 7$), all 5 from Yale University School of Medicine, New Haven), C57BL/6 lpr ($n = 12$), C57BL/6 lpr SIGIRR/TIR8^{-/-} ($n = 12$, both from Medical Policlinics, University Munich), C57BL/6 ($n = 10$), C57BL/6

+R848 ($n = 10$, both from University Hospital of Zurich, Zurich, Switzerland), and Balb/c IL-1Ra^{-/-} ($n = 35$, Radboud University Medical Center 272, Experimental Rheumatology Nijmegen, The Netherlands).

Cell lines

HEp-2 cell slides were supplied by Generic Assays (ANA HEp-2 plus Kit; Generic Assays, Dahlewitz, Germany), IL1 α -, TNF α - and non-stimulated HeLa whole cell extracts and IL6- and non-stimulated HepG2 whole cell extract were obtained by Active Motif (Carlsbad, USA). Ten microgrammes cell extract per lane were separated on a SDS-gel and transferred to a nitrocellulose membrane.

Protein macroarray

Screening for novel autoantigens in RA was performed on hEX1 protein macroarrays derived from cDNA of human foetal brain [36] (available from engine GmbH, Hennigsdorf, Germany). Screening was carried out as described by the manufacturer. Briefly, protein macroarrays were incubated with blocking buffer (3% (w/v) milk powder in TBST (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.05% Tween 20)) for 1 h at room temperature followed by overnight incubation at 4 °C with patient serum (1:50 dilution in blocking buffer). Subsequently, arrays were washed three times for 20 min each, in TBST-T (TBS with 0.05% Triton X-100) and incubated 2 h at room temperature with an alkaline phosphatase (AP)-conjugated goat α -human IgG antibody (A9544, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in blocking buffer for 2 h. Following three washes for 20 min in TBST-T, the arrays were incubated for 10 min in AP-buffer (1 mM MgCl₂, 100 mM Tris-Cl, pH 9.5) and finally 5 min in 0.125 mM Attophos (Roche, Basel, Switzerland) in AP-buffer. Arrays were illuminated with an excitation wavelength of 460 nm and images were taken using a CCD camera (Fuji LAS 1000, Tokyo, Japan). Image analysis was performed with AIDA software (Raytest, Berlin, Germany). The manufacturer has defined the cutoff values according to Aida program. Each filter has an individual cutoff level defined by signals of individual dots without expression vector and dots without bacteria.

Positive positions on the arrays were scored and correlated with clone data provided by the manufacturer.

Cloning, expression and purification of recombinant fusion proteins

Recombinant hnRNP-DL (UniProt NP_112740.1) was expressed in two bacterial clones with different variants of hnRNP-DL (amino acid 81-420 or 120-420). The hnRNP-D (AUF1) isoform p45, cloned in pTrcHis vector (Life Technologies; Carlsbad, USA), was a kind gift by Gary Brewer (School of Medicine, Wake Forest

University, USA). The AUF1 p45 plasmid includes the longest transcript variant of AUF1 (UniProt NP_112738.1) and consists of 322 amino acids (45 kDa). For expression, the AUF1p45 plasmid was transformed into expression strain BL21 (DE3) pLysS cells (Merck Millipore; Darmstadt, Germany, USA) according to the manufacturer's protocol.

The cDNA clone of hnRNP-DL was obtained from (IRAU969E0262D, Source BioScience, Nottingham, UK). The polymerase chain reaction was performed, using the oligonucleotides primer 1: GACGACGACAAGATGGAGGTCCC GCCCAG and primer 2: GAGGAGAAGCCCGGTTAGTATGGCTGGTAATTG as primers (Biolegio, Nijmegen, Netherlands). The hnRNP-DL sequence was cloned using pET-30 Ek/LIC vector kit (Merck Millipore, Billerica, USA). Insert sequences were checked by sequencing (LGC Genomics, Berlin, Germany).

For protein expression, 1 L LB medium (containing antibiotics corresponding to the carrying expression vector) was inoculated with 5 mL overnight culture of the expression strain (*E. coli* LysS or -SCS1) and incubated at 37 °C with shaking until optical density of the solution was within the range of OD₆₀₀ 0.4–0.6. Fusion protein expression was induced by adding IPTG to a final concentration of 1 mM. After 4 h, the bacterial cells were pelleted at 20.000×g for 10 min and stored at – 20 °C.

All proteins were expressed as His-tag fusions proteins and purified by HisPur Cobalt Resin (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) in a batch process corresponding to the manufacturer's protocol under denaturing conditions (hnRNP-DL/ AUF1).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA plates (Nunc 96-well Nunc Maxisorp; Nalgene Nunc International, Rochester, NY, 1 µg protein/ well) were coated with recombinant proteins in PBS by passive adsorption at 4 °C, overnight. For sample background control plates were incubated with coating buffer only.

After washing three times with washing buffer (0.1% Tween20 in PBS, pH 7.4, 300 µL/well) and blocking with blocking buffer (5% non-fat dried milk in PBS, pH 7.4, 200 µL/well) for 90 min while shaking, the plates were then incubated with sera (1:200 dilution in 1.5% BSA in PBS, pH 7.4, 100 µL/well) for 60 min, shaking. On each plate a secondary antibody control (only serum dilution buffer) was present. Plates were washed four times with washing buffer and incubated shaking with secondary antibody (P021402-02, Dako Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, USA, diluted 1:5000 in 5% non-fat dried milk in PBS, pH 7.4, 100 µL/well) for 45 min. Afterwards, the plates were washed five times with washing buffer. Then, they

were incubated with 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB, Seramun, Heidesee, Germany) for 5 min (100 µL/well) and stopped with 0.5 M H₂SO₄ (100 µL/well). The resulting colour reaction (from blue to yellow) was quantified with a SpectraFluor reader (Tecan; Maennedorf, Switzerland) at 450 nm and 620 nm as reference.

Each sample was quantified as mean of triplicate measurements. The difference between antigen mean value and sample background mean value, each corrected using mean value of the secondary antibody control, resulted in the net values which were used for evaluation according to the antigen-specific cutoff. The cutoff values (dotted lines) were determined by ROC analysis (GraphPad Software, version 8.0.0, San Diego, California USA, www.graphpad.com) versus other diseases (except SLE) or healthy controls with 98% specificity each. This threshold served for qualitative (positive/ negative) assessment of patient sera. These calculations were used for all ELISA analyses in human and mice.

The "Ratio mean OD positive" (Table 2) reflects the level of the positive signals in each mouse model and was calculated as the quotient of the mean value of the positive signals and the diagnostic cutoff.

To determine serum-reactivity against the citrullinated forms of the antigens by ELISA, the coated antigens were citrullinated in vitro by incubating for 3 h at 55 °C with 60 mU per well rabbit PAD (Sigma; St. Louis, USA) in 100 mM Tris, 5 mM DTT, and 10 mM CaCl₂, while the control wells were incubated only with citrullination buffer. Afterwards, ELISA-experiments were carried out as described above

For detection of rheumatoid factor and reactivity against cyclic citrullinated peptides (α-CCP-2) commercial ELISA kits (Euroimmun, Lübeck, Germany) were applied according to the manufacturer's protocol.

To ensure reproducibility between assays, all tests were performed with the same lot of antigen, enzyme, and TMB substrate. A cit-DL/DL-positive control serum was diluted analogously to the samples and carried with each assay. Furthermore, a secondary antibody control was included with each test, where the serum dilution buffer was incubated to allow detection of the non-specific secondary antibody background signal. The positive control and the secondary antibody control had to be within the valid range (± 10%) to assure that the measurement is correct.

Statistical analysis

For statistical analysis Mann-Whitney test, Spearman correlation test or ROC calculation were performed (GraphPad Software, version 8.0.0, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com).

Immunoaffinity purification of antibodies

Autoantibodies to hnRNP-DL (amino acid 81-420) and hnRNP-D isoform p45 were affinity-purified from 10 RA patients by ELISA-elution technique. Antigen preparation was performed as described in the section "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)". The blocked plates were incubated overnight at 4 °C with sera diluted 1:25 in PBS with 1.5% BSA, pH 7.4. Elution of antigen-bound antibodies was performed by incubation and shaking in 0.2 M Glycin-HCl pH 2.4 for 10 min. The eluate was neutralized with 1:7 elution volume 1 M Tris, pH 8.8, and immediately dialyzed against PBS, pH 7.4.

Indirect immunofluorescence microscopy

Commercial HEp-2 cell slides (ANA HEp-2 plus; Generic Assays, Dahlewitz, Germany) were used for immunofluorescence analysis. Slides were incubated with affinity-purified α -AUF1 p45 and α -hnRNP-DL antibodies (undiluted in PBS) or rabbit α -RCK/p54 [37] antibodies (1:500; University of Florida, Gainesville, Florida, USA) overnight at 4 °C in a moist chamber. After washing, slides were incubated with α -human IgG-FITC antibody (ANA HEp-2 plus; Generic Assays, Dahlewitz, Germany) or polyclonal goat α -rabbit IgG (H+L)-Cy3 (1:50, 111-165-144, Dianova; Hamburg, Germany) antibodies.

HeLa cells were plated and exposed 1 h to 0.5 M sodium arsenite [38] and afterwards incubated with the respective primary antibodies (affinity-purified α -hnRNP-DL antibody, undiluted in PBS; rabbit α -human AUF1 peptide antibody [19], 1:1000; mouse α -ATXN2 antibody [39], 1:200; mouse α -hnRNP-A2/B1, 1:500; Acris Antibodies, San Diego, USA). For immunofluorescence analysis, corresponding FITC- and Cy3-coupled, secondary antibodies were used as previously described [40].

Preparations were analysed at 400-fold magnification with a LSM510 fluorescence microscope (Carl Zeiss; Jena, Germany) fitted with the appropriate filter sets for FITC and Cy3.

Immunohistochemical analysis

We analysed an α -hnRNP-DL antibody (ARP4085_T100; Aviva Systems Biology; San Diego, USA) in 1:50 dilution on a tissue microarray (TMA, Provitro, Berlin, Germany) with paraffin sections of human synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis ($n = 10$), osteoarthritis ($n = 12$) and from healthy donors ($n = 4$). Immunostaining of the antibody was performed according to the manufacturer's protocol. For visualization, the Novolink™ Polymer Detection System (RE-7140-CE; Leica Biosystems, Nussloch, Germany) was used. Slides were analysed with a CX41 microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

Preparation of synovial tissue

Synovial tissue was collected from a patient with rheumatoid arthritis (joint biopsies, Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité, Berlin). Lysis of synovial tissue was performed in M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent. (78501; Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) with protease inhibitor cocktail (P8340; Sigma, St. Luis, USA), 100 μ M Na₃VO₄, 150 mM NaCl, and 1 mM DTT, followed by mechanical homogenization with an Ultra Turrax (T25; IKA, Staufen, Germany) three times for 1 min. After centrifugation (1 min, 17,000 \times g) the supernatant was collected. To enhance solubility of proteins, the pellet was homogenized three times for 1 min with ultrasound (VibraCell; Sonics and Materials, Danbury, USA) in 8 M urea. Ten microgrammes of each, the supernatant and the pellet homogenate, were separated together in one lane on a SDS-gel and transferred on a nitrocellulose membrane.

Gel electrophoresis, immunoblotting and immune detection

Total protein was measured using the Bradford assay (Roth, Karlsruhe, Germany). Equal amounts of protein in sample buffer [41] were separated on 12.5% SDS minigels with 4% stacking gel in SDS running buffer (25 mM Tris, 0.2 M Glycine, 0.1% (w/v) SDS) for 40–50 min at 25 mA in a gel apparatus (Mighty Small II, Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden). Afterwards, proteins were transferred to nitrocellulose membranes (BA85; Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) using a tank blot system (TE22; Hoefer, Holliston, USA) with tankblot buffer (15 mM Tris, 0.1 mM glycine) for 1 h and 400 mA with stirring and water cooling. After protein transfer, the Western blot was blocked for 1 h in blocking solution (3% w/v non-fat dried milk in PBS, pH 7.4) and incubated with an α -hnRNP-DL antibody (ARP40586_P050; 1:500; Aviva Systems Biology, San Diego, USA), hnRNP-DL-specific rabbit antibody serum (peptide motif MEDMNEYSNIEEFAEGSK, contained in all hnRNP-DL isoforms, 1:100, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) or an α -deiminated arginine antibody (ABAP Kit; 1:500; Modiquest, Oss, Netherlands) diluted in blocking solution overnight at 4 °C. After washing three times for 10 min with washing buffer (PBS, pH 7.4, 0.05% Triton X-100) the blot was incubated for 1 h with secondary antibody (rabbit or mouse horse radish peroxidase conjugate, Dako Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, USA) 1:1000 diluted in 3% w/v non-fat dried milk in washing buffer. After washing five times for 5 min with washing buffer, chemiluminescence detection was performed with Roti Lumin substrate (Roth, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturer's instructions.

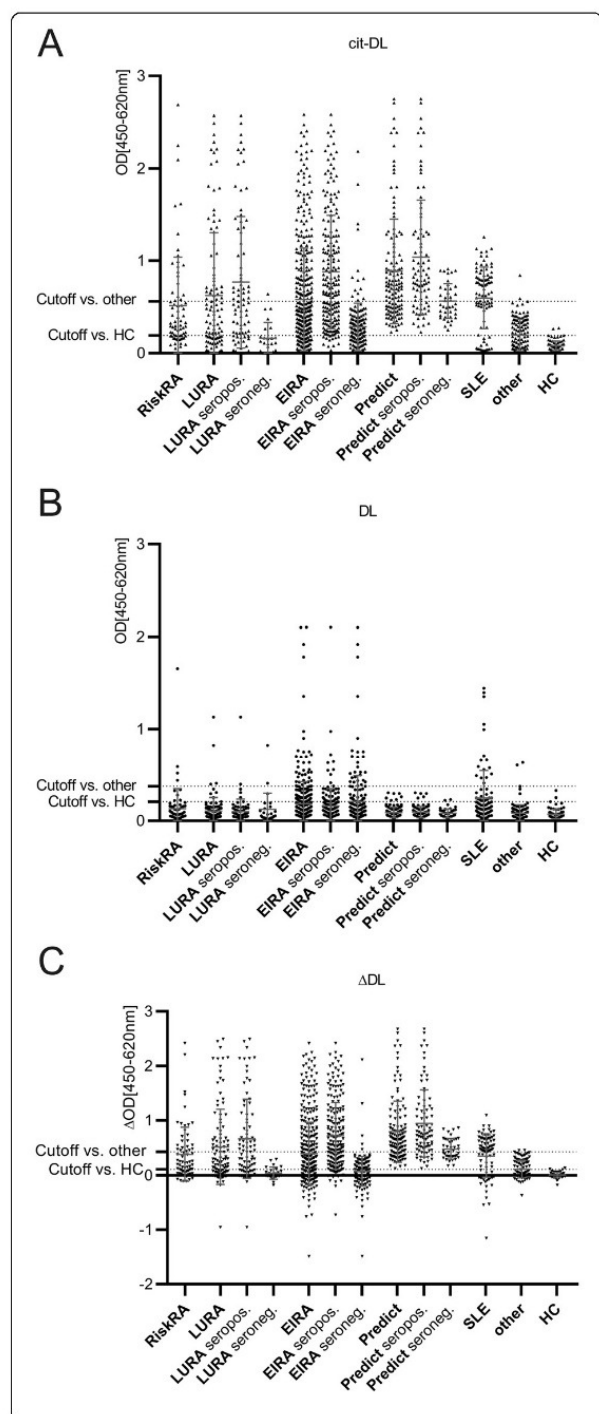


Fig. 1 Distribution of ELISA signals of α -hnRNP-DL_{mir} autoantibodies. Reactivities were predominantly found in SLE and RA. Prevalence of citrullinated α -hnRNP-DL_{mir} (cit-DL) (**A**), α -hnRNP-DL_{mir} (DL) (**B**) and the difference between cit-DL and DL signal (Δ DL) (**C**) in sera from Risk-RA patients ($n = 71$), early RA patients (LURA $n = 106$; EIRA $n = 404$), established RA patients (predict $n = 127$), SLE patients ($n = 89$), other diseases ($n = 127$) and healthy controls ($n = 86$) determined by ELISA. The dotted lines mark the cutoff versus other diseases (except SLE) or healthy controls with 98% specificity each. OD, optical density; SLE, systemic lupus erythematosus

Global sequence alignment

With the help of the program “Needle”, version 2019 [42], which can be accessed online via the EMBOS website [43] (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/; retrieved on 04 April 2020), we performed a global sequence alignment by Needleman-Wunsch algorithm [44]. The amino acid sequences of the two hnRNP proteins hnRNP-D (isoform A, 355 AA) and hnRNP-DL (isoform 1, 420 AA) were analysed for homologous sequence regions.

Results

Protein macroarray screening identifies the hnRNP-DL protein as a novel autoantigen targeted in rheumatoid arthritis (RA)

Sera from 26 RA patients and 40 control subjects, including osteoarthritis (OA) patients ($n = 20$) and self-reported healthy blood donors ($n = 20$), were analysed on protein macroarrays [36]. The 20 most sensitive autoantigens only found in the RA group are listed in the Additional file 2.

