

**Juvenile Idiopathische Arthritis:
Die Bedeutung von Autoreaktivität gegen
Glukose-6-phosphat-Isomerase**

DISSERTATION

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

2006

vorgelegt von

CARSTEN P. SCHEPP

Tag der mündlichen Prüfung

10. Januar 2006

Dekan

Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter

Prof. Dr. H.-G. Rammensee

2. Berichterstatter

Prof. Dr. G. E. Dannecker

WORTE DES DANKES

Ein tiefes Gefühl der Dankbarkeit empfinde ich für all diejenigen, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben:
durch Tatkraft, durch Lehre, durch Begleitung und durch Gegenwart.

Mein besonderer Dank gilt ...

... allen Patientinnen und Patienten, die an diesen Studien teilgenommen haben

... Günther E. Dannecker

... Hans-Georg Rammensee

... Ursula Holzer

... Stephan Neuhauss

... Jochen Scheel

... Luciana Dannecker

... Markus Haug

... Hermann Beck

...den Doktorandinnen und Doktoranden der Arbeitsgruppen Dannecker, Holzer und Müller

... dem Team der Rheumaambulanz

... meinen Eltern und meiner Schwester

... Wiltrud

1 INHALTSVERZEICHNIS

1 INHALTSVERZEICHNIS	II
2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
3 EINLEITUNG	1
3.1 Autoimmunität	1
3.1.1 Autoimmunerkrankungen – eine Übersicht	2
3.1.2 Autoimmunreaktion – Grundlagen	4
3.1.3 Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen	5
3.1.4 Autoantikörper	8
3.2 Juvenile Idiopathische Arthritis	11
3.2.1 Klassifikation und Diagnose	11
3.2.2 Epidemiologie	13
3.2.3 Pathogenese	15
3.3 Glukose-6-phosphat-Isomerase und Arthritis	20
3.3.1 Die K/BxN – Mauslinie	20
3.3.2 Glukose-6-phosphat-Isomerase – Struktur und Funktion	21
3.3.3 Glukose-6-phosphat-Isomerase als Ziel von Antikörpern in der K/BxN-Mauslinie	23
3.3.4 Glukose-6-phosphat-Isomerase als Ziel von Antikörpern bei humaner Arthritis	26
3.4 Zielsetzung	29
4 MATERIAL UND METHODEN	30
4.1 Reagenzien	30
4.2 Enzyme	31
4.3 Materialien	31
4.4 Geräte	31
4.5 Herstellerverzeichnis	32
4.6 Sterilisation der verwendeten Lösungen und Nährmedien	32
4.7 Standardlösungen	32
4.8 Patientenproben	33
4.9 Oligonukleotide	34
4.10 Statistik	35
4.11 Protein-Gelelektrophorese	35
4.12 Anfärbung von Proteingelen	36
4.13 Immunoblots zur Detektion von IgG-Antikörpern gegen die GPI-Aufreinigung	36
4.14 MALDI-TOF Massenspektrometrie	37
4.15 Messung der GPI-Aktivität	38

4.16 Freies Hämoglobin	39
4.17 Laktat-Dehydrogenase Aktivität	40
4.18 Herstellung rekombinanter, humaner PGM, GPI und CKM.....	40
4.18.1 Agarose-Gelelektrophorese	40
4.18.2 Polymerase Kettenreaktion.....	41
4.18.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	41
4.18.4 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	41
4.18.5 Klonierung.....	41
4.18.6 Expression und Aufreinigung von rekombinantem humanem PGM, GPI und CKM	43
4.19 ELISA	45
5 ERGEBNISSE	46
5.1 Messung der GPI Aktivität.....	46
5.1.1 GPI-Aktivität in Serum und SF	46
5.1.2 Etablierung einer Messmethode für die GPI-Aktivität	50
5.1.3 Vergleich der GPI-Aktivität mit der LDH-Aktivität und der Hämoglobin-Konzentration	51
5.2 Detektion von Antikörpern gegen GPI und andere Autoantigene.....	53
5.2.1 Massenspektrometrische Analyse einer GPI-Aufreinigung	53
5.2.2 Untersuchung von IgG-Antikörpern in Seren und SF mittels Immunoblot.....	56
5.2.3 Klonierung humaner GPI, CKM und PGM	65
5.2.4 Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen GPI, PGM und CKM im Serum mittels ELISA.....	66
5.2.5 Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen GPI, PGM und CKM in Synovialflüssigkeit mittels ELISA	70
5.2.6 Vergleich der Antikörperkonzentrationen mit der GPI- und der Entzündungsaktivität	70
6 DISKUSSION	80
7 ZUSAMMENFASSUNG	95
8 LITERATURVERZEICHNIS	97
9 ANHANG	111
9.1 Statistiken	111
9.2 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse.....	132
9.3 Veröffentlichungen.....	135
9.3.1 Originalarbeiten.....	135
9.3.2 Publierte Kongressbeiträge	135
9.4 Akademische Lehrer	137

2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AMF	autocrine motility factor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
AUC	Fläche unter der Kurve
BSA	bovines Serumalbumin
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CCP	cyclic citrullinated peptide
CD	cluster of differentiation
CI	Konfidenzintervall
CKM	Kreatinkinase M
CRP	C-reaktives Protein
CV	Variationskoeffizient
DMM	differentiation and maturation factor
DZ	Dendritische Zelle
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FG	Freiheitsgrad
GPI	Glukose-6-phosphat-Isomerase
HLA	human leukocyte antigen
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ILAR	International League of Associations for Rheumatology
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
JIA	Juvenile Idiopathische Arthritis
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption-time-of-flight
Max	Maximum
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Min	Minimum
Mittel	Mittelwert
MQ	mittlere Quadratsumme

nb	nicht bekannt
NLK	Neuroleukin
o/n	über Nacht
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	PBS mit Tween
PGM	Phosphoglukomutase
r_P	Korrelationskoeffizient nach Pearson
r_S	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
RA	Rheumatoide Arthritis
rek	rekombinant
RF	Rheumafaktor
ROC	Receiver operator curve
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sdv	Standardabweichung
sem	mittlerer Fehler
SF	Synovialflüssigkeit
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SQ	Quadratsumme
T_{Reg}	regulatorische T-Zelle
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF- β 1	Transforming growth factor- β 1
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TZR	T-Zell-Rezeptor
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

Besondere Hinweise

Der Einfachheit halber wird im ganzen Text an Stelle einer Doppelbezeichnung die männliche Form verwendet, ohne dass die Aussage damit auf dieses Geschlecht eingegrenzt werden soll. Bezieht sich eine Aussage nur auf ein Geschlecht, wird darauf explizit hingewiesen.

Sollten in diesem Text – wiederum der Einfachheit halber – Aussagen getroffen werden, die *für die JIA* gelten, so bitte ich um Nachsicht: Mir ist sehr wohl bewusst, dass Menschen von dieser Krankheit betroffen sind.

3 EINLEITUNG

3.1 Autoimmunität

"ES SIND DIESE EINRICHTUNGEN NATÜRLICH FÜR DIE EXISTENZ DES INDIVIDUUMS VON DER ALLERGRÖSSTEN BEDEUTUNG, DA IM LAUFE DES LEBENS SCHON UNTER PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN HÄUFIG GENUG RESORPTION DES EIGENEN ZELLMATERIALS EINTRETEN KANN UND MUSS, SO DASS DIE BILDUNG VON GEWEBSAUTOTOXINEN EINE SCHÄDLICHKEIT WÄRE, DIE DEN ORGANISMUS HÄUFIGER UND IN VIEL STÄRKEREM MAASSE BEDROHEN WÜRDEN, ALS ALLE EXOGENEN GEFAHREN."

EHRlich UND MORGENROTH, 1901

In den Industrienationen leidet jeder zwanzigste an einer Autoimmunerkrankung (Davidson und Diamond, 2001; Jacobson et al., 1997; Sinha et al., 1990). Hierbei gelten als Autoimmunerkrankungen klinische Syndrome, bei denen ein pathologischer Prozess durch eine Aktivierung des Immunsystems ohne erkennbaren Grund, beispielsweise eine aktive Infektion, gegen körpereigene Strukturen ausgelöst wird (Davidson und Diamond, 2001). Die Mechanismen, die bei autoaggressiven Immunreaktionen die Gewebeschädigung hervorrufen, sind im Wesentlichen die gleichen, die auch für die schützende Immunität verantwortlich sind. Da es dem Immunsystem jedoch nicht gelingt, das entsprechende Antigen zu eliminieren, führt dies in der Regel zu einem chronischen, häufig schubweisen Prozess. Autoimmunerkrankungen zeigen histologisch meist das Bild einer Entzündung. Oftmals werden sie durch „Triggereffekte“ wie Stress, Infektionen oder anderweitig verursachte Entzündungen ausgelöst. Die meisten dieser Erkrankungen kommen familiär gehäuft vor.

Erstmals beschrieben wurde ein Autoimmunphänomen, die Komplement-vermittelte Hämolyse, 1898 von Jules Bordet (Bordet, 1898). Diese Veröffentlichung stimulierte Paul Ehrlich und seinen Assistenten Julius Morgenroth zu Versuchen, bei denen sie verschiedene Tiere mit Blut von diesen selbst oder von derselben Spezies immuni-

sierten. Während es ihnen häufig gelang, Isoantikörper zu induzieren, beobachteten sie nie die Bildung von Autoantikörpern. Dies führte Ehrlich zur Postulation des Horror autotoxicus: ein Organismus bringt sich nicht selbst dadurch in Gefahr, dass er toxische Autoantikörper bildet. "Es wäre in höchstem Grade dysteleologisch, wenn unter diesen Umständen sich Eigengifte der Parenchyme, Autotoxine, bilden würden." (Ehrlich, 1902). Metallnikoffs scheinbar widersprechende Entdeckung von Antikörpern gegen Spermatozoen im Blut von Meerschweinchen, die mit Spermatozoen behandelt worden waren (Metallnikoff, 1900), führte zu Ehrlichs Antwort, dass es sich bei diesen Antikörpern nicht um wahre Autotoxine handele, da diese Antikörper in deren normaler *in vivo* Umgebung keine Spermatozoen zerstörten, und somit keine Krankheit darstellten, da durch bestimmte "Einrichtungen" ihre destruktive Potenz kontrolliert wird (Ehrlich und Morgenroth, 1901). Diese Aussage, damals umstritten, beinhaltet unsere heutige Vorstellung von Autoimmunität.

3.1.1 AUTOIMMUNERKRANKUNGEN – EINE ÜBERSICHT

Eine sinnvolle wissenschaftliche Einteilung der Autoimmunerkrankungen ist aus Mangel eines Verständnisses für deren Pathogenese sehr schwierig. Klinisch lassen sie sich jedoch nach ihrer Manifestation in Organ-spezifische und systemische Erkrankungen unterteilen. Diese Systematik spiegelt jedoch nicht die betroffenen Autoantigene wieder. So gibt es Organ-spezifische Autoimmunerkrankungen, bei denen Autoantikörper gegen Organ-spezifische Antigene gerichtet sind. Ein Beispiel hierfür ist die Hashimoto-Thyreoiditis, bei der sich die Immunreaktion gegen Schilddrüsen-spezifische Proteine wie Thyreoglobulin richtet (Roitt et al., 1956). Ebenso gibt es aber auch Organ-spezifische Autoimmunerkrankungen, bei denen systemische Antigene Ziel der Immunantwort sind. Dies ist beispielsweise bei der Polymyositis der Fall, bei der tRNA-Synthetasen Ziel von Autoantikörpern sind (Targoff, 2000). Beim Goodpasture-Syndrom werden Antikörper gegen Kollagen-IV, einem Hauptbestandteil von Basalmembranen, gebildet. In den Glomeruli, wo die Kapillargefäße durch fenestriertes Endothel gebildet werden, kommt es zu einer Immunreaktion gegen Kollagen-IV, wohingegen eine solche Reaktion in anderen Geweben, die Kollagen-IV enthalten, ausbleibt. Zu einer Lungenmanifestation des Goodpasture-Syndroms kommt es nahezu ausschließlich bei Rauchern, also dort,

wo die Basalmembran zusätzlich anderen Noxen ausgesetzt ist (Kelly und Haponik, 1994).

Neben Antikörpern können auch T-Zellen in der Effektorphase einer Immunreaktion Autoimmunität vermitteln. Bei der Multiplen Sklerose kommt es beispielsweise zur Infiltration des Zentralnervensystem durch Myelin-basic-protein-spezifische CD4⁺ T-Zellen (Wucherpfennig et al., 1994; Zamvil et al., 1985).

	Krankheit	Betroffene Organe	Bekannte Autoantigene	Effektor	Prävalenz [%]
Organ-spezifisch	Thyreoiditis	Schilddrüse	Thyreoglobulin, Iodidperoxidase	T-Zellen, Antikörper	1,0-2,0
	Gastritis	Magen	H ⁺ /K ⁺ ATPase, Intrinsic Factor	T-Zellen, Antikörper	1,0-2,0 (bei über 60-jährigen)
	Zöliakie	Dünndarm	Transglutaminase	T-Zellen, Antikörper	0,2-1,1
	Morbus Basedow	Schilddrüse	TSH-Rezeptor	Antikörper	0,2-1,1
	Vitiligo	Melanozyten	Tyrosinase, Tyrosinase-related protein 2	T-Zellen, Antikörper	0,4
	Typ I Diabetes	β-Zellen des Pankreas	Insulin, Glutamatdecarboxylase	T-Zellen	0,2-0,4
	Multiple Sklerose	ZNS	MBP, Proteolipid Protein	T-Zellen	0,01-0,15
	Pemphigus	Haut	Desmogleine	Antikörper	< 0,01 - > 3,0
	Hepatitis	Leber	Hepatozytäre Antigene (Cytochrom P450)	T-Zellen, Antikörper	< 0,01
	Myasthenia gravis	Muskel	Azetylcholin-Rezeptor	Antikörper	< 0,01
	Primäre biliäre Zirrhose	Gallengänge	2-Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexe	T-Zellen, Antikörper	< 0,01
Systemisch	Rheumatoide Arthritis	Gelenke, Lunge, Herz	IgG, citrullinierte Zylopeptide	T-Zellen, Antikörper	0,8
	Systemischer Lupus Erythematodes	Haut, Niere, Gelenke, ZNS, Lunge, Herz	Kernantigene	Antikörper	0,1
	Polymyositis Dermatomyositis	Skelettmuskel, Lunge, Herz, Gelenke	Aminoacyl-tRNA-Synthetasen	T-Zellen, Antikörper	< 0,01

Tabelle 1: Beispiele für Organ-spezifische und systemische Autoimmunerkrankungen mit bekannten Autoantigenen(basierend auf (Marrack et al., 2001).

