

**Molekulare Analyse der humoralen Autoimmunantwort
gegen das knorpelspezifische Kollagen Typ II in der
Pathogenese der rheumatoiden Arthritis**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften



vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften

der Johann Wolfgang Goethe - Universität

in Frankfurt am Main

von Nadine Schneider

aus Offenbach am Main

Frankfurt 2014

(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften der

Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

Erster Gutachter: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. H. Burkhardt

Datum der Disputation: 30.03.2015

"If we knew what it was we were doing, it
would not be called research, would it?"

(Albert Einstein)

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	I
II. Zusammenfassung	V
1. Einleitung	1
1.1 Pathogenese der rheumatoiden Arthritis	2
1.2 B-Zell Differenzierung in der Keimzentrumsreaktion	4
1.3 Kollagen Typ II als Autoantigen in der rheumatoiden Arthritis	9
1.4 Antikörper gegen citrullinierte Proteine als RA-Marker	13
1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	16
2. Methoden	19
2.1 Zellbiologische Methoden	19
2.1.1 Kultivierung und Passagieren von Zelllinien	19
2.1.2 Isolierung von humanen Chondrozyten	19
2.1.3 Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen und B-Zellen aus Synovialgewebe von RA-Patienten	20
2.1.4 Durchflusszytometrie (FACS)	20
2.1.5 Transfektion von eukaryotischen Zelllinien	21
2.1.6 Inkubation von Chondrozyten mit verschiedenen Stimuli	21
2.1.7 STAT3 Reporter Assay	22
2.2 Immunhistologische Methoden	22
2.2.1 Histologische Übersichtsfärbung	22
2.2.2 Immunhistochemie	23
2.2.3 Immunhistochemie mit humanen Autoantikörpern aus Patientenserum	24
2.2.4 Immunfluoreszenz - Zellfärbungen	25
2.3 Isolation von Einzelzellen mittels Laser-Mikrodissektion und Einzelzell-PCR	25
2.3.1 Patientenmaterial	25
2.3.2 Immunhistochemie von Synovialmembran mittels biotinylierten CII-Peptiden	26
2.3.3 Einzelzell Isolierung mittels Laser-Mikrodissektion	27
2.3.4 Proteinase K Verdau	29
2.3.5 Einzelzell Isolierung mittels FACS	29
2.3.6 <i>Semi-nested</i> Einzelzell-PCR	29
2.3.7 Rekombinante Expression chimärer Antikörper in HEK 293T Zellen	32

2.4 Molekularbiologische Methoden.....	33
2.4.1 Isolation von RNA	33
2.4.2 Reverse Transkription von mRNA.....	33
2.4.3 Polymerase-Ketten-Reaktion	33
2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese	34
2.4.5 Klonierung in pGEM Vektor.....	35
2.4.6 Transformation chemisch kompetenter Bakterienstämme.....	35
2.4.7 Isolierung von Plasmid-DNA	36
2.4.8 Sequenzierung von DNA Fragmenten.....	36
2.4.9 Klonierung des löslichen LIF-Rezeptors.....	36
2.5 Biochemische Methoden	38
2.5.1 Herstellung von Zelllysaten	38
2.5.2 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	38
2.5.3 ELISA (<i>Enzyme-linked-immunosorbent-assay</i>).....	39
2.5.4 Immunpräzipitation.....	40
3. Material.....	41
4. Ergebnisse.....	50
4.1 Der Effekt des arthritogenen UL-1 Antikörpers auf Chondrozyten.....	50
4.1.1 Verstärkte Phosphorylierungen nach UL-1 Stimulation	51
4.1.2 Sequenzhomologie des CII-Epitops mit dem LIF-R.....	53
4.1.3 Expression des LIF-Rezeptors auf Chondrozyten	54
4.1.4 Kreuzreaktivität des UL-1 Antikörpers mit der ligandenbindenden Domäne	56
4.1.5 Analyse von phosphorylierten STAT3 nach UL-1 Stimulation	59
4.2 Autoantikörper gegen citrullinierte CII-Epitope und Rolle der Peptidylarginin-Deiminase in der Pathogenese der RA.....	71
4.2.1 Citrullinierte CII-Epitope	71
4.2.1 Bindung von Antikörpern an citrullinierte CII-Epitope im Knorpel.....	72
4.2.2 Expression der Peptidylarginin-Deiminase im Knorpelgewebe.....	74
4.2.3 Expression der Peptidylarginin-Deiminase in OA-Chondrozyten	77
4.2.4 Erhöhte PAD-Expression nach Induktion von oxidativen und genotoxischen Streß in Chondrozyten.....	79
4.3 Detektion von CII-spezifischen B- und Plasmazellen in der Synovialmembran von Patienten mit rheumatoider Arthritis.....	82
4.3.1 Detektion von anti-CIIC1 produzierende Plasmazellen	84
4.3.2 Nachweis von ektopischen Keimzentren im inflammatorischen Synovialgewebe.....	88

4.3.3 Laser-Mikrodissektion von Einzelzellen aus dem Synovialgewebe von RA-Patienten und Amplifikation der variablen Antikörperregion	90
4.3.4 V-Gen Amplifikation von zytofluorimetrisch sortierten singulären ClIC1-spezifischen B-Zellen aus dem peripheren Blut und Synovialgewebe von RA-Patienten	96
4.3.5. Rekombinante Expression der ClIC1-spezifischen Antikörper und Validierung der Antigenspezifität mittels ELISA	101
5. Diskussion	104
5.1 Citrulliniertes Kollagen: Zielstruktur von Autoantikörpern in RA-Seren	105
5.2 Chondrozytäre Expression von PAD2 und PAD4	106
5.3 Gesteigerte PAD-Expression im pathophysiologischen Kontext.....	107
5.4 Pathogenetische Assoziation zum <i>HLA-DR</i> Locus.....	108
5.5 ClIC1-Epitop-spezifische Plasmazellen im RA-Synovialgewebe	109
5.6 Präferentielle V-Genverwendung von ClIC1-Epitop-spezifischen synovialen Plasmazellen und peripherer B-Zellen	113
5.7 Ausblick	115
III. Literaturverzeichnis	117
IV. Abkürzungsverzeichnis	126
V. Publikationen und Kongressbeiträge	127
VI. Danksagung	128
VII. Eidesstattliche Erklärung	131
VIII. Lebenslauf	131

II. Zusammenfassung

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine idiopathische chronisch-entzündliche Systemerkrankung, mit primärer Gelenkmanifestation. Die fortschreitende Gelenkentzündung ist die Folge einer immunologischen Fehlerkennung von Gelenkstrukturen durch dysregulierte B- und T-Lymphozyten. So lassen sich in bis zu 70% der entzündeten Gelenke von RA-Patienten IgG-Autoantikörper gegen das knorpelspezifische Kollagen Typ II (CII) nachweisen.

In dieser Arbeit wurde die CII-Epitop-spezifische humorale Autoimmunantwort in der Pathogenese der RA auf molekularer Ebene analysiert. Im Mittelpunkt stehen hierbei bereits gut charakterisierte B-Zell-Epitope auf dem CII, die über die Speziesbarrieren hinweg evolutionär konserviert sind und sowohl in der humanen RA als auch in der murinen Experimentalerkrankung des CIA-Modell (*Collagen-Induced-Arthritis*) immundominante Strukturen der humoralen arthritogenen Autoimmunität darstellen.

Ein Teilaspekt der Arbeit war die Aufklärung des molekularen Mechanismus, der den katabolen Effekten des murinen arthritogenen CII-Autoantikörper (UL-1) auf den chondrozytären Matrixmetabolismus zugrunde liegt, gewidmet. Der gegen ein immundominantes Epitop (U1-Epitop) auf dem CII gerichtete monoklonale Antikörper kann unabhängig von seinen Fc-vermittelten inflammatorischen Effektorfunktionen, eine direkte Schädigung der Knorpelmatrix über eine Modulation des Chondrozytenmetabolismus im CIA-Modell bewirken. Basierend auf der Analyse von Sequenzhomologien des U1-Epitopes konnte eine immunologische Kreuzreaktivität mit dem LIF (*Leukemia-Inhibitory-Factor*)-Rezeptor auf Chondrozyten nachgewiesen werden. Weitergehende funktionelle Studien haben jedoch gezeigt, dass die Rezeptorbindung durch den Antikörper keine intrazellulären Signalwege aktiviert, die an der aus der Literatur bekannten Proteoglykan-depletierenden Wirkung des Zytokins LIF beteiligt sind. Während somit eine UL-1 abhängige Aktivierung des LIF-Rezeptors als Erklärungsmodell der katabolen Antikörperwirkung ausscheidet, konnten die funktionellen *in vitro* Studien eine spezifische UL-1 Antikörper abhängige Src-Kinaseaktivierung in den humanen Chondrozyten als Ansatzpunkt für zukünftige Studien nachweisen.

In der RA-Pathogenese wird die Bedeutung posttranslationaler Modifikationen, insbesondere der Deiminierung von Argininresten unter Bildung von Citrullin für die Neoepitopgenerierung diskutiert. Autoantikörper gegen citrullinierte Peptide (ACPA,

anti-citrullinated-peptides-antibody) gelten als diagnostische und verlaufsprädiktive Marker der RA. Zielstrukturen für ACPAs sind nicht nur einige ubiquitär exprimierte Proteine, sondern auch das knorpelspezifische CII. In dieser Arbeit konnte erstmals die *in vitro* Bindung CII-spezifischer ACPAs an Knorpelgewebe von RA-Patienten, das als asserviertes Biomaterial aus Synovektomie- bzw. Gelenkersatzoperationen zur Verfügung stand, nachgewiesen werden. Darüber hinaus gelang der erstmalige Nachweis einer chondrozytären Expression der für die posttranslationale Modifikation verantwortlichen Peptidylarginin-Deiminasen (PAD) PAD2 und PAD4 im Knorpelgewebe und ihre Hochregulation in den Chondrozyten unter oxidativem und genotoxischem Stress. Diese Stressoren sind an degenerativen Knorpelveränderungen in der Pathogenese der Osteoarthritis (OA) beteiligt, sodass die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese stützen, dass Degenerationsprozesse des alternden Knorpels zur Expression kollagenmodifizierender PAD-Enzyme führen und damit die immunologische Selbsttoleranz des Knorpelgewebes durch Neoepitop-Generation in der Knorpelmatrix schwächen können.

Ein zentraler Aspekt der Arbeit galt der Analyse der CII-spezifischen humoralen Immunantwort im Blut und in der entzündlich veränderten Synovialmembran von RA-Patienten über die vergleichende Analyse der rearrangierten Immunglobulingene in epitopspezifisch über biotinylierte CII-Peptide markierten B- und Plasmazellen. Die Isolation der markierten Zellen erfolgte mittels Laser-Mikrodissektion aus dem Gewebe und durchflusszytometrisch aus dem peripheren Blut. Die anschließende Sequenzanalyse der mittels *semi-nested* Einzelzell-PCR amplifizierten, für die variable Region der leichten und schweren Antikörperkette kodierenden V-Gene, ergab für die Erkennung des immundominanten CII1-Epitopes eine präferentielle V-Genverwendung. Darüber hinaus spricht der Nachweis höherer Mutationsraten in synovialen Plasmazellen im Vergleich zu CII-spezifischen B-Zellen im Blut für eine lokale synoviale Affinitätsreifung der Antikörperantwort. Die Klonierung der amplifizierten V-Gene in einen eukaryotischen Expressionsvektor ermöglicht die Expression rekombinanter Antikörper und deren Validierung im ELISA. Zukünftige Affinitätsbestimmungen und Kristallstrukturanalysen dienen dem verbesserten molekularen Verständnis der CII-Antikörpererkennung und murine Antikörpertransferexperimente der Evaluation der Arthritogenität der humanen CII-Antikörperantwort. Fernziel ist die Entwicklung einer auf der CII-Antigenspezifität beruhenden immunmodularischen Therapie der RA.

1. Einleitung

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist mit einer Prävalenz von 1% die häufigste entzündliche Erkrankung der Gelenke (Smith & Arnett 1991). Es handelt sich um eine systemische Autoimmunerkrankung des Menschen mit unbekannter Ätiologie, bei der die körpereigenen Gelenkstrukturen wie Knorpel und Knochen vom Immunsystem als Zielstrukturen erkannt werden. Die Erkrankung kann in jedem Lebensalter auftreten mit einem Erkrankungsgipfel in der 5. und 6. Lebensdekade, während Frauen dreimal häufiger erkranken als Männer (Symmons 2002). Die Krankheit verläuft schubweise progredient, dabei kommt es neben der symptomatischen Morgensteife initial häufig zum symmetrischen Befall der kleinen Finger- und Zehengelenke, den sogenannten Metacarpophalangealgelenken (MCP) und den proximalen Interphalangealgelenken (PIP) (Lorenz 2012). Die betroffenen Gelenke können als Folge der entzündeten Gelenkinnenhaut (Synovialitis) geschwollen, überwärmt und gerötet sein. Die chronische Gelenkentzündung zeichnet sich durch eine progressive Zerstörung von Gelenkstrukturen wie Knorpel, Knochen und den Ligamenten aus, was im weiteren Krankheitsverlauf zu deformierenden irreversiblen Veränderungen mit Funktionseinschränkung führen kann (Aletaha et al. 2006). IgM Autoantikörper mit Spezifität für Fc-Domänen von IgG Molekülen, sogenannte Rheumafaktoren (RF), können in 60-80% der Fälle (Nishimura 2007; Nell et al. 2005) im Serum der Patienten nachgewiesen werden, während ca. 20% der Patienten auch nach jahrelanger Krankheit „seronegativ“ bleiben. Statistisch gesehen ist die Lebenswahrscheinlichkeit von RA-Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung um 5-10 Jahre vermindert (Minaur et al. 2004). Die Diagnose basiert auf der 2010 veröffentlichten überarbeiteten Version der klinischen Kriterien des *American College of Rheumatology* (ACR) und dem Fachverband der europäischen Rheumatologen (EULAR) (Aletaha et al. 2010).

1.1 Pathogenese der rheumatoiden Arthritis

Bis heute ist die Pathogenese der RA noch nicht vollständig geklärt. Man geht von einer multifaktoriellen Krankheitsentwicklung aus, wobei eine vorliegende genetische Prädisposition, Umwelt- und Lebensstilfaktoren wie Streß oder starkes Rauchen im Zusammenspiel mit mikrobiellen Erregern, welche das fein ausbalancierte Immunsystem aus dem Gleichgewicht bringen beim Ausbruch der Krankheit eine potenziell kritische Rolle spielen (McInnes & Schett 2011).

Zwillingsstudien und andere genetische Analysen zeigten eine genetische Assoziation mit Loci, die für humane Leukozyten-Antigene (HLA) der Klasse II kodieren, vor allem mit bestimmten Allelen des *HLA-DRB1-Gens*, welches für die β 1-Kette des DR-Moleküls kodiert (Stastny 1978). Insbesondere Träger der Allele *HLA-DRB1*0404*, *HLA-DRB1*0401* und *HLA-DRB1*0101* besitzen ein erhöhtes Risiko eine RA zu entwickeln. Die Gemeinsamkeit dieser Allele ist ein bestimmtes Epitop, das sogenannte „*shared epitope*“, welches aus einer kurzen Aminosäuresequenz (QKRAA; Aminosäure 70 bis 74) besteht (Gregersen et al. 1987). Während B-Zellen Antigene über ihre Oberflächenrezeptoren erkennen, können T-Helferzellen Peptide nur erkennen, wenn sie ihnen von Antigenpräsentierenden Zellen dargeboten werden. Das „*shared epitope*“ liegt genau in dem Bereich des HLA-Klasse-II-Moleküls, der für die Bindung der Peptide verantwortlich ist und bestimmt somit, welche Peptide von HLA-DRB1 gebunden und den T-Helferzellen präsentiert werden. Die Peptiderkennung hat einen maßgeblichen Einfluß darauf, welche Antigene von T-Zellen erkannt werden und somit auch welche B-Zellen aktiviert werden. Aus dem großen Repertoire von B-Zellen mit unterschiedlichen Antigenrezeptoren werden nur die aktiviert, die das Antigen binden und die entsprechenden Peptidfragmente mittels HLA-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentieren können. Die gegenseitige Abhängigkeit und komplexe Interaktion von T-Helferzellen und B-Zellen verdeutlicht, warum es eine so enge Assoziation zwischen Genen des HLA-Lokus und einer Prädisposition für eine Autoimmunerkrankung gibt und impliziert damit eine wichtige Rolle beider Zelltypen in der Pathogenese der RA.

Das Hauptcharakteristikum der RA ist der erosive Entzündungsprozess, der zur Zerstörung von Gelenkstrukturen führt und aus der Interaktion zwischen Zellen des

angeborenen und adaptiven Immunsystems resultiert (Firestein 2003). Der artikuläre Knorpel der diarthrodialen Gelenke befindet sich in einer Gelenkkapsel, die aus der äußeren *Membrana fibrosa* und der inneren *Membrana synovialis* (Synovialmembran) besteht (Abb. 1.1). Diese Gelenkinnenhaut wird aus zwei Zelltypen gebildet, den Typ A Synoviozyten (Makrophagenartig) und den Typ B Synoviozyten (Fibroblastenartig), die das gesunde Gelenk ein- bis zweilagig umschließen (Hawtree et al. 2013). Der Entzündungsprozeß ist durch drei Phänomene gekennzeichnet; der synovialen Hyperplasie, der Bildung von pathologischen Immunkomplexen und einer progressiven Gelenkzerstörung (Gay et al. 1993; Seemayer et al. 2001).

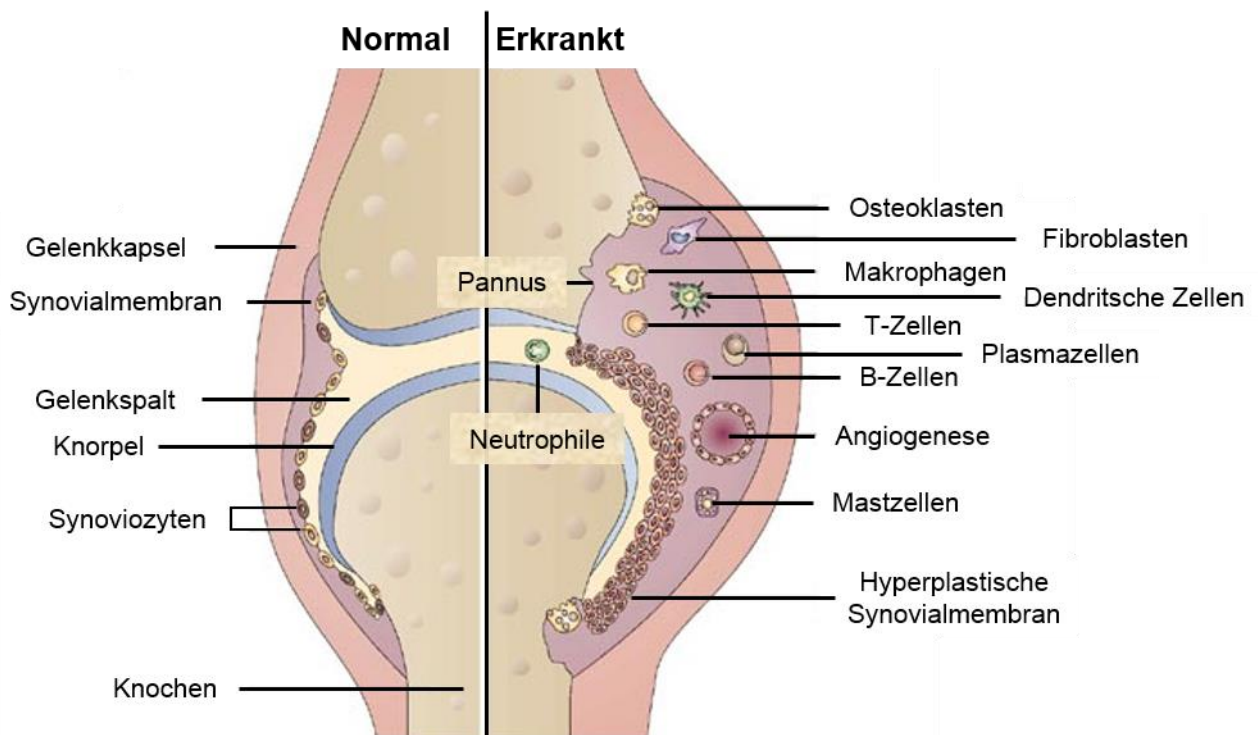


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines normalen und erkrankten Gelenks. Die dünne Synovialmembran umschließt das gesunde Gelenk, bestehend aus meist einer Lage Synoviozyten (links). Das arthritische Gelenk hingegen zeichnet sich durch eine hyperplastische Synovialmembran aus, die von inflammatorischen Zellen infiltriert wird (rechts). Weitere Erklärungen im Text. Abbildung wurde modifiziert nach (Strand et al. 2007).

Dabei kommt es im betroffenen Gelenk durch die Neovaskularisierung zur Einwanderung von Entzündungszellen (Rowley et al. 2008), wie z.B. Makrophagen, die ihrerseits knochenabbauende Osteoklasten aktivieren. Die Hyperplasie der Synovialmembran ist die Folge eines gestörten Gleichgewichts von Apoptose- und

Proliferationsprozessen in den Makrophagen ähnlichen und fibroblastoiden Synoviozyten (Firestein 2003), das zur Bildung einer mehrschichtigen Gelenkinnenhaut führt. Mit der Synovialhyperplasie einhergehend findet eine gesteigerte Angiogenese und Neovaskularisierung statt, die die Ausbildung eines faserreichen Granulationsgewebe (Thomas 2004), den sogenannten Pannus, mit lokal infiltrativem Wachstum in die Umgebung begünstigt und zur Destruktion des Knorpelgewebes und subchondraler Knochenerosionen führt (Abb. 1.1).

Die Infiltration von Immunzellen in das entzündliche Gelenk hat zudem die Produktion von proinflammatorischen Botenstoffen zur Folge, welche das fein regulierte lokale Zytokinnetzwerk maßgeblich beeinflussen. Sie führen zur Chemotaxis entzündlicher Zellen ins Gelenk und regulieren deren Aktivierung, Interaktion und Sekretionsverhalten (Brennan & McInnes 2008). Die Produktion dieser immunregulatorischen Glykoproteine kann durch mikrobielle Antigene, Komplementfaktoren, Immunkomplexe, Akute-Phase-Proteine sowie andere Zytokine induziert werden (Okroj et al. 2007).

Die Destruktion von Knorpel- und Knochenstrukturen im inflammatorischen Gelenk wird durch aktivierte Proteinase vermittelt, die vor allem von RA-Synovialfibroblasten, aber auch von Makrophagen und Neutrophilen sowie Chondrozyten produziert werden (Seemayer et al. 2001). Verantwortlich dafür sind maßgeblich die Matrixmetalloproteinase (z.B. Kollagenase und Stromelysin), Cysteinproteasen (z.B. Kathepsine) und Serinproteinasen (z.B. Elastase) (Konttinen et al. 1999; Keyszer et al. 1998). Die Expression dieser proteolytischen Enzyme führt zum Verdau der extrazellulären Matrix und dem Verlust der artikulären Integrität (Rowley et al. 2008).

1.2 B-Zell Differenzierung in der Keimzentrumsreaktion

Die im Knochenmark gebildeten B-Zellen repräsentieren als Träger der humoralen Immunantwort eine konstitutive Komponente des adaptiven Immunsystems. Jede B-Zelle exprimiert einen individuellen Zellmembran-verankerten B-Zell-Rezeptor (BCR), der für die Antigenerkennung ein Liganden-bindendes variables Immunglobulinmolekül der jeweiligen Isotypklasse (IgG, IgM, IgA oder IgE) verwendet und einen assoziierten der Signaltransduktion dienenden konservierten heterodimeren

Transmembranproteinkomplex bestehend aus den Molekülen CD79 A und B (auch: *Immunoglobulin-associated α und β , mb-1 und B29*) enthält (Astsaturov et al. 1996). Interaktionen mit dem Korezeptor-Proteinkomplex CD19, CD21 und CD81 dienen der Signalverstärkung um den Faktor 100. Die Diversität der Antigenpezifität des BCR-Repertoires wird durch die Unterschiede in der Aminosäuresequenz der Antigenbindestelle, die von den variablen (V) Regionen des Rezeptors gebildet werden, bestimmt. Dabei ist in jeder Kette die V-Region mit einer unveränderlichen konstanten (C) Region verknüpft (Abb. 1.2). Da allerdings aus Platzmangel nicht jede Variante der Rezeptorketten vollständig im Genom codiert sein kann, wird die enorme Diversität des BCRs erst durch die Rearrangierung des Immunglobulinlokus generiert. In der Lymphozytenentwicklung werden daher die einzelnen Gensegmente der V-Region durch somatische DNA-Rekombination zu einer kompletten V-Region-Sequenz verknüpft.

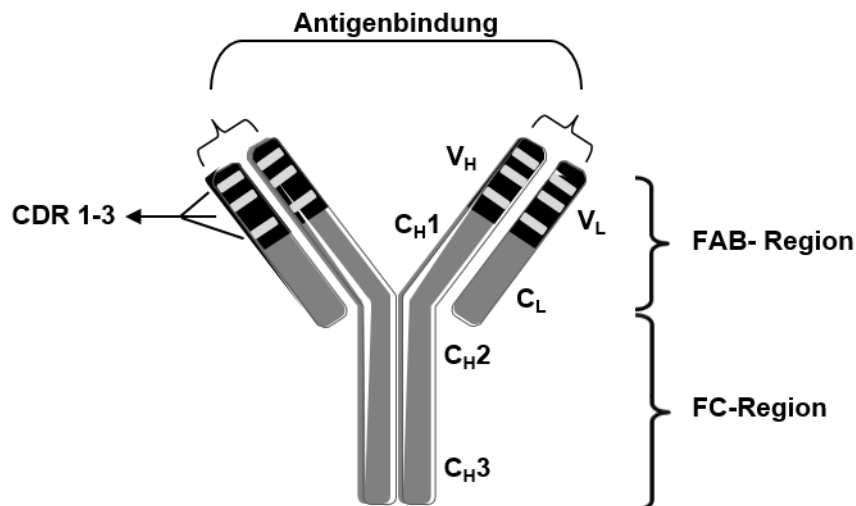


Abb. 1.2: Struktur eines IgG Moleküls. Das Immunglobulinmolekül besteht aus vier Polypeptidketten: je zwei identische schwere (H) und leichte (L) Ketten, welche über Disulfidbrückenbindungen miteinander gekoppelt sind. Unterteilen lassen sich schwere und leichte Antikörperkette jeweils in eine variable (V) Region, die am N-terminalen Ende der Polypeptidkette lokalisiert ist und die konstante (C) Region am C-terminalen Ende. Mutationen in der CDR 1-3 (*Complementary Determining Region*) der variablen Region sind entscheidend für die Antigenaffinität. Abbildung wurde modifiziert nach (Tonegawa 1983).

Die variable (V) Region der schweren Kette (*heavy chain* = H) besteht aus drei Gensegmenten, *variable* (VH), *diversity* (DH) und *joining* (JH) Region, während die V-Region der leichten Kette sich nur aus V- und J-Gensegmenten zusammensetzt (Tonegawa 1983). Bei der leichten Antikörperkette (*light chain* = L) wird zwischen

Lambda (λ) und *Kappa* (κ) unterschieden. Der humane IgGH-Lokus befindet sich auf Chromosom 14 und umfasst ca. 50 funktionale VH-, 27 DH- und 6 JH-Gene. Jedes VH-Segment kann mit jedem DH- und mit jedem JH-Segment rekombiniert werden, womit eine große Antikörperdiversität der V-Gene der schweren Kette entsteht. Zwar ist diese große Diversität bei der Rekombination der leichten Kette durch das Fehlen des D-Segmentes eingeschränkt, dennoch kann durch V-J-Rekombination auch eine große Variationsvielfalt hervorgerufen werden. Der humane $V\kappa$ -Lokus liegt auf Chromosom 2 und umfasst 30-35 funktionale $V\kappa$ - und 5 $J\kappa$ -Gene. Der humane $V\lambda$ -Lokus befindet sich auf Chromosom 22 und besteht aus 30-37 funktionalen $V\lambda$ und 4 $J\lambda$ Genen (Übersicht in: Küppers et al. 2013).

Die eben beschriebene primäre Umlagerung der Immunglobulingene durch somatische Rekombination erzeugt bereits ein BCR-Repertoire naiver B-Zellen von ungefähr 10^{18} , einschließlich der junktionalen Vielfalt, die durch Entfernen oder Hinzufügen einzelner Nukleotide während des Rekombinationsvorgangs entsteht (Übersicht in Janeway et al. 2001). Nach Entwicklungsabschluß im Knochenmark zirkulieren die reifen aber naiven B-Zellen durch das Blut zu den peripheren lymphatischen Geweben.

Die Neovaskularisation der Synovialmembran während des Entzündungsprozesses der RA ermöglicht die Einwanderung von Lymphozyten in das rheumatoide Gelenk (Strand et al. 2007). Dabei kann die Migration von B-Zellen die Bildung einer organisierten Lymphstruktur zur Folge haben, die bei ca. 10% der RA-Patienten zu beobachten ist und aus mehrheitlich CD20 positiven B-Zellen besteht, die netzwerkartig von folliculären dendritischen Zellen (FDC) durchzogen sind (Berek 2005) (Abb. 1.3). Bis zur Entdeckung dieser sogenannten ektopischen Keimzentren im inflammatorischen Synovialgewebe galt die chronische Gelenkentzündung als ein Antigen-unabhängiger Prozess (Magalhães et al. 2002). Untersuchungen haben gezeigt, dass die neu entstandenen ektopischen Lymphstrukturen eine Keimzentrumsreaktion voll unterstützen (Humby et al. 2009; Magalhães et al. 2002). Keimzentren sind hoch spezialisierte Strukturen im sekundären Lymphgewebe, in denen B-Zellen verschiedene Proliferationsstadien durchlaufen. Durch somatische Hypermutation passen die B-Zellen die Affinität ihres Rezeptors an das jeweilige Antigen an, um in der Konkurrenz mit anderen B-Zellen um antigenabhängig

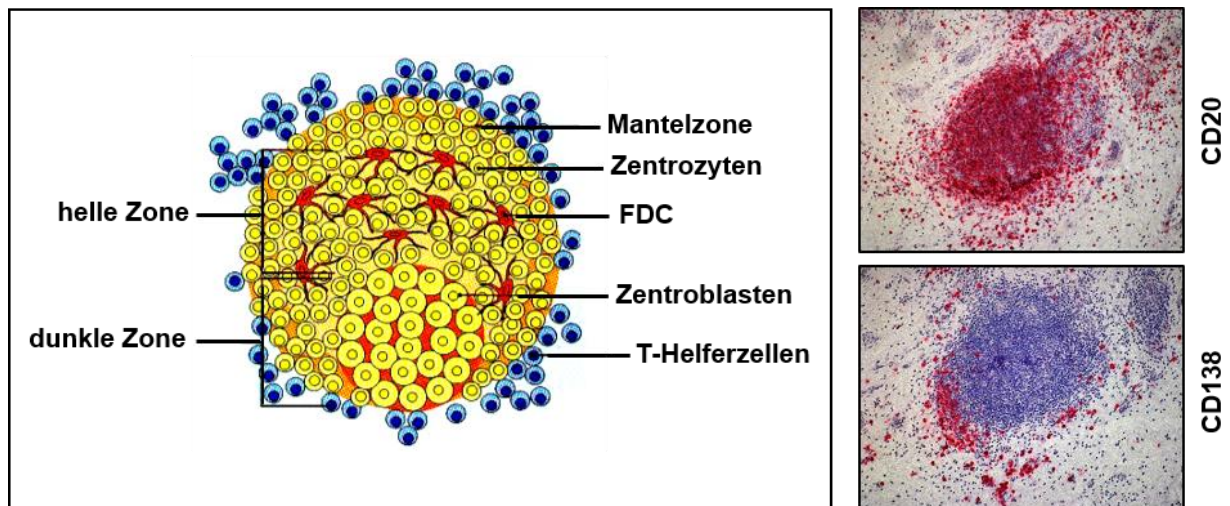


Abb. 1.3: Aufbau eines Keimzentrums im sekundären Lymphgewebe. Die schematische Darstellung (links) eines Keimzentrums zeigt die Unterteilung in eine helle und dunkle Zone, die Verteilung der Immunzellen sowie die netzwerkartige Ansammlung von folliculären dendritischen Zellen (FDC). Das Schema wurde modifiziert nach (Buchbeitrag: Janeway et al. 2001). Konsekutive immunhistologische Färbungen (rechts) vom inflammatorischen Synovialgewebe eines RA-Patienten zeigen eine organisierte Lymphstruktur, angefärbt mit dem B-Zellmarker CD20 und dem Plasmazellmarker CD138. Die Aufnahmen wurden im Rahmen dieser Arbeit angefertigt.

vermittelte Überlebenssignale der Apoptoseinduktion zu entgehen (Honjo et al. 2002; Liu et al. 1989). Die zunächst durch ein Antigen aktivierten B-Zellen (Zentroblasten) unterliegen einer massiven klonalen Expansion, wodurch eine dicht gepackte Zone aus proliferierenden Zellen entsteht, die "dunkle Zone" des Keimzentrums (Abb. 1.3 und 1.4). In der weiteren Entwicklung reduzieren einige der B-Zellen ihre Teilungsrate und exprimieren ein höheres Level an Oberflächen IgG. Diese Zentrozyten bilden nun die "helle Zone" des Keimzentrums, ein Bereich der von einem FDC-Netzwerk durchzogen ist und somit weniger Zelldichte aufweist (Übersicht in Janeway et al. 2001). Eigentlich kommen FDC nur in den sekundären Lymphorganen (Lymphknoten, Milz) vor und bilden dort die netzartige Grundstruktur des Primärfollikels in das sich die B-Zellen einnisten (Berek 2005). Da sich normalerweise keine FDC in der Synovialmembran finden lassen, ist eine solche Keimzentrumsstruktur im Synovialgewebe äußerst erstaunlich. Auch wenn die Herkunft dieser Zellen und die Ausbildung dieser Netzwerkstrukturen noch unklar ist, wird die Ausdifferenzierung aktivierter Synovialfibroblasten zu FDCs während des chronischen Entzündungsprozesses diskutiert (Lindhout et al. 1999). Neben dem Klassenwechsel der konstanten Antikörperregion (Isotypenwechsel) kommt es zu

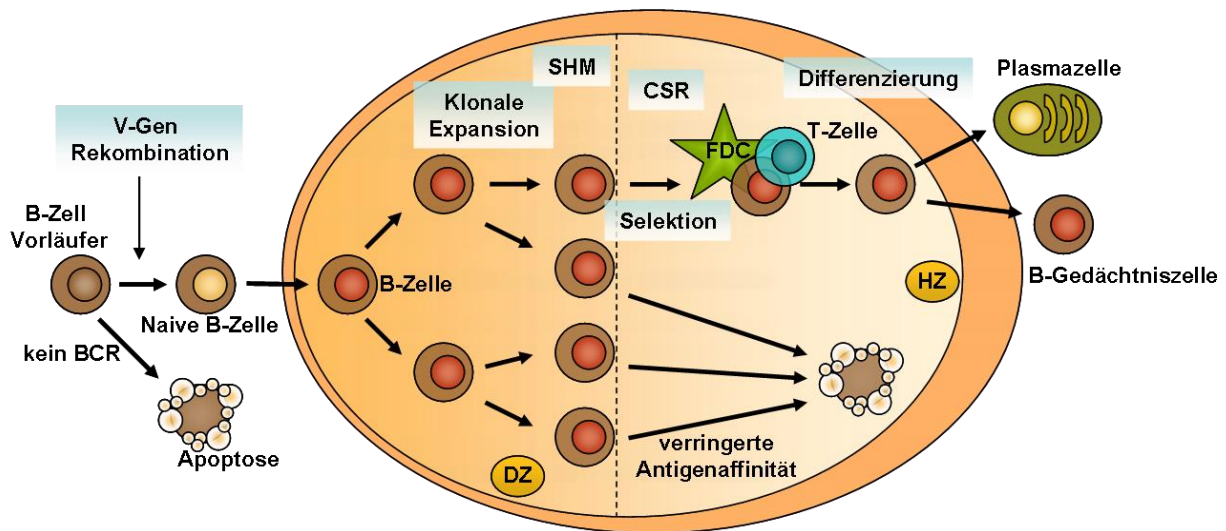


Abb. 1.4: B-Zell Differenzierung während der Keimzentruksreaktion. Die frühe B-Zell Entwicklung im Knochenmark beinhaltet die V-Gen Rekombination von schwerer und leichter Antikörperkette. Nur Zellen mit einem funktionalen B-Zell-Rezeptor (BCR) differenzieren zu reifen naiven B-Zellen, die das Knochenmark verlassen. Nach Antigenaktivierung durchlaufen die B-Zellen eine klonale Expansion in der dunklen Zone (DZ) des Keimzentrums. Nach somatischer Hypermutation (SHM) und Klassenwechsel (*Class Switch Recombination*, CSR) erhalten die positiv selektionierten B-Zellen in der hellen Zone (HZ) den notwendigen Überlebensstimulus und differenzieren zu Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen, während die anderen B-Zellen in die Apoptose gehen. Schaubild wurde modifiziert nach (Küppers 2005).

somatischen Mutationen in den Genen der variablen Regionen der leichten und schweren Antikörperketten (Berek et al. 1991), welche neben der primären Genumlagerung eine weitere Diversifikation der V-Gene zur Folge hat. Die hoch spezialisierten FDCs präsentieren den B-Zellen das Antigen in Form von Antigen-Antikörper-Komplexen, die sowohl über Komplementrezeptoren als auch über Fc-Rezeptoren gebunden werden (Kim & Berek 2000). Somatische Mutationen in der variablen Antikörperregion haben eine gesteigerte oder erniedrigte Affinität der BCR zu ihrem Antigen zur Folge, welches zu einer Positivselektion von hochaffinen B-Zell-Rezeptoren führt. Nur die Rezeptoren mit einer hohen Affinität zum präsentierten Antigen können dieses binden, internalisieren und nach Prozessierung auf der Zelloberfläche, gebunden an MHCII (*Major Histocompatibility Complex*, HLA-Komplex), exprimieren. Nach anschließender Wanderung an den Rand der „hellen Zone“ erfahren die B-Zellen, die das Antigen mit hoher Affinität gebunden an den BCR präsentieren, T-Zellhilfe. In der Interaktion mit den CD4 positiven T-Helferzellen

erhalten die B-Zellen Differenzierungssignale über kostimulatorische Moleküle (z.B. CD40/CB40L Ligation) oder vermittelt durch Zytokinrezeptoren (z.B. IL-10). Sie entwickeln sich entweder zu antikörpersezernierenden Plasmazellen oder zu Gedächtnis-B-Zellen, die sich im Falle eines erneuten Antigenkontaktes wesentlich schneller in Plasmazellen differenzieren können (Abb. 1.4) (Berek 2005). Da die Vorläufer der Gedächtnis-B-Zellen bereits eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen haben, weisen sie auch die genetischen Veränderungen auf, die im Keimzentrum generiert wurden, einschließlich der somatischen Hypermutation und des Klassenwechsels. B-Zellen mit einem BCR, der das Antigen nur mit niedriger Affinität bindet und somit den T-Zellen kein Antigen präsentieren kann, erhalten keine Überlebenssignale und werden durch Apoptose eliminiert (Übersicht in Janeway et al. 2001).

1.3 Kollagen Typ II als Autoantigen in der rheumatoiden Arthritis

Der chronische Entzündungsprozeß im Rahmen der RA-Pathogenese führt zur Destruktion von Knorpel- und Knochenstrukturen. Der artikuläre Knorpel besteht zu 70-80% aus Wasser, 15% aus Kollagen, 9% aus Proteoglykanen und enthält lediglich 3% Knorpelzellen (Chondrozyten), die den Knorpelanabolismus zur Aufrechterhaltung der Matrixintegrität gewährleisten (Aigner & Stöve 2003) (Abb. 1.5). Der Kollagenanteil im Knorpel besteht zu 80% aus dem tripelhelikalen Kollagen Typ II (CII) und ist somit der Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix. Die Detektion von Autoantikörpern gegen CII sowohl im Serum von ca. 15-30% als auch im entzündeten Gelenk von ca. 70% der RA-Patienten macht das knorpelspezifische Molekül zu einem relevanten Autoantigen in der Pathogenese der RA (Tarkowski et al. 1989).

Die bereits in einem frühen Krankheitsstadium mögliche Detektion von Autoantikörpern im Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis ist zu einem wichtigen Diagnosekriterium geworden (Schellekens et al. 2000; Kroot et al. 2000). Dabei handelt es sich zum einen um die sogenannten Rheumafaktoren (RF), die sich gegen den Fc-Teil von IgG-Immunglobuline richten und selbst meistens aus der IgM-Subklasse stammen (Mellors et al. 1961; Burska et al. 2014). Und zum anderen um

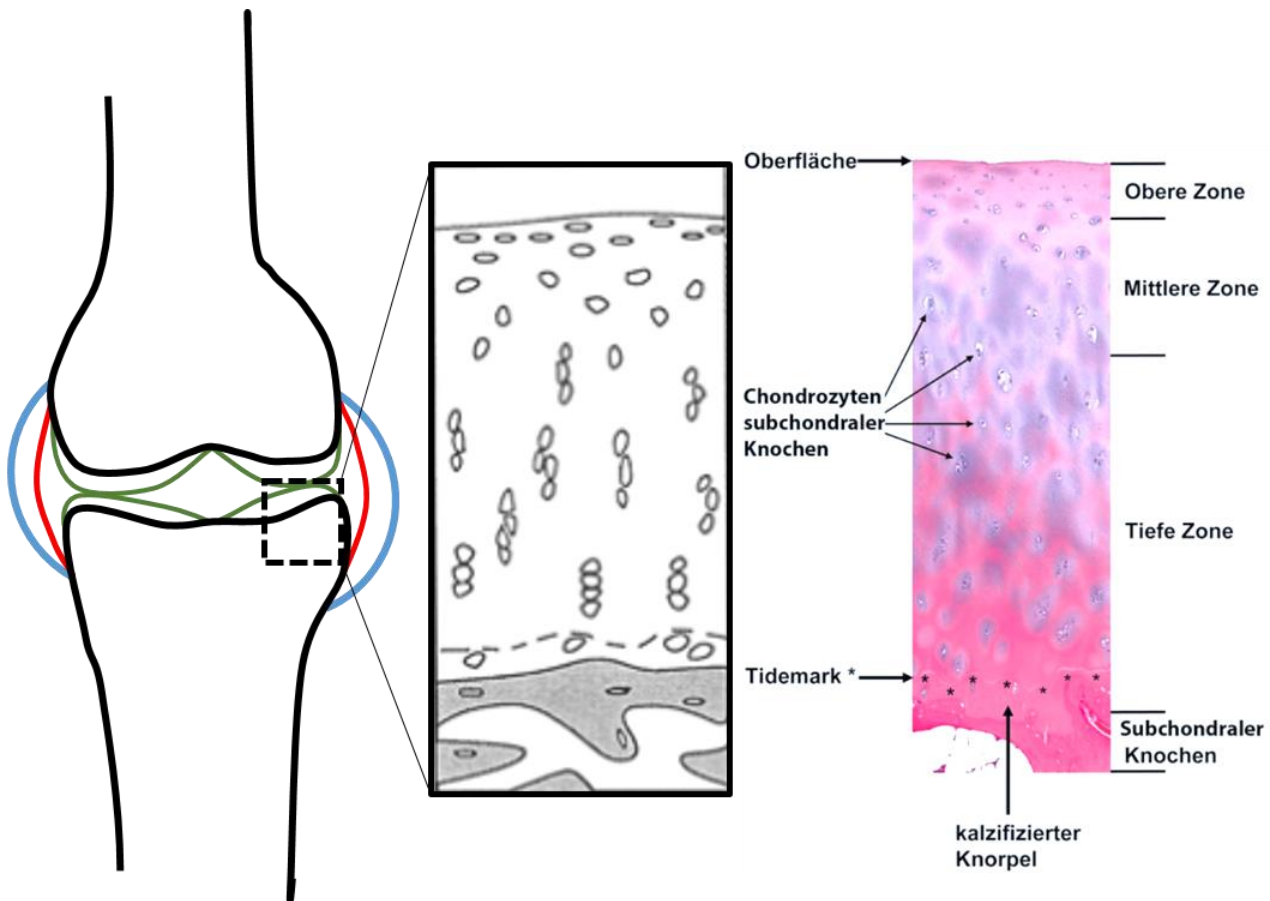


Abb. 1.5: Schematische Darstellung von Gelenkstrukturen und Knorpelaufbau. Bei echten diarthrodialen Gelenken sind deren Enden mit hyalinem Knorpel überzogen (grün) und von einer Gelenkkapsel (blau) mit innenliegender Gelenkinnenhaut (Synovialmembran, rot) umgeben (Schema links). Der vergrößerte Ausschnitt des Schemas (Mitte) und der Querschnitt durch normalen hyalinen Gelenkknorpel demonstriert die verschiedenen Zonen extrazellulären Matrix und die darin befindlichen Knorpelzellen (Chondrozyten) (H&E Färbung rechts, 40x Vergrößerung). Abbildung wurde modifiziert nach (Aigner & Stöve 2003; Söder & Aigner 2011)

eine zunehmend an Bedeutung gewinnende Gruppe den ACPAs (*anti-citrullinated peptides antibody*), die citrullinierte Autoantigene erkennen und eine sehr hohe Spezifität für die Diagnose der RA haben (Mathsson et al. 2008; Caspi et al. 2006). Zwar sind diese beiden Gruppen von Autoantikörpern gründlich validierte Marker und prädiktiv für die Entwicklung einer RA, jedoch verbleibt der Zusammenhang mit der Pathogenese der RA noch unklar. Die Relevanz von CII als Autoantigen wird u.a. durch das CIA-Mausmodell (*Collagen Induced Arthritis*) demonstriert, bei dem durch Immunisierung mit CII bei Mäusen eine Arthritis ausgelöst wird. Hierbei konnten modellhaft immundominante T- und B-Zell Epitope arthritogener Immunantworten charakterisiert werden. Die Mehrheit der B-Zellantworten ist dabei gegen die

tripelhelikale Struktur von CII gerichtet. Diese murinen B-Zellepitope sind über die Speziesbarrieren hinweg konserviert und werden auch in der Humanerkrankung der RA als Zielstrukturen der humoralen Immunität erkannt (Kraetsch et al. 2001; Burkhardt et al. 2002). Dabei ist die Antigenerkennung konformationsabhängig, da eine Immunisierung mit denaturiertem CII (CII α -Kette) lediglich eine sehr schwache Immunantwort auslöst und nicht arthritogen ist (Holmdahl et al. 1989; Schulte et al. 1998). Zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen relevante B-Zellepitope wurden während der Primärantwort nach CII-Immunisierung Zellen aus den drainierenden Lymphknoten isoliert und mit Myelomzellen fusioniert. Nach Selektion und Screening kompetenter Zellen produzieren diese Hybridomzellen Antikörper mit Spezifität für relevante Epitope der Arthritispathogenese (Schulte 1998). Die immundominanten B-Zellepitope auf dem CII weisen ein konserviertes Aminosäurekonsensusmotiv (Arg-Gly-hydrophob) auf. Die identifizierten relevanten Epitope und die generierten monoklonalen Antikörper gegen diese CII-Sequenzen sind in Tab. 1.1 zusammengefasst.