We identified α -hnRNP-DL with second highest intensity score. HnRNP-A2/B1 and hnRNP-D (AUF1) have already been described as autoantibody targets in RA [11, 19]. Structure of hnRNP-DL and sequence alignment with hnRNP-D is shown in Additional file 1: supplementary Figure 1. One of two different hnRNP-DL clones, expressing the protein fragment from amino acid 81 to 420, revealed autoantibody reactivity in 20% of RA sera (Additional file 2). This hnRNP-DL fragment was termed hnRNP-DL_{mir} (major immunogenic region). Isoform hnRNP-DL2 (amino acid 120-420) could not be detected by RA sera.

Autoantibodies against native and citrullinated hnRNP-DL are predominantly present in sera of systemic lupus erythematosus (SLE) and RA patients

To verify the results from protein macroarray screening, hnRNP-DL_{mir} was expressed in *E. coli* BL21(DE3)pLysS, purified and tested for reactivity in ELISA as native (DL) and citrullinated protein version (cit-DL), using 1010 sera obtained from Risk-RA cohort ($n = 71$), from early RA cohorts (LURA $n = 106$; EIRA $n = 404$), from an established RA cohort (predict $n = 127$), control cohorts

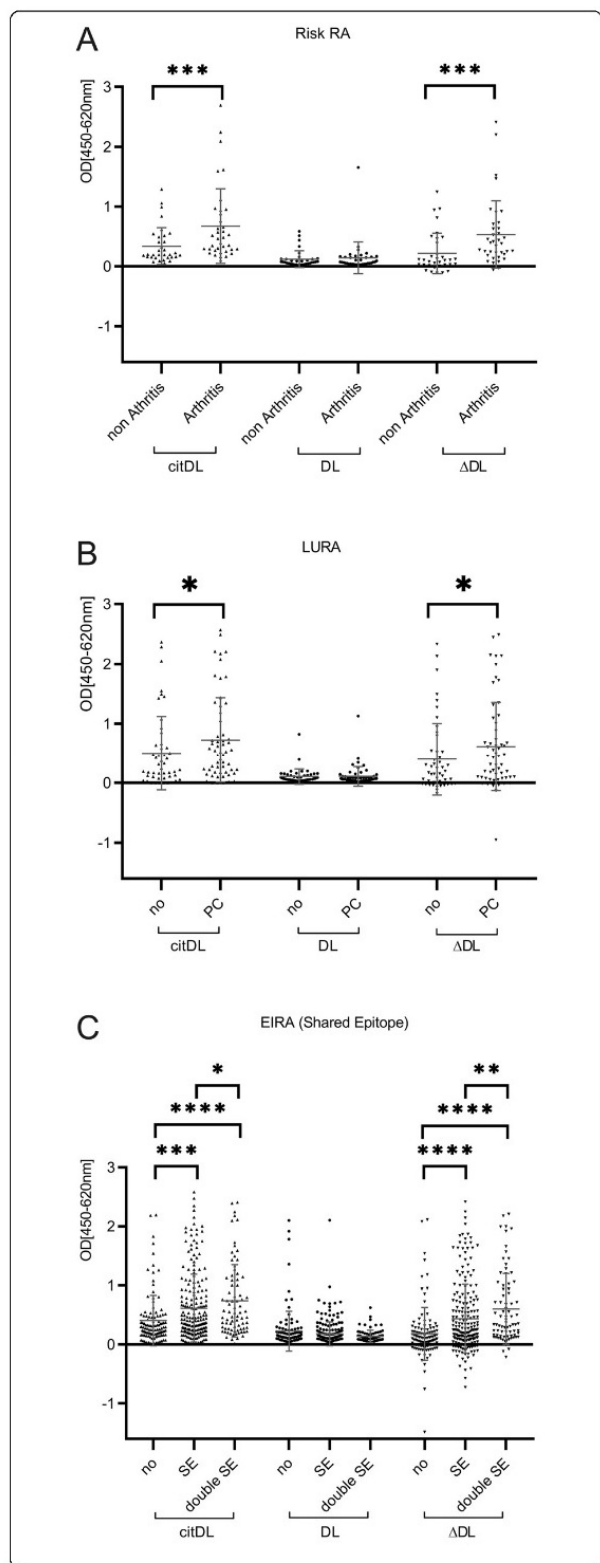


Fig. 2 Anti-citrullinated hnRNP-DL_{mir} autoantibodies are detectable even before the onset and in early status of disease. **A–C** Anti-citrullinated hnRNP-DL_{mir} (cit-DL), α-hnRNP-DL_{mir} (DL) and Δ OD between cit-DL and DL (ΔDL) were measured by ELISA. **A** In Risk-patients of arthritis the OD levels of cit-DL and ΔDL before onset are significantly specific in the patient group where the arthritis has already been diagnosed compared to the group without diagnosis ($n = 71$; non-arthritis $n = 34$ /arthritis $n = 37$; Mann-Whitney U ; cit-DL median_{non-Arthritis} = 0.19/median_{Arthritis} = 0.46; $p = 0.0006$; NC-index median_{non-Arthritis} = 0.10/median_{Arthritis} = 0.38; $p = 0.0003$). **B, C** Cit-DL and ΔDL are significantly associated with parenchymal changes in the lung of early RA patients of the LURA cohort (**B**; $n = 106$; no $n = 48$ /PC $n = 58$; Mann-Whitney U ; cit-DL median_{no} = 0.23/median_{PC} = 0.53; $p = 0.0340$; NC-index median_{no} = 0.16/median_{PC} = 0.44; $p = 0.0332$) and with and shared epitopes of the early RA patients of the EIRA cohort (**C**; $n = 404$; no $n = 112$ /SE $n = 213$ /double SE $n = 79$; Mann-Whitney U ; cit-DL median_{no} = 0.27/median_{SE} = 0.36; $p = 0.0003$, median_{no} = 0.27/median_{double SE} = 0.54; $p < 0.0001$, median_{SE} = 0.36/median_{double SE} = 0.54; $p = 0.0453$; NC-index median_{no} = 0.11/median_{SE} = 0.21; $p < 0.0001$, median_{no} = 0.11/median_{double SE} = 0.34; $p < 0.0001$, median_{SE} = 0.21/median_{double SE} = 0.34; $p = 0.0061$). Mann-Whitney U test was performed for analysing significance of indicated groups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). OD, optical density; ns, not significant; PC, parenchymal changes in lung; SE, shared epitope

of other autoimmune diseases ($n = 216$) and from healthy controls ($n = 86$). Since citrullinated antigens, among them hnRNP-A2/B1 [18], are the most specific targets in RA, we analysed autoantibody responses against cit-DL, with the highest signalling and positivity found in the early and established RA cohorts (64–100%). With special focus on the seropositive and seronegative RA patients only α-cit-DL signals differ significantly within all investigated RA cohorts, not α-DL values (Fig. 1A/B; Additional file 1: supplementary Table 1). Although α-cit-DL signals of seronegative patients were lower than those of seropositive patients, they were still significantly higher than in other diseases in EIRA and predict cohort (Additional file 1: supplementary Table 2).

The majority of α-DL was found in sera of patients with SLE (34%) and RA (6–21%) and in patients with psoriasis arthritis (15%), patients with MS (5%) and scleroderma (5%) as well as healthy controls (2%) (Fig. 1B; Additional file 1: supplementary Figure 2). Interestingly, we obtained very different sensitivities within the four investigated RA cohorts whereby Risk-RA- (13%) and EIRA cohort (21%) showed the highest sensitivities. Cohorts under certain therapy or advanced disease duration showed lower values (LURA 8%/predict 6%).

Noticeable 58% of the SLE patients, using the cutoff level versus other diseases, were α-cit-DL positive (α-DL 18%), although 98% of the tested SLE sera were α-CCP-2-negative. We determined the difference between the ELISA signals, to get a value that describes the relationship between α-cit-DL and α-DL. This value we named

CN_{DL}-Index (Δ DL), shown in Fig. 1C, with the highest values detected in the RA cohorts. In established RA (predict), the highest CN_{DL}-Index (sensitivity, 100%/72% versus healthy controls/other diseases) and exclusively positive values were detected. In contrast, 11–20% of early RA patients (Risk-RA/EIRA/ LURA) had a negative CN_{DL}-index, where α -DL was higher than α -cit-DL. Besides, only SLE patients and single exceptions in other diseases had a negative CN_{DL}-index below -0.1 . In the early RA cohort EIRA, the CN_{DL}-Index correlated positively to α -cit-DL and there, exclusively in the seronegative EIRA negatively to α -DL response (Additional file 1: supplementary Figure 3).

Anti-cit-DL and CN_{DL}-Index correlated with parenchymal changes in lung/shared epitope and identified people at risk to develop RA

Anti-DL autoantibodies were detectable in early RA. Therefore, we investigated α -CCP2-positive healthy subjects with musculoskeletal symptoms, classified as Risk-RA cohort, differentiating between subjects developing arthritis during follow-up and those remaining healthy without arthritis diagnosis. Further, we analysed α -DL autoantibody association with certain risk factors for RA. We plotted respectively α -cit-DL, α -DL and the CN_{DL}-index in the LURA cohort with the parenchymal changes in the lung and in the EIRA cohort with the genetic risk factor shared epitope.

In the Risk-RA cohort, α -cit-DL and CN_{DL}-Index were significantly elevated in progressors (Fig. 2A), in the LURA cohort in patients with parenchymal lung changes (Fig. 2B) and in the EIRA in patients with shared epitope, particularly in those carrying two copies (Fig. 2C). No significant differences were found for α -DL antibodies.

High α -DL autoantibody levels found in 6-month EULAR responders for methotrexate (MTX) or Enbrel® treatment

We examined our biomarkers (α -cit-DL, α -DL and CN_{DL}-index) with therapy data of the EIRA and predict cohort. One hundred and ninety-two MTX-treated EIRA patients were analysed (Fig. 3A–C; Additional file 1: supplementary Figure 4A/B). The ROC analysis of α -DL signals reached 12% sensitivity with 90% specificity, using the RA-specific cutoff level (OD 0.371) for detecting MTX response. ROC results got more significance for detecting MTX responses in the seronegative group (cutoff 0.371; 16% sensitivity, 94% specificity; Additional file 1: supplementary Table 6).

Because α -DL correlated negatively to the CN_{DL}-Index in the seronegative group (Additional file 1: supplementary Figure 3), we analysed MTX-treated EIRA patients with negative CN_{DL}-index. Eighty-seven percent of these patients were responders. We reached sensitivities in a

range of 15–33% (100/75% specificity) to detect MTX response (Additional file 1: supplementary Table 7).

In the predict cohort (Enbrel®-treatment) no CN_{DL}-index/response association were found since all patients had equally high positive CN_{DL}-index and none of them negative values. ROC analysis of α -cit-DL or CN_{DL}-index showed no specific response cutoff. But with α -DL, we identified 23% of the EIRA patients as MTX responder and in the seronegative group 25% (90% specificity). Among the established RA cohort (predict), α -DL reached 13% sensitivity and even 25% within the seronegative group for the detection of Enbrel® response (100% specificity; Fig. 3D–F; Additional file 1: supplementary Table 8).

Anti-cit-DL and α -DL increase the serodiagnostic sensitivity in early RA

All RA cohorts were analysed to determine diagnostic sensitivities of α -cit-DL and α -DL, in RF IgM/ α -CCP-2-seropositive and -negative patients.

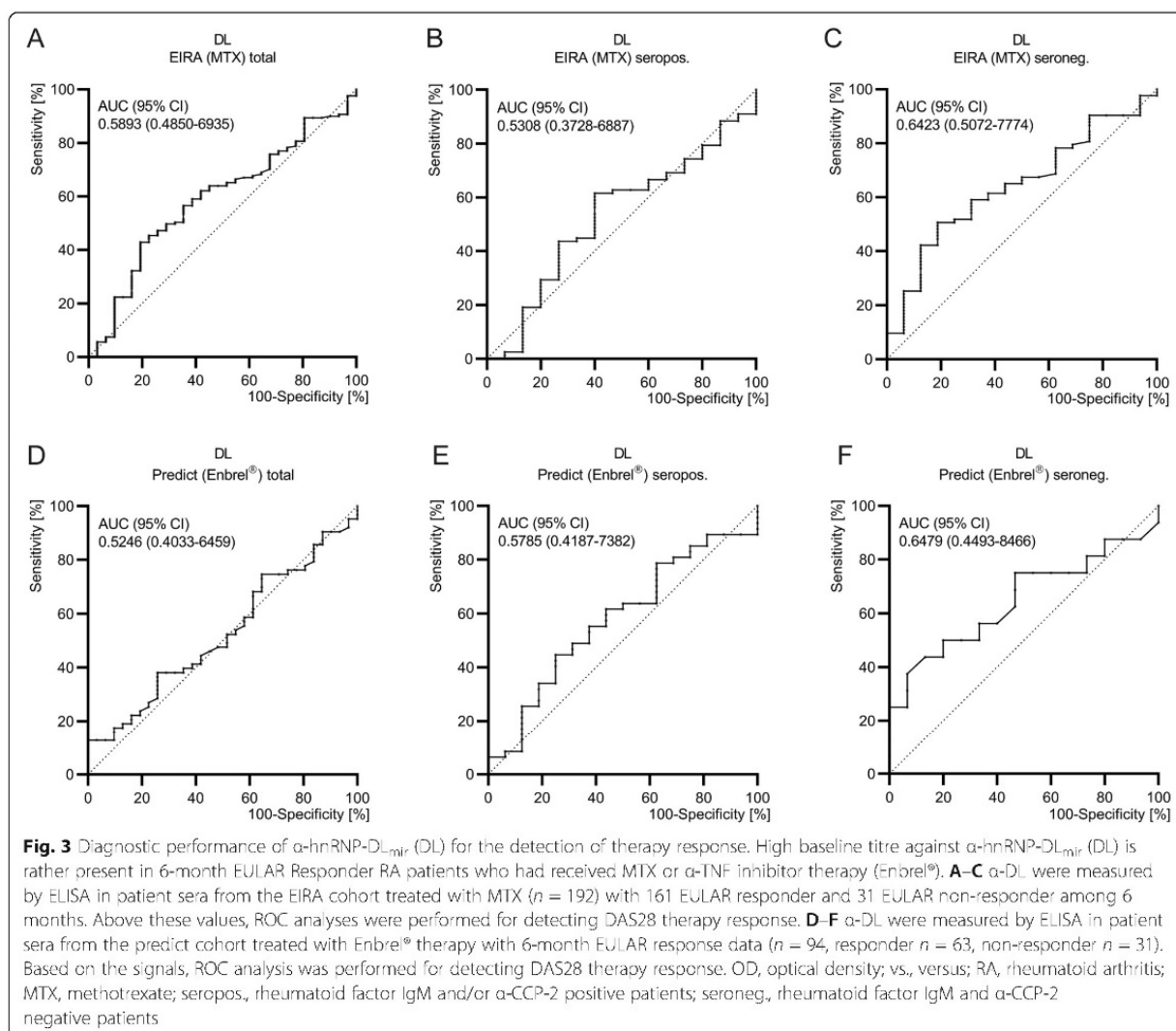
The calculated cutoff level versus healthy controls (96% specificity), identified 80% of the subjects in the Risk-RA cohort, which are exclusively α -CCP-2-positive. In the LURA/EIRA cohort 32/73% of the seronegative patients were identified. In the predict cohort, all patients could be identified with one of our biomarkers and α -DL response was on average the lowest (6%). In SLE patients, 84% in total were detected (α -DL, 34%; α -cit-DL, 80%). In other autoimmune diseases, about half (48%) of the patients were detected in total with our biomarker set.

Using the cutoff level versus other diseases (96% specificity), we detected 51% of the seronegative established RA patients and 8–17% of the early RA patients (Table 1).

Localization and expression of hnRNP-DL in different cell lines and synovial tissue

Affinity-purified α -DL autoantibodies from RA patient sera were used for localization of hnRNP-DL in HeLa- and HEP-2 cells. Sparing the nucleoli in interphase cells, staining with the α -DL autoantibodies showed a nucleoplasmic staining with large speckles (Fig. 4A; a, b). However, the nucleoplasmic staining produced by α -hnRNP-D (α -AUF-1) and α -hnRNP-A2/B1 antibodies was more homogeneous (Fig. 4A; e, f) and stained as well as α -DL autoantibodies discrete cytoplasmic foci when cells were stressed by arsenite (Fig. 4A; c, e, f). Notably, the colocalization experiment showed α -DL antibodies stained a subset of cytoplasmic stress granules (Fig. 4A; c), independent of size and localization. hnRNP-D could be detected in nearly all granules (Fig. 4A; g, yellow), like the controls Ataxin2 and RCK/p54 (Fig. 4A; d/h).

Since previous studies demonstrated hnRNP-A2/B1 and hnRNP-D to be highly expressed in synovial tissue



of RA patients and arthritic mice [19, 28, 45, 46], we analysed the expression of hnRNP-DL in the human joint. Specific rabbit antibodies recognizing hnRNP-DL 1 and 2 expression were tested by immunohistochemistry in synovial tissue of RA and OA patients and from healthy controls (Fig. 4B). These analyses revealed hnRNP-DL to be highly expressed in RA tissue. Nuclear and cytoplasmic expression was seen in cells of RA synovial tissue, in contrast to the exclusive nuclear staining observed in OA and normal tissue (Fig. 4B, arrows).

