

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

DISSERTATION

„*Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase from an  
RA patient internally citrullinates major RA autoantigens“

Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Madeleine Jennings  
aus Berlin

Datum der Promotion: 04.06.2021

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ABSTRACT (DEUTSCH)</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRACT (ENGLISCH)</b> .....	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>MANTELTEXT</b> .....	<b>5</b>
3.1	Einleitung .....	5
3.2	Ergebnisse & Diskussion .....	7
3.3	Schlussfolgerung.....	9
3.4	<b>Methoden</b> .....	<b>11</b>
3.4.1	RA-P.-g.-CH2007-Isolierung.....	11
3.4.2	DNA-Gewinnung und Expression von RA <sub>CH2007</sub> -PPAD .....	11
3.4.3	RA <sub>CH2007</sub> -PPAD-Protein-Aufreinigung.....	12
3.4.4	Autocitrullinierung der RA <sub>CH2007</sub> -PPAD .....	12
3.4.5	2D-Gel der RA <sub>CH2007</sub> -PPAD.....	12
3.4.6	Citrullinierung humaner Proteine durch RA <sub>CH2007</sub> -PPAD.....	12
3.4.7	Enzymaktivitätsbestimmung von RA <sub>CH2007</sub> -PPAD mittels ABAP-Assay (ModiQuest) .....	14
3.4.8	Vesikelpräparation von <i>Porphyromonas-gingivalis</i> -RA-P.-g.-CH2007.....	14
3.4.9	RA <sub>CH2007</sub> -PPAD-ELISA .....	14
3.4.10	PPAD-Peptid-ELISA .....	15
3.4.11	Massenspektrometrische Analyse und Peptid-Identifikation .....	15
3.4.12	Protein-Macro-Array-Analyse .....	16
3.4.13	Immunhistochemische Analyse.....	16
3.4.14	Statistische Analyse.....	16
3.4.15	Online-Tools .....	17
3.5	Referenzen .....	17
<b>4</b>	<b>EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG</b> .....	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>AUSZUG AUS DER JOURNAL SUMMARY LIST</b> .....	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>PUBLIKATION</b> .....	<b>28</b>
6.1	Annals of the Rheumatic Diseases Original research – Extended report .....	28
6.2	Supplementary Material.....	37
<b>7</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>47</b>
<b>8</b>	<b>PUBLIKATIONS LISTE</b> .....	<b>48</b>
8.1	Poster und Präsentationen .....	48
8.2	Auszeichnungen .....	48
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>50</b>

# 1 ABSTRACT (DEUTSCH)

**Ziele:** Es wurden Unterschiede in der enzymatischen Aktivität und dem pathogenen Einfluss von *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) Peptidylarginin-Deiminase (PPAD) auf die Entstehung der rheumatoiden Arthritis (RA) veröffentlicht. Diese Diskrepanzen werden durch die Verwendung unterschiedlicher PPAD-Enzyme und Modifikations-Methoden unterstützt. Es wird diskutiert, ob Infektionen, wie z. B. durch *P. g.*, an der Auslösung und Verstärkung von Autoimmunreaktionen beteiligt sind. An der Peptidylarginin-Deiminase aus *P.g.CH2007* (RA<sub>CH2007</sub>-PPAD) von einem Patienten (CH2007) mit rheumatoider Arthritis (RA) und einem synthetischen PPAD-Peptid (CPP), das die Hauptautocitrullinierungsstelle enthält, wurde der potentielle Zusammenhang zwischen bakterieller Infektion, Citrullinierung von RA-Autoantigenen, -Beginn, -Diagnose und RA mit Lungenbeteiligung untersucht.

**Methoden:** Eine rekombinante RA<sub>CH2007</sub>-PPAD wurde kloniert, die DNA sequenziert bzw. analysiert und das Protein in *Escherichia coli* exprimiert. Die gereinigte RA<sub>CH2007</sub>-PPAD und ihre enzymatische Aktivität wurden mittels 2D-Elektrophorese, Massenspektrometrie, Immunoblot und ELISA analysiert. Native *P.g.CH2007*-Vesikel wurden durch mehrere Zentrifugationsschritte isoliert und auf ihre enzymatische Aktivität hin überprüft. Eine Autoantikörperantwort auf verschiedene RA<sub>CH2007</sub>-PPAD-citrullinierte Proteine und Peptide sowie die RA<sub>CH2007</sub>-PPAD selbst wurden untersucht und bioinformatisch ausgewertet.

**Ergebnisse:** RA<sub>CH2007</sub>-PPAD autocitrullinierte die Aminosäureposition aa63 und zeigte in der massenspektrometrischen Analyse zwei noch unbekannte Aminosäure-Mutationen an Position aa73 und aa447 auf. RA<sub>CH2007</sub>-PPAD citrullinierte Fibrinogen, Vimentin, hnRNP-A2/B1 und Histone H1 innerhalb des nativen Proteins mit einer bestimmten RG/RGG-Erkennungsregion und wird von RA-Seren und spezifischen monoklonalen Anti-Citrullin-Antikörpern detektiert.

Bei 20 % der RA-Patienten stellten wir eine erhöhte Antikörper-Reaktivität für anti-cit-RA<sub>CH2007</sub>-PPAD nach Ausbruch der RA fest (n=30). Die Antikörperspiegel korrelierten mit den Rheumafaktorwerten und dem Alter. Hohe Antikörper-Reaktivitäten (77 %) konnten wir für die spezifischen Citrulline im CPP, welches die identifizierte Autocitrullinierungsstelle (R<sub>63</sub>) enthält, in RA-Seren (n=99) nachweisen, wovon 48 % sero-negative RA-Patienten waren.

Ein humaner RA-Autoantigen-Protein-Microarray (Antigene = 458) wurde mit RA<sub>CH2007</sub>-PPAD citrulliniert und anschließend mit Seren von RA-Patienten (n=6) und OA-Patienten (n=4) detektiert. Es wurden 16 bekannte RA-Autoantigene und neun Antigene, die mit Lungen-Krankheiten assoziiert sind, gefunden. Fünf (FGB, FGG, HARS, HSP90, SRP14) der detektierten Antigene wurden bereits als RA-Autoantigene mit der interstitiellen

Lungenerkrankung (ILD) in Zusammenhang gebracht. Die anti-Citrullin-spezifische CPP-Reaktion ist eine wichtige Determinante bei parenchymalen Veränderungen in der Lunge ( $p=0,018$ ;  $n=106$ ) zum Zeitpunkt der RA-Diagnose.

**Schlussfolgerungen:** Die RA<sub>CH2007</sub>-PPAD ist in der Lage, die wichtigsten RA-Autoantigene intern zu citrullinieren, und hat eine immunologische und diagnostische Bedeutung in der frühen Form der RA und zum Zeitpunkt des Ausbruchs der Krankheit. Anti-Cit-RA<sub>CH2007</sub>-PPAD und die Anti-CPP-Level korrelieren mit den ACPA-Spiegeln und unterstützen ein infektionsbasiertes Konzept zur Induktion von ACPAs in der Lunge und im Synovialgewebe.

## 2 ABSTRACT (ENGLISCH)

**Background:** Differences in enzymatic activity and pathogenic impact of *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) peptidylarginine deiminase (PPAD) for development of rheumatoid arthritis (RA) have been published, confounded by different PPAD enzymes and methods used. *P. g.* is involved in triggering self-reactive immune responses. An enzymatic active PPAD (RA<sub>CH2007</sub>-PPAD) was isolated from an RA patient (CH2007) and linked to bacterial infection, citrullination of major RA autoantigens, RA onset, RA diagnosis, and RA lung involvement.

**Methods:** Recombinant RA<sub>CH2007</sub>-PPAD was cloned, verified by DNA sequencing and expressed in *Escherichia coli*. The purified RA<sub>CH2007</sub>-PPAD and its enzymatic activity was analysed using 2D-electrophoresis, mass spectrometry (MS), immunoblot and ELISA. Natural *P.g.*CH2007 vesicles were isolated by centrifugation method and their enzymatic activity was analysed. The autoantibody response to various citrullinated RA<sub>CH2007</sub>-PPAD proteins, peptides and RA<sub>CH2007</sub>-PPAD itself was recorded and bioinformatically evaluated.

**Results:** RA<sub>CH2007</sub>-PPAD autocitrullinates amino acid position 63 (aa63) and exhibits so far two new amino acid mutations (aa73 F to L) and (aa447 E to V). RA<sub>CH2007</sub>-PPAD internally citrullinated fibrinogen, vimentin, hnRNP-A2/B1, and histone H1 recognised by RA sera and specific  $\alpha$ -citrulline monoclonal antibodies, identifying a common RG/RGG consensus motif.

In 20% of RA patients we identified an increased antibody reactivity for  $\alpha$ -cit-RA<sub>CH2007</sub>-PPAD after RA onset ( $n=30$ ) and antibody levels were correlated with Rheumatoid factor levels and age. High antibody reactivities (77%) against the cit-specific signal CPP derived from the autocitrullination site (R<sub>63</sub>) we detected in RA patient sera ( $n=99$ ), 48% of them were seronegative.

A human 458 RA autoantigen protein-microarray was citrullinated by RA<sub>CH2007</sub>-PPAD and probed with RA patient sera ( $n=6$ ) and OA patient sera as controls ( $n=4$ ). 16 RA autoantigens

and 9 autoantigens associated with lung diseases were identified. 5 (FGB, FGG, HARS, HSP90, SRP14) have previously been described as RA autoantigens in interstitial lung disease (ILD). Anti-cit-specific anti-RA-PPAD peptide response is a major determinant in parenchymal changes ( $p=0.018$ ;  $n=106$ ) in the lung at time of RA diagnosis.

