

Einleitung

Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist die häufigste entzündliche rheumatische Erkrankung. Die Diagnosestellung ist mitunter schwierig, da innerhalb des sogenannten rheumatischen Formenkreises (Morbus Bechterew, Sjögren Syndrom, Polymyositis, systemische Sklerose, Psoriasis-Arthritis, Osteoarthritis u.a.) die Leitsymptome dieser ansonsten sehr heterogenen Gruppe der Schmerz und die Gelenkschwellung sind und zumindest in den Frühstadien leicht Verwechslungen mit anderen rheumatischen Krankheiten auftreten können. Daher ist für die RA ein Kriterienkatalog erstellt worden, um dem Problem wenigstens teilweise entgegenzuwirken. Die von dem American College of Rheumatology (ACR) herausgegebenen Kriterien dienen heute weltweit zur Klassifikation der rheumatoiden Arthritis. Zur Zeit ist der Rheumafaktor (RF) der einzige serologische Parameter für RA, der hier verankert ist ¹. Der RF kann bei ca. 60-70% der RA-Patienten nachgewiesen werden, aber auch bei bis zu 19% der Patienten mit anderen systemisch rheumatischen Erkrankungen ². Der RF-Test muß so eingestellt werden, daß maximal 5% der Gesunden RF-positiv sind. RF-positiv und -negativ bedeutet die Anwesenheit bzw. Abwesenheit von IgM RF. Dennoch ist der Rheumafaktor möglicherweise nicht ursächlich für die RA, und seine Qualitäten als Maß für die Schwere der Erkrankung sind fraglich ^{3,4}. Es gibt aber immer wieder Ansätze, dem Rheumafaktor in der Pathogenese der RA eine Bedeutung zukommen zu lassen. So wird unter anderem betont ⁵, daß nur in der RA hochtitrige und hochaffine Rheumafaktoren auftreten, während natürlich vorkommende von niedrigerer Affinität seien. Dabei werden aber Infektionen und andere Autoimmunerkrankungen außer acht gelassen, denn bei einigen Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis wie z.B. SLE oder dem Sjögren-Syndrom treten ebenfalls hochtitrige und -affine Rheumafaktoren auf. Ferner wird auf eine Untersuchung verwiesen, nach der die wirklich relevanten Rheumafaktoren nicht frei im Serum vorkommen, sondern vermutlich sofort Immunkomplexe bilden, die als solche erkannt und internalisiert werden und damit möglicherweise doch pathogenes Potential besitzen ⁵. Da aber der Nachweis an sezernierenden B-Zellen geführt wurde, sind diese Ergebnisse nicht mit herkömmlichen Daten zum Rheumafaktor vergleichbar, da dieser in verdünntem Serum ermittelt wird.

Pathogenese und Krankheitsverlauf

Nach dem heutigen Stand der Kenntnisse ist die rheumatoide Arthritis eine systemische Erkrankung des Bindegewebes, die besonders die Gelenke befällt. Für die Pathogenese der RA ist ein auslösendes Agens unbekannt. Der Krankheitsverlauf der RA beginnt oft mit einer akuten exsudativen Entzündung der Synovialis. Die gesunde Synovialmembran ist normalerweise glatt und besteht aus einer bis wenigen Zellschichten, während sich das entzündete, granuläre Gewebe auf das Vielfache verdicken kann. Mit diesen Veränderungen ist das Vollbild der Synovitis erreicht: Aktivierung der eingewanderten Makrophagen, Aktivierung des Komplementsystems und lymphoides Infiltrat ⁶. Meistens folgt die Proliferation granulären Gewebes (Pannus), beginnend am Übergang zwischen

Perichondrium zu Gelenkknorpel. In die Gelenkflüssigkeit eingewanderte Entzündungszellen (Neutrophile) tragen über Ausschüttung lysosomaler Enzyme, Hydrolasen, Kollagenasen und eines breiten Spektrums lymphotroper Faktoren zur irreversiblen Degradierung des Knorpels bei. Der Pannus breitet sich aus und infiltrierte den darunter befindlichen Knochen. Begünstigt durch eine abnehmende Viskosität der Synovialflüssigkeit und nicht zuletzt durch Bewegungsschmerz induzierte Ruhigstellung der Gelenke, kann es in den Endstadien zu einer vollständigen Zerstörung oder auch zu einer Verknöcherung (Ankylose) des Gelenkes kommen.