We further investigated the expression of hnRNP-DL under inflammatory conditions in IL1 α - and TNF α -stimulated HepG2-, as well as in IL6-stimulated HeLa cells by immunoblotting (supplementary Fig. 5 A/B). TNF α and particularly IL1 α upregulate, whereas IL6 downregulates the expression of hnRNP-DL and furthermore induces its degradation.

We further detected citrullinated proteins of the same molecular weight as of hnRNP-DL (supplementary Fig. 5 B) in the synovial tissue. The molecular weights of the detected DL bands in supplementary Figure 5 B do not correspond to the isoforms in supplementary Figure 5A; they may be other DL isoforms that have not been studied in detail.

Anti-DL in animal models of RA and SLE with association to TLR7/9 and MyD88 — supports reference to clinical pain

Anti-cit-DL/ α -DL autoantibodies, in baseline samples, are associated with pain VAS after 6 months of various treatments of EIRA patients (Additional file 1: supplementary Table 3-5).

Therefore, we wanted to study the production of α -DL autoantibodies in the context of TLR and MyD88-knock-out mice, known to be involved in pain pathway

Table 1 Sensitivity of α -citrullinated hnRNP-DL_{mir} (cit-DL), α -hnRNP-DL_{mir} (DL) autoantibodies and Δ OD between cit-DL and DL (Δ DL) in sera from Risk-RA patients, early RA patients (LURA/ EIRA), established RA patients (predict), SLE patients ($n = 89$), other diseases and healthy controls determined by ELISA. Sensitivities are expressed as percentages, with a 98% specificity, and were calculated using two cutoffs in each case, first, against healthy controls (to the left of the slash) and second, against other diseases except SLE (to the right of the slash). Total DL is the combined antibody reactivity and describes the proportion of patients that one detects positive overall with the combination of all three biomarkers α -cit-DL, α -DL and/or Δ DL

	cit-DL	DL	Δ DL	total DL	RF and/or CCP positive				RF and CCP negative				
					cit-DL	DL	Δ DL	total DL	cit-DL	DL	Δ DL	total DL	
Risk-RA	$n = 71$				$n = 71$				$n = 0$				
% pos.	70/28	13/6	68/34	80/39	70/28	13/6	68/34	80/39	-	-	-	-	-
LURA	$n = 106$				$n = 81$				$n = 25$				
% pos.	64/38	8/4	64/40	69/42	77/48	7/2	77/52	80/53	24/4	12/8	24/0	32/8	
EIRA	$n = 404$				$n = 202$				$n = 202$				
% pos.	80/33	21/9	68/31	84/40	94/59	17/5	89/59	96/63	65/7	25/14	46/2	73/17	
Predict	$n = 127$				$n = 86$				$n = 41$				
% pos.	100/67	6/0	100/72	100/72	100/77	6/0	100/83	100/83	100/46	5/0	100/51	100/51	
SLE	$n = 89$												
% pos.	80/58	34/18	72/57	84/73									
other	$n = 127$												
% pos.	45/2	4/2	41/2	48/4									
HC	$n = 86$												
% pos.	2/0	2/0	2/0	5/0									

HC healthy controls, RA rheumatoid arthritis, SLE systemic lupus erythematosus

[47, 48]. Because hnRNP-DL is highly conserved in human and mouse (similarity 98.5% [44]), we analysed α -DL in sera of mouse models of RA and SLE (Table 2).

In zymosan-treated SKG-mice [49], α -DL autoantibodies were twice as frequent (50%) compared to the less severe arthritis model without zymosan induction (25%).

Interestingly, in the interleukin-1 receptor antagonist-deficient (IL-1Ra^{-/-})-mouse arthritis model we found high signals of α -DL autoantibodies in all mice tested.

MRL/lpr-mice produce antibodies against hnRNPs [50] and snRNPs [51] α -DL autoantibodies were detectable in 85%, while none of them were positive for the citrullinated protein version.

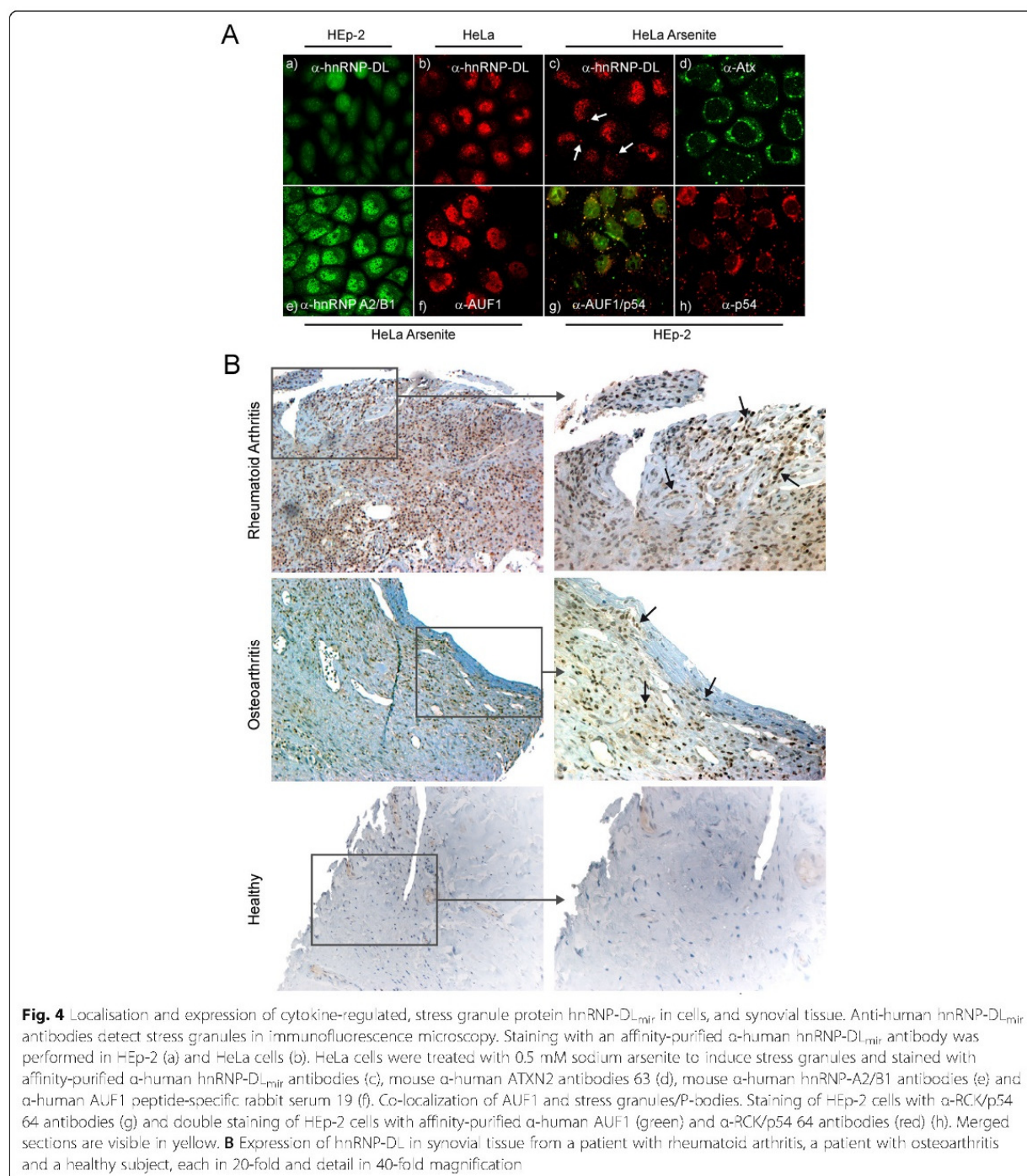
We analysed sera from TLR7-, TLR9-, and TLR7/TLR9-double deficient lupus-prone MRL/lpr-mice. This investigation revealed that α -DL autoantibodies were TLR7/-9 dependent and only completely absent in the double deficient mice, while they remained detectable in about 50% of the single TLR7- or TLR9-knock-out MRL/lpr-mice. MyD88 plays a central role in TLR-pathway [52]. We tested MyD88-deficient mice, which did not produce α -DL autoantibodies except two mice with very low titre. Further, we tested knock-out mice of Toll interleukin-1 receptor 8 (TIR8, SIGIRR, IL1R8), a negative regulator of TLR-IL1-receptor family signalling. Genetic inactivation of this protein, which is associated with severe autoimmunity and high autoantibody production [53], increased prevalence of α -DL autoantibodies by 50%, with a

three times higher mean level of ELISA signal intensity (Table 2).

Discussion

RA antibody systems are remarkably diverse, characterized by the presence of those against native proteins as well as those containing posttranslational modifications (PTMs) [54, 55]. While current models of RA have embraced PTMs as core principles of pathogenesis [54, 56], α -native protein antibodies are not adequately explained by the PTM-centric paradigm of autoantigen selection. The direct α -citrullinated protein-antibody response may depend on the presence of permissive factors, i.e., a genetic predisposition, as has been shown for α -cit-DL with its shared epitope (SE)-dependency and the continued production of modified antigen. Chronic bacterial infection, such caused by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [57] or *Porphyromonas gingivalis*, which can citrullinate hnRNPs [58] or smoking [59, 60], leading to overexpression of hnRNPs, as shown by our results with overexpression and citrullination of hnRNP-DL in RA joint.

In early RA, a serodiagnostic gap of 50–60% [61–64] left by using RF IgM/ α -CCP-2 assays. This is of particular importance as patients considered to be autoantibody negative may erroneously not be diagnosed as having RA due to inappropriate therapeutic measures. In recent years, novel biomarkers have been described with



sensitivities between 16 and 67% in α -CCP-2-negative RA cohorts [65]. However, the clinical utility of these biomarkers is questionable because diagnostic specificities are largely unknown and will have to be shown in further studies. RF IgM/ α -CCP-2-seronegative RA patients became seropositive by a combination of our

biomarker set (α -cit-DL, α -DL, CN_{DL}-index). In the clinical autoantibody testing, the new biomarker can be used for detecting people “at risk” for RA, and for early and established RA, reducing the sensitivity gap of RF IgM/ α -CCP-2-seronegative patients (sensitivity RF IgM/ α -CCP-2 negative LURA/EIRA/predict 32%/73%/100%; Table 1).

Table 2 Frequency of autoantibodies against recombinant hnRNP-DL_{mir} in sera from different RA and SLE mouse models

Mouse model	Model	Autoantigen(s) assayed	No. of sera tested	% Positive	Ratio, Mean OD positive ^b
SKG (-/+ Zymosan)	RA	hnRNP-DL _{mir}	8/8	25/50	2.48/1.23
Balb/c (IL-1Ra ^{-/-})	RA	hnRNP-DL _{mir}	36	100	7.89
MRL-lpr	SLE	hnRNP-DL _{mir} ^a	20	85	4.22
MRL-lpr (MyD88 ^{-/-})	SLE	hnRNP-DL _{mir} ^a	20	10	1.3
MRL-lpr (TLR9 ^{-/-})	SLE	hnRNP-DL _{mir}	4	50	2.42
MRL-lpr (TLR7 ^{-/-})	SLE	hnRNP-DL _{mir}	7	43	2.55
MRL-lpr (TLR7/9 ^{-/-})	SLE	hnRNP-DL _{mir}	7	0	-
C57BL/6 lpr	SLE	hnRNP-DL _{mir} ^a	12	33	2.46
C57BL/6 lpr (SIGIRR/TLR8 ^{-/-})	SLE	hnRNP-DL _{mir} ^a	12	83	6.83
C57BL/6 (-/+ R848)	TLR7/8 agonist	hnRNP-DL _{mir}	10/10	0/10	-/1.39

RA rheumatoid arthritis, SLE systemic lupus erythematosus, SIGIRR/TLR8 Single Ig IL-1-related receptor/Toll/interleukin-1 receptor 8, R848 SIGIRR TLR7/8 agonist, MyD88 myeloid differentiation primary response gene 88, TLR Toll-like receptor

^aAdditionally citrullinated hnRNP-DL_{mir} were tested. In no case, citrullination of hnRNP-DL_{mir} resulted in a higher signal compared to the native hnRNP-DL_{mir} form (no additional reactivity)

^bRatio mean OD positive reflects the level of the positive signals in each mouse model and was calculated as the quotient of the mean value of the positive signals and the diagnostic cutoff

It has already been published that it is important to study the citrullinated signal adjusted from the unmodified protein/peptide signal, to obtain the specific signal, which is added or reduced by the modification. It has been shown that these autoantibodies occur specifically in RA, but without clinical associations such as therapy response [30, 58].

Therefore, we have introduced and tested a new biomarker CN_{DL}-index which measures the difference of α -cit-DL and α -DL ELISA OD levels, covering both antibodies against citrullinated epitopes and structural citrullinated epitopes (SCEs). Negative CN_{DL}-index was detectable at an early timepoint of arthritis and even before arthritis starts. Moreover, RA patients with such negative CN_{DL}-index tended to respond positively to MTX/Enbrel® therapy. As RA progresses, the CN_{DL}-index became increasingly positive and was associated with SE, parenchymal changes in lung and lower the response to MTX therapy.

Citrullination is a hydrolytic reaction, the target protein mobility in SDS-PAGE will shift, yielding a non-charged citrulline amino acid and neutral urea through the hydrolysis of the strongly basic positively charged side chain of arginine by water. This charge shift affects protein structure, protein-protein interactions, and hydrogen bond formation, and it may cause protein denaturation [66, 67]. This study suggests an alternative model to the PTM-centric model in which the antigen is initially targeted independent of citrullin itself, but may depend on a structural change induced by cryptic PTM that causes the autoantibody binding. Demonstrably, the sensitivity of α -cit-DL within the tested SLE patients was 58%, almost three times higher than the sensitivity of α -DL (18%), calculated with the cutoff versus other diseases, although 98% of the tested SLE sera

were α -CCP-2-negative. Citrullination leads to formation of a new SCE, whose recognition is independent of directly targeting the citrulline site. This new form of α -SCE autoantibodies may explain the shift from an initial native autoantibody response against PTMs. DNA, RNA and TLR7/9 activation are required to generate α -hnRNP-specific B cells and this complex induced RA in a pristane-induced arthritis model of RA [68]. Interestingly, MyD88 deficiency leads to reduction of pain [47], which may explain the correlation of α -DL with pain VAS after 6 months in the EIRA cohort. Autoantibodies against DL did not correlate to RF IgM or α -CCP-2 or SE. These antibodies can be used specifically in the seronegative group to predict the therapeutic outcome and pain level after 6 months of treatment.

The α -DL autoantibody level disappeared in the course of RA, inversely the α -cit-DL autoantibody level increased, independently from the therapeutic regime. Therefore, future therapies utilizing tolerance induction may use native RA autoantigens in “high risk” individuals. Epitope spreading to PTM autoantigens can be blocked in the major mouse models of SLE and RA that we have tested, and this could be analysed experimentally with hnRNP-DL in future studies. Native antigens as part of stress granules are used in existing models of experimental arthritis to induce arthritis, but not the citrullinated antigens [68]. SE and specific exogenous factors are missing in the studied animal models of RA and SLE, explaining the lack of ACPAs and SCE autoantibodies. Anti-native protein antibodies may represent markers for the detection of risk people in the earliest pre disease of RA, preceding the development of the ACPA response, predicting a mild disease. For α -hnRNP-A2/B1 autoantibodies, an association to less erosive disease, exclusively in early RA, has already been

published [18, 29]. Recently, several more reactivities against native proteins in RA have been published [55]. Therefore, it is important to measure other hnRNP autoantibodies and in combination in future studies to evaluate them for personalized medicine.

Conclusions

These new data suggest that hnRNP-DL is a novel TLR7/9-dependent autoantigen found predominantly in RA and SLE and in mouse models of inflammatory rheumatic diseases. Our studies on hnRNP-DL have shown that citrullination can lead to structural epitopes (SCE) that can be recognized by α -CCP-2-negative SLE patients. By using the combined assay consisting of citrullinated hnRNP-DL and native hnRNP-DL, we increase the serodiagnostic sensitivity in RA patients who are negative for RF and α -CCP-2 autoantibodies. We demonstrated that autoantibodies against hnRNP-DL have prognostic value for the differential diagnosis of RA, especially in early disease. Immunofluorescence analyses revealed that hnRNP-DL is part of stress granules that can trigger inflammatory processes in RA. Our results indicate that truncated, possibly citrullinated, immunogenic hnRNP-DL can be detected in synovial tissue.

We hypothesize that hnRNP autoantibodies generated by patients with systemic autoimmune diseases are directed against mRNA decay complexes that are part of the stress granules. We hypothesize that increased formation and structural modification of such protein complexes by bacterial or human enzymes (e.g., in inflammatory processes with overexpression of IL1 α and/or TNF α) may lead to a pathogenic autoimmune response against a structurally altered form of native hnRNP-DL and that SCE epitopes may arise before the temporal increase in PTM-specific targets. In conclusion, the introduction of a CN-index biomarker that measures specific anti-citrulline signalling in autoantigens will help to objectively facilitate early RA treatment decisions that are not measurable with current commercial ACPA assays.

Further autoantibody studies with additional hnRNP family proteins in native and citrullinated form should follow to identify new subsets of reactivities in RA patients. In addition, the clinical significance of the structural epitopes should be investigated in detail.