Tab. 1.1: B-Zell Epitope auf CII

Zuordnung der Lokalisation der Epitope auf den nach Cyanbromid Spaltung entstehenden CB-Fragmenten und nach Aminosäureposition, Buchstaben (Aminosäure-Einbuchstabencode), Motiv: Arg (R) – Gly (G) – hydrophob (unterstrichen), modifiziert nach (Nandakumar 2010)

Epitop	Aminosäuren	Lokalisierung	Sequenz	monoklonaler Antikörper
C1	359-363	CB11	AR <u>GLT</u>	CIIC1
U1	494-504	CB8	LVGPR <u>GERG</u> FP	UL1
J1	551-564	CB10	MPG <u>ERGA</u> AGIAGPK	M2139
D3	687-698	CB10	AR <u>G</u> AQ <u>G</u> PPGATGFP	CIID3
E/F10	777-783	CB10	LAGQ <u>R</u> GIV	CIIE10
F4	926-936	CB9	ER <u>G</u> LK <u>G</u> H <u>R</u> GFT	CIIF4

Der direkte Nachweis der Arthritogenität der CII-Epitop charakterisierten murinen monoklonalen Antikörper konnte im Transfer Modell der CAIA (*Collagen II Antibody Induced Arthritis*) demonstriert werden. Während die systemische Gabe eines singulären monoklonalen anti-CII-Antikörpers in naive Mäuse lediglich eine moderate Synovialitis auslöst führt der Transfer einer Kombination von anti-CII-Antikörpern

distinkter Epitopspezifitäten zur Induktion einer schweren Polyarthrititis (Nandakumar et al. 2003; Hietala et al. 2004) (Abb. 1.6). Die Epitopspezifität der anti-CII Antikörper ist dabei von kritischer Relevanz, da gezeigt werden konnte, dass die Ko-Injektion des sogenannten CIIF4 Antikörpers mit der arthritogenen Antikörper-Kombination einen starken, mechanistisch bisher noch nicht verstandenen, protektiven Effekt hatte. So reduziert der Antikörper mit Spezifität für das F4-Epitop auf CII, den Grad der Arthritis deutlich (Burkhardt et al. 2002) obgleich seine Bindung an das CII des Knorpels *in vivo* gleichermaßen gut ist, er sich im Isotyp von den arthritogenen Antikörpern nicht unterscheidet und mit diesen auch keine direkte Bindung eingeht. Die im murinen Modell identifizierten B-Zellepitope C1, J1 und U1 auf dem CII sind auch Teil der humoralen Immunantwort in RA-Patienten und vornehmlich positiv assoziiert mit der Krankheitsentwicklung, im Gegensatz zum ebenfalls immundominanten aber protektiv wirkenden F4-Epitop auf CII (Übersicht in: Nandakumar & Holmdahl 2005; Burkhardt et al. 2002).

Der UL-1 Klon, spezifisch für das U1-Epitop auf CII, wurde nach CII-Immunisierung von B10.Q Mäusen isoliert und produziert IgG2b Antikörper. Das tripelhelikale U1-Epitop, welches partiell mit einer Integrin-Bindedomäne überlappt, besteht aus 11 Aminosäuren (CII 494-504, s. Tab. 1.1) und wurde als eines der Haupt-B-Zellepitope, sowohl in der Immunantwort der rheumatoiden Arthritis (Kraetsch et al. 2001; Burkhardt et al. 2002) als auch in CIA-Experimenten mit Mäusen und Ratten (Wernhoff et al. 2001) identifiziert. In Transferexperimenten konnte für den UL-1 Antikörper auch eine pathogene Wirkung nachgewiesen werden, wobei eine Besonderheit darin liegt, dass die durch den AK durch Transfer induzierte Proteoglykandepletion des Knorpels *in vivo* auch in C5a defizienten Mäusen in vollständiger Abwesenheit von Infiltrationen durch Zellen des angeborenen oder adaptiven Immunsystems in das Gelenkkompartiment nachweisbar war. Entsprechend konnte die direkte katabole Wirkung auf die Knorpelmatrix auch *in vitro* an primären bovinen Gewebekulturen gezeigt werden (Nandakumar et al. 2008). Kontrollversuche mit anderen CII bindenden monoklonalen Antikörpern differenter Epitopspezifität belegen, dass der katabole Effekt des UL-1 Antikörpers an seine distinkte Feinspezifität gekoppelt ist. Der dieser völlig neuen Antikörper vermittelten Knorpelschädigung zugrunde liegende molekulare Mechanismus ist derzeit noch nicht verstanden und seine Aufklärung von potenziell hoher Relevanz für die Pathogeneseforschung immunmediierter Inflammationserkrankungen.

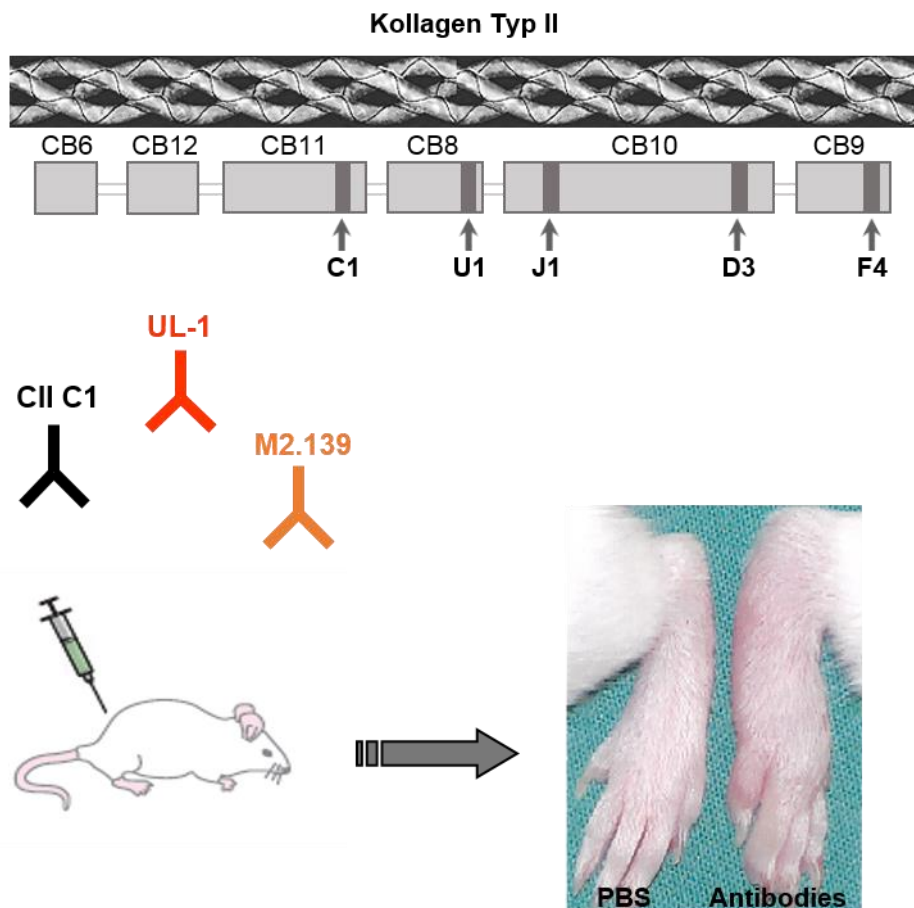


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des tripelhelikalen Kollagen Typ II Moleküls, den identifizierten B-Zellepitopen und der CII-Antikörper Transfer im CAIA-Modell. Das Monomer des Kollagens Typ II besteht aus drei identischen α -Ketten $[\alpha 1(\text{II})]_3$, die eine Tripelhelix bilden. Die immundominanten B-Zellepitope (C1, U1, J1, D3 und F4) sind in ihrer Lokalisation den CII-Fragmenten zugeordnet, die nach Cyanbromid (CB) Spaltung des CII entstehen. Nach Injektion eines CII-Antikörper Cocktails (CII C1, UL-1 und M2.139) kann im Vergleich zur PBS Kontrolle eine Polyarthrititis der murinen Gelenke beobachtet werden. Abbildung wurde modifiziert nach (Burkhardt et al. 2002; Imboden 2009)

1.4 Antikörper gegen citrullinierte Proteine als RA-Marker

Aufgrund des Nachweises von Autoantikörpern im Serum und im Synovium von 50-70% der Patienten mit rheumatoider Arthritis (Schellekens et al. 1998; Masson-Bessière et al. 2000; Caspi et al. 2006; Mathsson et al. 2008), die gegen citrullinierte Proteine (ACPA, *anti-citrullinated peptides antibody*) gerichtet sind, wurde eine pathogenetische Bedeutung der Proteincitrullinierung für die Arthritisentwicklung über die Generierung von Neoepitopen postuliert. Die Citrullinierung von Proteinen erfolgt enzymatisch durch die Deiminierung von Arginin zu Citrullin durch die

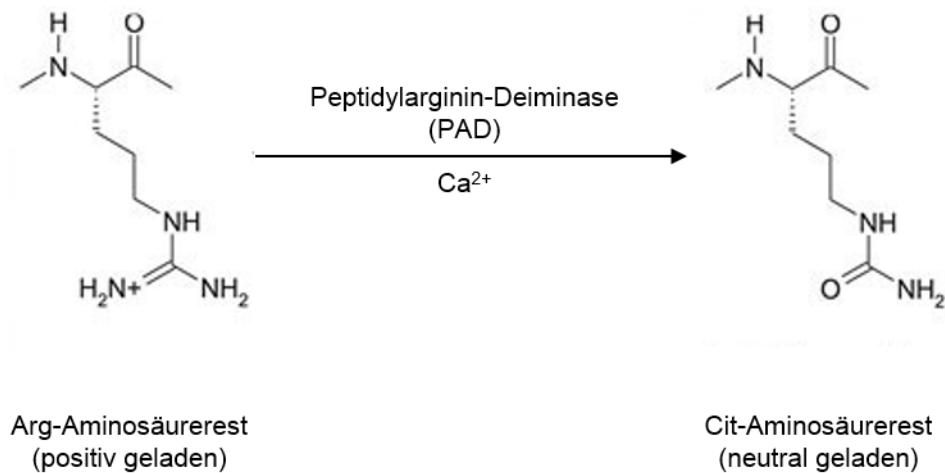


Abb. 1.7: Citrullinierung von Peptidylarginin durch die Peptidylarginin-Deiminase. Während der postrationalen Modifikation wird mittels der Peptidylarginin-Deiminase (PAD) Arginin zu Citrullin in Abhängigkeit der Ca^{2+} -Konzentration und des pH-Wertes katalysiert (modifiziert nach Vossenaar et al. 2003).

Peptidylarginin-Deiminasen (PAD) und resultiert somit aus einer posttranslationalen Modifikation (Abb. 1.7). Citrullin entsteht auch im Metabolismus als Zwischenprodukt des Harnstoffzyklus, findet aber in der Proteinbiosynthese keine Verwendung (Suzuki et al. 2007). Die fünf identifizierten PAD-Isoformen (1, 2, 3, 4 und 6) sind über die Speziesbarrieren hinweg stark konserviert und unterscheiden sich hauptsächlich aufgrund ihrer gewebespezifischen Expression. PAD1 wird überwiegend in der Epidermis und in Haarfollikeln exprimiert (Nachat et al. 2005; Vossenaar et al. 2003); PAD2 im neuronalen Gewebe und peripheren mononukleären Blutzellen (Vossenaar et al. 2004; Sambandam et al. 2004), PAD3 in Haarfollikeln (Nachat et al. 2005) und PAD4 im Knochenmark und weißen Blutzellen, vor allem in Neutrophilen und Eosinophilen (Asaga et al. 2001). Das erst kürzlich entdeckte PAD6 wird in Eizellen exprimiert (Wright et al. 2003). Außer der zusätzlich nukleären Expression von PAD4 werden alle Isoformen im Zytoplasma exprimiert. Die postrationale Modifikation resultiert in einem Ladungswechsel des positiven Argininrestes in das neutrale Citrullin mit potenziellen Auswirkungen auf die Konformation und ggf. die Funktion des Zielproteins durch veränderte intra- und intermolekulare Interaktionen (Vossenaar et al. 2003). Die enzymatische PAD-Reaktion ist abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration und dem pH-Wert. Die benötigte Ca^{2+} -Konzentration ist dabei

wesentlich höher als die im Cytosol (200 nM) normalerweise vorliegende Konzentration. Es kann eine erhöhte Rate von Citrullinierungen während der Apoptose, der Alterung, im Zusammenhang mit einem Trauma und während eines inflammatorischen Prozesses beobachtet werden (Yamada et al. 2005). So steigt z.B. die Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol während der Apoptose um das 100-1000 fache an und bietet dadurch optimale Bedingungen für die PAD-Enzymaktivität (Vossenaar et al. 2003; Uysal et al. 2010; Schwab et al. 2002).

Der Nachweis von ACPAs im Serum hat sich in der Klinik als diagnostischer Parameter insbesondere durch seine hohe Spezifität für die RA von > 95% (van Venrooij et al. 2002) bewährt. Darüberhinaus konnte anhand der Analysen asservierter Serumproben aus Biobanken gezeigt werden, dass diese Autoantikörper analog zu Rheumafaktoren bereits bis zu 15 Jahre vor Ausbruch der Krankheit im peripheren Blut von Patienten nachweisbar sein können d.h. in einer sehr frühen subklinischen Phase der Krankheit gebildet werden (van de Stadt et al. 2011; Rantapää-Dahlqvist et al. 2003). ACPAs lassen sich auch im Kompartiment der entzündeten Geleke in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten und ihre lokale Produktion durch Plasmazellen im inflammatorischen Synovialgewebe nachweisen (Humby et al. 2009). Die lokale Detektion von citrullinierten Vimentin (Vossenaar et al. 2004) und Fibrin (Masson-Bessière et al. 2001) deutet auf eine anhaltende posttranslationale Citrullinierung im arthritischen Gelenk hin. In dem Zusammenhang konnte sowohl die Expression von PAD2 als auch PAD4 im Synovialgewebe (Foulquier et al. 2007) und in der Synovialflüssigkeit (Kinloch et al. 2008) von RA-Patienten nachgewiesen werden. Neben den ubiquitär exprimierten Proteinen, wie Vimentin oder Fibrinogen, konnte auch für das knorpelspezifische Kollagen Typ II (CII) gezeigt werden, dass es durch PAD-Enzyme modifizierbar ist und in dieser Form von den in RA-Seren vorhandenen ACPAs detektiert wird (Burkhardt et al. 2005).

Es konnte in Studien zur Suszeptibilität der RA ein krankheitsassoziierte Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (*Single-nucleotid-polymorphism*, SNP) im *PADI4* Gen identifiziert werden (Suzuki et al. 2003). In der initialen japanischen Studie konnte auch eine funktionelle Bedeutung der assoziierten SNPs im *PADI4* Genlokus für eine verbesserte mRNA Stabilität und Korrelationen mit erhöhten Antikörpertitern gegen citrullinierte Proteine nachgewiesen werden. Allerdings gibt es ethnische Variabilitäten der genetischen Prädisposition, sodass auch Negativergebnisse großer

Replikationsstudien an europäischen Populationen zur Assoziation von PAD14-Polymorphismen mit der RA publiziert sind (Burr et al. 2010). Unabhängig von seiner potenziellen Bedeutung für die Neoepitopgenerierung in der RA-Pathogenese ist PAD4 bekannt für die intranukleäre Citrullinierung von Histonen und resultierenden regulatorischen Effekten auf die Genexpression (Sharma et al. 2012) unter Beeinflussung anderer posttranslationaler Modifikationen, wie der Methylierung und Acetylierung (Raijmakers et al. 2007).

1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Analyse der Kollagen Typ II (CII) spezifischen humoralen Autoimmunität hinsichtlich drei für die RA-Pathogenese relevanter Aspekte.

Im ersten Teil der Arbeit (Kapitel 4.1) war das Ziel die Aufklärung des molekularen Mechanismus, die der Induktion kataboler Wirkungen auf den chondrozytären Matrixmetabolismus durch den UL-1 Antikörper zugrunde liegen. Der monoklonale CII-Antikörper UL-1 ist gegen ein immundominantes Epitop (U1-Epitop) auf dem CII gerichtet und löst injiziert in Kombination mit anderen CII-Antikörpern definierter Spezifität im murinen Antikörper-Transferexperimenten (CAIA, *Collagen II Antibody Induced Arthritis*) innerhalb weniger Tage eine erosiv verlaufende Polyarthritits aus. Dabei führt der Transfer des arthritogenen UL-1 Antikörpers unabhängig von seinen durch Fc-Rezeptorbindung oder Komplementaktivierung vermittelten Effektorfunktionen zudem zur direkten Schädigung der Knorpelmatrix über eine Modulation des Chondrozytenmetabolismus (Nandakumar et al. 2008). Dieser Effekt ist nur nach Transfer des UL-1 Antikörpers mit Feinspezifität für das sogenannte U1-Epitop auf dem CII nachweisbar.

Neben der Detektion von Autoantikörpern gegen das knorpelspezifische CII können auch andere Autoantikörper mit erkrankungsrelevanten Spezifitäten, wie Rheumafaktoren und ACPAs, in den Seren von RA-Patienten nachgewiesen werden. Sowohl RFs als auch ACPAs, letztere gerichtet gegen citrullinierte Peptide, sind mittlerweile validierte diagnostische Marker und prädiktiv für eine erosive Arthritis

(Schellekens et al. 2000; Kroot et al. 2000). Die Spezifität der ACPAs für die rheumatoide Arthritis macht sie als Biomarker interessant, während ihr Beitrag zur Arthritispathogenese bisher allerdings als ungeklärt gelten muss. Die Reaktivität von ACPAs ist kritisch abhängig von der Präsenz der Aminosäure Citrullin in der Sequenz des Antigens. Die Generation dieser Aminosäure ist das Resultat einer posttranslationalen Modifikation, die durch verschiedene Isoformen der Peptidylarginin-Deiminase (PAD) katalysiert werden kann (Vossenaar et al. 2003). Neben ubiquitär exprimierten Proteinen, konnte auch das knorpelspezifische CII als Zielstruktur PAD-katalysierter Argininmodifikationen identifiziert werden; entsprechend citrullinierte CII-Strukturen stellen dann auch potenzielle Erkennungsdeterminanten von ACPAs dar (Burkhardt et al. 2005). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit (Kapitel 4.2) war daher der Nachweis der *in vitro* Bindung von ACPAs mit Spezifität für citrullinierte CII-Epitope an Knorpelgewebe von RA-Patienten, das als asserviertes Biomaterial aus Synovektomie- bzw. Gelenkersatzoperationen zur Verfügung stand. In diesem Kontext wird darüber hinaus die PAD-Expression sowohl im Knorpelgewebe als auch in kultivierten Chondrozyten hinsichtlich eines möglichen Beitrages zur Citrullinierung von Knorpelmatrixkomponenten und damit einer Neoepitopgeneration in der Auslösung bzw. Perpetuierung immunmediierter Inflammationsprozesse studiert.

Die in den adaptiven Immunantworten von murinen T- und B-Zellen erkannten CII-Epitope sind evolutionär konserviert und stellen auch immundominante Strukturen RA-spezifischer humaner Autoimmunantworten dar. Bereits in einem frühen Stadium der Krankheit können Autoantikörper gegen Epitope des körpereigenen CII im Serum von RA-Patienten detektiert werden (Terato et al. 1996; Cook et al. 2004; Burkhardt et al. 2002). Der Nachweis von anti-CII IgG produzierenden B-Zellen im inflammatorischen Synovialgewebe und in der Synovialflüssigkeit lässt auf einen Antigen-gerichteten Inflammationsprozess in der Pathogenese schließen (Tarkowski et al. 1989; Rudolphi et al. 1997). Im dritten Kapitel des Ergebnisteils dieser Arbeit (Kapitel 4.3) soll eine Methode zur Detektion und Isolation einzelner autoreaktiver B-Zellen und Plasmazellen mit Spezifität für pathogenetisch relevante CII-Epitope im peripheren Blut und in der entzündlich veränderten Synovialmembran von RA-Patienten etabliert werden. Dieses beinhaltet zudem die Etablierung einer Einzelzell-PCR zur Amplifikation der kodierenden Genelemente für die an der CII-Erkennung

beteiligten variablen Regionen (V-Gene) von leichter und schwerer Antikörperkette. Die daraus resultierenden Sequenzanalysen erlauben den möglichen Nachweis von nicht-konservativen Aminosäuremutationen in klonal verwandten Antikörpern in den, für die molekularen Wechselwirkungen mit Antigen determinanten, kritischen Bindungsdomänen der variablen Immunglobulin-domänen. Darüber hinaus könnte die Analyse Hinweise auf eine mögliche präferentielle V-Genverwendung in den autoreaktiven CII-spezifischen B-Zellen und Plasmazellen geben. Die Studien dienen daher der Prüfung der bisher nicht belegten Arbeitshypothese eines Antigen-abhängigen Selektionsprozesses CII-spezifischer B-Zellen im synovialen Kompartiment von RA-Patienten.

2. Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Kultivierung und Passagieren von Zelllinien

Adhärente Zelllinien wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), die Suspensionszelllinien in RPMI 1640 Medium, supplementiert mit 10% inaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 50 U/ml Penicillin und 50 mg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂, gehalten. Für die weitere Passagierung wurden die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen und mittels einer Trypsin-Lösung (0,25% in PBS) von der Zellkulturflasche abgelöst. Durch die Zugabe von frischem Medium wurde die enzymatische Reaktion abgestoppt, da das darin befindliche FCS Protease Inhibitoren enthält, die inaktivierend auf Trypsin wirken. Die Zellen wurden in einem geeigneten Verhältnis in eine neue Kulturflasche überführt. Für die längerfristige Lagerung wurden die Zellen nach Trypsinisierung im Einfriermedium (Kulturmedium, 20% FCS, 10% DMSO) bei -80°C langsam eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.1.2 Isolierung von humanen Chondrozyten

Artikulärer Knorpel aus Hüft- oder Kniegelenken wurde von Osteoarthrose-Patienten während einer Gelenkersatzoperation gewonnen (s. 2.3.1). Nach Zerkleinerung des Knorpels in kleine (2–5 mm) Stücke, wurden diese unter Schütteln im CO₂-Inkubator bei 37°C sequentiell proteolytisch verdaut: Zunächst mit Pronase (1 mg/ml in PBS) bei 37°C für 30 min und danach mit bakterieller Kollagenase (1,5 mg/ml in PBS) für weitere 16-24 h bei 37°C. Um nicht verdaute Knorpelreste zu entfernen, wurde die Zellsuspension durch ein 70 µm Zellsieb filtriert und in DMEM/HAM's F12 Medium (supplementiert mit 10% FCS, 50 U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin) resuspendiert. Die primären Chondrozyten konnten für 4-6 Passagen kultiviert werden.

2.1.3 Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen und B-Zellen aus Synovialgewebe von RA-Patienten

Mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation können PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) aufgrund der Dichteunterschiede ihrer zellulären Bestandteile während des Zentrifugierens in unterschiedliche Phasen aufgetrennt werden. Zur Isolierung der peripheren mononukleären Zellen wurde ca. 30 ml EDTA-Blut von RA-Patienten über eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Zur Isolierung der B-Zellen aus dem Synovialgewebe von RA-Patienten wurde dieses zunächst zerkleinert (2-5 mm) und mit Kollagenase (0,75 mg/ml in PBS) bei 37 °C für ca. 16 h verdaut. Nach Filtration durch ein 70 µm Zellsieb, wurde die Zellsuspension für die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation verwendet. Dazu wurden 15 ml Ficoll-Plaque (Dichte 1,007 g/cm³) in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit EDTA-Waschpuffer (2 mM EDTA in PBS) verdünnten Spenderblut bzw. verdaute Zellsuspension überschichtet und für 35 min bei 440 x g bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Während die Thrombozyten in der oberen Plasmaphase verbleiben, reichern sich die PBMC in der Interphase und die Granulozyten in der unteren Schicht des Lymphozytenseparationsmediums an. Erythrozyten und tote Zellen bilden während des Zentrifugierens ein Pellet und sammeln sich im Boden des Zentrifugenröhrchens. Das Entnehmen der Interphase ermöglicht die Separation der PBMC von den anderen Zellen, welche anschließend mehrfach mit dem EDTA-Waschpuffer gewaschen (5 min, 500 x g) wurden und zur Lyse der Erythrozyten in 5 ml Lyse-Puffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA in H₂O) für 5 min bei RT inkubiert wurden. Nach nochmaligen Waschen des Pellets wurden die Zellen in 1 ml PBS, pH 7,2 (mit 0,5 % BSA) resuspendiert.

2.1.4 Durchflusszytometrie (FACS)

Mit der Durchflusszytometrie (FACS, *Fluorescence-Activated Cell-Sorting*) können individuelle Zellen innerhalb einer Zellpopulation anhand ihrer Granularität und Größe charakterisiert und sortiert werden. Nach Isolation der PBMC (s. 2.1.3) wurden die Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und bei 1500 UpM für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit Fc-Blockreagenz (2 µl/ 200 µl, Fa. Miltenyi) für 10 min auf Eis inkubiert, um die unspezifische Fc-Rezeptor vermittelte Bindung der Antikörper auf der Zelloberfläche zu inhibieren. Die anschließende Inkubation der Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper erfolgte für 20 min

bei 4°C im Dunkeln. Hierfür wurden je 1-2 µl (1:50-100) eines Allophycocyanin (APC) gekoppelten CD3 Antikörper, eines *Pacific Blue* (V450) gekoppelten CD19 Antikörper und mittels Phycoerythrin (PE) gekoppelten Streptavidin verwendet (s. Tab. 3.9). Nach Waschen der Zellsuspension wurde das Pellet in 3% BSA in PBS aufgenommen und die Zellen mittels eines FACS-Röhrchen mit Filterdeckel (Fa. BD) vereinzelt. Die Analyse von Oberflächenmarkern wurde am FACS-Fortessa (Fa. BD, Becton & Dickinson Company) und die Sortierung von PBMC am FACS-Aria III (BD) durchgeführt.

2.1.5 Transfektion von eukaryotischen Zelllinien

Für das Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryotische Zelllinien wurde ein lineares Polyethylenimin (PEI) Derivat „Jet-Pei“ (Fa. Polyplus) verwendet. Die DNA wird durch das Jet-Pei Reagenz verpackt und stellt somit einen positiv geladenen Komplex dar, der mit den negativ geladenen Proteoglykanen auf der Zelloberfläche interagieren kann und mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen wird. Für eine 6-well Kulturplatte wurden 2×10^5 HEK 293T oder HEPG2 Zellen 24 h vor Transfektion ausgesät. Pro Transfektionsansatz wurden zwei Reaktionsgefäße benötigt, in denen jeweils 100 µl sterile 150 mM NaCl Lösung vorgelegt wurden. Während in das eine Gefäß 3 µg Plasmid-DNA pipettiert wurde, wurde in das andere Gefäß das Jet-Pei Reagenz pipettiert und nach Vereinigung beider Lösungen durch sorgfältiges Vortexen gemischt. Die Jet-Pei Lösung wurde zur DNA-Lösung gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der DNA/Lipid Komplex auf die Zellen unter leichten Schwenken pipettiert und die transfizierten Zellen nach 24-48 h in den *STAT3 Luciferase Reporter Assay* eingesetzt (s. 2.1.7) oder nach Herstellung von Zelllysaten (s. 2.5.1) für Immunpräzipitationsexperimente (s. 2.5.4) verwendet.

2.1.6 Inkubation von Chondrozyten mit verschiedenen Stimuli

Für die Stimulationsversuche wurden in eine 24-well Kulturplatte 1×10^5 T/C28a4 Chondrozyten oder primäre OA-Chondrozyten ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium durch FCS-freies Medium ausgetauscht und mit dem entsprechenden Stimulanz versetzt. Zur Analyse des Signalweges der arthritogenen CII-Antikörper wurden diese in verschiedenen Konzentrationen (0,5-5 µg/ml) für verschiedene Zeitpunkte (5 min bis 48 h) eingesetzt. Für die pSTAT3 Analysen wurden verschiedene LIF Konzentrationen (0,25-20 ng/ml) für 20 min bei 37°C eingesetzt.

Um die Auswirkung von genotoxischen Stress zu untersuchen, wurden die Zellen mit 1–8 μM Camptothecin für 16 h bei 37°C inkubiert. Oxidativer Streß wurde durch Gabe von 50-250 μM H_2O_2 für 4 h induziert. Für Western Blot Analysen wurden anschließend Zelllysate hergestellt und mittels BCA-Test der Proteingehalt der Proben ermittelt (s. 2.5.1).

2.1.7 STAT3 Reporter Assay

Zur Messung transkriptionaler Aktivität von STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) durch verschiedene Stimuli wurde ein „STAT3 Luciferase Reporter Assay“ (Fa. Panomics) eingesetzt. Dabei wird ein Reporterplasmid in Zellen eingebracht, welches ein spezifisches DNA Bindungsmotiv für den Transkriptionsfaktor STAT3 enthält. Die Bindung des nach Stimulation aktivierten Transkriptionsfaktors resultiert dann in der Expression der *Firefly* Luziferase, die ebenfalls auf dem Plasmid kodiert ist. Nach Zugabe des entsprechenden Substrats, Luziferin, kann das Signal in einem Luminometer gemessen werden.

Für den STAT3 Assay wurden 1×10^4 HEK 293T oder HEP G2 Zellen in eine 96-well Kulturplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit dem STAT3 Reporterplasmid (50 ng/ well) zusammen mit einem *Renilla* Kontrollvektor (1 ng/ well) unter Verwendung des Jet-Pei Transfektionsreagenz (s. 2.1.5) ko-transfiziert. Dabei fungierte die Transfektion eines Leervektors als Negativkontrolle. Nach 24-48 h wurden die Zellen in FCS-freiem Medium mit 50 ng/ml LIF (Positivkontrolle) oder mit verschiedenen Konzentrationen der Kollagen Typ II (CII) spezifischen Antikörper UL-1 und CII1 (0,05-5,0 $\mu\text{g/ml}$) für 16 h stimuliert. Zur Messung der STAT3 Aktivität wurde das „Dual Luciferase Assay System“ von Promega, nach Angaben des Herstellers, verwendet. Die Aktivität der induzierten *Firefly* Luziferase wurde zur kontinuierlich exprimierten *Renilla* Luziferase Aktivität normalisiert.

2.2 Immunhistologische Methoden

2.2.1 Histologische Übersichtsfärbung

Zur morphologischen Untersuchung von Gewebeschnitten von humanem Knorpel und Synovialmembran wurden zwei verschiedene histochemische Färbungen, die Hämatoxylin-Eosin (HE) und die Toluidinblau Färbung, eingesetzt. Für die HE-

Färbung wurden die Gewebsschnitte zuerst für 4 min mit einer Hämalaun-Lösung (aufgearbeitetes Hämatoxylin), welche alle basophilen Strukturen, insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA, blau anfärbt, inkubiert. Die anschließende Färbung mit dem synthetischen Farbstoff Eosin für 1 min färbt alle acidophilen Strukturen, wie Zellplasmaproteine, Mitochondrien, das glatte endoplasmatische Retikulum und Kollagen, rot an. Für die Darstellung der Integrität der Knorpelmatrix wurde die Toluidinblau Färbung eingesetzt, da der Farbstoff an den negativ geladenen Proteoglykanen der extrazellulären Matrix bindet. Hierfür wurden Gewebeschnitte, die vorher mit Xylol entparaffiniert wurden (s. 2.2.2), mit einer Toluidinblau Lösung (0,04% in 0,2 M Na-Acetatpuffer, pH 4,0) für 10 min inkubiert und anschließend für 1 min gewässert.

2.2.2 Immunhistochemie

Für immunhistochemische Analysen wurde artikulärer OA- und RA-Knorpel sowie RA-Synovialgewebe verwendet. Während der Knorpel zunächst in 3% TCA (Trichlor-Essigsäure) entkalkt wurde, konnte bei Asservierung des Synovialgewebes direkt mit der Fixierung durch 4% Paraformaldehyd (PFA) für 24 h begonnen werden. Nach Dehydration durch die aufsteigende Alkoholreihe und Inkubation in Xylol wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet (FFPE-Material).

Nach Anfertigung von FFPE-Gewebeschnitten (5 µm) am Mikrotom wurde diese, für die anschließende Färbung, mit Xylol für 12 min unter zweimaligen Wechseln des Lösungsmittels entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (2x 3 min 100% Ethanol, 2x 3 min 96% Ethanol, 1x 3 min 70% Ethanol) und mit H₂O zweimal gewaschen. Um Epitope für die nachfolgende immunhistochemische Färbung zu demaskieren, wurden die Schnitte in Abhängigkeit des eingesetzten Antikörpers entweder enzymatisch oder chemisch vorbehandelt (s. Tab. 2.3). Nach Blockierung unspezifischer Epitope mit 3% BSA in TBS für 30 min, wurden die Schnitte mit Primärantikörpern in der in Tab. 2.3 aufgeführten Konzentration über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligen Waschen in TBS erfolgte die Detektion mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugierten Sekundärantikörpern (*Link&Label System* der Fa. Biogenix) und nachfolgender Detektion mit *Permanent Red*, was zu einer Rotfärbung von positiven Signalen führt. Anschließend wurde mit Meyers Hämalaun 2 min gegengefärbt und die Schnitte mit Eindeckmedium eingedeckt.

2.2.3 Immunhistochemie mit humanen Autoantikörpern aus Patientenserum

Für die Färbung von humanem Knorpelgewebe wurden gegen Typ-II Kollagen gerichtete Autoantikörper, die aus Seren von RA-Patienten gewonnen wurden, eingesetzt. Diese Antikörper waren an, im 96-well immobilisierten synthetischen triplehelikalen CII-Peptiden, affinitätsgereinigt (Haag et al. 2014) und standen in Kooperation mit Dr. R. Holmdahl (Karolinska Institut, Stockholm, Schweden) zur Verfügung. Zu diesem Zweck wurde humanes OA- und RA-Knorpelgewebe entparaffiniert, rehydriert und enzymatisch vorbehandelt (s. Tab. 2.3). Nach Blockierung mit 3% BSA in TBS wurden die Schnitte mit den unverdünnten affinitätsgereinigten Antikörpern bei 4°C über Nacht inkubiert. Zur Detektion der humanen Autoantikörper wurde nach mehrmaligem Waschen die Schnitte mit einem Maus anti-humanen IgG (1:100) für 1 h bei RT inkubiert und mit dem AP-konjugierten *Link&Label System* Detektionssystem (s. 2.2.2) entwickelt.

Tab. 2.3 : Übersicht der Antikörper für die Immunhistologie

Antikörper	Vorbehandlung	Konzentration	Spezies
anti-CD138	1 mM EDTA, pH 8,0 Dampfkochtopf 1 min	1:100	Maus
anti-CD20	1 mM EDTA, pH 8,0 Dampfkochtopf 1 min	1:100	Maus
anti-PAD2	10 mM Citratpuffer (Tri-Na-Citrat-Dihydrat), pH 6.0, Mikrowelle 10 min	1:100	Kaninchen
anti-PAD4	1mM EDTA, pH 8, Mikrowelle 10 min	1:100	Kaninchen
CIIC1	2 mg/ml Hyaluronidase, 37°C, 30 min	10 µg/ml	Maus
Affinitätsgereinigte CII-Antikörper	2 mg/ml Hyaluronidase, 37°C, 30 min	unverdünnt	Human

2.2.4 Immunfluoreszenz - Zellfärbungen

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden primäre OA Chondrozyten, T/C28a4 Chondrozyten oder HEK 293T Zellen (je 5×10^3 Zellen pro Kammer) in *ChamberSlides* ausgesät und über Nacht aufwachsen gelassen. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen in Abhängigkeit des verwendeten Antikörpers entweder mit eiskaltem Ethanol (100%) für 10 min oder mit einer Paraformaldehyd Lösung (4% PFA in PBS) fixiert und mit PBS/ 0,5% Triton X-100 für 10 min sowie PBS/0,1% Triton X-100 für 3x 3 min permeabilisiert. Nach Waschen mit PBS wurden die freien Bindungsstellen mit PBS /1% BSA / 0,1% Triton X-100 für 30 min blockiert. Bei der Ethanol Fixierung entfällt die Permeabilisierung und es wurde direkt mit dem Blockierungsschritt fortgefahren. Die Zellen wurden mit den primären Antikörpern anti-PAD2 (1 $\mu\text{g/ml}$), anti-PAD4 (1 $\mu\text{g/ml}$) oder anti-LIF-Rezeptor (1:100) jeweils in PBS/0,1% BSA verdünnt für 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,1% BSA für je 3 min, wurden die Schnitte mit Alexa 594-gekoppelten *chicken-anti-rabbit* IgG (1:500) zur Detektion von PAD2 und PAD4 sowie Alexa 488-gekoppelten *mouse-anti-sheep* IgG (1:250) für LIF-R Antikörper für 1 h bei Dunkelheit inkubiert. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurden die Schnitte mit DAPI (5 $\mu\text{g/ml}$ in H_2O) für 2 min inkubiert, mehrfach mit H_2O gewaschen, mit einem Fluoreszenz schützenden Medium eingedeckt und bis zur mikroskopischen Analyse bei 4°C gelagert. Die Bilder wurden mit dem *Axio Imager Z1* Fluoreszenz Mikroskop und der *Axiovision 4.6*. Software (Fa. Zeiss, Göttingen, Deutschland) angefertigt.

2.3 Isolation von Einzelzellen mittels Laser-Mikrodissektion und Einzelzell-PCR

2.3.1 Patientenmaterial

In dieser Arbeit wurde sowohl mit Knorpel- und Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten, welches im Zuge von Gelenkersatzoperationen entnommen wurde, als auch mit peripheren Blut von RA-Patienten gearbeitet. Ein entsprechendes Ethikvotum des Universitätsklinikums Frankfurt für die Verarbeitung des primären Materials liegt vor (Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin, Geschäfts-Nr. 215/10 und 37/09). Alle Patienten wurden anhand eines Informationsblattes durch

den behandelnden Arzt aufgeklärt und haben ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung des Gewebes gegeben.

Während das RA-Material freundlicherweise von Herrn Prof. Rehart (Agarplesion Markus-Krankenhaus, Frankfurt) zur Verfügung gestellt wurde, konnte Dank der Unterstützung von Frau Prof. Dr. Meurer und Frau Dr. Adolf (Orthopädische Universitätsklinik Friedrichsheim, Frankfurt) auch mit Primärmaterial von OA-Patienten gearbeitet werden.

2.3.2 Immunhistochemie von Synovialmembran mittels biotinylierten CII-Peptiden

Zum immunhistochemischen Nachweis von spezifischen B- und Plasmazellen, die Antikörper gegen spezifische CII-Sequenzen exprimieren, wurde Synovialgewebe von RA-Patienten mit triplehelikalen CII-Peptiden inkubiert und mittels Biotin-Streptavidin-HRP Bindung detektiert (Abb. 2.1).

Dafür wurden am Kryotom Gefrierschnitte (5µM) angefertigt, in Azeton für 10 min fixiert und für weitere 10 min bei 37°C getrocknet. Die endogene Peroxidase wurde für 10 min mit 3% H₂O₂ in Methanol blockiert und freie Bindungsstellen mit 3% BSA in TBS für 30 min blockiert. Biotinylierte CII-Peptide wurden in einer Konzentration von 5 µg/ml für 16 h bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligen Waschen mit TBS wurde zur Visualisierung des Signals das *L2AB2-System-HRP* Kit (Fa. Dako) verwendet. Dabei wurde die hoch affine Bindung zwischen Biotin und dem mit HRP-gekoppelten Streptavidin genutzt. Die Farbreaktion wurde mit dem chromogenen Farbstoff DAB (3,3'-Diaminobenzidin) umgesetzt und die Zellkerne mit Meyers Hämalaun 2 min gegengefärbt. Zur Isolation der Zellen mittels Laser-Mikrodissektion (s. 2.3.3) wurden die gefärbten Gewebeschnitte nicht mit Objektträgern bedeckt.

Zur Identifikation der Zellen, die sich mit dem triplehelikalen CII-Peptid anfärben ließen, wurden die Schnitte nach der Peptidinkubation zusätzlich mit einem B-Zellmarker (anti-CD20) oder einem Plasmazellmarker (anti-CD138) für 1 h bei RT inkubiert (s. Tab. 2.3). Während für die Visualisierung der CD-Marker ein Alexa-594 gekoppelter anti-*mouse* Antikörper (1:100) verwendet wurde, erfolgte die Detektion des biotinylierten Peptids durch ein FITC (488 nm, Fluoreszein Derivat)–gekoppeltes Avidin (1:250) für 1 h bei RT. Die Kernfärbung und die mikroskopischen Analysen wurden, wie in 2.2.4 beschrieben, durchgeführt.

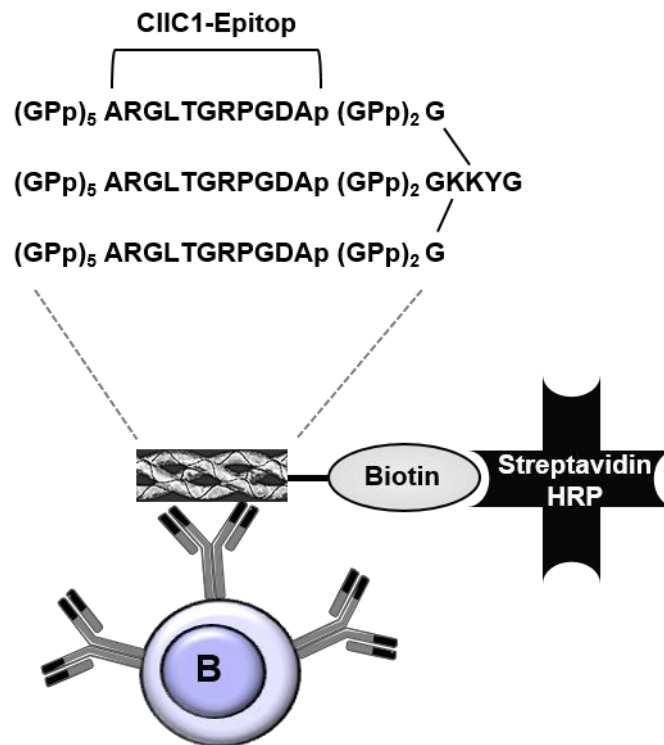


Abb. 2.1.: Schema zur immunhistologischen Detektion des biotinylierten CII-Peptids mittels Streptavidin-HRP Bindung. Das tripelhelikale CII-Peptid besteht aus drei Peptidketten mit C1-Epitop-spezifischer Sequenz (s. Tab. 3.10), die am Carboxy-Terminus über Lysinreste miteinander verbunden sind. Zur Stabilisierung dienen sowohl die 5 (GPp) Wiederholungen am Amino-Terminus als auch die 2 (GPp) Wiederholungen am Carboxy-Terminus. Nach epitopspezifischer Bindung des biotinylierten CII-Peptid an den B-Zell-Rezeptor im synovialen Gewebeschnitt, kann durch Inkubation des HRP-gekoppelten Streptavidins und dem Farbstoff DAB ein Signal detektiert werden.

2.3.3 Einzelzell Isolierung mittels Laser-Mikrodissektion

Die Laser-Mikrodissektion (LMD) ist eine Mikrodissektionstechnik, mit deren Hilfe verschiedene Zellverbände oder auch einzelne Zellen aus Gewebeschnitten, unter mikroskopischer Sicht, mittels Laserenergie heraus geschnitten werden können. Dabei wird durch den präzisen Einsatz des Lasers eine hohe Reinheit der gewonnenen Zellpopulation bzw. der einzelnen Zelle gewährleistet. Das LMD-System besteht aus einem binokularen Lichtmikroskop (Zeiss Axiovert 200M) mit vier Objektiven (10x, 20x, 40x, 63x), einem UV-Laser (Palm by P.A.L.M. Mikrolaser Technologie, Nitrogen Laser mit einer Wellenlänge von 337 nm), welche an einem Computer mit Monitor angeschlossen sind. Die Steuerung des Lasers erfolgt Computer vermittelt. Zur Analyse individueller Objektträger, werden diese auf dem

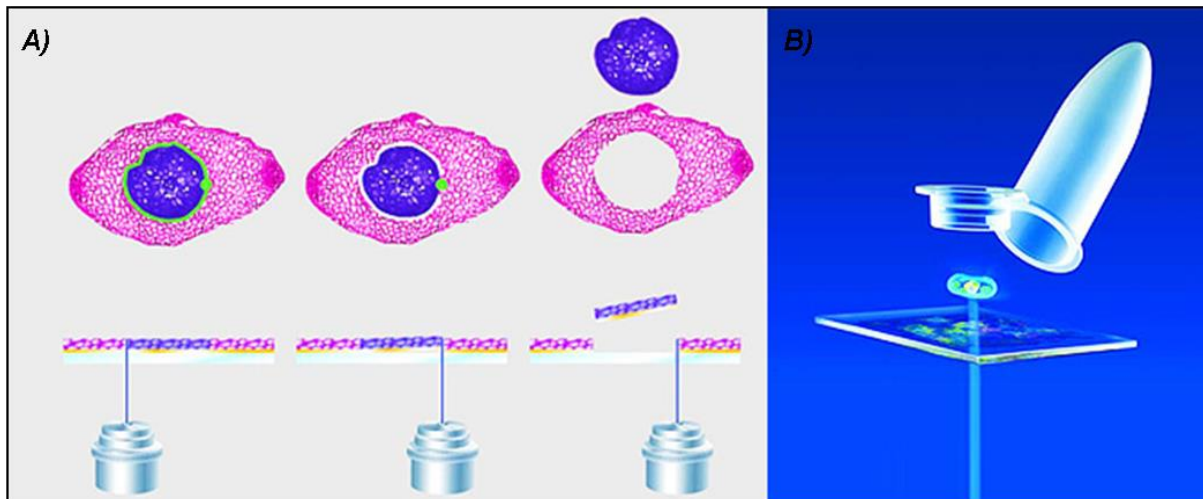


Abb. 2.2: Funktionsprinzip der Laser-Mikrodissektion. Nach Markierung des zu isolierenden Areals (blau), werden Laservermittelt die chemischen Verbindungen des benachbarten Gewebes zerstört und mittels der restlichen Energie des defokussierten Laserstrahls heraus katapultiert (A). Das isolierte Gewebe wird in den Deckel eines, zuvor befestigten, PCR-Tubes katapultiert (B). (Quelle: Zeiss Broschüre: "The PALM Family - A New Dimension in Sample Purity")

Objekttisch befestigt, welcher über die Computertastatur in x- und y-Richtung bewegt werden kann. Oberhalb des Objektträgers befindet sich ein höhenverstellbarer Transportarm, in dem ein PCR-Tube am Deckel eingespannt wird. Für den Vorgang der Laserdissektion sollte der Deckel sehr nah auf dem zu dissezierenden Gewebe aufliegen. Das gewünschte Gewebeareal oder die spezifisch angefärbte Zelle wird nach Markierung nun mittels eines Software-gesteuerten Laserstrahls umfahren und herausgeschnitten (Abb. 2.2). Dabei wird der Laser durch ein Objektiv fokussiert. Durch das Eindringen des Lasers in das Gewebe werden chemische Verbindungen im Gewebe zerstört, wodurch einzelne Zellen oder Zellverbände aus dem umliegenden Verband heraus gelöst werden können. Die restliche Energie des defokussierten Laserstrahls wird benötigt, um das dissektierte Material in das Auffangbehältnis, den Deckel des PCR-Tubes, zu katapultieren und dort zu sammeln. Nach immunhistologischer Färbung von Synovialmembranen (s. 2.3.2) wurden positiv gefärbte Zellen markiert und noch am gleichen Tag mittels LMD isoliert. Dafür wurden in den Deckel eines 0,2 ml PCR-Tubes 8 µl des 1x PCR-Puffers (*Expand High Fidelity PCR System P3*, 0,1% Triton X-100) vorgelegt, in den die Zelle dann katapultiert wurde. Nach kurzem Abzentrifugieren der Zellen in das PCR-Tube, wurde diese bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.3.4 Proteinase K Verdau

Für die Freisetzung von zellulärer DNA wurden die isolierten Zellen aus Gefrierschnitten mit 2 µg/ml Proteinase K verdaut. Dafür wurde der Ansatz im PCR-Cycler für 8 h bei 50°C inkubiert und bei 95°C für 10 min inaktiviert. Die Proben wurden bis zur weiteren Prozessierung innerhalb weniger Stunden bei 4 °C gelagert. Für den Verdau von Zellen aus FFPE-Schnitten wurde 20 µg/ml Proteinase K verwendet und für 16 h bei 50°C inkubiert.

2.3.5 Einzelzell Isolierung mittels FACS

Zur Isolation einzelner B-Zellen, die Antikörper gegen spezifische CII-Sequenzen exprimieren, aus dem Synovialgewebe sowie dem peripheren Blut von RA-Patienten wurden mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation gewonnene PBMC (s. 2.1.3) wurden zeitgleich mit drei Oberflächenmarkern angefärbt: mit dem CD3-APC Antikörper zur Detektion von T-Zellen und mit dem CD19-V450 zur Detektion von B-Zellen (s. 2.1.4). Zur Markierung von anti-CII IgG exprimierenden B-Zellen, wurde das zuvor beschriebene biotinylierte CII-Peptid (s. Abb. 2.1) mit einem PE-gekoppelten Streptavidin in einem molaren Verhältnis von 4:1 für 20 min auf Eis vorinkubiert, um die vier freien Biotin-Bindungsstellen des Streptavidins abzusättigen und dadurch eine Erhöhung der Bindungsaffinität des CII-Peptids an die Zelloberfläche zu ermöglichen. Zur Sortierung von Einzelzellen wurde in eine 96-well PCR-Platte 4 µl Lysepuffer (0,5x PBS, 10 mM DTT, 4 U RNasin) vorgelegt und anschließend die CD19 positiven anti-CII exprimierenden B-Zellen einzeln in die wells sortiert. Nach der Zellsortierung wurde die PCR-Platte kurz abzentrifugiert und bei -80°C bis zur anschließenden c-DNA Synthese (s. 2.4.2) gelagert.