**Conclusions:** Specific RA<sub>CH2007</sub>-PPAD from *P.g.*CH2007 induced internal citrullination of major RA autoantigens and has immunological and diagnostic relevance in early RA and for onset of RA. Anti-cit- RA<sub>CH2007</sub>-PPAD and anti-CPP levels correlated with ACPA levels, and citrullination of ILD autoantigens supporting an infection based concept of induction of ACPAs in the human lung and synovial tissue.

## 3 MANTELTEXT

### 3.1 Einleitung

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung mit einer Vielzahl involvierter Gelenke, die in jedem Alter auftreten kann. In Deutschland ist einer von 100 Erwachsenen betroffen, wobei die Erkrankung meist bei Frauen ab dem 50. Lebensjahr und bei Männern ca. 10 Jahre später auftritt. Zudem erkranken Frauen dreimal häufiger als Männer<sup>1-4</sup>. Die Prävalenz steigt mit dem Alter an und ist bei Frauen mit über 65 Jahren am höchsten, was darauf hindeutet, dass hormonelle Faktoren eine pathogene Rolle spielen könnten<sup>5</sup>. Die RA ist eine systemische Autoimmunerkrankung, deren Ursache bis heute noch nicht geklärt ist<sup>6</sup>. Der Hauptgrund liegt in einer immunologischen Dysregulation, welche zur Inflammation führt. Diese ist charakterisiert durch autoreaktive T- und B-Zellen, welche gegen synoviale Proteine gerichtet sind. Diese T- und B-Zellen führen zur Inflammation des synovialen Gelenks und schließlich zur Zerstörung des Gelenks<sup>7-10</sup>. Genetische und umweltbedingte Faktoren und die Interaktion zwischen ihnen spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der RA<sup>11,12</sup>. Zwar sind 50 % des Risikos für die Entwicklung von RA auf genetische Faktoren zurückzuführen, eine niedrige Konkordanzrate von RA bei monozygoten Zwillingen sprechen jedoch für zusätzliche Faktoren wie Umwelteinflüsse, Rauchen und Infektionen<sup>13,14</sup>. Rauchen ist der stärkste bekannte zusätzliche Einflussfaktor für die RA und wurde in zahlreichen Studien mit dem erhöhten Risiko für RA assoziiert<sup>15-18</sup>.

Ein weiterer Faktor, der die RA beeinflussen könnte, ist die Infektion mit bakteriellen Erregern<sup>19,20</sup>. Eine mögliche Verbindung zwischen dem Mikrobiom und der RA wird seit Jahren diskutiert und unter anderem für *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) vorgeschlagen, aber es gibt noch immer keine eindeutigen Beweise<sup>21,22</sup>. Dennoch scheint *P. g.* an der Entstehung und am Fortschreiten der RA beteiligt zu sein.

Anti-citrullinierte Peptid-/Protein-Antikörper (ACPAs) gegen menschliche Autoantigene sind hochspezifisch in der Serumdiagnostik für die RA und in der Lage, den Ausbruch und die Schwere der klinischen Erkrankung vorherzusagen<sup>23-25</sup>. Die humanen Peptidylarginin-Deiminasen (hPADs) können verschiedene Autoantigene wie Vimentin, Fibrinogen, Alpha-Enolase oder Histone im Synovialgewebe citrullinieren, die als Ziele für die Seroreaktivität bei der RA<sup>26-31</sup> fungieren. Bei der frühen RA sind 40–50 % der Patienten ACPA-seronegativ<sup>32-34</sup>. Zwar sind ACPAs hochgradig kreuzreaktiv und binden eine Vielzahl von citrullinierten Proteinen, das relevante Zielantigen *in vivo* und seine Gewebslokalisation sind jedoch unbekannt<sup>35</sup>. *P. g.*, der Haupterreger der Parodontitis (PD), ist einzigartig in der Expression prokaryotischer Peptidylarginin Deiminase (PPAD)<sup>21,36,37</sup>. Es ist das einzige bekannte Bakterium, das eine prokaryotische PAD exprimiert, die in der Lage ist, die C-terminale Citrullinierung von Peptiden aus Fibrinogen und Enolase zu induzieren<sup>38-40</sup>.

Es hat sich gezeigt, dass *P. g.* die Lunge, das Gehirn, die Speiseröhre, die Plazenta und die Synovialflüssigkeit infizieren kann und intrazellulär in Makrophagen, Epithel-, Endothel- und glatte Muskelzellen eindringt. In diesem Zusammenhang kann *P. g.* die Autophagie innerhalb der dendritischen Zellen unterdrücken und aus der Mundhöhle in entfernte Organe auswandern<sup>41-45</sup>. PPAD, welche genetisch nicht mit den hPADs verwandt ist, kann die gleiche chemische Reaktion mit einem anderen katalytischen Mechanismus auslösen. PPAD citrulliniert C-terminales Peptidylarginin und freies L-Arginin ohne jeden Kofaktor. Im Gegensatz dazu citrullinieren die hPADs interne Arginine und sind zudem calciumabhängig<sup>36,46-50</sup>. Intern citrullinierte Arginine sind bisher nur für bakterielle Proteine, menschliches Histon H3<sup>51</sup> und autocitrullinierte PPAD in *P. g.*<sup>52,53</sup> beschrieben worden.

Es besteht eine potentielle Verbindung zwischen PD und RA, da es Parallelen in der Pathogenese, den klinischen Parametern, den Therapien und den ACPA-Intensitäten gibt<sup>27-31,54</sup>. Eine deutlich erhöhte Anti-PPAD-Antikörperreaktion, insbesondere in Seren von RA-Patienten, deutet darauf hin, dass PPAD selbst ein für die RA-Pathogenese relevantes Antigen sein könnte<sup>52,53</sup>. Zu den RA-assoziierten Risiken gehören Zigarettenrauch und eine hohe Prävalenz von Lungenerkrankungen einschließlich Atemwegsentzündungen, wie sie bei der etablierten RA festgestellt wurden. Die Prävalenz der entzündlichen Atemwegserkrankungen ist ebenfalls mit RA-Autoantikörpern assoziiert<sup>44</sup>. Obwohl *P.-g.-DNA* in Vollblut, Plasma, Serum, Synovialflüssigkeit, Synovialgewebe und Zahnbelägen von RA-Patienten gefunden wurde, ist der genaue Mechanismus der *P.-g.-Migration* in die Gelenke unklar<sup>45,55-57</sup>.

Die Spezifität der Immunreaktionen auf citrullinierte PPAD wurde durch die Reaktivität von RA-Seren auf mehrere synthetische citrullinierte Peptide bestätigt<sup>53</sup>. Es wurden verschiedene Mechanismen zur Störung der Immuntoleranz gegenüber citrullinierten Proteinen diskutiert. Zum Beispiel könnte PPAD direkt dazu beitragen, indem sie bakterielle und menschliche

Proteine citrulliniert, die dann zu einer ACPA-Antwort führen könnten<sup>26,58</sup>. Leider konnte bisher kein direkter Zusammenhang zwischen einer *P.-g.*-Infektion und der Citrullinierung von humanen Autoantigenen und der ACPA-Reaktion untersucht werden, da die C-terminale Citrullinierung bei RA-Patienten nicht immunreaktiv ist<sup>59</sup>.

Es wurden mehrere vollständige und verkürzte PPAD-Varianten (fPPAD/tPPAD) mit verschiedenen enzymatischen Eigenschaften veröffentlicht. Rodriguez et al.<sup>50</sup> zeigten eine aktive fPPAD (556aa) und eine N-terminal verkürzte Form der PPAD (513aa), wobei nur die verkürzte Proteinversion stabil war und autocitrullinieren konnte. Quirke et al.<sup>53</sup> verifizierten eine fPPAD in *P.-g.*-Kulturfraktionen und in Membran-Vesikeln (OMVs, outer-membrane vesicles) und produzierten eine rekombinante fPPAD, die autocitrullinieren konnte. König et al.<sup>52</sup> identifizierten eine 47-kDa- und eine 75–85-kDa-zelluläre Form der tPPAD und eine gereinigte rekombinante tPPAD mit erhöhter enzymatischer Aktivität. Abhängig von den verwendeten PPAD-Varianten und in Kombination mit verschiedenen Methoden wurde von heterogenen Ergebnissen für die PPAD-Autocitrullinierung und deren Enzymaktivität berichtet. Diese unterschiedlichen Ergebnisse der PPAD werfen Fragen über die Rolle von PPAD in der RA-Pathogenese auf. Ist die Autoantigen-Citrullinierung durch PPAD z. B. zufällig oder substratspezifisch, um das Immunsystem zu modulieren, was zu Entzündungen im Gelenk und möglicherweise auch in anderen Geweben führen kann?