Nicht alle Autoimmunreaktionen führen unmittelbar zu einem destruktiven Prozess. Bei der Myasthenia gravis kommt es zur Bildung von Antikörpern, die antagonistisch am Azetylcholin-Rezeptor wirken. Diese Antikörper werden auch transplazentar übertragen, so dass Neugeborene einer an Myasthenia gravis erkrankten Mutter entsprechende Symptome zeigen, ohne selbst die Antikörper zu bilden. Beim Morbus Basedow werden Thyreotropin-Rezeptoren durch Antikörper stimuliert. Auch hier führt die Autoimmunreaktion also nicht unmittelbar zu einer Zerstörung des Zielgewebes. Weitere Autoimmunerkrankungen fasst Tab. 1 zusammen.

3.1.2 AUTOIMMUNREAKTION – GRUNDLAGEN

Ein generelles Verständnis der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen gibt es derzeit noch nicht. Jedoch wird angenommen, dass viele dieser Erkrankungen durch Umweltfaktoren, die auf einen permissiven genetischen Hintergrund treffen, ausgelöst werden. Dabei haben sowohl die Genetik als auch Umwelteinflüsse Auswirkung auf einzelne Zellen aber auch auf die Gesamtreaktivität des Immunsystems.

Für eine genetische Komponente sprechen zahlreiche epidemiologische Untersuchungen. So wurde nicht nur eine familiäre Häufung bei bestimmten Autoimmunerkrankungen beschrieben, sondern es wurde auch beobachtet, dass bei Auftreten einer Autoimmunerkrankung gehäuft andere Erkrankungen autoreaktiver Natur ausbrechen (z.B. Priori et al., 2003; Tomer, 2002).

Auch Zwillingsstudien deuten auf eine deutliche genetische Komponente in der Pathogenese. So lagen bei Untersuchungen zum Typ I Diabetes, zur Rheumatoiden Arthritis (RA), zur Multiplen Sklerose und zum Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) die Konkordanzraten monozygoter Zwillinge bei ca. 20 %, während sie bei dizygoten Zwillingen nur ca. 5 % betragen (Janeway et al., 2001). Autoimmunität wird aber sicherlich nicht monogen vererbt, vielmehr wird die Zahl der bekannten Loci immer größer. In Mausmodellen wurden inzwischen mehr als 100 solcher Autoimmunitäts-Loci gefunden. Eine ähnliche Zahl wird bei menschlichen Erkrankungen vermutet (als Übersichtsartikel Raman und Mohan, 2003). Diese Gene haben unterschiedliche Funktionen und wirken auf verschiedenen Ebenen: Sie können die

Gesamtreaktivität des Immunsystems, die Antigenpräsentation und -erkennung sowie die Immunmodulation im Gewebe beeinflussen.

Die erhöhte Konkordanzrate monozygoter Zwillinge, die ja deutlich unter 100% liegt, zeigt aber auch, dass ein gleicher genetischer Hintergrund zwar anfälliger macht, aber nicht notwendigerweise zur Manifestation einer Autoimmunerkrankung führt. Somit müssen zusätzliche, nicht-genetische Faktoren angenommen werden. Nur solche Umwelteinflüsse können auch erklären, dass die Inzidenz von Multipler Sklerose oder Typ-I-Diabetes sich durch Migration ändert, obwohl bei beiden Erkrankungen zweifelsfrei eine genetische Komponente beobachtet wird.

Durch Umwelteinflüsse wird das Immunsystem ständig mit neuen Antigenen konfrontiert, die im Rahmen eines molekularen Mimikry mit einem Autoantigen kreuzreagieren können. Als Umwelteinfluss sind auch Verletzungen zu werten, die ein ungewohntes Antigen exponieren, wie es z.B. bei der Sympathischen Ophthalmie nach Verletzungen des Augapfels der Fall ist. Auch die Umwelt kann die Gesamtreaktivität des Immunsystems beeinflussen, durch Konfrontation mit potenten Adjuvantien wie Lipopolysaccharid, Hitzeschockproteinen oder bakterieller DNA.

3.1.3 TOLERANZ GEGENÜBER KÖRPEREIGENEN STRUKTUREN

Am Anfang einer adaptiven Immunantwort, auch einer pathologisch gegen den eigenen Körper gerichteten, steht die Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen. Eine solche Aktivierung kann unmittelbar über eine zytotoxische T-Zellantwort und Th1-vermittelte Aktivierung von Makrophagen zu einer Gewebeschädigung führen. Sie kann aber auch mittelbar über Unterstützung von B-Zellen durch T-Helferzellen zur Bildung von Autoantikörpern führen. Unreife Lymphozyten exprimieren eine enorme Vielfalt an Antigenrezeptoren, die potentiell auch körpereigene Strukturen erkennen. Es müssen also Mechanismen (Ehrlichs "Einrichtungen") existieren, die die Schädigung körpereigener Strukturen verhindern. Toleranzinduktion und -aufrechterhaltung finden auf mehreren Ebenen statt.

Als zentrale Toleranz wird die Deletion von Lymphozyten bezeichnet, deren Rezeptoren Autoantigene mit hoher Affinität binden. Unreife B-Zellen, die mit körpereigenen

Proteinen interagieren, werden noch im Knochenmark oder der Milz deletiert (Goodnow et al., 1988). Unreife T-Zellen werden im Thymus vor Apoptose bewahrt, wenn sie einen T-Zellrezeptor (TZR) exprimieren, der einen Selbstpeptid-MHC (major histocompatibility complex) - Komplex bindet (positive Selektion). Ist diese Bindung allerdings hochaffin, wird Apoptose induziert (negative Selektion) (Starr et al., 2003). Diese negative Selektion findet sowohl während des CD4⁺CD8⁺-doppelt positiven als auch während des reiferen CD4⁺- oder CD8⁺- einfach positiven Stadiums statt (Kisielow et al., 1988; Sha et al., 1988). Proteine, die eigentlich keine Funktion im Thymus haben, werden dennoch dort exprimiert. Diese Expression zur Toleranz-induktion wird durch den Transkriptionsfaktor AIRE (*autoimmune regulator*) reguliert (Liston et al., 2003; Starr et al., 2003). Eine Aire^{-/-}- Mauslinie zeigt multiple Autoimmunerkrankungen (Anderson et al., 2002; Ramsey et al., 2002). Ebenso weist dieser Locus Mutationen auf bei Menschen, die am Autoimmunen Polyendokinem Syndrom (APS-1) leiden, eine Krankheit bei der im wesentlichen das Endokrinium, aber häufig auch andere Organsysteme wie die Haut oder der Gastrointestinaltrakt von autoreaktiven Destruktionprozessen betroffen sind (Consortium, 1997; Nagamine et al., 1997).

Jedoch werden nicht alle autoreaktiven T-Zellen zentral deletiert. Autoreaktive T-Zellen, die in die Peripherie gelangen, müssen also kontrolliert werden. Die Aktivierung naiver T-Zellen erfordert nicht nur die Interaktion eines TZR mit einem Peptid-MHC-Komplex, sondern auch die Interaktion mit kostimulatorischen Molekülen wie CD80/86 auf der Antigen-präsentierenden Zelle (APZ) mit CD28 auf der T-Zelle. Solche kostimulatorischen Moleküle werden auf dendritischen Zellen (DZ), den professionellen APZ, allerdings nur nach Reifung exprimiert. Interagieren DZ mit T-Zellen ohne Kostimulation, ignorieren T-Zellen diese Interaktion oder werden anerg (Hawiger et al., 2001). Möglicherweise induziert eine solche Wechselwirkung sogar die Bildung suppressiver T-Zellen (Hawiger et al., 2001). Bei der Regulation der Kostimulation der DZ spielen Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems, die Toll-like receptors, eine Schlüsselrolle. Somit obliegt zumindest teilweise dem angeborenen Immunsystem die Kontrolle der peripheren Toleranz.

Weiterhin sind regulatorische T-Zellen an der Aufrechterhaltung von Toleranz beteiligt (Shevach, 2000). T_{Reg} gehören zu den CD4⁺CD25⁺ T-Zellen. Für viele Tier-

modelle von Autoimmunerkrankungen konnte gezeigt werden, dass diese Zellen in der Lage sind, die pathologische Immunreaktion zu unterdrücken. Hier sei als Beispiel erwähnt, dass die Depletion CD25⁺-Zellen in normalen Mäusen zu einer Exazerbation einer Kollagen-induzierten Arthritis führt, die durch Gabe von CD4⁺CD25⁺ T_{Reg}-Zellen abgemildert werden kann (Morgan et al., 2003). CD4⁺CD25⁺ T_{Reg}-Zellen entwickeln sich unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors Foxp3 (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003). Das Ausschalten von Foxp3 führt zu einer lethalen, systemischen Autoimmunerkrankung. Die Mechanismen, über die CD4⁺CD25⁺ T_{Reg}-Zellen wirken, sind noch umstritten. Es werden sowohl Zell-Zell-Kontakt abhängige Mechanismen diskutiert als auch Zytokin-vermittelte.

Zytokinen kommt auch unabhängig von CD4⁺CD25⁺ T_{Reg}-Zellen eine regulatorische Funktion bei der Immunantwort zu. Neben Zytokinen mit proinflammatorischer Wirkung, wie z.B. Interferon- γ (IFN- γ) sind eine Reihe immunregulatorischer und -inhibitorischer Zytokine bekannt, z.B. Interleukin-4 (IL-4) und Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Zytokinsekretion werden T-Helferzellen in Th1- und Th2-Zellen eingeteilt. Th1-Zellen produzieren hauptsächlich IFN- γ und IL-2, während IL-4 und IL-5 von Th2-Zellen sezerniert werden. Proinflammatorische Zytokine spielen bei der Aktivierung vieler autoaggressiver Erkrankungen, wie z.B. der Psoriasis (Austin et al., 1999) und dem Typ I Diabetes (Liblau et al., 1995), eine herausragende Rolle. Für die RA weisen ebenfalls zahlreiche Beobachtungen auf eine Th1-Pathogenese hin (Feldmann et al., 1996; Gerli et al., 2002).

TGF- β 1 ist ein Zytokin, dem bei der Aufrechterhaltung der T-Zell-Homöostase eine Schlüsselrolle zukommt (Letterio und Roberts, 1998). Insbesondere gibt es Hinweise, dass TGF- β 1 auch an der Funktion CD4⁺CD25⁺ T_{Reg}-Zellen beteiligt ist (Chen und Wahl, 2003; Nakamura et al., 2001; Piccirillo et al., 2002). TGF- β 1 gehört zu einer Familie multifunktionaler Proteine, die an der Regulation des Wachstums, der Differenzierung und der Funktion verschiedenster Zellen beteiligt sind. TGF- β 1^{-/-}-Mäuse leiden an einer ausgeprägten entzündlichen Multisystemerkrankung (Gorelik und Flavell, 2000; Shull et al., 1992). Die systemische Applikation von TGF- β 1 in Mausmodellen für arthritische Erkrankungen führt zu einer deutlichen Verbesserung des

Krankheitsbildes, wohingegen die Applikation von Antikörpern gegen TGF- β 1 zu einer Krankheitsverschlechterung führt (Kuruvilla et al., 1991; Thorbecke et al., 1992).

Die hier angeführten "Einrichtungen" der Toleranzinduktion und –aufrechterhaltung (siehe auch Abb. 1) erklären diese Phänome jedoch nur teilweise, und es bleiben Fragen offen, deren Beantwortung aussteht.

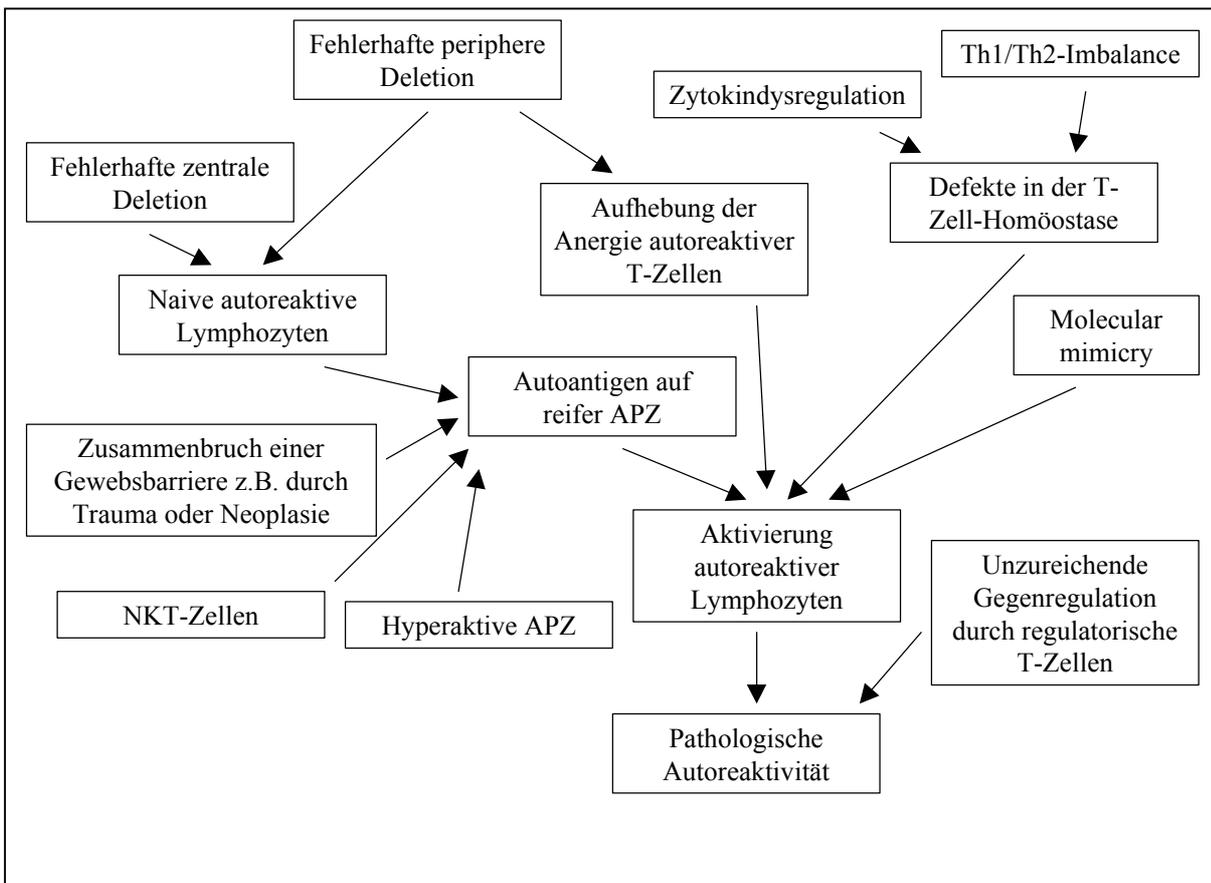


Abbildung 1: Autoreaktivität – Konzepte

3.1.4 AUTOANTIKÖRPER

Antikörperdiversität wird generiert durch zufällige Umordnung der V-(variable), D-(diversity) und J-(joining)-Gensegmente und durch somatische Hypermutation während der B-Zellentwicklung. Diese enorme Rezeptordiversität ermöglicht eine effiziente Immunantwort gegen die riesige Anzahl und Heterogenität sich schnell

ändernder, pathogener Herausforderungen. Der Preis dieser Flexibilität liegt in der Gefahr, dass bei diesem zufälligen Prozess autoreaktive Antikörper entstehen.