2.3.6 Semi-nested Einzelzell-PCR

In dieser Arbeit sollen die rearrangierten humanen Ig V-Gene aus Einzelzellen von B- und Plasmazellen aus Synovialgewebe und dem peripheren Blut amplifiziert werden. Dafür wurden die bereits etablierten Primersequenzen (s. Tab. 3.13) von Herrn Prof. Küppers verwendet (Küppers et al. 2013). Die *Forward*-Primer binden am 5' Ende der FR1 (Framework Region 1) und die *Revers*-Primer im J-Segment in der FR4 (Abb. 2.3). Die humanen V-Gene werden, basierend auf ihrer bis zu 80%igen Sequenzhomologie, in Familien unterteilt. Aufgrund dessen wurden familienzuspezifische Primer entworfen, die nahezu jedes Mitglied der jeweiligen V-Gen Familie

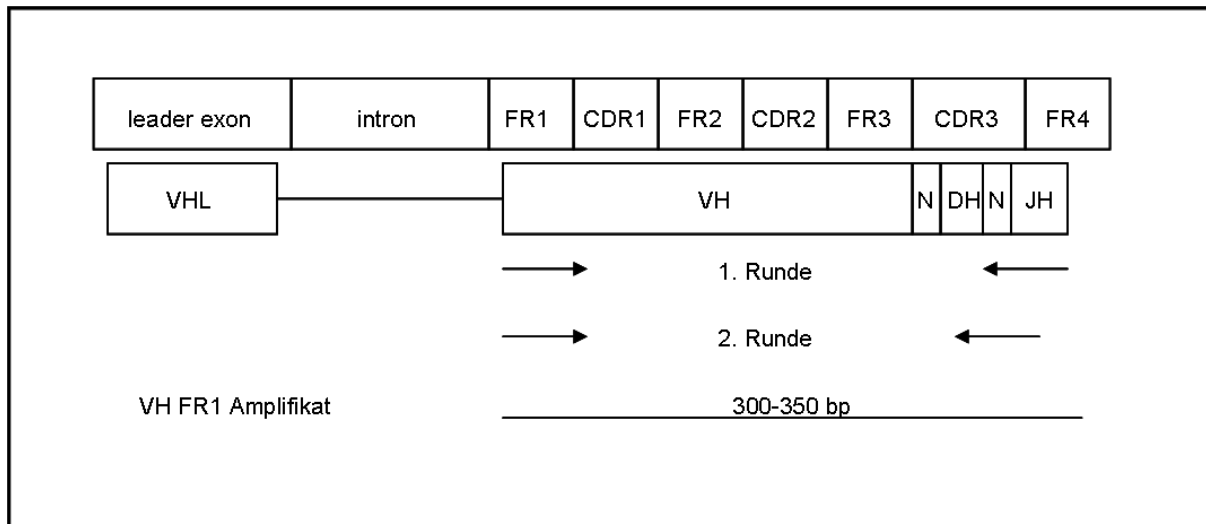


Abb. 2.3: Struktur der VH-Region und Lage der Primer. Die VH-Region besteht aus zwei Exons (oben dargestellt), von denen das erste das *Leader Peptid* (VHL) kodiert und das zweite die reife VH-Region, bestehend aus V, D und J Gensegmenten, kodiert. Zwischen diesen Bereichen sind „nicht-Keimbahn“ kodierte Nukleotide (N) zu finden. Die VH-Region ist in vier stark konservierte *Framework* Regionen (FR) und drei diversen *Complementarity determining* Regionen (CDR) unterteilt. Die Lage der Primer für die 1. und 2. PCR-Runde ist mit Pfeilen dargestellt. *Nach der semi-nested PCR wurde ein Produkt von 300-350 bp erwartet* (Abbildung modifiziert nach Küppers, Schneider, & Hansmann, 2013).

binden. Es wurden die V-Gene der schweren Kette (VH, Heavy) sowie der leichten Kette (V λ , Lambda und V κ , Kappa) amplifiziert. Ausgehend von dem *Template* einer einzigen Zelle würde man mit einer PCR-Runde nicht genügend Material amplifizieren, daher wird das Produkt der ersten PCR-Runde als *Template* für die zweite Runde verwendet (*nested-PCR*). Für eine weitere Steigerung der DNA-Ausbeute wurde nach Proteinase K Verdau mit Hilfe des *GenomiPhi Amplifikation Kit* (GE Healthcare) das genomische Material angereichert. Mittels der isothermalen Amplifikation der Phi29 DNA Polymerase wird das komplette genetische Material der Einzelzelle angereichert. Das Protokoll wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Hochamplifikation wurden pro Zelle 3 (VH, V λ , V κ) separate 1. Runde Ansätze mit jeweils 1 und/oder 3 μ l *Template* durchgeführt. Der Primer-Mix der ersten Runde beinhaltet sowohl V- wie auch J-Primer aller Untergruppen des jeweiligen V-Gens. Im oberen Teil der Tab. 2.1 ist sowohl der PCR-Ansatz als auch das PCR-Programm der 1. Runde aufgeführt.

Tab. 2.1: Übersicht der PCR-Ansätze und Programme der *semi-nested* Einzelzell-PCR

1. Runde			
PCR-Ansatz		PCR-Programm	
Template	1 oder 3 µl	Denaturierung (95°C)	2 min
Primer Mix (je 2,5 µM)	2 µl	Annealing (65°C)	1 min
dNTP's (10 mM)	2 µl	Elongation (72°C)	1 min
10x EpanD-Puffer (ohne MgCl ₂)	4 µl	1) Denaturierung (95°C)	30 s
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl	2) Annealing (61°C)	40 s
Expand Polymerase (3,5 U)	1 µl	3) Elongation (72°C)	55 s
dH ₂ O	ad 50 µl	Elongation (72°C)	5 min
		Halten (4°C)	∞
		Zyklen 1) bis 3)	40x
2. Runde			
PCR-Ansatz		PCR-Programm	
Template	1,5 µl	Denaturierung (95°C)	2 min
Primer for (je 2,5 µM)	2 µl	Annealing (67°C)	1 min
Primer rev (je 2,5 µM)	2 µl	Elongation (72°C)	1 min
dNTP's (10 mM)	0,5 µl	1) Denaturierung (95°C)	30 s
10x EpanD-Puffer (15mM MgCl ₂)	5 µl	2) Annealing (63°C)	40 s
Expand Polymerase (3,5 U)	0,3 µl	3) Elongation (72°C)	55 s
dH ₂ O	ad 50 µl	Elongation (72°C)	5 min
		Halten (4°C)	∞
		Zyklen 1) bis 3)	44x

Für die 2. Runde bleiben die V-Gen Primer (*Forward* Primer) gleich, während der J-Primer (*Revers* Primer) weiter innen bindet. In dieser zweiten PCR werden die PCR Reaktionen untergruppenspezifisch aufgeteilt und separat amplifiziert. Mit Hilfe dieser *semi-nested* PCR können DNA Fragmente von 300-350 bp amplifiziert werden. Für die 2. PCR-Runde wurde jeweils 1,5 µl aus der 1. Runde als *Template* verwendet. Im unteren Teil der Tab. 2.1 kann man das Schema dazu sehen (exemplarisch: Vλ Amplifikation). Für die Amplifikation der VH und Vk Gene sowie für die Aktin-Kontroll-PCR wurde dem Reaktionsansatz noch 1 µl MgCl₂ (25 mM) hinzugefügt. Die *Annealing* Temperatur der VH und Vλ Amplifikation betrug 63°C, während die Anlagerung der Primer für die Amplifikation von Aktin und Vk bei 61°C erfolgte.

Neben der Bestimmung von klonalen Verwandtschaften einzelner Zellen können mit dieser Methode und den daraus folgenden Sequenzanalysen auch somatische Mutationen innerhalb der V, (D) und J Segmente identifiziert werden. Nach erfolgreicher Amplifikation, wurden die DNA-Fragmente aufgereinigt (s. 2.4.4), in den pGEM Vektor kloniert (s. 2.4.5) und sequenziert (s. 2.4.8).

2.3.7 Rekombinante Expression chimärer Antikörper in HEK 293T Zellen

Für die chimäre rekombinante Expression eines kompletten Antikörpers wurde zunächst die aus Einzelzellen amplifizierte humane variable Region der leichten und schweren Antikörperkette (s. 2.3.6) jeweils in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert, welcher die Sequenz für die konstante Region der jeweiligen murine Antikörperkette (Fc-Teil) kodiert. Die Nukleotidsequenz der jeweiligen konstanten Region sowie die 5' liegende Restriktionsschnittstellen-Kassette wurden von der Fa. MWG synthetisiert und in den pCI-Neo Vektor (Fa. Promega) eingebracht.

Die in den Primersequenzen beinhaltenden Restriktionsschnittstellen ermöglichte die weitere Klonierung der aus Einzelzellen amplifizierten V-Genfragmente in diesen eukaryotischen Expressionsvektor. Dazu wurden die amplifizierten V-Genfragmente mit *AgeI/SalI* (schwere Kette), *AgeI/XhoI* (λ , leichte Kette) und mit *AgeI/BsiWI* (κ , leichte Kette) für 90 min bei 37°C verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Banden aus dem Agarose-Gel aufgereinigt (s. 2.4.4). Die aufgereinigten V-Genfragmente wurden in den eukaryotischen Expressionsvektor pCI-Neo kloniert und in HEK 293T Zellen transfiziert. Dazu wurden diese in DMEM, 10% *Ultra low* IgG FCS, 50 U/ml Penicillin und 50 mg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. 13x10⁶ Zellen wurden in einer T175 cm² Zellkulturflasche mit je 15 µg Plasmid-DNA der schweren und leichten Antikörperkette ko-transfiziert (s. 2.1.5). Das, die chimären Antikörper enthaltende Medium, wurde nach 5 Tagen abgenommen und für 5 min bei 1900 UpM abzentrifugiert und sowohl unverdünnt für einen antigenspezifischen ELISA (s. 2.5.3) eingesetzt als auch mittels Protein G Agarose aufgereinigt. Dazu wurde 10 ml Mediumüberstand mit 10 µl Protein G Agarose Gemisch versetzt und für mindestens 14 h bei 4°C unter ständiger Rotation inkubiert. Die an Protein G Agarose gebundenen Antikörper wurden bei 800 x g für 10 min abzentrifugiert und das Pellet auf Zentrifugensäulchen (Fa. Pierce) aufpipettiert und mit dem 10fachen Säulenvolumen mit PBS zweimal gewaschen. Die Antikörper wurden in vier Fraktionen mit je 200 µl Glycin (0,1 M, pH 3) in Reaktionsgefäße eluiert, in die 20 µl

Tris-HCl (1 M, pH 8, 0,5% Natriumazid) vorgelegt wurde. Für die Bestimmung der Antikörperkonzentration der jeweiligen Eluate wurde je ein Aliquot mittels SDS-PAGE (s. 2.5.2) aufgetrennt und die Menge des aufgereinigten Antikörpers im Vergleich zu einem Kontrollantikörper, der in aufsteigenden Konzentrationen aufgetragen wurde, abgeschätzt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolation von RNA

Zur Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen wurde das *RNeasy Kit* (Fa. Qiagen) verwendet und es wurde dabei nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Es wurden ca. 5×10^6 Zellen in PBS zusammengekratzt und nach dem Pelletieren bei $1900 \times g$ nochmals mit PBS gewaschen. Nach der Lyse der Zellen wurde die genomische DNA von der Zellsuspension getrennt und die verbleibende RNA mit EtOH gefällt. Die gefällte RNA wurde nun auf die *RNeasy Säule* gegeben, an dessen Membran sie bindet. Es folgte das mehrmalige Waschen der Säule durch Zugabe von RPE-Puffer, einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt zum Trocknen der Membran und schließlich das Eluieren der RNA mit $20 \mu\text{l H}_2\text{O}$. Die Konzentration und die Qualität der RNA konnte am Photometer ermittelt werden. Die RNA wurde sofort aliquotiert und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Zur Isolation von RNA aus Gewebeschnitten wurde das *RNeasy FFPE Kit* (Fa. Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.4.2 Reverse Transkription von mRNA

Gesamt-RNA (1-5 μg) wurde mittels der SuperScript II reversen Transkriptase (Fa. Invitrogen) nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben.

2.4.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation geringer DNA-Mengen mit Hilfe von zwei flankierenden, sequenzspezifischen Primern (Oligonukleotide von 18 bp bis 28 bp Länge) und thermostabilen DNA Polymerasen. Die geschieht in der Regel in drei Schritten:

1. Denaturierung des DNA Doppelstranges bei 95°C

2. Annealing der Primer jeweils bei spezifischer Temperatur (48°C - 60°C)
3. Elongation der Primer in 5'-3' Richtung bei 72°C

Durch Wiederholung dieser drei Schritte für 20x bis 35x Zyklen können definierte DNA-Bereiche exponentiell vermehrt werden. In dieser Arbeit wurde hierfür der *PeqStar Cycler* (Fa. Peqlab) verwendet. Anschließende Auswertung erhaltener Fragmente erfolgte durch Auftrennung im Agarose Gel.

Kolonie-PCR

Um die von Bakterien aufgenommene Plasmid-DNA zu analysieren, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierbei wurden einzelne angewachsene Bakterienkolonien in 10 µl Wasser resuspendiert und 1 bis 2 µl als Template für die PCR eingesetzt. Als Kontroll-DNA wurde 1µl des *Inserts*, welches für die Ligation verwendet wurde, genutzt. Es wurden die spezifischen Primer (s. Tab. 3.13) der jeweiligen V-Gen Untergruppen verwendet.

Tab. 2.2: Übersicht der Kolonie-PCR

PCR-Ansatz		PCR-Programm	
Primer for (2,5 µM)	0,5 µl	Denaturierung (98°C)	1 min
Primer rev (2,5 µM)	0,5 µl	1) Denaturierung (94°C)	30 s
dNTP's (2 mM)	0,125 µl	2) Annealing (63°C)	40 s
10x Taq-Puffer (15 mM MgCl ₂)	1 µl	3) Elongation (72°C)	40 s
Taq-Polymerase (5 U)	0,08 µl	Elongation (72°C)	10 min
dH ₂ O	ad 12 µl	Halten (4°C)	∞
		Zyklen 1) bis 3)	28x

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 0,2 kb bis 1 kb wurden 2%ige TBS-Agarosegele verwendet und je nach Größe des Gels bei 90 V bis 120 V laufen gelassen. Anschließend wurde das Agarosegel 2 min im Ethidiumbromidbad (0,1 mg/ml) gefärbt. Für die Extraktion von DNA Fragmenten aus dem Gel wurde das *QIAquick Gel Extraction Kit* (Fa. Qiagen) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.4.5 Klonierung in pGEM Vektor

Zur Zwischenklonierung von PCR-Fragmenten wurde das *pGEM-T-Easy Vektor System* (Promega) verwendet. Der Klonierungsvektor pGEM mit überhängenden 3'-T-Enden zeichnet sich durch eine schnelle und effiziente Ligation aus. Bei 72°C wurde das PCR-Fragment für 20 min mit einer Taq-Polymerase inkubiert, die aufgrund ihrer terminalen Transferase-Aktivität und mit Hilfe des 10x PCR Puffers und dNTP zusätzliche 3'Adenosin-Überhänge an die neu-synthetisierte DNA anfügt. Anschließend konnte das PCR-Fragment in den pGEM-Vektor zwischenkloniert werden. Der Ligationsansatz bestand aus 1 µl pGEM-Vektor (10 ng), 3,5 µl des PCR-Fragmentes, 5 µl 2x Puffer (*Rapid Ligationspuffer*) und 0,5 µl Ligase. Die Ligationsreaktion erfolgte bei Raumtemperatur für 2 h mit anschließender Transformation in kompetente Bakterien.

2.4.6 Transformation chemisch kompetenter Bakterienstämme

Zur Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA wurde ein Aliquot der chemisch kompetenten Bakterien (DH5α oder XL-1 Blue) auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 0,5 µg bis 1 µg Plasmid-DNA bzw. 3,5 µl des Ligationsansatzes wurden die Bakterien 20 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 45 sek bei 42 °C im Heizblock. Anschließend wurden die Bakterien sofort auf Eis gestellt und weitere 2 min inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl SOC-Medium (0,5% 1 M MgCl₂-Lsg., 30% Glukose-Lösung, ad 10 ml SOB-Medium) wurden die Bakterien 1 h bei 37°C in Abwesenheit eines Selektionsantibiotikums geschüttelt, bevor diese auf einer LB-Agarplatten (1,5% (w/v) Agar-Agar) mit Selektionsantibiotikum (Ampicillin, 50 µg/ml) ausplattiert wurden. Die LB-Platten wurden anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zur Kultivierung von Bakterien in einer Flüssigkultur, wurde dem LB-Medium das Selektionsantibiotikum Ampicillin (50 µg/ml) zugesetzt und über Nacht bei 37°C bei 225 UpM geschüttelt. Zur langfristigen Lagerung einer Bakteriensuspension wurde eine Glycerin-Kultur angelegt. Dazu wurde in einem 2 ml Plastiksraubgefäß ein Aliquot einer Bakteriensuspension mit dem gleichen Volumen 65% (v/v) Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

2.4.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolation von geringen Mengen Plasmid-DNA wurde das *Mini-Prep Kit* (Fa. Qiagen) verwendet. Dazu wurde eine 3 ml Bakterienkultur angeimpft, über Nacht bei 225 UpM geschüttelt und bei 4000 UpM für 10 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 250 µl Puffer P1 (50 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Zur alkalischen Lyse wurden 250 µl Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) zugegeben und durch vorsichtiges Invertieren des Gefäßes gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT erfolgte die Zugabe von 350 µl Puffer P3 (3 M Kac, pH 5,5) zur Neutralisierung. Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wurde erneut durch Invertieren gemischt. Um Zelldebris von dem löslichen Überstand zu trennen, wurde das Reaktionsgefäß zentrifugiert (13.000 UpM, 20 min, 4°C). Der Überstand, in dem die Plasmid-DNA enthalten war, wurde vorsichtig abpipettiert und auf eine QiaPrep Säule gegeben. Bei anschließender Zentrifugation (13.000 UpM, 1 min, RT) bindet sich die DNA an die Säule. Nach Waschen der Säule mit 750 µl PE-Puffer wurde die DNA mit 25 µl H₂O/EB-Puffer (1:1) eluiert und die Konzentration mittels photometrischer Messung ermittelt.

2.4.8 Sequenzierung von DNA Fragmenten

Die Sequenzierung wurde kommerziell von der Firma *StarSeq* (Mainz, DE) durchgeführt. Erhaltene Sequenzen wurden mit dem Programm *FinchTV* und der V-Gen Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast> und <http://www.vbase2.org>) *in silico* analysiert.

2.4.9 Klonierung des löslichen LIF-Rezeptors

Für die Klonierung eines löslichen LIF-Rezeptors wurde das Plasmid pcDNA5 Frt/to LIF D1-D5, welches uns freundlicherweise von Silke Metz, Aachen zur Verfügung gestellt wurde, eingesetzt. Dieses Plasmid kodiert die extrazellulären Domänen D1 bis D5 des LIF-Rezeptors, die für unsere Zwecke in einen anderen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert wurden. Zur Vereinfachung der Interaktionsstudien wurde am 5' Ende der D5 Domäne des LIF-R ein Flag-Tag (Aminosäuresequenz: DYKDDDDK) hinzugefügt. Es wurden Primer entworfen, die sowohl die 5' und 3'

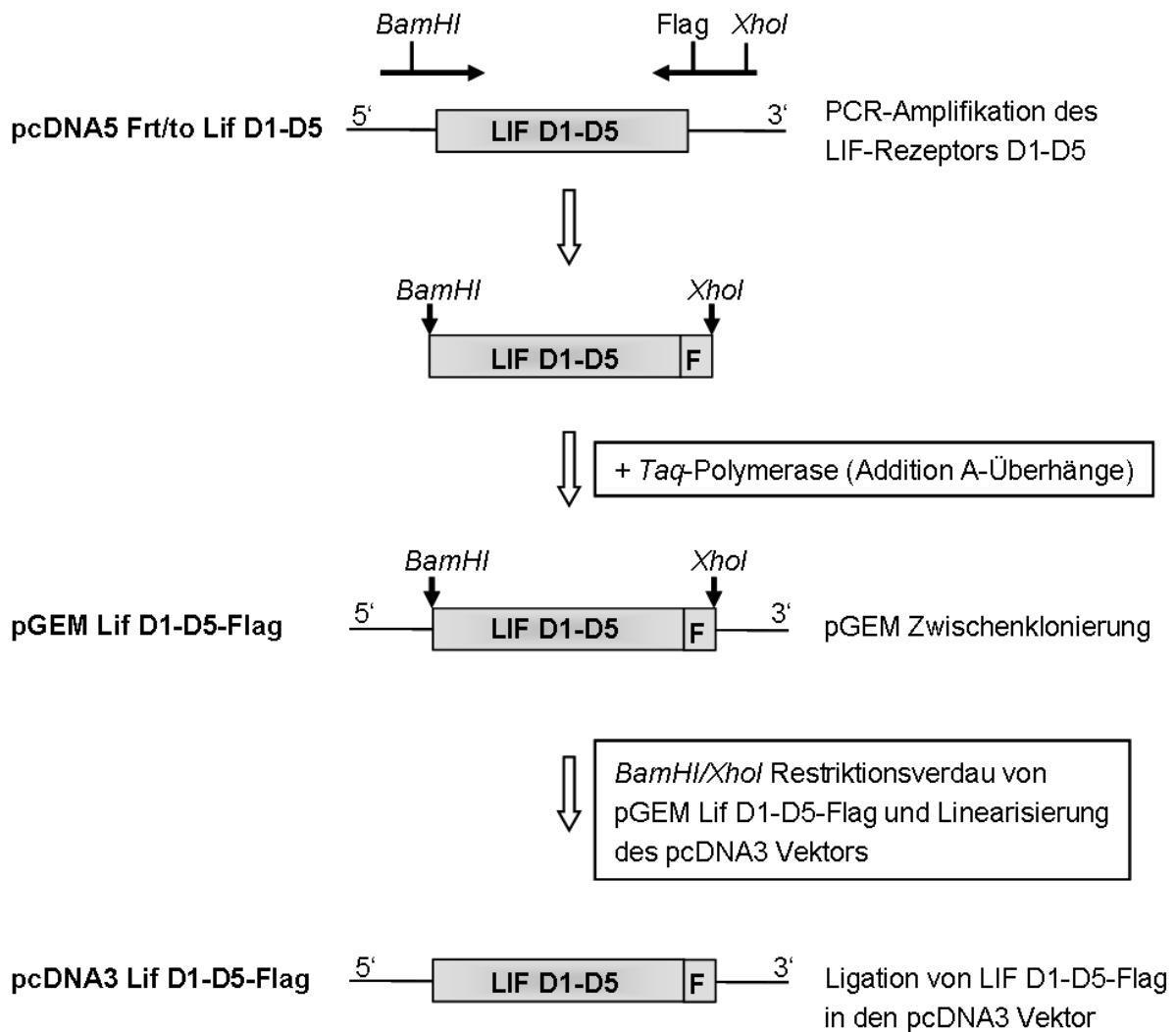


Abb. 2.4: Klonierungsstrategie für die Expression des löslichen LIF-Rezeptors. Für die PCR-Amplifikation des LIF-R Fragmentes D1-D5 wurden Primer (markiert durch Pfeile, Primersequenzen in Tab. 3.13) entworfen, die sowohl die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xho*I als auch einen Flag-Tag enthielten. Die Subklonierung in den pGEM Vektor erfolgte nach Addition der 3' Adenin (A)-Überhänge. Nach Inkubation mit den Restriktionsenzymen konnte das LIF-R Fragment D1-D5-Flag in den zuvor linearisierten pcDNA3 Vektor (s. Tab. 3.7) kloniert werden.

Anfangs- und End-Sequenz des LIF-Rezeptor Konstrukts als auch die Restriktionsschnittstellen und die Sequenz des Flag-Tags beinhalteten (s. Tab. 3.13). Das gewünschte Fragment wurde mittels PCR unter Verwendung des pcDNA5 Frt/to Lif D1-D5 Vektors als Matrize amplifiziert und in den pGEM Vektor (Fa. Promega) kloniert. Anschließend wurde sowohl der pGEM-Lif-D1D5Flag als auch der favorisierte Expressionsvektor pcDNA3 mit *Bam*HI und *Xho*I verdaut. Es folgte die Ligation des solublen Lif-D1D5Flag Fragmentes in den linearisierten Expressionsvektor (Abb. 2.4). Für die Klonierung von Vektoren wurde zunächst ein präparativer Restriktionsverdau

angesetzt. Hierfür wurde 2-5 µg Plasmid-DNA mit 5 Einheiten des entsprechenden Restriktionsenzym bei 37°C für 2 h verdaut. Zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung wurde nach Ligation in den eukaryotischen Expressionsvektor ein Kontrollverdau durchgeführt. Dafür sind lediglich 500 ng Plasmid-DNA und 1 Einheit des Enzyms notwendig.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten für SDS/PAGE Gelelektrophorese wurden die adhärennten Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit einem Zellschaber zusammengekratzt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon überführt, für 5 min bei 1900 x g zentrifugiert und erneut mit 5 ml PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde je nach Zellmenge in 20-100 µl RIPA Puffer (s. Tab. 3.14) resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Bei der Herstellung von Zelllysaten, die für Immunpräzipitationsexperimente benötigt wurden, wurde ein anderer Lysepuffer (20 mM Hepes, pH 7,5, 1% Triton, 5 mM EDTA) verwendet. Der Zelldebris wurde bei 13.000 UpM für 2 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt mittels BCA (Bicinchoninsäure) Test (Fa. Pierce) ermittelt. Alle Waschschrte wurden mit eiskaltem PBS und mit gekühlter Zentrifuge (4°C) durchgeführt.

2.5.2 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 30-120 kDa wurden 10% SDS-Gele verwendet. Dafür wurde ein 10% Trenngel und ein 4% Sammelgel gegossen. Die Zusammensetzung des SDS-Gel und der Laufpuffer sind in Tab. 3.14 beschrieben. Die Proteinproben im Ladepuffer (5x) wurden für 5 min bei 95°C denaturiert. Je nach Experiment wurden 20–60 µg Protein in eine Geltasche geladen. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte bei einer Spannung von 120 V für ca. 90 min.

Die im SDS-Gel entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine Nitrozellulose Membran mittels des *Semi-Dry Blot System* transferiert. Der Transfer erfolgte bei 40 mA pro Blot für 1 h bei RT. Nach

Blockierung mit 5% Milchpulver (in PBS + Tween 0,1%) wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert (s. Tab. 3.9). Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran dreimal 5 min bei RT in PBS-T (Tween 0,1%) gewaschen und anschließend für 60 min bei RT mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (s. Tab. 3.9) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS-T (Tween 0,1%) wurde die Membran für 1 min mit dem ECL-Reagenz inkubiert. Das in der ECL-Lösung enthaltene Luminol wird dabei durch die Peroxidase, welche an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, oxidiert. Die dabei entstehende Lumineszenz kann mit einem photosensitiven Film detektiert werden.

Die Silberfärbung des SDS-Gels erfolgte zur Visualisierung der Proteine nach der gelelektrophoretischen Auftrennung nach Angaben des Herstellers.

2.5.3 ELISA (*Enzyme-linked-immunosorbent-assay*)

Für die Untersuchung der Bindung der arthritogenen CII-Antikörper an den LIF-Rezeptor wurde ein sog. Sandwich ELISA durchgeführt. Dazu wurden Protein-G gekoppelte ELISA Platten (Fa. Pierce) verwendet, welche vor dem Experiment zunächst mit PBS-T (Tween 0,05%) 3x gewaschen wurden. Die Platten wurden mit den arthritogenen CII-Antikörper UL-1 oder C1 in PBS/1% BSA (1 und 5 µg/ml) für 1 h bei RT beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T (Tween 0,05%) wurden die *wells* mit dem synthetischen biotinylierten LIF-R Peptid (10 und 100 ng/ml) für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligen Waschen wurde mit einem HRP-gekoppelten Streptavidin Antikörper (1:5000) für 1 h bei 37°C inkubiert und die ELISA Platte mit ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) entwickelt. Unter oxidativen Bedingungen bildet ABTS ein stabiles, grün gefärbtes Radikalkation, das bei 405 nm photometrisch gemessen werden kann.

Zur Validierung der rekombinant exprimierten Antikörper (s. 2.3.7) wurden diese unverdünnt über Nacht bei 4°C auf ELISA Platten beschichtet. Die biotinylierten CII-Peptide (C1- und U1-Peptid) mit einer epitopspezifischen Sequenz wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml für 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS-T wurde mit einem HRP-gekoppelten Streptavidin Antikörper (1:10.000) für 1 h bei RT inkubiert und die ELISA Platte wie oben beschrieben entwickelt.

2.5.4 Immunpräzipitation

Zum Nachweis von Proteininteraktionen wurden Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Hierfür wurden adhärente Zellen zusammengekratzt und, wie unter 2.5.1 beschrieben, lysiert. 250-1000 µg Zelllysate wurde mit dem entsprechenden Antikörper sowie 30 µl Protein A/G Agarose-Gemisch (Fa. Pierce) versetzt und für 90 min bei 4°C unter ständiger Rotation inkubiert. Es folgten 4 Waschschrte, wobei der Ansatz jeweils mit eiskaltem PBS / 0,1 % Triton X-100 resuspendiert und bei 13.000 UpM bei 4°C für 2 min abzentrifugiert wurde. Das Pellet wurde in 10 µl Ladepuffer aufgenommen und in der SDS-Gelelektrophorese eingesetzt (s. 2.5.2).

3. Material

Tab. 3.1: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Blottkammer	Biometra, Göttingen, DE
Butan/Propan Gas-Brenner C206	Campinggaz, Hattersheim, DE
Cap-Stripes (Domed)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Chamberslides	Sarstedt, Nümbrecht, DE
CO ₂ – Inkubator HeraCell 240	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Deckglässchen, 24x66 mm	Menzel, Braunschweig, DE
FACS-Aria III, FACS-Fortessa	Becton & Dickinson, Heidelberg, DE
FACS-Röhrchen	BD Bioscience, Heidelberg, DE
Falcon 15/50 ml	Greiner, Frickenhausen, DE
Feinwaage XS205	Mettler Toledo, Giessen, DE
Filterspitzen 10/100/200/1000 µl	Starlab, Hamburg, DE
Geldokumentationssystem – RED	Biozym, Oldendorf, DE
Gelelektrophoresekammern	Peqlab, Erlangen, DE
Heizblock	Eppendorf, Hamburg, DE
Kryotube (0,5/2 ml)	Starlab, Hamburg, DE
Kühlschränke 4°C/-20°C	Liebherr, DE
MaxiSorp Nunc ELISA Platten	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Mikroskop AxioImager Z1	Zeiss, München, DE
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, München, DE
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, München, DE
PCR Platten 96well	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
PCR-Cycler PeqStar	Peqlab, Erlangen, DE
PCR-Tubes 0,2/0,5 ml	Biozym, Oldendorf, DE
PCR-Workstation	Kisker, Steinfurt, DE
Petrischale, 10cm	Greiner, Frickenhausen, DE
pH-Meter	Schott, Mainz, DE
Photometer	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipetboy Cell Mate II	Thermo Fisher Scientific (Matrix Tec), Dreieich, DE
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, DE
Plastikschraubdeckelgefäß	Starlab, Hamburg, DE
Plattenlesesystem Mithras LB940	Berthold Technologies, DE
Roller (SRT9)	Stuart (Vertrieb: VWR), Darmstadt, DE
Power Supply EPS 601	GE Healthcare, München, DE
Protein-G gekoppelte ELISA Platten	Thermo Fisher Scientific (Pierce), Dreieich, DE
Reaktionsgefäße 0,5 / 1,5 / 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Röntgenkassetten	Peqlab, Erlangen, DE
Schüttler unimax 2010	Heidolph, Schwabach, DE
Sterilbank HeraSafe	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Stripette (Costar) 5,10,25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
UV-Tisch 302 nm	Bachofer, Reutlingen, DE
Vortexer	Scientific Industries, Karlsruhe, DE

Waage Kern 470	Kern, Balingen, DE
Zellkulturplatten 6 / 24 – well	Greiner, Frickenhausen, DE
Zellkulturplatten 96well, weiß	Berthold, Bad Wildbach, DE
Zellkulturflächen 75 cm ²	Greiner, Frickenhausen, DE
Nitrozellulose Membran	GE Healthcare, München, DE
Whatman Blottingpapier	Neolab, Heidelberg, DE
Röntgenfilme	GE Healthcare, München, DE
Zellsieb	Millipore, Darmstadt, DE
Zentrifugen (Minifuge, Multifuge, Tischzentrifuge)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE

Tab. 3.2: Chemikalien

Acrylamid 40%	Roth, Karlsruhe, DE
Agar	Life Technologies, Darmstadt, DE
Agarose	Sigma, Hamburg, DE
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, DE
Bacto Yeast Extrakt	Roth, Karlsruhe, DE
Borsäure	Applichem, Darmstadt, DE
Bromphenolblau	Applichem, Darmstadt, DE
DAPI	Sigma, Hamburg, DE
Dinatriumphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)	Riedel-de Haen, Seelze, DE
EDTA-Trikomplex III	Roth, Karlsruhe, DE
Entwickler- und Fixierlösung (Kodak)	Sigma, Hamburg, DE
Essigsäure 100%	Applichem, Darmstadt, DE
Ethanol (EtOH) 96%	Sigma, Hamburg, DE
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, DE
Glucose-Lösung	Roth, Karlsruhe, DE
Glycin p.A.	Applichem, Darmstadt, DE
Hydrogenperoxid (H_2O_2)	Sigma, Hamburg, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, DE
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, DE
LB-Trockenmedium	Roth, Karlsruhe, DE
Methanol (MeOH)	Sigma, Hamburg, DE
Meyers Hämalaun	Applichem, Darmstadt, DE
Milchpulver, fettarm	Roth, Karlsruhe, DE
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Sigma, Hamburg, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Hamburg, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Hamburg, DE
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt, DE
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, DE
Pepton	Roth, Karlsruhe, DE
Ponceau S	Applichem, Darmstadt, DE
TEMED 99%	Roth, Karlsruhe, DE
Toluidinblau	Merck, Darmstadt, DE
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma, Hamburg, DE
Tris-HCl	Sigma, Hamburg, DE
TritonX-100	Sigma, Hamburg, DE

Trockenmedium LB	Roth, Karlsruhe, DE
Tween20	Roth, Karlsruhe, DE
Vergällter Ethanol 70%	Roth, Karlsruhe, DE
Xylol	Sigma, Hamburg, DE
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe, DE

Tab. 3.3: Reagenzien und Enzyme für molekularbiologische Arbeiten

ABTS 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)	Roche, Mannheim, DE
Ampicillin	Calbiochem, Darmstadt, DE
<i>AgeI</i> , Restriktionsenzym	New England Biolabs, Frankfurt, DE
<i>BamHI</i> , Restriktionsenzym	New England Biolabs, Frankfurt, DE
BCA Reagenz	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
BSA	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
<i>BsiWI</i> , Restriktionsenzym	New England Biolabs, Frankfurt, DE
Coomassie Tablette (PhastGel Blue)	GE Healthcare, München, DE
DNA-Exitus Plus	Applichem, Darmstadt, DE
DNA-Ladepuffer	Roth, Karlsruhe, DE
Expand High Fidelity	Roche, Mannheim, DE
Kanamycindisulfat	Merck, Darmstadt, DE
Protein Marker (<i>prestained/unstained</i>)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Proteinase K	Roche, Mannheim, DE
Poly-L-Lysin	Sigma, Hamburg, DE
<i>Sall</i> , Restriktionsenzym	New England Biolabs, Frankfurt, DE
T4 DNA Ligase	Promega, Mannheim, DE
Taq DNA Polymerase	Peqlab, Erlangen, DE
<i>XhoI</i> , Restriktionsenzym	New England Biolabs, Frankfurt, DE

Tab. 3.4: Medien und Reagenzien für zellbiologische Arbeiten

Camptothecin 98%	Acros Organics, Geel, B
Biocoll-Lösung (Dichte: 1,077 g/ml)	Merck Millipore, Darmstadt, DE
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Sigma, Hamburg, DE
DMEM/HAM F12	Sigma, Hamburg, DE
FcR Blocking Reagent, human	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, DE
Fötale Rinderserum Gold	PAA, Cölbe, DE
Fötale Rinderserum, <i>ultra low IgG</i>	Invitrogen, Darmstadt, DE
Hygromycin B	PAA, Egelsbach, DE
Kollagenase NB4G	Serva, Heidelberg, DE
PBS (<i>Dulbecco's Phosphate buffered Saline, without Mg²⁺ and Ca²⁺</i>)	Invitrogen, Darmstadt, DE
Pen/Strep (10,000 U/ml)	Invitrogen, Darmstadt, DE
Pronase	Merck, Darmstadt, DE
Puromycindihydrochlorid	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, DE
RPMI	Sigma, Hamburg, DE
Trypanblau 0,4%	Invitrogen, Darmstadt, DE
Trypsin 2,5%, 10x	Lonza, Base, CH

Tab. 3.5: Zytokine

<i>Leukemia-Inhibitory-Factor (Lif)</i>	R&D Systems, Wiesbaden, DE
Rekombinant löslicher Lif Rezeptor	R&D Systems, Wiesbaden, DE

Tab. 3.6: Kommerzielle Kits

Caspase 3/7 Assay	Promega, Mannheim, DE
CellTiter – Glo Luminiscent Cell Viability	Promega, Mannheim, DE
ECL-Plus Western Blot Kit	Perkin Elmer, Rodgau, DE
Gel-Extraction Kit	Qiagen, Hilden, DE
GenomiPhi V2 Amplifikation Kit	GE Healthcare, München, DE
Jet Pei Transfektionsreagenz	Polyplus, Darmstadt, DE
L2AB2-System-HRP	Dako, Hamburg, DE
Link&Label, IHC Detektionssystem	Biogenix, San Ramon, USA
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim, DE
PCR-Purification Kit	Qiagen, Hilden, DE
Plasmid-Kit, Mini und Maxi <i>Endofree</i>	Qiagen, Hilden, DE
RNeasy RNA Isolation Kit	Qiagen, Hilden, DE
RNeasy RNA FFPE Kit	Qiagen, Hilden, DE
Silver Staining Kit	Pierce, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE

Tab. 3.7: Vektoren

Vektoren	Herkunft
pGEM T-easy	Promega, Mannheim, DE
pcDNA5 Frt/to Lif D1-D5	S. Metz, Aachen, DE
pcDNA3 Lif D1-D5 Flag	N. Schneider, diese Arbeit
pTL-Luc (STAT3 Reporter)	Panomix, Mailand, Italien
pCI-Neo eukaryotischer Expressionsvektor	Promega, Mannheim, DE

Tab. 3.8: Zellen

Name	Beschreibung	Quelle/Firma
HEK 293T	humane embryonale Nierenzelllinie, adhären	Zelllinie, St. Stein (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt), ACC 305
HEP G2	humanes Leberzellkarzinom, adhären	Zelllinie, Prof. Hansmann (Pathologie, Frankfurt), ACC 180
OA Chondrozyten	humane Osteoarthritis Chondrozyten, adhären	Primäre Zellen (Friedrichsheim, Frankfurt)
T/C28a4 Chondrozyten	humane Chondrozyten, adhären	Zelllinie, Dr. M. B. Goldring (Hospital for Special Surgery, New York, NY)

Tab. 3.9: Antikörper

	Name	Spezies	Quelle/Firma	Verwendung
Primäre Antikörper	Affinitätsgereinigte anti-CII	Human	S. Haag (Stockholm, SE)	IHC
	Anti-Human	Maus	Serotec (Oxford, UK)	IHC
	UL-1	Maus	R. Holmdahl (Stockholm, SE)	WB, IF, IP
	CIIC1	Maus	R. Holmdahl (Stockholm, SE)	WB, IF, IP
	Anti-LIFR	Ziege	R&D (Darmstadt, DE)	WB, IF, IP
	Anti-CD20	Maus	Dako (Hamburg, DE)	IHC, IF
	Anti-CD138	Maus	Dako (Hamburg, DE)	IHC, IF
	Anti-PAD2	Hase	Abcam (Cambridge, UK)	WB, IHC, IF
	Anti-PAD4	Hase	Abcam (Cambridge, UK)	WB, IHC, IF
	Anti-Tubulin	Hase	Epitomics (Cambridge, UK)	WB
	Streptavidin-HRP	<i>Streptomyces avidinii</i>	Dianova (Hamburg, DE)	WB, ELISA
Sekundäre Antikörper	Anti-Maus-HRP	Ziege	Dako (Hamburg, DE)	WB, ELISA
	Anti-Schaf-HRP	Hase	Dako (Hamburg, DE)	WB, ELISA
	Anti-Hase-HRP	Maus	Dako (Hamburg, DE)	WB, ELISA
	Anti-Hase-Alexa-488	Maus	Dako (Hamburg, DE)	IF
	Anti-Hase- Alexa-594	Maus	Dako (Hamburg, DE)	IF
	Anti-Maus- Alexa-594	Ziege	Dako (Hamburg, DE)	IF
	Anti-Maus- Alexa-594	Huhn	Dako (Hamburg, DE)	IF
	Anti-CD3-APC	Maus	Biolegend (Fell, DE)	FACS
	Anti-CD19-V450	Maus	eBioscience (Frankfurt, DE)	FACS
	Anti-Streptavidin-PE	<i>Streptomyces avidinii</i>	Life Tech. (Darmstadt, DE)	FACS

ELISA (*Enzyme-linked-immunosorbent-assay*), FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*), IHC (*Immunhistochemistry*), IF (*Immunofluorescence*), IP (*Immunoprecipitation*), WB (*Western Blot*)

Tab. 3.10: Synthetische Peptide

A) CII Peptide (Quelle: R. Holmdahl, Stockholm, SE)

Name	Sequenz (5' – 3')	Kon.	Verw.
C1	BIO(GPp) ₅ -ARGLTGRPGDAp-(GPp) ₂	tripelhelikal	IHC, LMD, FACS
C1cit	BIO(GPp) ₅ -ACitGLTGCitPGDAp-(GPp) ₂	tripelhelikal	IHC, LMD
U1	BIO(GPp) ₅ -GLVGPRGERGFp-(GPp) ₂	tripelhelikal	IHC, LMD
F4 66	BIO(GPp) ₅ GDKGEAGEpGERGLKGHRGFTGLQ (GPp) ₂ G	linear	IHC, LMD

Buchstaben = Aminosäure-Code, Cit = Citrullin, p = Hydroxyprolin, BIO = Biotin, Konformation (Kon.), Verwendung (Verw.), IHC (Immunhistochemistry), LMD (Laser-Mikrodissektion), FACS (Fluorescence-activated cell sorting)

B) Andere Peptide (Quelle: Biosyntan, Berlin, DE)

Name	Sequenz (5' – 3')	Konformation	Verwendung
LIF-R (90405)	GRITGLVGPRNTEYT-EDA-BIO x TFA	linear	ELISA

Buchstaben = Aminosäure-Code, BIO = Biotin, EDA = Ethylendiamin (Linker), TFA = Trifluoressigsäure (Schutzgruppenabspaltung)

Tab. 3.11: Benötigte Software

Verwendung	Referenzen/Programm
BLAST Software	Vbase2 (http://www.vbase2.org) NCBI Ig Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast) IMGT (http://www.imgt.org/IMGT_vquest)
Bearbeitung von DNA/RNA Sequenzen; Primer-Design	Integrated DNA Technologies: (http://eu.idtdna.com/scitools/scitools.aspx) FinchTV Geospiza
Dokumentation; Auswertungen	Microsoft Office, Image J, Adobe Photoshop

Tab. 3.12: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
DH5 α (Stratagene, Zuidoost, NE)	F ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) PhoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1
XL1-Blue (Stratagene, Zuidoost, NE)	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]

Tab. 3.13: Oligonukleotide

Method	Name	5'-3' – Sequenz (Restriktionsschnittstelle in rot)
V-Gen Analyse Laser-Mikrodissektion	Heavy Chain - VH	
	For 1.+2. scVH1FR1	ACTAGTCGACCTCAGTGAAGGT(CT)TCCTGCAAGGC
	For 1.+2. scVH2FR1	ACTAGTCGACGTCTCGCTGGTGAAA(GC)CCACAC
	For 1.+2. scVH3FR1	ACTAGTCGACGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG
	For 1.+2. scVH4FR1	ACTAGTCGACCCTGTCCCTCACCTGC(AG)CTGTC
	For 1.+2. scVH5FR1	ACTAGTCGACAAAAAGCCCCGGGGAGTCTCTGA(AG)GA
	For 1.+2. scVH6FR1	ACTAGTCGACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTG
	Rev 1. sc3'JH1244	ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT
	Rev 1. sc3'JH3	TACCTGAAGAGACGGTGACCATTGT
	Rev 1. sc3'JH6	ACCTGAGGAGACGGTGACCCTGGT
	Rev 2. sc5JH1345	ACTAGTCGACGGTGACCAGGGT(GCT)CC(CT)GGCC
	Rev 2. sc5JH2	ACTAGTCGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
	Rev 2. sc5JH6	ACTAGTCGACGGTGACCCTGGTCCCTTGCC
	Light Chain - Vk	
	For 1.+2. scVK1	GACATCC(AG)G(AT)TGACCCAGTCTCC(AT)TC
	For 1.+2. scVK2	CAG(AT)CTCCACTCTCCCTG(CT)CCGTCA
	For 1.+2. scVK3	TTGTG(AT)TGAC(AG)CAGTCTCCAG(GC)CACC
	For 1.+2. scVK4	AGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGC
	Rev 1. sc3'JK5	CTCTAAA(AG)GTCAATACTGGCCATC
	Rev 2. sc5'JK124	ACTCACGTTTGAT(CT)TCCA(GC)CTTGGTCC
	Rev 2. sc5'JK3	GTACTIONTTGATATCCACTTTGGTCC
	Rev 2. sc5'JK5	GCTTACGTTAATCTCCAGTCGTGTCC
	Light Chain - Vλ	
	For 1.+2. VL1	GGTCCTGGGCCAGTCTGTG
	For 1.+2. VL2	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCT
	For 1.+2. VL3a	CTCAGCCACCCTCAGTGTCCGT
	For 1.+2. VL3b	CTCAGCCACCCTCGGTGTGAGT
	For 1.+2. VL4	TTTCTTCTGAGCTGACTCAGGAC
	For 1.+2. VL6	GAGTCTCCGGGGAAGACGGTA
	For 1.+2. VL7	GTGGTGACTCAGGAGCCCTCAC
	For 1.+2. VL8	ACTGTGGTGACCCAGGAGCCA
	For 1.+2. VL9	CCTGTGCTGACTCAGCCACCT
	Rev 1. JL1	GCCACTTACCTAGGACGGTGAC
	Rev 1. JL23	GAAGAGACTCACCTAGGACGGTC
	Rev 1. JL67	GGAGACT(CT)ACCGAGGACGGTC
	Rev 2. JL1i	GGACGGTGACCTTGGTCCCAGT
	Rev 2. JL237i	GACGGTCAGCTTGGT(GC)CCTCC
	Rev 2. JL6i	GACGGTCACCTTGGTGCCACT
	Aktin	
	Rev 1. AK1	CTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAA
	Rev 2. AK2i	GAAGGTAGTTTCGTGGATGCCACAG
	For 1.+2. AK3	GAAGGTAGTTTCGTGGATGCCACAGGACTCC