### 3.2 Ergebnisse & Diskussion

In dieser Studie zeigen wir, dass PPAD von einem RA-Patienten (RA<sub>CH2007</sub>-PPAD) ein pathogenes Potenzial in der RA haben kann. Wir können zeigen, dass RA<sub>CH2007</sub>-PPAD nicht nur eine C-terminale, sondern auch eine interne Citrullinierung von Argininen in Vimentin und Fibrinogen bewirkt, was bisher nur für das Histon H3<sup>51</sup> bekannt ist. Dies wird durch unsere massenspektrometrischen Daten und weiteren Daten aus Protein-Macro-Array-Analysen bestätigt, welche eine überlappende Aminosäure-Konsensussequenz (RG/RGG) für RA<sub>CH2007</sub>-PPAD-citrullinierte und hPAD4-citrullinierte humane Proteine identifizieren. Dabei könnte die Regulation der Proteinaggregation und die Hemmung von RGG-Methylierungsstellen auch durch *P. g.* beeinflusst werden. RG/RGG wurde zuvor durch hPAD4 citrulliniert gefunden, die die Proteinaggregation reguliert und die RGG-Methylierungsstellen hemmt<sup>60</sup>. ACPAs bei der RA sind mit der  $\beta$ 1-Kette des humanen Leukozytenantigens DR shared epitope (HLA-DRB1SE) assoziiert und erkennen viele citrullinierte Autoantigene, z. B. citrulliniertes Vimentin (cit71vim), das zuvor im Lungengewebe nachgewiesen werden konnte<sup>61,62</sup>. Vimentin konnten wir durch RA<sub>CH2007</sub>-PPAD ebenfalls als citrulliniert an Aminosäureposition 71 identifizieren, und es wurde in unseren Untersuchungen auch spezifisch durch Seren, im Stadium vor Ausbruch der RA-Erkrankung, detektiert.

Die Citrullinierung interner Arginine durch RA<sub>CH2007</sub>-PPAD, die an der gleichen Proteinsequenz-Stelle wie die der hPADs entstehen, können zu kreuzreaktiven Epitopen führen und unterstützen damit die Hypothese der enzymatischen Mimikry, dass durch eine *P.-g.*-Infektion und PPAD-Citrullinierung von humanen Antigenen eine ACPA-Reaktion induziert werden kann<sup>25</sup>.

Fibrinogen wurde zuvor in Synovialgeweben in citrullinierter Form gefunden<sup>27</sup>. Die Art der PPAD-vermittelten Citrullinierung von Fibrinogen, die wir gezeigt haben, hat das Potenzial, die hemmende Wirkung von nativem Fibrinogen auf die bakterielle Coaggregation zu zerstören, und kann so den mikrobiellen Biofilm stabilisieren, so dass sich die Infektion weiter ausbreiten kann<sup>63</sup>. Es wurde nachgewiesen, dass OMVs viele Bakterienarten miteinander coaggregieren lassen und die Anheftung anderer Pathogene an Epithelzellen verstärken<sup>64-66</sup>.

Eine molekulare Mimikry und Kreuzreaktivität von ACPAs, die durch eine Vielzahl verschiedener Citrullin-Epitope entstehen, wurden auch im Zusammenhang mit humaner Alpha-Enolase<sup>30,67</sup> gezeigt. Unsere Protein-Macro-Array-Analyse identifizierte 16 RA<sub>CH2007</sub>-PPAD-citrullinierte Autoantigene, darunter menschliche Enzyme, Hitzeschockproteine (HSPs), Histone, heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNPs) und Vimentin, mit Sequenz-Homologien zu *P. g.* Wenn sowohl das humane als auch das homologe Fremdantigen von antigenspezifischen B-Zellen präsentiert werden, kann eine T-Zell-Aktivierung erreicht werden<sup>34,68</sup>. Im Gegensatz zu hPADs benötigt RA<sub>CH2007</sub>-PPAD keinen Co-Faktor und ist auch in entzündeter Umgebung wie Synovialflüssigkeit enzymatisch aktiv und könnte citrulliniertes Calreticulin (CitCRT) enthalten, was wir durch unsere Protein-Macro-Array-Daten bestätigt haben. Es ist bekannt, dass CitCRT an RA SE von HLA-DR-Molekülen bindet und pro-inflammatorische Ereignisse in benachbarten Zellen auslöst. CRT wurde als Autoantigen bei Bronchiektasepatienten vor dem Ausbruch der RA beschrieben, was darauf hindeutet, dass CitCRT ein frühes PPAD-Ziel in der RA<sup>69</sup> sein könnte.

Die Anti-*P.-g.*-Werte waren bei ACPA-positiven RA-Patienten höher. Dies unterstützt die Annahme, dass Anti-*P.-g.*-Antikörper und die ACPA-Immunantwort an der Störung der Immuntoleranz gegenüber citrullinierten Autoantigenen beteiligt sein könnten – ein Phänomen, das in der Pathogenese von RA<sup>70</sup> auftritt.

Unsere Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass ACPAs gegen ein bestimmtes citrulliniertes PPAD-Peptid (CPP) spezifisch mit der interstitiellen Lungenerkrankung (ILD) im Frühstadium der RA assoziiert sein können. Unter anderem untersuchten wir potentiell neue ACPA-Epitope, die durch die bakterielle RA<sub>CH2007</sub>-PPAD (BCEs, bacterial citrullinated epitopes) erzeugt werden und die Beteiligung der Lunge in der RA im Zusammenhang mit *P.-g.*-Infektionen unterstützen.

Wir konnten bei 33 % der RA-Patienten eine Anti-cit-PPAD-Reaktivität vor Ausbruch der RA-Erkrankung feststellen, und mehr als drei Viertel der etablierten RA-Patienten erzeugten eine ACPA-Reaktion auf CPP. Fast die Hälfte der RF-IgM/anti-CCP2-negativen (sero-negativen) RA-Patienten erkannten auch das BCE-CPP innerhalb der RA<sub>CH2007</sub>-PPAD. RA<sub>CH2007</sub>-PPAD ist in der Lage, sowohl menschliche als auch bakterielle Epitope zu citrullinieren. Zwar kann das citrullinierte Epitop für PPAD und hPADs gleich sein, Protein-Macro-Array-Daten lassen jedoch auf zusätzliche Epitope in menschlichen Proteinen schließen, die durch PPAD citrulliniert wurden. Dies deutet darauf hin, dass es eine molekulare und eine enzymatische Mimikry für die Proteinmodifikation durch Citrullinierung bei Bakterien und beim Menschen geben könnte.

Zusätzlich zum Rauchen, das 35 % des Risikos für sero-negative Patienten ausmacht, an der RA zu erkranken, könnte eine *P.-g.*-Infektion die Autoimmunreaktion in der Lunge durch Citrullinierung der menschlichen Proteine auslösen, wenn *P. g.* sich vom Zahnfleisch in die Lunge ausbreitet und dort pathologische Schäden induziert<sup>62</sup>. Wir identifizieren RA<sub>CH2007</sub>-PPAD-citrullinierte Autoantigene, die von RA-Patienten erkannt, in der Lunge hoch exprimiert und als Autoantigene bei Arthritis-Patienten mit ILD identifiziert werden<sup>71</sup>. Die von uns nachgewiesenen Anti-cit-HSP90-Antikörper sind hochspezifisch für ILD bei RA<sup>72,73</sup>. Die Citrullinierung von antibakteriellen menschlichen Proteinen wie Histonen und HSPs könnte für das lokale Überleben von *P. g.* von großer Bedeutung sein. Autoantikörper gegen antibakterielle Proteine können ein Versagen der bakteriellen Clearance in der Lunge von RA-Patienten induzieren. Im Laufe der Zeit können entzündliche und autoimmunvermittelte Lungenschäden durch die Ausbreitung von *P. g.* aus der Lunge auch in andere Körperregionen auftreten, wie von Reynisdottir et al. bereits vorgeschlagen wurde<sup>74</sup>. Eine *P.-g.*-Infektion aus den Atemwegen in die umgebenden parenchymalen Strukturen kann die Citrullinierung von Fibrinogen und Vimentin induzieren, wie im Sputum von RA-Hochrisikopatienten gezeigt wurde<sup>75</sup>. Darüber hinaus wird eine Verbindung zu mikrobiellen Auslösern auch durch wiederholt berichtete mikrobielle DNA- oder Antigenfragmente in Gelenken von RA- und sogar OA-Patienten<sup>57,75,76</sup> und durch aktivierte Makrophagen mit Mustern der mikrobiellen Stimulation in Synovialgeweben langjähriger Patienten mit rheumatoider Arthritis angedeutet<sup>77</sup>.

### 3.3 Schlussfolgerung

Unsere Befunde unterstützen die Hypothese einer möglichen chronischen Auslösung durch Mikroben wie *P. g.*, die in der Lage sind, zu citrullinieren und exogen citrullinierte menschliche und BCEs zu produzieren und so die Entwicklung von ACPA zu induzieren, was zur Entstehung und Progression der RA beitragen kann.

Es sollte eine generelle Testung auf bakterielle Infektionen bei RA-Patienten durchgeführt werden, wenn möglich vor Therapiebeginn. Die *P.-g.*-Prophylaxe und – sollte der RA-Patient

infiziert sein – die *P.-g.*-Behandlung mit Antibiotika sollte bei der RA-Routinetherapie Standard sein. Darüber hinaus sollten klinische Studien mit und ohne *P.-g.*-Behandlung durchgeführt werden. Des Weiteren sollte untersucht werden welchen Einfluss die *P.-g.*-Behandlung auf die Therapie haben könnte.

## 3.4 Methoden

### 3.4.1 RA-P.-g.-CH2007-Isolierung

*Porphyromonas gingivalis* (RA-P.-g.-CH2007) wurde klinisch von einem RA-Patienten der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Abteilung für Rheumatologie und Klinische Immunologie, Humboldt-Universität und Freie Universität Berlin, Deutschland, isoliert. Die subgingivale Plaqueprobe wurde mit einem sterilen Papier entnommen. Die Papierspitze wurde in ein 1,5 ml Mikroröhrchen mit 500 µl sterilem, destilliertem Wasser gegeben. RA-P.-g.-CH2007 wurde in einer anaeroben Atmosphäre bei 37 °C für 48 bis 72 Stunden in TBS-Medium (TBS, Tryptic soybroth), ergänzt mit Menadion 1 µg/ml und Hämin 10 µg/ml, inkubiert. Die Entnahme der Probe aus einem RA-Patienten erfolgte in der Klinik und wurde nicht persönlich von mir durchgeführt. Das Animpfen in das spezielle Wachstumsmedium und alle weiteren Schritte wurden von mir weitergeführt.