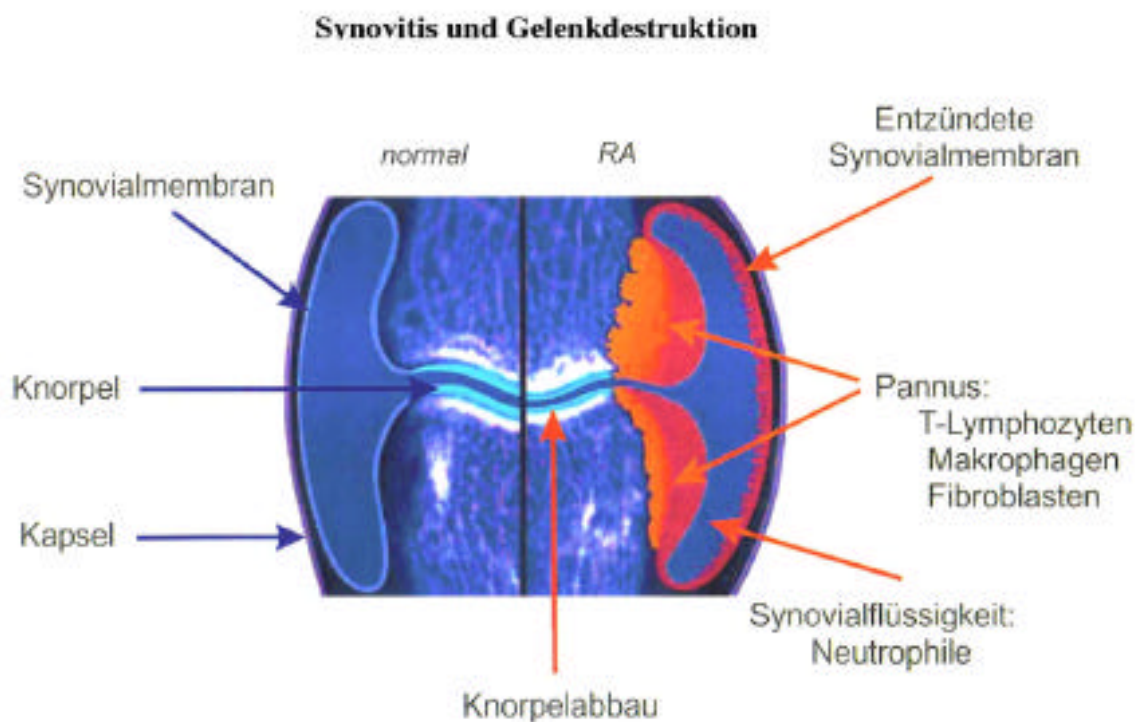


Abb. 1: Darstellung eines Gelenkes.

links: Normalzustand

rechts: Synovitis und Gelenkdestruktion als häufige Begleiterscheinungen der RA

Die betroffenen Patienten müssen lebenslang therapiert werden, um ihnen die Auswirkungen der Erkrankung zu erleichtern. Nicht selten kommt es zu einer frühzeitigen Invalidität. Neben den individuellen Einschränkungen der Lebensqualität der Patienten entstehen für das Gesundheitswesen enorme Kosten, da ca. 1% der Bevölkerung an der RA leiden. Eine frühzeitige Diagnose der RA und daraufhin eingeleitete Medikation und Bewegungstherapie ermöglichen in den meisten Fällen die Erhaltung der mechanischen Beweglichkeit der Gelenke, beeinflussen die Schmerzempfindlichkeit positiv und sind somit durch die erzielte geringere Behinderung für den Patienten von höchstem Nutzen. Die schweren sozioökonomischen Folgen der Erkrankung (Schmerz und Invalidität bis zur

Berufsunfähigkeit der Patienten einerseits und hohe Behandlungskosten von insgesamt 9Mrd Euro jährlich in Deutschland) erfordern eine intensive Erforschung der Ursachen der RA ^{7,8}.