Abbreviations

AA: Amino acid; ANA HEP-2: Indirect immunofluorescence to anti-nuclear autoantibodies with fixed human epithelial cells; AREs: AU-rich elements; ATXN: Ataxin-2; IL-1Ra: Interleukin-1 receptor antagonist; AUF1: TNF α regulatory protein; BSA: Bovine serum albumin; cit-DL: Citrullinated hnRNP-DL; CN_{DL}-Index: Difference of ELISA signal of α -citrullinated and α -native hnRNP-DL (Δ hnRNP-DL); DTT: Dithiothreitol; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; HAM/TSP: HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis; HC: Healthy controls; HeLa: Human immortal cell line from cervical cancer taken from Henrietta Lacks; HepG2: A human liver cancer cell line; hnRNP-DL: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like;

IL: Interleukin; JKTBP: JKT41-binding protein; LB medium: Lysogeny broth; MB: Ankylosing spondylitis; MCTD: Mixed connective tissue disease; mir: Major immunogenic region; MS: Multiple sclerosis; MTX: Methotrexate; MyD88: Myeloid differentiation primary response gene 88; OA: Osteoarthritis; PBS: Phosphate-buffered saline; PC: Parenchymal changes in the lung; PCR: Polymerase chain reaction; PsA: Psoriasis arthritis; PTMs: Posttranslational modifications; R848: SIGIRR TLR7/8 agonist; RA: Rheumatoid arthritis; RA33: Autoantibodies against hnRNP-A2/B1; RBD: RNA binding domains; RCK/p54: DEAD box/RNA helicase protein; ROC: Receiver operating characteristic; SCE: Structural citrullination dependent epitopes; SDS-PAGE: Sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis; SE: Shared epitope; SIGIRR/TIR8: Single Ig IL-1-related receptor/ Toll/interleukin-1 receptor 8; SLE: Systemic lupus erythematosus; TBS: Tris buffered saline; TBST: Tris buffered saline-Tween; TBST-T: Tris buffered saline-Tween-TritonX; TLR: Toll-like receptor; TNF: Tumour necrosis factor

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13075-021-02603-x>.

Additional file 1: Figure 1. Sequence, structure and major immunogenic region (mir) of hnRNP-D and hnRNP-DL. A, Schematic representation of hnRNP-D (isoform p45), hnRNP-DL and the different recombinant hnRNP-DL variants studied. The main structural features are highlighted. Mir-region is the major immunogenic region, RBD1 and RBD2 are RNA-binding domains 1 and 2, Gly-rich is the C-terminal glycine-rich region of the proteins. B, Global amino acid sequence alignment of hnRNP-D and hnRNP-DL1 (isoform 1). HnRNP-D and -DL share 89.1% similarity by sequence. Regions "mir", "RBD1", "RBD2" and "Gly-rich" are highlighted. **Figure 2.** Characterisation of autoantibodies against A, citrullinated α -hnRNP-DL_{mir} (cit-DL), B, α -hnRNP-DL_{mir} (DL) and C, Δ OD between cit-DL and DL (Δ DL) determined by ELISA in sera of other diseases (n=127; MS n=20, reA n=7, Sclero n=20, Sjögren n=20, PsA n=20, MB n=20, OA n=20). The dotted lines mark the cutoff vs. other diseases (except systemic lupus erythematosus) or healthy controls with 98% specificity each. OD, optical density; nm, nano meter; vs., versus; MS, multiple sclerosis; reA, reactive arthritis; Sclero, scleroderma; Sjögren's syndrome; PsA, psoriasis arthritis; MB, ankylosing spondylitis; OA, Osteoarthritis. **Table 1.** Mann Whitney U-test of (cit) α -hnRNP-DL_{mir}-OD signals of seropositive and seronegative data sets of RA-cohorts. **Table 2.** Mann Whitney U-test of cit α -hnRNP-DL_{mir}-OD signals of seronegative data sets of RA-cohorts and data sets of other inflammatory diseases. **Figure 3.** XY-Plot and Spearman Correlation of citrullinated or native α -hnRNP-DL_{mir} versus Δ hnRNP-DL_{mir} for the early RA cohort EIRA (A/D; n=404), the seropositive EIRA sera (B/E; n=202) and the seronegative EIRA sera (C/F; n=202). **Table 3.** Spearman correlation of the early RA sera of the EIRA cohort (n=404). The results are given as R value (left of slash) with the corresponding p-value (right of slash). **Table 4.** Spearman correlation of the 242 EIRA sera treated with MTX (α -CCP2 positive n=133, α -CCP2 negative n=109). The results are given as R value (left of slash) with the corresponding p-value (right of slash). **Table 5.** Spearman correlation of the established RA sera of the Predict cohort (n=94; RF IgM and/or α -CCP2 positive n=64, RF IgM and α -CCP2 negative n=30). The results are given as R value (left of slash) with the corresponding p-value (right of slash). **Table 6.** ROC analysis of native hnRNP-DL_{mir} of MTX-treated EIRA patients (n=192; seropositive n=93, seronegative n=99). **Table 7.** Negative CN_{DL}-index of MTX-treated EIRA patients n=192 (Resp. n=161, non-Resp. n=31). **Table 8.** ROC analysis of native hnRNP-DL_{mir} of Enbrel®-treated Predict patients (n=94; seropositive n=63, seronegative n=31). **Figure 4.** High baseline titer against α -hnRNP-DL_{mir} (DL) is rather present in 6-month EULAR Responder RA patients who had received MTX or α -TNF inhibitor therapy (Enbrel®). A-C, Citrullinated α -hnRNP-DL_{mir} (citDL) (A), α -hnRNP-DL_{mir} (DL) (B) and Δ OD between citDL and DL (Δ DL) (C) were measured by ELISA in patient sera from the EIRA cohort treated with MTX (n=192) with 161 EULAR Responder and 31 EULAR non-Responder among 6 months. The evaluation was done according to the cutoff versus other diseases. D, α -DL were measured by ELISA in patient sera from the Predict cohort treated with α -TNF inhibitor therapy with 6-month EULAR response data (n=94, responder n=63, non-Responder n=

31). Based on the signals, a response-cutoff (dotted line, OD 0.174) was determined, from which only responders are recognized as positive. OD, optical density; nm, nano meter; RA, rheumatoid arthritis; SLE, systemic lupus erythematosus; MTX, Methotrexate; Resp, 6-month EULAR Responder. Figure 5. A, Influence of cytokines on hnRNP-DL expression determined by immunoblotting. Cellular extracts from unstimulated, IL1 α - or TNF α -stimulated HeLa cells and from unstimulated and IL6-stimulated HepG2 cells were probed with α -hnRNP-DL1/2-peptide specific rabbit serum. B, Citrullination of hnRNP-DL in synovial tissue from a patient with rheumatoid arthritis was investigated with an α -deiminated arginine antibody and an α -hnRNP-DL antibody. Both positive bands were labeled with hnRNP-DL, which isoforms were not analysed.

Additional file 2: Tab. 1. Antigens.

Acknowledgements

We thank Prof. Gary Brewer (Rutgers Robert Wood Johnson Medical School, Piscataway, NJ, USA) who provided the AUF1p45 clone, Prof. Edward K.L. Chan (Department of Oral Biology, University of Florida, Gainesville, USA) for providing α -RCK/p54 antibody and Dr. Stefan Bänziger (Division of Infectious Diseases and Hospital Epidemiology, University Hospital of Zurich, Zurich, Switzerland) for providing mice sera from C57BL/6 (-/+ R848). Thanks to Prof. Gerhard Krönke from Erlangen, who provided additional sera of risk-RA.

We wish to thank EIRA study participants and the EIRA study group for their contributions, Professor Lars Klareskog for establishing the EIRA study and for support and scientific input, and Sarah Ohrendorf for comments reading the manuscript.

Authors' contributions

BM and KS conceived the study and design. BM, TH, UN, SK, APC, GS, and KS for acquisition of data. DMR, MIK, KJA, AIC, VJ, APC, MJS, and GS collected database and biological material. BM, ZK, MJ, FW, GS, KS, and JR involved in analysis and interpretation of data. All authors, BM, MJ, ZK, TH, FW, UN, SK, DMR, MIK, HJA, GRB, AIC, VJ, APC, MJS, JR, GS, and KS, were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content. The authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

AIC MD, PhD, Professor, Group Leader at Karolinska Institutet died in March 2021.

Funding

The work was supported by grants from the project ArthroMark (grant number 01EC1401A) and the project ProgRATE (KMU-innovativ-8) (grant number 0315941C) of the Federal Ministry for Education and Research (BMBF) and the IMI EU funded project BTCure (grant number 115142-2), additional KMU-innovativ: tVDIRA FKZ 13GW0194CA with the project partner: Charité and the RTCure project. RTCure (Rheuma Tolerance for Cure) is a large, pan-European collaborative initiative funded by the Innovative Medicines Initiative (IMI). IMI is the world's biggest public-private partnership (PPP) in the life sciences. It is a partnership between the European Union and the European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA). The RTCure project has received funding from the Innovative Medicines Initiative 2 Joint Undertaking under grant agreement no. 777357. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Availability of data and materials

Not applicable

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study has been performed in compliance with the Declaration of Helsinki, with informed consent obtained from all study participants, and ethical approval granted at the Regional Ethical Review Board in Berlin, Erlangen, Vienna, and Stockholm.

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no conflicting financial interest and have not received funding from commercial sources in the context of this study. KS and ZK are co-inventors of the patent WO/2010/072673 Diagnostic Prediction of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus, protecting the use of the hnRNP-DL and cit-hnRNP-DL in RA and SLE.

Author details

¹Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité — Universitätsmedizin Berlin, Charité Campus Mitte, Rheumatologisches Forschungslabor - AG Skriner, Charitéplatz 1 (intern Virchowweg 11, 5.OG, R011), 10117 Berlin, Germany. ²German Rheumatism Research Centre, Leibniz Institute, 10117 Berlin, Germany. ³Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Germany. ⁴Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Potsdam, Germany. ⁵Department of Analytical Chemistry (Dpt.1), Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), Berlin, Germany. ⁶Department of Experimental Rheumatology, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands. ⁷Division of Rheumatology, Department of Medicine Solna, Karolinska Institutet, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden. ⁸Centre for Rheumatic Diseases, School of Immunology and Microbial Sciences, Faculty of Life Sciences and Medicine, King's College London, London, UK. ⁹Department of Immunology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA. ¹⁰Medical Clinic and Policlinic IV, Nephrological Center, Ludwig-Maximilians-University Hospital, Munich, Germany. ¹¹Academic Specialist Center, Center for Rheumatology, Stockholm Health Region, Stockholm, Sweden. ¹²Department of Immunology, Genetics and Pathology, Uppsala University, Uppsala, Sweden. ¹³Division of Rheumatology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria. ¹⁴Ludwig Boltzmann Cluster for Arthritis and Rehabilitation, Vienna, Austria.

Received: 25 May 2021 Accepted: 6 August 2021

Published online: 14 September 2021

References

- Fritzler MJ, Ali R, Tan EM. Antibodies from patients with mixed connective tissue disease react with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein or ribonucleic acid (hnRNP/RNA) of the nuclear matrix. *J Immunol.* 1984;132(3):1216–22.
- Zouali M, Eyquem A. Antibodies to heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in sera from patients with rheumatic autoimmune diseases. *J Clin Immunol.* 1984;4(3):209–19. <https://doi.org/10.1007/BF00914968>.
- Dreyfuss G, Matunis MJ, Piñol-Roma S, Burd CG. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem.* 1993;62(1):289–321. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.62.070193.001445>.
- Carson JH, Kwon S, Barbarese E. RNA trafficking in myelinating cells. *Curr Opin Neurobiol.* 1998;8(5):607–12. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(98\)80088-3](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(98)80088-3).
- Biamonti G, Ghigna C, Caporali R, Montecucco C. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs): an emerging family of autoantigens in rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 1998;16(3):317–26.
- Hoffmann MH, Skriner K, Herman S, Baumann C, Steiner CW, Ospelt C, et al. Nucleic acid-stimulated antigen-presenting cells trigger T cells to induce disease in a rat transfer model of inflammatory arthritis. *J Autoimmun.* 2011; 36(3–4):288–300. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2011.02.007>.
- Krecic AM, Swanson MS. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11(3):363–71. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)80051-9](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)80051-9).
- Yukitake M, Sueoka E, Sueoka-Aragane N, Sato A, Ohashi H, Yakushiji Y, et al. Significantly increased antibody response to heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients but not in patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neuro-Oncol.* 2008;14(2):130–5. <https://doi.org/10.1080/13550280701883840>.
- Sueoka E, Yukitake M, Iwanaga K, Sueoka N, Aihara T, Kuroda Y. Autoantibodies against heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 in CSF of MS patients. *Ann Neurol.* 2004;56(6):778–86. <https://doi.org/10.1002/ana.20276>.
- Siapla S, Patrinoiu-Georgoula M, Vlachoyiannopoulos PG, Gualis A. Multiple specificities of autoantibodies against hnRNP A/B proteins in systemic rheumatic diseases and hnRNP L as an associated novel autoantigen. *Autoimmunity.* 2007; 40(3):223–33. <https://doi.org/10.1080/08916930701352357>.

11. Steiner G, Skriner K, Smolen JS. Autoantibodies to the A/B proteins of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex: novel tools for the diagnosis of rheumatic diseases. *Int Arch Allergy Immunol*. 1996;111(4):314–9. <https://doi.org/10.1159/000237386>.
12. Trembleau S, Hoffmann M, Meyer B, Nell V, Radner H, Zauner W, et al. Immunodominant T-cell epitopes of hnRNP-A2 associated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 2010;40(6):1795–808. <https://doi.org/10.1002/eji.200939482>.
13. Skriner K, Sommergruber WH, Tremmel V, Fischer I, Barta A, Smolen JS, et al. Anti-A2/RA33 autoantibodies are directed to the RNA binding region of the A2 protein of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex. Differential epitope recognition in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and mixed connective tissue disease. *J Clin Invest*. 1997;100(1):127–35. <https://doi.org/10.1172/JCI119504>.
14. Schett G, Dumortier H, Hoefler E, Müller S, Steiner G. B cell epitopes of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2: identification of a new specific antibody marker for active lupus disease. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(5):729–35. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.087502>.
15. Danglil A, Plomaritoglou A, Boutou E, Vassiliadou N, Moutsopoulos HM, Guialis A. Recognition of subsets of the mammalian A/B-type core heterogeneous nuclear ribonucleoprotein polypeptides by novel autoantibodies. *Biochem J*. 1996;320(Pt 3):761–7. <https://doi.org/10.1042/bj3200761>.
16. Skriner K, Steiner G, Sommergruber WH, Sinski A, Smolen JS. Anti-RA33 autoantibodies may recognize epitopes in the N-terminal region of hnRNP-A2 (RA33). *Clin Exp Rheumatol*. 1994;12(Suppl 11):S79–82.
17. Hassfeld W, Steiner G, Studnicka-Benke A, Skriner K, Graninger W, Fischer I, et al. Autoimmune response to the spliceosome. An immunologic link between rheumatoid arthritis, mixed connective tissue disease, and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1995;38(6):777–85. <https://doi.org/10.1002/art.1780380610>.
18. König MF, Giles JT, Nigrovic PA, Andrade F. Antibodies to native and citrullinated RA33 (hnRNP A2/B1) challenge citrullination as the inciting principle underlying loss of tolerance in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(11):2022–8. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-208529>.
19. Skriner K, Hueber W, Süleymanoglu E, Höfler E, Krenn V, Smolen J, et al. AUF1, the regulator of tumor necrosis factor alpha messenger RNA decay, is targeted by autoantibodies of patients with systemic rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*. 2008;58(2):511–20. <https://doi.org/10.1002/art.23306>.
20. Nakieliy S, Dreyfuss G. Nuclear export of proteins and RNAs. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9(3):420–9. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80016-6](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80016-6).
21. Guil S, Long JC, Cáceres JF. hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response. *Mol Cell Biol*. 2006;26(15):5744–58. <https://doi.org/10.1128/MCB.00224-06>.
22. Bandiera A, Medic N, Akindahuni AA, Manzini G. In-vitro dual binding activity of an evolutionarily related subgroup of hnRNP proteins. *Mol Cell Biochem*. 2005;268(1-2):121–7. <https://doi.org/10.1007/s11010-005-3700-1>.
23. Kamei D, Tsuchiya N, Yamazaki M, Meguro H, Yamada M. Two forms of expression and genomic structure of the human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like JKTBP gene (HNRPD). *Gene*. 1999;228(1-2):13–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00020-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00020-7).
24. Kawamura H, Tomozoe Y, Akagi T, Kamei D, Ochiai M, Yamada M. Identification of the nucleocytoplasmic shuttling sequence of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like protein JKTBP and its interaction with mRNA. *J Biol Chem*. 2002;277(4):2732–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M1108477200>.
25. Boopathi E, Lenka N, Prabu SK, Fang JK, Wilkinson F, Atchison M, et al. Regulation of murine cytochrome c oxidase Vb gene expression during myogenesis: YY-1 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like protein (JKTBP1) reciprocally regulate transcription activity by physical interaction with the BRF-1/ZBP-89 factor. *J Biol Chem*. 2004;279(34):35242–54. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403160200>.
26. Rebol MR, Oumard A, Gazdag AC, Renger I, Ritter B, Schwarzer M, et al. NRF IRES activity is mediated by RNA binding protein JKTBP1 and a 14-nt RNA element. *Rna*. 2007;13(8):1328–40. <https://doi.org/10.1261/ma.545407>.
27. Doi A, Shiosaka T, Takaoka Y, Yanagisawa K, Fujita S. Molecular cloning of the cDNA encoding A + U-rich element RNA binding factor. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1396(1):51–6. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(97\)00223-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(97)00223-6).
28. Hayer S, Tohidast-Akrad M, Haralambous S, Jahn-Schmid B, Skriner K, Trembleau S, et al. Aberrant expression of the autoantigen heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-A2 (RA33) and spontaneous formation of rheumatoid arthritis-associated anti-RA33 autoantibodies in TNF-alpha transgenic mice. *J Immunol*. 2005;175(12):8327–36. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.8327>.
29. Nell VP, Machold KP, Stamm TA, Eberl G, Heinzl H, Uffmann M, et al. Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(12):1731–6. <https://doi.org/10.1136/ard.2005.035691>.
30. Rönnelid J, Hansson M, Mathsson-Alm L, Cornillet M, Reed E, Jakobsson PJ, et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody multiplexing defines an extended group of ACPA-positive rheumatoid arthritis patients with distinct genetic and environmental determinants. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(2):203–11. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-211782>.
31. Stolt P, Bengtsson C, Nordmark B, Lindblad S, Lundberg I, Klareskog L, et al. Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(9):835–41. <https://doi.org/10.1136/ard.62.9.835>.
32. Reynisdottir G, Karimi R, Joshua V, Olsen H, Hensvold AH, Harju A, et al. Structural changes and antibody enrichment in the lungs are early features of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2014;66(1):31–9. <https://doi.org/10.1002/art.38201>.
33. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988;31(3):315–24. <https://doi.org/10.1002/art.1780310302>.
34. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982;25(11):1271–7. <https://doi.org/10.1002/art.1780251101>.
35. Alarcón-Segovia D, Cardiel MH. Comparison between 3 diagnostic criteria for mixed connective tissue disease. Study of 593 patients. *J Rheumatol*. 1989;16(3):328–34.
36. Büssov K, Cahill D, Niefeld W, Bancroft D, Scherzinger E, Lehrach H, et al. A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(21):5007–8. <https://doi.org/10.1093/nar/26.21.5007>.
37. Lian S, Fritzlir MJ, Katz J, Hamazaki T, Terada N, Satoh M, et al. Small interfering RNA-mediated silencing induces target-dependent assembly of GW/P bodies. *Mol Biol Cell*. 2007;18(9):3375–87. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-01-0070>.
38. Nonhoff U, Ralser M, Welzel F, Piccini I, Balzerit D, Yaspo ML, et al. Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules. *Mol Biol Cell*. 2007;18(4):1385–96. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-12-1120>.
39. Kaehler C, Isensee J, Nonhoff U, Terrey M, Hucho T, Lehrach H, et al. Ataxin-2-like is a regulator of stress granules and processing bodies. *PLoS One*. 2012;7(11):e50134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050134>.
40. Welzel F, Kaehler C, Isau M, Hallen L, Lehrach H, Krobisch S. FOX-2 dependent splicing of ataxin-2 transcript is affected by ataxin-1 overexpression. *PLoS One*. 2012;7(5):e37985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037985>.
41. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
42. Madeira F, Park YM, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(W1):W636–W41. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>.
43. Rice P, Longden I, Bleasby A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet*. 2000;16(6):276–7. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02024-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02024-2).
44. Needleman SB, Wunsch CD. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol*. 1970;48(3):443–53. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90057-4).
45. Fritsch R, Eselböck D, Skriner K, Jahn-Schmid B, Scheinecker C, Bohle B, et al. Characterization of autoreactive T cells to the autoantigens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 (RA33) and filaggrin in patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2002;169(2):1068–76. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.2.1068>.
46. Schett G, Hayer S, Tohidast-Akrad M, Schmid BJ, Lang S, Türk B, et al. Adenovirus-based overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 reduces tissue damage in the joints of tumor necrosis factor alpha transgenic mice. *Arthritis Rheum*. 2001;44(12):2888–98. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200112\)44:12<2888::AID-ART477>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200112)44:12<2888::AID-ART477>3.0.CO;2-3).