### 3.4.2 DNA-Gewinnung und Expression von RA<sub>CH2007</sub>-PPAD

Die Oligonukleotid-Primer (P1 vorwärts 5'-GAC GAC AAG ATG GCA TTC CAG GAA ACG AAT CCC CCT GC-3' und P2 rückwärts 5'-GAG GAG AAG CCC GGT TAT TTG AGA ATT TTC ATT GTC TCA C-3') für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) einer N-terminal verkürzten RA<sub>CH2007</sub>-PPAD-DNA von RA-P.-g.-CH2007 wurden von der BioTeZ Berlin-Buch GmbH (Berlin, Deutschland) synthetisiert. Die PCR-Reaktion wurde wie folgt durchgeführt: Die Denaturierung erfolgte 30 Sekunden bei 94 °C, anschließend wurde schnell 30 Sekunden bei 48 °C heruntergekühlt. Die Elongation wurde 2 Minuten bei 72 °C (10 Zyklen) durchgeführt. Daraufhin wurde erneut 30 Sekunden bei 94 °C temperiert, 30 Sekunden auf 36 °C heruntergekühlt und 2 Minuten bei 72 °C elongiert (30 Zyklen). Als letzter Schritt wurde 5 Minuten bei 72 °C<sup>50</sup> inkubiert. Die PCR erfolgte mit Hilfe der Platin-®Pfx-DNA-Polymerase (Katalog-Nr.11708013, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Anschließend wurde die DNA mit einem Miniprep-Kit von Qiagen (Katalog-Nr. 27104, QIAprep-Spin-Miniprep-Kit, Hilden, Deutschland) isoliert, gefolgt von der Klonierung des RA<sub>CH2007</sub>-PPAD-Fragments in einen EK/LIC-PET30-Vektor mit dem EK/LIC-PET30-Vektor-Kit von Novagen (Katalog-Nr. 69077, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) und der folgenden Transformation des Plasmids in One-Shot™-BL21-(DE3)-pLysS-kompatible Zellen (Katalog-Nr. C606003, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Der DNA-Sequenzierservice wurde von LGC Genomics (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Zur Proteinexpression wurden Zellen in LB-Medien gezüchtet, die mit 34 µg/ml Chloramphenicol und 50 µg/ml Kanamycin supplementiert wurden. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 0,5 mM/ml Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert, gefolgt von einer 4-stündigen Inkubation bei 37 °C. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 10.000 xg bei

4 °C für 15 Minuten geerntet und bei -20 °C bis zur Reinigung eingefroren. Die DNA-Gewinnung und Protein-Expression von RA<sub>CH2007</sub>-PPAD wurden von mir vorgenommen.

### 3.4.3 RA<sub>CH2007</sub>-PPAD-Protein-Aufreinigung

Jedes Gramm Zellpellet wurde in 1 ml Protein-Lysepuffer (50 mM Tris, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10 % Glycerin, 0,5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol pH 7,8) resuspendiert und die Suspension 5 x 20 s (70 % Cycle und 80 % Power) beschallt. Die Lysate wurden bei 8.000 xg 20 min bei 21 °C zentrifugiert. Die RA<sub>CH2007</sub>-PPAD wurde unter nativen Bedingungen aus dem Überstand unter Verwendung eines zweistufigen Reinigungsprotokolls mit HisPur™-Cobaltresin (Katalog-Nr. 89964, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gereinigt. Das Resin wurde mit dem Fünffachen an Protein-Lysepuffer äquilibriert. Der Proteinüberstand wurde mit dem Resin zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde vom Resin entfernt, gefolgt von drei Waschschritten mit zweifachem Waschpuffervolumen (50 mM Tris, 400 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 0,5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; pH 7,8) des Resins. Die Elution wurde dreimal mit dem einfachen Elutionspuffervolumen (50 mM Tris, 400 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 0,5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; pH 7,8) des Resins durchgeführt. Alle Reinigungsschritte wurden bei RT von mir ausgeführt.

### 3.4.4 Autocitrullinierung der RA<sub>CH2007</sub>-PPAD

Die Autocitrullinierung von RA<sub>CH2007</sub>-PPAD wurde durch Inkubation von nativ gereinigtem Protein in Elutionspuffer (siehe PPAD-Proteinreinigung) bei Raumtemperatur für mindestens 21 Tage durchgeführt. Die Autocitrullinierung wurde mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern mittels Immundetektion nachgewiesen. Das endgültige Protokoll zur Autocitrullinierung von RA<sub>CH2007</sub>-PPAD wurde von mir entwickelt und umgesetzt.

### 3.4.5 2D-Gel der RA<sub>CH2007</sub>-PPAD

50  $\mu$ g RA<sub>CH2007</sub>-PPAD wurden in 2 Dimensionen aufgetrennt. Für die isoelektrische Fokussierung in der isoelektrischen Protean-Fokussierungskammer (IEF) wurden immobilisierte pH-Gradientenstreifen (IPG) mit einem pH-Wert von 3–10 verwendet. Anschließend wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit einem 12,5%igen Gel vorgenommen. Ich verwendete das Protokoll des 2D-Fertigpräparationskits von BIORAD (ReadyPrep™-2-D-Starter-Kit, Katalog-Nr. 1632105, BIORAD, Hercules, Kalifornien, USA). Die 2D-Auftrennung der RA<sub>CH2007</sub>-PPAD wurde von mir durchgeführt.

### 3.4.6 Citrullinierung humaner Proteine durch RA<sub>CH2007</sub>-PPAD

Vor der Analyse des Westernblots wurden zwei verschiedene Methoden der Citrullinierung angewandt: die *In-vitro*-Modifikation unter nativen Bedingungen und die Modifikation am Westernblot unter nativen Bedingungen. Die RA<sub>CH2007</sub>-PPAD-Citrullinierung wurde bei

Raumtemperatur über Nacht oder 48 Stunden durchgeführt. Danach wurden die Blots einmal für 10 Minuten mit PBS-0,05%-Triton-X-100 gewaschen, gefolgt von einem Blockierungsschritt mit 5%-Milchpulver(MP)-1,5%-Rinderserumalbumin(BSA)-PBS für 1 Stunde bei RT. Die Citrullinierung von menschlichen Proteinen wurde mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern (human (hu) Anti-Citrullin 1:1.000 Katalog-Nr. MQR2.101; Maus (ms) Anti-Citrullin 1:1.000, Katalog-Nr. MQR1.101; ms Anti-Arginin 1:1.000 aus ABAP-Kit, Katalog-Nr. MQ17.101-96; ImmunoPrecise Antibodies ehemals ModiQuest Research, Oss, Niederlande) oder mit Serumpools von RA-Patienten (1:250) in 3%-MP-1%-BSA-PBS für 1 Stunde bei RT nachgewiesen. Die Blots wurden 3 x 10 Minuten gewaschen und mit sekundären HRP-konjugierten Antikörpern in 3%-MP-1%-BSA-PBS für 1 Stunde bei RT inkubiert, dann nochmals 5 x 5 Minuten gewaschen und 2 Minuten mit dem Western-Bright-(Chemilumineszenz)-ECL-Substrat von Advansta (Katalog-Nr. K-12045-D50, Menlo Park, USA) inkubiert. Der Nachweis des ECL-Signals wurde mit Hyperfilm™-ECL von Thermo Fisher Scientific (Katalog-Nr. 45-001-508, Waltham, Massachusetts, USA) durchgeführt. Das Protokoll zur Citrullinierung humaner Proteine durch RACH<sub>2007</sub>-PPAD mit anschließendem Nachweis mittels ECL wurde von mir entwickelt, und alle Experimente dazu wurden von mir persönlich umgesetzt.

Es wurde ein ELISA-basierter Nachweis-Assay für RA<sub>CH2007</sub>-PPAD-citrulliniertes hnRNP-A2/B1 und Histon H1 verwendet. hnRNP-A2/B1 und Histon H1 wurden 1 µg pro Well in 100 µl 8 M Harnstoff auf Nunc-Maxisorb-96-Wellplatten über Nacht bei 4 °C beschichtet. Dreimaliges Waschen der Platten erfolgte mit PBS-0,05%-Tween-20, 400 µl pro Well. Das Blockieren der Platten wurde mit 5%-MP-1,5%-BSA-PBS 200 µl pro Well eine Stunde bei RT und Schütteln bei 300 U/min durchgeführt. Es folgte ein erneutes dreimaliges Waschen der Platten. Anschließend wurden die Platten mit Modifikationspuffer (50 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT pH 7,8) 100 µl pro Well für 10 Minuten vorinkubiert. Die Citrullinierung der beschichteten Proteine mit aktiver RA<sub>CH2007</sub>-PPAD erfolgte mit 2 µg pro Well in 100 µl Modifikationspuffer für 48 Stunden bei RT. Die Platten wurden danach nochmals dreimal gewaschen. Daraufhin wurden die Platten mit monoklonalen Anti-Citrullin-Antikörpern (ms Anti-Cit-Antikörper 1:1.000, Katalog-Nr. MQR1.101 und hu Anti-cit ab 1:000, Katalog-Nr. MQR2.101, ImmunoPrecise Antibodies ehemals ModiQuest Research, Oss, Niederlande) in 3%-MP-1%-BSA-PBS 100 µl pro Well für eine Stunde bei RT inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Platten viermal gewaschen und mit dem Sekundärantikörper inkubiert (anti-human-IgG-Fc-spezifischer Peroxidase-konjugierter Antikörper, 1:10.000, Katalog-Nr.: MQR2.101, ImmunoPrecise Antibodies ehemals ModiQuest Research, Oss, Niederlande; anti-ms-IgG-FC-spezifischer Peroxidase-konjugierter Antikörper 1:10.000, Katalog-Nr. A2554, Sigma-Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) in 3%-MP-1%-BSA-Waschpuffer 100µl pro Well eine Stunde bei Raumtemperatur und 300 U/min inkubiert. Die Platten wurden

danach fünfmal gewaschen. Die Entwicklung der Platten erfolgte mit Seramun-fast-3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) von Seramun Diagnostica GmbH (Katalog-Nr. S-001-2-TMB, Heidensee, Deutschland) 100 µl pro Well für fünf Minuten. Die Entwicklung wurde mit 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 µl pro Well gestoppt. Im Anschluss daran wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen. Das ELISA-Protokoll zur Citrullinierung humaner Proteine durch RA<sub>CH2007</sub>-PPAD wurde von mir entwickelt und durchgeführt.