Autoreaktive Heterogenität der RA

Humane Leukozyten-Antigene (HLA) sind in dem Hauptgewebeverträglichkeitskomplex (MHC) auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 kodiert. Eine Gruppe von Antigenen, zusammengefaßt als Klasse II, wird hauptsächlich auf Makrophagen, B- oder T-Zellen, antigenpräsentierenden und Endothel-Zellen exprimiert. Sie dienen, wie auch Klasse I-Antigene, der Präsentation von Antigenfragmenten (Peptiden) an T-Zellen, die mittels ihrer T-Zellrezeptoren das Antigen nur im Zusammenhang mit dem HLA erkennen können. Genetische Prädisposition hat einen Einfluß auf die Manifestation systemisch rheumatischer Erkrankungen. Das gilt auch für die RA, da 55% der RA-Patienten das HLA-DR4-Antigen tragen ⁹. In der gesunden Bevölkerung tritt DR4 zu 30-40% auf, so daß für DR4-Individuen das Risiko, an RA zu erkranken, um einen Faktor zwei erhöht ist. Die Subtypisierung von DR4 erbrachte, daß nur Dw4 und Dw14 mit RA assoziiert sind, wobei letzteres noch umstritten ist ¹⁰. Dies gilt auch für HLA-DR1 ^{11,12}. Das Vorkommen der gleichen genetischen Sequenz auf verschiedenen Allelen schreibt man Genkonversionsereignissen zu ¹³. Daraus wurde die "shared epitope"-Hypothese abgeleitet ^{14,15,16}. Danach wird angenommen, daß bestimmte MHC-II-Moleküle in der Lage sind, krankheitsinduzierende Peptide zu binden sowie den T-Zellen zu präsentieren und damit Autoimmunerkrankungen zu ermöglichen ¹⁷. Für die RA-assoziierten HLA-19 Allele DRB1*0101, *0102, *0404, *0405 und *0408 wurde eine strukturelle Gemeinsamkeit gefunden, die auf die Aminosäuresequenz QRRAA in der dritten hypervariablen Region des HLA-II-Moleküls beruht. Diese Homologien liegen in der peptidbindenden Gruppe des HLA-II-Moleküls. Geringfügige Variation findet man bei DRB1*0401 (QKRAA) und DRB1*1001 (RRRAA) [28]¹⁸. Andere Nebengruppen von HLA-DRB1*04, die nicht für eine der drei Aminosäuresequenzen kodieren, beispielsweise HLA-DRB1*0402 und *0403, sind auch nicht mit der RA assoziiert. Allerdings kodieren noch weitere Gene für ein „shared epitope“, z.B. HLA-DRB1*0409, -*10 und -*13, und sind nicht mit der Erkrankung assoziiert. Gleichwohl sind die Häufigkeiten dieser Nebengruppen unter der Bevölkerung geringer, um eine solche Assoziation zu belegen. Zudem gibt es ebenfalls Individuen, die kein solches „shared epitope“ tragen, aber trotzdem an der RA erkranken. Diese Theorie kann im Zusammenhang mit der RA nicht schlüssig bestätigt werden und wird somit auch in Frage gestellt ¹⁹. Daher muß man zusätzliche Faktoren annehmen, welche die Entstehung der RA beeinflussen.

Heute wird angenommen, daß es sich bei der RA um eine Autoimmunerkrankung handelt. Autoimmunerkrankungen lassen sich im weitesten Sinne als eine Fehlregulation des Immunsystems beschreiben, wobei sowohl das B-Zell- als auch T-Zell-Repertoire betroffen sind. Die Aktivität des Immunsystems durchbricht die in einem gesunden Körper bestehende Selbsttoleranz und attackiert körpereigene Organe und Gewebe. Die Ursachen dieser entgleisenden Prozesse sind noch lange nicht geklärt.

B-Zell-Autoreaktivität

Ob Autoantikörper und damit auch B-Zellen eine tragende Rolle in der Pathogenese der RA spielen, oder nur eine Begleiterscheinung der T-Zellreaktivität sind, ist noch Gegenstand von Diskussionen. Eine B-Zell-Therapie mit -CD20-Antikörpern führt bei einigen RA-Patienten zu einer Besserung der Erkrankung. Gesunde Menschen weisen auch Autoantikörper gegen verschiedene Autoantigene in verschiedener, meist niedrigtitriger, Konzentration auf. Es wurde zum Beispiel bereits auf die physiologische Rolle der Rheumafaktoren beim Abbau von Immunkomplexen verwiesen. Hier gibt es eine verbesserte Aufnahme von Immunkomplexen durch RF-exprimierende B-Zellen, die damit das in den Immunkomplexen enthaltene Antigen prozessieren können. Daher wurde 1998 die Frage zur Diskussion gestellt, ob alle bisher beschriebenen Autoantikörper, individuell bewertet, als „Epiphänomen“ bei der RA zu bezeichnen seien, da für keinen ein eindeutiger pathognomonischer Beweis geliefert werden konnte. Autoantikörper spielen jedoch eine weitaus größere Rolle als nur eine einfache Nebenerscheinung, da viele von ihnen mit der Prognose oder der Aktivität der RA assoziiert sind²⁰. Die bekannten RA-assoziierten Autoreaktivitäten sind aber nicht bei allen RA-Patienten vorhanden und keine kommt ausschließlich bei der RA vor. Die Sensitivitäten und die Spezifitäten liegen für alle bekannten Autoreaktivitäten deutlich unter 100%. Aus diesem Grund wurde oft angenommen, daß RA aus verschiedenen immunologischen und klinischen Untergruppen besteht²¹.