47. Liu F, Wang Z, Qiu Y, Wei M, Li C, Xie Y, et al. Suppression of MyD88-dependent signaling alleviates neuropathic pain induced by peripheral nerve injury in the rat. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):70. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0822-9>.
48. Lacagnina MJ, Watkins LR, Grace PM. Toll-like receptors and their role in persistent pain. *Pharmacol Ther*. 2018;184:145–58. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.006>.
49. Kobayashi K, Suda T, Nan-Ya K, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Miki I. Cytokine production profile of splenocytes derived from zymosan A-treated SKG mice developing arthritis. *Inflamm Res*. 2006;55(8):335–41. <https://doi.org/10.1007/s00011-006-5208-x>.
50. Dumortier H, Monneaux F, Jahn-Schmid B, Briand JP, Skriner K, Cohen PL, et al. B and T cell responses to the spliceosomal heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2 and B1 in normal and lupus mice. *J Immunol*. 2000;165(4):2297–305. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.4.2297>.
51. Fatenejad S, Brooks W, Schwartz A, Craft J. Pattern of anti-small nuclear ribonucleoprotein antibodies in MRL/Mp-lpr/lpr mice suggests that the intact U1 snRNP particle is their autoimmunogenic target. *J Immunol*. 1994;152(11):5523–31.
52. Nickerson KM, Christensen SR, Shupe J, Kashgarian M, Kim D, Elkon K, et al. TLR9 regulates TLR7- and MyD88-dependent autoantibody production and disease in a murine model of lupus. *J Immunol*. 2010;184(4):1840–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902592>.
53. Riva F, Bonavita E, Barbati E, Muzio M, Mantovani A, Garlanda C. TIR8/SIGIRR is an interleukin-1 receptor/toll like receptor family member with regulatory functions in inflammation and immunity. *Front Immunol*. 2012;3:322.
54. Shi J, Knevel R, Suwannalai P, van der Linden MP, Janssen GM, van Veelen PA, et al. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(42):17372–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114465108>.
55. Poulsen TBG, Damgaard D, Jørgensen MM, Senolt L, Blackburn JM, Nielsen CH, et al. Identification of nNovel nNative aAutoantigens in rRheumatoid aArthritis. *Biomedicines*. 2020;8(6):141.
56. Trouw LA, Rispen T, Toes REM. Beyond citrullination: other post-translational protein modifications in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(6):331–9. <https://doi.org/10.1038/nrheum.2017.15>.
57. König MF, Abusleme L, Reinholdt J, Palmer RJ, Teles RP, Sampson K, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2016;8(369):369ra176.
58. Jennings M, Marklein B, Ytterberg J, Zubarev RA, Joshua V, van Schaardenburg D, et al. Bacterial citrullinated epitopes generated by. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(9):1194–202. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216919>.
59. Yan-Sanders Y, Hammons GJ, Lyn-Cook BD. Increased expression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (hnRNP) in pancreatic tissue from smokers and pancreatic tumor cells. *Cancer Lett*. 2002;183(2):215–20. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00168-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00168-4).
60. Zhou J, Mulshine JL, Ro JY, Avis I, Yu R, Lee JJ, et al. Expression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 in bronchial epithelium of chronic smokers. *Clin Cancer Res*. 1998;4(7):1631–40.
61. Egerer K, Feist E, Burmester GR. The serological diagnosis of rheumatoid arthritis: antibodies to citrullinated antigens. *Dtsch Arztebl Int*. 2009;106(10):159–63. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2009.0159>.
62. Seegobin SD, Ma MH, Dahanayake C, Cope AP, Scott DL, Lewis CM, et al. ACPA-positive and ACPA-negative rheumatoid arthritis differ in their requirements for combination DMARDs and corticosteroids: secondary analysis of a randomized controlled trial. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(1):R13. <https://doi.org/10.1186/ar4439>.
63. Gavrilă BI, Ciofu C, Stoica V. Biomarkers in rheumatoid arthritis, what is new? *J Med Life*. 2016;9(2):144–8.
64. Hua C, Daien CI, Combe B, Landewe R. Diagnosis, prognosis and classification of early arthritis: results of a systematic review informing the 2016 update of the EULAR recommendations for the management of early arthritis. *RMD Open*. 2017;3(1):e000406. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2016-000406>.
65. Trouw LA, Mahler M. Closing the serological gap: promising novel biomarkers for the early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2012;12(2):318–22. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.05.007>.
66. Knuckley B, Causey CP, Jones JE, Bhatia M, Dreyton CJ, Osborne TC, et al. Substrate specificity and kinetic studies of PADs 1, 3, and 4 identify potent and selective inhibitors of protein arginine deiminase 3. *Biochemistry*. 2010;49(23):4852–63. <https://doi.org/10.1021/bi100363t>.
67. Tarcsa E, Marekov LN, Mei G, Melino G, Lee SC, Steinert PM. Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *J Biol Chem*. 1996;271(48):30709–16. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.48.30709>.
68. Hoffmann MH, Tuncel J, Skriner K, Tohidast-Akrad M, Türk B, Pinol-Roma S, et al. The rheumatoid arthritis-associated autoantigen hnRNP-A2 (RA33) is a major stimulator of autoimmunity in rats with pristane-induced arthritis. *J Immunol*. 2007;179(11):7568–76. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7568>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



SUPPLEMENTARY RESULTS

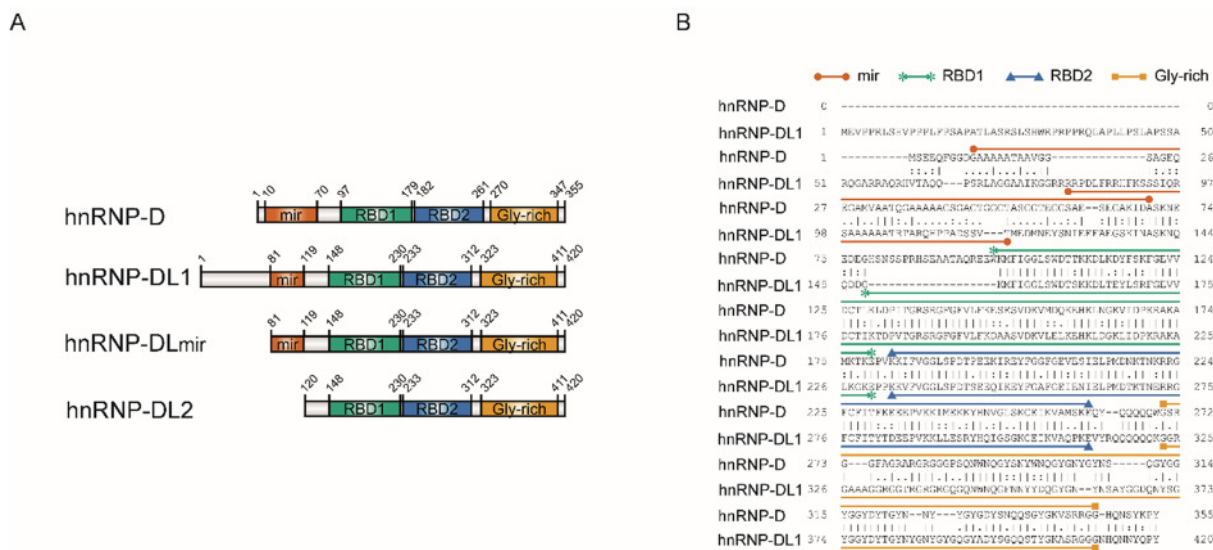


Figure 1. Sequence, structure and major immunogenic region (mir) of hnRNP-D and hnRNP-DL. **A**, Schematic representation of hnRNP-D (isoform p45), hnRNP-DL and the different recombinant hnRNP-DL variants studied. The main structural features are highlighted. Mir-region is the major immunogenic region, RBD1 and RBD2 are RNA-binding domains 1 and 2, Gly-rich is the C-terminal glycine-rich region of the proteins. **B**, Global amino acid sequence alignment of hnRNP-D and hnRNP-DL1 (isoform 1). HnRNP-D and -DL share 89.1% similarity by sequence[1]. Regions “mir”, “RBD1”, “RBD2” and “Gly-rich” are highlighted.

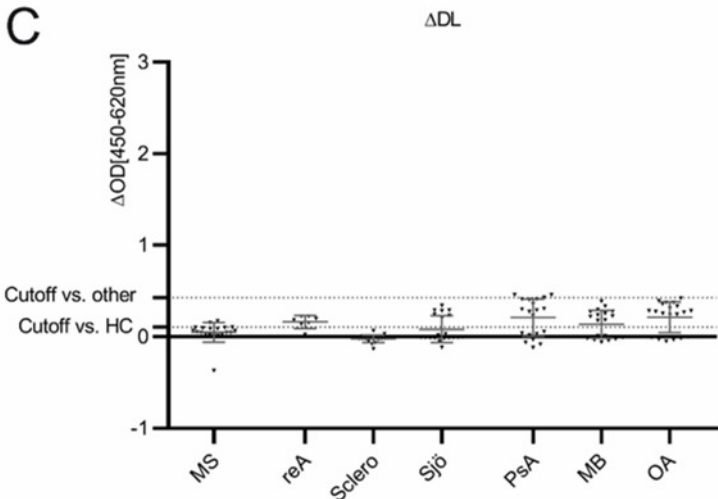
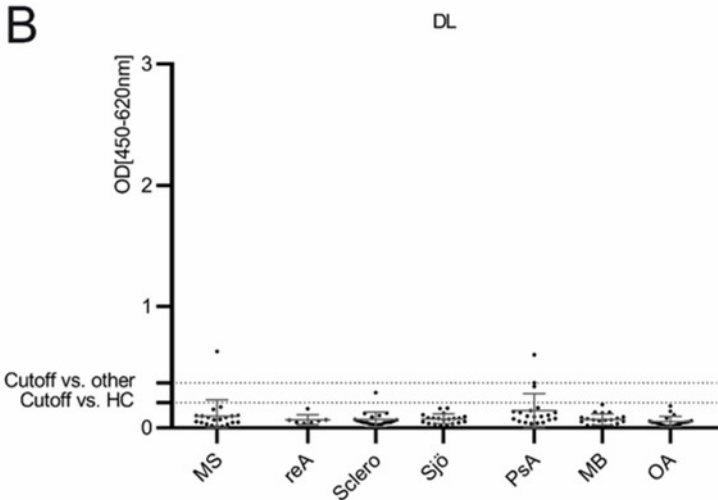
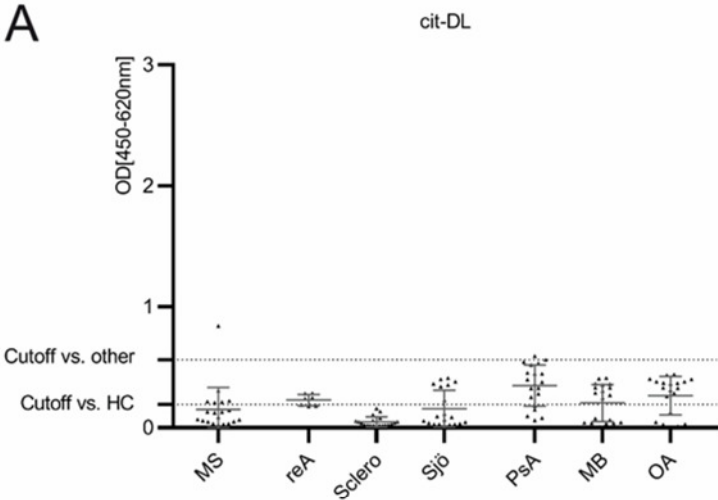


Figure 2. Characterisation of autoantibodies against, **A**, citrullinated α -hnRNP-DL_{mir} (cit-DL), **B**, α -hnRNP-DL_{mir} (DL) and **C**, Δ OD between cit-DL and DL (Δ DL) determined by ELISA in sera of other diseases (n=127; MS n=20, reA n=7, Sclero n=20, Sjö n=20, PsA n=20, MB n=20, OA n=20). The dotted lines mark the cutoff vs. other diseases (except systemic lupus erythematosus) or healthy controls with 98% specificity each. OD, optical density; nm, nano meter; vs., versus; MS, multiple sclerosis; reA, reactive arthritis; Sclero, scleroderma; Sjö, Sjögren's syndrome; PsA, psoriasis arthritis; MB, ankylosing spondylitis; OA. Osteoarthritis

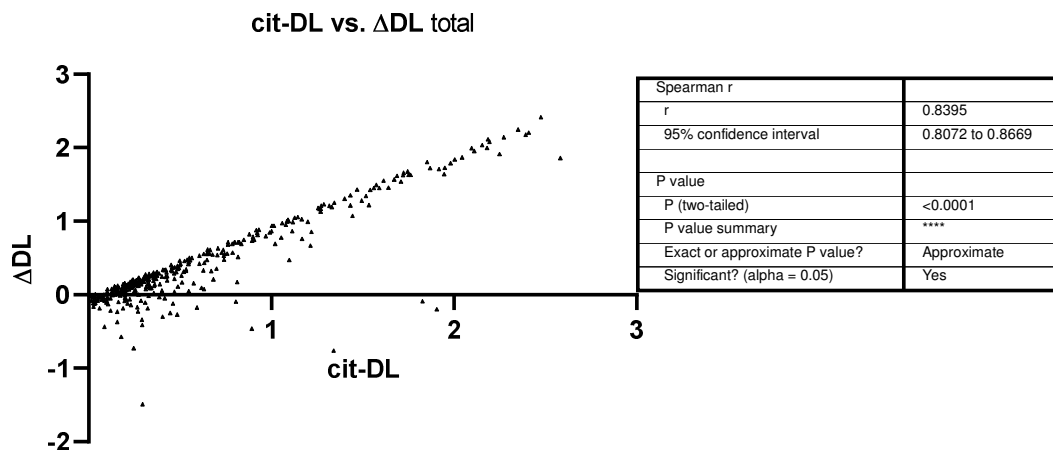
Table 1. Mann Whitney U-test of (cit) α -hnRNP-DL_{mir}-OD signals of seropositive and seronegative data sets of RA-cohorts.