#### 3.4.7 Enzymaktivitätsbestimmung von RA<sub>CH2007</sub>-PPAD mittels ABAP-Assay (ModiQuest)

Zur Bestimmung der Enzymaktivität von RA<sub>CH2007</sub>-PPAD haben wir den ABAP-Assay (Katalog-Nr. MQ17.101; Antibody-Based-Assay for PAD-enzyme-Activity ImmunoPrecise Antibodies ehemals ModiQuest Research, Oss, Niederlande) entsprechend der Empfehlung des Herstellers eingesetzt. Der Test basiert auf einem künstlichen Filaggrin-Peptid (SHQESTRGKSKGKAAAAA), das auf eine 96-Well-Platte gekoppelt ist. Nach einer 3-stündigen Citrullinierung mit RA<sub>CH2007</sub>-PPAD bei RT wurde der Nachweis mit einem spezifischen monoklonalen Anti-Deiminated-Arginin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1.000 durchgeführt. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers und wurden von mir umgesetzt.

#### 3.4.8 Vesikelpräparation von *Porphyromonas-gingivalis*-RA-P.-g.-CH2007

Die Zellen von *Porphyromonas-gingivalis*-RA-P.-g.-CH2007 wurden in TBS mit 1 µg/ml Menadion und 10 µg/ml Hemin unter Sauerstoffabschluss für 72 Stunden bei 37 °C kultiviert. Die OMVs wurden von mir gemäß dem Protokoll von Grenier & Mayrand 1987 präpariert<sup>78</sup> und aufgearbeitet.

#### 3.4.9 RA<sub>CH2007</sub>-PPAD-ELISA

96-Well-Maxisorb-Platten der Firma Nunc wurden mit 1 µg RA<sub>CH2007</sub>-PPAD in 100 µl 8 M Harnstoff pro Well über Nacht bei 4 °C beschichtet, dreimal mit 400 µl pro Well Waschpuffer 1 (0,05%-Tween-20-PBS) gewaschen und mit 200 µl pro Well Blockierungslösung (5%-MP-1,5%-BSA-PBS) für eine Stunde bei RT und Schütteln bei 300 U/min blockiert. Die Platten wurden erneut dreimal gewaschen und mit 100 µl pro Well Modifikationspuffer (50 mM Tris, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT pH 7,8) für 10 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Die Citrullinierung der gekoppelten RA<sub>CH2007</sub>-PPAD wurde mit 5 µg pro Well aktiver RA<sub>CH2007</sub>-PPAD in 100 µl Modifikationspuffer für 3 Stunden bei 37 °C durchgeführt. Auch hier wurden die Platten dreimal gewaschen. Vor der Anwendung wurden die Seren im Verhältnis 1:250 in Waschpuffer 2 (3%-MP-1%-BSA) äquilibriert, mit nicht reaktiver RA<sub>CH2007</sub>-PPAD (0,1 µg/ml) für 30 Minuten vorinkubiert und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur in die Wells (100 µl pro

Well) gegeben. Die Platten wurden viermal gewaschen und die weiteren Schritte wurden gemäß der Beschreibung im Abschnitt: „Citruillinierung humaner Proteine durch RA<sub>CH2007</sub>-PPAD“ von mir durchgeführt.

#### 3.4.10 PPAD-Peptid-ELISA

96-Well-Maxisorb-Platten wurden über Nacht bei 4 °C mit 2 µg pro Well Neutravidin in PBS beschichtet. Die Platten wurden dreimal mit 400 µl pro Well Waschpuffer 1 gewaschen und mit 200 µl pro Well Roti-Block (Katalog-Nr. A151.4, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) für zwei Stunden bei RT unter Schütteln bei 300 U/min blockiert. Die Platten wurden dreimal mit Waschpuffer 1 gewaschen. Die Beschichtung mit citruilliniertem PPAD-Peptid (CPP) und Arginin-haltigem Kontrollpeptid (PP) wurde mit 1 µg pro Well in 100 µl PBS für zwei Stunden bei RT unter Schütteln bei 300 U/min durchgeführt. Die Platten wurden dreimal mit Waschpuffer 1 gewaschen. Die Platten wurden danach mit Patientenserumproben in einer Verdünnung von 1:200 in 100 µl pro Well für eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend viermal mit Waschpuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Platten mit einem Sekundäntikörper, dem anti-human-IgG-Fc-spezifischen HRP-konjugierten Antikörper 1:10.000 (Katalog-Nr. A0170, Sigma-Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) und/oder dem anti-human-IgA-HRP-konjugierten Antikörper 1:1.000 (Katalog-Nr. A0170, Sigma-Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA), in 3%-MP-1%-BSA-Waschpuffer 100 µl pro Well für eine Stunde bei RT und unter Schütteln bei 300 U/min inkubiert. Die Platten wurden fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Seramun-fast-TMB-Substrat 100 µl pro Well (Katalog-Nr. S-001-2-TMB, Seramun GmbH, Heidensee, Deutschland) für fünf Minuten bei RT und wurde durch die Zugabe von 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 µl pro Well gestoppt. Im Anschluss daran wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen. Die Entwicklung des PPAD-Peptid-ELISAs wurde von meiner Kollegin Bianka Marklein und mir geleistet.

#### 3.4.11 Massenspektrometrische Analyse und Peptid-Identifikation

Die durch Western Blotting als citruilliniert identifizierten Flecken wurden aus einem SDS-PAGE-Gel ausgeschnitten. Die Banden wurden nach Shevchenko et al. 1996<sup>79</sup> reduziert, alkyliert und durch Trypsin verdaut. Nach der Extraktion und Entsalzung mittels Zip Tips (C18; Merck Millipore Ltd, Irland) wurden die Proben unter Verwendung von on-line nLC-MS/MS (RP C18) getrennt und auf einem LTQ Velos Orbitrap ETD MS (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) analysiert. Für die Trennung wurde ein 40-Minuten-Gradient von Puffer A und B (A: 0,1 % Ameisensäure in Wasser; B: 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril) verwendet: 5–30 % B in 35 Minuten, gefolgt von 30–95 % B in 5 Minuten. Die Durchflussrate betrug 300 nl/min. Die MS-Spektren wurden mit einer Auflösung von 60.000 aufgenommen, gefolgt von der Fragmentierung der 5 intensivsten Peaks unter Verwendung von CID und einer normalisierten

Kollisionsenergie von 30. Massenlisten wurden mit Raw2MGF v2.1.3 17 extrahiert und mit der Maskottchen-Suchmaschine v2.3.02 (Matrix Science Ltd., London, UK) in der Swiss-Prot-Datenbank (heruntergeladen von [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org) 2014010, enthält 546.790 Sequenzen) gesucht. Die folgenden Parameter wurden für die Datenbankabfrage verwendet: tryptischer Aufschluss (mit maximal zwei Fehlpaltungen); Carbamidomethylierung (C) als feste Modifikation; Oxidation (M), Pyroglutamat (N-Term Q), Deamidierung (N/Q) und Citrullinierung (R) als variable Modifikationen; 10 ppm als Vorläufer-Toleranz und 0,25 Da als Fragment-Toleranz. Spektren, die citrullinierte Peptide identifizierten, wurden manuell validiert, indem überprüft wurde, ob die Vorläufermasse korrekt zugeordnet war und ob die modifizierte Stelle mit den beobachteten Massenverschiebungen der Fragment-Ionen übereinstimmte. Die massenspektrometrischen Analysen und das Protokoll dazu führte Jimmy Ytterberg aus.

#### 3.4.12 Protein-Macro-Array-Analyse

Die Protein-Macro-Arrays wurden analog zur ELISA-Durchführung mit RA<sub>CH2007</sub>-PPAD citrulliniert, gefolgt von 3 Waschschritten der Arrays mit anschließender Blockierung und weiteren 3 Waschschritten sowie einer Inkubation der Citrullin-spezifischen monoklonalen Antikörper 1325:01BO9, 1325:04CO3 und humaner Anti-cit-Antikörper (Katalog-Nr. MQR2.101 ImmunoPrecise Antibodies ehemals ModiQuest Research, Oss, Niederlande). Der Nachweis spezifisch gebundener Antikörper erfolgte mit Sekundärantikörpern (anti-Maus-IgG-Fc-spezifischer AP-konjugierter Antikörper oder anti-Human-IgG-Fc-spezifischer AP-konjugierter Antikörper), gefolgt von einer Fluoreszenzsignaldetektion unter Verwendung von Attophos als Substrat auf einem Molecular-Devices-Storm-860-Scanner. Die Modifikation der Protein-Macro-Arrays mittels RA<sub>CH2007</sub>-PPAD wurde von mir entwickelt und die Detektion entsprechend dem Hersteller von mir vorgenommen.