Trotzdem korreliert keine der Autoreaktivitäten mit dem klinischen Bild der Erkrankung. Der klinisch ausgeprägten Heterogenität der RA in Befallsmuster, Intensität der Entzündung und schubweisem Verlauf steht eine Heterogenität der immunologisch fehlregulierten Prozesse gegenüber²². In der Gegenwart setzt sich daher zunehmend die Erkenntnis durch, daß als Auslöser der RA nicht eine einzelne Autoreaktivität in Frage kommt^{23,24,25}. Die Verschiebung des Immunsystems bei der RA von einem gesundem zu einem autoimmunen Zustand, ist Ursache der heterogenen klinischen Ausprägung der Erkrankung, deren Symptome entweder gleichzeitig oder in verschiedener Reihenfolge auftreten können. Der immunologische Hintergrund der rheumatoiden Arthritis erinnert an vielen Stellen dem, was ursprünglich als "Immunologischer Homunculus" beschrieben wurde²⁶. In Anlehnung daran wurde der Begriff Immunomics bei der RA definiert. Er sagt aus, daß nicht nur eine Autoreaktivität die Autoimmunerkrankung RA unterhält, sondern Kombinationen aus verschiedenen Autoreaktivitäten, die zu verschiedenen Zeitpunkten der Erkrankung auftreten und unterschiedlich vorhanden sein können²⁷. Ein prinzipieller Gewinn an Spezifität bei Kombinationen verschiedener Antikörpertests wurde von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen beschrieben^{28,29}. Eine weitere erreichte bei Kombination zweier unterschiedlich gemessener Antikörperreaktivitäten eine höhere Spezifität für die RA als im Einzeltest³⁰. Es wurden z.B. bei RA-Patienten Rheumafaktoren und Antikörper gegen citrullinierte Peptide getestet. Bei einer Kombination beider Autoantikörperreaktivitäten ließ sich ebenfalls eine höhere RA-Spezifität als in den einzelnen Tests feststellen, jedoch auf Kosten der Sensitivität³¹. Das Auftreten mehrerer Autoantikörper bei Patienten mit früher RA wurde beschrieben und die Spezifität für die RA konnte gegenüber dem Einzeltest durch Kombination von zwei Autoantikörperreaktivitäten gesteigert werden³².

Zur Zeit sind mindestens 15 verschiedene Autoreaktivitäten bekannt, die RA-assoziiert auftreten. Man kann sie nach folgenden Kriterien sortieren:

- Xenogene Antigene
- Autoantigene, die gelenkspezifisch vorkommen
- ubiquitäre Autoantigene.

Zur weiteren Erhöhung der Sensitivität und Spezifität bei der Diagnose der RA sollten zunächst die Antikörperreaktivitäten der ubiquitären Autoantigene und ihre Kombinationen untereinander näher betrachtet werden.

T-Zell-Autoreaktivität

Typisch für eine Autoimmunerkrankung ist, daß eine kontinuierliche Interaktion zwischen Autoantigen-reaktiven T-Zellen und Gewebe-APCs (Antigenpräsentierende Zellen) stattfindet³³. Man geht davon aus, daß autoantigen-reaktive T-Zellen, die durch autoantigen-präsentierende APCs stimuliert werden, Zytokine freisetzen, welche die Antigenpräsentations-Funktion aufrechterhalten. Hier spielen im wesentlichen IFN- (Interferon-), TNF- (Tumornekrosefaktor), IL-1 (Interleukin-1) und IL-6 (Interleukin-6) eine Rolle. Einen antagonistischen Effekt ruft das IL-10 (Interleukin-10) hervor. Es hemmt die MHC Klasse II-abhängige Antigenpräsentation der Monozyten, die T-Zell-Proliferation und die Zytokin-Produktion der T-Zellen, spielt aber demgegenüber eine proliferationsfördernde Rolle in der Angiogenese³⁴. Die Zusammensetzung und jeweilige Konzentration der Zytokine kann abhängig von der T-Zell-Stimulation sehr unterschiedlich sein und somit auch verschiedene Effekte hervorrufen. Viele Zusammenhänge auf dieser Ebene sind noch unbekannt. Bisher sind drei T-Zell-Zytokinmuster für die RA beschrieben worden, die mit verschiedenen histologischen Bildern der synovialen Entzündung assoziiert sind³⁵. Eine diffuse Synovitis korrelierte mit Th0 Zytokinen, eine mit lymphfollikel-ähnlichen Keimzentren mit einem Th1 Muster und die granulomatöse Synovitis mit einem gemischten Th1/Th2 Muster. T-Lymphozyten gehören zu den Zellen, die mit 20-50% im aktiv entzündeten RA-Gelenk am häufigsten auftreten; in gesunden Gelenken sind sie praktisch nicht nachweisbar. Die T-Zellen eines entzündeten Gelenkes weisen größtenteils Aktivierungsmarker auf (CD4⁺, CD45RA⁻, CD45RO⁺, CD27⁻, CD11a^{bright}, CD44^{bright}, CD69⁺^{36,37}), sind jedoch in ihrer großen Mehrzahl *in vitro* kaum oder nicht restimulierbar und werden daher auch als "bystander"-T-Zellen bezeichnet. Wahrscheinlich ist dafür eine Herunterregulierung der Transkription des Calmodulins verantwortlich. Eine Calmodulin-Blockade verursacht eine Verhinderung der Zellapoptose und eine allgemeine Verminderung der Restimulierbarkeit der T-Zellen bei gleichzeitiger antigen-spezifischer Proliferation³⁸. Ferner ist das T-Helfer-Zytokin IL-2 oftmals nicht oder nur in geringen Mengen nachweisbar. Dessen Funktion wird hier von IL-15 übernommen. IL-15 scheint bevorzugt T-Zellen zu aktivieren, die vorher von einem Antigen getriggert worden sind³⁹. Außerdem erhöht IL-15 die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- . Dieses Zytokin könnte für die Umwandlung von einer reaktiven Synovitis zu einer autoimmunen Verlaufsform verantwortlich sein. Es wird teilweise die Ansicht vertreten, daß T-Zellen zumindest für den chronischen Verlauf der Erkrankung keine bedeutende Rolle mehr spielen.