V-Gen Analyse FACS	Heavy Chain - VH	
	For 1. 5-VH1	ACAGGTGCCCACTCCCAGGTGCAG
	For 1. 5-VH3	AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG
	For 1. 5-VH46	CCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAG
	For 1. 5-VH5	CAAGGAGTCTGTTCCGAGGTGCAG
	Rev 1. 3-CH1	GGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTC
	Rev 1. 3-CH2	GGGAATTCTCACAGGAGACGA
	For 2. 5-VH1	CTGCA ACCGGT GTACATTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAG
	For 2. 5-VH15	CTGCA ACCGGT GTACATTCCGAGGTGCAGCTGGTGCAG
	For 2. 5-VH3	CTGCA ACCGGT GTACATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAG
	For 2. 5-VH4	CTGCA ACCGGT GTACATTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG
	For 2. 5-VH6	CTGCA ACCGGT GTACATTCCCAGGTACAGCTGCAGCAG
	Rev 2. 3-JH1	TGCGAA GTCGAC GCTGAGGAGACGGTGACCAG
	Rev 2. 3-JH3	TGCGAA GTCGAC GCTGAAGAGACGGTGACCATTG
	Rev 2. 3-JH6	TGCGAA GTCGAC GCTGAGGAGACGGTGACCCTG
	Light Chain - Vk	
	For 1. 5-VK12	ATGAGGSTCCCYGCTCAGCTGCTGG
	For 1. 5-VK3	CTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAG
	For 1. 5-VK4	ATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTG
	Rev 1. 3-CK1	GTTTCTCGTAGTCTGCTTTGCTCA
	For 2. 5-VK1	CTGCA ACCGGT GTACATTCTGACATCCAGA
	For 2. 5-VK2	CTGCA ACCGGT GTACATGGGGATATTGTGA
	For 2. 5-VK3	TTGTGCTGCA ACCGGT GTACATTCAGAAA
	For 2. 5-VK4	CTGCA ACCGGT GTACATTCGGACATCGTGA
	Rev 2. 3-JK1	GCCAC CGTACG TTTGATYTCCACCTTGCTC
	Rev 2. 3-JK2	GCCAC CGTACG TTTGATCTCCAGCTTGCTC
	Rev 2. 3-JK3	GCCAC CGTACG TTTGATATCCACTTTGCTC
	Rev 2. 3-JK4	GCCAC CGTACG TTTAATCTCCAGTCGTGCTC
	Light Chain - Vλ	
	For 1. 5-VL1	GGTCCTGGGCCAGTCTGTGCTG
	For 1. 5-VL2	GGTCCTGGGCCAGTCTGCCCTG
	For 1. 5-VL3	GCTCTGTGACCTCCTATGAGCTG
	For 1. 5-VL45	GGTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTG
For 1. 5-VL6	GTTCTTGGGCCAATTTTATGCTG	
For 1. 5-VL7	GGTCCAATTCYCAGGCTGTGGTG	
For 1. 5-VL8	GAGTGGATTCTCAGACTGTGGTG	
Rev 1. 3-CL	CACCAGTGTGGCCTTGTGGCTTG	
For 2. 5-VL1	CTGCT ACCGGT TCCTGGGCCAGTCTGTGCTGACKCAG	
For 2. 5-VL2	CTGCT ACCGGT TCCTGGGCCAGTCTGCCCTGACTCAG	
For 2. 5-VL3	CTGCT ACCGGT TCTGTGACCTCCTATGAGCTGACWCAG	
For 2. 5-VL45	CTGCT ACCGGT TCTCTCTCSCAGCYTGTGCTGACTCA	
For 2. 5-VL6	CTGCT ACCGGT TCTTGGGCCAATTTTATGCTGACTCAG	
For 2. 5-VL78	CTGCT ACCGGT TCCAATTCYCAGRCTGTGGTGACYCAG	
Rev 2. 3-CL	CTCCTCA CTCGAG GGYGGGAACAGAGTG	
RT-PCR	PAD	
	PAD1_For	CAC CAG GCA AAA AGA AGC AT
	PAD1_Rev	GAT GCC CAG GTA CTT GCC TA
	PAD2_For	CAG AGC CTT CTT CCC AAA CA
	PAD2_Rev	AGT GGA CTT CCC CCA GAA AT
	PAD3_For	GCT CTT CAA GAC CGA GAG GA
	PAD3_Rev	GCA GCA TGT GGT ATG GAG TG
	PAD4_For	CAT GGT GAA CAT GCT GGT G
PAD4_Rev	TGC CTG ATG TGG TAG GTG AA	
PAD6_For	CGT GGA GGA GTG CAT TCA CCT GAA C	
PAD6_Rev	GCC TCG CAA AGG ACC TCT TGG G	
Klonierung	PCR-Amplifikation des LIF-R D1-D5-Flag Fragments	
	For <i>Bam</i> HI/D1 Rev <i>Xho</i> I/Flag	AGG ATC CAT GGC AGC TTA CTC ATG GTG ACT CGA GTC ACT TGT CAT CGT CGT C

Tab. 3.14: Puffer, Lösungen

Name	Zusammensetzung
Blotting-Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol in H ₂ O
Citrat-Puffer	10 mM Tri-Na-Citrat-Dihydrat, pH 6 (mit Zitronensäure einstellen) in H ₂ O
Coomassie-Färbelösung	1 PhastGel Blue Tab. in 80 ml H ₂ O, add 200 ml Methanol, Filtration d. Lsg., für Gebrauch 1:1 mit Essigsäure (20%)
EDTA-Puffer	1 mM EDTA, pH 8 (mit NaOH einstellen) in H ₂ O
Ladepuffer (SDS-Gel)	0,2 M Tris-HCL (pH 6,8), 4% SDS, 40% Glycerin (w/v), 0,4% Bromphenolblau, add 10 ml H ₂ O
LB-Medium	2% LB-Trockenmedium, add 1 L H ₂ O
PBS-Puffer 10x	2,7 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ ·xH ₂ O, in H ₂ O
Ponceau-Lsg.	0,5% Ponceau S, 1% Essigsäure, add 100 ml H ₂ O
RIPA-Puffer (radio immunoprecipitation assay)	50 mM Tris (pH 7), 150 mM NaCl, 0,5% Natriumdesoxycholat, 1% Triton X-100, Proteaseinhibitoren
SDS-Puffer 10x	192 mM Glycin, 25 mM Tris, 1% SDS in H ₂ O
SOB-Medium	2% Pepton, 0,5% BactoYeast Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, add 0,5 L H ₂ O
SOC-Medium	0,5% 1M MgCl ₂ -Lsg., 30% Glukose-Lsg., add 10 ml SOB-Medium
TBE-Puffer 10x	1 M Tris, 0,9 M Borsäure, 10 mM EDTA pH 8,3 in H ₂ O
TBS-Puffer 10x	150 mM NaCl, 7,7 mM Tris-HCL pH 7,4 in H ₂ O
Western Blot Sammelgel (4%)	400 µl Acrylamid (40%), 1 ml Tris-HCL (pH 6,8), 40 µl SDS (10%), 8 µl Temed, 60 µl APS (10 %), add 4 ml H ₂ O
Western Blot Trenngel (10%)	2 ml Acrylamid (40%), 2 ml Tris-HCL (pH 8,8), 100 µl SDS (10%), 20 µl Temed, 140 µl APS (10 %), add 10 ml H ₂ O

4. Ergebnisse

4.1 Der Effekt des arthritogenen UL-1 Antikörpers auf Chondrozyten

Antikörperantworten gegen definierte Epitope der tripelhelikalen Hauptdomäne des Kollagen Typ II (CII) sind sowohl mit der Entwicklung der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA, *Collagen Induced Arthritis*) im Mausmodell als auch mit der humanen rheumatoiden Arthritis assoziiert. Als konformative Zielstrukturen der humoralen Immunantworten gegen CII in der RA aber auch in Experimentalerkrankungen in Maus, Ratte und nicht-humanen Primaten konnten die über Speziesbarrieren hinweg evolutionär konservierten Hauptepitope C1 (AS 359-363), U1 (AS 494-504) und J1 (AS 551-564) identifiziert werden. Während die intravenöse Gabe monoklonaler Antikörper mit Monospezifität für eines dieser Epitope in der rezipienten Maus lediglich eine transiente nicht-erosive Synovialitis auslöst, führt der Transfer eines Antikörper-Cocktails mit Spezifität für alle 3 immundominanten Epitope zur Induktion einer klinisch schweren Arthritis, die histologisch durch destruierende Knorpel- und Knochenveränderungen charakterisiert ist (CAIA, *Collagen Antibody Induced Arthritis*). Das pathogene Potenzial der einzelnen Antikörper konnte in diesen Transferexperimenten detaillierter untersucht werden. Bemerkenswerter Weise führte die singuläre Injektion des UL-1 Antikörpers, der gegen das U1-Epitop gerichtet ist, unter Bedingungen die keine Arthritis auslösen zu katabolen Wirkungen auf den Knorpelmetabolismus (Nandakumar et al. 2008). Bereits 72 h nach Injektion konnte eine deutliche Proteoglykandepletion der Knorpelmatrix und somit eine starke Strukturschädigung nachgewiesen werden. Eine solche matrixdestruierende Wirkung konnte durch den Transfer anderer CII-spezifischer monoklonaler Antikörper differenter Epitopspezifität, wie den CIIC1 Antikörper, der gegen das C1-Epitop (AS 359-363) gerichtet ist, unter sonst identischen experimentellen Bedingungen nicht beobachtet werden. Da die Proteoglykandepletion auch in UL-1 Transferstudien in C5-defizienten Mäusen in vollständiger Abwesenheit Antikörper-induzierter Inflammationsreaktionen sowie in Gewebekulturexperimenten durch den UL-1 Antikörper aber nicht durch CII-spezifische Antikörper differenter Feinspezifität induzierbar war, weist dies auf einen neuartigen nicht-inflammatorisch vermittelten

epitopspezifischen Mechanismus der Knorpelschädigung hin. Für die Untersuchung der zugrundeliegenden destrukturierenden Mechanismen wurden potentielle Effekte des arthritogenen UL-1 Antikörpers auf die Signaltransduktion der Chondrozyten *in vitro* mittels Western Blot im Vergleich zum CII-spezifischen Kontrollantikörper ClIC1 ohne Proteoglykan-depletierendes Wirkpotenzial untersucht.

4.1.1 Verstärkte Phosphorylierungen nach UL-1 Stimulation

Um den Effekt des UL-1 Antikörpers auf Chondrozyten zu untersuchen, wurden Signaltransduktionsversuche durchgeführt, in denen die T/C28a4 Chondrozyten Zelllinie mit beiden arthritogenen CII-Antikörpern UL-1 und ClIC1 für verschiedene Inkubationszeiten stimuliert und im Western Blot analysiert wurde (Abb. 4.1). Mittels des pan-Phospho-Tyrosin Antikörpers können Tyrosinphosphorylierungen von Proteinen im Zelllysate nach Inkubation mit verschiedenen Stimuli detektiert werden und aufgrund des Molekulargewichts des phosphorylierten Proteins einen Hinweis auf einen möglichen Signalweg geben. Bereits nach 10 min Inkubation mit dem UL-1 Antikörper ist eine deutlich verstärkte Tyrosinphosphorylierung von Proteinen im Molekulargewichtsbereich zwischen 50-60 kDa und zwischen 85-120 kDa im Vergleich zur Stimulation mit dem ClIC1 Antikörper nachweisbar, welche ein maximale Phosphorylierung bei 20 min aufwies und auch noch nach 120 min detektierbar war (Abb. 4.1, Klammer). Im Vergleich dazu zeigen die Proben, die mit dem arthritogenen Vergleichsantikörper ClIC1 stimuliert waren, neben einer basalen Proteinphosphorylierung keine Verstärkung dieser Phosphorylierungssignale.

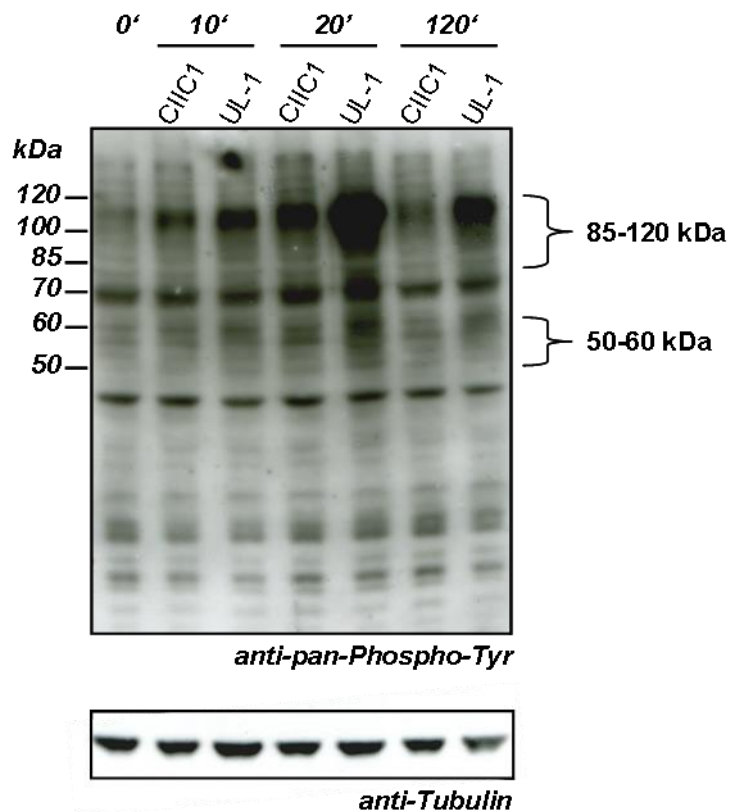


Abb. 4.1: Verstärkte Tyrosin-Phosphorylierung von T/C28a4 Chondrozyten nach Inkubation mit dem arthritogenen Antikörper UL-1. Zelllysate (50 µg) von mit dem UL-1 bzw. dem CIIc1 Antikörper (je 1 µg/ml) stimulierten Chondrozyten wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose Membran transferiert und mittels eines anti-pan-Phospho-Tyrosin Antikörpers detektiert (oben). Nach Inkubation mit dem UL-1 Antikörper ist nach 20 min eine deutlich verstärkte Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 50-60 kDa und 85-120 kDa (markiert durch Klammer) detektierbar. Die Beladungskontrolle erfolgte mittels anti-Tubulin Antikörper (unten).

Das Ergebnis, dass die Inkubation mit dem UL-1 Antikörper eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung im Molekulargewichtsbereich zwischen 50-60 kDa auslöst, hat dazu geführt, eine in der Signaltransduktion bekannte und gut untersuchte Kinase, nämlich die c-Src-Kinase, die ein Molekulargewicht von 60 kDa besitzt, zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden T/C28a4 Chondrozyten mit den beiden arthritogenen CII-Antikörpern UL-1 und CIIc1 für 0-40 min inkubiert und mittels Western Blot Analyse die Phosphorylierung der Src-Kinase an ihrer Aktivierungsstelle Y416 untersucht. Die Src-Kinase wurde bereits nach 5 min Inkubation mit dem UL-1 Antikörper um Faktor 2,6 stärker phosphoryliert im Vergleich zu Zellen, die mit dem CIIc1 Antikörper stimuliert wurden. Diese verstärkte Tyrosinphosphorylierung der Src-Kinase konnte zu allen untersuchten Zeitpunkten von 5 bis 40 min beobachtet werden (Abb. 4.2). Die Zellen, die mit dem CIIc1

inkubiert wurden, zeigen lediglich eine geringe Grundaktivität der Src-Kinase, die darüber hinaus durch den CIIc1 Antikörper auch nicht verstärkt wurde.

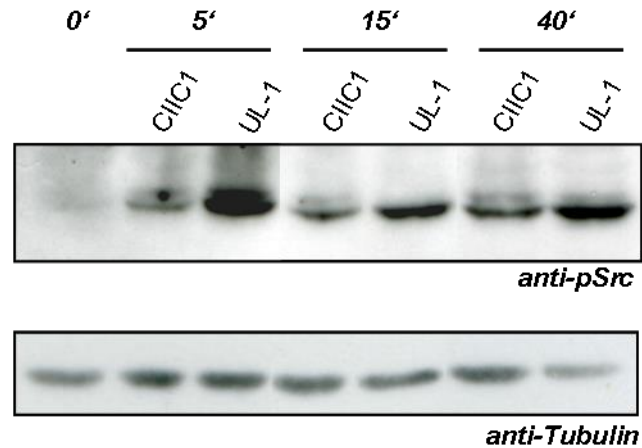


Abb. 4.2: Verstärkte Src-Kinase-Phosphorylierung von T/C28a4 Chondrozyten nach Gabe des arthritogenen Antikörpers UL-1. Nach Stimulation mit dem UL-1 und CIIc1 Antikörper (je 1 µg/ml) für 5-40 min wurden Zelllysate (50 µg) von Chondrozyten im Western Blot mittels eines anti-Phospho (Y416) -Src Antikörpers analysiert (oben). Nach Inkubation mit dem UL-1 Antikörper ist bereits nach 5 min eine deutlich verstärkte Phosphorylierung der Src-Kinase detektierbar. Die Beladungskontrolle erfolgte mittels anti-Tubulin Antikörper (unten).

4.1.2 Sequenzhomologie des CII-Epitops mit dem LIF-R

Die bisher gezeigten Effekte des UL-1 Antikörpers auf Chondrozyten führten zu der Fragestellung, ob eine mögliche kreuzreaktive Bindung des Antikörpers an Proteine der Zelloberfläche verantwortlich für die Verstärkung des Phosphorylierungssignals ist. Durch Sequenzhomologie-Analysen des vom UL-1 Antikörper erkannten Aminosäureepitops auf CII konnte mit Hilfe von Datenbanken (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) eine fast 100% Homologie zum sogenannten LIF-Rezeptor (LIF-R) festgestellt werden (Abb. 4.3). Das pleiotrope Zytokin LIF (*Leukemia-Inhibitory-Factor*) spielt in vielen Zelltypen, wie embryonale Stammzellen, Osteoblasten und Neuronen eine wichtige Rolle. Auf der Oberfläche der Zellen interagiert LIF zunächst mit dem LIF-R, dann mit dem Glykoprotein 130 (gp130) und formt so einen hochaffinen funktionalen Signalkomplex, dessen Aktivierung die Differenzierung und Proliferation der Zellen reguliert (Huyton et al. 2007). Der LIF-R ist ein Transmembranprotein, welches aus 5 extrazellulären (D1-D5) und 3 Membran-nahen Domänen (D6-D8) besteht (Huyton et al. 2007) (siehe Abb. 4.6).

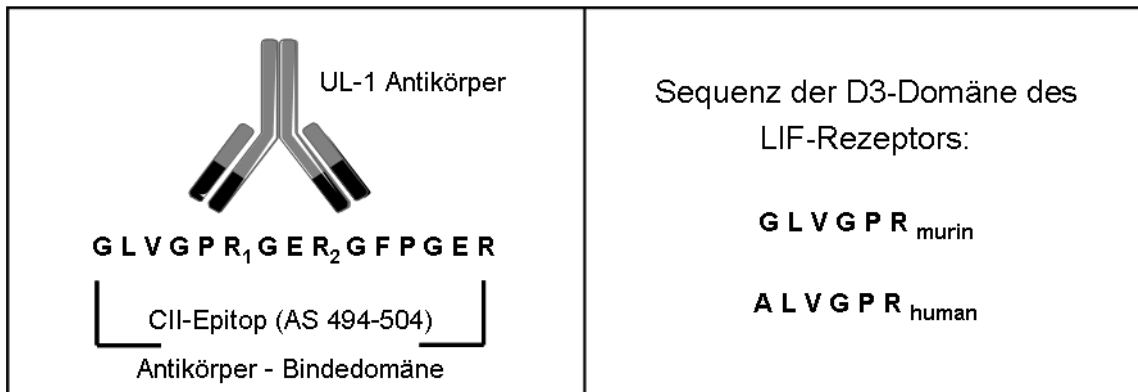


Abb. 4.3: Schematische Darstellung des U1-Epitops auf Kollagen Typ II (CII). Die vom monoklonalen Antikörper UL-1 erkannte Aminosäuresequenz (AS 494-504) definiert das U1-Epitop auf dem CII-Protein. Dargestellt ist die Antikörperbindedomäne des UL-1 Antikörpers (Panel links). Die Sequenz der ligandenbindenden Domäne (D3, Ig-ähnliche Domäne) des LIF-Rezeptors (LIF-R) ist über verschiedene Spezies hinweg sehr konserviert und unterscheidet sich nur in einem Aminosäureaustausch (Panel rechts). Die Sequenzhomologie zwischen dem U1-Epitop und der D3-Domäne des LIF-R führt zur Hypothese einer möglichen Kreuzreaktivität des vom UL-1 Antikörper erkannten CII-Epitops mit dem LIF-R.

4.1.3 Expression des LIF-Rezeptors auf Chondrozyten

Die identifizierte Sequenzhomologie zwischen der vom UL-1 Antikörper erkannten Aminosäuresequenz auf CII und der auf der D3-Domäne des LIF-R führte zur Hypothese einer LIF-R vermittelten Signalweiterleitung des UL-1 Antikörpers. Vor der funktionellen Analyse einer möglichen Kreuzreaktivität wurde zunächst die Expression des transmembranen LIF-R auf Chondrozyten untersucht. Zu diesem Zweck wurden Zelllysate von der T/C28a4 Zelllinie als auch primärer Chondrozyten, die aus Knorpelgewebe von Patienten mit Osteoarthrose (OA) nach Gelenkersatzoperationen gewonnen wurden, mittels Western Blot untersucht und mit der bekannten LIF-R Expression in HEK 293T Zellen verglichen. Sowohl in den Zelllysaten von HEK 293T Zellen als auch von T/C28a4 Chondrozyten wurde eine Doppelbande bei ca. 190 kDa detektiert (Abb. 4.4 A). Um die Expression des LIF-R in Abhängigkeit von verschiedenen, älter werdenden Zellkultur-Passagen zu untersuchen, wurden Zelllysate von Passage 2, 5, 9, 15 untersucht. Der transmembrane LIF-R wird in allen untersuchten Zell-Passagen 2 bis 15 in beiden Zelllinien exprimiert (Abb. 4.4 A). Ebenso konnte in Zelllysaten von OA-Chondrozyten, die aus dem Knorpel von 6 verschiedenen OA-Patienten isoliert wurden, eine Bande bei ca. 190 kDa detektiert werden (Abb. 4.4 B).

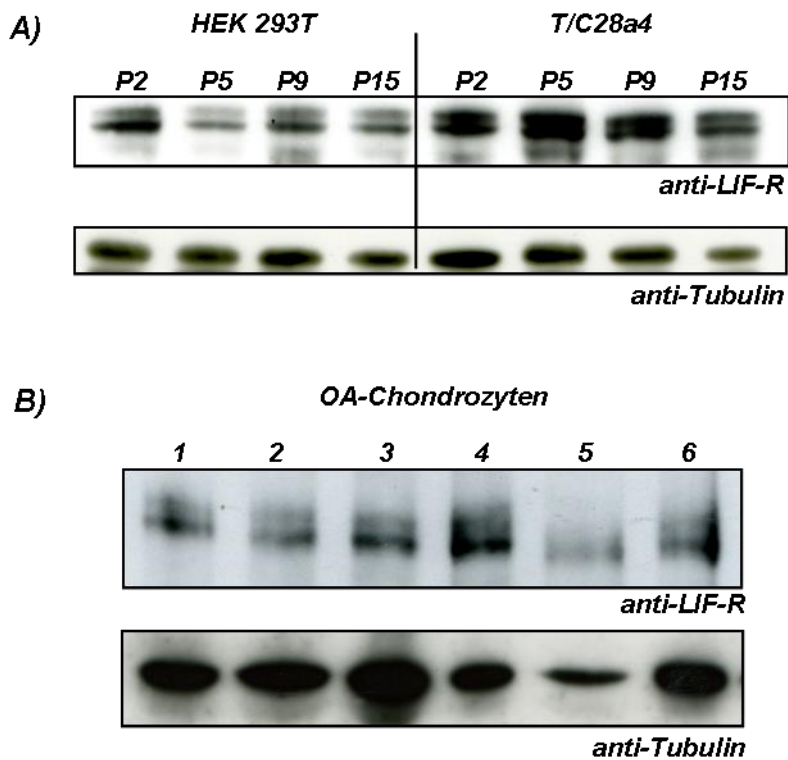


Abb. 4.4: LIF-R Expression auf Chondrozyten und HEK 293T Zellen. (A) Eine starke LIF-R Expression konnte in Zelllysaten (50 µg) von HEK 293T Zellen, T/C28a4 Chondrozyten verschiedener Passagen (P2, P5, P9, P15) und (B) von primären Chondrozyten isoliert aus Knorpelgewebe von sechs verschiedenen OA-Patienten mittels anti-LIF-R Antikörper im Western Blot detektiert werden. Die Beladungskontrolle erfolgte mittels anti-Tubulin Antikörper (jeweils unten).

Darüber hinaus wurde die LIF-R Expression mittels Immunfluoreszenzfärbungen in Chondrozyten untersucht. Hierfür wurden T/C28a4 und OA-Chondrozyten in *ChamberSlides* ausgesät, mit einem anti-LIF-R Antikörper inkubiert und mittels eines Alexa-488 gekoppelten Sekundärantikörpers visualisiert. Im Vergleich zu der nur mit dem Sekundärantikörper angefärbten Negativkontrolle (NK) konnte eine deutliche Anfärbung des LIF-R auf der gesamten Zelloberfläche detektiert werden (Abb. 4.5). Während die Expression des LIF-R auf allen T/C28a4 Chondrozyten nachweisbar war, wurde bei den OA-Chondrozyten hingegen nicht jede Zelle vom Antikörper angefärbt (Abb. 4.5).

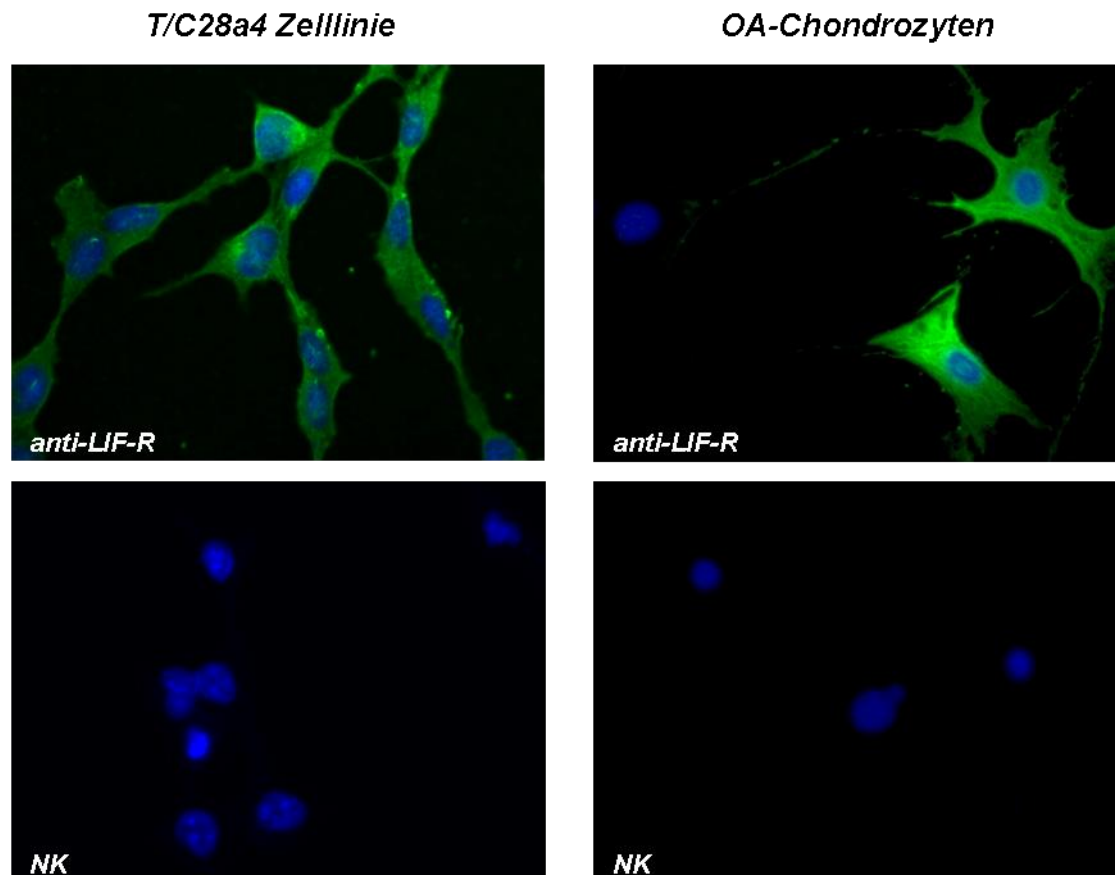


Abb. 4.5: Immunfluoreszenzfärbung von T/C28a4 und OA-Chondrozyten. T/C28a4- und OA-Chondrozyten wurden mit einem anti-LIF-R Antikörper inkubiert und mittels eines Alexa-488 gekoppelten anti-Ziege Antikörpers visualisiert. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Als Negativkontrolle (NK) wurden die Zellen lediglich mit dem Alexa-konjugierten Sekundärantikörper angefärbt. Die Mikroskopaufnahmen wurden in 40x Vergrößerung angefertigt.

4.1.4 Kreuzreaktivität des UL-1 Antikörpers mit der ligandenbindenden Domäne des LIF-R

Die *in silico* identifizierte Sequenzhomologie zwischen der vom UL-1 Antikörper erkannten Aminosäuresequenz auf CII und dem LIF-R als auch der experimentell erbrachte Expressionsnachweis des LIF-R auf Chondrozyten führte im Weiteren experimentellen Ablauf zur Analyse einer möglichen kreuzreaktiven Bindung des UL-1 Antikörpers mit dem LIF-R. Die kritischen Aminosäuren, die von dem monoklonalen UL-1 Antikörper auf CII erkannt werden, kommen auch in der ligandenbindenden Domäne (D3) des murinen LIF-R vor und unterscheiden sich nur in dem Austausch eines Glycinrestes (murin) durch ein Alaninrest (human) (s. Abb. 4.3). Da von beiden Aminosäuren keine signifikanten Einflüsse auf eine Änderung der Tertiärstruktur oder

Wechselwirkungen mit den Seitenketten anderer Aminosäuren zu erwarten sind, sollte eine potentielle kreuzreaktive Bindung des UL-1 Antikörpers mit dem LIF-R von den speziesspezifischen Sequenzunterschieden unbeeinflusst bleiben.

Für die weitere Untersuchung einer möglichen Kreuzreaktivität des arthritogenen UL-1 Antikörpers mit dem LIF-R wurde die extrazellulären Domänen D1-D5 des LIF-R in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert und mit einem Flag-Tag versehen (s. Kapitel 2.4.9, Abb. 2.4). Nach Transfektion in HEK 293T Zellen wurde die Expression von D1-D5 des LIF-R mittels anti-LIF-R Antikörper im Western Blot kontrolliert. Es wurde ein Fragment mit einem Molekulargewicht von ca. 64 kDa detektiert, welches der theoretisch errechneten Größe des LIF-R Fragmentes (D1-D5-Flag) entspricht (Abb. 4.6 A). In den Lysaten der Zellen, die mit der Leervektor Kontrolle transfiziert waren, konnte dieses Fragment hingegen nicht detektiert werden (Abb. 4.6 A). Darüber hinaus wurde die kreuzreaktive Bindung der arthritogenen CII-Antikörper durch Immunpräzipitation der, mit den D1-D5 Domänen des LIF-R, transfizierten HEK Zellen mittels anti-Flag Antikörper analysiert. Sowohl der LIF-R Antikörper als auch der UL-1 Antikörper detektierte dieses Fragment im erwarteten Molekulargewichtsbereich von 64 KDa, der CIIC1 Antikörper hingegen zeigte kein positives Signal.

In Zelllysaten, die mit dem Leervektor transfiziert wurden, konnte nach Immunpräzipitation mit dem anti-Flag Antikörper weder mit dem UL-1 Antikörper noch mit dem LIF-R Antikörper ein positives Signal nachgewiesen werden (Abb. 4.6 A).

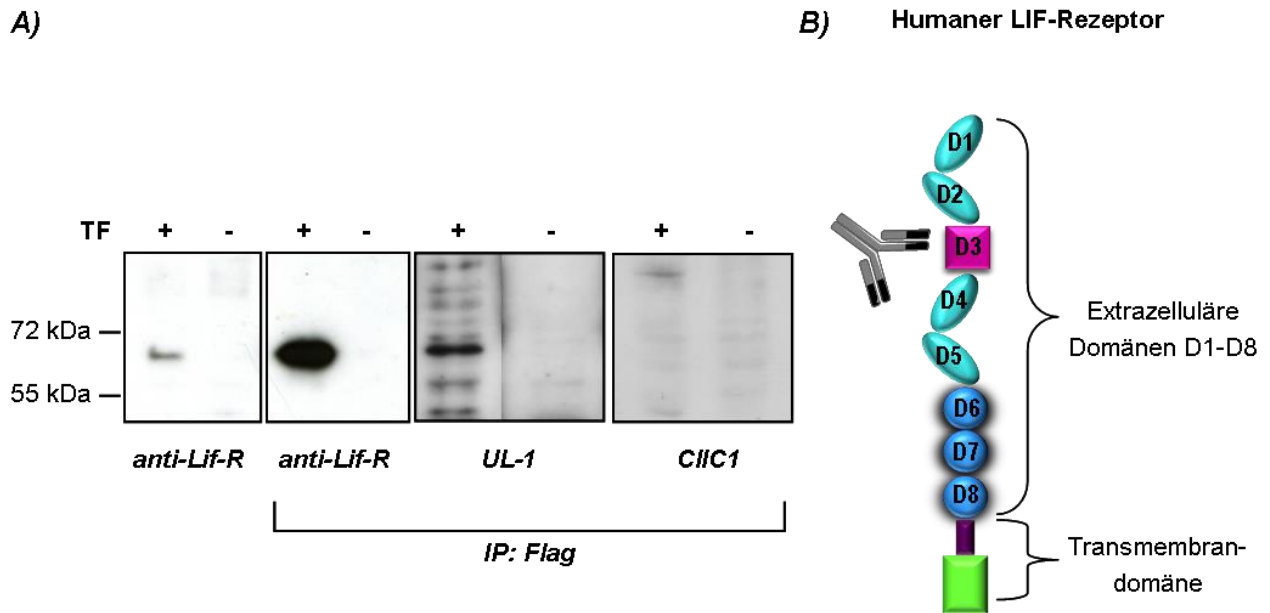


Abb. 4.6: UL-1 Antikörper bindet ein lösliches LIF-R Fragment nach Immunpräzipitation. (A) HEK 293T Zellen wurden transient mit dem löslichen LIF-Rezeptor Fragment (sLIF-R D1-D5-Flag) (+) transfiziert und die Expression des D1-D5 Domänen des LIF-R mittels eines anti-LIF-R Antikörpers im Western Blot nachgewiesen (A, Panel links). Ebenfalls konnte durch Immunpräzipitationen (IP) der transfizierten Zelllysate (500 µg) mittels anti-Flag Antikörper und nachfolgender Detektion sowohl mit dem anti-LIF-R als auch mit anti-UL-1 Antikörper eine Expression der D1-D5 Domänen des LIF-R bei ca. 64 kDa nachgewiesen werden, wohingegen der CIIC1 Antikörper diese nicht detektierte. Als Negativkontrolle (-) diente die transiente Transfektion des Leervektors. (B) Schematische Darstellung der Domänenstruktur des humanen LIF-R.

Um die Bindung des UL-1 Antikörpers an den LIF-R noch mit einer weiteren Methode zu bestätigen, wurde ein Sandwich ELISA mit einem synthetisch hergestellten LIF-R Peptid durchgeführt. Die Proteinsequenz des synthetischen Peptids entspricht der Aminosäuresequenz der Domäne 3 des murinen LIF-R, welche die Sequenzhomologie zum U1-Epitop auf CII beinhaltet (AS 351-365, GRITGLVGPRNTEYT). Das Peptid wurde N-terminal biotinyliert, so dass eine Detektion mittels Peroxidase gekoppeltem Streptavidin möglich war. Protein-G gekoppelte ELISA Platten wurden erst mit den arthritogenen CII-Antikörpern UL-1 und CIIC1 und anschließend mit dem synthetischen LIF-R Peptid inkubiert.

Nach Bindung des LIF-R Peptids an 1 µg/ml beschichteten UL-1 Antikörper wurde eine deutliche Farbentwicklung mit einer OD von 0,43 gemessen, die sich bei der Beschichtung von 5 µg/ml UL-1 Antikörper um den Faktor 1,7 verstärkt (Abb. 4.7). Wohingegen nach Bindung des LIF-R Peptids an 1 µg/ml CIIC1 Antikörper lediglich eine OD von 0,17 gemessen werden konnte, die sich bei einer Antikörper-

beschichtung von 5 $\mu\text{g/ml}$ nur unwesentlich auf eine OD von 0,2 erhöht. Mittels des ELISA Experimentes konnte im Vergleich zu dem CIIC1 Antikörper ein um den Faktor 2,5 - 3,75 signifikant stärkeres Signal mit dem UL-1 Antikörper detektiert werden. Zusammenfassend lassen diese Experimente den Schluss zu, dass der UL-1 Antikörper an die extrazelluläre D3-Domäne des LIF-Rezeptors binden kann.

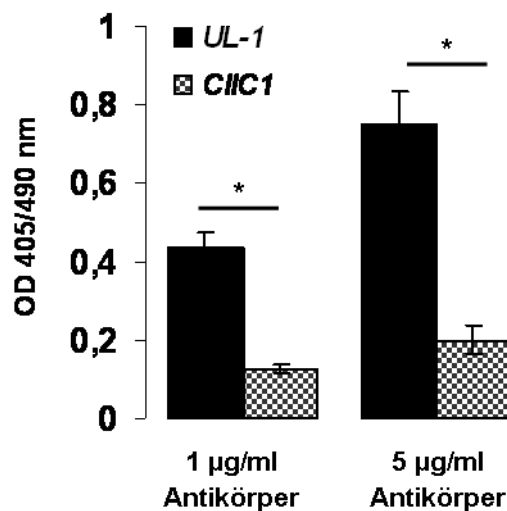


Abb. 4.7: Bindung des UL-1 Antikörpers an das synthetische Peptid des LIF-R im Sandwich ELISA. Der UL-1 oder der CIIC1 Antikörper (je 1 und 5 $\mu\text{g/ml}$) wurde an eine Protein-G gekoppelte ELISA Platte immobilisiert, anschließend mit einem synthetischen biotinylierten LIF-R Peptid (10 ng/ml) inkubiert und das Signal mit einem Streptavidin-HRP entwickelt. Die Signifikanz wurde aus Quadruplikaten mittels Student's T-Test errechnet. * $p < 0,001$.

4.1.5 Analyse von phosphorylierten STAT3 nach UL-1 Stimulation

In vivo bindet das Zytokin LIF an den membranverankerten LIF-R und löst, unter Rekrutierung von gp130, den JAK/STAT Signaltransduktionsweg, der bei der Regulation der Zellentwicklung, Wachstumskontrolle und Homöostase eine wichtige Rolle spielt, aus. Eine kritische Funktion in diesem Signalweg erfüllen die sogenannten STAT-Faktoren (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), die nach zytoplasmatischer Aktivierung und Translokation in den Zellkern als Transkriptionsfaktoren fungieren. Die Western Blot Ergebnisse einer verstärkten Tyrosinphosphorylierung im Molekulargewichtsbereich von 85-120 kDa (siehe Abb. 4.1), die Korrelaten eines STAT-Signals entsprechen könnten, sowie die

kreuzreaktive Bindung des UL-1 Antikörpers an die ligandenbindende Domäne (Ig-ähnliche Domäne) des LIF-R und führte zur Analyse des STAT Signalwegs mit der Frage einer UL-1-induzierten Aktivierung des im LIF-R Signalweg kritischen STAT3. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Phosphorylierung von STAT3 in Chondrozyten nach LIF Stimulation untersucht. Hierfür wurden Chondrozyten mit verschiedenen LIF-Konzentrationen für 20 min stimuliert und die Zelllysate anschließend im Western Blot mit einem anti-phospho-STAT3 Antikörper analysiert. Schon mit einer LIF-Konzentration von 0,25 ng/ml kann phosphoryliertes STAT3 in den Zelllysaten der T/C28a4 Chondrozyten nachgewiesen werden. Während in unbehandelten Zellen keinerlei Signal detektiert werden konnte, hat die Erhöhung der LIF-Konzentration auch einen Anstieg des phosphorylierten Proteins zur Folge (Abb. 4.8 A). In den Zelllysaten der OA-Chondrozyten konnte ebenfalls ein deutlicher Anstieg der STAT3-Phosphorylierung durch LIF (10 und 20 ng/ml) beobachtet werden, wobei schon im unbehandelten Ausgangszustand eine leichte Grundaktivität detektierbar war (Abb. 4.8 B).

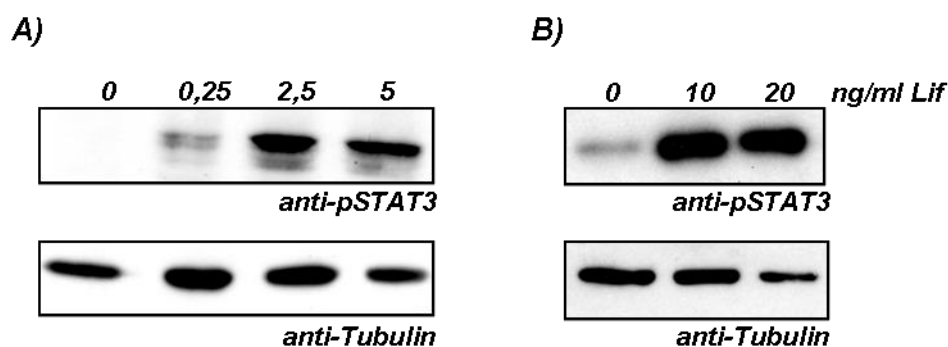


Abb. 4.8: Verstärkte Phosphorylierung von STAT3 nach LIF-Stimulation in Chondrozyten. Zelllysate (50 µg) von T/C28a4 (A) und primären OA Chondrozyten (B) wurden nach Stimulation mit LIF (0-20 ng/ml) für 20 min im Western Blot mittels anti-phospho STAT3 Antikörper detektiert. Die Beladungskontrolle erfolgte mittels anti-Tubulin Antikörper (jeweils unten).

In den anschließenden Experimenten wurde nun die Fähigkeit des arthritogenen UL-1 Antikörpers, Phosphorylierungssignale von STAT3 auszulösen, untersucht. Hierfür wurden Chondrozyten mit dem UL-1 und dem CIIC1 Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/ml für 10 bis 120 min inkubiert, ausgehend von der Inkubationsdauer, die LIF für die Aktivierung des STAT3 Signalweges in Chondrozyten benötigt (siehe Abb. 4.8). Nach Gabe der beiden arthritogenen CII-

Antikörper ist eine leichte Verstärkung des phospho-STAT3 Signals im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu beobachten, welches über den gesamten untersuchten Zeitraum von 0-120 min bestehen bleibt. Allerdings konnte kein Unterschied in der Stärke der STAT3 Phosphorylierung zwischen dem katabol wirkenden UL-1 und dem CII-spezifischen Kontrollantikörper CIIC1 gezeigt werden (Abb. 4.9 A). Diese Ergebnisse sprechen gegen eine spezifische Wirkung des UL-1 Antikörpers auf die STAT3 Aktivierung. Zum sicheren Ausschluss einer derartigen UL-1- Wirkung wurden jedoch noch weitere Studien unter Modifikation experimenteller Bedingungen mit potenziellem Einfluß wie Antikörperkonzentrationen, längere Inkubationszeiten oder eine Ko-Stimulation durchgeführt.

So berücksichtigten die weiteren Analysen sowohl längere Inkubationszeiten, bis zu 48 h, in Kombination mit Antikörperkonzentrationen von 0,01 bis 10 µg/ml als auch agonistische und antagonistische Effekte durch Ko-Inkubation des UL-1 Antikörpers mit LIF. In Abbildung 4.9 B ist ein exemplarisches Experiment dargestellt, indem Chondrozyten jeweils mit den arthritogenen CII-Antikörpern für 16 h vorinkubiert und anschließend mit LIF für 20 min stimuliert wurden. Die zusätzliche Vorinkubation der arthritogenen Antikörper erbrachte weder ein erhöhtes noch ein vermindertes Phosphorylierungssignal, ersteres wäre ein Hinweis auf eine Sensitivierung letzteres ein Indiz für eine mögliche Blockierung des Rezeptors, durch die Antikörperbindung. Zudem ist auch kein Unterschied in der Aktivierung von STAT3 zwischen dem UL-1 und dem CIIC1 Antikörper zu erkennen.

Zur Kontrolle des alleinigen Effekts von LIF wurden die Chondrozyten lediglich mit dem Zytokin für 20 min stimuliert, wonach ein deutlich verstärktes Phosphorylierungssignal von STAT3 im Vergleich zum unbehandelten Nullwert zu detektieren war. Diese Ergebnisse liefern weitere Belege dafür, dass dem UL-1 Antikörper keine synergistische Wirkung auf die STAT3 Aktivierung zukommt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass weder die Verlängerung der Inkubationsdauer noch die Erhöhung der Antikörperkonzentration einen Anstieg von phosphorylierten STAT3 nach UL-1 Gabe im Vergleich zum CIIC1 Antikörper zur Folge hatte.

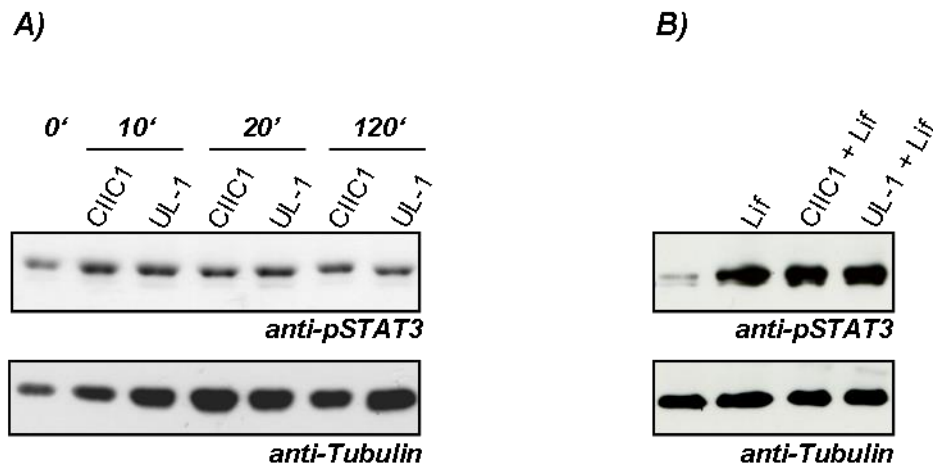


Abb. 4.9: Analyse der STAT3 Phosphorylierung nach UL-1 Inkubation. (A) Nach Stimulation mit dem UL-1 und CIIC1 Antikörper (je 1 µg/ml) für 10-120 min wurden Zelllysate (50 µg) von T/C28a4 Chondrozyten im Western Blot mittels eines anti-pSTAT3 Antikörper analysiert (oben). (B) Nach Vorinkubation mit den anti-CII Antikörpern UL-1 bzw. CIIC1 (je 1 µg/ml) für 16 h, wurden T/C28a4 Chondrozyten mit LIF (4 ng/ml) für 20 min stimuliert und die Zelllysate (50 µg) im Western Blot mittels eines anti-pSTAT3 Antikörper analysiert (oben). Die Beladungskontrolle erfolgte mittels anti-Tubulin Antikörper (jeweils unten).

Da *in vivo* lösliche Rezeptoren als “physiologische Regulatoren“ von Zytokinwirkungen wirksam werden können, wurden zusätzliche Studien zur potenziellen Interferenz des UL-1 Antikörpers mit dieser antagonistischen Wirkung des löslichen LIF-Rezeptors auf die zytokininduzierte STAT3-Aktivierung durchgeführt. Modellhaft wurde ein rekombinanter löslicher LIF-Rezeptor (rec. LIF-R) verwendet und seine Hemmwirkung auf die LIF-induzierte STAT3 Aktivierung in Abhängigkeit von der Präsenz des UL-1 Antikörpers studiert.