Autoreaktive Antikörper und B-Zellen werden auch bei gesunden Individuen gefunden (Jerne, 1974). Humorale physiologische Autoreaktivität ist nur schwer von pathologischer abzugrenzen. Pathogene Autoantikörper sind in der Regel vom Immunglobulin G (IgG) - Isotyp und zeigen eine hohe Affinität (Lacroix-Desmazes et al., 1998).

Um einem Autoantikörper tatsächlich Pathogenität zuzuschreiben, sind eine Reihe von Bedingungen zu erfüllen (Naparstek und Plotz, 1993), die häufig aber nur im tierexperimentellen System zu überprüfen sind. Eine passive Immunisierung mit diesen Antikörpern muss eine Krankheit auslösen. Transplazentarer Transfer von Autoantikörpern, der Symptome verursacht, kann ebenso ein Hinweis sein (wie z.B. bei der Myasthenia gravis) wie die adoptive Immunisierung humanisierter Mauslinien mit autoreaktiven B-Zellen. Weitere Indizien sind Korrelation von Autoantikörpertitern mit der Krankheitssymptomatik und eine Zustandsbesserung nach ggf. selektiver Entfernung oder Plasmapherese der Autoantikörper.

Autoantikörper
Rheumafaktor (RF)
Antinukleäre Antikörper (ANA)
Antikörper gegen zytoplasmatische Komponenten der Neutrophilen (ANCA)
Anti-Phospholipid Antikörper
Anti-Endothel Antikörper
Antikörper gegen Blutzellen
Antikörper gegen Neuronen
Antikörper gegen Stressproteine
Antikörper gegen Hormone
Antikörper gegen Mikrosomen

Tabelle 2: Autoantikörper bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises (basierend auf Griesmacher und Peichl, 2001)

Bei den meisten Autoimmunerkrankungen können Autoantikörper gefunden werden. Dabei stellen diese aber nicht notwendigerweise das pathogene Agens dar. Vielmehr sind sie ein häufiges Epiphänomen anderer pathogener Wirkprinzipien.

Zahlreiche Autoantikörper finden sich bei einer Vielzahl von verschiedenen Erkrankungen. Tab. 2 enthält eine Übersicht über Autoantikörper, die bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises gefunden werden.

Die Bestimmung zirkulierender Autoantikörper hat derzeit lediglich diagnostische Bedeutung. Aus dem Vorhandensein oder Fehlen verschiedener Autoantikörper kann auf die Wahrscheinlichkeit einer Diagnose geschlossen werden. Unmittelbare therapeutische Konsequenzen, wie eine Autoantikörper-spezifische Therapie, hat die Bestimmung nicht.

Krankheit	Inzidenz [%]
Bakterielle Infektion	5 - 60
Chronisch entzündliche Lungenerkrankung	10 - 50
Chronische Lebererkrankung	15 - 70
Sarkoidose	5 - 30
Gesunde Individuen < 50 Jahre	< 5
Gesunde Individuen > 70 Jahre	10 - 50
Sharp-Syndrom	50 - 60
Neoplasie	5 - 25
Parasitäre Infektion	15 - 65
Rheumatoide Arthritis	70 - 90
Sjögren-Syndrom	75 - 95
Systemischer Lupus Erythematoses	15 - 35
Systemische Sklerodermie	20 - 30
Systemische Vaskulitis	5 - 60
Virale Infektion	20 - 90

Tabelle 3: Inzidenz des Rheumafaktors bei verschiedenen Erkrankungen (basierend auf Griesmacher und Peichl, 2001)

Zu den Rheumafaktoren, wohl der bekanntesten Autoantikörpergruppe, gehören Immunglobuline, die an die Fc-Region von IgG binden. Solche Antikörper sind bei 70-90 % der RA Patienten vorhanden. Auch wenn der Rheumafaktor (RF) zu den diagnostischen Kriterien der RA gehört (Arnett et al., 1988), ist er nicht spezifisch für die RA (Tab. 3).

Bei der Diagnostik der RA hat in letzter Zeit ein weiterer Autoantikörper an Bedeutung gewonnen. Dieser erkennt zitrullinierte Aminosäurereste (Schellekens et al., 1998).

Zitrullin entsteht durch enzymatische Deiminierung der Aminosäure Arginin posttranslational. Die Reaktivität dieser Antikörper richtet sich also nicht gegen ein spezielles Protein, sondern gegen verschiedene, modifizierte Proteine, die im Detail noch nicht bekannt sind. Die Spezifität eines anti-cyclic citrullinated Peptid (anti-CCP)- ELISA liegt für die RA bei 96 - 98 % mit einer Sensitivität von mehr als 60 % (van Boekel et al., 2002). Unabhängig von der diagnostischen Relevanz, kann über die pathogenetische Relevanz derzeit nur spekuliert werden (als Übersicht Zhou und Menard, 2002).

3.2 Juvenile Idiopathische Arthritis

3.2.1 KLASSIFIKATION UND DIAGNOSE

Die Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA) ist die häufigste rheumatische¹ Erkrankung des Kindesalters. Erste Beschreibungen dieser Krankheit stammen aus dem auslaufenden 19. Jahrhundert (Diament-Berger, 1891; Still, 1897).

"There is a disease, occurring in children, and beginning before the second dentition, which is characterised clinically by elastic fusiform enlargement of joints without bony change, and also by enlargement of glands and spleen. ... Under the head of Rheumatoid Arthritis in children, at least three conditions have been confused which are both clinically and pathologically distinct, ..." (Still, 1897)²

Bei der JIA handelt es sich jedoch nicht um *eine* Krankheit, vielmehr steht JIA als Sammelbegriff für eine heterogene Gruppe entzündlicher Gelenkerkrankungen, also Arthritiden. Die Klassifikation dieser Erkrankungen war immer wieder Gegenstand von Auseinandersetzungen; lange Zeit war nicht einmal klar, wie sie zu bezeichnen sei: So wird im nordamerikanischen Raum häufig noch die Bezeichnung Juvenile Rheumatoide Arthritis (JRA) verwendet, die auf eine Klassifikation der American Rheumatism Association (ARA, heute American College of Rheumatology) zurückgeht (Brewer et al., 1972; Brewer et al., 1977). Die European League Against Rheumatism führte den Begriff Juvenile Chronische Arthritis ein (Wood, 1978). Diese zum Teil recht divergierenden Klassifikationen³ wurden erst 1997 durch eine Classification Task Force der International League of Associations for Rheumatology (ILAR) zusammengeführt. Diese Vereinbarung enthält nun acht Untergruppen der JIA (Tab. 4) (Petty et al., 1998). Allen Gruppen gemeinsam ist eine Arthritis unbekannter Ätiologie von mindestens sechswöchiger Dauer, deren Krankheitsbeginn vor

¹ Rheuma stammt aus dem Griechischen („rhein“) und bedeutet Fluss oder Strom.

² George Still beschreibt in diesem Artikel die systemische Verlaufsform der JIA, die heute auch als Morbus Still bezeichnet wird.

³ Diese Klassifikation unterscheiden sich beispielsweise in der zu Grunde liegenden Krankheitsdauer (jeweils mindestens 3 Monate für die EULAR-Klassifikation und 6 Wochen für die ARA-Klassifikation) und in der Berücksichtigung besonderer Formen juveniler Arthritiden in der EULAR-Klassifikation, wie der juvenilen ankylosierenden Spondylitis und juvenilen psoriatischen Arthritis.

JIA-Kategorie	Hauptkriterium	Nebenkriterien	Ausschlusskriterien
systemisch	Arthritis mit gleichzeitigem oder vorausgegangenem, täglichem Fieber für mehr als 2 Wochen und mind. ein Nebenkriterium	1. Exanthem 2. generalisierte Lymphknotenschwellung 3. Hepato- oder Splenomegalie 4. Serositis	
oligoartikulär persistierend	Arthritis in 1-4 Gelenken im gesamten Krankheitsverlauf		1. Psoriasis bei Verwandten 1. oder 2. Grades * 2. HLA-B27 assoziierte Erkrankung bei Verwandten 1. oder 2. Grades 3. RF positiv 4. HLA-B27 positiver Junge mit Krankheitsbeginn nach Abschluß des achten Lebensjahres 5. systemische JIA
oligoartikulär erweitert	Arthritis in 1-4 Gelenken in den ersten 6 Monaten, danach in weiteren Gelenken		
polyartikulär RF negativ	Arthritis in 5 oder mehr Gelenken in den ersten 6 Monaten		1. RF positiv 2. systemische JIA
polyartikulär RF positiv	1. Arthritis in 5 oder mehr Gelenken in den ersten 6 Monaten 2. mindestens 2x RF positiv im Abstand von mindestens 3 Monaten		systemische JIA
psoriatisch	1. Arthritis und Psoriasis oder 2. Arthritis und mindestens 2 Nebenkriterien	1. Daktylitis 2. Nagelveränderungen 3. Psoriasis bei Verwandten 1. Grades*	1. RF positiv 2. systemische JIA
Enthesitis-assoziiert	1. Arthritis und Enthesitis oder 2. Arthritis oder Enthesitis und mindestens 2 Nebenkriterien	1. schmerzhaftes Ileosakralgelenk 2. HLA-B27 positiv 3. HLA-B27 assoziierte Erkrankung bei Verwandten 1. oder 2. Grades 4. Uveitis anterior 5. Krankheitsbeginn nach dem 8. Lebensjahr	1. Psoriasis bei Verwandten 1. oder 2. Grades* 2. systemische JIA
andere	Arthritis > 6 Wochen, erfüllt die Kriterien 1. keiner Kategorie oder 2. mehrere Kategorien		

Tabelle 4: JIA-Klassifikation nach ILAR (Petty et al., 1998)

(* vom Dermatologen bestätigt)

Vollendung des 16. Lebensjahres liegt. Die Einteilung in eine dieser acht Kategorien erfolgt sechs Monate nach der Diagnosestellung einer Arthritis. Die JIA ist eine Ausschlussdiagnose⁴.

Ein abschließende Beurteilung und gegebenenfalls eine Revision dieser Diagnose- und Klassifikationskriterien wird nochmals notwendig sein, sobald es neue Erkenntnisse zur Ätiologie und Pathogenese dieser Krankheiten geben wird.

3.2.2 EPIDEMIOLOGIE

Epidemiologische Untersuchungen weisen auf eine Prävalenz zwischen 0,07 und 4,01 pro 1000 und eine Inzidenz zwischen 0,008 und 0,226 pro 1000 (Manners und Bower, 2002). Die einzige publizierte epidemiologische Untersuchung einer deutschen Population findet eine Prävalanz der JCA von 0,2 pro 1000 und eine Inzidenz von 0,035 pro 1000 (Kiessling et al., 1998). Als Gründe für die große Spannweite der Prävalenzen und Inzidenzen führen Manners et al. (Manners und Bower, 2002) in ihrer Metanalyse eine Reihe von Faktoren an: Die eingeschlossenen Studien aus den Jahren 1968 bis 1998 unterschieden sich in den angewendeten Diagnosekriterien, in dem Studiencharakter (Fallkontroll- und Kohortenstudien), dem Stand der Forschung und in der Erfahrung der klinischen Untersucher. Ein weiterer Grund für die Spannweite sind die gewaltigen Unterschiede der aufgeführten Fälle pro Studie, diese liegen zwischen 4 und 334 (Manners und Bower, 2002).

Wie bei vielen Autoimmunkrankheiten ist auch bei der JIA das weibliche Geschlecht deutlich häufiger, nämlich zwei- bis dreimal so häufig, betroffen wie das männliche (Kiessling et al., 1998). Jedoch zeigt die Geschlechtsverteilung deutliche Unterschiede bezüglich der JIA-Subgruppen. Mädchen dominieren sowohl bei der psoriatischen, bei pauci- und polyartikulären Verlaufsform, während die Geschlechtsverteilung bei der systemischen Verlaufsform ausgeglichen ist. Bei der Enthesitis-assoziierten JIA sind Jungen 2 bis 6mal häufiger betroffen als Mädchen (Gare, 1998).

⁴ Die wichtigsten auszuschließenden Diagnosen sind: Osteomyelitis, septische Arthritis, Leukämie und andere Neoplasien, virale Arthritis, Trauma, andere Autoimmunerkrankungen, Hämarthros, rheumatisches Fieber, Purpura Schönlein-Henoch, mechanische Gelenkprobleme, Perthes-Krankheit und psychosomatische Arthralgie.

Das Alter bei Erkrankungsbeginn zeigt in westlichen Ländern eine bimodale Verteilung. Das erste Maximum wird dargestellt von Mädchen mit oligoartikulärer JIA, das zweite setzt sich zusammen aus mehreren Untergruppen: Mädchen mit polyartikulärer oder psoriatischer JIA und Jungen mit Enthesitis-assoziiierter JIA (Gare, 1998). Interessanterweise gibt es Studien aus Costa Rica, Afrika und Indien, bei denen das erste Maximum nicht nachgewiesen wird (Aggarwal und Misra, 1994; Arguedas et al., 1995; Haffeejee, 1995). Da letztere Daten jedoch aus Fallkontrollstudien stammen, ist unklar, ob das nicht beobachtete Maximum darauf zurückzuführen ist, dass nur die ernsthafteren Verläufe der JIA einer klinischen Untersuchungen unterzogen wurden, und die „milde“ pauciartikuläre JIA somit der Beobachtung entgangen ist.

Eine ähnliche Frage muss gestellt werden, wenn die Verteilung bezüglich der Untergruppen in verschiedenen Regionen dieser Welt verglichen wird. Während in Europa und Nordamerika regelmäßig die pauciartikulären Verläufe ca. 50 %, die polyartikulären 25 % (bis zu 7 % seropositiv) und die systemischen 10 % ausmachen (Gare und Fath, 1992; Kunnamo et al., 1986; Towner et al., 1983), dominieren in Studien aus Afrika, Thailand und Indien polyartikuläre Verläufe (Aggarwal und Misra, 1994; Haffeejee et al., 1984; Pongpanich und Daengroongroj, 1988). Rassenunterschiede bezüglich der Inzidenzen und Prävalenzen, die nicht auf eine unterschiedliche Häufigkeit von HLA-B27 zurückzuführen sind, konnten bisher nicht festgestellt werden (Gare, 1998).

Ähnlich wie auch bei der RA konnte in einer Studie eine Abnahme der Inzidenz der pauciartikulären und systemischen JIA in den letzten Jahrzehnten beobachtet werden, während die für die polyartikuläre gleich blieb (Peterson et al., 1996). Auch wenn man hierbei eine immer präzisere Diagnostik in Betracht zieht (insbesondere auch die Entdeckung der Lyme-Arthritis), so bleibt bei dieser Studie immer noch ein zyklisches Muster an Inzidenzmaxima auffällig (1967, 1975 und 1987).