Stattdessen wird vermutet, daß es zu einem sich selbsterhaltenden Prozeß von Gewebeerstörung und -reparatur kommt, der lediglich von nichtlymphoiden Zellen und proteolytischen Substanzen getragen wird. Im Verlauf bestimmter Infektionen treten wie bei der RA begleitend gelenkzerstörende Prozesse auf, die dann aber wieder mit der Infektion zurückgehen. Daher sind Entzündung und Destruktion selbst in fortgeschrittenen Stadien nicht hinreichend, eine chronische Gelenkentzündung auszulösen und zu unterhalten. Offenbar wirken hier Regulationsmechanismen, die bei der RA nicht funktionieren, oder allenfalls durch die häufig auftretenden Remissionen nach Krankheitsschüben reflektiert werden. Möglicherweise spiegeln sich hier Regulationen wider, die durch T-Zellen bewirkt werden. Dies ist insbesondere bemerkenswert, da bei einer Reihe weiterer Autoimmunerkrankungen bekannt ist, daß pathogene T-Zellklone in so niedrigen Frequenzen vorkommen, daß sie ohne Kenntnis des spezifischen Antigens nicht detektierbar sind ⁴⁰. Ferner existieren offenbar regulatorische suppressive T-Zellen, die entweder direkt oder indirekt Einfluß auf pathogene T-Zellen nehmen. Um den Pathomechanismus der RA besser zu verstehen, sind detaillierte Kenntnisse über diejenigen Antigene erforderlich, die als Autoantigene erkannt werden. In erster Linie wird die Rolle der T-Zellen analysiert. Existieren für die jeweiligen Antigene antigenspezifische T-Zellen und wenn ja, wie sind sie zu charakterisieren?

Ubiquitäre Autoantigene

Ubiquitäre Autoantigene spielen bei Autoimmunerkrankungen eine große Rolle. Diese Proteine erfüllen in einem gesunden Organismus oftmals mehrere Aufgaben und werden erst mit der Verschiebung von einem gesunden zu einem autoimmunen Zustand als Antigene erkannt. Durch ihr Vorhandensein in jedem menschlichen Organismus und ihren Wechsel von Proteinen mit mehreren Funktionen zu Autoantigenen, sind gerade diese Proteine bei der Untersuchung systemischer Erkrankungen wie die RA besonders interessant. Antigene, die nur im Gelenk vorkommen und xenogene Antigene waren nicht Gegenstand dieser Arbeit.

IgG (Rheumafaktor)

Das am häufigsten beschriebene Autoantigen der RA, das Immunglobulin G (IgG), ist zugleich nicht gewebespezifisch sondern kann nahezu ubiquitär auftreten. Es ist das Ziel weiterer Antikörper, der sogenannten Rheumafaktoren. Rheumafaktoren sind humane Immunglobuline, deren Spezifität sich gegen den Fc-Teil humanen IgG's richtet. Sie treten in verschiedenen Isotypen auf, IgG, IgM und IgA, der am häufigsten getestete ist IgM. Der Rheumafaktor ist nach wie vor der einzige serologische Parameter, der in den ACR-Kriterien enthalten ist. Er wird bei ca. 65% der RA-Patienten nachgewiesen – aber auch bei anderen rheumatischen und nicht-rheumatischen Erkrankungen, sowie bei bis zu 5% der Gesunden, mit zunehmendem Lebensalter bis auf 30% ansteigend ⁸. Ein hoher RF-Titer kann aber als prognostischer Marker für einen erosiven und/oder sehr schnellen Verlauf der Erkrankung angesehen werden. Leider können Rheumafaktoren oft nicht oder nur in geringen Mengen im Frühstadium der RA nachgewiesen werden, wenn eine klare klinische Diagnose oft nicht möglich ist. Das Auftreten von Rheumafaktoren scheint ferner unter bestimmten pathologischen Gegebenheiten, wie der bakteriellen Endokarditis, eine physiologische Reaktion des Körpers zu sein. Bei einem Großteil der Bevölkerung liegen wahrscheinlich autoreaktive B-Zellen mit Spezifität für IgG vor, die durch verschiedene Mechanismen aktiviert werden können. Es konnte bisher keine T-Zell-stimulatorische Wirkung nachgewiesen werden.