Zu diesem Zweck wurden T/C28a4 Chondrozyten jeweils mit den beiden arthritogenen CII-Antikörpern für 16 h vorinkubiert und anschließend mit dem Zytokin LIF und dem rekombinanten löslichen LIF-R für 20 min stimuliert. Auch unter diesen experimentellen Bedingungen waren keine Unterschiede zwischen der Wirkung des UL-1 und des CIIC1 Antikörpers auf die Phosphorylierung von STAT3 nachweisbar (Abb. 4.10). Zur Kontrolle des inhibierenden Effekts des rekombinanten löslichen LIF-R wurden die Chondrozyten sowohl lediglich mit dem Zytokin LIF als auch in Kombination mit dem löslichen Rezeptor für 20 min stimuliert. Dabei ist nach Ko-Inkubation mit dem rekombinanten löslichen LIF-R konzentrationsabhängig ein deutlich vermindertes pSTAT3 Signal zu detektieren. Fasst man diese Signaltransduktionsversuche hinsichtlich der UL-1 Antikörperwirkung zusammen,

kann keine spezifische direkte STAT3 Aktivierung in Folge einer Bindung an den membranständigen Rezeptor oder eine indirekte Modulation der Zytokinwirkung über Interaktionen mit dem löslichen LIF-Rezeptor beobachtet werden. Darüber hinaus lässt sich im Vergleich zum arthritogenen CII C1 Antikörper kein Unterschied in der Bandenstärke des phospho-STAT3 Signals detektieren, welcher einen Hinweis auf einen epitopspezifischen Mechanismus hätte liefern können.

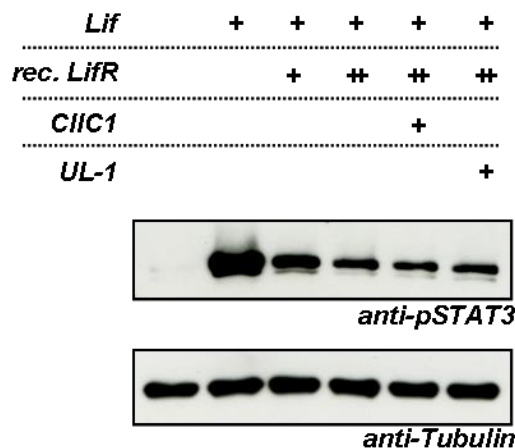


Abb. 4.10: Analyse der STAT3 Phosphorylierung nach UL-1 Inkubation. Nach Vorinkubation mit den anti-CII Antikörpern UL-1 und CIIC1 (je 1 µg/ml) für 16 h wurden die T/C28a4 Chondrozyten anschließend mit LIF (+; 4 ng/ml) zusammen mit rekombinanten löslichen LIF-R (1 µg/ml (+), 10 µg/ml (++) für 20 min stimuliert, wie schematisch dargestellt. Zelllysate (50 µg) wurden im Western Blot mittels anti-pSTAT3 Antikörper detektiert. Die Beladungskontrolle erfolgte mittels anti-Tubulin Antikörper (jeweils unten).

Im Folgenden wurde mittels eines sensitiveren methodischen Ansatzes die UL-1 vermittelte Signalweiterleitung mit einem STAT3 Reporter Assay untersucht. Nach transienter Transfektion eines STAT-3 spezifischen Reportergenkonstruktes und Inkubation mit dem entsprechenden Stimulus, kommt es zur Bindung des Transkriptionsfaktors an den Promotor und zur Expression der auf dem Reporterplasmid kodierten Luziferase, deren Aktivität als Lumineszenzintensität gemessen werden kann.

Dafür wurden HEP G2 Zellen mit einem STAT3 Reporterplasmid transfiziert und mit den beiden arthritogenen CII-Antikörpern (1,5 und 5 µg/ml) für 16 h stimuliert. Transfizierte Zellen, die mit LIF (50 ng/ml für 16 h) inkubiert wurden, zeigten eine starke Aktivierung von STAT3 im Vergleich zu den mit dem Leervektor transfizierten

Zellen (Abb. 4.11). Der Effekt beider CII-Antikörper auf die mit dem STAT3 Reporterplasmid transfizierten Zellen ist um den Faktor > 10 geringer als nach Stimulation mit LIF. Zudem konnte auch kein signifikanter Unterschied in der STAT3 Aktivierung der beiden Antikörper UL-1 und CIIC1 detektiert werden und bestätigt damit die Vorergebnisse aus den Western Blot Experimenten.

Zusätzlich wurden auch in diesem Experiment die Parameter Antikörperkonzentration und Inkubationsdauer variiert, was jedoch zu keinem messbaren Unterschied des Signals zwischen den Zellen, die mit dem katabolisch wirkenden UL-1 Antikörper inkubiert wurden und denen die mit dem nicht-katabolen CIIC1 Antikörper inkubiert wurden, führte.

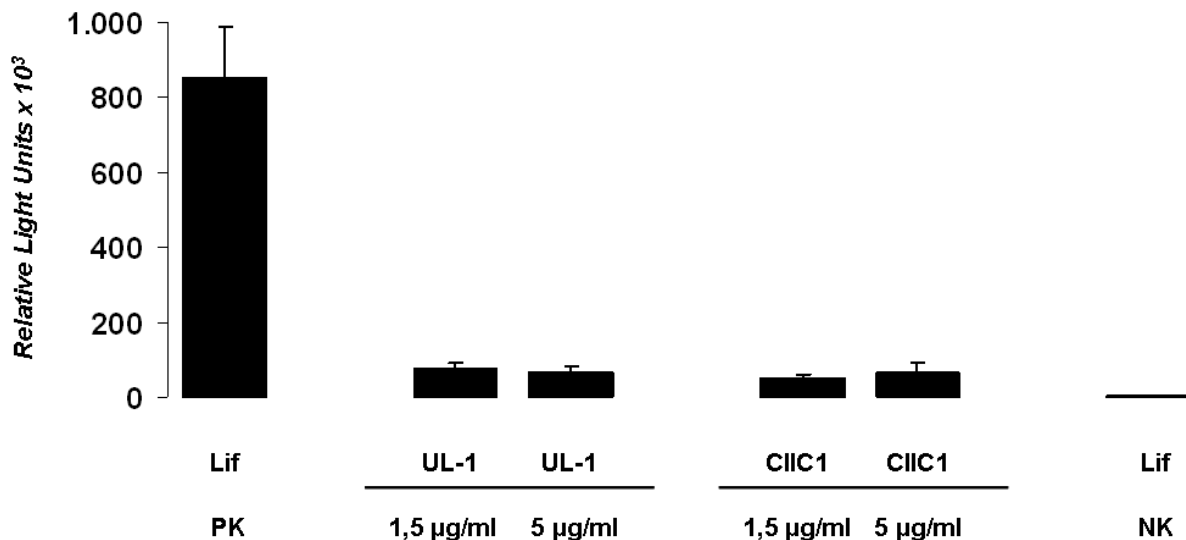


Abb. 4.11: Analyse der STAT3 Aktivität nach Inkubation mit dem UL-1 Antikörper mittels STAT3 Reporter Assay. Messung der transkriptionellen Aktivität durch Transfektion von HEP G2 Zellen mit einem STAT3 Reporter Plasmid oder einer Leervektor-Kontrolle (NK). Inkubation verschiedener Stimuli (1,5 oder 5 µg/ml CII-Antikörper) erfolgte für 16 h. LIF-Inkubation (50 ng/ml) diente als Positivkontrolle (PK). Nach Zugabe des Substrats kann die Lumineszenz der Luziferase Aktivität gemessen werden. Die Messwerte der induzierten *Firefly*-Luziferase-Aktivität wurden auf die konstitutive Renilla-Aktivität normalisiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis.

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte des arthritogenen Kollagen Typ II Antikörpers UL-1 untersucht. Dieser monoklonale Antikörper bindet spezifisch das U1-Epitop auf Kollagen Typ II (CII 494-504) und wurde als eines der Haupt-B-Zellepitope sowohl in der humoralen Immunantwort der rheumatoiden Arthritis (Kraetsch et al. 2001; Burkhardt et al. 2002) als auch in CIA-Experimenten mit Mäusen und Ratten identifiziert (Wernhoff et al. 2001). Die inflammationsunabhängige katabole Wirkung auf die Knorpelmatrix durch eine direkte Beeinflussung des Chondrozytenmetabolismus ist bei anderen anti-CII Antikörpern nicht zu beobachten, sodass ein neuartiger epitopspezifischer Mechanismus postuliert werden kann (Nandakumar et al. 2008; Amirahmadi et al. 2005; Crombie et al. 2005).

Initial wurde der Einfluß von dem katabol wirkenden UL-1 Antikörper im Vergleich zum ClIC1 Antikörper, der spezifisch ein anderes CII-Epitop bindet, auf die Chondrozyten Zelllinie T/C28a4 untersucht. Die Analyse der Tyrosinphosphorylierungen mit einem anti-pan-Phospho-Tyrosin Antikörper zeigt eine deutliche Signalverstärkung in den Zellen die zuvor mit dem UL-1 Antikörper inkubiert wurden. Dabei handelt es sich zum einen um eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung im Molekulargewichtsbereich zwischen 50-60 kDa und zum anderen in dem Bereich zwischen 85-120 kDa. In weiteren Stimulationsexperimenten konnte bei Zellen, die mit dem UL-1 Antikörper inkubiert wurden, eine verstärkte Phosphorylierung der c-Src Proteinkinase identifiziert werden, die ein Molekulargewicht von ca. 60 kDa besitzt (Roskoski 2004).

Die c-Src Proteinkinase gehört zur Familie der nicht membrangebundenen Tyrosinkinasen, welche aus 9 Mitgliedern besteht und eine bedeutende Rolle für verschiedene Zellfunktionen, wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Migration spielt (Boggon & Eck 2004; Tatosyan & Mizenina 2000). Den Einfluß der c-Src Proteinkinase auf Chondrozyten wird u.a. durch *in vitro* Experimente mit murinen Chondrozyten demonstriert, die nach Inkubation des Src-Inhibitors PP2 eine reduzierte Zellproliferation und eine gesteigerte chondrogene Genexpression nachweisen (Bursell et al. 2007). Nach Inkubation mit dem UL-1 Antikörper konnte eine deutlich verstärkte Src-Phosphorylierung im Vergleich zu Zelllysaten von Chondrozyten, die mit dem ClIC1 Antikörper stimuliert wurden, nachgewiesen werden. Die Aktivierung der Src-Kinase durch die Autophosphorylierungsstelle Y416

lässt auf eine Signalweiterleitung, vermittelt durch die Bindung des arthritogenen UL-1 Antikörpers an die Zelloberfläche, schließen.

Basierend auf Sequenzhomologie-Analysen des vom UL-1 Antikörper erkannten Aminosäureepitops auf CII konnte eine fast 100% Sequenzhomologie zum LIF-Rezeptor (LIF-R) identifiziert werden.

LIF (*Leukemia-Inhibitory factor*), genauso wie IL-6, IL-11, OSM (Oncostatin M), CNTF (*ciliary neurotropic factor*) und Epo (Erythropoetin) gehört zu der Klasse der IL-6 Zytokine. Diese Polypeptide mit einem Molekulargewicht von ca. 20 kDa sind klassische sekretorische Proteine mit einem N-terminalen Signalpeptid. Die Rezeptoren der IL-6 Zytokine sind Typ I Membranproteine mit einem extrazellulären N-Terminus und einer Transmembrandomäne, welche zur Bildung eines funktionalen Rezeptorkomplex zytokininduziert die Rekrutierung von gp130 (Glykoprotein) benötigen (Heinrich et al. 1998). Im Fall von LIF entsteht so ein trimere Signalkomplex aus LIF, LIF-R und gp130 (Huyton et al. 2007), der die Dimerisierung der zwei Rezeptorketten und dadurch die Aktivierung von JAK1 (Januskinase) zur Folge hat. Die darauffolgende Phosphorylierung von Tyrosinen am Rezeptor stellen Bindungsstellen für *Src-homology 2* (SH2) Domänen dar, die Bestandteil aller STATs (*Signal transducer and activator of transcription*) sind. Nach Bindung von STAT1 und STAT3 werden auch diese von JAK1 am Tyrosin 705 phosphoryliert und bilden nach Dissoziation mittels der bivalenten Phosphotyrosin Interaktion aktivierte Homo- oder Heterodimere (Heinrich et al. 1998). Das exponierte nukleäre Lokalisationssignal (NLS) führt zur Translokation in den Kern, wo die STATs als Transkriptionsfaktor die Genexpression beeinflussen (Imada & Leonard 2000).

Innerhalb dieser Arbeit konnte die Expression des LIF-R in Zelllysaten sowohl von T/C28a4 Chondrozyten als auch von primären Osteoarthrose-Chondrozyten im Western Blot und in Fluoreszenz-Analysen gezeigt werden. Dieser Proteinnachweis wird von der LIF vermittelten Signalweiterleitung unterstützt, die mit einem phospho-STAT3 Antikörper nachgewiesen wurde. Im Gegensatz dazu steht eine Studie bei der die LIF-R Expression bei T/C28a4 Chondrozyten mittels FACS-Analyse nicht nachweisbar war, obwohl die Expression von mRNA im Northern Blot detektiert werden konnte (Rowan et al. 2001). Allerdings konnte diese Gruppe auch keine

Signalweiterleitung durch Stimulation mit dem entsprechenden Zytokin LIF bei den T/C28a4 Chondrozyten induzieren.

Durch den in dieser Arbeit gezeigten Expressionsnachweis und den zuvor beschriebenen Sequenzhomologie-Analysen konnte eine kreuzreaktive Bindung des UL-1 Antikörpers mit der ligandenbindenden Domäne (Ig-ähnliche Domäne) des LIF-R auf der Zelloberfläche vermutet werden, die eine Signalweiterleitung in die Zelle zur Folge hätte. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Detektion einer verstärkten Tyrosinphosphorylierung im Molekulargewichtsbereich von 85-120 kDa in den Zelllysaten von Chondrozyten, die mit dem UL-1 inkubiert wurden, welche den der JAK- (120-140 kDa) und der STAT-Proteinfamilie (85-110 kDa) entsprechen (Heinrich et al. 1998).

Mittels Immunpräzipitationsexperimenten konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Kreuzreaktivität zwischen dem UL-1 Antikörper und dem transient transfizierten LIF-R Konstrukt, welches der Domäne D1 bis D5 entspricht, nachgewiesen werden. Auch konnte die Bindung des UL-1 Antikörpers an die ligandenbindende Domäne (D3) des LIF-R mittels ELISA gezeigt werden, indem ein synthetisch hergestelltes Peptid mit entsprechender Sequenz verwendet wurde. Diese beiden biochemischen Methoden zur Bindungsanalyse belegen eine mögliche Kreuzreaktivität des katabol wirkenden UL-1 Antikörpers, im Gegensatz zum CIIC1 Antikörpers, mit dem LIF-R.

LIF bindet sowohl an den LIF-R mit nanomolarer Affinität als auch an gp130 mit einer picomolaren Bindeaffinität (Huyton et al. 2007). Im Fall von gp130 konnte mittels Röntgenstrukturanalyse die Bindung von LIF über die CBM-Domäne (Abb. 4.12) identifiziert werden (Boulanger et al. 2003; Huyton et al. 2007). Betrifft es aber die Bindung von LIF an den LIF-R wird in der Literatur hinsichtlich der Beteiligung der extrazellulären Domänen kontrovers diskutiert. Zwei Studien belegen die Notwendigkeit der Domänen D1 bis D5 zur Ausbildung eines funktionellen LIF-R Komplex (Owczarek et al. 1997; Voisin et al. 2002), während eine andere Gruppe zeigt, dass lediglich das N-terminale CBM und die Ig-ähnliche Domäne (D1-D3) dafür verantwortlich sind (Aasland et al. 2002). Dass LIF nur an die Domänen D3 bis D5 für eine erfolgreiche Signalweiterleitung bindet konnte durch zwei Studien einer Arbeitsgruppe (He et al. 2002; He et al. 2005) belegt werden. Eine jüngere Studie zeigt die Kristallstruktur des Komplexes aus humanen LIF und murinen LIF-R und identifiziert die Ig-ähnliche Domäne (D3, ligandenbindende Domäne) als

entscheidendes Modul für die Bindung des Zytokins (Huyton et al. 2007). In dieser Interaktion zeigte sich ungewöhnlicher Weise, dass humanes LIF mit einer sehr viel höheren Affinität von 10-20 pM an den murinen LIF-R bindet als an das humane Homolog (600-2000 pM) (Owczarek et al. 1997). Dieses Phänomen ist auf die Ig-ähnliche Domäne zurück zu führen und interessanter Weise nicht reziprok für die Interaktion zwischen murinen LIF und humanen LIF-R zu beobachten (Huyton et al. 2007).

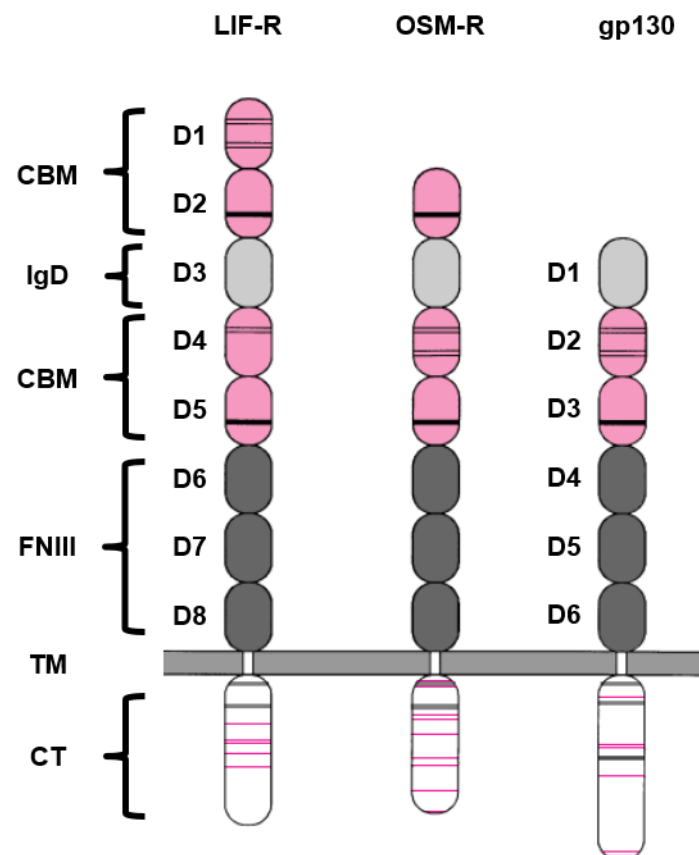


Abb. 4.12: Domänenstruktur von LIF-R, OSM-R und gp130. Dargestellt sind die extrazellulären Domänen des LIF (*Leukemia-Inhibitory-Factor*)-Rezeptor (D1-D8), OSM (Oncostatin M)-Rezeptor und Glykoprotein (gp) 130. Dünne Querstriche repräsentieren Cysteinbrücken, dicke Querstriche ein WSXWS-Motiv, CBM = Zytokin-bindendes Modul, IgD = Immunglobulin-ähnliche Domäne, FNIII = Fibronectin-Typ-III-ähnliche Domäne, TM = Transmembranregion, CT = zytoplasmatischer Teil. Abbildung wurde modifiziert nach (Heinrich et al. 1998)

In den eigenen Studien konnte gezeigt werden, dass der katabol wirkenden UL-1 Antikörper an die Ig-ähnliche Domäne (D3) des LIF-R binden kann, das hohe Sequenzhomologien mit dem entsprechenden Epitop auf dem CII aufweist. Ob diese

Bindung für eine Signalweiterleitung ausreicht oder ob der arthritogene Antikörper mittels Kreuzreaktivität an gp130 bindet um so einen funktionalen Komplex zu bilden, wurde im weiteren Projektverlauf untersucht. Die Analyse der phospho-STAT3 Expression in Zelllysaten von T/C28a4 Chondrozyten nach Gabe des UL-1 Antikörpers erbrachte außer einer basalen Grundaktivität kein Hinweis für eine über den LIF-R vermittelte Signalweiterleitung. Auch die Gabe des zu vergleichenden ClIC1 Antikörper, welcher ein anderes CII-Epitop bindet, erbrachte keinen Unterschied hinsichtlich der phospho-STAT3 Expression.

Ausgehend von der Hypothese, dass die UL-1 Bindung an den LIF-R die Ausbildung des multimeren Proteinkomplexes aus LIF, LIF-R und gp130 für die nachfolgende Signalgebung nach Zytokinbindung begünstigen könnte, wurden Koinkubations-Studien des UL-1 Antikörpers mit LIF zur Detektion potenzieller additiver bzw. synergistischer Effekt durchgeführt. Es konnten jedoch keine derartigen Wirkungen nachgewiesen werden, so dass aus diesen Studien die Schlussfolgerung gezogen werden kann, dass der UL-1 Antikörper trotz seiner kreuzreaktiven Bindung an den LIF-R weder zu einer funktionellen Blockade noch einer verstärkenden Wirkung des LIF-Signals führt.

Die Aktivierung des LIF-R benötigt zum einen die Bindung von LIF an die ligandenbindende Domäne (Owczarek et al. 1997) zum anderen aber auch die Rekrutierung des gp130, wofür die zusätzliche Bindung von LIF an die CBM (*Cytokine Binding Module*)-Domäne der Rezeptor-Untereinheit vorausgesetzt ist (Hammacher et al. 1998). Nur so kommen die beiden Rezeptor-Untereinheiten in die räumliche Nähe, die für die Aktivierung des Heterodimers benötigt wird. Studien haben gezeigt wie unverzichtbar der Kontakt zwischen der Domäne D5 des gp130 und der Domäne D7 des LIF-R für eine funktionale Heterodimerisierung ist, welcher aus der korrekten Ligandenbindung beider Rezeptoruntereinheiten resultiert (Abb. 4.13). Nur die richtige Rezeptororientierung führt zur einer adäquaten Signalweiterleitung (Kurth et al. 2000). Diese Tatsache könnte erklären warum der UL-1 Antikörper trotz Bindung an die ligandenbindende Domäne (D3) des LIF-R keine Signalweiterleitung induziert. Aufgrund der Antikörperstruktur könnte die Aktivierung des Heterodimers, bestehend aus LIF-R und gp130, und somit die Signalweiterleitung verhindert werden.

Zusammenfassend bietet daher die Kreuzreaktivität des UL-1 Antikörpers mit dem LIF-R kein Erklärungsmodell für die direkten katabolen Wirkungen des Antikörpers auf den Knorpelmatrixmetabolismus, das aufgrund bekannter Proteoglykan-depletierender Effekte des Zytokins LIF auf den Knorpelstoffwechsel (Van de Loo et al. 1997; Hui et al. 1998) eine attraktive Arbeitshypothese als Ausgangspunkt der dargestellten Studien bot. Da die UL-1 Antikörper vermittelte katabole Wirkung auf den Knorpelmetabolismus einen neuartigen Pathomechanismus von potenziell großer Bedeutung darstellt, ist vorgesehen die in dieser Arbeit gezeigte spezifische Src-Aktivierung als Ansatzpunkt für zukünftige Studien weiter zu verfolgen.

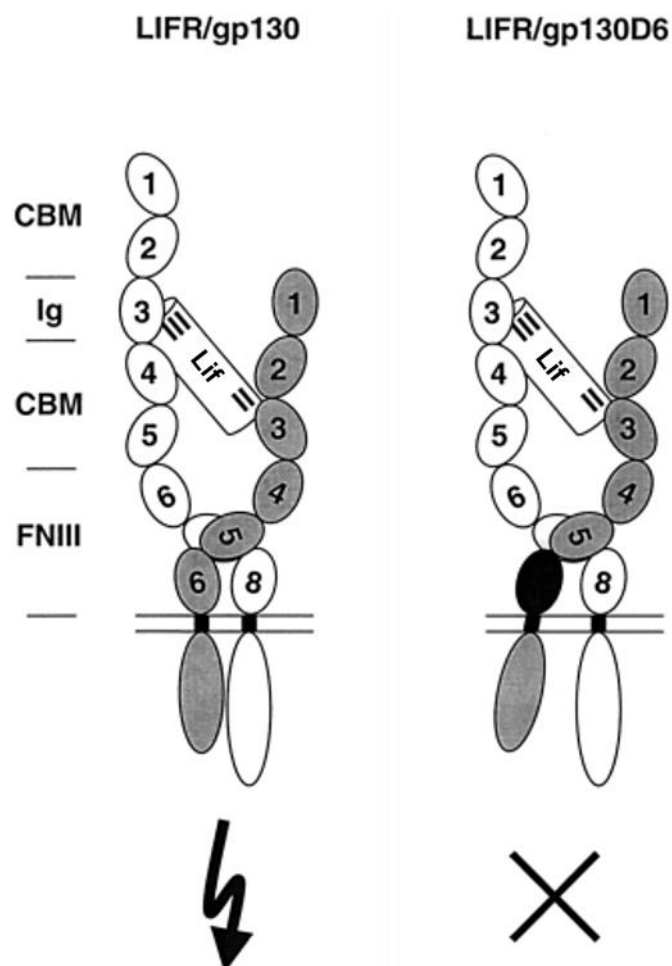


Abb. 4.13: Model der Dimerisierung zwischen dem Glykoprotein 130 (gp130) und dem LIF-R. Nach Bindung von LIF (weißer Zylinder), dimerisieren die Rezeptoruntereinheiten gp130 (grau) und der LIF-R (weiß). Erst durch die Interaktion der gp130 Domäne D5 und der LIF-R Domäne D7 kann die Signaltransduktion folgen (links). Experimente mit einem chimären Rezeptor, bei dem die gp130 Domäne D6 durch ein GCSFR-Motiv (schwarz) ausgetauscht wurde demonstrieren eine fehlende Signaltransduktion durch inkorrekte Dimerisierung (rechts) (Kurth et al. 2000).

4.2 Autoantikörper gegen citrullinierte CII-Epitope und Rolle der Peptidylarginin-Deiminase in der Pathogenese der RA

4.2.1 Citrullinierte CII-Epitope

Die rheumatoide Arthritis ist eine Autoimmunerkrankung, die durch die Präsenz von ACPAs (*Anti-citrullinated peptide/protein antibodies*) gekennzeichnet ist, welche man bereits in einer sehr frühen Phase der Krankheit detektieren kann. Sie gelten als Biomarker mit hoher Sensitivität und Spezifität (Schellekens et al. 1998; Avouac, Gossec, & Dougados, 2006; Pruijn, Wiik, & van Venrooij, 2010; Rantapää-Dahlqvist et al., 2003; van Venrooij, van Beers, & Pruijn, 2011). Neben ubiquitär exprimierten Proteinen wie Fibrinogen oder Vimentin, konnte auch das knorpelspezifische CII als Zielstruktur für ACPAs identifiziert werden (Burkhardt et al. 2005). Für die Citrullinierung verantwortlich ist die sogenannte Peptidylarginin-Deiminase (PAD), die posttranslational Arginin zu Citrullin modifiziert. In einer internationalen Kooperation mit der „*Division of Medical Inflammation Research*“ am Karolinska Institut in Stockholm (R. Holmdahl/ S. Haag) konnten potentielle citrullinierte Neoepitope auf dem CII nach PAD2-induzierter Modifikation mittels Tandem-Massenspektrometrie identifiziert werden (Haag et al., 2014). Die im Rahmen dieser Studien detektierten Modifikationen der Argininreste 927 und 933 auf CII lokalisieren in einem Sequenzabschnitt mit bereits vorbekannter funktioneller Bedeutung als Zielstruktur humoraler B-Zell Antworten (CII-Epitop F4: CII Aminosäure 926-936, E R G L K G H R G F T). Zur Analyse von Antikörperantworten in Patientenseren gegen das modifizierte Epitop wurden tripelhelikale Peptide synthetisiert, deren Sequenz entweder an Position 927 oder 933 einen Citrullinrest (Cit) aufweist.

	AS 927	AS 933
F4 Cit-R	E Cit G L K G H R G F T	
F4 R-Cit	E R G L K G H Cit G F T	

Mittels dieser Peptide konnten Seren innerhalb der schwedischen Fall-kontrollierten EIRA (*Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis*) Kohorte hinsichtlich ihrer Spezifität gegen das citrullinierte F4-Epitop analysiert werden. Diese Kohorte umfasst 1949 RA-Patienten, bei denen 17% positiv für das citrullinierte Arg 927 (F4 Cit-R) und 21% für das citrullinierte Arg 933 (F4 R-Cit) getestet wurden. Diese

Autoantikörper wurden aus den Seren der RA-Patienten mittels Affinitätschromatografie an synthetischen CII-Peptiden entsprechender Epitopspezifität aufgereinigt.

4.2.1 Bindung von Antikörpern an citrullinierte CII-Epitope im Knorpel

Bisher konnte citrulliniertes CII nur im Synovialgewebe (Yoshida et al. 2006) und in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten (Uysal et al. 2009) nachgewiesen werden. Inwieweit citrulliniertes CII auch im Knorpelgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis vorkommt, sollte durch immunhistologische Färbungen von Knorpelgewebe verschiedener RA-Spender untersucht werden. Hierfür wurden Autoantikörper mit entsprechender Epitopspezifität (F4 Cit-R und F4 R-Cit) aus den Seren sechs verschiedener RA-Patienten (#79, #144, #148, #183, #200, #218) affinitätsgereinigt und für die Färbung von Knorpelgewebe eingesetzt. Es konnte eine starke Färbung der territorialen wie auch interterritorialen extrazellulären Matrix mit den aufgereinigten ACPAs nachgewiesen werden, wobei auch eine deutliche perizelluläre Anfärbung mit 2 ACPAs (#144 und #183) detektiert wurde (Abb. 4.14). Alle untersuchten F4 Cit-R Antikörper, die das modifizierte F4-Epitop erkennen, und vier von fünf der F4 R-Cit Antikörper färbten das Knorpelgewebe in distinkten Arealen an (Abb. 4.14 A, B). Allerdings variierte die Intensität des Positivsignals aufgrund der hohen Variabilität der isolierten Antikörpermenge aus den Patientenseren.

Als Kontrolle für die Bindungsspezifität der aufgereinigten Autoantikörper zu citrullinierten CII-Epitopen, wurden zusätzlich Antikörper aus Patientenseren aufgereinigt, die gegen CEP-1 (citrullinierte α -Enolase) gerichtet sind. Die α -Enolase wird ebenfalls im rheumatoiden Gelenk exprimiert und die citrullinierte Form ist eine bekannte ACPA-Zielstruktur von Autoantikörpern in der RA (Lundberg et al. 2008). Keiner der eingesetzten CEP-1 Antikörper zeigte ein positives Färberesultat (Daten nicht gezeigt). Diese initialen immunhistologischen Studien zeigen erstmalig die Bindung von ACPAs an die extrazelluläre Matrix des Gelenkknorpels und sind Hinweise, dass eine CII-Citrullinierung *in situ* im Knorpel von RA-Patienten stattfindet.

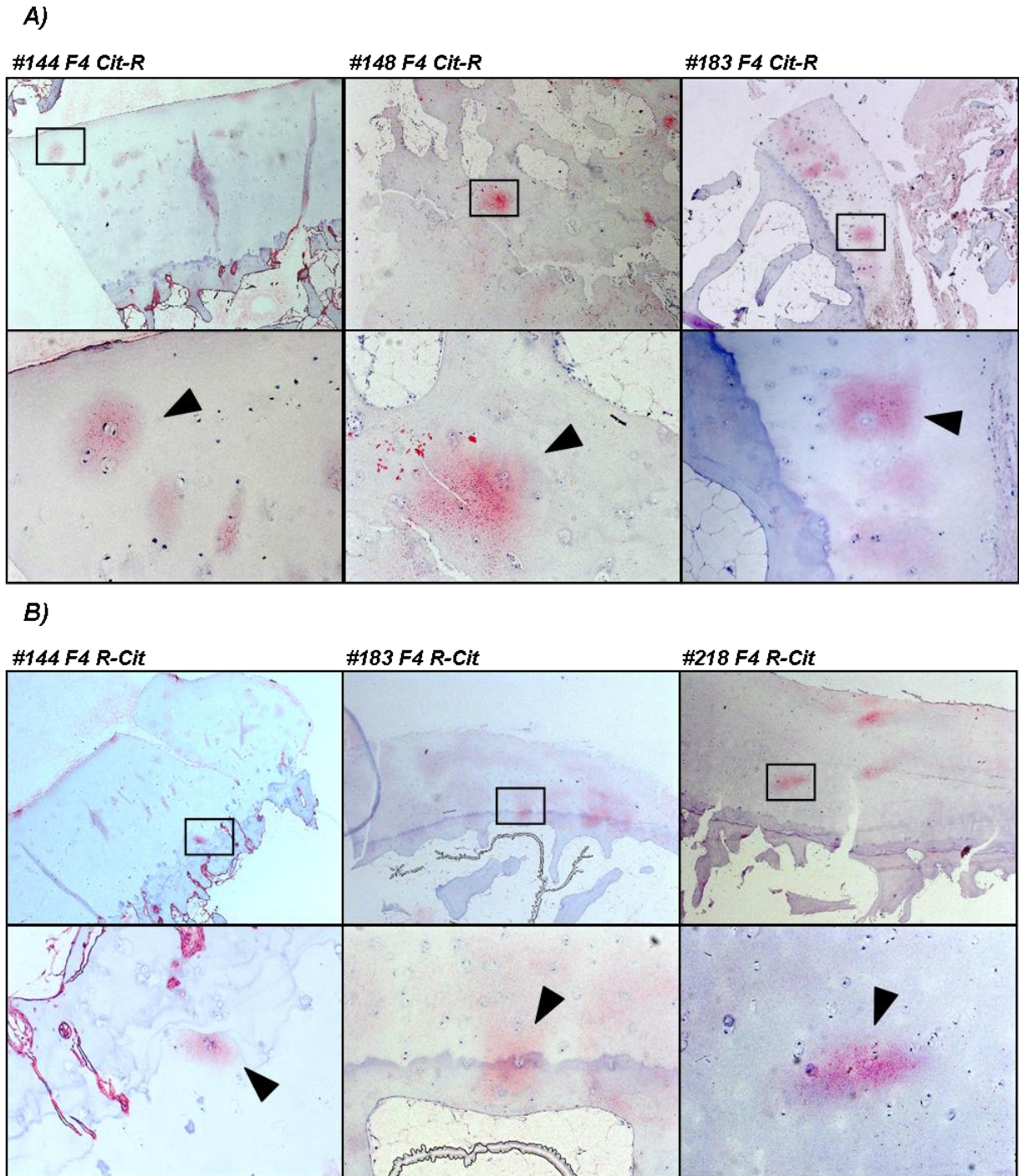


Abb. 4.14: Immunhistologie von RA-Knorpel mit affinitätsgereinigten Antikörpern. Antikörper, die spezifisch das F4 Cit-R **(A)** Epitop binden, wurden aus Serum von RA-Patienten #144, #148 und #183 aufgereinigt. Antikörper, die spezifisch das F4 R-Cit **(B)** Epitop binden, wurden aus dem Serum der RA-Patienten #144, #183 und #218 aufgereinigt. Nach Inkubation der affinitätsgereinigten Antikörper auf dem RA-Knorpelgewebe wurden die positiven Signale mittels eines Brückenantikörpers (anti-human IgG) und alkalischer Phosphatase-gekoppelten Antikörper visualisiert. Die Rechtecke in der Übersichtsaufnahme (10x Vergrößerung, jeweils oberes Panel) zeigen die Stelle des Detailausschnittes (40x Vergrößerung, jeweils unteres Panel). Die Pfeile kennzeichnen die gefärbten Areale der extrazellulären Matrix.

4.2.2 Expression der Peptidylarginin-Deiminase im Knorpelgewebe

Da der Nachweis von citrullinierten CII-Epitopen in der extrazellulären Matrix des Knorpels durch Anfärbung mittels affinitätsgereinigter Antikörper in perizellulärer Lokalisation der Chondrozyten (siehe Abb. 4.14 A, z.B. #144 und #183) auf eine potentielle Beteiligung der Chondrozyten bei der CII-Citrullinierung hindeutet, sollte die chondrozytäre Expression der für die Citrullinierung verantwortlichen Peptidylarginin-Deiminase (PAD) 2 und 4 untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden immunhistologische Analysen von RA-Knorpelgeweben mittels anti-PAD2 und anti-PAD4 Antikörpern durchgeführt. Während sich die PAD4 Färbung ausschließlich zellulär darstellt, kann die PAD2 Expression sowohl zellulär als auch perizellulär detektiert werden (Abb. 4.15 A, B). Darüber hinaus wurde die PAD-Expression auch im Knorpelgewebe von Osteoarthrose-Patienten untersucht, um eine potentielle Rolle von PAD im Kontext anderer pathophysiologischer, Autoantikörper unabhängiger, nicht-inflammatorischer Prozesse zu analysieren. Die immunhistologische Anfärbung des OA-Knorpels ergab analog zu den Resultaten mit dem RA-Knorpel ein gleiches Färbemuster sowohl für den anti-PAD2 als auch den PAD4-spezifischen Antikörper (Abb. 4.15 A, B). Die Expression der beiden PAD-Isoformen ist somit nicht auf immunpathogenetische Prozesse der RA limitiert, sondern lässt vielmehr auf eine potenzielle funktionelle Bedeutung auch unter anderen pathophysiologischen Bedingungen schließen.

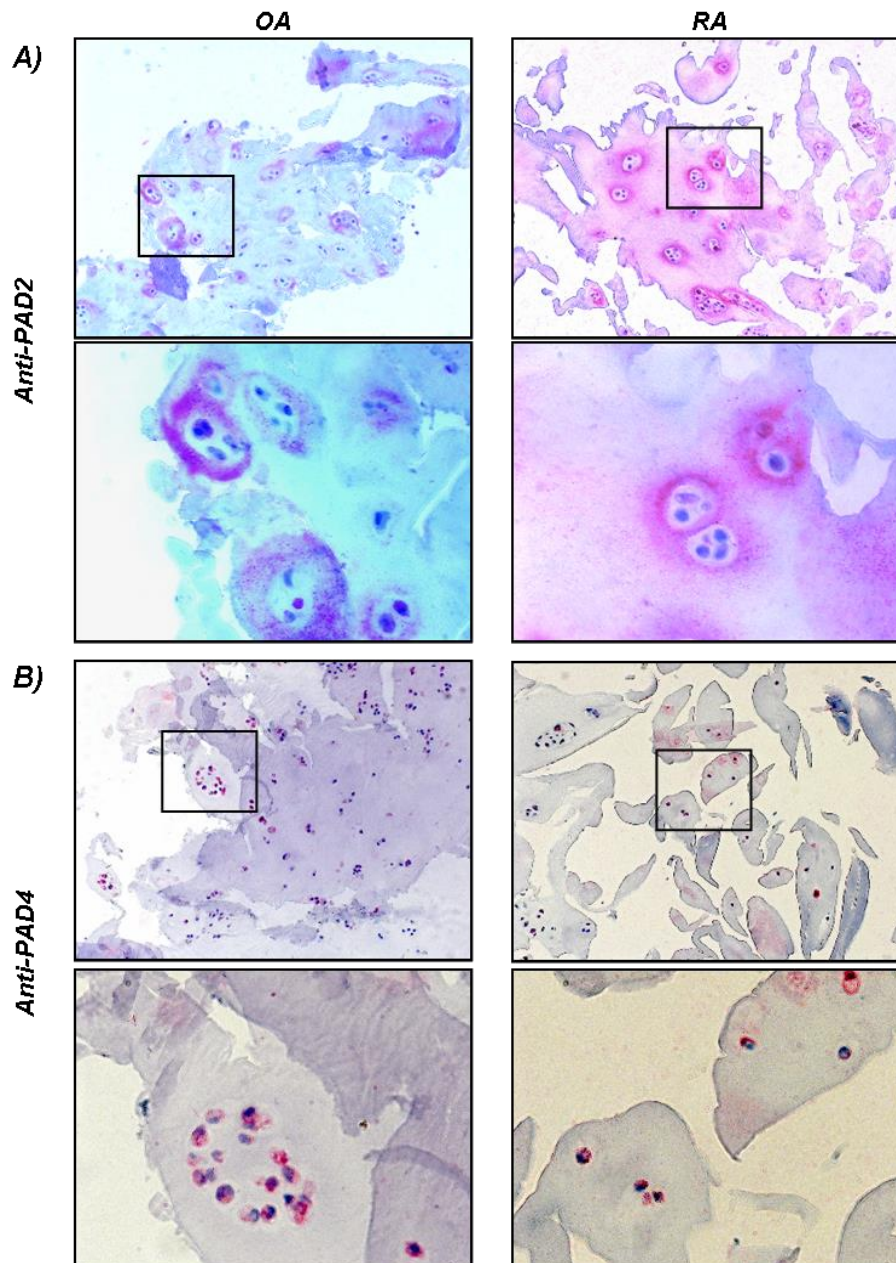
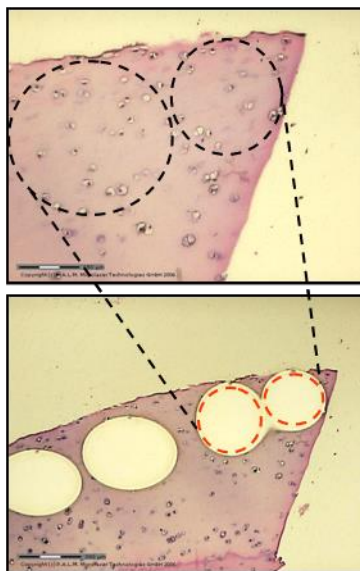


Abb. 4.15: Expression von PAD2 und PAD4 in OA- und RA-Knorpel. Immunhistologische Analyse von Knorpelgewebe isoliert aus Patienten mit Osteoarthritis (OA) und rheumatoider Arthritis (RA). Nach Inkubation eines anti-PAD2 **(A)** und anti-PAD4 **(B)** Antikörper, wurden die positiven Signale mit einem AP-gekoppelten Detektionssystem visualisiert. Die Rechtecke in der Übersichtsaufnahme (10x Vergrößerung) markieren die Stelle des Detailausschnittes (40x Vergrößerung).

Um den Nachweis von PAD2 und PAD4 auf molekularbiologischer Ebene zu führen, wurde die Expression beider Enzyme mittels reverser Transkription (RT)-PCR analysiert. Hierfür wurden HE-Übersichtsfärbungen des Knorpelgewebes angefertigt, Chondrozyten enthaltende Knorpelareale mittels Laser-Mikrodissektion gezielt aus dem Knorpel herausgeschnitten (Abb. 4.16 A), und die Aliquots für größere Ausbeuten an isolierbarer RNA miteinander vereint. Im Anschluss an die

Gewebedisektion wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe spezifischer Primer die jeweilige PAD-Isoform amplifiziert (Foulquier et al. 2007). Die Primer für die Amplifikation der verschiedenen PAD-Proteine wurden dabei so gewählt, dass diese in spezifischen Bereichen der jeweiligen Isoform binden. Eine positive Expression von PAD2 und PAD4 konnte in den Chondrozyten des RA-Knorpelgewebes bei 197 bp und 209 bp durch RT-PCR nachgewiesen werden (Abb. 4.16 B). Da PAD6 bekannterweise nur in Eizellen und in der embryonalen Entwicklung exprimiert wird, wurde die Amplifikation dieser Isoform als zusätzliche Kontrolle mitgeführt. Lediglich in den HEK 293T Zellen ist ein PAD6-Amplifikat nachweisbar, wohingegen die Chondrozyten aus dem RA-Knorpelgewebe negativ für diese Isoform sind. Als Kontrolle der RNA-Integrität wurde eine Aktin-PCR durchgeführt. Nach der RT-PCR wurden die Fragmente in den pGEM Vektor zwischenkloniert und mittels Sequenzanalysen die Spezifität der PAD-Isoformen überprüft.

A) LMD von Chondrozyten aus Knorpelgewebe



B) RT-PCR

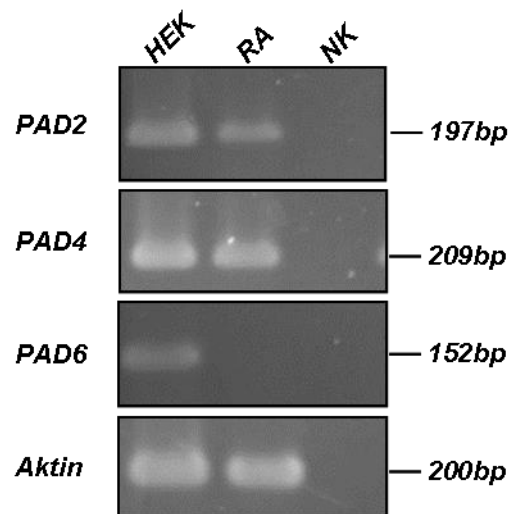


Abb. 4.16: Nachweis der PAD-Expression im Knorpelgewebe mittels reverser Transkription (RT)-PCR. Nach HE-Färbung wurden Chondrozyten-reiche Areale im RA-Knorpelgewebe markiert (A oben, 10x Vergrößerung) und mittels Laser-Mikrodissektion (LMD) ausgeschnitten (A unten, 2,5x Vergrößerung). Anschließend wurde die RNA der Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die RT-PCR erfolgte mit spezifischen Primern für PAD-2, 4 und 6 (B). Als Positivkontrolle (PK) wurde die RNA von HEK 293T Zellen verwendet. Die Aktin-PCR wurde zur Kontrolle der RNA-Integrität mitgeführt. In der Negativkontrolle (NK) wurde anstatt cDNA H₂O als Matrize verwendet. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente ist jeweils rechts in Basenpaaren (bp) angegeben.

4.2.3 Expression der Peptidylarginin-Deiminase in OA-Chondrozyten

Nachdem die Expression von PAD2 und PAD4 sowohl immunhistologisch als auch auf DNA-Ebene im Knorpelgewebe nachgewiesen werden konnte, wurde die Expression auch auf Proteinebene in primären OA-Chondrozyten untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Proteinexpression von PAD2 und PAD4 mittels Western Blot in OA-Chondrozyten analysiert. In den Zelllysaten der OA-Chondrozyten kann sowohl PAD2 mit einem Molekulargewicht von 75 kDa als auch PAD4 mit einem Molekulargewicht von 65 kDa detektiert werden (Abb. 4.17 A+B). Wie in den RT-PCR Analysen wurden auch für die Western Blot Experimente Zelllysate von HEK 293T Zellen als Positivkontrolle für die PAD-Expression mitgeführt.

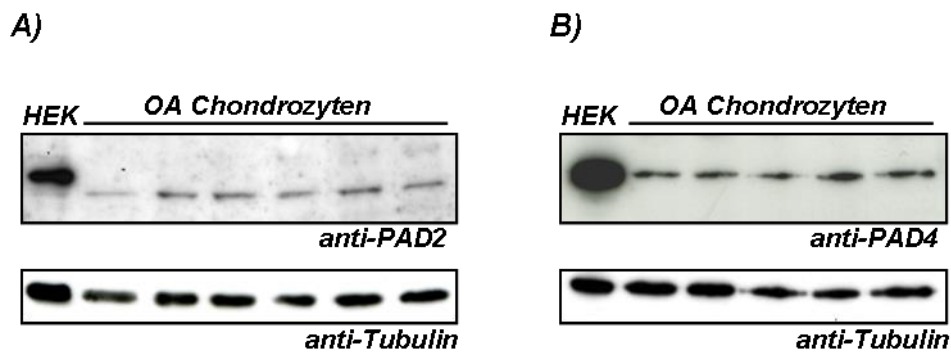


Abb. 4.17: PAD2 und PAD4 Expression von OA-Chondrozyten. Zelllysate (60 µg) von OA-Chondrozyten und HEK 293T Zellen wurden mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot mit einem anti-PAD2 Antikörper (**A**) und einem anti-PAD4 Antikörper (**B**) detektiert. Die Ladekontrolle erfolgte durch Inkubation mit einem anti-Tubulin Antikörper (jeweils unten).

Darüber hinaus wurde die PAD-Expression auch in kultivierten OA-Chondrozyten mittels Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Hierfür wurden auf Objektträgern aufgewachsene primäre OA-Chondrozyten mit dem anti-PAD2 und anti-PAD4 Antikörper angefärbt und mit einem Alexa-594 gekoppelten Sekundärantikörper visualisiert. Während die PAD2 Expression im gesamten Zytoplasma zu detektieren ist, kann man die PAD4 Expression vornehmlich im Zellkern durch eine distinkte punktuelle Färbung nachweisen (Abb. 4.18). Als Negativkontrolle wurden die Zellen lediglich mit dem Sekundärantikörper inkubiert; entsprechend resultiert keine Detektierbarkeit distinkter Fluoreszenzsignale.