cohort	Mann Whitney U Test	cit-DL		DL	
		seropos.	seroneg.	seropos.	seroneg.
LURA	median	0.5480 n=81	0.1120 n=25	0.06600 n=81	0.05700 n=25
	P value	<0.0001		0.6801	
	P value summary	****		ns	
EIRA	median	0.7175 n=202	0.2403 n=202	0.1105 n=202	0.1200 n=202
	P value	<0.0001		0.2672	
	P value summary	****		ns	
Predict	median	0.8478 n=86	0.5255 n=41	0.07650 n=86	0.06500 n=41
	P value	<0.0001		0.2693	
	P value summary	****		ns	

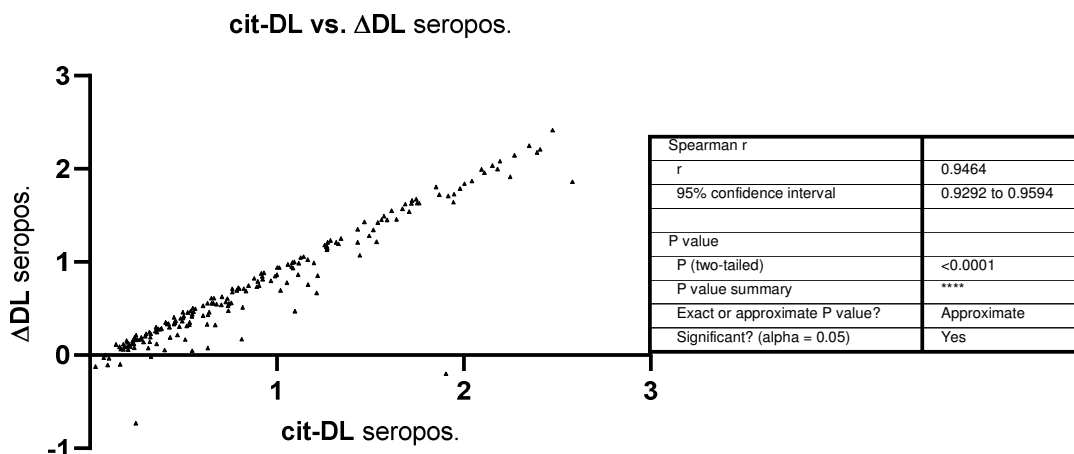
Table 2. Mann Whitney U-test of cit α -hnRNP-DL_{mir}-OD signals of seronegative data sets of RA-cohorts and data sets of other inflammatory diseases.

Mann Whitney Test	Cit-DL	
	seroneg. EIRA	other diseases
median	0.2403 n=202	0.1455 n=127
P value	0.0005	
P value summary	***	
	seroneg. Predict	other diseases
median	0.5255 n=41	0.1455 n=127
P value	<0.0001	
P value summary	****	
	seroneg. LURA	other diseases
median	0.1120 n=25	0.1455 n=127
P value	0.2168	
P value summary	ns	

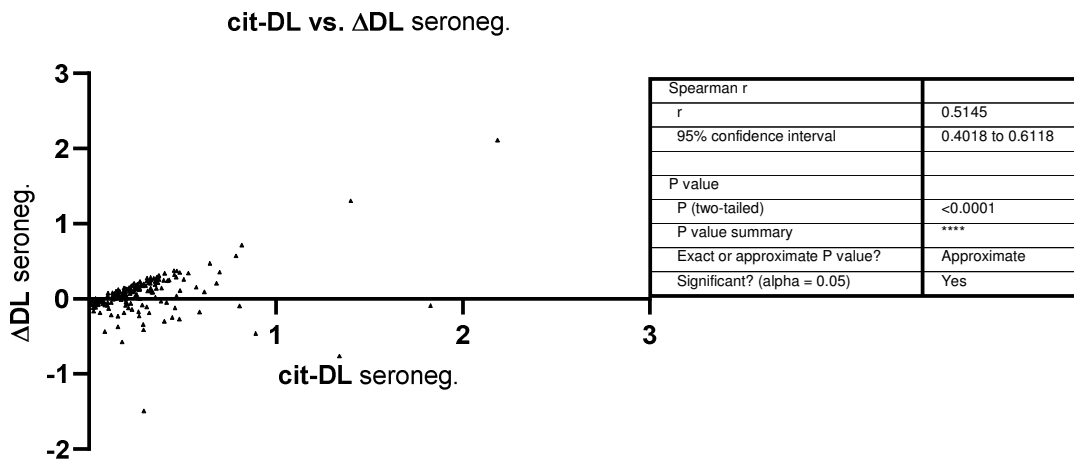
A



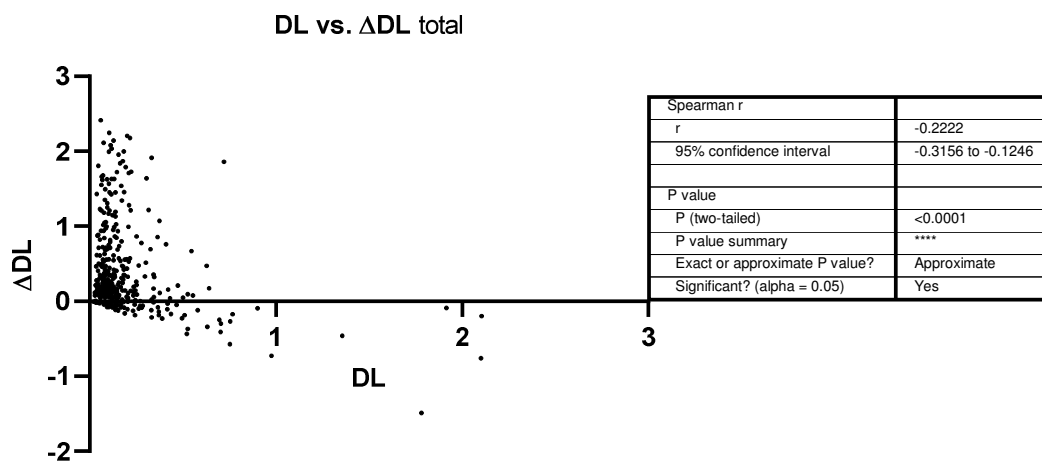
B



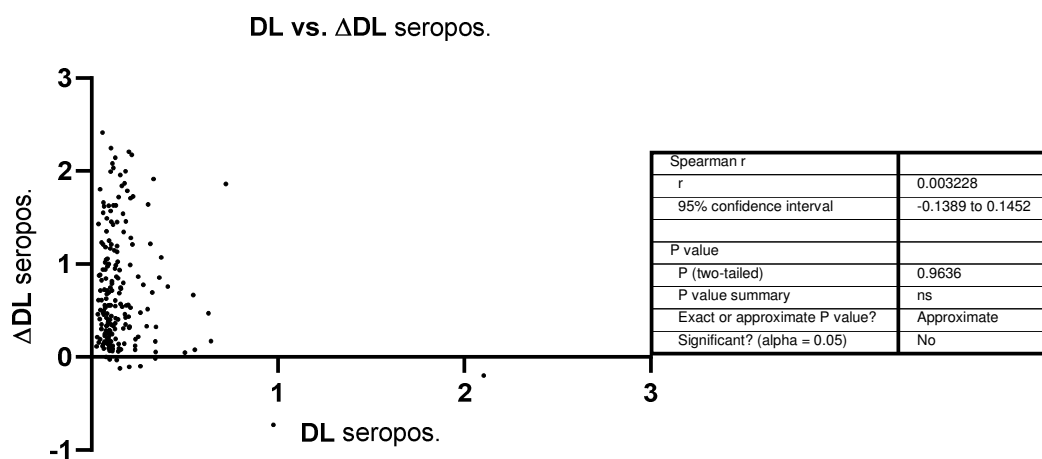
C



D



E



F

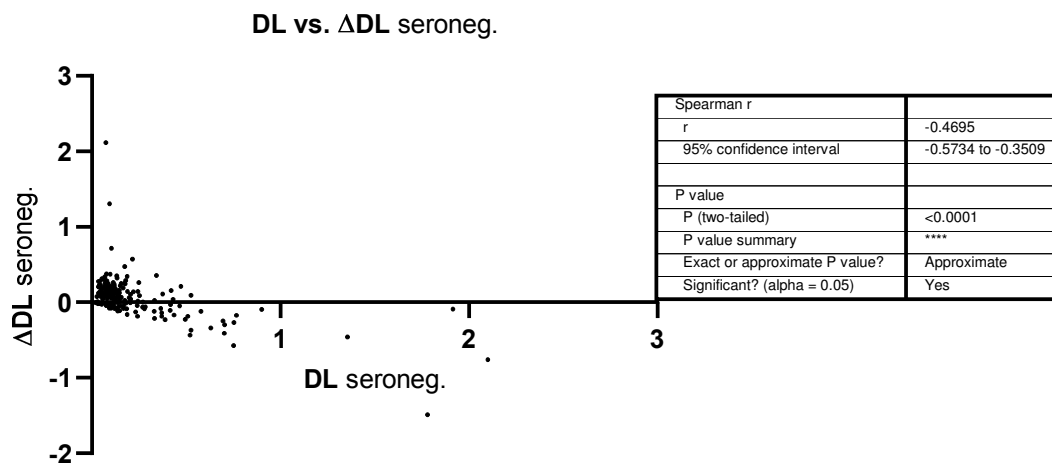


Figure 3. XY-Plot and Spearman Correlation of citrullinated or native α -hnRNP-DL_{mir} versus Δ hnRNP-DL_{mir} for the early RA cohort EIRA (A/D; n=404), the seropositive EIRA sera (B/E; n=202) and the seronegative EIRA sera (C/F; n=202).

Table 3. Spearman correlation of the early RA sera of the EIRA cohort (n=404). The results are given as R value (left of slash) with the corresponding p-value (right of slash).

parameter	RF IgM		CCP2		cit-DL		DL		ΔDL	
	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p
CCP2	0.7610	<0.0001								
cit-DL	0.6084	<0.0001	0.6811	<0.0001						
DL	NS		NS							
ΔDL	0.6573	<0.0001	0.7173	<0.0001						
CRP baseline	NS		NS		NS		NS		NS	
ESR baseline	0.2277	<0.0001	0.1960	<0.0001	0.1377	0.0055	NS	NS	0.1445	0.0036
SJC baseline	NS		NS		0.2053	0.0034	NS	NS	NS	
TJC baseline	NS		NS		NS		NS		NS	
pain VAS baseline	NS		NS		NS		NS		-0.1884	0.0079
global VAS baseline	NS		NS		NS		NS		NS	
HAQ baseline	NS		NS		NS		NS		-0.1545	0.0282
DA S28 baseline	NS		NS		NS		NS		NS	
DA S28CRP baseline	NS		NS		NS		NS		NS	
CRP 6 months	NS		NS		NS		NS		NS	
ESR 6 months	0.2221	<0.0001	0.2118	<0.0001	0.1401	0.0112	NS	NS	0.1801	0.0111
SJC 6 months	NS		NS		NS		NS		NS	
TJC 6 months	NS		NS		NS		NS		NS	
pain VAS 6 months	-0.1132	0.0401	-0.1346	0.0145	NS		NS		-0.1526	0.0470
global VAS 6 months	-0.1560	0.0045	-0.1235	0.0249	NS		NS		NS	
HAQ 6 months	-0.1311	0.0168	NS		NS		NS		NS	
DA S28 6 months	NS		NS		NS		NS		NS	
DA S28CRP 6 months	NS		NS		NS		NS		NS	
ΔCRP 6 months	NS		NS		NS		NS		NS	
ΔESR 6 months	-0.1754	0.0015	-0.1502	0.0065	NS		NS		-0.1933	0.0143
ΔSJC 6 months	NS		NS		NS		NS		-0.1281	0.0199
ΔTJC 6 months	NS		NS		NS		NS		NS	
Δpain VAS 6 months	-0.1311	0.0173	-0.1104	0.0454	NS		NS		NS	
Δglobal VAS 6 months	-0.1646	0.0027	NS		NS		NS		NS	
ΔHAQ 6 months	NS		NS		NS		NS		NS	
ΔDA S28 6 months	NS		NS		NS		NS		-0.1260	0.0235
ΔDA S28CRP 6 months	NS		NS		NS		NS		-0.1186	0.0337
symptdur	NS		0.1008	0.0429	NS		NS		NS	
Share d epitope	NS		0.3488	<0.0001	0.2397	<0.0001	NS		0.3050	<0.0001

cit-DL, α-citrullinated hRFNP-DL; DL, α-hRFNP-DL; ΔDL, difference between optical density of cit-DL and DL; RA, rheumatoid arthritis; RF, rheumatoid factor; CCP2, second generation anti-cyclic citrullinated peptide test; CRP, C-Reactive Protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; SJC, swollen joint count; TJC, tender joint count; VAS, visual analog scale; HAQ, Health Assessment Questionnaire Disability Index; DAS28, disease activity score-28; symptdur, symptom duration; seropos., RF IgM and/or α-CCP2 positive; seroneg., RF IgM and α-CCP2 negative; NS, not significant

Table 4. Spearman correlation of the 242 EIRA sera treated with MTX (α -CCP2 positive n=133, α -CCP2 negative n=109). The results are given as R value (left of slash) with the corresponding p-value (right of slash).

parameter	RF IgM	CCP2	cit-DL		DL		Δ DL	
			total	seropos.	total	seropos.	total	seropos.
CCP2	0.7644/<0.0001							
cit-DL	0.6248/<0.0001	0.7248/<0.0001						
DL	NS	NS						
Δ DL	0.8568/<0.0001	0.7281/<0.0001						
CRP base line	NS	0.1484/0.0209	NS	NS	NS	NS	-0.1274/0.0477	NS
ESR baseline	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SJC baseline	NS	NS	0.2007/0.0170	NS	NS	NS	NS	0.1765/0.0421
TJC base line	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
pain VA 5 baseline	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
global VA 5 baseline	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
HAQ base line	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DA S28 baseline	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DA S28CRP baseline	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CRP 6 months	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ESR 6 months	0.2062/0.0038	0.1795/0.0120	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SJC 6 months	NS	NS	-0.1569/0.0277	NS	NS	NS	NS	NS
TJC 6 months	NS	NS	NS	NS	-0.1634/0.0218	NS	NS	NS
pain VA 5 6 months	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0.2382/0.0248	NS
global VA 5 6 months	NS	NS	NS	NS	-0.1839/0.0052	NS	NS	-0.2622/0.0125
HAQ 6 months	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0.2194/0.0378
DA S28 6 months	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DA S28CRP 6 months	NS	NS	-0.1784/0.0133	NS	NS	NS	NS	-0.2683/0.0120
Δ CRP 6 months	NS	NS	NS	NS	-0.1630/0.0248	NS	NS	-0.2588/0.0155
Δ ESR 6 months	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Δ SJC 6 months	NS	NS	NS	NS	NS	-0.2233/0.0208	NS	NS
Δ TJC 6 months	NS	NS	-0.1955/0.0059	NS	-0.2085/0.0304	NS	NS	NS
Δ pain VA 5 6 months	NS	NS	NS	NS	-0.1488/0.0369	NS	NS	NS
Δ global VA 5 6 months	NS	-0.1511/0.0349	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Δ HAQ 6 months	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Δ DA S28 6 months	NS	NS	NS	NS	-0.1834/0.0109	NS	NS	NS
Δ DA S28CRP 6 months	NS	NS	NS	NS	-0.2086/0.0039	NS	NS	-0.2345/0.0283
symptdur	NS	0.1398/0.0297	0.1535/0.0169	NS	NS	0.1753/0.0435	NS	NS

cit-DL, α -citullinated hnRNP-DL_{opt}; DL, α -hnRNP-DL_{opt}; Δ DL, difference between optical density of cit-DL and DL; RA, rheumatoid arthritis; RF, rheumatoid factor; CCP2, second generation anti-cyclic citrullinated peptide test; CRP, C-Reactive Protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; SJC, swollen joint count; TJC, tender joint count; VAS, visual analog scale; HAQ, Health Assessment Questionnaire Disability Index; DAS28, disease activity score-28; **symptdur**, symptom duration; **seropos**, RF IgM and/or α -CCP2 positive; **seroneg**, RF IgM and α -CCP2 negative; NS, not significant

Table 5. Spearman correlation of the established RA sera of the Predict cohort (n=94; RF IgM and/or α-CCP2 positive n=64, RF IgM and α-CCP2 negative n=30). The results are given as R value (left of slash) with the corresponding p-value (right of slash).