#### 3.4.13 Immunhistochemische Analyse

Wir analysierten einen Anti-PPAD-Antikörper (PPAD-Peptid-Antikörper vom Kaninchen; Thermo Scientific) in 1:1.000 Verdünnung auf einem Gewebe-Mikroarray (TMA, Provitro, Berlin, Deutschland) mit Paraffinschnitten von menschlichem Synovialgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis (n=10), Osteoarthritis (n=12), Psoriasis-Arthritis (n=2) und von gesunden Spendern (gemäß Eigenauskunft; n=5). Die Immunfärbung des Antikörpers wurde nach dem Protokoll des Herstellers durch mich durchgeführt. 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) von meiner Kollegin Bianka Marklein und mir analysiert.

#### 3.4.14 Statistische Analyse

Der Mann-Whitney-Test wurde verwendet, um Unterschiede zwischen den Antikörperreaktionen auf die spezifischen Antigene in Serumproben zu vergleichen, und ein

gepaarter T-Test wurde verwendet, um Unterschiede zwischen den Antikörperreaktionen in Serumproben desselben Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten zu vergleichen. Die Cut-off-Werte der ELISAs wurden als Mittelwert plus 3 x Standardabweichung der ND (gemäß Eigenauskunft) definiert. Statistische Korrelationen wurden mittels Spearman-Korrelationstests berechnet. Die Berechnungen und Diagramme wurden mit GraphPAD-Prisma von mir erstellt.

#### 3.4.15 Online-Tools

Das Venn-Diagramm wurde mit dem Tool InteractiVenn<sup>80</sup> erstellt.

Das Konsensdiagramm wurde mit Weblogo, Version 2.8.2 ((2005-09-08) Genomforschung, 14:1188-1190, (2004))<sup>81</sup> erstellt.

Die Online-Tools und Graphen wurden von mir erstellt und in die Abbildungen der Publikation eingebunden.

### 3.5 Referenzen

1. Weyand CM, Schmidt D, Wagner U, Goronzy JJ. The influence of sex on the phenotype of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:817-822.
2. Linos A, Worthington JW, O'Fallon WM, Kurland LT. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota: a study of incidence, prevalence, and mortality. *Am J Epidemiol* 1980;111:87-98.
3. Dugowson CE, Koepsell TD, Voigt LF, Bley L, Nelson JL, Daling JR. Rheumatoid arthritis in women. Incidence rates in group health cooperative, Seattle, Washington, 1987-1989. *Arthritis Rheum* 1991;34:1502-1507.
4. Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002;4 Suppl 3:S265-272.
5. Nelson JL, Ostensen M. Pregnancy and rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1997;23:195-212.
6. Sherrer YS, Bloch DA, Mitchell DM, Young DY, Fries JF. The development of disability in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1986;29:494-500.
7. Toh ML, Miossec P. The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets. *Curr Opin Rheumatol* 2007;19:284-288.
8. Bugatti S, Codullo V, Caporali R, Montecucco C. B cells in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2007;6:482-487.
9. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51 Suppl 5:v3-11.
10. Burmester GR, Feist E, Dörner T. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10:77-88.

11. Nepom BS, Nepom GT. Polyglut and polymorphism. An HLA update. *Arthritis Rheum* 1995;38:1715-1721.
12. van Zeben D, Hazes JM, Zwinderman AH, Cats A, Schreuder GM, D'Amato J, Breedveld FC. Association of HLA-DR4 with a more progressive disease course in patients with rheumatoid arthritis. Results of a followup study. *Arthritis Rheum* 1991;34:822-830.
13. Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, Ollier WE. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 1993;32:903-907.
14. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, Silman AJ. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000;43:30-37.
15. Heliövaara M, Aho K, Aromaa A, Knekt P, Reunanen A. Smoking and risk of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1993;20:1830-1835.
16. Stolt P, Bengtsson C, Nordmark B, Lindblad S, Lundberg I, Klareskog L, Alfredsson L, group Es. 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;62:835-841.
17. Masdottir B, Jonsson T, Manfredsdottir V, Vikingsson A, Brekkan A, Valdimarsson H. Smoking, rheumatoid factor isotypes and severity of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2000;39:1202-1205.
18. Sugiyama D, Nishimura K, Tamaki K, Tsuji G, Nakazawa T, Morinobu A, Kumagai S. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis* 2010;69:70-81.
19. Carty SM, Snowden N, Silman AJ. Should infection still be considered as the most likely triggering factor for rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 2004;63 Suppl 2:ii46-ii49.
20. Leirisalo-Repo M. Early arthritis and infection. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:433-439.
21. de Pablo P, Chapple IL, Buckley CD, Dietrich T. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2009;5:218-224.
22. Li S, Yu Y, Yue Y, Zhang Z, Su K. Microbial Infection and Rheumatoid Arthritis. *J Clin Cell Immunol* 2013;4.
23. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998;101:273-281.
24. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000;43:155-163.
25. van de Stadt LA, de Koning MH, van de Stadt RJ, Wolbink G, Dijkmans BA, Hamann D, van Schaardenburg D. Development of the anti-citrullinated protein antibody repertoire prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63:3226-3233.
26. Wegner N, Wait R, Venables PJ. Evolutionarily conserved antigens in autoimmune disease: implications for an infective aetiology. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:390-397.

- 27.** Masson-Bessiere C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, Serre G. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol* 2001;166:4177-4184.
- 28.** Sebbag M, Moinard N, Auger I, Clavel C, Arnaud J, Nogueira L, Roudier J, Serre G. Epitopes of human fibrin recognized by the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins. *Eur J Immunol* 2006;36:2250-2263.
- 29.** Kinloch A, Tatzer V, Wait R, Peston D, Lundberg K, Donatien P, Moyes D, Taylor PC, Venables PJ. Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R1421-1429.
- 30.** Lundberg K, Kinloch A, Fisher BA, Wegner N, Wait R, Charles P, Mikuls TR, Venables PJ. Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum* 2008;58:3009-3019.
- 31.** Foulquier C, Sebbag M, Clavel C, Chapuy-Regaud S, Al Badine R, Mechin MC, Vincent C, Nachat R, Yamada M, Takahara H, Simon M, Guerrin M, Serre G. Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis Rheum* 2007;56:3541-3553.
- 32.** Degboé Y, Constantin A, Nigon D, Tobon G, Cornillet M, Schaefferbeke T, Chiochia G, Nicaise-Roland P, Nogueira L, Serre G, Cantagrel A, Ruysse-Witrand A. Predictive value of autoantibodies from anti-CCP2, anti-MCV and anti-human citrullinated fibrinogen tests, in early rheumatoid arthritis patients with rapid radiographic progression at 1 year: results from the ESPOIR cohort. *RMD Open* 2015;1:e000180.
- 33.** van Heemst J, Trouw LA, Nogueira L, van Steenberg HW, van der Helm-van Mil AH, Allaart CF, Serre G, Holmdahl R, Huizinga TW, Toes RE, van der Woude D. An investigation of the added value of an ACPA multiplex assay in an early rheumatoid arthritis setting. *Arthritis Res Ther* 2015;17:276.
- 34.** Dekkers J, Toes RE, Huizinga TW, van der Woude D. The role of anticitrullinated protein antibodies in the early stages of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2016;28:275-281.
- 35.** Toes R, Pisetsky DS. Pathogenic effector functions of ACPA: Where do we stand? *Ann Rheum Dis* 2019;78:716-721.
- 36.** McGraw WT, Potempa J, Farley D, Travis J. Purification, characterization, and sequence analysis of a potential virulence factor from *Porphyromonas gingivalis*, peptidylarginine deiminase. *Infect Immun* 1999;67:3248-3256.
- 37.** Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K, Kinloch A, Culshaw S, Potempa J, Venables PJ. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and  $\alpha$ -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:2662-2672.
- 38.** Stobernack T, Glasner C, Junker S, Gabarrini G, de Smit M, de Jong A, Otto A, Becher D, van Winkelhoff AJ, van Dijk JM. The Extracellular Proteome and Citrullinome of the Oral Pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *J Proteome Res* 2016.
- 39.** Gabarrini G, de Smit M, Westra J, Brouwer E, Vissink A, Zhou K, Rossen JW, Stobernack T, van Dijk JM, van Winkelhoff AJ. The peptidylarginine deiminase gene is a conserved feature of *Porphyromonas gingivalis*. *Sci Rep* 2015;5:13936.