3.2.3 PATHOGENESE

Da die verschiedenen Subgruppen der JIA sich klinisch deutlich voneinander unterscheiden, ist anzunehmen, dass unterschiedliche genetische und umweltbedingte Einflüsse zur Pathogenese beitragen.

Genetische Untersuchungen bei JIA-Patienten unterliegen zahlreichen Schwierigkeiten. Neben der geringen Prävalenz in einigen Subgruppen der JIA waren lange Zeit die uneinheitlichen Klassifikationssysteme ein Problem. Dennoch deuten Familien- und Zwillingsstudien (Ansell et al., 1969; Clemens et al., 1985) auf eine bedeutende genetische Komponente in der Pathogenese der JIA hin. In den USA existiert ein Register für JRA-betroffene Geschwisterpaare. Aus der Analyse der darin enthaltenen Daten geht ein Risiko für Geschwister betroffener Kinder λ_s^5 von 15 hervor (Moroldo et al., 1997). Dies entspricht dem Risiko beim Insulin-abhängigen Diabetes mellitus oder bei Multipler Sklerose. In einer späteren Analyse dieses Registers wurden 14 Zwillingspaare (11 eineiige Zwillingspaar, 1 zweieiiges und 2 von unbekannter Zygosität) gefunden, bei denen beide Geschwister an JRA litten. Dreizehn dieser Paare waren konkordant für die Art der Krankheit zu Beginn (10 pauciartikulär, 3 polyartikulär) und im Verlauf (8 pauciartikulär und 5 polyartikulär) (Pralhad et al., 2000). Eine finnische Studie fand in einer Population von 41 Familien mit mehr als einem betroffenen Individuum ein λ_s von 20 (Savolainen et al., 2000).

Die Untersuchungen in diesen beiden Population deuten also daraufhin, dass genetische Komponenten in der Pathogenese der JIA von Bedeutung sind. Dies wurde aber bereits vor diesen beiden Studien vermutet. Schon lange galt für das Auftreten einiger Subgruppen der JIA eine Assoziation mit Loci des HLA (human leukocyte antigen) - Komplexes als erwiesen.

Der HLA-Komplex liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6. Er enthält mindestens 128 Gene, davon haben ungefähr 40% eine immunologische Funktion (Forre und Smerdel, 2002). Innerhalb dieses HLA-Komplexes liegen die Gene für die HLA-

⁵ λ_s ist definiert als der Quotient aus der Auftretenswahrscheinlichkeit bei Geschwistern und der Prävalenz der Gesamtpopulation.

Klasse-I-(HLA-A, -B und -C) und HLA-Klasse-II-(HLA-DP, -DQ und -DR) Moleküle. Weiterhin finden sich dort nicht-klassische HLA-Gene (z.B. HLA-DM). Die klassischen HLA-Moleküle zeichnen sich durch ihren Polymorphismus aus, das heißt für jedes Gen gibt es eine Vielzahl von Allelen in einer Population. Diese polymorphen Allele für die unterschiedlichen Loci zeigen eine ausgeprägte Kopplung, d.h. bestimmte Allele eines genetischen Locus werden häufiger als bei zufälliger Verteilung mit einem bestimmten Allel eines topographisch benachbarten Locus beobachtet. Solche gekoppelten Allele bilden einen Haplotyp.

Für HLA-Klasse-I-Gene wurden verschiedene Assoziationen mit dem Auftreten der JIA beschrieben. HLA-B27 war die erste beschriebene HLA-Assoziation für die JIA überhaupt. Dieses Allel wurde überproportional häufig bei Patienten mit der Enthesitis-assoziierten JIA gefunden (Rachelefsky et al., 1974). Dies deutet daraufhin, dass es sich bei dieser Krankheit um die juvenile Manifestation der ankylosierenden Spondylitis handelt. Weiterhin wurde eine Assoziation zwischen HLA-A*0201 und einem frühen Krankheitsbeginn für alle Verlaufsformen der JIA beobachtet (Brunner et al., 1993).

Bei den HLA-Klasse-II-Genen zeigt sich ein komplexeres Bild. Es sind mehrere Assoziationen für die verschiedenen Subgruppen bekannt. Eine Übersicht bietet Tab. 5. Besonders auffällig ist die Assoziation des DRB1*0401 enthaltenden Haplotyps mit der RF positiven JIA. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei dieser Krankheit um die juvenile Manifestation der RA handelt (Clemens et al., 1983), die ebenfalls mit diesem DR-Allel assoziiert ist. Insbesondere zeigen DRB1*0401-homozyote Individuen einen ernsthafteren Krankheitsverlauf (Weyand et al., 1992). Bei Patienten mit RF negativer, polyartikulärer JIA konnte bisher keine Assoziation mit einem HLA-Klasse-II-Gen nachgewiesen werden.

Eine besonders ausgeprägte Assoziation findet sich für den Haplotyp DRB1*0801-DQA1*0401-DQB1*0402 mit den beiden oligoartikulären Verlaufsformen. Neben Suszeptibilitäts- gibt es auch Protektions-vermittelnde Haplotypen. Hier ist insbesondere die niedrige Odds ratio für den DRB1*0401 enthaltenden Haplotypen, der Suszeptibilität für die RF positive JIA vermittelt, bei den beiden oligoartikulären Verlaufsformen erstaunlich.

JIA-Kategorie	DRB1-DQA1-DQB1-Haplotyp	Odds ratio
systemisch	11-05-03	4,3
oligoartikulär persistierend	13-01-06	6,4
	0801-0401-0402	6,1
	11-05-03	2,2
	<i>0401-03-03</i> <i>0701-0201-0201</i>	<i>0,4</i> <i>0,2</i>
oligoartikulär erweitert	0801-0401-0402	10,3
	11-05-03	3,0
	01-0101-0501	1,9
	<i>0401-03-03</i>	<i>0,1</i>
polyartikulär RF positiv	0401-03-03	3,9
polyartikulär RF negativ		
psoriatisch	13-01-06	4,5
	01-0101-0501	3,8
Enthesitis- assoziiert	01-0101-0501	4,9
Gesamt-JIA	0801-0401-0402	4,1
	13-01-06	3,0
	11-05-03	2,1
	<i>0401-03-03</i>	<i>0,6</i>

Tabelle 5: Suszeptibilitäts- und Protektions-(kursiv) vermittelnde HLA-Klasse-II-Haplotypen bei der JIA. Basierend auf Thomson et al., 2002. Die Odds ratio OR ist folgendermaßen definiert:

$$OR = \frac{\frac{\text{kranke Merkmalsträger}}{\text{gesunde Merkmalsträger}}}{\frac{\text{kranke Nichtmerkmalsträger}}{\text{gesunde Nichtmerkmalsträger}}}$$

Assoziationen mit nicht-HLA-Genen sind ebenfalls bekannt. Beispielsweise konnte eine positive Assoziation der EOPA-JRA mit LMP7 (eine Proteasomuntereinheit) (Pralhad et al., 2001) und der systemischen JRA mit Tapasin nachgewiesen werden (Bukulmez et al., 2001). Beide Gene liegen zwar im HLA-Komplex, dennoch blieb nach Stratifikation der Gruppen nach den assoziierten, gekoppelten HLA-Loci eine Assoziation nachweisbar.

Widersprüchliche Ergebnisse ergaben Studien zu Assoziationen mit Polymorphismen sowohl in den Promotorregionen des Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Eppelen et al.,

1995; Ozen et al., 2002), des IL-6 (Fishman et al., 1998; Pignatti et al., 2001), des IL-10 (Callen, 2000; Donn et al., 2001a), als auch in der 5'UTR des Macrophage migration inhibitory factor (MIF) (Donn et al., 2002; Donn et al., 2001b) als auch in der 3'-UTR des Interferon regulatory factor (IRF)-1 (Donn et al., 2001a; Scola et al., 2002; Vencovsky et al., 2001).

Die stärksten genetischen Assoziationen liegen also im sehr polymorphen HLA-Komplex. HLA-Moleküle dienen der Präsentation von Antigenen an T-Lymphozyten, die einen HLA-Peptid-Komplex mittels des T-Zellrezeptors erkennen.

CD4⁺-T-Lymphozyten sind die vorherrschenden Zellen in der JIA-Synovia (Wynne-Roberts et al., 1978). Dabei zeigen sie die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von aktivierten T-Lymphozyten wie Expression von CD25 (De Maria et al., 1987), CD69, VLA-1 (Odum et al., 1987) und HLA-Klasse-II-Antigene (Forre et al., 1982). Vorwiegend handelt es sich um CD45RO⁺ T-Lymphozyten (also Gedächtniszellen) (Silverman et al., 1993). Beim weit überwiegenden Teil der JIA-Patienten konnte eine Oligoklonalität der CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten in der Synovia nachgewiesen werden (Bernstein et al., 1993; Sioud et al., 1992). Insbesondere konnten identische Klone in verschiedenen Gelenken des gleichen Patienten über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden (Grom et al., 1993; Wedderburn et al., 1999). Einige dieser Klone wurden auch im peripheren Blut gefunden, allerdings war die Akkumulation im entzündeten synovialen Gewebe deutlich (Thompson et al., 1995). Diese Beobachtungen legen eine anhaltende antigene Stimulation von T-Zellen im synovialen Gewebe nahe.

Dazu passt auch das histopathologische Bild: Neben einer massiven Infiltration der Synovia durch Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen kommt es zu einer Proliferation von Fibroblasten und Synoviozyten (Wynne-Roberts et al., 1978). Letzteres führt zu einer massiven synovialen Hypertrophie. In der Nähe von Gefäßen werden Ansammlungen CD4⁺-T-Lymphozyten gefunden, die von einer gemischten Population von B-Lymphozyten sowie von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten umgeben sind (Murray et al., 1996). Weiterhin finden sich enorm viele Makrophagen und dendritische Zellen, die HLA-DR und -DQ hoch exprimieren (Knight et al., 1989). Die dendritischen Zellen stehen in innigem Kontakt mit den T-Lymphozyten. Auch wenn

diese Hinweise für eine Antigen-vermittelte Antwort sprechen, sind diesbezügliche Antigene bisher nicht gefunden worden.

Wie schon oben erwähnt können CD4⁺-T-Helferlymphozyten in Th1 und Th2-Zellen eingeteilt werden. Es gibt Hinweise darauf, dass es bei der JIA zu einer Th1-Dominanz und somit zu einer Th1-vermittelten Pathogenese kommt. So zeigte bei JIA-Patienten von 44 aus Synovialflüssigkeit (SF) gewonnenen T-Zellklonen keiner einen Th2-Phänotyp, aber 27 einen Th1- und 17 einen Th0⁶-Phänotyp (Gattorno et al., 1997). Eine Studie an 20 JIA-Patienten mit oligo- und polyartikulären, aber nicht systemischen Verlaufsformen zeigte, dass T-Zellen aus der SF im Vergleich zum peripheren Blut eine deutlich erhöhte CCR5- und CXCR3-Expression⁷ und einen deutlich erhöhten IFN- γ /IL-4-Quotienten haben (Wedderburn et al., 2000).

Dass ein proinflammatorisches Zytokinmilieu von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese der JIA ist, zeigen neuere, erfolgreiche medikamentöse Strategien, die darauf abzielen, proinflammatorische Zytokine wie TNF- α (Elliott et al., 1997; Lahdenne et al., 2003) oder IL-1 (Manners, 2002) zu antagonisieren. Noch ungeklärt ist, ob die Antagonisierung der proinflammatorischen Zytokine zu einer Unterbindung der Pathogenese zu einem frühen Zeitpunkt führt, oder ob so ein am Ende stehender destruktiver Prozeß verhindert wird.

Ein am Ende stehender Prozeß ist die Aktivierung der Komplementkaskade. In einer Studie mit 56 JIA-Patienten zeigten 51 eine erhöhte Konzentration der Komplementfaktoren sC5-9 (zum Membranangriff-Komplex gehörend) und 42 eine erhöhte Konzentration des Faktor Bb, welcher auf eine Aktivierung über den alternativen Weg schließen läßt (Aggarwal et al., 2000).

Wie bei anderen Autoimmunerkrankungen werden auch bei JIA-Patienten Autoantikörper im Serum gefunden. Zu den regelmäßig untersuchten und auch gefundenen gehören neben dem RF (10% aller JIA-Fälle, nahezu ausschließlich bei der polyartikulären Verlaufsform, die der RA ähnlich ist), noch die antinukleären Antikörper (bei

⁶ Th0-Zellen sezernieren sowohl IFN- γ als auch IL-4 und IL-5 und sind somit weder vom Th1- noch vom Th2-Typ.

⁷ CCR5 und CXCR3 sind für Th1-Zellen charakteristische Chemokin-Rezeptoren.

75 - 85 % der oligoartikulären und bei 40 - 50 % der polyartikulären Verlaufsform) (Cassidy und Petty, 2001). Anti-CCP wird in 73 % der Patienten mit RF positiver, polyartikulärer Verlaufsform gefunden, bei den übrigen Verlaufsformen jedoch in nur 3 % der Fälle (van Rossum et al., 2003).

3.3 Glukose-6-phosphat-Isomerase und Arthritis

3.3.1 DIE K/BxN – MAUSLINIE

Die K/BxN-Mauslinie wurde durch Zufall entdeckt. Für Experimente zur T-Zellselektion wurde eine transgene Mauslinie etabliert, die einen TZR exprimiert, der ein Fragment der bovinen Pankreas-Ribonuklease im Kontext des MHCII Allels A^k erkannte. Eine ungeplante Kreuzung dieser Mauslinie mit der NOD-Mauslinie führte zu Nachkommen, der K/BxN-Linie, die überraschenderweise spontan eine Arthritis entwickelten. Damit steht dieses Modell im Gegensatz zu anderen Tiermodellen, bei denen arthritische Symptome erst provoziert werden müssen wie beispielsweise bei der Kollagen-induzierten Arthritis bei Ratten, Mäusen und Affen (Bakker et al., 1990; Courtenay et al., 1980; Trentham et al., 1977) oder der Adjuvans-induzierten Arthritis bei Ratten (Pearson, 1956). Arthritische Symptome zeigen sich bei allen Nachkommen, das heißt also mit kompletter Penetranz, am Tag 25 bis 35. Alle distalen Gelenke der Pfoten sind betroffen. Mit zunehmender Dauer führt die Erkrankung zu verschiedenen Deformationen und Einschränkung der Mobilität, obwohl die Tiere bis auf die Gelenkaffektion gesund erscheinen. In der histologischen Untersuchung der Gelenke fiel eine Hyperplasie und Entzündung der Synovia auf, die sich auch über das Knorpelgewebe ausdehnte (Kouskoff et al., 1996). Eine solche Pannusbildung ist auch bei humanen arthritischen Gelenken zu beobachten.