parameter	RF IgM	CCP2	cit-DL		DL		ΔDL	
			total	seropos.	total	seropos.	total	seropos.
CCP2	0.7029/<0.0001							
cit-DL	0.2787/0.0065	0.4783/<0.0001						
DL	NS	NS						
ΔDL	0.3019/0.0031	0.4934/<0.0001						
CRP	0.2795/0.0070	0.2080/0.0490	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ESR	0.2175/0.0352	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SJC	NS	0.2934/0.0198	NS	NS	0.2399/0.0199	NS	NS	0.3014/0.0164
TJC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.2130/0.0392
VAS (doctor) base line	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
VAS (patient) base line	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
VAS (patient) pain baseline	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DAS base line	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CRP 6 months	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ESR 6 months	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SJC 6 months	NS	NS	NS	NS	-0.3481/0.0479	NS	NS	NS
TJC 6 months	-0.2408/0.0194	NS	NS	NS	NS	0.2559/0.0396	NS	NS
VAS (doctor) 6 months	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
VAS (patient) 6 months	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
VAS (patient) pain 6 months	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DAS 6 months	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ΔCRP 6 months	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ΔESR 6 months	-0.2162/0.0363	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ΔSJC 6 months	-0.2167/0.0359	NS	NS	NS	-0.2413/0.0191	NS	NS	-0.4670/0.0081
ΔTJC 6 months	-0.2593/0.0118	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ΔVAS 3 (doctor) 6 months	-0.2430/0.0183	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0.2832/0.1227
ΔVAS 5 (patient) 6 months	-0.2300/0.0258	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0.3423/0.0594
ΔVAS 5 (patient) pain 6 months	-0.2377/0.0211	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0.4053/0.0237
ΔDAS 6 months	-0.3128/0.0021	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
symptdur	0.2251/0.0292	NS	NS	NS	-0.4133/0.021	NS	NS	-0.4348/0.0145
ΔDp	0.2167/0.0359	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Response	0.3023/0.0031	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

cit-DL, α-citrullinated IgM; DL, α-IgM; ΔDL, difference between optical density of cit-DL and DL; RA, rheumatoid arthritis; RF, rheumatoid factor; CCP2, second generation anti-cyclic citrullinated peptide test; CRP, C-Reactive Protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; SJC, swollen joint count; TJC, tender joint count; VAS, visual analog scale; DAS28, disease activity score-28; symptdur, symptom duration; seropos, RF IgM and/or α-CCP2 positive; seroneg, RF IgM and/or α-CCP2 negative; NS, not significant

Table 6. ROC analysis of native hnRNP-DL_{mir} of MTX-treated EIRA patients (n=192; seropositive n=93, seronegative n=99)

Total n=192

Area under the ROC curve

Area	0.5893
Std. Error	0.05318
95% confidence interval	0.4850 to 0.6935
P value	0.1159

Data

Controls (DL_nonR)	31
Patients (DL_R)	161

	Sensitivity %	95% CI	Specificity %	95% CI	Likelihood Ratio
> 0.1540	42.86	35.47% to 50.58%	80.65	63.72% to 90.81%	2.214
> 0.1588	42.24	34.87% to 49.96%	80.65	63.72% to 90.81%	2.182
> 0.1630	41.61	34.28% to 49.34%	80.65	63.72% to 90.81%	2.150
> 0.1650	40.99	33.69% to 48.71%	80.65	63.72% to 90.81%	2.118
> 0.1678	40.37	33.10% to 48.09%	80.65	63.72% to 90.81%	2.086
> 0.1703	39.75	32.52% to 47.46%	80.65	63.72% to 90.81%	2.054
> 0.1718	39.13	31.93% to 46.84%	80.65	63.72% to 90.81%	2.022
> 0.1730	38.51	31.34% to 46.21%	80.65	63.72% to 90.81%	1.990
> 0.1748	37.89	30.76% to 45.58%	80.65	63.72% to 90.81%	1.958
> 0.1758	37.27	30.18% to 44.95%	80.65	63.72% to 90.81%	1.925
> 0.1768	36.65	29.60% to 44.32%	80.65	63.72% to 90.81%	1.893
> 0.1795	36.02	29.01% to 43.69%	80.65	63.72% to 90.81%	1.861
> 0.1830	35.40	28.44% to 43.05%	80.65	63.72% to 90.81%	1.829
> 0.1865	34.78	27.86% to 42.42%	80.65	63.72% to 90.81%	1.797
> 0.1935	34.16	27.28% to 41.78%	80.65	63.72% to 90.81%	1.765
> 0.1998	33.54	26.71% to 41.14%	80.65	63.72% to 90.81%	1.733
> 0.2020	32.92	26.13% to 40.50%	80.65	63.72% to 90.81%	1.701
> 0.2038	32.30	25.56% to 39.86%	80.65	63.72% to 90.81%	1.669
> 0.2048	32.30	25.56% to 39.86%	83.87	67.37% to 92.91%	2.002
> 0.2058	31.68	24.99% to 39.22%	83.87	67.37% to 92.91%	1.964
> 0.2068	30.43	23.85% to 37.93%	83.87	67.37% to 92.91%	1.887
> 0.2078	29.81	23.29% to 37.28%	83.87	67.37% to 92.91%	1.848
> 0.2088	29.19	22.72% to 36.63%	83.87	67.37% to 92.91%	1.810
> 0.2103	28.57	22.16% to 35.99%	83.87	67.37% to 92.91%	1.771
> 0.2120	27.95	21.59% to 35.33%	83.87	67.37% to 92.91%	1.733
> 0.2158	27.33	21.03% to 34.68%	83.87	67.37% to 92.91%	1.694
> 0.2200	26.71	20.48% to 34.03%	83.87	67.37% to 92.91%	1.656
> 0.2215	26.09	19.92% to 33.37%	83.87	67.37% to 92.91%	1.617
> 0.2283	25.47	19.36% to 32.71%	83.87	67.37% to 92.91%	1.579
> 0.2380	24.22	18.26% to 31.39%	83.87	67.37% to 92.91%	1.502
> 0.2428	23.60	17.71% to 30.73%	83.87	67.37% to 92.91%	1.463
> 0.2455	22.98	17.16% to 30.06%	83.87	67.37% to 92.91%	1.425
> 0.2480	22.36	16.61% to 29.40%	83.87	67.37% to 92.91%	1.386
> 0.2498	22.36	16.61% to 29.40%	87.10	71.15% to 94.87%	1.733
> 0.2513	22.36	16.61% to 29.40%	90.32	75.10% to 96.65%	2.311
> 0.2608	21.74	16.07% to 28.73%	90.32	75.10% to 96.65%	2.246
> 0.2703	21.12	15.52% to 28.06%	90.32	75.10% to 96.65%	2.182

> 0.2740	20.50	14.98% to 27.39%	90.32	75.10% to 96.65%	2.118
> 0.2780	19.88	14.45% to 26.71%	90.32	75.10% to 96.65%	2.054
> 0.2873	19.25	13.91% to 26.03%	90.32	75.10% to 96.65%	1.990
> 0.2983	18.63	13.38% to 25.35%	90.32	75.10% to 96.65%	1.925
> 0.3028	18.01	12.84% to 24.67%	90.32	75.10% to 96.65%	1.861
> 0.3148	17.39	12.32% to 23.99%	90.32	75.10% to 96.65%	1.797
> 0.3285	16.77	11.79% to 23.30%	90.32	75.10% to 96.65%	1.733
> 0.3323	16.15	11.27% to 22.61%	90.32	75.10% to 96.65%	1.669
> 0.3328	15.53	10.74% to 21.92%	90.32	75.10% to 96.65%	1.605
> 0.3378	14.91	10.23% to 21.22%	90.32	75.10% to 96.65%	1.540
> 0.3430	14.29	9.712% to 20.52%	90.32	75.10% to 96.65%	1.476
> 0.3445	13.66	9.200% to 19.82%	90.32	75.10% to 96.65%	1.412
> 0.3555	13.04	8.692% to 19.12%	90.32	75.10% to 96.65%	1.348
> 0.3683	12.42	8.187% to 18.41%	90.32	75.10% to 96.65%	1.284
> 0.3713	11.80	7.687% to 17.70%	90.32	75.10% to 96.65%	1.219
> 0.3800	11.18	7.190% to 16.98%	90.32	75.10% to 96.65%	1.155
> 0.3985	10.56	6.698% to 16.26%	90.32	75.10% to 96.65%	1.091
> 0.4133	9.938	6.210% to 15.53%	90.32	75.10% to 96.65%	1.027
> 0.4193	9.317	5.727% to 14.80%	90.32	75.10% to 96.65%	0.9627
> 0.4605	8.696	5.250% to 14.07%	90.32	75.10% to 96.65%	0.8986
> 0.5048	8.075	4.779% to 13.32%	90.32	75.10% to 96.65%	0.8344
> 0.5175	7.453	4.315% to 12.58%	90.32	75.10% to 96.65%	0.7702
> 0.5358	7.453	4.315% to 12.58%	93.55	79.28% to 98.85%	1.155
> 0.5495	6.832	3.858% to 11.82%	93.55	79.28% to 98.85%	1.059
> 0.5663	6.211	3.408% to 11.05%	93.55	79.28% to 98.85%	0.9627
> 0.6030	5.590	2.969% to 10.28%	93.55	79.28% to 98.85%	0.8665
> 0.6288	5.590	2.969% to 10.28%	96.77	83.81% to 99.83%	1.733
> 0.6663	4.969	2.539% to 9.498%	96.77	83.81% to 99.83%	1.540
> 0.7028	4.348	2.122% to 8.702%	96.77	83.81% to 99.83%	1.348
> 0.7125	3.727	1.719% to 7.891%	96.77	83.81% to 99.83%	1.155
> 0.7370	3.106	1.334% to 7.063%	96.77	83.81% to 99.83%	0.9627
> 0.7533	2.484	0.9703% to 6.213%	96.77	83.81% to 99.83%	0.7702
> 0.7605	1.863	0.5079% to 5.335%	96.77	83.81% to 99.83%	0.5776
> 0.8710	1.242	0.2207% to 4.416%	96.77	83.81% to 99.83%	0.3851
> 1.538	0.6211	0.03186% to 3.434%	96.77	83.81% to 99.83%	0.1925
> 2.102	0.000	0.000% to 2.330%	96.77	83.81% to 99.83%	0.000

seropositive n=93

Area under the ROC curve

Area 0.5308

Std. Error 0.08058

95% confidence interval 0.3728 to 0.6887

P value 0.7069

Data

Controls (DL_seropos_nonR) 15

Patients (DL_seropos_R) 78

	Sensitivity %	95% CI	Specificity %	95% CI	Likelihood Ratio
> 0.2058	29.49	20.52% to 40.38%	80.00	54.81% to 92.95%	1.474
> 0.2078	28.21	19.43% to 39.03%	80.00	54.81% to 92.95%	1.410

> 0.2088	26.92	18.34% to 37.68%	80.00	54.81% to 92.95%	1.346
> 0.2103	25.64	17.26% to 36.31%	80.00	54.81% to 92.95%	1.282
> 0.2153	24.36	16.19% to 34.94%	80.00	54.81% to 92.95%	1.218
> 0.2205	23.08	15.13% to 33.56%	80.00	54.81% to 92.95%	1.154
> 0.2283	21.79	14.08% to 32.16%	80.00	54.81% to 92.95%	1.090
> 0.2425	19.23	12.02% to 29.33%	80.00	54.81% to 92.95%	0.9615
> 0.2638	19.23	12.02% to 29.33%	86.67	62.12% to 97.63%	1.442
> 0.2863	17.95	11.00% to 27.90%	86.67	62.12% to 97.63%	1.346
> 0.2983	16.67	10.01% to 26.46%	86.67	62.12% to 97.63%	1.250
> 0.3028	15.38	9.026% to 24.99%	86.67	62.12% to 97.63%	1.154
> 0.3148	14.10	8.061% to 23.51%	86.67	62.12% to 97.63%	1.058
> 0.3285	12.82	7.115% to 22.02%	86.67	62.12% to 97.63%	0.9615
> 0.3373	11.54	6.191% to 20.50%	86.67	62.12% to 97.63%	0.8654
> 0.3430	10.26	5.289% to 18.95%	86.67	62.12% to 97.63%	0.7692
> 0.3445	8.974	4.415% to 17.38%	86.67	62.12% to 97.63%	0.6731
> 0.3770	7.692	3.573% to 15.78%	86.67	62.12% to 97.63%	0.5769
> 0.4545	6.410	2.769% to 14.14%	86.67	62.12% to 97.63%	0.4808
> 0.5230	5.128	2.012% to 12.46%	86.67	62.12% to 97.63%	0.3846
> 0.5495	3.846	1.048% to 10.71%	86.67	62.12% to 97.63%	0.2885
> 0.5903	2.564	0.4556% to 8.875%	86.67	62.12% to 97.63%	0.1923
> 0.6743	2.564	0.4556% to 8.875%	93.33	70.18% to 99.66%	0.3846
> 0.8483	1.282	0.06576% to 6.911%	93.33	70.18% to 99.66%	0.1923
> 1.540	0.000	0.000% to 4.694%	93.33	70.18% to 99.66%	0.000

seronegative n=99

Area under the ROC curve

Area	0.6423
Std. Error	0.06894
95% confidence interval	0.5072 to 0.7774
P value	0.0724

Data

Controls (DL_seroneg_nonR)	16
Patients (DL_seroneg_R)	83

	Sensitivity %	95% CI	Specificity %	95% CI	Likelihood Ratio
> 0.1365	50.60	40.06% to 61.09%	81.25	56.99% to 93.41%	2.699
> 0.1415	49.40	38.91% to 59.94%	81.25	56.99% to 93.41%	2.635
> 0.1458	48.19	37.76% to 58.78%	81.25	56.99% to 93.41%	2.570
> 0.1470	46.99	36.62% to 57.62%	81.25	56.99% to 93.41%	2.506
> 0.1490	45.78	35.49% to 56.45%	81.25	56.99% to 93.41%	2.442
> 0.1508	44.58	34.36% to 55.27%	81.25	56.99% to 93.41%	2.378
> 0.1520	42.17	32.12% to 52.91%	81.25	56.99% to 93.41%	2.249
> 0.1540	42.17	32.12% to 52.91%	87.50	63.98% to 97.78%	3.373
> 0.1608	40.96	31.01% to 51.71%	87.50	63.98% to 97.78%	3.277
> 0.1703	39.76	29.91% to 50.52%	87.50	63.98% to 97.78%	3.181
> 0.1748	38.55	28.81% to 49.31%	87.50	63.98% to 97.78%	3.084
> 0.1785	37.35	27.72% to 48.10%	87.50	63.98% to 97.78%	2.988
> 0.1850	36.14	26.63% to 46.88%	87.50	63.98% to 97.78%	2.892
> 0.1968	34.94	25.56% to 45.66%	87.50	63.98% to 97.78%	2.795

> 0.2058	33.73	24.48% to 44.42%	87.50	63.98% to 97.78%	2.699
> 0.2095	31.33	22.36% to 41.94%	87.50	63.98% to 97.78%	2.506
> 0.2168	30.12	21.31% to 40.69%	87.50	63.98% to 97.78%	2.410
> 0.2313	28.92	20.27% to 39.43%	87.50	63.98% to 97.78%	2.313
> 0.2428	27.71	19.23% to 38.16%	87.50	63.98% to 97.78%	2.217
> 0.2455	26.51	18.20% to 36.89%	87.50	63.98% to 97.78%	2.120
> 0.2480	25.30	17.19% to 35.60%	87.50	63.98% to 97.78%	2.024
> 0.2505	25.30	17.19% to 35.60%	93.75	71.67% to 99.68%	4.048
> 0.2608	24.10	16.17% to 34.31%	93.75	71.67% to 99.68%	3.855
> 0.2703	22.89	15.17% to 33.01%	93.75	71.67% to 99.68%	3.663
> 0.2750	21.69	14.18% to 31.70%	93.75	71.67% to 99.68%	3.470
> 0.3058	20.48	13.20% to 30.38%	93.75	71.67% to 99.68%	3.277
> 0.3328	19.28	12.23% to 29.04%	93.75	71.67% to 99.68%	3.084
> 0.3493	18.07	11.27% to 27.70%	93.75	71.67% to 99.68%	2.892
> 0.3683	16.87	10.32% to 26.34%	93.75	71.67% to 99.68%	2.699
> 0.3713	15.66	9.388% to 24.98%	93.75	71.67% to 99.68%	2.506
> 0.3800	14.46	8.468% to 23.59%	93.75	71.67% to 99.68%	2.313
> 0.4033	13.25	7.564% to 22.19%	93.75	71.67% to 99.68%	2.120
> 0.4193	12.05	6.678% to 20.78%	93.75	71.67% to 99.68%	1.928
> 0.4648	10.84	5.810% to 19.34%	93.75	71.67% to 99.68%	1.735
> 0.5175	9.639	4.965% to 17.88%	93.75	71.67% to 99.68%	1.542
> 0.5525	9.639	4.965% to 17.88%	100.0	80.64% to 100.0%	
> 0.6048	8.434	4.145% to 16.40%	100.0	80.64% to 100.0%	
> 0.6663	7.229	3.355% to 14.89%	100.0	80.64% to 100.0%	
> 0.7028	6.024	2.600% to 13.34%	100.0	80.64% to 100.0%	
> 0.7280	4.819	1.890% to 11.75%	100.0	80.64% to 100.0%	
> 0.7533	3.614	0.9852% to 10.10%	100.0	80.64% to 100.0%	
> 0.7605	2.410	0.4281% to 8.366%	100.0	80.64% to 100.0%	
> 1.434	1.205	0.06180% to 6.514%	100.0	80.64% to 100.0%	