40. Montgomery AB, Kopec J, Shrestha L, Thezenas ML, Burgess-Brown NA, Fischer R, Yue WW, Venables PJ. Crystal structure of Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2016;75:1255-1261.
41. El-Awady AR, Miles B, Scisci E, Kurago ZB, Palani CD, Arce RM, Waller JL, Genco CA, Slocum C, Manning M, Schoenlein PV, Cutler CW. Porphyromonas gingivalis evasion of autophagy and intracellular killing by human myeloid dendritic cells involves DC-SIGN-TLR2 crosstalk. *PLoS Pathog* 2015;10:e1004647.
42. Li L, Michel R, Cohen J, Decarlo A, Kozarov E. Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of Porphyromonas gingivalis. *BMC Microbiol* 2008;8:26.
43. Gao S, Li S, Ma Z, Liang S, Shan T, Zhang M, Zhu X, Zhang P, Liu G, Zhou F, Yuan X, Jia R, Potempa J, Scott DA, Lamont RJ, Wang H, Feng X. Presence of Porphyromonas gingivalis in esophagus and its association with the clinicopathological characteristics and survival in patients with esophageal cancer. *Infect Agent Cancer* 2016;11:3.
44. Demoruelle MK, Solomon JJ, Fischer A, Deane KD. The lung may play a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Int J Clin Rheumatol* 2014;9:295-309.
45. Totaro MC, Cattani P, Ria F, Tolusso B, Gremese E, Fedele AL, D'Onghia S, Marchetti S, Di Sante G, Canestri S, Ferraccioli G. Porphyromonas gingivalis and the pathogenesis of rheumatoid arthritis: analysis of various compartments including the synovial tissue. *Arthritis Res Ther* 2013;15:R66.
46. Darrah E, Rosen A, Giles JT, Andrade F. Peptidylarginine deiminase 2, 3 and 4 have distinct specificities against cellular substrates: novel insights into autoantigen selection in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2012;71:92-98.
47. Assouhou-Luty C, Raijmakers R, Benckhuijsen WE, Stammen-Vogelzangs J, de Ru A, van Veelen PA, Franken KL, Drijfhout JW, Pruijn GJ. The human peptidylarginine deiminases type 2 and type 4 have distinct substrate specificities. *Biochim Biophys Acta* 2014;1844:829-836.
48. Nakayama-Hamada M, Suzuki A, Kubota K, Takazawa T, Ohsaka M, Kawaida R, Ono M, Kasuya A, Furukawa H, Yamada R, Yamamoto K. Comparison of enzymatic properties between hPADI2 and hPADI4. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327:192-200.
49. Sugawara K, Oikawa Y, Ouchi T. Identification and properties of peptidylarginine deiminase from rabbit skeletal muscle. *J Biochem* 1982;91:1065-1071.
50. Rodriguez SB, Stitt BL, Ash DE. Expression of peptidylarginine deiminase from Porphyromonas gingivalis in Escherichia coli: enzyme purification and characterization. *Arch Biochem Biophys* 2009;488:14-22.
51. Stobernack T, du Teil Espina M, Mulder LM, Palma Medina LM, Piebenga DR, Gabarrini G, Zhao X, Janssen KMJ, Hulzebos J, Brouwer E, Sura T, Becher D, van Winkelhoff AJ, Gotz F, Otto A, Westra J, van Dijk JM. A Secreted Bacterial Peptidylarginine Deiminase Can Neutralize Human Innate Immune Defenses. *mBio* 2018;9.
52. Konig MF, Paracha AS, Moni M, Bingham CO, 3rd, Andrade F. Defining the role of Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase (PPAD) in rheumatoid arthritis through the study of PPAD biology. *Ann Rheum Dis* 2015;74:2054-2061.
53. Quirke AM, Lugli EB, Wegner N, Hamilton BC, Charles P, Chowdhury M, Ytterberg AJ, Zubarev RA, Potempa J, Culshaw S, Guo Y, Fisher BA, Thiele G, Mikuls TR, Venables PJ.

Heightened immune response to autocitrullinated *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase: a potential mechanism for breaching immunologic tolerance in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2014;73:263-269.

**54.** Araujo VM, Melo IM, Lima V. Relationship between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Review of the Literature. *Mediators Inflamm* 2015;2015:259074.

**55.** Moen K, Brun JG, Valen M, Skartveit L, Eribe EK, Olsen I, Jonsson R. Synovial inflammation in active rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis facilitates trapping of a variety of oral bacterial DNAs. *Clin Exp Rheumatol* 2006;24:656-663.

**56.** Reichert S, Haffner M, Keysser G, Schafer C, Stein JM, Schaller HG, Wienke A, Strauss H, Heide S, Schulz S. Detection of oral bacterial DNA in synovial fluid. *J Clin Periodontol* 2013;40:591-598.

**57.** van der Heijden IM, Wilbrink B, Tchetverikov I, Schrijver IA, Schouls LM, Hazenberg MP, Breedveld FC, Tak PP. Presence of bacterial DNA and bacterial peptidoglycans in joints of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. *Arthritis Rheum* 2000;43:593-598.

**58.** Rosenstein ED, Greenwald RA, Kushner LJ, Weissmann G. Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation* 2004;28:311-318.

**59.** Quirke AM, Fisher BA, Kinloch AJ, Venables PJ. Citrullination of autoantigens: upstream of TNFalpha in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *FEBS Lett* 2011;585:3681-3688.

**60.** Tanikawa C, Ueda K, Suzuki A, Iida A, Nakamura R, Atsuta N, Tohnai G, Sobue G, Saichi N, Momozawa Y, Kamatani Y, Kubo M, Yamamoto K, Nakamura Y, Matsuda K. Citrullination of RGG Motifs in FET Proteins by PAD4 Regulates Protein Aggregation and ALS Susceptibility. *Cell Rep* 2018;22:1473-1483.

**61.** Snir O, Rieck M, Gebe JA, Yue BB, Rawlings CA, Nepom G, Malmstrom V, Buckner JH. Identification and functional characterization of T cells reactive to citrullinated vimentin in HLA-DRB1\*0401-positive humanized mice and rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2011;63:2873-2883.

**62.** Lugli EB, Correia RE, Fischer R, Lundberg K, Bracke KR, Montgomery AB, Kessler BM, Brusselle GG, Venables PJ. Expression of citrulline and homocitrulline residues in the lungs of non-smokers and smokers: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2015;17:9.

**63.** Nagata H, Amano A, Ojima M, Tanaka M, Kataoka K, Shizukuishi S. Effect of binding of fibrinogen to each bacterium on coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus oralis*. *Oral Microbiol Immunol* 1994;9:359-363.

**64.** Kamaguchi A, Nakayama K, Ichiyama S, Nakamura R, Watanabe T, Ohta M, Baba H, Ohshima T. Effect of *Porphyromonas gingivalis* vesicles on coaggregation of *Staphylococcus aureus* to oral microorganisms. *Curr Microbiol* 2003;47:485-491.

**65.** Furuta N, Takeuchi H, Amano A. Entry of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles into epithelial cells causes cellular functional impairment. *Infect Immun* 2009;77:4761-4770.

**66.** Furuta N, Tsuda K, Omori H, Yoshimori T, Yoshimura F, Amano A. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles enter human epithelial cells via an endocytic pathway and are sorted to lysosomal compartments. *Infect Immun* 2009;77:4187-4196.

- 67.** Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T, Venables PJ. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:727-730.
- 68.** Snir O, Widhe M, von Spee C, Lindberg J, Padyukov L, Lundberg K, Engstrom A, Venables PJ, Lundberg J, Holmdahl R, Klareskog L, Malmstrom V. Multiple antibody reactivities to citrullinated antigens in sera from patients with rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1 alleles. *Ann Rheum Dis* 2009;68:736-743.
- 69.** Clarke A, Perry E, Kelly C, De Soyza A, Heesom K, Gold LI, Ollier W, Hutchinson D, Eggleton P. Heightened autoantibody immune response to citrullinated calreticulin in bronchiectasis: Implications for rheumatoid arthritis. *Int J Biochem Cell Biol* 2017;89:199-206.
- 70.** Hitchon CA, Chandad F, Ferucci ED, Willemze A, Ioan-Facsinay A, van der Woude D, Markland J, Robinson D, Elias B, Newkirk M, Toes RM, Huizinga TW, El-Gabalawy HS. Antibodies to porphyromonas gingivalis are associated with anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis and their relatives. *J Rheumatol* 2010;37:1105-1112.
- 71.** Berglund L, Bjorling E, Oksvold P, Fagerberg L, Asplund A, Szigyarto CA, Persson A, Ottosson J, Wernerus H, Nilsson P, Lundberg E, Sivertsson A, Navani S, Wester K, Kampf C, Hober S, Ponten F, Uhlen M. A gene-centric Human Protein Atlas for expression profiles based on antibodies. *Mol Cell Proteomics* 2008;7:2019-2027.
- 72.** Harlow L, Rosas IO, Gochuico BR, Mikuls TR, Dellaripa PF, Oddis CV, Ascherman DP. Identification of citrullinated hsp90 isoforms as novel autoantigens in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Arthritis Rheum* 2013;65:869-879.
- 73.** Demoruelle MK, Bowers E, Lahey LJ, Sokolove J, Purmalek M, Seto NL, Weisman MH, Norris JM, Kaplan MJ, Holers VM, Robinson WH, Deane KD. Antibody Responses to Citrullinated and Noncitrullinated Antigens in the Sputum of Subjects With Rheumatoid Arthritis and Subjects at Risk for Development of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2018;70:516-527.
- 74.** Reynisdottir G, Karimi R, Joshua V, Olsen H, Hensvold AH, Harju A, Engstrom M, Grunewald J, Nyren S, Eklund A, Klareskog L, Skold CM, Catrina AI. Structural changes and antibody enrichment in the lungs are early features of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:31-39.
- 75.** Chen T, Rimpilainen M, Luukkainen R, Mottonen T, Yli-Jama T, Jalava J, Vainio O, Toivanen P. Bacterial components in the synovial tissue of patients with advanced rheumatoid arthritis or osteoarthritis: analysis with gas chromatography-mass spectrometry and pan-bacterial polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* 2003;49:328-334.
- 76.** Zhao Y, Chen B, Li S, Yang L, Zhu D, Wang Y, Wang H, Wang T, Shi B, Gai Z, Yang J, Heng X, Yang J, Zhang L. Detection and characterization of bacterial nucleic acids in culture-negative synovial tissue and fluid samples from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients. *Sci Rep* 2018;8:14305.
- 77.** Smiljanovic B, Grutzkau A, Sorensen T, Grun JR, Vogl T, Bonin M, Schendel P, Stuhlmuller B, Claussnitzer A, Hermann S, Ohrndorf S, Aupperle K, Backhaus M, Radbruch A, Burmester GR, Haupl T. Synovial tissue transcriptomes of long-standing rheumatoid arthritis are dominated by activated macrophages that reflect microbial stimulation. *Sci Rep* 2020;10:7907.
- 78.** Grenier D, Mayrand D. Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun* 1987;55:111-117.