Durch weitere Kreuzungsexperimente konnte gezeigt werden, dass das MHCII Allel A^{g7} der einzige genetische Anteil der NOD-Mauslinie an der Entwicklung der Arthritis ist (Kouskoff et al., 1996). Somit ist klar, dass T-Zellen eine kritische Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen: Es kommt nur zur Entstehung der Krankheit, wenn die beiden Elemente definierter TZR und bestimmtes MHCII-Molekül aufeinandertreffen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Krankheits Symptome erst dann auftreten, wenn T-Zellen, die den transgenen TZR exprimieren, in signifikanter Anzahl in der

Peripherie nachweisbar sind. Eine Behandlung der Mäuse mit einem monoklonalem anti-CD4-Antikörper eine Woche vor Ausbruch verhinderte diesen (Kouskoff et al., 1996).

Neben dieser Schlüsselrolle der CD4⁺-T-Lymphozyten konnte auch gezeigt werden, dass ein reifes B-Zellkompartiment ebenfalls Voraussetzung für die Entwicklung der Arthritis in diesem Modell ist. Durch Einführung der μ MT^o-Mutation (Kitamura et al., 1991) wurde die Expression von schweren Ketten der Immunglobuline auf der Oberfläche unterbunden. Eine Mauslinie, die diese Mutation trägt, entwickelt keine Arthritis. Durch Serumtransfer aus kranken K/BxN-Mäuse in gesunde K/BxN- μ MT^o konnte Arthritis jedoch innerhalb von 2 Tagen ausgelöst werden (Korganow et al., 1999), die ohne weitere Injektion nach 15 Tagen nachließ. Serumtransfer in RAG^{-/-} Mäuse führt ebenfalls zu Arthritis, das heißt, dass sobald das arthritogene Serum produziert ist, T- oder B-Zellen nicht mehr für den Ausbruch der Krankheit benötigt werden (Korganow et al., 1999). Das krankheitsauslösende Agens im Serum konnte in der IgG-Fraktion lokalisiert werden. Das Ziel sowohl der arthritogenen Antikörper als auch der pathogenen T-Zellantwort in der K/BxN-Mauslinie stellte sich als das ubiquitär vorkommende, zytosolische Enzym Glukose-6-phosphat-Isomerase heraus (Matsumoto et al., 1999).

3.3.2 GLUKOSE-6-PHOSPHAT-ISOMERASE – STRUKTUR UND FUNKTION

Glukose-6-phosphat-Isomerase (GPI) katalysiert die Isomerisierung von Glukose-6-phosphat zu Fruktose-6-phosphat, somit den zweiten bzw. vorletzten Schritt der Glykolyse und Glukoneogenese. Damit ist GPI ein elementares Enzym des Intermediärstoffwechsels. Es kommt in allen Eukaryonten und Prokaryonten vor mit Ausnahme einiger obligat intrazellulärer Parasiten wie z.B. Rickettsien. Wie bei vielen glyko-



Abbildung 2: Kristallstruktur von GPI aus Kaninchen, Auflösung 2,5 Å, (Jeffery et al., 2000)

lytischen Enzymen führt ein Mangel zu einer hämolytischen Anämie und zu neurologischen Störungen. Erhöhte Serum-Aktivitäten dienten eine Zeit lang als Tumormarker, was jedoch aufgrund mangelnder Sensitivität und Spezifität wieder aufgegeben wurde. GPI ist enzymatisch aktiv als Homodimer, mit einem Molekulargewicht M_r von 2×55000 . Die Kristallstrukturen aus verschiedenen Spezies sind bekannt (in Abb. 2: *O. cuniculus*, Auflösung 2,5 Å, Jeffery et al., 2000; *B. stearotherophilus*, Auflösung 2,3 Å, Sun et al., 1999). Diese untereinander sehr ähnlichen Strukturen zeigen keine Homologie zu anderen Proteinen und stellen somit ein eigenständiges Motiv dar.

Zusätzlich zur katalytischen Funktion besitzt GPI noch extrazelluläre Signalfunktionen. Bevor klar war, dass es sich um dasselbe Molekül handelte, wurden ihm dieser verschiedenen Funktionen wegen weitere Namen gegeben: Autocrine Motility Factor (AMF), Neuroleukin (NLK) und Differentiation and Maturation Factor (DMM). AMF stimuliert die Zellmigration sowohl gerichtet als auch ungerichtet (Watanabe et al., 1996). Insbesondere konnte gezeigt werden, dass AMF die Motilität von Endothelzellen stimuliert und angiogenetisch wirkt (Funasaka et al., 2001). Als Rezeptor wurde gp78, ein Pertussistoxin-sensitiver Siebenhelixrezeptor identifiziert (Shimizu et al., 1999). Die AMF-Aktivität ist Spezies spezifisch und unabhängig vom katalytischem Zentrum (Amraei und Nabi, 2002). NLK wird eine neurotrophe Aktivität für spinale und sensorische Neurone zugeschrieben (Chaput et al., 1988; Faik et al., 1988). DMM vermittelt die Differenzierung von myeloischen Leukämiezellen zu terminalen Monozyten (Xu et al., 1996). Sowohl intra- als auch extrazelluläre GPI unterliegen einer Phosphorylierung durch die Kaseinkinase II. Die funktionelle Bedeutung dieser Beobachtung ist noch unklar (Haga et al., 2000).

Mit seiner Vielzahl an Funktionen, die es neben seiner Hauptaufgabe als Enzym im zentralen Stoffwechsel ausübt, gehört GPI zur einer neu definierten Gruppe der Moonlight⁸-Enzyme.

⁸ to moonlight (engl.) = eine Nebenbeschäftigung ausüben

3.3.3 *GLUKOSE-6-PHOSPHAT-ISOMERASE ALS ZIEL VON ANTIKÖRPERN IN DER K/BxN-MAUSLINIE*

In der K/BxN-Mauslinie sind IgG-Antikörper, die gegen GPI gerichtet sind, das pathogene Agens. Monoklonale Antikörper, die aus B-Zellen von K/BxN-Mäusen stammten, waren alleine nicht in der Lage, die Krankheit auszulösen. Erst die Kombination mehrerer monoklonaler Antikörper führte zur Auslösung der Arthritis. Die Bindung an ein spezifisches Epitop war nicht notwendig, vielmehr war die Bildung von Antikörper-GPI-Multimeren erforderlich. Krankheitsauslösende Antikörper sind vom IgG1-Typ. Die Sequenzanalyse zeigte eine hohe Homologie, was ein Hinweis darauf ist, dass diese Antikörper spezifisch von einem gemeinsamen Vorläufer herangereift sind, der die Toleranzmechanismen durchbrochen hat (Maccioni et al., 2002).

Durch Injektion von arthritogenem, ⁶⁴Cu-markiertem anti-GPI-IgG konnte der zeitliche Ablauf der Arthritisinduktion per Positronenemissionstomographie (PET) visualisiert werden. Dabei zeigte sich, dass sich das anti-GPI-IgG innerhalb weniger Minuten nach der intravenösen Injektion in den distalen Gelenken aller Extremitäten anreicherte; eine Sättigung wurde nach 20 min erreicht, die für 24 h bestehen blieb. Erste Arthritiszeichen waren nach 24 - 48 h zu beobachten (Wipke et al., 2002).

Warum ein systemisches Antigen eine lokal so begrenzte Immunreaktion auslöst, ist noch ungeklärt. Es ließen sich weder alternativ gespleißte Varianten von GPI mRNA im Gelenk nachweisen, noch zeigte die Analyse der die kodierenden Regionen angrenzenden Sequenzen eine Gelenk-spezifische Auffälligkeit (Matsumoto et al., 2002). Eine Gewebe-spezifisch unterschiedliche elektrophoretische Mobilität auf zweidimensionalen Proteingelen wurde ebenfalls nicht beobachtet. Was als Hinweis darauf gedeutet werden kann, dass GPI nicht Gewebe-spezifisch posttranslational modifiziert wird (Matsumoto et al., 2002).

In immunhistologischen Untersuchungen an Gewebeproben aus gesunden C57BL/6-Mäusen wurde eine homogene, zytoplasmatische Verteilung von GPI in allen Zellen aller untersuchten Organe gefunden. Dies traf insbesondere für Chondrozyten und Synoviozyten aus Gelenken zu (Abb. 3). Im Gelenk wurden auch extrazelluläre Ablagerungen von GPI gefunden: Eine dünne, scharf begrenzte Ablagerung auf der

Knorpeloberfläche war nachzuweisen (Abb. 3a), während kein GPI in der Knorpelmatrix oder an der Knorpel-Knochen-Grenzfläche gefunden wurde. Wurden an Arthritis erkrankte Mäuse (K/BxN-Mäuse oder Empfänger von K/BxN-Serum) untersucht, zeigte sich ein markante Verbreiterung dieser Ablagerung (Abb. 3c). In Doppelfärbungen ließ sich ein Kolokalisation von anti-GPI-IgG und C3-Komplement-Fragmenten zeigen (Abb. 3d-g). Immunkomplexe aus IgG und GPI wurden auch außerhalb des Gelenkes in Nieren- und Muskelgewebe gefunden, nur waren dort keine C3-Komplement-Fragmente kolokalisiert. Die Autoren dieser Untersuchungen interpretierten diesen Befund als Schlüssel zur Gelenkspezifität dieser Erkrankung: GPI-IgG-Komplexe bilden sich systemisch, aktivieren aber nur im Gelenk die Komplementkaskade (Matsumoto et al., 2002).

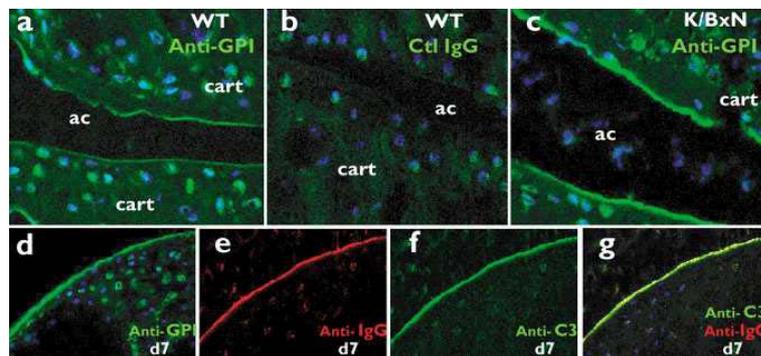


Abbildung 3: Immunhistologische Untersuchungen zur Lokalisation von GPI. ac, Gelenkspalt (articular cavity); cart, Knorpel (cartilage). (a, b) Gefrierschnitte aus Sprunggelenken von gesunden Wildtypmäusen (WT). Die Kerne wurden mittels DAPI gefärbt. Objektiv: x63. (a) Färbung mit anti-GPI. (b) Färbung mit irrelevantem Kontroll-IgG. (c) Färbung eines Sprunggelenkschnittes einer arthritischen K/BxN-Maus mit anti-GPI. (d-g) Sprunggelenksknorpeloberfläche einer B6 Maus sieben Tage nach Injektion von arthritogenem K/BxN-Serum. Färbung wie angegeben. Die Abbildung ist entnommen aus Matsumoto et al., 2002.

Dass die Aktivierung der Komplementkaskade eine Schlüsselrolle bei der Manifestation der Arthritis in diesem Modellsystem spielt, konnte durch Experimente mit Mauslinien, die defizient für einzelne Komplementfaktoren waren, eindrucksvoll bestätigt werden (Abb. 4). Wurden Gene ausgeschaltet, die Proteine des Membran-angreifenden Komplexes, des klassischen Weges oder des Lektin-Weges der Komplementaktivierung kodierten, konnte durch Transfer von arthritogenem K/BxN-Serum die Krankheit ausgelöst werden (Ji et al., 2002a; Solomon et al., 2002). Waren jedoch Gene betroffen, die Proteine des Komplements für Entzündungsmediation und Chemoattraktion (C5a), sowie des gemeinsamen Abschnitts der Komplementkaskade und des alternativen Weges der Komplementaktivierung (Faktor B) kodier-

ten, war eine Auslösung der Arthritis durch Serumtransfer nicht mehr möglich (Ji et al., 2002a).⁹ In der gleichen Studie wurde gezeigt, dass die Induktion von Arthritis durch Serumtransfer intakte Fcγ-Rezeptoren benötigt (Ji et al., 2002a).

Fcγ-Rezeptoren wurden auch mit dem pathogenetischen Ablauf bei der RA in Zusammenhang gebracht (Edwards et al., 1997). Daten zur JIA sind nicht bekannt. Eine weitere Parallele zur menschlichen Arthritis ist das Zytokinmuster. IL-1 ist absolut notwendig für die Induktion der Krankheit, ähnlich bedeutend, wenn auch nur in einem Teil der Mäuse, ist TNF-α (Ji et al., 2002b).

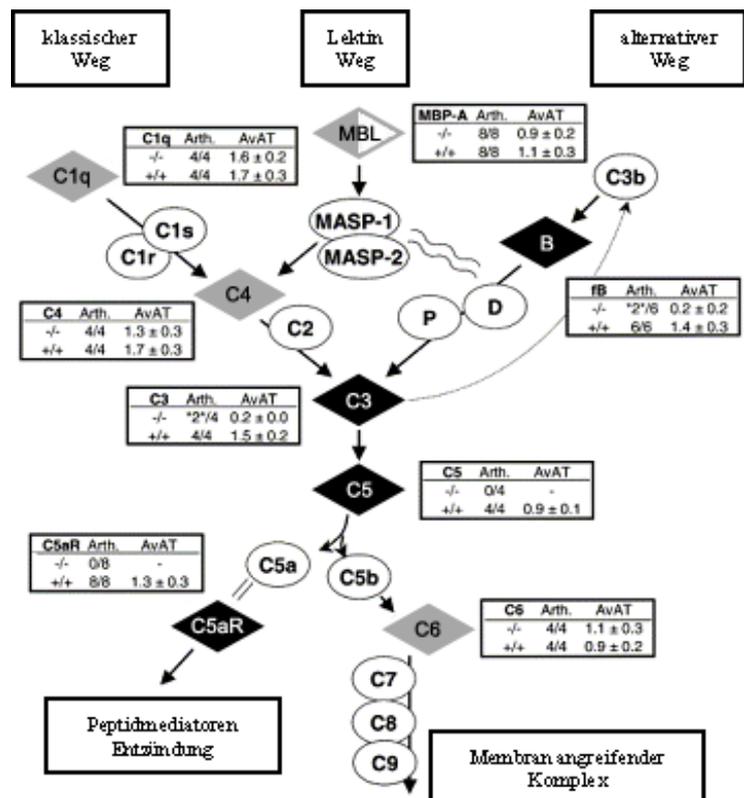


Abbildung 4: Transfer von arthritogenem Serum aus K/BxN-Mäusen in Mäuse mit Defizienzen in der Komplementkaskade. Defizienzen im alternativen Weg der Komplementaktivierung und im C5aR-Komplementfragment führen zur Resistenz gegenüber der Arthritisinduktion (schwarze Rauten), während Defizienzen in anderen Bereichen keine Auswirkung haben (graue Rauten, von den zwei bekannten MBL konnte nur eines getestet werden). Arthr. = Anteil an symptomatischen Mäusen; AvAT = durchschnittliche Schwellung des Fußgelenkes. Abb. nach Ji et al., 2002a.