p205 ist das Antigen mit dem bisher bekannten stärksten stimulatorischen Effekt auf T-Zellen. Die Stimulationsindices bei Proliferationsversuchen erreichen oftmals den zehnfachen Wert im Vergleich zu anderen Autoantigenen ⁴¹. In den Vorarbeiten zu den hier beschriebenen Experimenten wurde SF von RA-Patienten biochemisch fraktioniert, um die Komponente/n zu isolieren, die für die bekannten T-Zell-Stimulationen verantwortlich ist/sind. Hier wurde aus 11 gepoolter SF eine Fraktion mit dem Antigen p205 isoliert, die starke Proliferationseffekte hervorruft. Der isoelektrische Punkt des Antigens liegt bei 6,5. Das Protein weist keine N-Glykosylierungen auf und ist ein Produkt synovialer Zellen. Ob das Antigen auch in weiteren Geweben vorkommt, ist bislang unbekannt. Die Sequenzierung tryptischer Peptide von p205 offenbart eine 11 Aminosäuren lange Sequenz, die identisch zum Fc-Teil der schweren Kette humanen IgG's ist und in dem Bereich zwischen C_H2 und C_H3 liegt, in dem die RFs binden. Da die vollständige Sequenz des p205 noch nicht bekannt ist (es sind bisher drei Fragmente identifiziert), konnte dieses Protein nur bedingt eingesetzt

werden. Es wurde entweder mit einer p205-haltigen Fraktion oder mit dem reaktiven Peptid gearbeitet.

Es ist denkbar, daß IgG und p205 gleichen Ursprungs sind oder zwei verschiedene Erscheinungsformen eines Proteins darstellen. Da die bislang bekannte reaktive Domäne des IgG und des p205 identisch sind, werden in dieser Arbeit beide Proteine - unter Berücksichtigung ihrer spezifischen Unterschiede - gemeinsam behandelt.

Citrullin

Ursprünglich wurden die Autoreaktivitäten APF (Anti-perinukleärer Faktor) und AKA (Antikeratin-Antikörper) beschrieben ⁴². Es wurde dann gezeigt, daß sich diese Antikörper hauptsächlich gegen Filaggrin richten. Filaggrin ist ein 42k-Protein, das intermediäre Filamente, insbesondere Cytokeratin, vernetzt und im Endothel vorkommt. Als Epitop stellte sich eine posttranslational veränderte Aminosäure heraus, Citrullin, das durch das Enzym Peptidyl-Arginin-Deaminase aus Arginin entsteht. Mittlerweile sind zahlreiche citrullinierte Proteine gefunden worden. Obwohl Filaggrin nur extraartikulär vorkommt, konnte Citrullin mittlerweile auch in Synovialzellen nachgewiesen werden ⁴³; hier wahrscheinlich als citrulliniertes Filaggrin. Dennoch richten sich AKA mit einer sehr hohen Spezifität und guter Sensitivität gegen diese Modifikationen. Der APF-Antikörper, der bei 49-51% der RA-Patienten gefunden wurde ⁴⁴, weist eine Spezifität von über 70% auf. Als Testkits werden derzeit zyklisierte Peptide des Filaggrins verwendet, die diese Modifikation tragen. Anticitrullin-Antikörper als auch Antikeratin-Antikörper und Antiperinukleäre-Antikörper finden sich in Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis und sind wahrscheinlich zukunftsweisend in der Diagnostik von RA. Man kann mit ihnen z.B. klinisch ähnliche Erkrankungen wie SLE mit erosiver Arthritis und RA sehr sicher unterscheiden ⁴⁵. Sie sind möglicherweise bei früher Arthritis schon vor der eigentlichen Diagnosestellung vorhanden ⁴⁶. Anticitrullin-Antikörper treten bei Patienten mit früher RA auf, obgleich sie dort oft nur in Verbindung mit dem Auftreten von Rheumafaktoren zu finden sind ^{32,50}. Der akute Verlauf der Erkrankung ist aber mit Hilfe der Rheumafaktoren besser prognostizierbar ⁴⁷. Bisherige Untersuchungen weisen eine sehr hohe Spezifität zwischen 95% und 97% der Anticitrullin-Antikörper für die RA auf, bei einer Sensitivität zwischen 41% und 76% ^{48,49,50}.

Calreticulin

Calreticulin ist ein Protein des endoplasmatischen Reticulums (ER). Wie sehr viele andere Proteine im endoplasmatischen Retikulum hat auch Calreticulin die KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu)-Sequenz als C-Terminus. Calreticulin wurde auch im Nukleus und in der Kernmembran gefunden ⁵¹. Eine Induktion der Calreticulinexpression und dessen Translokation innerhalb der Zellkompartimente und außerhalb der Zelle ist meist von UV-B Licht, Aminosäuremangel, Calciumentzug und Hitzeschock, also zellulärem Stress, getriggert. Dieses 63k-Protein ist hoch konserviert und zeigt homologe Sequenzen bei verschiedenen Spezies von Pflanzen bis zum Menschen reichend. Calreticulin übt über 40 intra- und extrazelluläre Funktionen aus ⁵², unter anderem im Zusammenhang mit Calcium-abhängigen Signaltransduktionswegen, der Calciumhomöostase und im Prozessieren von Proteinen ⁵³. Neueste Untersuchungen haben gezeigt, daß dieses lösliche ER-Protein eine multifunktionelle