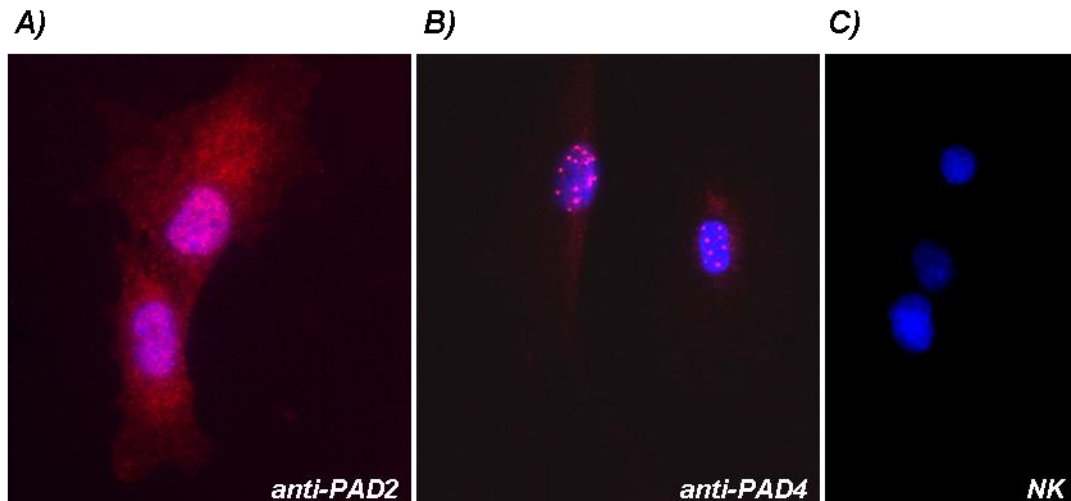


Abb.: 4.18 Immunfluoreszenzfärbung von OA-Chondrozyten. 5×10^3 OA-Chondrozyten wurden auf Objektträger ausgesät und mit dem anti-PAD2 (**A**) und anti-PAD4 (**B**) Antikörper inkubiert und mit einem Alexa-594 Sekundärantikörper detektiert. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI. Als Negativkontrolle (NK) wurden die Zellen nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die Aufnahmen wurden in 40x Vergrößerung angefertigt.

Für den spezifischen Nachweis der PAD-Expression von OA-Chondrozyten wurde deren RNA isoliert und mittels RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben. Die RT-PCR Amplifikation wurde für alle fünf PAD-Isoformen durchgeführt. In der cDNA von allen untersuchten OA-Chondrozyten ($n =$ sechs verschiedene Spender) konnte jeweils eine DNA-Bande von ca. 234 bp mit den Primern für PAD1 amplifiziert werden, wohingegen in diesen RNAs kein Amplifikat mit den spezifischen Primern für PAD6 nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.19). Die PAD2 (197 bp) und PAD4 (165 bp) DNA-Fragmente konnten jeweils bei vier OA-Spendern nachgewiesen werden und PAD3 wurde nur bei zwei der 6 untersuchten OA-Spender mit einer Bande bei 209 bp amplifiziert. In der cDNA von HEK und Hela Zellen, welche hier als Positivkontrolle mitgeführt wurden, konnte für alle fünf PAD-Isoformen ein DNA-Fragment entsprechender Größe amplifiziert werden. Die RNA Integrität wurde mittels Amplifikation von Aktin überprüft. Zur Kontrolle der amplifizierten PAD-Isoformen wurden die in der PCR erhaltenen Banden in den pGEM Vektor kloniert und die Spezifität durch Sequenzanalysen bestätigt.

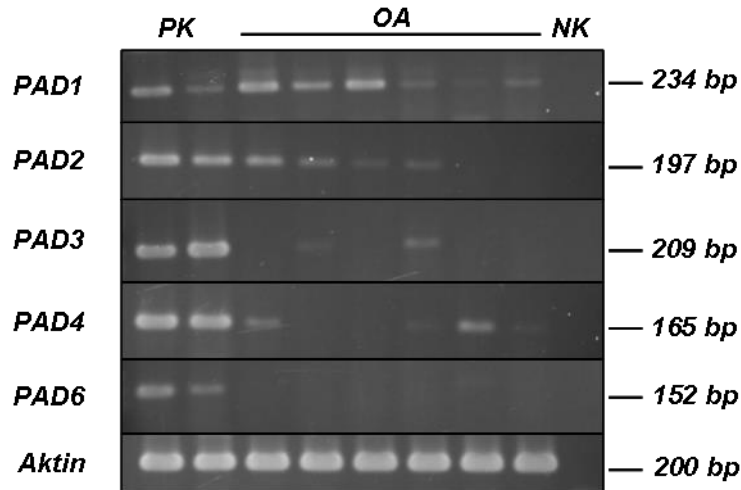


Abb. 4.19: Nachweis der PAD-Expression in OA-Chondrozyten mittels Reverse Transkription (RT)-PCR. RNA von OA-Chondrozyten wurde isoliert und mittels RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben. Die anschließende PCR wurde mit spezifischen Primern für PAD-1, 2, 3, 4 und 6 durchgeführt. Als Positivkontrolle (PK) wurde die RNA von HeLa und HEK 293T Zellen verwendet. Die Aktin-PCR wurde zur Kontrolle der RNA-Integrität mitgeführt. In der Negativkontrolle (NK) wurde anstatt cDNA H_2O als Matrize verwendet. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente ist jeweils rechts in Basenpaaren (bp) angegeben.

4.2.4 Erhöhte PAD-Expression nach Induktion von oxidativen und genotoxischen Streß in Chondrozyten

Die Expression von PAD2 und PAD4 konnte sowohl im Knorpelgewebe von RA-Patienten als auch in Chondrozyten von OA-Spendern nachgewiesen werden. Um die Regulation der PAD-Expression unter pathophysiologischen Bedingungen, z.B. oxidativen oder genotoxischen Stress, zu untersuchen, wurden T/C28a4 Chondrozyten entsprechenden modellhaften Kulturbedingungen *in vitro* ausgesetzt und anschließend hinsichtlich ihrer PAD-Expression analysiert. So wurden die Zellen mit ansteigenden H_2O_2 -Konzentrationen als Induktor von oxidativem Stress und mit dem Topoisomerase I Inhibitor Camptothecin als genotoxischem Agens für 4 oder 16h inkubiert und anschließend nach Zellyse im Western Blot mit PAD-spezifischen Antikörpern analysiert.

Bereits ab einer Konzentration von 1 μM Camptothecin konnte eine leicht erhöhte PAD2 Expression nachgewiesen werden (Abb. 4.20 A), welche mit einer Konzentration von 4 μM Camptothecin einen, um den Faktor 4,8, deutlichen Anstieg zeigte. Die Inkubation mit 50 μM H_2O_2 induzierte ebenfalls eine Hochregulation des PAD2 Enzyms, resultierte jedoch quantitativ in einer deutlich geringeren PAD2-Expressionssteigerung als die vergleichsweise unter Camptothecineinfluß

detektierbare (Abb. 4.20 B). Eine, um den Faktor 3,8 erhöhte PAD4 Expression konnte nach Inkubation mit 4 μM Camptothecin (Abb. 4.20 C) nachgewiesen werden; auch im Fall der Stimulation der PAD4-Expression fiel hierbei der quantitative Anstieg unter 50 μM H_2O_2 deutlich geringer im Vergleich zur Wirkung von Camptothecin aus (Abb. 4.20 D). So resultiert die Exposition zu den zellulären Stress induzierenden Agenzien in einer Hochregulation der beiden PAD-Isoformen, sodass diesen Enzymen eine potenzielle funktionelle Bedeutung entweder im Rahmen homöostatische Regulationsprozesse oder zellschädigender Effektorsignalwegen zukommt.

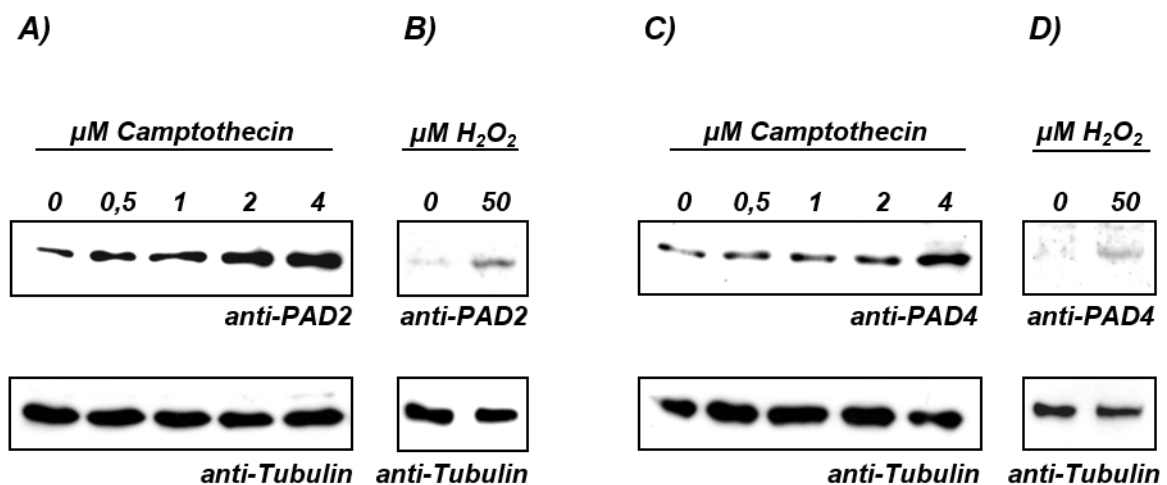


Abb. 4.20: Erhöhte PAD-Expression nach oxidativen bzw. genotoxischen Streß. T/C28a4 Chondrozyten wurden mit 0-4 μM Camptothecin (**A, C**) für 16 h oder mit 0-50 μM H_2O_2 (**B, D**) für 4 h behandelt. Nach Herstellung von Zelllysaten wurde anschließend die Expression mit einem anti-PAD2 und anti-PAD4 Antikörper mittels Western Blot Analyse untersucht. Die Beladungskontrolle erfolgte durch die Inkubation mit einem anti-Tubulin Antikörper (jeweils unten).

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die Bindung der aus Patientenseren affinitätschromatographisch gereinigten, an citrullinierte CII-F4 Peptide bindenden ACPAs an RA-Knorpelgewebe *in vitro* auf eine *in vivo* Citrullinierung von CII in der extrazellulären Matrix hinweist. Das perizelluläre Färbemuster kann als indirekte Evidenz für eine potentielle Beteiligung der Chondrozyten an der posttranslationalen CII-Modifikation gewertet werden. Entsprechend weisen die anschließenden immunhistologischen Analysen die Expression der Proteincitrullinierungen katalysierenden Enzyme PAD2 und PAD4 sowohl im RA- als auch im OA-Knorpel nach. Die sowohl intra- als auch perizelluläre PAD2 Färbung ist mit der Hypothese,

einer Freisetzung des synthetisierten Enzyms aus den Chondrozyten vereinbar. Im Unterschied hierzu spricht die vornehmlich nukleäre PAD4 Färbung für eine intrazelluläre Funktion. Zusätzliche Nachweise der PAD2 und PAD4 Expression auf mRNA und Proteinebene in isolierten OA-Chondrozyten und ihrer Steigerung unter oxidativen und genotoxischen Stressbedingungen weisen auf eine potenzielle funktionelle Bedeutung dieser Enzyme in der Pathogenese degenerativer inflammatorischer Prozesse der Knorpelschädigung hin.

4.3 Detektion von CII-spezifischen B- und Plasmazellen in der Synovialmembran von Patienten mit rheumatoider Arthritis

Obwohl der molekulare Mechanismus der rheumatoiden Arthritis (RA) noch nicht vollständig aufgeklärt ist, gibt es Evidenzen, die für die pathogenetische Bedeutung einer CII-gerichteten Autoimmunität als treibende Kraft der chronischen Inflammationsprozesse in den Gelenken sprechen. In der murinen Experimentalerkrankung der CIA (*Collagen-Induced-Arthritis*) konnte das arthritogene Potential der Autoimmunität gegen CII modellhaft gezeigt werden (Holmdahl et al. 1990). Auch im Menschen konnten anti-CII Antikörper im Synovium, dem Knorpel und auch im Serum von Patienten mit RA nachgewiesen werden (Terato et al. 1996; Morgan et al. 1987; Rowley et al. 1992). Wie bereits im Ergebnisteil 4.1 beschrieben, binden diese Autoantikörper an immundominante Epitope des CII, welche als Erkennungsdeterminanten der humoralen Autoimmunität über die Speziesbarrieren hinweg konserviert sind. Die Vermutung eines Antigen-gesteuerten Immunprozesses wird durch den Nachweis von anti-CII IgG produzierenden B-Zellen im inflammatorischen Gelenkkompartiment von RA-Patienten gestützt (Rudolphi et al. 1997; Tarkowski et al. 1989).

Im nachfolgenden Abschnitt der vorliegenden Arbeit wird die lokale, gegen den Gelenkknorpel gerichtete, humorale Autoimmunität untersucht. Voraussetzungen ist einerseits die systematische Asservierung von Synovialgewebe im Rahmen rheumachirurgischer Routineeingriffe (Gelenkersatzoperationen, Synovektomien) nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung durch die RA-Patienten und die systematische Austestung einer optimalen Fixierung des primären Patientenmaterials für die nachfolgenden Analysen. Eine weitere Voraussetzung stellt die Etablierung einer Methode zur immunhistologischen Detektion CII-Epitop spezifischer Zellen mittels synthetischer tripelhelikaler Peptide dar. Nach erfolgreicher Isolation der synovialen CII-spezifischen Zellen mittels Laser-Mikrodissektion erfolgt die Amplifikation der variablen Antikörperregionen von schwerer und leichter Kette durch eine *semi-nested* Einzelzell-PCR. Die durch Sequenzanalysen bestätigten V-Gene der leichten und schweren Antikörperkette werden in einen eukaryotischen Expressionsvektor, welcher eine murine konstante Antikörperregion beinhaltet, kloniert und im Anschluß in HEK Zellen transfiziert und exprimiert. Die

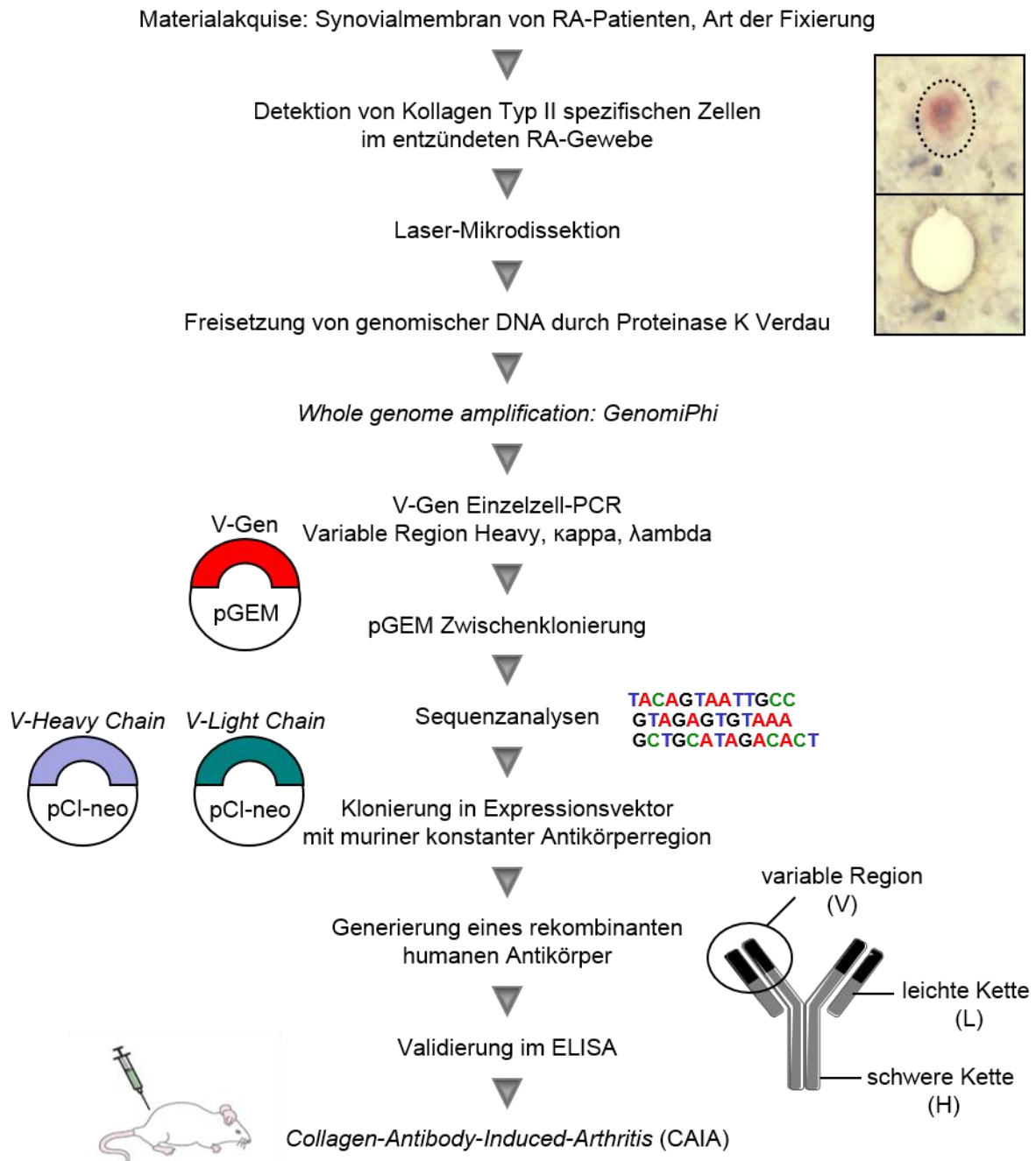


Abb. 4.21: Übersicht des Projektverlaufes zur Identifizierung von CII-Antikörper spezifischen Zellen. Der systematischen Asservierung von RA-Synovialgewebe folgt die Etablierung einer Methode zur Detektion und Isolation von CII-spezifischer Zellen aus dem entzündlichen Gewebe. Die Isolation dieser Zellen wird durch Laser-Mikrodissektion und die Amplifikation der V-Gene durch eine *semi-nested* Einzelzell-PCR gewährleistet. Die durch Sequenzanalysen bestätigten V-Gene der leichten und schweren Antikörperkette werden in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert und in HEK Zellen transfiziert. Nach Generierung eines rekombinanten humanen Antikörpers wird dieser im ELISA validiert und perspektivisch im CAIA Mausmodell eingesetzt.

Sequenzierung der V-Gene gibt desweiteren Aufschluß über klonale Verwandtschaften der exprimierten Antikörper und im Vergleich zur Keimbahnkonfiguration Hinweise auf somatische Mutationen. Die Validierung des exprimierten Antikörpers hinsichtlich Antigenaffinität soll zunächst im ELISA, später auch mittels *Surface Plasmon Resonance* (SPR) Messungen untersucht und perspektivisch ihr pathogenes Potenzial in heterologen Transferexperimenten auf naive Tiere im Mausmodell der *Collagen-Antibody-Induced-Arthritis* (CAIA) getestet werden (Abb. 4.21).

4.3.1 Detektion von anti-CIIC1 produzierende Plasmazellen

Für den Nachweis von Plasmazellen, die Antikörper gegen Kollagen Typ II produzieren, wurden immunhistologische Analysen von Synovialgewebe von Patienten mit RA durchgeführt. Für die Färbung wurden zwei synthetisch hergestellte tripelhelikale CII-Peptide verwendet, die der Sequenz des bereits beschriebenen pathogenetisch relevanten C1-Epitops (CII-Aminosäure 359-369) entsprechen. Während das eine CII-Peptid in der nicht posttranslational modifizierten Sequenz vorliegt (C1), wurden die Argininreste (R) des zweiten CII-Peptids in Citrullinreste getauscht (C1cit).

C1	A R G L T G R P G D A
C1cit	A Cit G L T G Cit P G D A

Um *in situ* B-Zellen oder Plasmazellen zu identifizieren, die spezifische Antikörper gegen immundominante CII-Epitope exprimieren, wurden in immunhistologischen Experimenten das C1 und C1cit CII-Peptid, welche am N-Terminus biotinyliert sind, eingesetzt. Sowohl FFPE (in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet) als auch kryokonservierte Synovialmembranen von RA-Patienten wurden mit den biotinylierten Peptiden inkubiert und mit einem HRP-konjugierten Streptavidin detektiert. In 17 von 18 untersuchten Gewebeproben konnten anti-CIIC1 exprimierende Zellen detektiert werden, ein repräsentativer Fall ist in Abbildung 4.22 A, B dargestellt. Allerdings konnten in keiner der untersuchten Gewebeproben Zellen mit dem citrullinierten CIIC1 Peptid angefärbt werden, sodass diese Ergebnisse eine

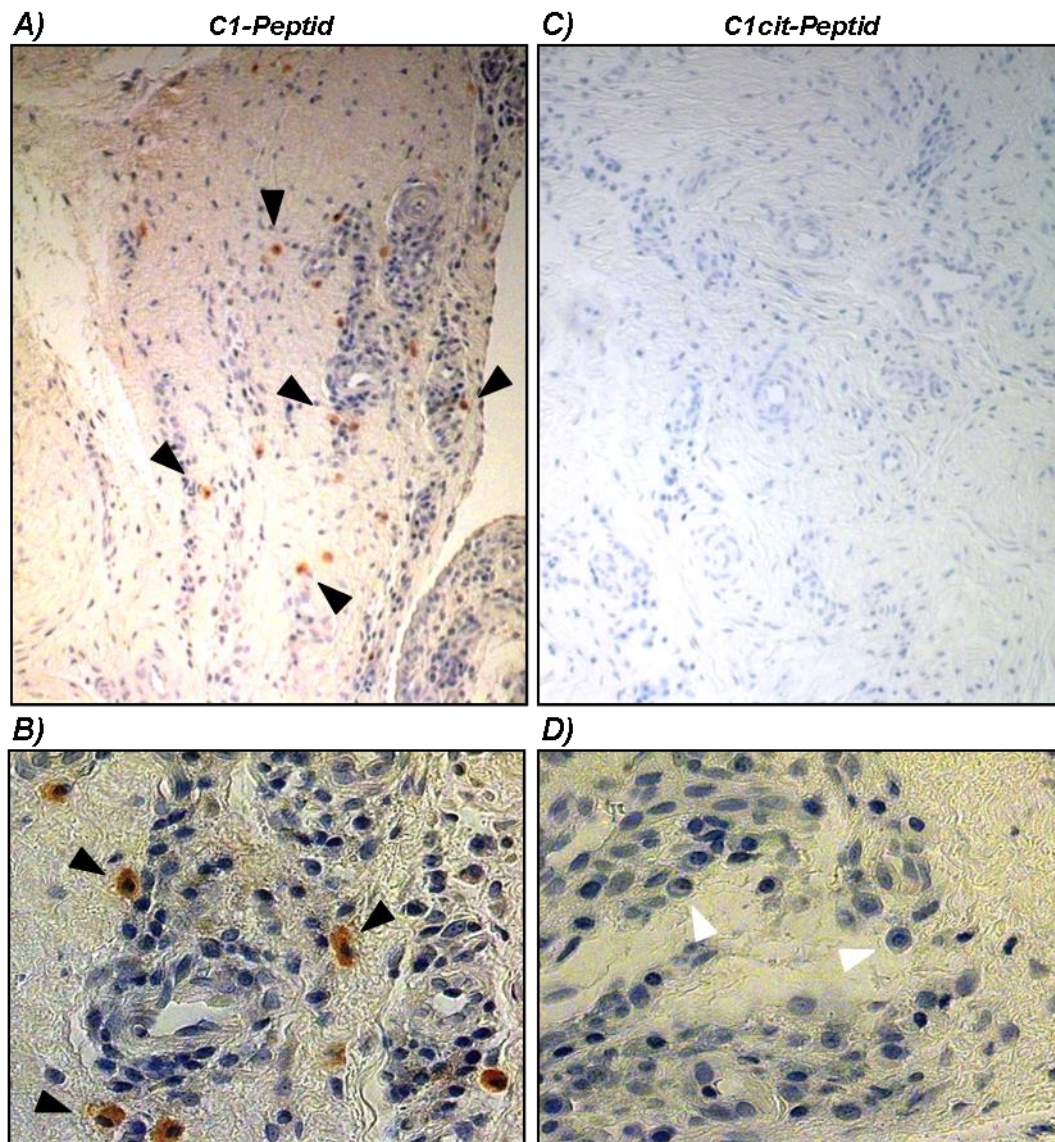


Abb. 4.22: Detektion von anti-CIIC1 exprimierenden Zellen in der Synovialmembran von RA-Patienten mittels Immunhistologie. Gewebeschnitte von inflammatorischen RA-Synovialmembranen wurden mit dem biotinylierten C1- oder C1cit Peptid für 16 h inkubiert. Visualisierung des positiven Signals erfolgte mittels Streptavidin-HRP Bindung und Farbentwicklung mit DAB. Die positive Bindung des C1-Peptides (**A, B**) ist durch schwarze Pfeile gekennzeichnet, es ist keine Bindung des C1cit-Peptides (**C, D**) nachweisbar (weiße Pfeile). Die Übersichtsaufnahmen (oberes Panel) wurden in 10x Vergrößerung und die Detailaufnahme (unteres Panel) in 40x Vergrößerung angefertigt.

Spezifitätskontrolle der Nachweise CIIC1-Epitop spezifischer Zellen mit dem tripelhelikalen Wildtyp CIIC1-Peptid darstellen. Zur Zelltypidentifizierung erfolgte im nächsten Schritt die immunhistologische Analyse mit Antikörpern gegen CD20 als Oberflächenmarker von B-Zellen (CD20) und CD138 als Differenzierungsantigen von Plasmazellen (Abb. 4.23). Mittels konsekutiver Schnitte der entzündlichen Synovialmembran wurde neben der zellmorphologischen Beurteilung, auch die

Lokalisation der anti-CIIC1 exprimierenden Zellen untersucht. Während die CD20 positiven B-Zellen sehr distinkt in fokalen Bereichen des Entzündungsherdes lokalisiert sind (Abb. 4.23 C), verteilen sich die CD138 positiven Plasmazellen in der Peripherie dieser Lymphfollikel-ähnlichen Struktur (Abb. 4.23 A). Unmittelbar angrenzend zu der B-Zell Population können die C1-positiven Zellen detektiert werden, welche somit eine ähnliche Lokalisation im Gewebe aufweisen wie die Plasmazellen (Abb. 4.23 B). Mit Hilfe von Detailaufnahmen konnten vergleichende Analysen bezüglich der Zellmorphologie von C1-positiven Zellen (Abb. 4.23 E) und Plasmazellen (Abb. 4.23 D) gemacht werden. Die für die Plasmazelle typisch ovale Zellform mit exzentrischem Zellkern konnte an Zellen, die mit dem C1-Peptid gefärbt wurden, demonstriert werden. Fasst man diese immunhistologischen Untersuchung zusammen weisen die anti-CIIC1 exprimierenden Zellen, unter Berücksichtigung der Aspekte Lokalisierung im entzündlichen Synovialgewebe und Zellmorphologie, Plasmazellmerkmale auf.

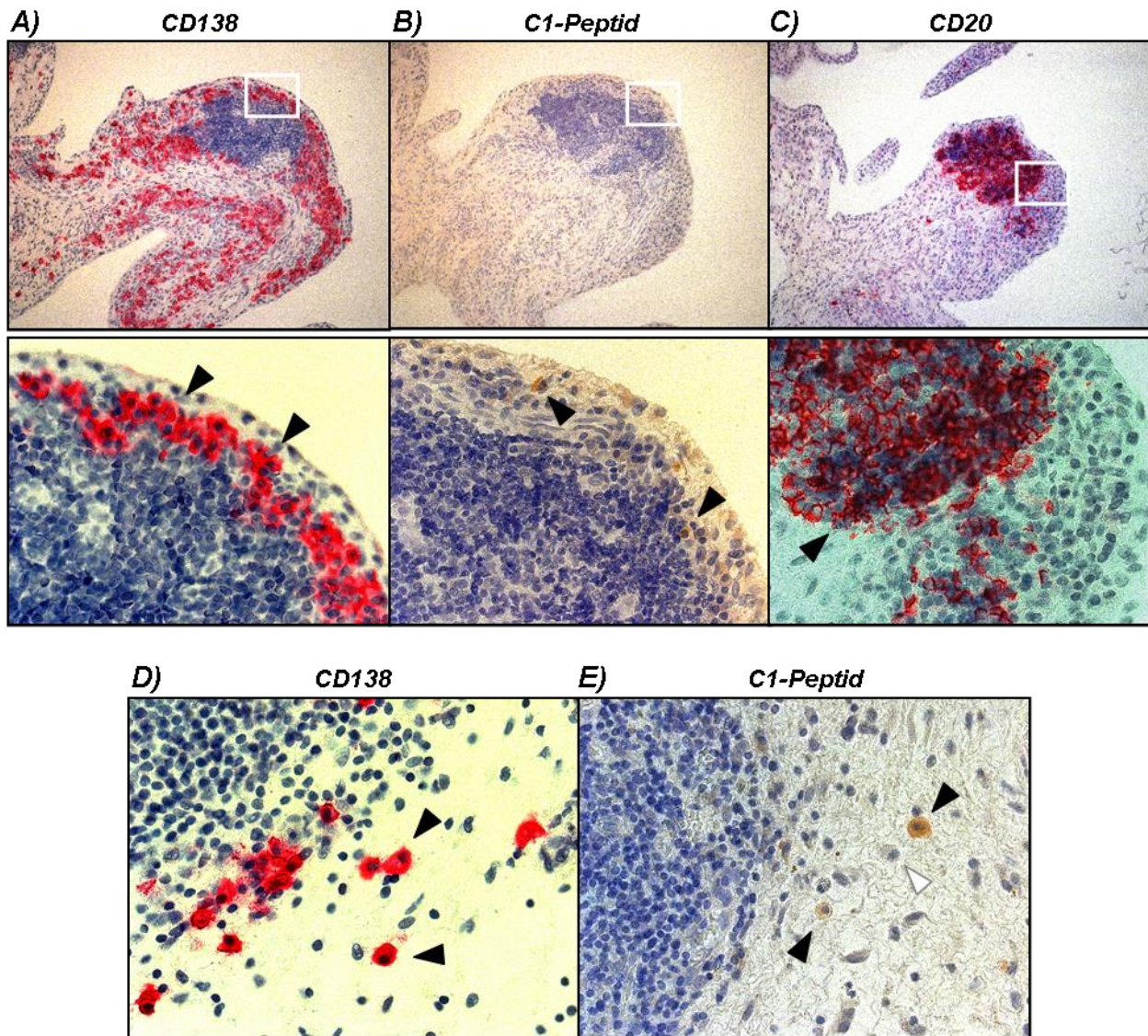


Abb. 4.23: Immunhistologie von Synovialmembran mit CD138, CD20 und dem C1-Peptid. Konsekutive Gewebeschnitte vom inflammatorischen Synovialgewebe wurde mit dem biotinylierten C1-Peptid für 16h oder mit CD20 und CD138 für 1h inkubiert. Visualisierung der positiven Signale mit CD138 (**A, D**) und CD20 (**C**) erfolgte mit einem AP-gekoppeltem Detektionssystem und die Entwicklung der Farbreaktion mit dem Farbstoff *PermanentRed* (schwarze Pfeile). Visualisierung des positiven C1-Signals erfolgte mittels Streptavidin-HRP Bindung und die Farbentwicklung wurde mit DAB initiiert (schwarze Pfeile), ungefärbte Zellen Plasmazellen wurden mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. Die Rechtecke in den 10x Übersichtsaufnahmen (**A, B** und **C** jeweils oben) kennzeichnen die Detailaufnahme in 40x Vergrößerung (**A, B** und **C** jeweils unten und **D, E**).

Um nachzuweisen, dass die CII-Peptide an CII-Antikörper produzierende Plasmazellen oder B-Zellen binden, wurden Doppelfärbungen angefertigt. Dazu wurde kryokonserviertes rheumatoides Synovialgewebe verwendet, um auf die Notwendigkeit der Antigendemaskierung von FFPE-Gewebe zu verzichten. Die

Doppelfärbungen wurden mit dem tripelhelikalen CII-Peptid und mit Antikörpern entweder gegen den Plasmazellmarker (CD138) oder den B-Zellmarker (CD20) durchgeführt. Die Fluoreszenzanalysen zeigen deutlich eine Doppelmarkierung der Zellen, die das CII-Peptid binden sowohl mit CD138 als auch mit CD20 (Abb. 4.24 A, B). Somit können in diesem Experiment sowohl anti-CII produzierende Plasmazellen als auch anti-CII exprimierende B-Zellen im RA-Synovialkompartiment entzündeter Gelenke nachgewiesen werden.

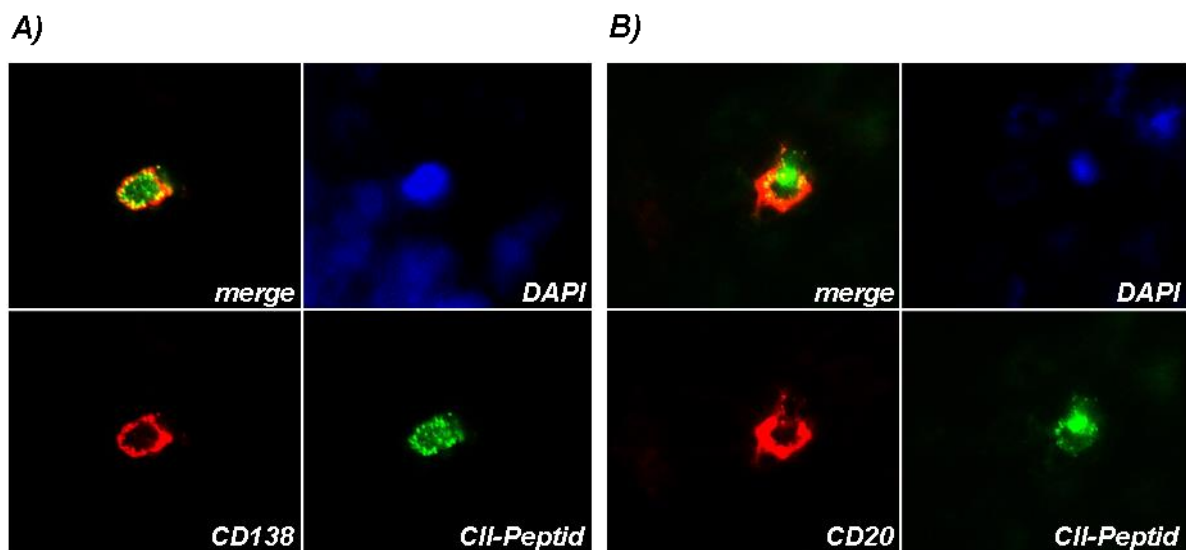


Abb. 4.24: Immunfluoreszenzdoppelfärbungen von Kryogewebe mit CD138/CD20 und CII-Peptid. Kryokonserviertes Synovialgewebe wurde mit CD138 (A) oder CD20 (B) und dem CII-Peptid inkubiert. Visualisierung der positiven Signale erfolgte für die CD-Marker mit einem Alexa 594-gekoppelten Sekundärantikörper und für das biotinylierte CII-Peptid durch ein FITC 488-konjugiertes Streptavidin. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte durch Dapi. Die Fotos wurden in 40x Vergrößerung aufgenommen.

4.3.2 Nachweis von ektopischen Keimzentren im inflammatorischen Synovialgewebe

Der Nachweis von anti-CIIC1 produzierenden Plasmazellen in der Synovialmembran (siehe Abb. 4.22 und 4.23) ist mit der Hypothese einer lokalen Antikörperproduktion vereinbar. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage ob die synoviale Produktion CII-Epitop spezifischer Antikörper auch mit einer lokalen Antikörperreifung unter Ausbildung ektopischer Keimzentren einhergeht. Untersuchungen haben gezeigt, dass die neu entstandenen ektopischen Lymphstrukturen im Synovialgewebe eine Keimzentrumsreaktion voll unterstützen (Humby et al. 2009). Das würde bedeuten, dass vor Ort im entzündeten Synovialgewebe aus Antigen-aktivierten B-Zellen Plasmazellen entstehen, die hoch-

affine Antikörper sezernieren. Im weiteren Studien wurde daher die Ausbildung dieser Strukturen näher untersucht. Zu diesem Zweck wurden immunhistologische Analysen von Gewebeproben aus Synovialmembranen von RA-Patienten mit einem Marker für folliculäre dendritische Zellen (FDC) angefertigt, welche charakteristisch für die Ausbildung von Keimzentren sind und hochspezifisch nur in diesen Strukturen vorkommen. Mittels dieses Markers konnten die, bereits zuvor beobachteten Lymphfollikel-ähnlichen Strukturen (siehe Abb. 4.23), im inflammatorischen Kompartiment als Keimzentrums-assoziiert charakterisiert werden. Die immunhistologische Analyse mit dem FDC-Marker zeigt folliculäre dendritische Zellen in den lymphoiden Strukturen des Synovialgewebes von RA-Patienten (Abb. 4.25). Von den insgesamt 18 untersuchten FFPE-Synovialgewebeproben konnte lediglich bei 25% die Ausbildung solcher Lymphfollikel-ähnlichen Strukturen beobachtet werden, wobei nur für die Hälfte dieser Fälle eine positive Anfärbung des FDC-Netzwerks gezeigt werden konnte.

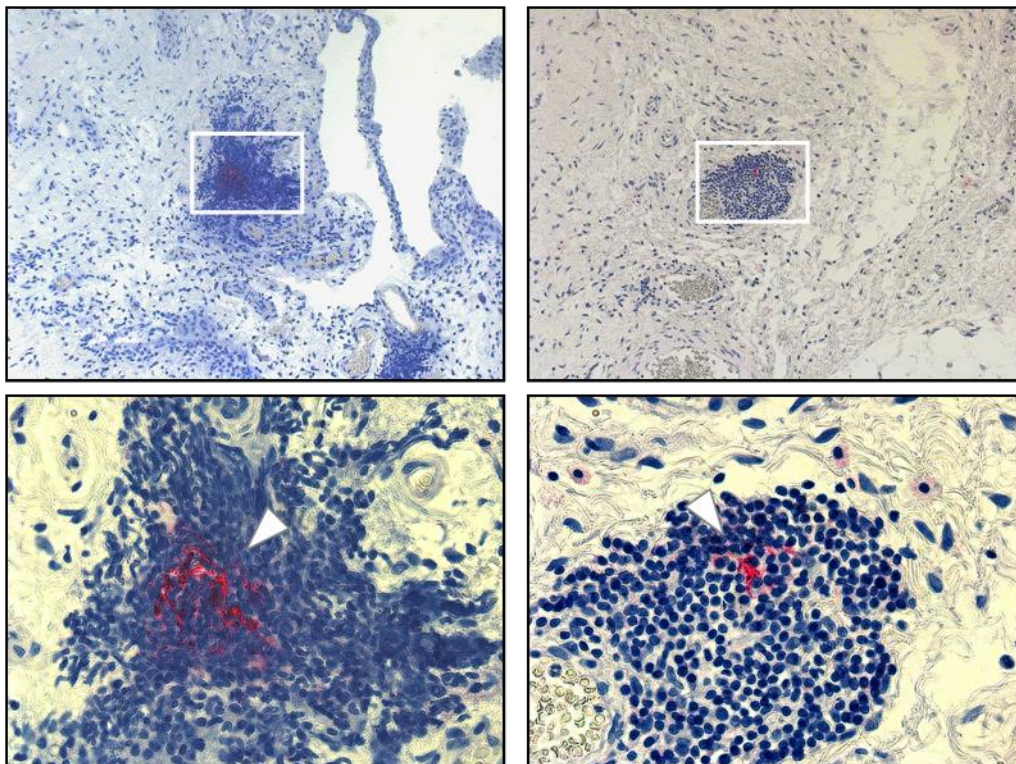


Abb. 4.25: Expression folliculärer dendritischer Zellen in der inflammatorischen Synovialmembran. FFPE-Gewebeschnitte von inflammatorischen Synovialmembranen wurden mit dem Ki-M4 Antikörper für 16h inkubiert. Die Visualisierung der positiven Signale erfolgte durch ein AP-gekoppeltes Detektionssystem und *PermanentRed*-Farbstoff (weiße Pfeile). Die Rechtecke in den 10x Übersichtsaufnahmen (**A**, **B** jeweils oben) kennzeichnen die Detailaufnahme in 40x Vergrößerung (**A**, **B** jeweils unten).

4.3.3 Laser-Mikrodissektion von Einzelzellen aus dem Synovialgewebe von RA-Patienten und Amplifikation der variablen Antikörperregion

Die in diesem Teil der Arbeit dargestellten Ergebnisse, belegen die Präsenz anti-CIIC1 produzierender Plasmazellen und B-Zellen in der Synovialmembran von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Der Nachweis dieser Zellen in der Peripherie von lymphozytären Infiltraten in der Synovialmembran, die zumindest partielle Anfärbbarkeit mit dem FDC-Marker Ki-M4 und damit Charakteristika ektooper Keimzentren aufweisen führt zu der Frage, ob in diesen Strukturen auch eine lokale Affinitätsreifung CII-spezifischer Antikörper stattfindet. Die weiteren Studien dienten daher der Analyse klonaler Verwandtschaften der spezifisch mit dem CIIC1-Peptid angefärbten Plasmazellen über die Analyse der für die Kodierung der von ihnen produzierten Immunglobuline verwendeten V-Gene. Die amino-terminale variable (V) Region der Antikörper ist für die spezifische Antigenbindung verantwortlich und sorgt aufgrund der hohen Rekombinationsvielfalt für Antikörperviariabilität. Für die nachfolgenden Analysen wurden Plasmazellen mit dem tripelhelikalen CII-Peptid angefärbt und mittels Laser-Mikrodissektion aus dem inflammatorischen Gewebe ausgeschnitten. Zur Analyse der rearrangierten V-Gene wurde eine *semi-nested* PCR-Reaktion etabliert, um die variablen Bereiche der schweren und leichten Antikörperketten zu amplifizieren.

Für die Etablierung der Einzelzell-PCR wurde zunächst mit einem Gemisch aus ca. 100 B-Zellen gearbeitet, die auch mittels Laser-Mikrodissektion aus dem Gewebe isoliert wurden. Es wurde darauf geachtet, Kontaminationen durch benachbarte Zellen zu vermeiden und das Arbeiten in einem separaten Raum sollte potenzielle äußere Störgrößen beim Ansetzen der PCR-Reaktion minimieren. Nach Isolation einzelner CIIC1 spezifischer Plasmazellen aus der Synovialmembran mittels LMD wurden die Zellen mit Proteinase K verdaut und mittels eines „*Whole genome amplification*“ Kit das gesamte genomische Material vermehrt. Hierbei handelt es sich um eine isothermale Amplifikation, die mit Hilfe von *random Hexamer* Primern und der phi29 DNA-Polymerase durchgeführt wurde. Dies verbesserte die anschließende Amplifikation durch die *semi-nested* Einzelzell-PCR maßgeblich. In der 1. PCR-Runde wurden zwar drei separate PCR-Ansätze für die Amplifikation der schweren und leichten Antikörperkette (κ und λ) durchgeführt, allerdings ein Primergemisch für alle Familienuntergruppen verwendet. Erst in der 2. PCR-Runde wurden die PCR-Ansätze für jede Untergruppe separat angesetzt (Abb. 4.26).

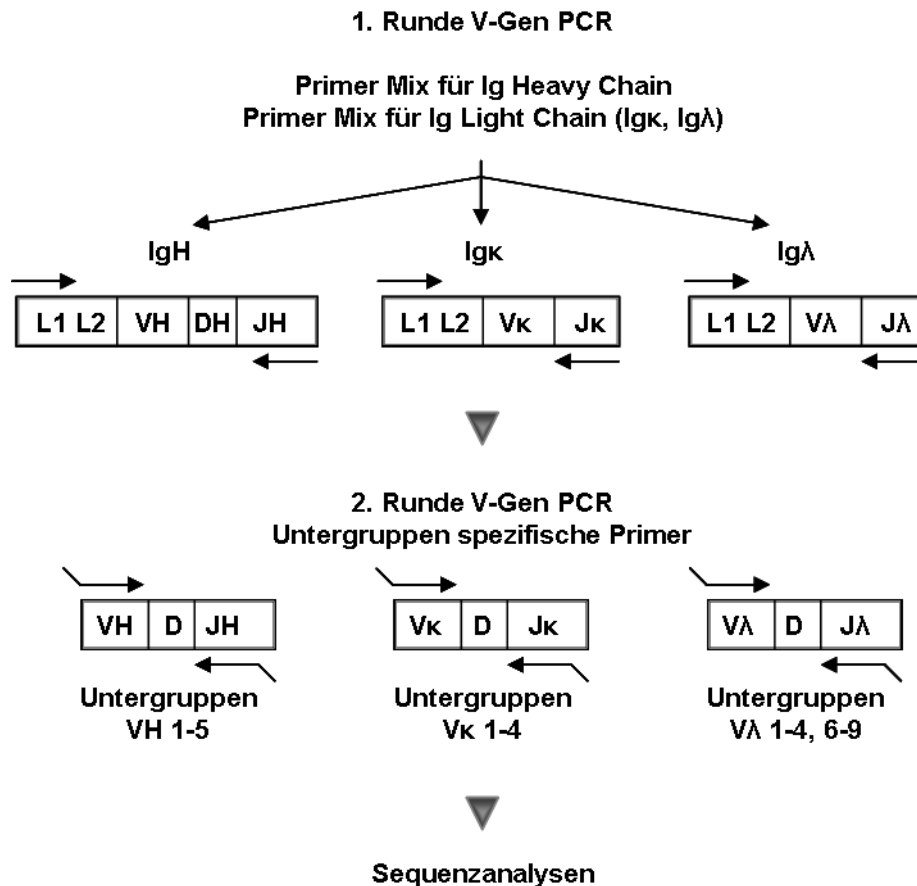


Abb. 4.26: Übersicht der *semi-nested* Einzelzell-PCR. Nach Isolation mittels Laser-Mikrodissektion, Proteinase K Verdau und Anreicherung des genomischen Materials wurde die 1. PCR-Runde in drei separaten Ansätzen mit einem Primergemisch für die variable (V) Antikörperregion der schweren (H) und leichten (L, κ und λ) Kette durchgeführt. Danach wurde in der 2. PCR-Runde die V-Gene mittels Untergruppen spezifischer Primer in separaten PCR-Ansätzen amplifiziert. Der anschließenden Analyse im Agarose-Gel folgte die pGEM Zwischenklonierung und die Auswertung der Sequenzierungen.

In Abbildung 4.27 A ist exemplarisch die Isolation mittels Laser-Mikrodissektion einer einzelnen Zellen gezeigt, die spezifisch mit dem CII-Peptid gefärbt ist. Die angeschlossene Software ermöglicht die präzise Markierung und der Laser ein sauberes Ausschneiden dieser spezifischen Zelle, deren V-Gene im weiteren experimentellen Verlauf amplifiziert wurden. Das abgebildete Agarose-Gel weist die Vλ-Amplifikation von drei einzelnen Zellen nach, die durch Laser-Mikrodissektion isoliert wurden (Abb. 4.27 B). Von den acht analysierten und häufig vertretenen Vλ-Untergruppen (Vλ 1-4, 6-9) konnten in Zelle 1 und 4 jeweils die Vλ-Untergruppe 3 und in Zelle 6 die Vλ-Untergruppe 2 amplifiziert werden. Die PCR-Produkte wurden in den pGEM Vektor zwischenkloniert und anschließend sequenziert. Unter optimalen

experimentellen Bedingungen betrug die Ausbeute spezifischer Sequenzen aus Einzelzellen 1-5%.