Überraschend war die Beobachtung, dass Mauslinien, die keine Mastzellen bildeten, resistent gegen die Induktion von Arthritis durch K/BxN-Serumtransfer waren. Durch Injektion von Mastzellen konnte die Anfälligkeit jedoch wieder hergestellt werden (Lee et al., 2002). Daraus und aus der Tatsache, dass C5a und auch Bindung an den Fcγ-Rezeptoren Mastzellen potent aktivieren, schließen die Autoren, dass Mastzellen die zellulären Effektoren in diesem Arthritismodell sind. Insbesondere muss dies vor dem Hintergrund gesehen werden, dass Mastzellen die einzigen Zellen sind, die

⁹ Diese Notwendigkeit der Komplementkaskade, insbesondere des alternativen Weges der Aktivierung, erinnert an die erhöhten Messwerte des Faktors Bb bei JIA-Patienten (Aggarwal et al., 2000).

TNF- α präformiert in Vesikeln enthalten, und auch sehr schnell in der Lage sind TNF- α und IL-1 in großen Mengen zu produzieren (Burd et al., 1989; Gordon und Galli, 1990).

3.3.4 GLUKOSE-6-PHOSPHAT-ISOMERASE ALS ZIEL VON ANTIKÖRPERN BEI HUMANER ARTHRITIS

Aufgrund der Ähnlichkeit des pathologischen Bildes der Arthritis in der K/BxN-Mauslinie mit der RA wurde untersucht, ob eine humorale Immunantwort gegen GPI auch bei der menschlichen Krankheit von Bedeutung ist. Erste Ergebnisse waren vielversprechend. In einer Studie mit 69 RA-Patienten wurden in 44 (= 64 %) Proben anti-GPI-IgG-Konzentrationen nachgewiesen, die zwei Standardabweichungen über dem Mittelwert der gesunden Kontrollgruppe lagen (Schaller et al., 2001). Ähnliche Ergebnisse lieferte der Vergleich von anti-GPI-IgG-Konzentration in der SF von RA- und Arthrose-Patienten: 8 von 8 RA-Proben lagen zwei Standardabweichungen über dem Mittelwert der Arthrosegruppe (Schaller et al., 2001). In der gleichen Studie wurde eine Phage-Display-Bibliothek aus der RNA aus dem Knochenmark eines RA-Patienten hergestellt. Die Sequenzen der einzelnen anti-GPI-Fab-Fragmente wiesen eine Nukleinsäure-Homologie von 79 - 95 % auf. Die beiden Fab-Fragmente, die am besten an GPI gebunden hatten, wiesen die höchste Rate an somatischer Mutation auf (Schaller et al., 2001). Beides sind Indizien für eine Antigen-gesteuerte humorale Immunantwort.

Weiterhin untersuchten die Autoren dieser Studie die Konzentration des nativen Antigens im Serum und in der SF, indem sie die Enzymaktivität bestimmten. Dabei fanden sie einen deutlich höheren Mittelwert für die Serumproben der RA-Gruppe (n = 8) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Die SF der RA-Patienten zeigte noch höhere Enzymaktivität. Mit $r = 0,79$ ($p = 0,026$) beobachteten sie auch eine positive Korrelation zwischen der anti-GPI-Konzentration und der GPI-Aktivität im Serum (Schaller et al., 2001).

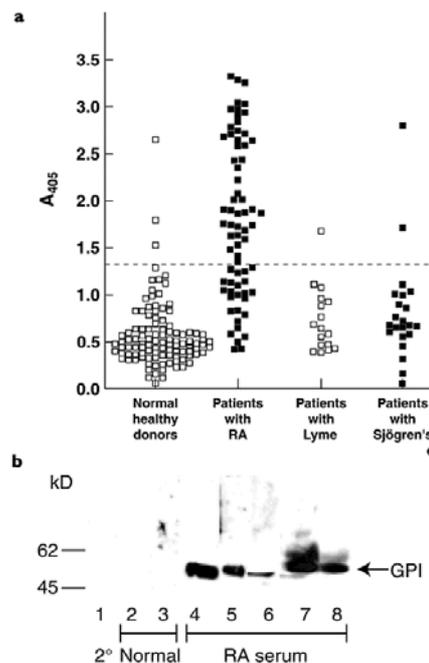


Abbildung 5: Abb. aus Schaller et al., 2001. **(a)** Seren von 69 RA-Patienten, 17 Lyme-Arthritis-Patienten, 22 Sjögren-Syndrom-Patienten und 107 gesunden Kontrollpersonen wurden mittels ELISA auf anti-GPI-IgG getestet. Eine optische Dichte (OD), die zwei Standardabweichungen über dem Mittelwert der Kontrollgruppe lag, wurde als positiv angenommen (gestrichelte Linie). **(b)** Westernblot zur Detektion von anti-GPI-Reaktivität. Bahn 1: Kontrolle, nur Sekundäntikörper; Bahn 2, 3: gesunde Kontrollpersonen, Bahn 4-8: RA-Patienten. Zu beachten ist hier die Doppelbande bei Patient 7, die in der Veröffentlichung nicht kommentiert wurde.

Schon kurz nach der Veröffentlichung wurden diese Ergebnisse angezweifelt. Schon eine Abbildung in der Originalpublikation (Abb. 5) berechtigte zu Zweifeln an den Ergebnissen. Die anti-GPI-IgG-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt, bei dem als Antigen eine kommerzielle GPI-Aufreinigung aus Kaninchenmuskel verwendet wurde. Diese beinhaltete jedoch beträchtliche Mengen an kontaminierenden Proteinen, wie sie auch in dieser Abbildung auffallen: In dem dort dargestellten Westernblot zum Nachweis von anti-GPI-Reaktivität war bei Probe 7 eine Doppelbande zu sehen. Die kontaminierende Bande war von ähnlicher Intensität wie die eigentliche GPI-Bande (Abb. 5).

Bald wurde eine erste kontaminierende Bande als Kreatinkinase M (CKM) identifiziert. Und es konnte gezeigt werden, dass 10/61 RA-Patienten Reaktivität gegen rekombinante (rek) CKM aufwiesen (Schubert et al., 2002). Weiterhin konnte die hohe Sensitivität und Spezifität in verschiedenen Studien nicht reproduziert werden (Tab. 6).

Studie	Im ELISA verwendetes Antigen	positive Seren
Schaller et al., 2001	kommerzielle GPI-Aufreinigung	44/69
Kassahn et al., 2002	rekombinantes, humanes GPI, HPLC-augereinigt	4/224
Herve et al., 2003	kommerzielle GPI-Aufreinigung wie Schaller et al., 2001	5/21
Matsumoto et al., 2003	rekombinantes, humanes GPI	31/239
Matsumoto et al., 2003	kommerzielle GPI-Aufreinigung wie Schaller et al., 2001	13/239

Tabelle 6: Studien zur anti-GPI-Reaktivität bei der RA.

Neben den in diesen Studien verwendeten ELISA wurde inzwischen auch eine Messanordnung etabliert, die auf Oberflächenplasmonenresonanz basiert. In dieser Studie wurden anti-GPI-IgG gegen rekombinantes, humanes GPI in SF bestimmt. Verglichen wurden SF von RA- und Arthrose-Patienten (jeweils n = 5). Der Mittelwert der RA-Gruppe (104,28 RU) war signifikant höher ($p < 0,0001$) als der der Arthrose-Gruppe (38,84 RU).

Nach der CKM wurde inzwischen auch ein weiteres Protein, das die kommerzielle Aufreinigung kontaminiert, als Phosphoglukomutase (PGM) identifiziert. Die Autoren dieser Studie bestimmten nur qualitativ, ob die Patienten anti-PGM-IgG und anti-GPI-IgG im Serum aufwiesen. Sie unterschieden dabei zwischen normal und hoch. Anti-GPI-IgG war bei 16/21 RA-Patienten normal und 5/21 hoch; anti-PGM-IgG war bei 12/21 normal und 8/21 hoch (Herve et al., 2003).

In einer weiteren Studie führte eine Untergruppen-Analyse bei RA-Patienten zu der Beobachtung, dass anti-GPI-IgG mit extraartikulären Komplikation der RA verbunden ist. So wiesen in dieser Studie 5 % aller unkomplizierten RA-Verläufe und 4 % der gesunden Kontrollpersonen anti-GPI-IgG auf, während dies bei 18 % der Patienten mit Rheumaknoten, 45 % mit rheumatischer Vaskulitis und 92 % mit Felty-Syndrom der Fall war (van Gaalen et al., 2004).

Zur Bedeutung von anti-GPI-IgG in der JIA lagen bisher nur wenige Daten vor. Matsumoto et al. schlossen in ihre Studie 19 Seren von 4 JRA-Patienten ein. Diese

Gruppe zeigte ähnliche Konzentrationen von anti-GPI-IgG wie RA-Patienten (Matsumoto et al., 2003). Diese kleine Population ist in keiner Weise repräsentativ für die JIA und ihre Untergruppen.

3.4 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll die Bedeutung einer humoralen Immunantwort gegen das systemische Antigen Glukose-6-phosphat-Isomerase bei der JIA und ihren Untergruppen untersucht werden.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Reagenzien

Standard Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, im Reinheitsgrad p. A. bei VWR International, Darmstadt bezogen.

Reagenz	Hersteller	Spezielle Angaben
Peroxidase-konjugierter Molekulargewichtstandard für Proteine	Amersham	ECL protein molecular weight markers
Molekulargewichtstandard für Proteine	Amersham	Rainbow coloured protein mw marker, high molecular range
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma	
Glukose-6-phosphat-Isomerase aus Kaninchenmuskel	Sigma	Ammoniumsulfat-Suspension
Immunglobulin-κ-Leichtkette	Biotrend	
Ladepuffer für Proteine	Invitrogen	NuPAGE LDS Sample Buffer 4x
30% w/v Acrylamid-Bisacrylamidlösung (37,5:1)	Roth	
Peroxidase-konjugierter, Affinitäts-aufgereinigter anti-human-IgG(Fc) (Ziege)	Rockland Immunochemicals	
Substrat für die Chemilumineszenz	Pierce	SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate
HIV-1 gp120	Advanced Biotechnologies Incorporated	
humane cDNA aus Skelettmuskel	Ambion	
Phosphohexose Isomerase Diagnostic Kit	Sigma	
Laktatdehydrogenase Diagnostic Kit	Sigma	
Hämoglobin (Plasma) Diagnostic Kit	Sigma	
Fruktose-6-phosphat NADP ⁺	VWR International	
Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase	VWR International	
Standardagarose	Roth	Agarose NEEQ Ultra Qualität
Niedrigschmelzende Agarose	Peqlab	PeqGold Low Melt Agarose
Plasmid-Isolierung	Macherey-Nagel	NucleoSpin Plasmid
DNA-Extraktion aus Agarosegelen	Macherey-Nagel	NucleoSpin Extract
Kompetente Zellen zur Klonierung	Promega	JM109 Competent Cells, high efficiency

Vektor zur T/A-Klonierung	Promega	pGEM-T Easy Vector Systems
Kompetente Zellen zur Expression	Novagen	BL21(DE3)pLysS
Expressionsvektor	Novagen	pET15b
Extraktionsreagenz	Novagen	BugBuster
Säulenmaterial	Novagen	HisBind Resin
Peroxidase-konjugiertes anti-poly-Histidin	Qiagen	PentaHis HRP Conjugate Kit
Blockierreagenz für ELISA	Roche	Blocking reagent for ELISA
Substrat für ELISA	Pierce	TMB

4.2 Enzyme

Enzyme	Hersteller	Spezielle Angaben
Trypsin	Promega	Trypsin, sequencing grade
Taq DNA Polymerase	Promega	
Restriktionsenzyme	New England Biolabs	
T4 DNA Ligase	Roche	
Nuklease	Novagen	Benzonase Nuclease

4.3 Materialien

Enzyme	Hersteller	Spezielle Angaben
Polystyrol-Halbmikroküvetten	Sarstedt	
μ-C18 Zip-Tips	Millipore	
Nitrozellulose-Membran, 45 μm	Invitrogen	
ELISA Platten	Nunc	Maxisorp

4.4 Geräte

Gerät	Hersteller	Spezielle Angaben
Spektrometer	Amersham	Ultrospec 3000
Thermostat (zum Spektrometer)	Haake	K10 - DC 10
Thermocycler	Perkin Elmer	GeneAmp PCR System 9700
Protein Gelelektrophorese	BioRad	Miniprotean 2
Massenspektrometer	Applied Biosystems	Voyager DE-STR
Elektroblotter	Invitrogen	Novex Western Transfer Apparatus
CCD-Kamera	Raytest	
Platten Photometer	Diagnostic Products Corporation	Milenia Kinetic Analyzer

4.5 Herstellerverzeichnis

Hersteller	Ort	Staat
Amersham Biosciences Europe	Freiburg	Deutschland
Applied Biosystems	Foster City	CA, USA
BioRad	Hercules	CA, USA
Biotrend	Köln	Deutschland
Diagnostic Products Corporation	Los Angeles	CA, USA
Haake	Karlsruhe	Deutschland
Invitrogen	Karlsruhe	Deutschland
Millipore	Billerica	MA, USA
New England Biolabs	Beverly	MA, USA
Novagen	Darmstadt	Deutschland
Nunc	Roskilde	Dänemark
Perkin Elmer	Wellesley	MA, USA
Pierce	Bonn	Deutschland
Promega	Mannheim	Deutschland
Qiagen	Hilden	Deutschland
Raytest	Straubenhardt	Deutschland
Roche	Mannheim	Deutschland
Rockland Immunochemicals	Gilbertsville	PA, USA
Roth	Karlsruhe	Deutschland
Sarstedt	Nürnbergrecht	Deutschland
Sigma	St. Louis	MO, USA
VWR International	Darmstadt	Deutschland

4.6 Sterilisation der verwendeten Lösungen und Nährmedien

Wenn nötig wurden alle nicht-thermolabilen Lösungen dampfdrucksterilisiert (145°C, 3 bar); thermolabile Lösungen wurden sterilfiltriert (Nitrozellulosefilter, 0,2 µm Porendurchmesser). Die verwendeten Nährmedien und Agarlösungen wurden vor der evtl. Zugabe von Antibiotika ebenfalls dampfdrucksterilisiert.

4.7 Standardlösungen

<u>PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)</u>		<u>PBST</u>	
0,144 g	KH ₂ PO ₄		PBS
9 g	NaCl	0,05 % (v/v)	Tween-20
0,795 g	Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O		

50 x TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)

242 g	Tris-Base
57,1 ml	Essigsäure
100 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
auf 1000 ml	mit H ₂ O auffüllen

6 x DNA Ladepuffer

0,25% (w/v)	Bromphenolblau
40% (w/v)	Saccharose

LB-Medium

10 g	Bacto-Tryptone
5 g	Bacto-Hefe-Extrakt
5 g	NaCl
auf 1000 ml	mit H ₂ O auffüllen

SOC-Medium

2 g	Bacto-Tryptone
0,5 g	Bacto-Hefe-Extrakt
1 ml	1 M NaCl
0,25 ml	1 M KCl
auf 97 ml	mit H ₂ O auffüllen autoklavieren
1 ml	1 M MgCl ₂ , filter-steril.
1 ml	2 M Glukose, filter-steril.