Rolle spielt, weil es sowohl bei der Calcium-Speicherung und Calciumregulation beteiligt ist als auch eine molekulare Chaperon-Aktivität besitzt ⁵⁴. Es gibt auch Vermutungen über eine Beteiligung in bestimmten autoimmunen Prozessen. Patienten mit Systemischem Lupus erythematodes (SLE) bilden vermehrt Antikörper gegen Calreticulin. Anticalreticulin Antikörper finden sich aber auch in anderen Autoimmunerkrankungen und parasitären Infektionen ⁵⁵. Die Prävalenz von Anti-Calreticulin Autoantikörpern bei RA wurde in der bis dato veröffentlichten Literatur noch nicht evaluiert.

Schließlich bindet der RA-assoziierte Haplotyp DR4Dw4/DR53 ein Peptid aus Calreticulin ⁵⁶. Calreticulin scheint ähnlich zu sein wie andere bedeutende Calcium bindende ER residente Chaperones, Grp78 und Grp94. Es wurde postuliert, daß die Calcium-Bindung am C-terminalen Ende mit der Regulierung der Interaktion zwischen KDEL-Proteinen und KDEL-Rezeptoren im Zusammenhang steht.

Calpastatin

Calpastatin ist ein ubiquitäres zytoplasmatisches Protein mit vier inhibitorischen Domänen für Calpain. Calpaine umfassen eine Familie von Cystein-Proteasen, die unter dem Verdacht stehen, an der Gelenkzerstörung bei rheumatischen Erkrankungen beteiligt zu sein. Calpastatin ist in verschiedenen Geweben in unterschiedlichen Größen und Isoformen zu finden ^{57,58,59}, deren Funktion bis auf wenige Ausnahmen unbekannt ist.

Die Beschreibung unterschiedlicher Molekulargewichte ⁶⁰, liegt im Vorkommen verschiedener Splicevarianten begründet, die das Entstehen verschiedener Formen des Moleküls bewirken. Außerdem wird wahrscheinlich aufgrund seiner ungewöhnlichen Aminosäurezusammensetzung bei SDS-PAGE das Molekulargewicht zu hoch bestimmt. Analysen von cDNAs haben gezeigt, daß Calpastatin eine molekulare Masse von 72k besitzt, aber auf SDS-PAGE anomal wandert und dort eine relative molekulare Masse von 115-130k zeigt.

Nach Aktivierung von Zellen kommt Calpastatin auch extrazellulär vor und ist derart für Antikörper zugänglich ⁶¹. Calpastatin wird durch Autoantikörper bei Patienten mit RA, SLE, PM/DM (Polymyositis/Dermatomyositis), MCTD (Mixed Connective Tissue Disease), aktivierter Arthrose und venöser Thrombose erkannt ^{62,63,64,65}. Im Tiermodell an Calpastatin-defizienten Ratten lassen sich keine Symptome einer Arthritis auslösen ⁶⁶. Calpastatin, Calpaine und Calpastatin-spezifische Antikörper kommen in den entzündeten Gelenken von RA- und Arthrose-Patienten vor und können daher in die Pathogenese dieser Erkrankungen involviert sein. Die Spezifität der Anticalpastatin-Antikörper liegt für die RA bei 72% während die Sensitivität mit 46% bis 57% relativ gering ist ^{67,68}.

BiP (Heavy Chain Binding Protein)

BiP, ursprünglich beschrieben als ein Glucose reguliertes Protein von 78kDa (grp78) ist ein Mitglied der Hsp70-Familie ⁶⁹. Eukaryontische, sekretorische Proteine beginnen ihre Ausschleusung aus der Zelle mit der Translokation in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) ⁷⁰. Die meisten interagieren im ER mit BiP, einem ubiquitären, ER-residenten Protein, das als sogenanntes molekulares Chaperon ("Anstandsdame") fungiert. Über diese essentielle Funktionalität hinaus wird BiP durch Streßfaktoren wie

Schwermetallionen oder Agenzien, die den Calciumionen-Haushalt der Zelle oder die Integrität der Proteinbiosynthese beeinflussen, überexprimiert. Es kann unter diesen Bedingungen dann sogar im Zellkern, aber auch auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden ^{71,72,73,74}.

Im Zusammenhang mit der RA wurde BiP zum ersten Mal mit einer Größe von 68kDa als B-Zell Autoantigen ⁷⁵, später auch als T-Zell Antigen beschrieben ⁷⁶. Der Nachweis der Antikörper gegen dieses Antigen ergab eine Sensitivität für die RA von 66% und eine Spezifität von 99%. Die Sensitivität der T-Zell Proliferationsassays lag bei 67%. Eine andere Untersuchung für -BiP-AK ergab für die RA eine Sensitivität von 30% und eine Spezifität von 90% ⁷⁷.