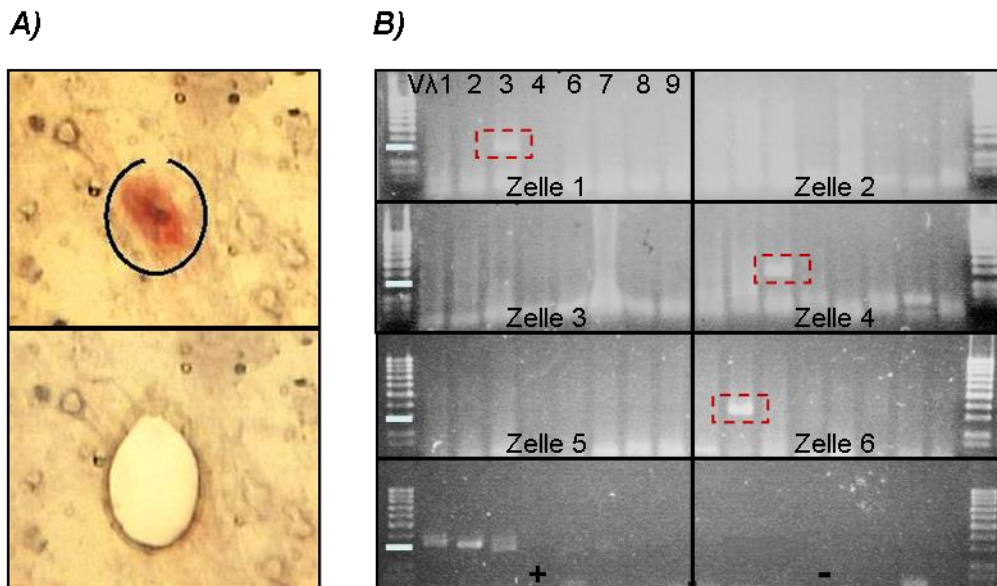


Abb. 4.27: Isolierung von anti-CIIC1 produzierenden Zellen und Einzelzell-PCR-Analysen. Mittels Laser-Mikrodissektion wurden einzelne C1-spezifisch angefärbten Plasmazellen isoliert (**A**, 40x Vergrößerung). Nach Proteinase K Verdau der Zellen und *GenomiPhi*-Amplifikation wurde eine *semi-nested* PCR mit spezifischen Primern für die variable IgG Region durchgeführt (**B**). Repräsentativ wurde hier die 2. Runde PCR der V-Lambda ($V\lambda$ 1-9) Amplifikation von 6 Einzelzellen auf einem 2% Agarose-Gel dargestellt. Genomische DNA, isoliert aus Tonsillen, diente als Postivkontrolle (+) und als Negativkontrolle wurde H_2O als *Template* verwendet (-). Ein 100 bp DNA-Marker (300 bp Markerbande links hervorgehoben) kennzeichnet die Höhe der amplifizierten DNA-Fragmente (rote Boxen).

Aus mikrodissezierten Einzelzellen, die das CIIC1-Peptid gebunden haben, konnten bisher nur $V\lambda$ -Gene amplifiziert werden (Tab 4.1). Zwar wurden die PCR-Bedingungen für die V_k und V_H Amplifikationen erfolgreich an Kontrollzellen optimiert, trotzdem konnten aus spezifisch angefärbten Einzelzellen bislang keine DNA-Produkte amplifiziert werden. Die gefundenen V-Gen Sequenzen wurden mit den, in der Datenbank hinterlegten, Keimbahnsequenzen mittels BLAST-Programme (www.vbase2.org, www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast, www.imgt.org) verglichen und ausgewertet. Es konnten einige DNA-Sequenzen gefunden werden, die zu 100% mit der Keimbahnsequenz übereinstimmen (Tab 4.1. A+B), dabei handelt es sich um DNA-Amplifikate aus Zellen die aus der Synovialmembran eines RA-Patienten stammen. Allerdings wurden auch identische Sequenzen nach Amplifikation aus Einzelzellen,

von zwei verschiedenen RA-Patienten identifiziert (Tab 4.1. C+D). Von den Keimbahnsequenzen abweichende Mutationen lassen sich sowohl in den antigenbindenden Bereichen (CDR, *Complementarity Determining Region*) als auch in den sogenannten FR-Bereichen (*Framework Region*), deren Primärsequenzen Einfluß auf die Tertiärstruktur des Antikörpers nehmen, nachweisen. Ob ein einzelner Nukleotidaustausch innerhalb eines Basenpaartripletts zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führt, ergibt sich aus dem genetischen Code, sodass entweder eine Austauschmutation (*Replacement*, R) oder eine stumme Mutation (*Silent*, S) resultieren kann. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Mutation eine Änderung der Primärsequenz hervorruft, ist für jedes Triplet unterschiedlich. Es konnte auch eine weitere V λ -Sequenz amplifiziert werden, die in einer Zelle des Patienten RA 1 (Klon A 79#7) identisch zur Keimbahnsequenz ist und ebenfalls in einer Zelle des Patienten RA 25 (Klon A 319#20) vorkommt, allerdings stark mutiert (Tab 4.1. D). Bei den identifizierten Abweichungen von der Keimbahnsequenz handelt es sich in den FR-Bereichen (FR1 und 2) überwiegend um stumme Punktmutationen, die zwar zu einem Nukleotidaustausch, nicht aber zur Änderungen der Aminosäuresequenz führen. Dahingegen handelt es sich bei den Veränderungen in den CDR-Bereichen (CDR1 und 2) um Austauschmutationen, die in einer veränderten Aminosäuresequenz resultieren. In Abbildung 4.28 ist das Chromatogramm des CDR1-Bereiches der Klone A 79#7 und A 319#20 vergleichend dargestellt. Während die V-Gensequenz des Klons A 79#7 keinerlei Mutationen enthält und somit zu 100% der Keimbahn-Konfiguration entspricht (Abb. 4.28 A), weist die V-Gensequenz des Klons A 319#20, vor allem der CDR1-Bereich, mehrere Mutationen (Abb. 4.28 B) auf. Im Chromatogramm sind zum einen die Aminosäuren markiert, welche durch Substitutionen verändert wurden und zum anderen die, die durch Insertion oder Deletion eines kompletten Tripletts entstanden sind. Bei den Substitutionen durch Punktmutationen handelt es sich um den Austausch eines sauren Asparaginsäurerestes (D) durch einen neutralen Serinrest (S) sowie eines neutralen Methioninrestes (M) durch die Kodierung eines neutralen Isoleucin (I). Die Deletion hat den Verlust eines Alanins und die Insertion die zusätzliche Kodierung eines Serins in der Sequenz zur Folge. Über die Variabilität der V-Region hinaus konnte durch die Datenbankanalyse noch zusätzlich eine weitere Punktmutation in der J-Region identifiziert werden. Dabei handelt es sich um eine Deletion einer einzelnen

Tab. 4.1: Sequenzanalysen der amplifizierten V λ Gene aus einzeln isolierten Plasmazellen. CDR (*Complementarity Determining Region*), FR (*Framework Region*), JR (*Junction Region*), R/S (*Ratio Replacement/ Silent Mutation*), NF (*Nicht Funktional*)

Patient	Klon	V λ Gene			J-Region	Nukleotid Unterschiede									
		Familie	Mitglied	Identität		FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	CDR (R/S)	FR (R/S)	Gesamt-länge	
A)	RA 25	A 9 #1	V λ 4	<i>IGλV3-19*01</i>	100%	IG λ J1*01							0/0	0/0	325 bp
	RA 25	A 37 #5	V λ 4	<i>IGλV3-19*01</i>	100%	IG λ J1*01							0/0	0/0	326 bp
B)	RA 25	A 20 #5	V λ 3	<i>IGλV3-1*01</i>	100%	IG λ J3*01							0/0	0/0	303 bp
	RA 25	A 348 #4	V λ 3	<i>IGλV3-1*01</i>	100%	IG λ J1*01							0/0	0/0	302 bp
C)	RA 1	A 75 #20	V λ 2	<i>IGλV2-23*03</i>	89,4%	IG λ J3*01		6	6	5	7	1	12/3	13/3	328 bp
	RA 25	A 101 #31	V λ 2	<i>IGλV2-23*03</i>	90,3%	IG λ J3*01		6	6	5	6	1	12/3	12/3	327 bp
D)	RA 1	A 79 #7	V λ 1	<i>IGλV1-41*01</i>	100%	IG λ J1*01							0/0	0/0	340 bp
	RA 25	A 319# 20	V λ 3	<i>IGλV1-41*01 NF</i>	95,6%	IG λ J3*01	2	8	2	1			9/0	4/3	296 bp

Nukleinbase, was das gleichzeitige Verschieben des Leserasters und eine frühzeitige Kodierung eines Stopcodons und somit eine nicht funktionale Antikörperkette zur Folge hat. Während eine Austauschmutation in den CDRs zur Variabilität der Antigenerkennung führen kann, implizieren stumme Mutationen in den FRs eine konservierte Antikörperstruktur. Die Häufung aktiver Austauschmutationen in den antigenbindenden Bereichen (CDRs) und eine gleichzeitige Häufung von stummen Mutationen in den FRs deutet auf eine antigenabhängige Entwicklung hin. Dabei zählt nicht die absolute Mutationsrate, sondern das Verhältnis von R- zu S-Mutationen (R/S-Ratio) in den CDRs bzw. FRs.

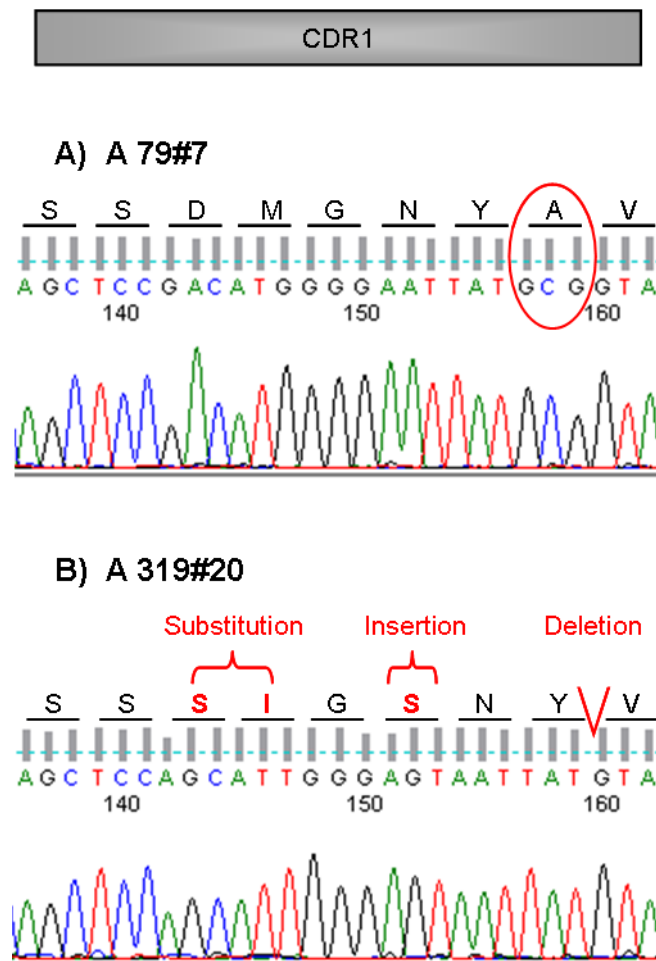


Abb. 4.28: Chromatogramm des CDR1-Bereiches der Klone A 79#7 und A 319#20. Nach der *semi-nested* Einzelzell-PCR wurden die Sequenzen, isoliert aus Zellen von zwei verschiedenen RA-Patienten **A)** RA 1 – A 79#7 und **B)** RA 25 – A319#20, mit der Keimbahnsequenz V λ 1-41*01 verglichen (s. Tab. 4.1). Dargestellt ist das Chromatogramm der CDR1 (*Complementarity Determining Region*) mit entsprechender Aminosäuresequenz (Einbuchenstabencode), wobei Veränderungen zur Keimbahnsequenz rot geschrieben und die Art der Mutationen gekennzeichnet wurden.

4.3.4 V-Gen Amplifikation von zytofluorimetrisch sortierten singulären CIIC1-spezifischen B-Zellen aus dem peripheren Blut und Synovialgewebe von RA-Patienten

Neben der erfolgreichen Isolation von anti-CII spezifischen Plasmazellen aus dem Synovialgewebe von RA-Patienten mittels LMD, wurde die Isolierung von CIIC1-spezifischen B-Zellen mittels durchflusszytometrischer Einzelzellsortierung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die mononukleären Zellen (PBMC, *peripheral blood mononuclear cell*) durch Ficollzentrifugation aus dem peripheren Blut von RA-Patienten isoliert und anschließend sowohl mit einem B- und T-Zellmarker als auch mit dem, durch Vorinkubation mit Streptavidin-PE, tetramerisierten tripelhelikalen CIIC1-Peptid für die FACS-Analyse gefärbt. Einzelne anti-CIIC1 exprimierende B-Zellen wurden in eine PCR-Platte sortiert, die mRNA in c-DNA umgeschrieben und mittels der bereits beschriebenen *semi-nested* Einzelzell-PCR die variable Antikörperregion amplifiziert.

Diese Methode ermöglichte die Amplifikation der V-Gene sowohl der schweren (VH) als auch der leichten (V λ / κ) Antikörperkette von insgesamt vier verschiedenen RA-Patienten. In Tabelle 4.2 sind die Ergebnisse der Sequenzanalysen der V-Gene aufgelistet, bei denen es möglich war aus einer B-Zelle die schwere und leichte Antikörperkette zu amplifizieren. Von insgesamt 10 Zellen konnten beide Antikörperketten erfolgreich amplifiziert werden und mit der Keimbahnkonfiguration verglichen werden. Auffällig ist zum einen die Amplifikation der gleichen VH-Untergruppe *IGHV4-59*08* bei verschiedenen Einzelzellen (5.2, 10.2, 20.1) des Patienten PB 6 und zum anderen die Amplifikation der gleichen V κ -Untergruppe *IGKV4-1*01* zweier RA-Patienten (PB 2 und PB 6).

Im unteren Teil der Tabelle sind die Ergebnisse der Sequenzanalysen amplifizierter V-Gene von B-Zellen aus der Synovialmembran (RA 42_{SY}) aufgelistet. Hierfür wurde Synovialgewebe von RA-Patienten zerkleinert, enzymatisch verdaut und die mononukleären Zellen mittels Ficoll-Zentrifugation isoliert. Die anschließende FACS-Färbung und Einzelzellsortierung wurde analog zu der für die Analysen des peripheren Blutes gewählten Vorgehensweise durchgeführt. Aufgrund der geringeren Ausbeute der anti-CIIC1 spezifischen B-Zellen in der Synovialmembran konnten nur von insgesamt vier Zellen die V-Gene amplifiziert werden, worunter allerdings auch keine Zelle war, für die sowohl die kodierenden V-Gene sowohl der schweren als

Tab. 4.2: Sequenzanalyse der V-Gene von schwerer und leichter Antikörperkette aus CLLC1-spezifischen B-Zellen. VH (variable Region der schweren Antikörperkette), V λ/κ (variable Region der leichten Antikörperkette)

Patient	Zell-Nr.	VH	Zell-Nr.	V λ / κ
PB 2	2.5	<i>IGHV3-7*01</i>	2.2	IG κ V1-5*03
	4.3	<i>IGHV3-11*01</i>	4.2	IG λ V2-8*01
	8.1	<i>IGHV1-18*04</i>	8.2.	IG κ V4-1*01
	11.4	<i>IGHV3-48*02</i>	11.10	IG λ V2-8*01
PB 3	5.3	<i>IGHV3-21*01</i>	5.1	IG λ V2-23*03
PB 6	5.2	<i>IGHV4-59*08</i>	5.1	IG κ V4-1*01
	6.2	<i>IGHV1-18*01</i>	6.5	IG λ V1-47*01
	8.1	<i>IGHV4-39*07</i>	8.6	IG κ V4-1*01
	10.2	<i>IGHV4-59*08</i>	10.1	IG κ V3-20*01
	20.1	<i>IGHV4-59*08</i>	20.9	IG λ V1-47*01
RA 42 _{SY}	---	---	2.1	IG λ V1-47*01
	10.7	<i>IGHV4-39*07</i>	---	---
	---	---	11.1	IG λ V2-18*02
	---	---	13.5	IG κ V3-20*01
RA 42 _{PB}	8.1	<i>IGHV3-30-3*01</i>	8.1	IG λ V1-47*01
	9.4	<i>IGHV3-53*02</i>	9.5	IG λ V2-14*01
	12.2	<i>IGHV1-18*01</i>	12.10	IG κ V4-1*01
	19.7	<i>IGHV1-69*06</i>	19.1	IG κ V4-1*01
RA 43 _{PB}	2.7	<i>IGHV1-69*01</i>	2.9	IG κ V1-5*03
	3.1	<i>IGHV1-69*01</i>	3.7	IG κ V4-1*01
	4.5	<i>IGHV4-4*02</i>	4.6	IG κ V4-1*01

auch leichte Antikörperkette amplifiziert werden konnten. Auch in den B-Zellen der Synovialmembran konnten V-Gensequenzen identifiziert werden, die schon bei peripheren B-Zellen eines anderen RA-Patienten (PB 6) amplifiziert wurden, wie die

VH-Untergruppe *IGHV4-39*07*, die $V\lambda$ -Untergruppe *IGLV1-47*01* und die $V\kappa$ -Untergruppe *IGKV3-20*01* (Tab. 4.2). Die identifizierten V-Gene wurden mit Hilfe von Datenbanken mit der Keimbahnkonfiguration verglichen und auf mögliche somatische Hypermutationen in den CDR-Regionen untersucht. Da die Variabilität des Antikörpers hauptsächlich von der Sequenz der antigenbindenden Bereiche abhängt, sind diese Regionen von besonderem Interesse hinsichtlich einer CII-gerichteten humoralen Immunantwort. In Tabelle 4.3 sind die Aminosäuresequenzen der CDR1-3 Bereiche der isolierten VH-Gene aufgeführt. Die mehrfach vorkommende VH-Untergruppe *IGHV4-59*08*, die aus einzelnen B-Zellen (5.2, 10.2, 20.1) des RA-Patienten PB 6 amplifiziert wurde, entspricht zu 100% der Keimbahnkonfiguration und weist keinerlei somatische Hypermutationen auf. Die Sequenzanalysen der meisten anderen VH-Gene zeigten lediglich eine geringe Mutationsrate von 0,3-1,4% im Vergleich zur Keimbahnkonfiguration, während die VH-Untergruppe *IGHV3-48*02* des Patienten PB 2 (11.4) mit 7,2% deutlich mehr Mutationen aufweist. In diesem Fall handelt es sich nicht nur um stille Mutationen oder Mutationen in der FR-Region, sondern auch um Austauschmutationen in der CDR 1, 2 und 3 (s. Tab. 4.3, rote Markierung).

Bei Betrachtung der CDR-Bereiche der isolierten V-Gene der leichten Kette, können ebenfalls Sequenzen, sowohl $V\lambda$ als auch $V\kappa$, identifiziert werden die zu 100% mit der Keimbahnsequenz übereinstimmen (Tab. 4.4). Allerdings konnten auch V-Gene amplifiziert werden, die eine leichte Mutationsrate aufweisen. Bei einigen der leicht mutierten $V\lambda/\kappa$ -Sequenzen konnten Austauschmutationen in der CDR 1, 2 und 3 detektiert werden (s. Tab. 4.4, rote Markierung). Auffällig ist dabei die Länge der CDR2 Region aller V-Gene der leichten Antikörperkette, welche nur aus drei Aminosäuren besteht obgleich sie bis zu sieben Aminosäuren lang sein könnte.

Vergleicht man die gefundenen $V\lambda$ -Sequenzen der mittels LMD isolierten Plasmazellen (s. Tab. 4.1) mit den nun identifizierten $V\lambda$ -Sequenzen der B-Zellen, so lässt sich die $V\lambda$ -Untergruppe *IGLV2-23*03* nicht nur in drei verschiedenen RA-Patienten finden sondern auch noch sowohl in B-Zellen des peripheren Bluts als auch in Plasmazellen der inflammatorisch veränderten Synovialmembran (s. Tab. 4.4). Während die $V\lambda$ -Sequenz der B-Zelle (PB 3, 5.1) nur wenig mutiert ist und zu 98,3% mit der Keimbahnkonfiguration übereinstimmt, weisen die Sequenzen der CDR 1, 2 und 3 für die synovialen Plasmazellen einige Austauschmutationen auf und sind somit nur zu 91,8% homolog mit der Keimbahnsequenz.

Tab. 4.3: Sequenzanalyse der variablen schweren (VH) Antikörperregion aus ClIC1-spezifischen B-Zellen. CDR (Complementarity Determining Region), Aminosäuresequenz als Einbuchstabencode (Mutierte Aminosäurereste sind rot markiert)

Patient	Zell-Nr.	VH	% zur Keimbahnsequenz	CDR1	CDR2	CDR3
PB 2	2.5	IGHV3-7*01	99,7	GFTFSSYW	IKQDGSEK	ARARLGLRLGFEFLFDP
	4.3	IGHV3-11*01	99,7	GFTFSDYY	ISSSGSTI	ARDPGYCSSTSCYRGDGFY
	8.1	IGHV1-18*04	99,7	GYTFTSYG	ISAYNGNT	ARMVVVAATFFGWFD
	11.4	IGHV3-48*02	92,8	GFD FS IYS	MSNSGTA I	V RLTYYYETKDAFDI
PB 3	5.3	IGHV3-21*01	98,3	GFTFSSYS	ISS G SSYI	ARDPKGTWIYSGFDI
PB 6	5.2	IGHV4-59*08	100	GGSISSYY	IYYSGST	ALGYDFWSPQGYGNWFDP
	6.2	IGHV1-18*01	98,6	GYTFTSYG	ISAYNGNT	ARERLYLLSGYYYYHDAFDI
	8.1	IGHV4-39*07	99,7	GGSISSSSYY	IYYSGST	ARSGVATIRFYGMDV
	10.2	IGHV4-59*08	100	GGSISSYY	IYYSGST	ALGYDFWSPQGYGNWFDP
	20.1	IGHV4-59*08	100	GGSISSYY	IYYSGST	ARVRGYSYGTEGWFD
RA 42 _{SY}	10.7	IGHV4-39*07	99,7	GGSISSSSYY	IYYSGST	ARSGVATIRFYGMDV
RA 42 _{PB}	8.1	IGHV3-30-3*01	100	GFTFSSYA	ISYDGSNK	ARDLYRIRGLRSGGGIDY
	9.4	IGHV3-53*02	100	GFTVSSNY	IYSGGST	ARYSSGWFGFDY
	12.2	IGHV1-18*01	99,7	GYTFTSYG	ISAYNGNT	ATYPVVTAIHGY
	19.7	IGHV1-69*06	99,7	GGTFSSYA	IPIFGTA	ARGSGSYDY
RA 43 _{PB}	2.7	IGHV1-69*01	100	GGTFSSYA	IPIFGTA	ARDRSGNWNSYYYYYGMDV
	3.1	IGHV1-69*01	99,7	GGTFSSYA	IPIFGTA	ARDRSGNWNSYYYYYGMDV
	4.5	IGHV4-4*02	99,7	GGSISSSNW	IYHSGST	ARDLNADGYNDAFDI

Tab. 4.4: Sequenzanalyse der variablen leichten (V λ /k) Antikörperregion aus ClIC1-spezifischer B-Zellen und Plasmazellen
 CDR (Complementarity Determining Region), Aminosäuresequenz als Einbuchstabencode (Mutierte Aminosäurereste sind rot markiert)

Patient	Zell-Nr.	V λ /k	% zur Keimbahnsequenz	CDR1	CDR2	CDR3	
PB 2	2.2	IGkV1-5*03	100	QSISSW	KAS	QQYNSYWT	
	4.2	IG λ V2-8*01	96,3	SSDIGVYNY	EVS	SAYAGNYNLV	
	8.2	IGkV4-1*01	100	QSVLYSSNNKKNY	WAS	QYYSTPPLT	
	11.10	IG λ V2-8*01	94,6	SSDVGGYDL	EVS	NSYAARNIYV	
PB 3	5.1	IG λ V2-23*03	98,3	SSDVGSYNL	EDT	CSYAGSSTFVV	
PB 6	5.1	IGkV4-1*01	100	QSVLYSSNNKKNY	WAS	QYYSTPPLT	
	6.5	IG λ V1-47*01	100	SSNIGSNY	RNN	AAWDDSLSGVV	
	8.6	IGkV4-1*01	99,7	QSVLYSSNNKKNY	WAS	QYYSTPPLT	
	10.1	IGKV3-20*01	100	QSVSSSY	GAS	QQYGSSPYT	
	20.9	IG λ V1-47*01	100	SSNIGSNY	RNN	AAWDDSLSGWV	
RA 42 _{SY}	2.1	IG λ V1-47*01	99,7	SSNIGSNY	RNN	AAWDDSLSGWV	
	11.1	IG λ V2-18*02	97,9	SSDVGSYNR	DVT	SSYTSSIFHV	
	13.5	IGKV3-20*01	99,7	QSVSSSY	GAS	QQYGSSPYT	
RA 42 _{PB}	8.1	IG λ V1-47*01	100	SSNIGSNY	RNN	AAWDDSLSGYV	
	9.5	IG λ V2-14*01	99,7	SSDVGGYNY	EVS	SSYTSSSTLVV	
	12.10	IGkV4-1*01	100	QSVLYSSDNKKNY	WAS	QYYSTPPLT	
	19.1	IGkV4-1*01	100	QSVLYSSNNKKNY	WAS	QYYSTPPLT	
RA 43 _{PB}	2.9	IGkV1-5*03	99,6	QSISSW	KAS	QQYNSYWT	
	3.7	IGkV4-1*01	100	QSVLYSSNNKKNY	WAS	QYYSTPPLT	
	4.6	IGkV4-1*01	100	QSVLYSSNNKKNY	WAS	QYYSTPPLT	
Plasma- zellen	RA 1 _{SY}	A75.6	IG λ V2-23*03	91,8	STDVGYYDL	DCY	SSYALTRPLV
	RA 25 _{SY}	A101.5	IG λ V2-23*03	91,5	STDVGYYDL	DCY	SSYALTRPLV

4.3.5. Rekombinante Expression der CIIC1-spezifischen Antikörper und Validierung der Antigenspezifität mittels ELISA

Für die Expression von CIIC1-spezifischen Antikörpern, deren V-Gensequenz von mit dem spezifischen C1-Peptid angefärbten und durchflusszytometrischer einzelsortierter B-Zellen stammen, wurden die amplifizierten V-Genfragmente in eukaryotische Expressionsvektoren kloniert, welche bereits für die jeweilige konstante Region der leichten (λ oder κ) oder schweren Antikörperkette kodieren. HEK 293T Zellen wurden mit zwei Plasmiden, in die jeweils die V-Region sowohl der leichten als auch schweren Antikörperkette kloniert wurde, ko-transfiziert und für 5 Tage kultiviert. Die in den Mediumüberstand sezernierten Antikörper wurden mittels Protein G Agarose Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt und die Reinheit der Antikörper mittels gelelektrophoretischer Auftrennung im SDS-Gel analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die schwere Kette bei ca. 55 kDa und die leichte Kette bei ca. 25 kDa vorliegt, übereinstimmend mit dem zum Vergleich aufgetragenen Kontrollantikörper CIIC1. Dabei enthalten die Fraktionen zwei und drei von den vier eluierten Fraktionen (F1-F4) die höchste Anreicherung des Antikörpers (Abb. 4.29 A). Die spezifische Bindung der rekombinant hergestellten Antikörper an das CIIC1-Epitop wurde in einer Art „Sandwich-ELISA“ validiert. Dazu wurden 96-well ELISA-Platten mit Antikörper enthaltenden unverdünnten Mediumüberstand beschichtet, anschließend mit den biotinylierten CII-Peptiden (spezifisch für die CII-Epitope C1 und U1) inkubiert und die Bindung mittels HRP-gekoppelten Streptavidin-Sekundärantikörper visualisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass der rekombinant exprimierte Antikörper #1 signifikant an das CII-C1-Peptid bindet, wohingegen an das CII-U1-Peptid keinerlei Bindung nachweisbar war. Als Positivkontrolle wurde der CIIC1-Antikörper, der das CII-C1-Peptid spezifisch erkennt, mitgeführt (Abb. 4.29 B). Zur funktionellen Überprüfung des CII-U1-Peptids wurde in einem nicht gezeigten ELISA-Experiment der Bindungsnachweis mittels des für dieses CII-Epitop spezifischen UL-1 Antikörper erbracht.

Das ELISA-Experiment zeigt eine spezifische Bindung des in HEK 293T Zellen exprimierten Antikörpers an das C1-Epitop des CII und belegt somit exemplarisch die Antigenspezifität der durch die verwendeten Ig-V-Gene kodierten variablen Bindungsregion des klonotypischen B-Zell-Rezeptors der mittels FACS isolierten Zelle.

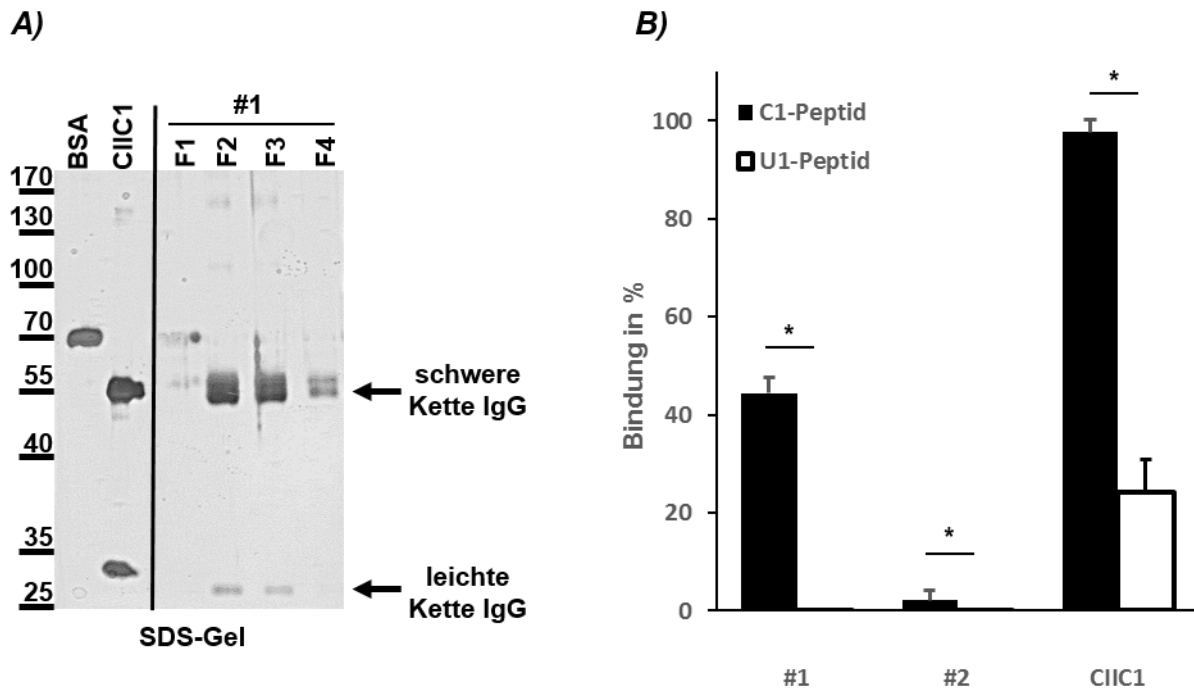


Abb. 4.29: Nachweis eines CIIC1-Epitop-spezifischen rekombinant exprimierten Antikörpers und Überprüfung der Antigenspezifität mittels ELISA. (A) SDS-Gel der mittels Protein G Affinitäts-Chromatographie eluierten Fraktionen F1 bis F4 eines rekombinanten Antikörpers zeigt unter reduzierenden Bedingungen die schwere und leichte IgG Kette. Im Vergleich wurde 250 ng des monoklonalen CIIC1 Antikörpers aufgetragen. Die Proteinbanden wurden mit Silber angefärbt. **(B)** Bindungsanalyse zweier rekombinant exprimierter CIIC1-Antikörper im ELISA, der Antikörper #1 zeigt eine deutliche Bindung an das spezifische CIIC1-Epitop aber keinerlei Bindung an das CIU1-Epitop. Zur Kontrolle wurde der murine monoklonale CIIC1-Antikörper eingesetzt. Die Signifikanz wurde aus Triplikaten mittels Student's T-Test errechnet. * $p < 0,001$

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit stand die V-Gen Analyse von autoreaktiven B- und Plasmazellen im Mittelpunkt. Es sollte die Frage einer präferentiellen V-Gen Verwendung für die Kodierung CIIC1-spezifischer Immunglobuline in den B-Zellen und Plasmazellen als Hinweis auf die Antigenselektion mittels Sequenzanalyse untersucht werden. Sequenzvergleiche mit den Keimbahnsequenzen sollten darüber hinaus Aufschluss über eine Affinitätsreifung der CII-spezifischen humoralen Immunantwort durch somatische Hypermutation der CDR-Regionen geben. Hierfür wurde zunächst eine Methode zur Detektion dieser spezifischen Zellen im inflammatorischen Kompartiment sowie ihrer Isolierung für nachfolgenden Analysen ihrer rearrangierten Ig-Gene etabliert. Mit Hilfe eines tripelhelikalen biotinylierten CIIC1-Peptids konnten Plasmazellen in der Synovialmembran von RA-Patienten visualisiert werden. Durch Laser-Mikrodissektion wurden diese spezifisch

angefärbten Zellen isoliert und die V-Gene mittels *semi-nested* PCR amplifiziert. Die aufwendige Etablierung dieser Methode und die limitierte Anzahl von DNA-Sequenzen aus Einzelzellen ließ bisher nur präliminäre Analysen der anhand von Biomaterialien aus wenigen RA-Patienten gewonnenen Daten zu. Die im weiteren Projektverlauf zusätzliche Analyse von durchflusszytometrisch isolierten CIIC1-spezifischen B-Zellen erlaubte eine umfangreichere Auswertung der erhaltenen V-Gensequenzen. Die Daten deuten auf eine präferentielle V-Gen Verwendung der leichten sowie der schweren Antikörperkette hin. So lässt sich beispielsweise das V λ -Gen *IG λ V2-23*03* in 3 verschiedenen RA-Patienten sowohl im peripheren Blut als auch in der entzündlich veränderten Synovialmembran detektieren. Die höheren Mutationsraten der synovialen Plasmazellen, insbesondere die Austauschmutationen in den CDR-Bereichen, sprechen für eine lokale Affinitätsreifung in der Synovialmembran. Der Nachweis keimbahnkodierter CIIC1-Epitop-spezifischer Antikörper zeigt, dass die humorale Immunität gegen das arthritogene CII-Epitop in den Keimbahngen angelegt und durch die zentralen Toleranzmechanismen nicht negativ selektioniert ist.

5. Diskussion

Die Arbeit thematisiert die molekulare Analyse der Kollagen Typ II (CII) spezifischen humoralen Autoimmunantwort in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis (RA). Die Studien sind fokussiert auf bereits gut charakterisierte B-Zell-Epitope auf dem CII, die über die Speziesbarrieren hinweg evolutionär konserviert sind und sowohl in der humanen RA als auch im murinen CIA-Modell immundominante Strukturen der humoralen arthritogenen Autoimmunität darstellen (Burkhardt et al. 2002; Kraetsch et al. 2001).

Ein spezieller Aspekt der Studien war einem murinen arthritogenen Autoantikörper (UL-1) gewidmet, der durch einen unbekanntem neuen Wirkmechanismus in direkter Interaktion mit den Chondrozyten des Gelenkknorpels den Proteoglykan-Katabolismus in der Gewebematrix, unabhängig von seinen FC-medierte proinflammatorischen Wirkungen, steigert. Die auf der Basis der Epitop-charakterisierung formulierte Arbeitshypothese der funktionellen Bedeutung einer immunologischen Kreuzreaktivität mit dem LIF-Rezeptor konnte experimentell nicht gestützt werden. Diese Negativergebnisse sind bereits im unmittelbaren Anschluss an den entsprechenden Ergebnisteil separat diskutiert.

In der Pathogenese der RA wird aktuell die Bedeutung posttranslationaler Proteinmodifikationen insbesondere die Deiminierung von Argininresten unter Bildung von Citrullin als Beitrag zur Neoepitopgenerierung in der Auslösung bzw. Aufrechterhaltung immunmediierter Entzündungsprozesse diskutiert. Die aktuelle Studie diente daher der Fragestellung ob die Modifikation von Argininresten im CII die *in vivo* Bindung von ACPAs, Autoantikörper gegen citrullinierte Epitope, an humanes Knorpelgewebe begünstigt und ob die für die Citrullinierungsreaktionen verantwortlichen Peptidylarginin-Deiminasen (PAD) auch lokal im Gelenkknorpel von den Chondrozyten exprimiert werden.

Ein zentral wichtiger Aspekt der Arbeit galt der Fragestellung des histologischen Nachweises einer lokalen Produktion CII-spezifischer Antikörper im inflammatorisch veränderten Kompartiment der Synovialmembran über die Epitop-spezifische Detektion von Plasmazellen und B-Zellen. Darüber hinaus wurde die Frage der Affinitätsreifung der CII-Antikörper über die V-Gen Analyse CII-Epitop-spezifisch

sortierter B- und Plasmazellen sowohl aus dem peripheren Blut als auch aus dem Synovialgewebe von RA-Patienten nach Einzelzell-PCR Amplifikation analysiert.

5.1 Citrulliniertes Kollagen: Zielstruktur von Autoantikörpern in RA-Seren

Die Detektion von ACPAs im Serum von 50-70% der RA-Patienten mit einer relativ hohen Krankheitsspezifität hat dazu geführt, dass der humoralen Immunität gegen citrullinierte Autoantigene auch eine pathogenetische Bedeutung zugeschrieben wird. So konnte bereits citrulliniertes Vimentin (Erik R Vossenaar et al. 2004), Fibrinogen (Masson-Bessière et al. 2001), Fibronectin (van Beers et al. 2012) und die α -Enolase (CEP) (Lundberg et al. 2013) im Serum und in der inflammatorischen Synovialmembran von RA-Patienten nachgewiesen werden. Während es sich bei den genannten modifizierten Autoantigenen um ubiquitär bzw. nicht gelenkspezifisch exprimierte Proteine handelt, war die Charakterisierung citrullinierter Epitope des knorpelspezifischen CII als Zielstruktur für ACPAs (Burkhardt et al. 2005) der erste Hinweis auf die RA-assoziierte Immunität gegen posttranslational entstandene Neopeptide in der Matrix des Gelenkknorpels. Die Tatsache, dass CII den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix des Gelenkknorpels (Übersicht in: Aigner & Stöve 2003), als Zielstruktur destruierender immunmediierter Inflammationsprozesse in der RA-Pathogenese darstellt, unterstreicht die potenzielle Bedeutung seiner immunogenen Strukturveränderung durch enzymatische Citrullinierungsreaktionen.

Die tripelhelikale Region des CII enthält 52 Argininreste, von denen 30 posttranslational durch die Peptidylarginin-Deiminase 2 citrulliniert werden können (Haag et al. 2014). Sieben der identifizierten citrullinierten Argininreste sind in Domänen mit bereits charakterisierten CII-Antikörper Epitopen lokalisiert. Sie sind im Fall von Arg³⁶⁰ (C1-Epitop), Arg⁷⁸⁰ (E10-Epitop), Arg⁹²⁷ und Arg⁹³³ (F4-Epitop) Teil eines konservierten Aminosäuremotivs (Arg-Gly-hydrophob), das die immun-dominanten Determinanten der humoralen Immunantwort gegen das native nicht-modifizierte CII verbindet (Schulte et al. 1998).

In den vorliegenden Studien konnte mittels Immunhistochemie *in situ* gezeigt werden, dass zwei ACPAs spezifisch für je eine Variante des citrullinierten F4-Epitops auf dem CII direkt an den humanen Knorpel arthritischer Gelenke von RA-Patienten binden. Diese kürzlich identifizierten Autoantikörper binden spezifisch an das F4-

Epitop entweder in Abhängigkeit von der Citrullinierung des Aminosäurerestes Arg⁹²⁷ (E **Cit** G L K G H R G F T) oder Arg⁹³³ (E R G L K G H **Cit** G F T) (Haag et al. 2014). Die Spezifität wurde mittels synthetischer Peptide mit entsprechender Epitopsequenz an Seren einer großen gut dokumentierten RA-Kohorte analysiert (Haag et al. 2014). Über die Ergebnisse einer bereits publizierten Studie hinaus, die bereits citrulliniertes CII in der Synovialflüssigkeit (Uysal et al. 2009) nachgewiesen hat, gelang in der aktuellen Arbeit erstmals die Detektion von citrulliniertem CII im humanen Gelenkknorpel.

5.2 Chondrozytäre Expression von PAD2 und PAD4

Aus der Literatur ist bereits die Expression von PAD2 und PAD4 sowohl im Synovialgewebe (Foulquier et al. 2007) als auch in der Synovialflüssigkeit (Kinloch et al. 2008) bekannt, sodass die Enzyme des synovialen Kompartimentes im Rahmen der Inflammationsprozesse als mögliche Effektoren der Citrullinierung von Knorpelmatrixbestandteilen in Betracht kommen. Die aktuelle Studie liefert darüber hinaus aber erstmalig Evidenzen für eine potenzielle Beteiligung der Chondrozyten an der lokalen Citrullinierung des CII. So konnte die Expression der für die posttranslationalen Modifikation verantwortlichen Peptidylarginin-Deiminasen (PAD) sowohl im Knorpel von RA-Patienten als auch im Knorpel von Patienten mit Osteoarthrose (OA) nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu der ausschließlich intrazellulären Expression von PAD4, kann PAD2 zudem immunhistologisch auch perizellulär in der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden.

Die Studie zeigt die Expression von PAD2 und PAD4 *in vitro* in primären Chondrozyten mittels biochemischer Methoden sowie durch RT-PCR mit anschließender Sequenzierung des PCR-Amplifikats. Insgesamt sind die Ergebnisse mit der Arbeitshypothese einer chondrozytären PAD-Expression vereinbar, die unter bestimmten Umständen offenbar auch zur Freisetzung von PAD2 in das perizelluläre Matrixkompartiment der Chondrozyten führen kann, in dem auch durch Bindung von ACPAs citrullinspezifische CII-Modifikationen nachweisbar sind. Dies sind supportive indirekte Evidenzen für eine funktionelle Beteiligung der chondrozytären PAD2 an der CII-Citrullinierung im Gelenkknorpel, da der direkte Nachweis einer enzymatischen Aktivität, die u.a. hohe lokale Ca²⁺-Konzentrationen voraussetzt, fehlen. So ist denkbar, dass die Chondrozyten unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen durch Citrullinierung des CII eine Neoepitopgeneration

in der Knorpelmatrix bewirken können mit der Folge einer gestörten Selbsttoleranz gegenüber dieser Hauptstrukturkomponente des hyalinen Knorpels und der Induktion bzw. Amplifikation immunmediierter Entzündungsreaktionen.

5.3 Gesteigerte PAD-Expression im pathophysiologischen Kontext

Im Kontext des Chondrozytenmetabolismus sowie der physiologischen Funktion des Knorpel spielen für die Regulation von Differenzierungs- und Apoptosevorgängen sowie anaboler und kataboler Prozesse biomechanische Belastungen sowie oxidative und genotoxische Stressoren (Zuscik et al. 2008) eine wichtige Rolle. Die Bedingungen, die zur chondrozytären PAD-Expression führen, sind offenbar nicht auf immunmedierte Entzündungserkrankungen beschränkt, da in der vorliegenden Arbeit der Nachweis von PAD2 und PAD4 sowohl im RA- als auch OA-Knorpel, geführt werden konnte. Von potenzieller Relevanz für die PAD-Expressionsregulation sind daher Stressoren, denen die Chondrozyten als terminal differenzierte, unter hypoxischen Bedingungen in einem avaskulären Gewebe, biomechanischen Belastungen lebenslang ausgesetzte Zellen zu widerstehen haben. Hier sind insbesondere oxidative und genotoxische Einflüsse als bekannte pathophysiologische Faktoren der Osteoarthritis (Aigner et al. 2007; Regan et al. 2005) zu nennen. Da PAD4 aufgrund seines nukleären Translokationssignals als einzige der bekannten PAD-Isoformen hauptsächlich im Nukleus exprimiert ist und genregulatorisch über die enzymatische Modifikation von Chromatinstrukturen wirken kann (Wang et al. 2004; Yao et al. 2008; Tanikawa et al.), wurde die Arbeitshypothese der Induktion einer PAD-Expressionssteigerung in Chondrozyten *in vitro* unter dem Einfluß von zwei distinkten Modellsubstanzen zur Simulation von oxidativen und genotoxischen Streß analysiert. Sowohl nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid als auch mit Camptothecin konnte eine konzentrationsabhängige Hochregulation beider PAD-Isoformen beobachtet werden.

Die funktionellen Konsequenzen dieser PAD-Expression unabhängig von der potenziellen Bedeutung für Citrullinierung werden aktuell noch weiter untersucht. So ist denkbar, dass unter den zellulären Stressbedingungen PAD-abhängig mit den Veränderungen der Chromatinstruktur (Wang et al. 2004) homöostatische Gegenregulationen induziert werden. Beispielsweise konnte eine hohe Resistenz von OA-Chondrozyten gegenüber der Apoptoseinduktion durch genotoxischen Streß

gezeigt werden (Böhm et al. 2010), jedoch ist ein funktioneller Zusammenhang mit der Heraufregulation der Genexpression von PAD4 derzeit rein spekulativ.

5.4 Pathogenetische Assoziation zum *HLA-DR* Locus

Für die fortschreitende Gelenkzerstörung durch den chronischen Entzündungsprozess der RA wird die immunologische Fehlerkennung von Gelenkstrukturen durch dysregulierte B- und T-Lymphozyten verantwortlich gemacht. So lassen sich in bis zu 70% der entzündeten Gelenken von RA-Patienten IgG Autoantikörperproduktionen gegen das knorpelspezifische CII nachweisen (Tarkowski et al. 1989). Auf die Bedeutung von T-Helferzellen weist die genetische Assoziation der Krankheitsschwere zu bestimmten Allelen des *HLA-DRB1** Locus (*0401*, *0404*, *0101*) hin (Gregersen et al. 1987). Die in dieser Region kodierten Genprodukte sind sogenannte MHCII-Moleküle, die von spezialisierten Antigen-präsentierenden Zellen (z.B. dendritischen Zellen, Makrophagen) auf ihrer Zellmembran exprimiert werden und der Präsentation antigener Peptide an CD4 positive T-Lymphozyten dienen. Die genetisch determinierte Form der Peptidbindungstasche in den jeweiligen MHCII-Molekülen beeinflusst entsprechend sowohl die Selektion der Peptide für die Präsentation an allo- und autoreaktive oder regulatorische T-Lymphozyten als auch die aus den jeweiligen Interaktionen mit dem T-Zellrezeptor resultierenden Signalstärken und prägt damit das dem Individuum für adaptive Immunantworten zur Verfügung stehende T-Zell-Rezeptorrepertoire. Alle RA-assoziierten *HLA-DRB1* Allele weisen in ihrer dritten hypervariablen Region in der kodierenden Sequenz für die Position 70-74 die homologen Aminosäuremotive QKRAA (**0401*), QRRAA (**0404*, **0405*, **0408*, **0101*, **0102*, **1402*) oder RRRAA (**1001*) auf, deren Konsensus als "*Shared Epitope*" bezeichnet wird. Das Konsensusmotiv QK(R)AA auf der β -Kette des MHCII stellt eine Bindungsstelle für die Präsentation einer immundominanten T-Zell Determinante des CII (CII259-272) dar. Dies zeigen entsprechende Röntgenstrukturanalysen der humanen HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) und HLA-DR1 (DRA*0101, DRB1*0101) Moleküle im Komplex mit dem CII-Peptid 259-273 (Dessen et al. 1997; Rosloniec et al. 2002).

Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Burkhardt in Kooperation mit der *Division of Medical Inflammation Research* am Karolinska Institut in Stockholm haben gezeigt, dass die Entwicklung der erosiven Arthritis im CIA Modell abhängig von dem murinen MHCII Allel *Aq* sowie von der T-Zell-Erkennung der CII-Region 259-273 und

insbesondere des galaktosylierten Lysinrestes in Position 264 ist. In analogen Studien zur T-Zell-Erkennung des CII konnte nachgewiesen werden, dass das galaktosylierte CII259-273 auch eine Zielstruktur humaner T-Zellantworten ist und in allen bis jetzt untersuchten RA-Patienten, die Träger des krankheitsassoziierten Allels HLA-DRB1*0401 sind, erkannt wurde (Bäcklund et al. 2002). Die T-Zell-vermittelte Immunreaktion scheint zur Aktivierung CII-spezifischer B-Zellen beizutragen, da eine genetische Assoziationen von CII-spezifischen IgG-Autoantikörperantworten in frühen Krankheitsstadien mit den entsprechenden RA-assoziierten Allelen des HLA-DRB1-Lokus nachgewiesen werden konnte (Burkhardt et al. 2006). Für einen Beitrag der B-Zellen zur Krankheitsentstehung der RA spricht die gute therapeutische Wirkung einer B-Zell-depletierenden anti-CD20 (Rituximab) Behandlung (Beschrieben in: Martinez-Gamboa et al., 2006). Neben ihrer Bedeutung für die Entstehung von Antikörperantworten spielt die B-Zelle auch eine Rolle in der Präsentation von Antigen an T-Helferzellen sowie der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine.