4.8 Patientenproben

Insgesamt wurden 324 Serum-Proben von 99 JIA-Patienten (Tab. 7), 34 RA-Patienten, 8 Arthralgie-Patienten und 11 gesunden Individuen, sowie 48 SF-Proben von 29 JIA Patienten und 2 RA-Patienten untersucht. Die Proben wurden nach Aufklärung der Patienten bzw. Eltern mit deren Einverständnis im Rahmen notwendiger therapeutischer und diagnostischer Eingriffe gewonnen. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Tübingen lag vor. Da die Probenvolumina eingeschränkt waren, war es nicht immer möglich jede Untersuchung mit jeder Probe durchzuführen.

Nach der Gewinnung wurden die Proben für 10 min bei 2500 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bis zur Untersuchung bei -20°C gelagert. Die Diagnosen wurden nach den ILAR-Kriterien (Petty et al., 1998) für die JIA und nach den ACR-Kriterien (Arnett et al., 1988) für die RA gestellt.

JIA-Verlaufsform	n (♂/♀)	Mittelwert und Spannweite [a]	
		Untersuchungszeitpunkt	Alter zum Krankheitsbeginn
oligoartikulär persistent	26 (10/16)	11,0 [4,9-16,0]	5,3 [1,5-15,0]
oligoartikulär extended	10 (1/9)	13,3 [8,6-18,9]	3,9 [0,8-10,5]
polyartikulär RF negativ	17 (1/16)	10,6 [2,6-18,0]	5,9 [1,3-15,3]
polyartikulär RF positiv	5 (2/3)	18,7 [17,1-21,4]	11,6 [2,0-16,8]
systemisch	9 (6/3)	11,6 [5,4-17,6]	5,6 [1,3-13,0]
psoriatisch	6 (4/2)	12,1 [3,8-20,5]	6,7 [1,0-12,0]
Enthesitis-assoziiert	13 (11/2)	14,6 [11,6-18,9]	10,2 [2,0-17,0]
nicht kategorisierbar	17 (7/10)	11,4 [3,3-22,2]	6,1 [1,3-16,0]
gesamt	103 (42/61)	12,2 [2,6-22,2]	6,5 [0,8-17,0]

Tabelle 7: JIA-Patienten

4.9 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland, bezogen.

Name	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Schmelzpunkt T _M
hCKM1	cat atg cca ttc ggt aac acc	cag gcg cct act tct gg	48°C
hGPI1	cat atg gcc gct ctc acc	atg agc acg agt tta ttg ga	52°C
hGPI2	cgc gtc tca ctc agt gta cc	tca cag agg agg ctg cag at	50°C
hPGM1	cat atg gtg aag atc gtg aca g	agg cct gtc ttc tta ggt ga	49°C

Tabelle 8: Oligonukleotide

4.10 Statistik

Für alle statistischen Berechnungen wurde die Software GraphPad Prism 4 für Windows, Version 4.01 von GraphPad Software Inc. San Diego, USA, verwendet.

Zum Vergleich von mehr als zwei Mittelwerten (z.B. Vergleich der Enzymaktivitäten oder anti-GPI-IgG-Konzentrationen in verschiedenen Diagnosegruppen) wurde eine einfache Varianzanalyse durchgeführt (one-way analysis of variance, one way ANOVA). Führt die Varianzanalyse zur Verwerfung der Nullhypothese ($p < 0,05$), d.h. mindestens zwei Mittelwerte unterschieden sich signifikant, wurden multiple Mittelwertvergleiche angewendet: Patientengruppen wurden mit der gesunden Kontrollgruppe anhand des Dunnett-Test verglichen. Ein Vergleich aller Mittelwerte miteinander wurde mittels des Tukey-Kramer-Tests durchgeführt.

Zum Vergleich zweier Mittelwerte wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben eingesetzt. Mittelwerte mit theoretischen Werten (z.B. Normbereiche) wurden ebenfalls mittels eines t-Tests bewertet. Zur Korrelationsanalyse wurde in der Regel der Pearsonsche Maßkorrelationskoeffizient verwendet. Waren die Voraussetzungen hierfür nicht gegeben wurde der Spearmansche Rangkorrelationskoeffizient berechnet. Messwerte mit verschiedenen Kategorien sind in Box-Whisker-Grafiken dargestellt. Die Box repräsentiert den Bereich zwischen der 25. und 75. Perzentile, die Whiskers den zwischen der 5. und 95. In der Box ist der Median durch einen Balken und der Mittelwert durch einen Kreis markiert.

4.11 Protein-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in Plattengelen (Größe: 83 mm x 73 mm x 1 mm) erfolgte in einer vertikalen Elektrophoreseapparatur. Hierbei wurde das diskontinuierliche System von Lämmli (Laemmli, 1970) verwendet, in dem die Probe zunächst in einem Sammelgel konzentriert und anschließend in einem Trenngel aufgetrennt wird.

<u>Sammelgel-Puffer (4x)</u>		<u>Trenngel-Puffer (4x)</u>		<u>Laufpuffer (10x)</u>	
0,5 M	Tris-HCl pH 6,8	1,5 M	Tris-HCl pH 8,8	0,25 M	Tris-Base
0,4% w/v	SDS	0,4% w/v	SDS	1,92 M	Glycin
				1% w/v	SDS

Verwendet wurden 10% und 15% Gele. Dazu wurden 5ml bzw. 7,5 ml einer 30% (w/v) Acrylamid-Bisacrylamidlösung mit 3,75 ml 4x Trenngelpuffer, 6,25 ml bzw. 3,75 ml Wasser und 10 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) versetzt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 500 µl 10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS) gestartet und die Lösung anschließend zwischen die Platten ca. 5 cm hoch gegossen. Nach Abschluß der Polymerisation wurde das Sammelgel darüber geschichtet. Das Sammelgel setzte sich wie folgt zusammen: 650 µl 30% (w/v) Acrylamid-Bisacrylamidlösung (37,5:1), 1,25 ml 4x Sammelgelpuffer, 3,05 ml Wasser, 5 µl TEMED und 50 µl APS. Je nach Bedarf wurde ein 10 Loch- oder ein 2D-(eine große und eine kleine Tasche) Kamm eingefügt. Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Proben 5 min bei 96°C in Ladepuffer unter Zugabe von 100 mM Dithiothreitol inkubiert. Die Auftrennung erfolgte in der Regel für 50 min bei 200 V.

4.12 Anfärbung von Proteingelen

Wenn nötig, wurden Proteine in den Gelen durch eine Coomassie-Blau-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese für 30 min in 25% (v/v) Isopropanol und 10% (v/v) Essigsäure inkubiert. Anschließend erfolgte die Anfärbung mit 0,006% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 in 10% (v/v) Essigsäure. Nach einstündiger Inkubation wurde das Gel in 10% (v/v) Essigsäure bis zum gewünschten Kontrast entfärbt.

4.13 Immunoblots zur Detektion von IgG-Antikörpern gegen die GPI-Aufreinigung

30 µg GPI (Aufreinigung aus Kaninchenmuskel, Sigma) und 0,75 µg Immunglobulin-κ-Leichtkette (Biotrend) wurden durch 15% Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Verwendet wurden 2D-Kämme, die aus einer kleinen Tasche für einen Standard und einer großen Tasche für die Probe bestanden. Das ganze Gel wurde auf eine 0,45 µm Nitrozellulosemembran (Invitrogen) für 1 h bei 30 V elektrogeblottet (Transferpuffer: NuPAGE, Invitrogen). Zur Kontrolle des Transfers wurde der Blot mit 0,2% (w/v) Ponceau S, 3% (w/v) Trichloressigsäure reversibel angefärbt. Nach Entfärbung mit Wasser wurde in Blockierlösung (5% (w/v) Magermilchpulver in PBST) 3 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde der Blot in 0,5 cm breite, längliche Streifen

geschnitten und über Nacht (o/n) bei 4°C auf einem Schütteltisch mit 1:100 (in Blockierlösung) verdünnten Seren oder SF inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit PBST wurde gebundenes IgG durch eine einstündige Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten, Affinitäts-aufgereinigten anti-human-IgG(Fc) (Rockland Immunochemicals, 1:20000 in Blockierlösung) detektiert. Nach sechsmaligem Waschen mit PBST wurden zur Visualisierung der Banden ein chemilumineszentes Substrat (SuperSignal Chemiluminescent Substrat, Pierce) zugegeben. Die Chemilumineszenz wurde mit einer CCD-Kamera unter Verwendung der Software DIANA 1.6 (Raytest) aufgenommen. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit der Software AIDA 2.1 (Raytest). Die Chemilumineszenz der Banden, die durch Bindung des anti-IgG(Fc)-Antikörpers an IgG ausgelöst wurde, wurde ins Verhältnis gesetzt zu derjenigen, die durch Bindung dieses anti-IgG(Fc) an die Immunglobulin- κ -Leichtkette entstand. Die Verwendung der Immunglobulin- κ -Leichtkette als interner Standard war möglich wegen der Kreuzreaktivität des verwendeten, Affinitäts-gereinigten anti-IgG(Fc) Antikörpers.

4.14 MALDI-TOF Massenspektrometrie

2 μg der GPI-Aufreinigung aus Kaninchenmuskel wurden per 10% SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend Coomassie-Blau gefärbt. Entsprechende Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in 1 mm³ große Stücke geschnitten. Diese wurden in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und zweimal mit Wasser gewaschen. Danach wurde durch Zugabe von 40 μl 50% (v/v) Acetonitril für 15 min entfärbt. Es folgte eine Inkubation in 40 μl reinen Acetonitril für 15 min. Der Überstand wurde verworfen und 80 μl 50% (v/v) Acetonitril in 100 mM Ammoniumbikarbonat hinzugefügt. Nach 15 min wurde der Überstand abgenommen und die Gelstückchen in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wurden sie in 20 μl Trypsinlösung (0,01 g/l Trypsin, sequencing grade, Promega; in 25 mM Ammoniumbikarbonat, 5 mM CaCl₂) rehydriert. Nach 45 min Inkubation auf Eis wurde der Überstand entfernt und soviel 25 mM Ammoniumbikarbonat, 5 mM CaCl₂ hinzugefügt, dass die Stückchen bedeckt waren. Der Verdau wurde für weitere 16 h bei 37°C fortgesetzt. Danach wurden 10 μl 2% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) zugegeben und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. In einem weiteren Extraktionsschritt wurden 50 μl 0,1% (v/v) TFA zugefügt und für 30 min in einem Ultraschallbad inkubiert.

Weitere zwei Extraktionen unter gleichen Bedingungen schlossen sich an in 30% (v/v) und 60% (v/v) Acetonitril in 0,1% (v/v) TFA. Die zusammengeführten Extrakte wurden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, in 0,3 % (v/v) TFA resuspendiert und durch μ -C18 Zip-Tips (Millipore) entsalzt.

Die Proteine wurden durch Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) - time of flight (TOF) - Massenspektrometrie an einem Voyager DE-STR Massenspektrometer (Applied Biosystems) analysiert. Die Peptide wurden kokristallisiert mit einem gleichen Volumen einer 1:20 Verdünnung einer gesättigten α -Cyano-4-hydroxycimtsäure-Lösung in 30 % (v/v) Acetonitril, 0,3 % TFA. Die Spektren wurden extern durch Verwendung einer Standard-Peptidmischung kalibriert.

Die Datenbanksuche wurde unter Verwendung der im Internet freizugänglichen Software Mascot (www.matrixscience.com, Matrix Science LTd., London, UK) durchgeführt. Ein Trypsinfehlchnitt und eine Methionin-Oxidation wurden für die Datenbanksuche zugelassen. Die Massentoleranz für den Vergleich der experimentellen mit den vorhergesagten Massen wurde auf 100 ppm gesetzt. Die Ergebnisse (scores) werden als $-10 \times \log_{10}p$ ausgegeben, mit p als der absoluten Wahrscheinlichkeit dafür, dass dieser Treffer zufällig ist. Peptidfragmente aus den Trypsinverdaus, die eine ausreichende Signalintensität aufwiesen, wurden durch eine Postsource-decay-Analyse auf dem gleichen Gerät sequenziert.

4.15 Messung der GPI-Aktivität

Die Enzymaktivität der GPI wurde mittels einer gekoppelten enzymatischen Reaktion (Abb. 6) spektrophotometrisch bestimmt. Hierzu wurde ein kommerzielles Reagenziensystem verwendet. Hierbei wurde die Probe mit einer Reaktionslösung inkubiert, die einen Überschuß Fruktose-6-phosphat, NADP^+ und Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase enthielt. Dabei wurde Fruktose-6-phosphat durch die GPI-Aktivität in der Probe zu Glukose-6-phosphat isomerisiert, das dann quantitativ durch die Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase in 6-Phosphoglukonat oxidiert wurde. Das dabei entstehende NADPH wurde spektrophotometrisch anhand einer Zunahme der Extinktion bei 340 nm erfasst. 30 μl der Probe wurden mit 970 μl Reaktionslösung versetzt, die direkt in ein auf 25°C temperiertes Spektrometer gegeben wurde. Die

Messung der Extinktion bei 340 nm erfolgte in Intervallen von 10 s über einen Zeitraum von 720 s. Als Leerwert diente die Messung an Messposition 1 zum Zeitpunkt $t = 0$. Die Verwendung eines Messwertes als Nullwert, der GPI-Aktivität enthält, ist insofern unproblematisch, da eine Extinktionsänderung und keine absolute Extinktion gemessen wurde und da das Reagenziensystem ohne Zugabe von Serum bzw. SF keine Extinktionsänderung zeigte. Dieses Vorgehen wurde vor der Messung aller Seren validiert. Der lineare Bereich des NADPH-Anstiegs wurde zur Berechnung der GPI-Aktivität wie folgt herangezogen:

$$\text{GPI-Aktivität [U/l]} = \frac{\Delta OD_{340nm}}{\text{min}} \times \frac{\mu\text{mol} \cdot \text{cm}}{6,22\text{ml}} \times \frac{\text{Gesamtvolumen}}{\text{Probenvolumen}} \times 1000$$

Als Einheit wurde U verwendet. Diese ist folgendermaßen definiert: 1 U eines Enzyms setzt 1 μmol Substrat pro Minute um. Wenn nötig wurden die Proben mit 0,9% NaCl in 1:5 Schritten verdünnt.