- 79.** Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996;68:850-858.
- 80.** Heberle H, Meirelles GV, da Silva FR, Telles GP, Minghim R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* 2015;16:169.
- 81.** Schneider TD, Stephens RM. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res* 1990;18:6097-6100.

## 4 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Madeleine Jenning, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase from an RA patient internally citrullinates major RA autoantigens"; „Porphyromonas gingivalis Peptidylargin-Deiminase aus einem RA-Patienten citrulliniert intern die wichtigen Autoantigene der RA“ 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](http://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 im Rahmen der Promotionsverfahren zum PhD bzw. MD/PhD**

Alle massenspektrometrischen Analysen wurden von Jimmy Ytterberg durchgeführt. Die erzeugten Daten wurden von mir in Abbildung 1A und Tabelle 1 dargestellt. Alle weiteren Experimente (Methodenteil) habe ich durchgeführt und dokumentiert. Alle weiteren Daten, Tabellen (Supplement) und Abbildungen (1B-D; 2A/B; 3A-E; 4A-E; 5A-C) wurden von mir erzeugt, ebenso die statistischen Auswertungen, die für die Publikation verwendet wurden. Bei der Publikationsentstehung haben Karl Skriner und Bianka Marklein mitgewirkt, in Form von Korrekturlesen und Verbesserungsvorschlägen.

**Publikation:** "Bacterial citrullinated epitopes generated by Porphyromonas gingivalis infection - a missing link for ACPA production"

**Autoren:** Madeleine Jennings, Bianka Marklein, Jimmy Ytterberg, Roman A Zubarev, Vijay Joshua, Dirkjan van Schaardenburg, Lotte van de Stadt, Anca Irinel Catrina, Ute Nonhoff, Thomas Häupl, Zoltán Konthur, Gerd R Burmester, Karl Skriner

**Titel:** "Bacterial citrullinated epitopes generated by Porphyromonas gingivalis infection - a missing link for ACPA production"

**Journal:** Annals Of The Rheumatic Diseases

**Erscheinungsdatum:** 12.06.2020

Beitrag im Einzelnen: Madeleine Jenning: Hauptarbeit an Experimenten, Datenerzeugung und –auswertung sowie Abbildungserstellung und Verfassung der Publikation. Bianka Marklein: Allgemeine Laborarbeit, Hilfe bei der Publikationsentstehung und beim Korrekturlesen. Jimmy Ytterberg: Alle massenspektrometrischen Analysen, sowie die Erklärung der Methodik. Roman A Zubarev: Vorgesetzter von Jimmy Ytterberg. Vijay Joshua: LURA-Serenkohorte mit klinischen Daten erhalten. Anca Irinel Catrina: Vorgesetzte von Vijay Joshua. Lotte van de Stadt: Early RA-Serenverlaufskohorte mit klinischen Daten erhalten. Dirkjan van Schaardenburg: Vorgesetzter von Lotte van de Stadt. Ute Nonhoff: Produktion der Protein-Macro-Arrays. Zoltán Konthur: Vorgesetzter von Ute Nonhoff. Thomas Häupl: Erstbetreuer der Promotion. Gerd R Burmester: Zweitbetreuer der Promotion. Karl Skriner: Vorgesetzter von Madeleine Jenning, Ideengeber und Hilfe bei der Publikationsentstehung und beim Korrekturlesen.

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## 5 AUSZUG AUS DER JOURNAL SUMMARY LIST

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI

Selected Categories: **"RHEUMATOLOGY"** Selected Category Scheme: WoS

**Gesamtanzahl: 31 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Nature Reviews Rheumatology	7,761	18.545	0.021650
2	ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES	44,754	14.299	0.082820
3	Arthritis & Rheumatology	10,169	9.002	0.046120
4	RHEUMATOLOGY	19,897	5.149	0.029990
5	SEMINARS IN ARTHRITIS AND RHEUMATISM	6,124	5.072	0.011650
6	Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease	817	5.045	0.002060
7	OSTEOARTHRITIS AND CARTILAGE	16,264	4.879	0.027140
8	ARTHRITIS CARE & RESEARCH	16,725	4.530	0.024540
9	ARTHRITIS RESEARCH & THERAPY	16,287	4.148	0.028820
10	CURRENT OPINION IN RHEUMATOLOGY	4,866	3.851	0.008140
11	Current Rheumatology Reports	2,855	3.645	0.005610
12	JOURNAL OF RHEUMATOLOGY	23,342	3.634	0.022670
13	RHEUMATIC DISEASE CLINICS OF NORTH AMERICA	2,234	3.527	0.003600
14	JOINT BONE SPINE	3,601	3.278	0.005480
15	CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY	8,671	3.238	0.012830
16	BEST PRACTICE & RESEARCH IN CLINICAL RHEUMATOLOGY	3,614	3.016	0.005500
17	LUPUS	7,708	2.924	0.009100
18	SCANDINAVIAN JOURNAL OF RHEUMATOLOGY	3,238	2.706	0.003880
19	Pediatric Rheumatology	1,290	2.673	0.003320
20	CLINICAL RHEUMATOLOGY	8,011	2.293	0.014140

## 6 PUBLIKATION

### 6.1 Annals of the Rheumatic Diseases Original research – Extended report

[Bacterial citrullinated epitopes generated by Porphyromonas gingivalis infection—a missing link for ACPA production | Annals of the Rheumatic Diseases \(bmj.com\)](https://ard.bmj.com/content/79/9/1194)

<https://ard.bmj.com/content/79/9/1194>

Ann Rheum Dis. 2020 Sep;79(9):1194-1202. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-216919. Epub 2020 Jun 12.

DOI: [10.1136/annrheumdis-2019-216919](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216919)

















## 6.2 Supplementary Material

[Bacterial citrullinated epitopes generated by Porphyromonas gingivalis infection—a missing link for ACPA production | Annals of the Rheumatic Diseases \(bmj.com\)](#)

<https://ard.bmj.com/content/79/9/1194>

Ann Rheum Dis. 2020 Sep;79(9):1194-1202. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-216919. Epub 2020 Jun 12.

DOI: [10.1136/annrheumdis-2019-216919](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216919)



















## 7 LEBENSLAUF

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

## 8 PUBLIKATIONSLISTE

### 8.1 Poster und Präsentationen

- 02. bis 04. März 2017 Teilnahme und Posterpräsentation “NEW MUTATED PEPTIDYLARGININE DEIMINASE FROM PORPHYROMONAS GINGIVALIS, A TARGET IN EARLY RA, CITRULLINATES MAJOR RA-AUTOANTIGENS“ beim 37. Europäischen Workshop für Rheumatologische Forschung EWRR in Athen, Griechenland
- Teilnahme und Posterpräsentation “New mutated Peptidylarginine Deiminase from *Porphyromonas gingivalis* a target in early RA citrullinates major RA-autoantigens” beim 8th International forum for RA 23.-26. September 2017 Stockholm, Schweden
- Posterpräsentation 6. November 2017 ACR “Mutated Peptidylarginine Deiminase from *Porphyromonas gingivalis* is a target in Rheumatoid Arthritis and citrullinates major RA-Autoantigens”
- Posterpräsentation “*Porphyromonas gingivalis* linked to RA-onset and anti-TNF alpha Treatment Nonresponse” auf dem 38. EWRR 22.-24.02.2018 in Genf, Schweiz
- 14th Dresden Symposium on Autoantibodies "*Porphyromonas gingivalis* Peptidylarginine Deiminase from RA patient citrullinates major RA autoantigens biomarkers for Interstitial Lung Disease Arthritis" 10.-13. September 2019 Gesellschaft zur Förderung der Immundiagnostik e.V.

### 8.2 Auszeichnungen

- Poster Award beim 38. EWRR 22.-24.02.2018 in Genf, Schweiz

- Dresden Prize für die Studie an Autoantikörpern 2019 Posterpräsentation und Vortrag

## 9 DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich Herrn Dr. Karl Skriner für sein beständiges Interesse am Fortgang der Arbeit, seinen Enthusiasmus und seine hilfreiche Unterstützung bei jeglichen fachlichen Fragen danken.

Besonders danken möchte ich Herrn PD. Dr. Thomas Häupl für die Funktion als Erstbetreuer, für die Zusammenarbeit und Diskussionsbereitschaft.

Für die Übernahme als Zweitbetreuer danke ich Herrn Prof. Dr. Gerd R. Burmester.

Vielen Dank an Bianka Marklein für die langjährige freundschaftliche Zusammenarbeit, die Fachkompetenz und Hilfsbereitschaft, die mir den Laboralltag angenehmer machte.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Freunden, die die nötige Geduld, das Verständnis und die Unterstützung aufbrachten, dass ich diese Arbeit erfolgreich abschließen konnte.

Dir, lieber Tino, ist die Arbeit gewidmet. Vielen Dank für Deine Freundschaft.

Danke an Dich, liebe Yvonne, für Deine Bereitschaft, mich bei meinen Vorhaben zu unterstützen und hinter mir zu stehen. Du bereicherst mein Leben.