5.5 CIIC1-Epitop-spezifische Plasmazellen im RA-Synovialgewebe

Ein wesentlicher Aspekt der aktuellen Arbeit diente der Analyse der lokalen CII-Epitop spezifischen Antikörperantwort im entzündeten Gelenk. Zu diesem Zweck wurde exemplarisch ein synthetisch hergestelltes tripelhelikales CII-Peptid selektiert, das ein immundominantes B-Zellepitop auf CII repräsentiert. Antikörper gegen dieses sogenannte C1-Epitop auf CII (Aminosäure 359-369, ARGLTGRPGDA) konnten regelhaft sowohl im CIA-Mausmodell als auch in der Immunantwort von Patienten mit RA nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist ein Beitrag zur Arthritogenität der Antikörperbildung gegen das C1-Epitop durch Antikörpertransfer im CAIA-Modell belegt (Nandakumar & Holmdahl 2005). Mit Hilfe eines biotinylierten tripelhelikalen CII-Peptids war es möglich in immunhistologischen Studien im Synovialgewebe von RA-Patienten CIIC1-Epitop-spezifische Plasmazellen an der Peripherie ektooper Lymphfollikelstrukturen zu identifizieren. Darüber hinaus gelang auch der vereinzelte Nachweis CIIC1-Epitop-spezifischer B-Zellen in Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen B-Zell spezifische Differenzierungsmarker.

In etwa 20% der RA-Patienten können ektope Keimzentren im entzündeten Synovialgewebe nachgewiesen werden (Schröder et al. 1996; Randen et al. 1995;

Schröder et al. 1997; Kim & Berek 2000). Für B-Zellen in diesen ektopen Keimzentren konnte aufgrund einer Stammbaumanalyse ihrer rearrangierten Immunglobulingene eine klonale Expansion und die schrittweise Akkumulation somatischer Mutationen als Hinweis auf Antigen-abhängige Affinitätsreifungen der Antikörperantwort nachgewiesen werden (Schröder et al. 1996, Kim & Berek 2000; Berek & Kim 1997). Auf diese Weise können B-Zellen lokal im chronisch entzündeten Synovialgewebe zu Plasmazellen ausdifferenzieren (Kim et al. 1999). In dem Großteil der in dieser Arbeit immunhistologisch analysierten Synovialgeweben von RA-Patienten konnten diese ektopischen Lymphfollikelstrukturen mittels H&E Übersichtsfärbung detektiert werden. In einigen wenigen Fällen konnten sogar folliculäre dendritische Zellen (FDC) innerhalb der ektopischen Keimzentren angefärbt werden, dessen Netzwerkbildung für den Aufbau von Keimzentren unerlässlich ist (Weyand et al. 2000).

Von Plasmablasten, die sich im Keimzentrum sekundärer lymphatischer Organe entwickeln, wird angenommen dass sie über die Zirkulation ins Knochenmark gelangen, wo sie sich zu langlebigen Plasmazellen ausdifferenzieren (Manz et al. 1997; Chu & Berek 2013). Das Kompartiment des Knochenmarks bietet im engen zellulären Kontakt zu eosinophilen Granulozyten und Stromazellen den Plasmazellen, ein Zytokinmilieu und weitere antiapoptotische Signale, eine besondere Überlebensnische (Abb. 5.2). Langlebige Plasmazellen können in so einer geschützten Umgebung für mehrere Jahre überleben, möglicherweise sogar für die gesamte Lebensspanne des Organismus (Winter et al. 2012). Das entzündlich-veränderte Synovialgewebe von RA-Patienten scheint analog zum Knochenmark ebenfalls lokale Milieufaktoren bereitzustellen, die das Langzeitüberleben von Plasmazellen begünstigen (Dechanet et al. 1995; Berek & Kim 1997) mit korrespondierend hohen, histologisch nachweisbaren Plasmazellanteilen (Kim et al. 1999). Für die in dieser Arbeit häufig - aber nicht ausschließlich - in direkter Umgebung Keimzentrums-ähnlicher lymphatischer Strukturen mit dem CII-C1 Peptid spezifisch anfärbbaren Plasmazellen in der Synovialmembran von RA-Patienten erscheint es möglich, dass diese Zellen lokal langfristig persistieren und dauerhaft durch die Produktion CII-spezifischer Autoantikörper humorale Effektormechanismen knorpelspezifischer Autoimmunität unterhalten können. Allerdings ist nicht ausgeschlossen, dass diese Zellen als

Plasmablasten nur von begrenzter Lebensdauer sind, da spezifische differenzierende Marker für die *in situ* Identifikation langlebiger Plasmazellen fehlen. Der Marker CD138 (Syndecan-1), der in dieser Arbeit für die Detektion von Plasmazellen verwendet wurde, erlaubt lediglich die Unterscheidung zu Gedächtnis-B-Zellen, die im Gegensatz zu Plasmazellen nicht markiert werden.

In der aktuellen Studie konnten keine CIIC1-spezifischen B-Zellen innerhalb der ektopen Keimzentrumsstrukturen der RA-Synovialmembran nachgewiesen werden. Dieser Befund kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die CIIC1-Epitop-spezifischen Plasmazellen nicht unmittelbar in diesen Lymphfollikel-ähnlichen Strukturen durch eine Keimzentrums-abhängige Reifung entstanden sind - allerdings mit der Einschränkung, dass diese Möglichkeit durch die Ergebnisse auch nicht sicher ausgeschlossen ist. Die erhobene Datenlage ist auch mit der Hypothese vereinbar, daß CIIC1-spezifische Plasmablasten z.B. nach Ihrer Generation in einer Keimzentrumsreaktion im regionalen Lymphknoten aus der Peripherie eingewandert sind und nachfolgend im antiapoptotischen Milieu der entzündlich veränderten Synovialmembran als langlebige Plasmazellen überdauern. Plasmazellen in der Synovialmembran von RA-Patienten exprimieren den Chemokinrezeptor CXCR3, dessen Ligand das Chemokin CCL9 bereits in frühen Arthritisstadien von den Synovialfibroblasten unter Einfluss von IFN- γ lokal produziert wird, sodass die Komponenten für das Szenario einer Chemokin-vermittelten Plasmazellmigration in der Synovialis nachgewiesen sind (Tsubaki et al. 2005). Alternativ besteht aber auch die Möglichkeit einer lokalen Reifung CIIC1-spezifischer Plasmazellen in der RA-Synovialmembran außerhalb ektoper Keimzentren. Physiologisch sind extrafollikulär in der Milz gebildete Plasmazellen kurzlebige Blasten; sie produzieren in der Regel unmutierte Antikörper relativ niedriger Affinität, die dennoch in der initialen protektiven Immunität im Rahmen von Infektionen von physiologischer Bedeutung sind (MacLennan et al. 2003). Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die spezifische immungenetische Prädisposition der RA sowie lokale Besonderheiten des synovialen Kompartimentes auch eine extrafollikuläre Affinitätsreifung der Autoantikörperantwort mit der Ausdifferenzierung langlebiger Plasmazellen begünstigen könnten. So konnte paradigmatisch in komplexen Studien der Autoantikörperantwort mit Rheumafaktor (RF)-Spezifität in RF-transgenen *MLR/lpr* Mäusen gezeigt werden, dass die den transgenen Autoantikörper exprimierenden B-

Zellen in der Milz im Grenzbereich von T-Zellzone und roter Pulpa d.h. außerhalb des Keimzentrums proliferieren und in dieser Lokalisation aufgrund der Ergebnisse von Ig-V Gen-Analysen nach Mikrodissektion eine hohe Rate somatischer Mutationen aufweisen (William et al. 2002; Shlomchik et al. 2003). Diese Studien belegen somit, dass die Generation somatischer Hypermutationen in den Ig-Genen nicht restriktiv auf die Keimzentrumsreaktion limitiert ist, sondern sich in einem zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen prädisponierten Organismus unter chronischem Antigenstimulus bei verfügbarer T-Zell Hilfe auch außerhalb von Lymphfollikelstrukturen vollziehen kann. In der Konsequenz impliziert die extrafollikuläre B-Zell Reifung damit eine Umgehung der natürlichen Zensur im Keimzentrum mit potenzieller Bedeutung für den Verlust immunologischer Selbsttoleranz.

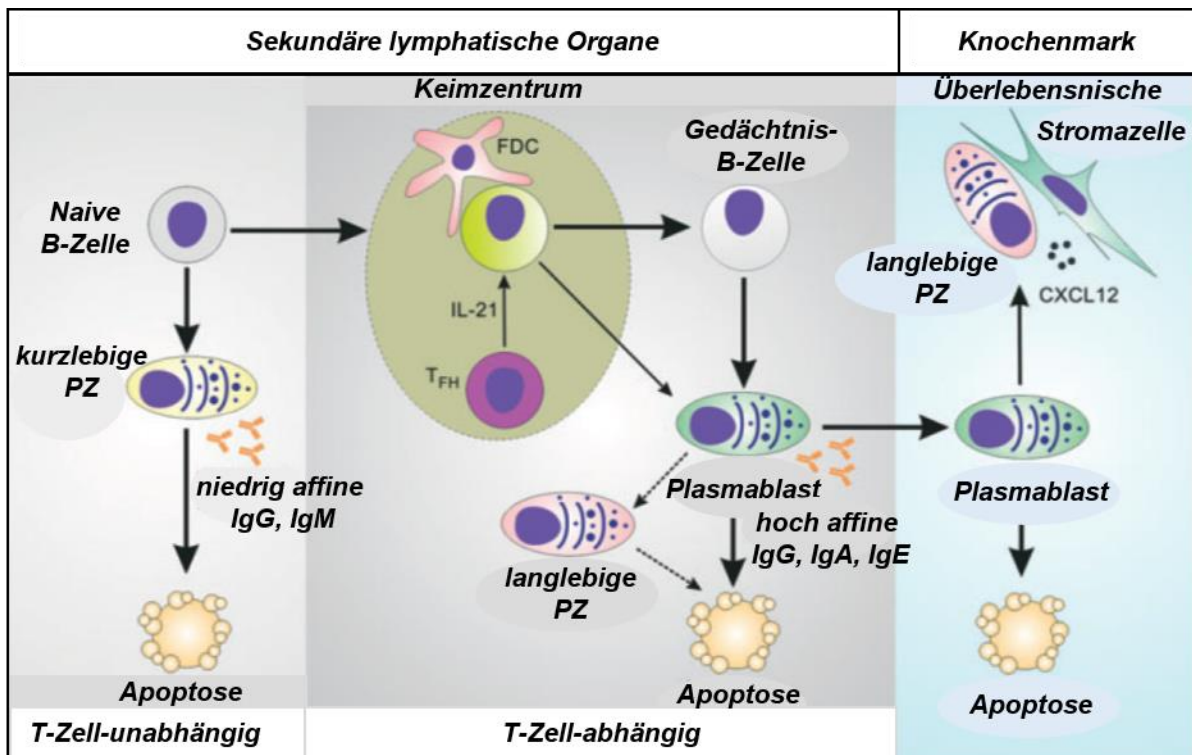


Abb. 5.2: Bildung von kurzlebigen und langlebigen Plasmazellen. B-Zellen, die mit einem Antigen in Kontakt kommen, proliferieren und können direkt in kurzlebige Plasmazellen differenzieren, die unmutierte IgM oder IgG Antikörper mit niedriger Affinität sezernieren. Die Ausdifferenzierung von Gedächtnis B-Zellen ist T-Zell-abhängig und benötigt die Bildung eines Keimzentrums im sekundären lymphoiden Gewebe. Plasmablasten migrieren ins Knochenmark, wo sie mit Hilfe von CXCL12 (CXC-Motiv-Chemokin 12, auch *stromal cell-derived factor 1*) exprimierenden Stromazellen zu langlebigen Plasmazellen ausdifferenzieren. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Chu & Berek 2013).

5.6 Präferentielle V-Genverwendung von CIIC1-Epitop-spezifischen synovialen Plasmazellen und peripherer B-Zellen

Die Detektion von CIIC1-Epitop-spezifischen Plasmazellen in der inflammatorischen Synovialmembran von Patienten mit rheumatoider Arthritis in dieser Arbeit führte zu der Frage nach einer präferentiellen V-Genverwendung. Sequenzanalysen der variablen Region von leichter und schwerer Antikörperkette dieser CIIC1-Epitop-spezifischen Zellen können Aufschluss über mögliche somatische Hypermutationen und somit Hinweise auf eine Antigen selektierte Affinitätsreifung geben.

Zu diesem Zweck wurden zum einen CII-spezifische Plasmazellen aus der inflammatorischen Synovialmembran mittels Laser-Mikrodissektion und zum anderen CII-spezifische B-Zellen aus dem peripheren Blut von RA-Patienten mittels FACS-Analyse isoliert. Die Analyse der amplifizierten V λ -Gene aus CIIC1-Epitop-spezifischen synovialen Plasmazellen zeigte bereits eine präferentielle V-Gen Verwendung. Dieser Befund wurde durch die Amplifikation von V λ -Genen identischer Untergruppen aus peripherer CIIC1-Epitop-spezifisch markierten B-Zellen bestätigt. Somit ist es in der aktuellen Studie gelungen sowohl aus der Peripherie als auch aus dem lokal entzündeten Gewebekompartiment der Synovialis von RA-Patienten B- bzw. Plasmazellen mit der gleichen V-Gen Verwendung zu isolieren. Die Detektion von keimbahnkodierten V-Genen belegt, dass die humorale Immunität gegen das arthritogene CIIC1-Epitop bereits in den Keimbahngenen angelegt und durch die zentralen Toleranzmechanismen nicht negativ selektioniert ist.

Zu den aktuellen Studien der humanen Autoantikörperantwort gegen CII liegen V-Gen Analysen von CII-reaktiven B-Zellen Hybridomen aus dem murinen CIA Modell vor, die im Rahmen der primären und sekundären Immunantwort nach CII-Immunisierung etabliert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die variable Region der IgG Antikörper der Erstantwort, die gegen das immundominante C1-Epitop auf CII gerichtet sind mit der Keimbahnsequenz übereinstimmen (Mo & Holmdahl 1996; Mo et al. 1993). Kristallstrukturanalysen der Bindung zwischen dem arthritogenen, somatisch-mutierten CIIC1-Antikörper aus der Sekundärantwort und dem tripelhelikalem C1-Epitop auf CII demonstrieren, dass die an der Antigenerkennung kritisch beteiligten Aminosäurereste der CDR-Regionen in Keimbahnkonfiguration vorliegen (Dobritsch et al. 2011).

Während die V-Region der CII-Antikörper in der Primärantwort der Keimbahnkodierung entspricht, konnten in der CII-spezifischen murinen Sekundärantwort somatische Hypermutationen in den V-Genen detektiert werden. Diese Sequenzveränderungen waren u.a. auch mit einer Verlagerung der Epitopspezifität (*epitope shift*) bzw. der Kreuzreaktivität mit anderen Epitopen auf dem gleichen Antigen CII verbunden. Diese Modifikationen der CII-Epitoperkennung durch somatischen Mutation ist mit einer erhöhten Pathogenität der humoralen CII Autoimmunität verbunden (Mo & Holmdahl 1996). Im Verlauf chronischer Autoimmunerkrankungen ist das sogenannte „*epitope spreading*“ ein bekanntes Phänomen der Diversifizierung der Antigenerkennung, bei dem sich die initiale Immunantwort gegen ein oder wenige autoantigene Determinanten in Folge der immunmedierten Gewebedestruktion nachfolgend auch gegen besser zugänglich gewordene oder im Rahmen enzymatischer Umbauprozesse modifizierte Neoepitope auf den ursprünglichen oder anderen Antigenen richtet. So konnte für die Autoantikörperantwort gegen citrullinierte Peptide im Serum von RA-Patienten entsprechend das Phänomen des „*epitope spreading*“ bereits vor Krankheitsausbruch nachgewiesen werden (van der Woude et al. 2010), allerdings in diesem Falle ohne Evidenz einer pathogenetischen Bedeutung.

Neben den keimbahnkodierten Sequenzen in CIIC1 markierten peripheren B-Zellen konnten darüber hinaus in dieser Arbeit auch Amplifikate aus synovialen CIIC1-Epitop-spezifisch gefärbten Plasmazellen gewonnen werden, die somatische Hypermutationen ihrer Ig-Gene aufwiesen. Die Identifikation von Mutationsraten von 10,6% bzw. 9,7% (25 bzw. 24 Mutationen), vor allem die Austauschmutationen in den antigenbindenden Bereichen, spricht für einen Antigen-abhängigen Prozess der Affinitätsreifung. Während naive B-Zellen lediglich eine geringe Mutationsrate von 0,3% in der für die Antigenbindung entscheidenden variablen Region aufweisen (Klein et al. 1993), beträgt die Mutationsrate der mit einem Antigen in Kontakt stehenden oder gestandenen klassengewechselten Gedächtnis-B-Zelle 4% (ca. 12 Mutationen) (Klein et al. 1997). Die bisherigen limitierten Datensätze lassen auf eine antigenspezifische Affinitätsreifung der Autoantikörperantwort gegen CIIC1 in der entzündlich veränderten Synovialmembran von RA-Patienten schließen, ohne die Alternativhypothese einer Immigration extraartikulär durch Antigen-Selektion gereifter Plasma-Zellen ausschließen zu können. Die hohe Rate somatischer Hypermutationen verweist auf eine erfolgte T-Zell-Hilfe. Da keine CIIC1-Epitop-

spezifischen B-Zellen innerhalb der ektopen Keimzentrumsstrukturen in der Synovialmembran nachgewiesen werden konnten, liefert die aktuelle Studie keine Belege für eine Rolle dieser Lymphfollikel-ähnlichen Formationen in der Affinitätsreifung der CII1-spezifischen Autoantikörperantwort.

5.7 Ausblick

Zukünftig sind auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit aufbauende weitere Studien erforderlich, um die lokalen Autoimmunprozesse im Gelenkkompartiment und den Beitrag der humoralen Autoimmunität gegen CII besser zu verstehen. Nach Optimierung der Isolation von CII-spezifischen Zellen sowohl aus dem peripheren Blut als auch aus dem Synovialgewebe von RA-Patienten mittels FACS-Analyse, sind jetzt systematische Analysen CII-spezifischer Zellen aus dem Primärmaterial weiterer RA-Patienten unter Berücksichtigung bisher noch nicht analysierter arthritogener CII-Epitope essentiell. Eine optimierte Untersuchung von Zellen aus den Biomaterialien einer größeren RA-Kohorte sollte die statistische Auswertung der präferentiellen V-Genverwendung für die CII-Autoantigenerkennung auch unter Berücksichtigung eines erweiterten Epitopspektrums ermöglichen. Von besonderem Interesse wird die zukünftige Isolation von CII-spezifischen B- und Plasmazellen, die das citrullinierte C1-Epitop binden, sein. In der Sequenz des synthetisch hergestellten tripelhelikalen Peptids sind die beiden Argininreste durch die nicht-proteinogene Aminosäure Citrullin ausgetauscht (A **Cit** G L T G **Cit** P G D A). Die V-Genanalyse, insbesondere der Vergleich somatischer Mutationen in den CDRs von Zellen, die das unmodifizierte mit denen, die das citrullinierte C1-Epitop binden, sollen Aufschluss über die spezifische Antikörpererkennung der posttranslationalen CII-Modifikation geben.

Neben den in dieser Arbeit gezeigten präliminären ELISA-Daten zur Validierung der chimären rekombinant exprimierten CII1-Epitop-spezifischen Antikörper bedarf es zukünftig noch intensiverer Analysen weiterer eukaryotisch exprimierter Antikörper. So sind Affinitätsbestimmungen der rekombinanten Antikörper inkl. der Analysen funktioneller Auswirkungen von Rückmutationen in die Keimbahnkonfiguration in Positionen mit Aminosäureaustauschen erforderlich, um die antigenspezifische Affinitätsreifung durch Hypermutation zu belegen. Exemplarisch ist vorgesehen einige ausgewählte humane Antikörper im Komplex mit den von ihnen gebundenen tripelhelikalen Kollagenpeptiden zu kristallisieren für die vergleichende Analyse mit

analogen bereits verfügbaren Daten muriner Antikörper, um besser die molekulare Basis der Erkennung von CII als Autoantigen zu verstehen. Das arthritogene Potential der rekombinant als chimäre Moleküle mit murinen FC- und humanen CII-spezifischen FAB-Domänen hergestellten Antikörper soll in murinen Antikörper-transferexperimenten in Kooperation mit Prof. Rikard Holmdahl (Karolinska Institut, Schweden) erfolgen.

Fernziel des Projektes ist die Entwicklung einer auf der CII-Antigen- bzw. Epitopspezifität beruhenden immunmodularischen Therapie der RA.

III. Literaturverzeichnis

- Aasland, D. et al., 2002. The upper cytokine-binding module and the Ig-like domain of the leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor are sufficient for a functional LIF receptor complex. *Journal of molecular biology*, 315(4), pp.637–46.
- Aigner, T. et al., 2007. Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis--structure, chaos and senescence. *Nature clinical practice. Rheumatology*, 3(7), pp.391–9.
- Aigner, T. & Stöve, J., 2003. Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Advanced drug delivery reviews*, 55(12), pp.1569–93.
- Aletaha, D. et al., 2010. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and rheumatism*, 62(9), pp.2569–81.
- Aletaha, D., Smolen, J. & Ward, M.M., 2006. Measuring function in rheumatoid arthritis: Identifying reversible and irreversible components. *Arthritis and rheumatism*, 54(9), pp.2784–92.
- Amirahmadi, S.F. et al., 2005. Arthritogenic anti-type II collagen antibodies are pathogenic for cartilage-derived chondrocytes independent of inflammatory cells. *Arthritis and rheumatism*, 52(6), pp.1897–906.
- Asaga, H. et al., 2001. Immunocytochemical localization of peptidylarginine deiminase in human eosinophils and neutrophils. *Journal of leukocyte biology*, 70(1), pp.46–51.
- Astsaturou, I.A. et al., 1996. Differential expression of B29 (CD79b) and mb-1 (CD79a) proteins in acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*, 10(5), pp.769–73.
- Avouac, J., Gossec, L. & Dougados, M., 2006. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Annals of the rheumatic diseases*, 65(7), pp.845–51.
- Bäcklund, J. et al., 2002. Predominant selection of T cells specific for the glycosylated collagen type II epitope (263-270) in humanized transgenic mice and in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(15), pp.9960–5.
- Van Beers, J.J.B.C. et al., 2012. Anti-citrullinated fibronectin antibodies in rheumatoid arthritis are associated with human leukocyte antigen-DRB1 shared epitope alleles. *Arthritis research & therapy*, 14(1), p.R35.
- Berek, C., 2005. [Do B cells play an important role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis?]. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 64(6), pp.383–8.
- Berek, C., Berger, A. & Apel, M., 1991. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*, 67(6), pp.1121–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1760840> [Accessed July 12, 2014].
- Berek, C. & Kim, H.J., 1997. B-cell activation and development within chronically inflamed synovium in rheumatoid and reactive arthritis. *Seminars in immunology*, 9(4), pp.261–8.

- Boggon, T.J. & Eck, M.J., 2004. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene*, 23(48), pp.7918–27.
- Böhm, B. et al., 2010. ADAM15 exerts an antiapoptotic effect on osteoarthritic chondrocytes via up-regulation of the X-linked inhibitor of apoptosis. *Arthritis and rheumatism*, 62(5), pp.1372–82.
- Boulanger, M.J. et al., 2003. Convergent mechanisms for recognition of divergent cytokines by the shared signaling receptor gp130. *Molecular cell*, 12(3), pp.577–89.
- Brennan, F.M. & McInnes, I.B., 2008. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation*, 118(11), pp.3537–45.
- Burkhardt, H. et al., 2006. Association between protein tyrosine phosphatase 22 variant R620W in conjunction with the HLA-DRB1 shared epitope and humoral autoimmunity to an immunodominant epitope of cartilage-specific type II collagen in early rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 54(1), pp.82–9.
- Burkhardt, H. et al., 2002. Epitope-specific recognition of type II collagen by rheumatoid arthritis antibodies is shared with recognition by antibodies that are arthritogenic in collagen-induced arthritis in the mouse. *Arthritis and rheumatism*, 46(9), pp.2339–48.
- Burkhardt, H. et al., 2005. Humoral immune response to citrullinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis. *European journal of immunology*, 35(5), pp.1643–52.
- Burr, M.L. et al., 2010. PADI4 genotype is not associated with rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian population. *Annals of the rheumatic diseases*, 69(4), pp.666–70.
- Bursell, L. et al., 2007. Src kinase inhibition promotes the chondrocyte phenotype. *Arthritis research & therapy*, 9(5), p.R105.
- Burska, A.N. et al., 2014. Autoantibodies to posttranslational modifications in rheumatoid arthritis. *Mediators of inflammation*, 2014, p.492873.
- Caspi, D. et al., 2006. Synovial fluid levels of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and IgA rheumatoid factor in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*, 55(1), pp.53–6.
- Chu, V.T. & Berek, C., 2013. The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunological reviews*, 251(1), pp.177–88.
- Cook, A.D. et al., 2004. Antibodies against the CB10 fragment of type II collagen in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, 6(5), pp.R477–83.
- Cook, A.D. et al., 1994. Specificity of antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*, 21(7), pp.1186–91.
- Crombie, D.E. et al., 2005. Destructive effects of murine arthritogenic antibodies to type II collagen on cartilage explants in vitro. *Arthritis research & therapy*, 7(5), pp.R927–37.
- Darrah, E. et al., 2012. Peptidylarginine deiminase 2, 3 and 4 have distinct specificities against cellular substrates: novel insights into autoantigen selection in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 71(1), pp.92–8.
- Dechanet, J. et al., 1995. The ability of synoviocytes to support terminal differentiation of activated B cells may explain plasma cell accumulation in rheumatoid synovium. *The Journal of clinical investigation*, 95(2), pp.456–63.

- Dessen, A. et al., 1997. X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) complexed with a peptide from human collagen II. *Immunity*, 7(4), pp.473–81.
- Dobritzsch, D. et al., 2011. Crystal structure of an arthritogenic anticollagen immune complex. *Arthritis and rheumatism*, 63(12), pp.3740–8.
- Firestein, G.S., 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423(6937), pp.356–61.
- Foulquier, C. et al., 2007. 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 and rheumatism*, 56(11), pp.3541–53.
- Gay, S., Gay, R.E. & Koopman, W.J., 1993. Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Annals of the rheumatic diseases*, 52 Suppl 1, pp.S39–47.
- Gregersen, P.K., Silver, J. & Winchester, R.J., 1987. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 30(11), pp.1205–13.
- Haag, S. et al., 2014. Mass spectrometric analysis of citrullinated type II collagen reveals new citrulline-specific autoantibodies, which bind to human arthritic cartilage. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*.
- Hammacher, A. et al., 1998. The immunoglobulin-like module of gp130 is required for signaling by interleukin-6, but not by leukemia inhibitory factor. *The Journal of biological chemistry*, 273(35), pp.22701–7.
- Hawtree, S., Muthana, M. & Wilson, A.G., 2013. The role of histone deacetylases in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Biochemical Society transactions*, 41(3), pp.783–8.
- He, W. et al., 2002. Membrane distal cytokine binding domain of LIFR interacts with soluble CNTFR in vitro. *FEBS letters*, 514(2-3), pp.214–8.
- He, W. et al., 2005. The N-terminal cytokine binding domain of LIFR is required for CNTF binding and signaling. *FEBS letters*, 579(20), pp.4317–23.
- Heinrich, P.C. et al., 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical journal*, 334 (Pt 2, pp.297–314.
- Hietala, M.A. et al., 2004. Complement activation by both classical and alternative pathways is critical for the effector phase of arthritis. *European journal of immunology*, 34(4), pp.1208–16.
- Holmdahl, R. et al., 1989. Origin of the autoreactive anti-type II collagen response. II. Specificities, antibody isotypes and usage of V gene families of anti-type II collagen B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 142(6), pp.1881–6.
- Holmdahl, R. et al., 1990. Type II collagen autoimmunity in animals and provocations leading to arthritis. *Immunological reviews*, 118, pp.193–232.].
- Honjo, T., Kinoshita, K. & Muramatsu, M., 2002. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annual review of immunology*, 20, pp.165–96.
- Hui, W. et al., 1998. Modulation of cartilage proteoglycan metabolism by LIF binding protein. *Cytokine*, 10(3), pp.220–6.
- Humby, F. et al., 2009. Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium. *PLoS medicine*, 6(1), p.e1.

- Huyton, T. et al., 2007. An unusual cytokine:Ig-domain interaction revealed in the crystal structure of leukemia inhibitory factor (LIF) in complex with the LIF receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(31), pp.12737–42.
- Imada, K. & Leonard, W.J., 2000. The Jak-STAT pathway. *Molecular Immunology*, 37(1-2), pp.1–11.
- Imboden, J.B., 2009. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annual review of pathology*, 4, pp.417–34.
- Janeway, C.A. et al., 2001. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* 5th editio., New York: Garland Science.
- Keyszer, G. et al., 1998. Differential expression of cathepsins B and L compared with matrix metalloproteinases and their respective inhibitors in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a parallel investigation by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction . *Arthritis and rheumatism*, 41(8), pp.1378–87.
- Kim, H.J. et al., 1999. Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(5), pp.3053–62.
- Kim, H.J. & Berek, C., 2000. B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis research*, 2(2), pp.126–31.
- Kinloch, A. et al., 2008. Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 58(8), pp.2287–95.
- Klein, U., Küppers, R. & Rajewsky, K., 1997. Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood*, 89(4), pp.1288–98.
- Klein, U., Küppers, R. & Rajewsky, K., 1993. Human IgM+IgD+ B cells, the major B cell subset in the peripheral blood, express V kappa genes with no or little somatic mutation throughout life. *European journal of immunology*, 23(12), pp.3272–7.
- Konttinen, Y.T. et al., 1999. Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 58(11), pp.691–7.
- Kraetsch, H.G. et al., 2001. Cartilage-specific autoimmunity in rheumatoid arthritis: characterization of a triple helical B cell epitope in the integrin-binding-domain of collagen type II. *European journal of immunology*, 31(6), pp.1666–73.
- Kroot, E.J. et al., 2000. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 43(8), pp.1831–5.
- Küppers, R., 2005. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nature reviews. Cancer*, 5(4), pp.251–62.
- Küppers, R., Schneider, M. & Hansmann, M.-L., 2013. Laser-based microdissection of single cells from tissue sections and PCR analysis of rearranged immunoglobulin genes from isolated normal and malignant human B cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 971, pp.49–63.
- Kurth, I. et al., 2000. Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(1), pp.273–82.

- Lindhout, E. et al., 1999. Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients have intrinsic properties of follicular dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(10), pp.5949–56.
- Liu, Y.J. et al., 1989. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature*, 342(6252), pp.929–31.
- Van de Loo, F.A., Arntz, O.J. & Van den Berg, W.B., 1997. Effect of interleukin 1 and leukaemia inhibitory factor on chondrocyte metabolism in articular cartilage from normal and interleukin-6-deficient mice: role of nitric oxide and IL-6 in the suppression of proteoglycan synthesis. *Cytokine*, 9(7), pp.453–62.
- Lorenz, H.-M., 2012. [Rheumatoid arthritis: diagnostics and therapy 2012]. *Der Orthopäde*, 41(7), pp.514–9.
- Lundberg, K. et al., 2008. Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis and rheumatism*, 58(10), pp.3009–19.
- Lundberg, K. et al., 2013. Genetic and environmental determinants for disease risk in subsets of rheumatoid arthritis defined by the anticitrullinated protein/peptide antibody fine specificity profile. *Annals of the rheumatic diseases*, 72(5), pp.652–8.
- MacLennan, I.C.M. et al., 2003. Extrafollicular antibody responses. *Immunological reviews*, 194, pp.8–18.
- Magalhães, R. et al., 2002. Morphological and molecular pathology of the B cell response in synovitis of rheumatoid arthritis. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 441(5), pp.415–27.
- Manz, R.A., Thiel, A. & Radbruch, A., 1997. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature*, 388(6638), pp.133–4.
- Martinez-Gamboa, L. et al., 2006. Immunopathologic role of B lymphocytes in rheumatoid arthritis: rationale of B cell-directed therapy. *Autoimmunity reviews*, 5(7), pp.437–42.
- Masson-Bessière, C. et al., 2000. In the rheumatoid pannus, anti-filaggrin autoantibodies are produced by local plasma cells and constitute a higher proportion of IgG than in synovial fluid and serum. *Clinical and experimental immunology*, 119(3), pp.544–52.
- Masson-Bessière, C. et al., 2001. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(6), pp.4177–84.
- Mathsson, L. et al., 2008. Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis and rheumatism*, 58(1), pp.36–45.
- McInnes, I.B. & Schett, G., 2011. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*, 365(23), pp.2205–19.
- Mellors, R.C. et al., 1961. Rheumatoid factor and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The Journal of experimental medicine*, 113, pp.475–84.
- Minaur, N.J. et al., 2004. Outcome after 40 years with rheumatoid arthritis: a prospective study of function, disease activity, and mortality. *The Journal of rheumatology. Supplement*, 69, pp.3–8.

- Mo, J.A., Bona, C.A. & Holmdahl, R., 1993. Variable region gene selection of immunoglobulin G-expressing B cells with specificity for a defined epitope on type II collagen. *European journal of immunology*, 23(10), pp.2503–10.
- Mo, J.A. & Holmdahl, R., 1996. The B cell response to autologous type II collagen: biased V gene repertoire with V gene sharing and epitope shift. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 157(6), pp.2440–8.
- Morgan, K. et al., 1987. Incidence of antibodies to native and denatured cartilage collagens (types II, IX, and XI) and to type I collagen in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 46(12), pp.902–7.
- Nachat, R. et al., 2005. Peptidylarginine deiminase isoforms 1-3 are expressed in the epidermis and involved in the deimination of K1 and filaggrin. *The Journal of investigative dermatology*, 124(2), pp.384–93.
- Nandakumar, K.S. et al., 2008. Arthritogenic antibodies specific for a major type II collagen triple-helical epitope bind and destabilize cartilage independent of inflammation. *Arthritis and rheumatism*, 58(1), pp.184–96.
- Nandakumar, K.S., 2010. Pathogenic antibody recognition of cartilage. *Cell and tissue research*, 339(1), pp.213–20.
- Nandakumar, K.S. & Holmdahl, R., 2005. Efficient promotion of collagen antibody induced arthritis (CAIA) using four monoclonal antibodies specific for the major epitopes recognized in both collagen induced arthritis and rheumatoid arthritis. *Journal of immunological methods*, 304(1-2), pp.126–36.
- Nandakumar, K.S., Svensson, L. & Holmdahl, R., 2003. Collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice: description of the disease and the influence of age, sex, and genes. *The American journal of pathology*, 163(5), pp.1827–37.
- Nell, V.P.K. et al., 2005. Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 64(12), pp.1731–6.
- Nishimura, K., 2007. Meta-analysis: Diagnostic Accuracy of Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody and Rheumatoid Factor for Rheumatoid Arthritis. *Annals of Internal Medicine*, 146(11), p.797.
- Okroj, M. et al., 2007. Rheumatoid arthritis and the complement system. *Annals of medicine*, 39(7), pp.517–30.
- Owczarek, C.M. et al., 1997. The unusual species cross-reactivity of the leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain is determined primarily by the immunoglobulin-like domain. *The Journal of biological chemistry*, 272(38), pp.23976–85.
- Pruijn, G.J., Wiik, A. & van Venrooij, W.J., 2010. The use of citrullinated peptides and proteins for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, 12(1), p.203.
- Raijmakers, R. et al., 2007. Methylation of arginine residues interferes with citrullination by peptidylarginine deiminases in vitro. *Journal of molecular biology*, 367(4), pp.1118–29.
- Randen, I. et al., 1995. The identification of germinal centres and follicular dendritic cell networks in rheumatoid synovial tissue. *Scandinavian journal of immunology*, 41(5), pp.481–6.
- Rantapää-Dahlqvist, S. et al., 2003. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 48(10), pp.2741–9.

- Regan, E. et al., 2005. Extracellular superoxide dismutase and oxidant damage in osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*, 52(11), pp.3479–91.
- Roskoski, R., 2004. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochemical and biophysical research communications*, 324(4), pp.1155–64.
- Rosloniec, E.F. et al., 2002. HLA-DR1 (DRB1*0101) and DR4 (DRB1*0401) use the same anchor residues for binding an immunodominant peptide derived from human type II collagen. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(1), pp.253–9.
- Rowan, A.D. et al., 2001. Synergistic effects of glycoprotein 130 binding cytokines in combination with interleukin-1 on cartilage collagen breakdown. *Arthritis and rheumatism*, 44(7), pp.1620–32.
- Rowley, M.J. et al., 1992. Epitope specificity of antibodies to type II collagen in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology international*, 12(2), pp.65–9.
- Rowley, M.J., Nandakumar, K.S. & Holmdahl, R., 2008. The role of collagen antibodies in mediating arthritis. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*, 18(5), pp.429–41.
- Rudolphi, U. et al., 1997. The B cell repertoire of patients with rheumatoid arthritis. II. Increased frequencies of IgG+ and IgA+ B cells specific for mycobacterial heat-shock protein 60 or human type II collagen in synovial fluid and tissue. *Arthritis and rheumatism*, 40(8), pp.1409–19.
- Sambandam, T. et al., 2004. Increased peptidylarginine deiminase type II in hypoxic astrocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 325(4), pp.1324–9.
- Schellekens, G.A. et al., 1998. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *The Journal of clinical investigation*, 101(1), pp.273–81.
- Schellekens, G.A. et al., 2000. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis and rheumatism*, 43(1), pp.155–63.
- Schröder, A.E. et al., 1996. Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(1), pp.221–5.
- Schröder, A.E., Sieper, J. & Berek, C., 1997. Antigen-dependent B cell differentiation in the synovial tissue of a patient with reactive arthritis. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 3(4), pp.260–72.
- Schulte, S., 1998. Arthritis-related B Cell Epitopes in Collagen II Are Conformation-dependent and Sterically Privileged in Accessible Sites of Cartilage Collagen Fibrils. *Journal of Biological Chemistry*, 273(3), pp.1551–1561.
- Schulte, S. et al., 1998. Arthritis-related B cell epitopes in collagen II are conformation-dependent and sterically privileged in accessible sites of cartilage collagen fibrils. *The Journal of biological chemistry*, 273(3), pp.1551–61.
- Schwab, B.L. et al., 2002. Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis. *Cell death and differentiation*, 9(8), pp.818–31.
- Seemayer, C.A. et al., 2001. [Rheumatoid arthritis: new developments in the pathogenesis with special reference to synovial fibroblasts]. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 60(5), pp.309–18.
- Sharma, P. et al., 2012. Citrullination of histone H3 interferes with HP1-mediated transcriptional repression. *PLoS genetics*, 8(9), p.e1002934.

- Shlomchik, M.J. et al., 2003. Activation of rheumatoid factor (RF) B cells and somatic hypermutation outside of germinal centers in autoimmune-prone MRL/lpr mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 987, pp.38–50.
- Smith, C.A. & Arnett, F.C., 1991. Epidemiologic aspects of rheumatoid arthritis. Current immunogenetic approach. *Clinical orthopaedics and related research*, (265), pp.23–35.
- Söder, S. & Aigner, T., 2011. [Osteoarthritis. Etiology, typing, staging and histological grading]. *Der Pathologe*, 32(3), pp.183–92.
- Van de Stadt, L.A. et al., 2011. Development of the anti-citrullinated protein antibody repertoire prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 63(11), pp.3226–33.
- Stastny, P., 1978. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*, 298(16), pp.869–71.
- Strand, V., Kimberly, R. & Isaacs, J.D., 2007. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nature reviews. Drug discovery*, 6(1), pp.75–92.
- Suzuki, a., Yamada, R. & Yamamoto, K., 2007. Citrullination by Peptidylarginine Deiminase in Rheumatoid Arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1108(1), pp.323–339.
- Suzuki, A. et al., 2003. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nature genetics*, 34(4), pp.395–402.
- Symmons, D.P.M., 2002. Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best practice & research. Clinical rheumatology*, 16(5), pp.707–22.
- Tarkowski, A. et al., 1989. Secretion of antibodies to types I and II collagen by synovial tissue cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 32(9), pp.1087–92.
- Tatosyan, a G. & Mizenina, Q. a, 2000. Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochemistry. Biokhimiia*, 65(1), pp.49–58.
- Terato, K. et al., 1990. Specificity of antibodies to type II collagen in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 33(10), pp.1493–500.
- Terato, K. et al., 1996. The mechanism of autoantibody formation to cartilage in rheumatoid arthritis: possible cross-reaction of antibodies to dietary collagens with autologous type II collagen. *Clinical immunology and immunopathology*, 79(2), pp.142–54.
- Thomas, C., 2004. *Histopathologie kompakt: Kursbuch der allgemeinen und speziellen Histopathologie*, Schattauer Verlag.
- Tonegawa, S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 302(5909), pp.575–81.
- Tsubaki, T. et al., 2005. Accumulation of plasma cells expressing CXCR3 in the synovial sublining regions of early rheumatoid arthritis in association with production of Mig/CXCL9 by synovial fibroblasts. *Clinical and experimental immunology*, 141(2), pp.363–71.
- Uysal, H. et al., 2010. Antibodies to citrullinated proteins: molecular interactions and arthritogenicity. *Immunological reviews*, 233(1), pp.9–33.
- Uysal, H. et al., 2009. Structure and pathogenicity of antibodies specific for citrullinated collagen type II in experimental arthritis. *The Journal of experimental medicine*, 206(2), pp.449–62.

- Van Venrooij, W.J., van Beers, J.J.B.C. & Pruijn, G.J.M., 2011. Anti-CCP antibodies: the past, the present and the future. *Nature reviews. Rheumatology*, 7(7), pp.391–8.
- Van Venrooij, W.J., Hazes, J.M. & Visser, H., 2002. Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. *The Netherlands journal of medicine*, 60(10), pp.383–8.
- Voisin, M.-B. et al., 2002. Separate functions for the two modules of the membrane-proximal cytokine binding domain of glycoprotein 190, the leukemia inhibitory factor low affinity receptor, in ligand binding and receptor activation. *The Journal of biological chemistry*, 277(16), pp.13682–92.
- Vossenaar, E.R. et al., 2004. Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Annals of the rheumatic diseases*, 63(4), pp.373–81.
- Vossenaar, E.R. et al., 2003. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 25(11), pp.1106–18.
- Vossenaar, E.R. et al., 2004. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis research & therapy*, 6(2), pp.R142–50.
- Wang, Y. et al., 2004. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminium. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5694), pp.279–83.
- Wernhoff, P. et al., 2001. Identification of conformation-dependent epitopes and V gene selection in the B cell response to type II collagen in the DA rat. *International immunology*, 13(7), pp.909–19.
- Weyand, C.M. et al., 2000. Cell-cell interactions in synovitis. Interactions between T cells and B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis research*, 2(6), pp.457–63.
- William, J. et al., 2002. Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5589), pp.2066–70.
- Winter, O. et al., 2012. Pathogenic long-lived plasma cells and their survival niches in autoimmunity, malignancy, and allergy. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(11), pp.5105–11.
- Van der Woude, D. et al., 2010. Epitope spreading of the anti-citrullinated protein antibody response occurs before disease onset and is associated with the disease course of early arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 69(8), pp.1554–61.
- Wright, P.W. et al., 2003. ePAD, an oocyte and early embryo-abundant peptidylarginine deiminase-like protein that localizes to egg cytoplasmic sheets. *Developmental biology*, 256(1), pp.73–88.
- Yamada, R. et al., 2005. Citrullinated Proteins in Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in Bioscience* 10, pp.54–56.
- Yoshida, M. et al., 2006. Autoimmunity to citrullinated type II collagen in rheumatoid arthritis. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*, 16(5), pp.276–81.
- Zuscik, M.J. et al., 2008. Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *The Journal of clinical investigation*, 118(2), pp.429–38.

IV. Abkürzungsverzeichnis

ACPA	<i>Anti-Citrullinated Peptides Antibody</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAIA	<i>Collagen-Antibody Induced Arthritis</i>
CD	<i>Clusters of differentiation</i>
CDR	<i>Complementarity Determining Region</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CIA	<i>Collagen Induced Arthritis</i>
CII	Kollagen Typ II
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FITC	Fluoreszinsocyanat
For	<i>Forward</i>
FR	<i>Framework Region</i>
kDa	Kilodalton
M	Molar
m	Milli
n	Nano
OA	Osteoarthrose
PAD	Peptidylarginin-Deiminase
PE	Phycoerytrin
RA	Rheumatoide Arthritis
Rev	<i>Revers</i>
RT	Reverse Transkriptase
SHM	Somatische Hypermutation
UpM	Umdrehungen pro Minute
VH	Variable Antikörperregion der schweren Kette
V κ	Variable Antikörperregion der leichten κ -Kette
V λ	Variable Antikörperregion der leichten λ -Kette
μ	Mikro
LMD	Laser-Mikrodissektion
LIF	<i>Leukemia-Inhibitory Factor</i>
LIF-R	LIF-Rezeptor

V. Publikationen und Kongressbeiträge

Nadine Schneider, Beate Böhm, Harald Burkhardt. *Cross-reactivity of an arthritogenic anti-Collagen type II mAB with the ligand binding domain of Leukemia-Inhibitory-Factor (LIF) receptor.*

Posterpreis – 39. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), **September 2011, München**

Sabrina Haag, **Nadine Schneider**, Daniel E. Mason, Jonatan Tuncel, Ida E. Andersson, Erik C. Peters, Harald Burkhardt, Rikard Holmdahl. *Mass spectrometric analysis of citrullinated type II collagen reveals new citrulline-specific autoantibodies, which bind to human arthritic cartilage.* **Arthritis & Rheumatology**, doi:10.1002/art.38383, **Januar 2014**

VI. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Forschungsabteilung der Rheumatologie in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Harald Burkhardt am Universitätsklinikum Frankfurt der Goethe-Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Harald Burkhardt für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, hervorragender Arbeitsbedingungen und sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit, welche durch seine wertvollen Ratschläge und guten Ideen immer vorangetrieben wurde.

Frau Prof. Anna Starzinski-Powitz danke ich für die Bereitschaft diese Arbeit seitens des Fachbereichs für Biowissenschaften an der Goethe-Universität Frankfurt zu betreuen.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Rikard Holmdahl und seinen Mitarbeitern am Karolinska Institut in Stockholm für die Bereitstellung der CII-Peptide und der monoklonalen CII-Antikörper bedanken. Mein besonderer Dank gilt hierbei Sabrina Haag, die für mich immer ansprechbar und offen für Fragen sowie neue Ideen war.

Für die konstruktive Betreuung im Labor möchte ich mich bei Frau Dr. Beate Böhm sehr herzlich bedanken, die mit steten Optimismus und Ideenreichtum ihren wertvollen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat. Zudem danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Dorothee Fried, Verena Dresing, Kristin Krause und Tatjana Scholz, für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Martin-Leo Hansmann für die Möglichkeit zur Zellisolation am Senckenbergischen Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Frankfurt mittels Laser-Mikrodissektion. Dabei danke ich besonders den Mitarbeitern der Pathologie, Ekaterini Hadzoglou, Sabine Albrecht, Dr. Silvia Hartmann, Dr. Nora Hinsch und Ralf Lieberz, die mir diese Experimente ermöglicht haben.

Für die Bereitstellung humaner Biomaterialien danke ich ganz herzlich Herrn Prof. Stefan Rehart (AgarpleSION Markus-Krankenhaus, Frankfurt), Frau Prof. Andrea Meurer sowie Frau Dr. Stefanie Adolf (Orthopädische Universitätsklinik Friedrichsheim, Frankfurt) und Frau Dr. Michaela Köhm (Rheumatologie, Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Frankfurt).

VII. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich keiner anderen Hilfsmittel als der angegebenen bedient habe. Entlehnungen aus anderen Schriften sind als solche kenntlich gemacht.

Frankfurt am Main, den 12.08.2014

Nadine Schneider