Table 7. Negative CN_{DL}-index of MTX-treated EIRA patients n=192 (Resp. n=161, non-Resp. n=31)

ΔDL_Responder N=27	ΔDL_nonResponder N=4
-0.759	-0.3705
-0.729	-0.199
-0.5745	-0.1225
-0.41	-0.032
-0.3395	
-0.3	
-0.27	
-0.2325	
-0.2145	
-0.186	
-0.184	
-0.175	
-0.14	
-0.118	
-0.091	
-0.0835	
-0.08	
-0.0765	
-0.0635	
-0.0435	
-0.032	
-0.024	
-0.0185	
-0.0155	
-0.0145	
-0.0095	
-0.007	

Cutoff = -0.2010 → 33% Sensitivity/ 75% Specificity

Cutoff = -0.3710 → 15% Sensitivity/ 100% Specificity

Table 8. ROC analysis of native hnRNP-DL_{mir} of Enbrel®-treated Predict patients (n=94; seropositive n=63, seronegative n=31)

Total n=192

Area under the ROC curve

Area	0.5246
Std. Error	0.06190
95% confidence interval	0.4033 to 0.6459
P value	0.6995

Data

Controls (DL_nonR)	31
Patients (DL_R)	63

	Sensitivity %	95% CI	Specificity %	95% CI	Likelihood Ratio
> 0.1118	23.81	14.99% to 35.64%	80.65	63.72% to 90.81%	1.230
> 0.1153	22.22	13.73% to 33.91%	80.65	63.72% to 90.81%	1.148
> 0.1178	22.22	13.73% to 33.91%	83.87	67.37% to 92.91%	1.378
> 0.1213	20.63	12.48% to 32.17%	83.87	67.37% to 92.91%	1.279
> 0.1245	19.05	11.25% to 30.41%	83.87	67.37% to 92.91%	1.181
> 0.1270	19.05	11.25% to 30.41%	87.10	71.15% to 94.87%	1.476
> 0.1308	17.46	10.04% to 28.62%	87.10	71.15% to 94.87%	1.353
> 0.1358	17.46	10.04% to 28.62%	90.32	75.10% to 96.65%	1.804
> 0.1443	15.87	8.857% to 26.81%	90.32	75.10% to 96.65%	1.640
> 0.1558	12.70	6.577% to 23.11%	90.32	75.10% to 96.65%	1.312
> 0.1638	12.70	6.577% to 23.11%	93.55	79.28% to 98.85%	1.968
> 0.1703	12.70	6.577% to 23.11%	96.77	83.81% to 99.83%	3.937
> 0.1740	12.70	6.577% to 23.11%	100.0	88.97% to 100.0%	
> 0.1985	9.524	4.438% to 19.26%	100.0	88.97% to 100.0%	
> 0.2263	7.937	3.438% to 17.27%	100.0	88.97% to 100.0%	
> 0.2373	6.349	2.497% to 15.22%	100.0	88.97% to 100.0%	
> 0.2515	4.762	1.298% to 13.09%	100.0	88.97% to 100.0%	
> 0.2753	3.175	0.5641% to 10.86%	100.0	88.97% to 100.0%	
> 0.2930	1.587	0.08142% to 8.459%	100.0	88.97% to 100.0%	

seropositive n=63

Area	0.5785
Std. Error	0.08150
95% confidence interval	0.4187 to 0.7382
P value	0.3515

Data

Controls (DL_seropos_nonR)	16
Patients (DL_seropos_R)	47

Sensitivity %	95% CI	Specificity %	95% CI	Likelihood Ratio
---------------	--------	---------------	--------	------------------

< 0.02575	2.128	0.1091% to 11.11%	100.0	80.64% to 100.0%	
< 0.02625	4.255	0.7561% to 14.25%	100.0	80.64% to 100.0%	
< 0.02800	6.383	2.195% to 17.16%	100.0	80.64% to 100.0%	
< 0.03025	6.383	2.195% to 17.16%	93.75	71.67% to 99.68%	1.021
< 0.03375	8.511	3.359% to 19.93%	93.75	71.67% to 99.68%	1.362
< 0.03700	8.511	3.359% to 19.93%	87.50	63.98% to 97.78%	0.6809
< 0.03775	12.77	5.985% to 25.17%	87.50	63.98% to 97.78%	1.021
< 0.03850	14.89	7.407% to 27.69%	87.50	63.98% to 97.78%	1.191
< 0.03925	17.02	8.886% to 30.14%	87.50	63.98% to 97.78%	1.362
< 0.03975	19.15	10.42% to 32.54%	87.50	63.98% to 97.78%	1.532
< 0.04225	21.28	11.99% to 34.90%	87.50	63.98% to 97.78%	1.702
< 0.04725	23.40	13.60% to 37.22%	87.50	63.98% to 97.78%	1.872
< 0.05075	25.53	15.25% to 39.51%	87.50	63.98% to 97.78%	2.043
< 0.05200	25.53	15.25% to 39.51%	81.25	56.99% to 93.41%	1.362
< 0.05275	27.66	16.94% to 41.76%	81.25	56.99% to 93.41%	1.475
< 0.05375	31.91	20.40% to 46.17%	81.25	56.99% to 93.41%	1.702
< 0.05475	34.04	22.17% to 48.33%	81.25	56.99% to 93.41%	1.816

seronegative n=31

Area under the ROC curve

Area	0.6479
Std. Error	0.1014
95% confidence interval	0.4493 to 0.8466
P value	0.1605

Data

Controls (DL_seroneg_nonR)	15
Patients (DL_seroneg_R)	16

	Sensitivity %	95% CI	Specificity %	95% CI	Likelihood Ratio
> 0.08225	50.00	28.00% to 72.00%	80.00	54.81% to 92.95%	2.500
> 0.08475	43.75	23.10% to 66.82%	80.00	54.81% to 92.95%	2.188
> 0.09550	43.75	23.10% to 66.82%	86.67	62.12% to 97.63%	3.281
> 0.1065	37.50	18.48% to 61.36%	93.33	70.18% to 99.66%	5.625
> 0.1143	31.25	14.16% to 55.60%	93.33	70.18% to 99.66%	4.688
> 0.1233	25.00	10.18% to 49.50%	93.33	70.18% to 99.66%	3.750
> 0.1320	25.00	10.18% to 49.50%	100.0	79.61% to 100.0%	
> 0.1560	18.75	6.592% to 43.01%	100.0	79.61% to 100.0%	
> 0.1985	12.50	2.221% to 36.02%	100.0	79.61% to 100.0%	
> 0.2263	6.250	0.3206% to 28.33%	100.0	79.61% to 100.0%	

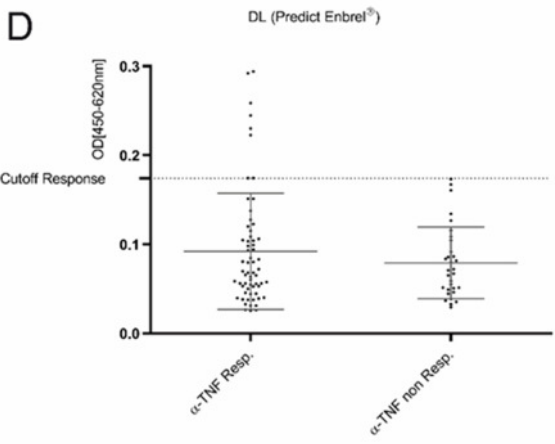
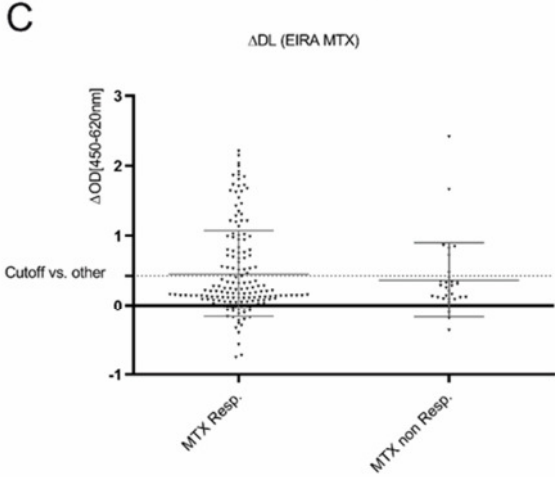
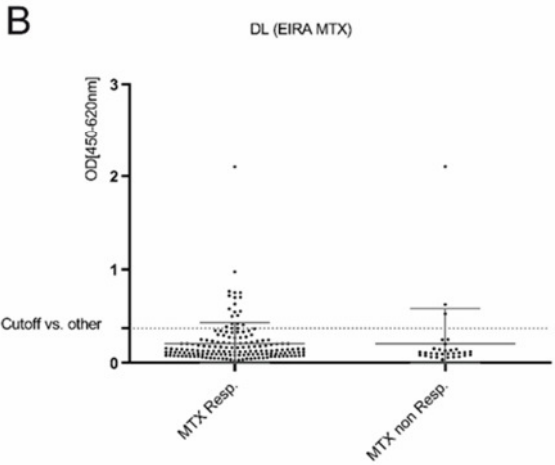
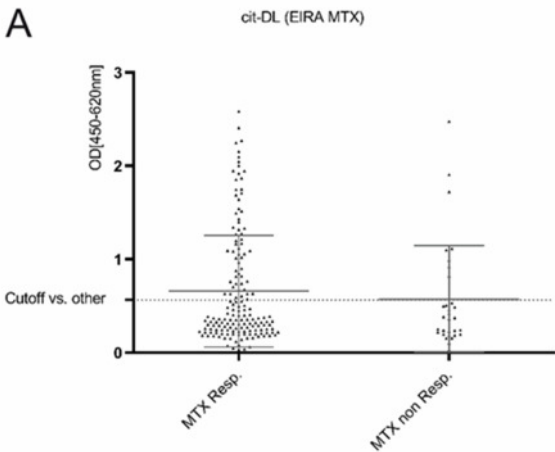


Figure 4. High baseline titer against α -hnRNP-DL_{mir} (DL) is rather present in 6-month EULAR Responder RA patients who had received MTX or α -TNF inhibitor therapy (Enbrel®). **A-C**, Citrullinated α -hnRNP-DL_{mir} (citDL) (**A**), α -hnRNP-DL_{mir} (DL) (**B**) and Δ OD between citDL and DL (Δ DL) (**C**) were measured by ELISA in patient sera from the EIRA cohort treated with MTX (n=192) with 161 EULAR Responder and 31 EULAR non-Responder among 6 months. The evaluation was done according to the cutoff versus other diseases. **D**, α -DL were measured by ELISA in patient sera from the Predict cohort treated with α -TNF inhibitor therapy with 6-month EULAR response data (n=94, responder n=63, non-Responder n=31). Based on the signals, a response-cutoff (dotted line, OD 0.174) was determined, from which only responders are recognized as positive. OD, optical density; nm, nano meter; RA, rheumatoid arthritis; SLE, systemic lupus erythematosus; MTX, Methotrexate; Resp., 6-month EULAR Responder

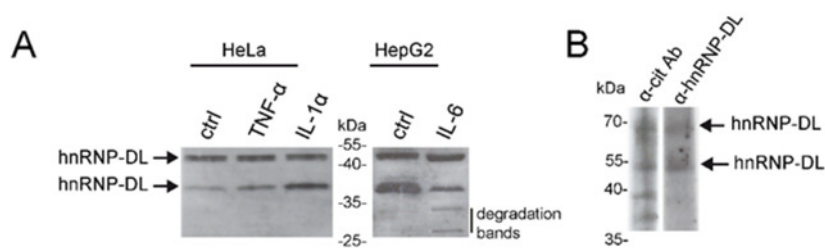


Figure 5. A, Influence of cytokines on hnRNP-DL expression determined by immunoblotting. Cellular extracts from unstimulated, IL1 α - or TNF α -stimulated HeLa cells and from unstimulated and IL6-stimulated HepG2 cells were probed with α -hnRNP-DL1/2-peptide specific rabbit serum. B, Citrullination of hnRNP-DL in synovial tissue from a patient with rheumatoid arthritis was investigated with an α -deiminated arginine antibody and an α -hnRNP-DL antibody. Both positive bands were labeled with hnRNP-DL, which isoforms were not analysed.

REFERENCES

1. Needleman, S.B. and C.D. Wunsch, *A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins.* J Mol Biol, 1970. **48**(3): p. 443-53.

ANTIGENS

Antigen	Autoantigen	Disease	Reference	PMID	Number of patients reactive (n=26)	Sum of filter spots detected	Averaged intensity per filter spot
PEC1_Peroxisc	Yes	Renal cell carcinoma	Matthew et al. 1999	PMID: 10508479	4	22	523,06
HNRNPDL	(H) Yes	SLE	Chang et al. 1999	PMID: 23642268	5	20	497,60
NT5C2_Cytos	No				4	8	470,13
ANKS6_Ankyr	No				9	18	323,46
STMN4_Stath	No				10	50	283,28
ZNF133_Zinc f	No				4	12	276,58
RPL14_60S rIt	Yes	SLE	Hasegawa et al. 2002	PMID: 12051391	5	18	271,43
ZNF91_Zinc fi	No				4	14	259,61
HIST1H1C_His	Yes	Rheumatic disease , Scleroderma, Connective tissue disease	Elkayam et al. 2005	PMID: 16040336	4	8	248,13
HDACS_Histo	Yes	Cancer	Chan et al. 2010	PMID: 19795454	7	24	214,73
RPL21_60S rIt	No				11	40	208,77
PTN_PleiotroI	No				7	27	206,86
MTA1_Metas	No				6	18	183,00
MAZ_Myc-associated zinc finger protein (MAZ)	Cancer		Battaller et al. 2003	PMID: 12509857	11	52	182,27
BCL11A_B-ce	No				4	8	181,93
BCL11B_B-ce	No				4	10	178,98
DIS3L2_DIS3	No				6	12	152,82
ZNF358_Zinc f	No				5	10	143,82
FTH1_Ferritin	Yes	Takayasu arteritis	Große et al. 2014	PMID: 25178778	5	20	101,58
TRIO_Triple fi	No				4	10	70,80

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

- **Marklein, B.**; Jennings, M.; Konthur, Z.; Häupl, T.; Welzel, F.; Nonhoff, U.; Krobtsch, S.; Mulder, D.M.; Koenders, M.I.; Joshua, V.; Cope, A.P.; Shlomchik, M.J.; Anders, H.J.; Burmester, G.R.; Hensvold, A.; Catrina, A.I.; Rönnelid, J.; Steiner, G.; Skriner, K., The citrullinated/native index of autoantibodies against hnRNP-DL predicts an individual "window of treatment success" in RA patients. *Arthritis Res Ther* **2021**, 23 (1), 239.

<https://doi.org/10.1186/s13075-021-02603-x>

Impact-Faktor: 5.156

- Jennings, M.; **Marklein, B.**; Ytterberg, J.; Zubarev, R. A.; Joshua, V.; van Schaardenburg, D.; van de Stadt, L.; Catrina, A. I.; Nonhoff, U.; Häupl, T.; Konthur, Z.; Burmester, G. R.; Skriner, K., Bacterial citrullinated epitopes generated by *Porphyromonas gingivalis* infection-a missing link for ACPA production. *Ann Rheum Dis* **2020**, 79 (9), 1194-1202.

<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216919>

Impact-Faktor: 19.103

- Lloyd, K. A.; Wigerblad, G.; Sahlström, P.; Garimella, M. G.; Chemin, K.; Steen, J.; Titcombe, P. J.; **Marklein, B.**; Zhou, D.; Stålesen, R.; Ossipova, E.; Lundqvist, C.; Ekwall, O.; Rönnelid, J.; Mueller, D. L.; Karlsson, M. C. I.; Kaplan, M. J.; Skriner, K.; Klareskog, L.; Wermeling, F.; Malmström, V.; Grönwall C., Differential ACPA Binding to Nuclear Antigens Reveals a PAD-Independent Pathway and a Distinct Subset of Acetylation Cross-Reactive Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* **2019**, 9, 3033.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03033>

Impact-Faktor: 5.085

Danksagung

Diese Arbeit entstand im Rheumatologischen Forschungslabor, unter der Leitung von Dr. Karl Skriner. Ihm gilt mein ausdrücklicher Dank für die Idee und Überlassung dieses interessanten Themas, die wertvollen Ratschläge und seinen fortwährenden Enthusiasmus, der mich für die Rheumaforschung begeistert hat.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Gerd R. Burmester für die Funktion als Erstbetreuer.

Für die Funktion als Zweitbetreuer danke ich Dr. Thomas Häupl und für die angenehme Zusammenarbeit, Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Dr. Madeleine Jenning für die vielen kompetenten Gespräche und Anregungen und vor allem für ihre Hilfsbereitschaft, ihr Engagement sowie die persönliche, angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken, die wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Ehemann, der mich stets motiviert, mir Kraft und Rückhalt gegeben und viel Verständnis aufgebracht hat und damit diese Arbeit überhaupt ermöglicht hat.