RA 33

In Zellen eukaryonter Lebewesen findet die Reifung von prä-mRNA aus Vorläufer-Molekülen am sogenannten Spliceosom statt. Wichtige Bestandteile dieses hochmolekularen Komplexes sind u.a. die etwa 30 heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNP). Bei verschiedenen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises können diese Proteine als Antigene das Ziel von autoimmunen Reaktionen sein. Besondere Aufmerksamkeit fand dabei ein Protein, das relativ häufig mit Autoantikörpern aus Seren von RA-Patienten reagierte. Da es ein Molekulargewicht von 33k hat, heißt es RA33 ⁷⁸. Bei weiteren Untersuchungen wurde dieses Antigen als das A2-Protein des hnRNP-Komplexes identifiziert ⁷⁹. Die exakte Funktion des A2 ist unbekannt, jedoch nimmt man eine Funktion beim Splicen der hnRNA an. Anti-RA33-Antikörper ohne begleitende Anti-U1-RNP-Antikörper kommen fast nur bei der rheumatoiden Arthritis vor und haben damit eine besondere Bedeutung für die Diagnose dieser Erkrankung ⁸⁰. Bei einer diagnostischen Sensitivität von 35% ist die Spezifität mit 96% sehr hoch. Die Antikörper lassen sich bei RA-Patienten schon sehr früh nachweisen, so daß eine Diagnose wahrscheinlich bereits im Frühstadium der Erkrankung serologisch besser erkannt werden kann.

Problemstellung

Die RA ist eine Autoimmunerkrankung, gekennzeichnet durch ein komplexes immunologisches Geschehen, in dessen Verlauf Autoantigene das Ziel einer B- und T-Zellimmunantwort werden. Mittlerweile ist eine Vielzahl RA-assoziiierter Antigene beschrieben worden, die bei der RA eine besondere Rolle spielen. Bislang war keine der bekannten Autoreaktivitäten für eine sichere Diagnostik ausreichend. Diese Arbeit soll zur:

- 1.) Verbesserung und Vereinfachung der Diagnostik und zum
- 2.) besseren Verständnis des Pathomechanismus beitragen.

Verbesserung und Vereinfachung der Diagnostik

Unabhängig von der pathogenetischen Bedeutung besteht die dringende Notwendigkeit, eine undifferenzierte Arthritis möglichst frühzeitig entweder als eine RA oder aber als eine andere rheumatische Erkrankung sicher zu diagnostizieren. Aus der Vielzahl beschriebener Autoreaktivitäten gilt es diejenigen herauszufiltern, die am ehesten geeignet sind, die Früherkennung und Differentialdiagnose zu verbessern. Grundlegende Aufgabe für die Einordnung dieser Autoreaktivitäten als Laborparameter ist jedoch der Nachweis seiner diagnostischen Wertigkeit. Die für die RA beschriebenen Autoantikörper und ihre einzelnen Tests ergaben eine unterschiedliche Spezifität für die RA.

Es wurden für die folgenden Untersuchungen die ubiquitären Autoantigene ausgewählt, die in der Literatur die höchsten Sensitivitäten und Spezifitäten für die RA aufweisen (IgG, Citrullin, BiP, RA33, Calpastatin, Calreticulin). Die sechs verschiedenen Autoreaktivitäten sollen sowohl einzeln analysiert als auch deren Kombinationen untereinander verglichen werden (Clusteranalyse). Es werden Antikörper in SF als auch in Seren getestet, um eventuell vorhandene RA-spezifische Muster zu erkennen, die eine höhere Spezifität als einzelne Autoreaktivitäten aufweisen und somit eine bessere Diagnostik zulassen.

Besseres Verständnis des Pathomechanismus

Um ein besseres Verständnis der RA zu erreichen, genügt es nicht, nur die humorale Seite der verschiedenen Autoantigene zu betrachten. Deshalb werden die Autoantigene BiP, Calreticulin, Calpastatin und p205/IgG genauer untersucht. Trotz der weitgehenden Anergie der T-Zellen in der SF, findet man auch antigenspezifische T-Zell-Reaktivität als Kriterium für pathogenetische Relevanz. Es soll geklärt werden, ob antigenspezifische T-Zell-Klone existieren und wann und wie diese Klone proliferieren. Mit Hilfe von FACS-Analysen, Zytokinuntersuchungen und spezifisch gehemmten Proliferationstests könnte die reaktive Subpopulation der T-Zellen genauer definiert werden. Ein weiteres Kriterium für die Pathogenese wäre eine Überexpression der Autoantigene im erkrankten Gewebe, der Synovialmembran. Gewebeschnitte und -anfärbungen von Synovialmembranen zeigen, ob die Antigene im entzündeten Gewebe verstärkt nachweisbar und wenn ja, mit welchen Zelltypen assoziiert sind und welche Verbindungen zwischen der humoralen und der T-Zell-Antwort existieren.