Alle hier dargestellten GPI-Aktivitäten wurden auf diese Weise bestimmt. Da das fertige Reagenziensystem zum Ende der Untersuchungen nicht mehr erhältlich war, wurde eine Protokoll (Beutler, 1984) modifiziert und etabliert, so dass auch weiterhin eine Messung der GPI-Aktivität möglich ist. Folgende Reaktionsbedingungen erwiesen sich zur Messung von 30 μl Serum in einem Gesamtvolumen von 1 ml bei 25°C als optimal: 50 mM Tris-HCl pH 7,8, 3 mM MgCl_2 , 50 mM Fruktose-6-phosphat, 0,5 mM NADP^+ und 4 $\mu\text{g/ml}$ (entspricht > 800 U/l) Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (aus *L. mesenteroides*). Vor Zugabe der Probe wurde die Reaktionslösung 5 min bei RT vorinkubiert.

4.16 Freies Hämoglobin

Zur Bestimmung des freien Serum-Hämoglobins wurde ein kommerzielles System verwendet. Dieser spektrometrische Test basiert auf der Peroxidase-Aktivität des

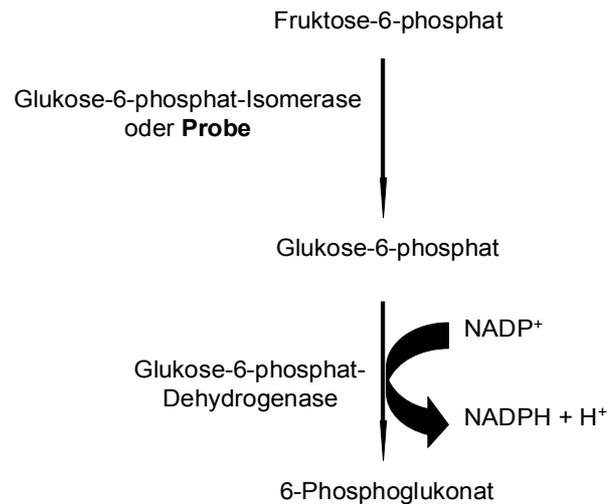


Abbildung 6: Reaktionsschema zur Bestimmung der GPI-Aktivität

Hämoglobins. 5 µl der Probe wurden zu 500 µl einer 5 mg/ml (in 90% v/v Essigsäure) 3-,3'-,5-,5'-Tetramethylbenzidin-Lösung gegeben. Anschließend wurden 500 µl 0,3% (v/v) Wasserstoffperoxid hinzugefügt und nach exakt 10 min die Extinktion bei 600 nm gegen Wasser als Leerwert gemessen. Zur Eichung wurde eine 30 mg/dl Hämoglobin-Standardlösung eingesetzt. Die Hämoglobin-Konzentration wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Hämoglobin [mg/dl]} = \frac{\text{OD}_{\text{Probe}} - \text{OD}_{\text{Leerwert}}}{\text{OD}_{\text{Standard}} - \text{OD}_{\text{Leerwert}}} \times \text{Konzentration}_{\text{Standard}} [\text{mg/dl}]$$

4.17 Laktat-Dehydrogenase Aktivität

Zur Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität wurde ein kommerzielles Reagenziensystem verwendet. LDH katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Laktat bei gleichzeitiger äquimolarer Oxidation von NADH zu NAD⁺. Diese Oxidation führt zu einer Abnahme der Extinktion bei 340 nm. 20 µl der Probe wurden zu 800 µl der Reaktionslösung gegeben. Die Messung und Berechnung der LDH-Aktivität erfolgte analog der der GPI-Aktivität.

4.18 Herstellung rekombinanter, humaner PGM, GPI und CKM

4.18.1 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Die Auftrennung der negativ-geladenen Nukleinsäuremoleküle in Agarosegelen beruht auf dem Molekularsiebeffekt des Trägermaterials, Agarose. Die elektrophoretische Beweglichkeit von linearen Nukleinsäuremolekülen ist bis zu einer gewissen Grenze umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde horizontal in Flachbettgelapparaturen durchgeführt. Die Lösung wurde in die Gelform gegossen und der Taschenformer eingesetzt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 V/cm. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel mit einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) angefärbt. Die Visualisierung der DNA erfolgte durch Anregung des interkalierten Ethidiumbromids durch Licht der Wellenlänge 312 nm. Dies führte zu einer Fluoreszenz im orange-roten Spektralbereich. Die Dokumentation erfolgte mit einer analogen Kamera. Für analytische Gele kam eine Standardagarose (Roth) in der Konzentration von 1 bis 1,5 % (w/v), für präparative

eine niedrigschmelzende (Peglab) in der Konzentration von 2 % (w/v) jeweils in 1x TAE zum Einsatz.

4.18.2 POLYMERASE KETTENREAKTION

Wenn nicht anders angegeben, wurden für die PCR folgende Bedingungen verwendet: 2 mM MgCl₂, 50 µM jeder Base, 1 µM Primer, 1 U Taq DNA Polymerase. Als Matrize wurden zugefügt 1 µl der cDNA (0,5 ng/µl), 1 µl PCR-Produkt oder 1 µl eines durch Aufkochen von Bakterien gewonnenen Lysats.

Die Denaturierung erfolgte für 2 min. bei 95°C. Angeschlossen wurden in der Regel 35 Zyklen mit folgenden Schritten: 95°C für 45 s, T_M (Tab. 8, Oligonukleotide) für 35 s und 72°C für 1 min. Abschließend erfolgte eine 5 min. Inkubation bei 72°C.

4.18.3 AUFREINIGUNG VON PLASMID-DNA AUS BAKTERIENKULTUREN

Zur Plasmidisolierung wurden 5 ml Übernachtskultur in LB-Medium angesetzt und bei 37°C bei 200 rpm geschüttelt. Die Aufreinigung erfolgte mithilfe eines Aufreinigungssystems, bei dem nach alkalischer Lyse der Zellen Plasmid-DNA an Silikamembran adhärert (Macherey-Nagel).

4.18.4 AUFREINIGUNG VON DNA AUS AGAROSEGELEN

Zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde niedrigschmelzende Agarose eingesetzt. Nach möglichst kurzer UV-Exposition wurden die interessierenden Banden knapp ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit einem auf einer Silikamembran basierenden Aufreinigungssystem (Machery-Nagel).

4.18.5 KLONIERUNG

Zur rekombinanten Herstellung humaner PGM, GPI und CKM wurde eine kommerziell erhältliche cDNA aus menschlichem Skelettmuskel eingesetzt (Ambion). Für PGM und CKM war eine Einzelschritt-PCR ausreichend, während für die GPI eine Zweischnitt-verschachtelte PCR zum Einsatz kam (siehe Abb. 7).

Die Taq DNA Polymerase hat eine von Matrizen unabhängige Terminale-Transferase-Aktivität, die einzelne Desoxyadenosine an 3'-Enden anhängt. Somit können diese PCR-Produkte effizient in linearisierte Vektoren mit 3'-Desoxythymidinüberhängen ligiert werden.

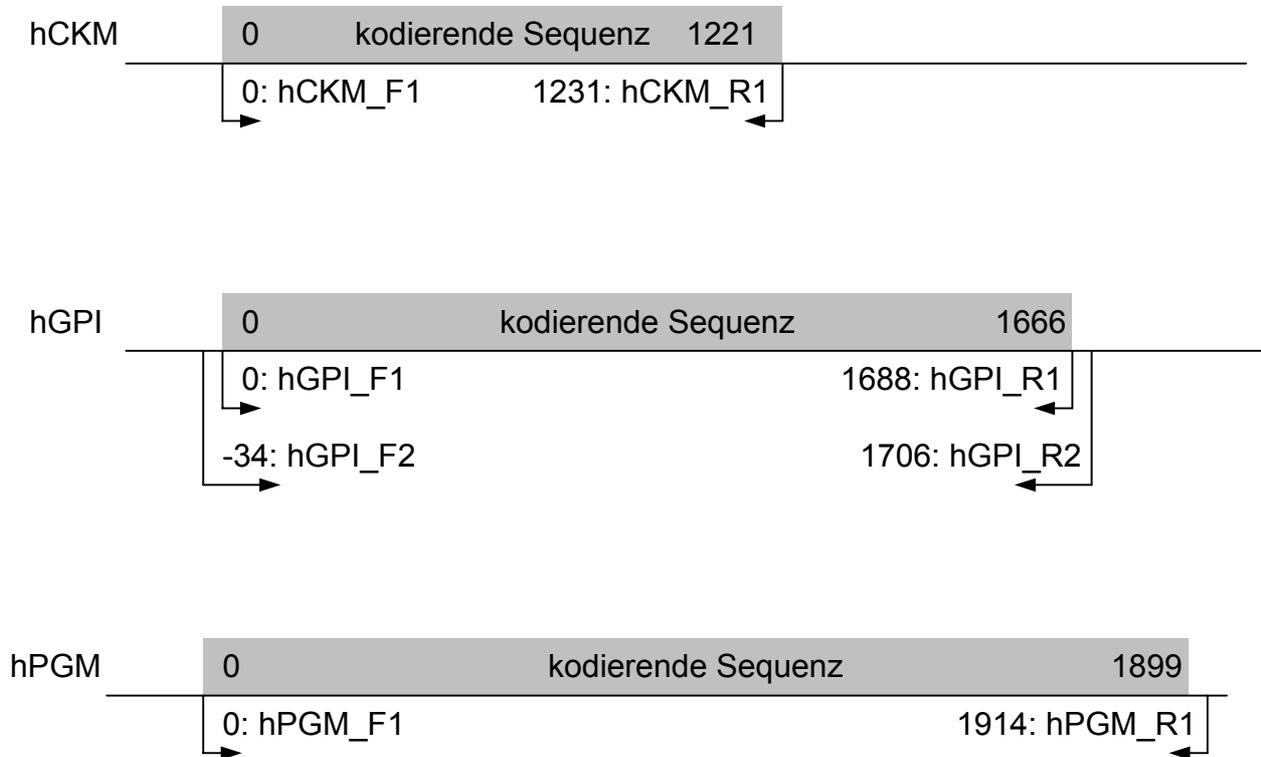


Abbildung 7: PCR-Strategie. Angegeben sind die Basenpaarpositionen unter Verwendung von in GenBank hinterlegten Sequenzen. Für die humane GPI wurde NM000175, für humane CKM NM001284 und für humane PGM NM002633 verwendet.

Nach Aufreinigung und Extraktion der PCR-Produkte aus einem Agarosegel wurden diese in den pGEM-T Easy Vector (Promega) o/n bei 4°C ligiert, dabei wurden die Anweisungen des Herstellers befolgt (pGEM-T Easy Vector Systems, Promega).

Die Transformation erfolgte in den *E.coli* Stamm JM109 (Promega). 1 µl der Ligationreaktion wurde für 10 min auf Eis mit 100 µl der kompetenten Zellen inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeschock bei 42°C für genau 45 s, gefolgt von einer 2 min Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium wurden die Kulturen für 1 h bei 37°C geschüttelt. Dann wurden 50 µl der Bakteriensuspension auf Agarplatten (100 µg/ml Ampicillin enthaltend) ausplattiert, die zuvor mit 100 µl 100 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktosid) und 20 µl 50 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-

indolyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal) imprägniert worden waren. Das Ampicillin diente zur Selektion von Klonen, die intaktes Plasmid aufgenommen hatten. IPTG und X-Gal erlaubten eine Blau-weiß-Selektion von Klonen, die ein Plasmid mit erfolgreicher Ligation aufgenommen hatten. Die Aufnahme der richtigen Sequenz in die Klone wurde weiterhin durch Gen-spezifische PCR und durch Sequenzierung überprüft. Die für die Proteine kodierende Sequenz wurde mittels eines NdeI-Verdau (5'-Schnittstelle wurde durch den Primer eingefügt, 3'-Schnittstelle entstammt dem Vektor) ausgeschnitten. Als Expressionsvektor wurde der pET15b (Novagen) ebenfalls durch einen NdeI-Verdau vorbereitet. Nach Gelaufreinigung wurden die Fragmente in einem Verhältnis Insert zu Vektor von 5:1 o/n bei 4°C mittels T4 DNA Ligase (Roche) ligiert. Nach Transformation (wie oben) wurden positive Klone und die Orientierung des Fragmentes durch Gen-spezifische PCR und analytische Verdau identifiziert. Der pET15b-Vektor verfügt über einen T7 *lac* Promotor und eine N-terminale Poly-Histidin-Sequenz. Dass das interessierende Protein im richtigen Leseraster zur Poly-Histidin-Sequenz war, wurde durch Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde der Expressionsvektor in Expressionbakterien *E.coli* Stamm BL21(DE3)pLysS transformiert.

4.18.6 EXPRESSION UND AUFREINGUNG VON REKOMBINANTEM HUMANEM PGM, GPI UND CKM

Im folgenden wird LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin und 34 μ g/ml Chloramphenicol verwendet. Mit entsprechenden Klonen wurden 10 ml Medium inokuliert und o/n bei 37°C geschüttelt. Am folgenden Tag wurden diese Kulturen abzentrifugiert, gewaschen und 1 ml Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde zu 500 ml Medium gegeben. Diese Kultur wurde dann bis zu einer Bakteriendichte von $OD_{600} = 1$ geschüttelt. Daraufhin wurden die Kulturen auf zwei Erlenmeyer-Kolben verteilt: zu einem der beiden wurde IPTG bis zu einer Konzentration von 1 mM hinzugefügt. Anschließend wurden beide für weitere 200 min bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Danach wurden die Bakterien für 10 min bei 10000 g und 4°C abzentrifugiert und das Pellet o/n bei -20°C gelagert. Dieses Einfrieren führte zu einer Freisetzung eines endogenem Lysozyms, das durch das pLysS-Plasmid kodiert wurde. Am nächsten Morgen wurde das Pellet in 5 ml pro 1 g Pellet Extraktionslösung resuspendiert (BugBuster, Novagen, mit 25 U/ml Nuklease) und für 10 min. bei RT sanft geschüt-

telt. Wenn nicht anders vermerkt, erfolgten alle folgenden Schritte bei 4°C. Es folgte eine 30 min Zentrifugation bei 16000 g. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt und bis zur chromatographischen Aufreinigung bei 4°C gelagert.

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte affinitätschromatographisch basierend auf einer Interaktion der Poly-Histidin-Sequenz mit einer Nickel-beladenen Agarose.

Zur Chromatographie wurden 5 ml Iminodiazetat-Agarose-Suspension (HisBind Resin, Novagen) in eine Säule gegeben. Nach Setzen des Gelbetts (= 1 vol) wurde mit 3 vol Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Agarose mit Nickel beladen durch Waschen mit 5 vol 1x His-Beladungspuffer mit Ni²⁺ vorbereitet.

8x His-Beladungspuffer

400 mM NiSO₄

8x His-Bindepuffer

40 mM Imidazol
4 M NaCl
160 mM Tris-HCl pH 7,9

8x His-Waschpuffer

480 mM Imidazol
4 M NaCl
160 mM Tris-HCl pH 7,9

4x His-Elutionspuffer

4 M Imidazol
2 M NaCl
80 mM Tris-HCl pH 7,9

Nach Äquilibrierung mit 3 vol 1x His-Bindungspuffer wurde das Bakterienlysat auf die Säule gegeben. Hieran schlossen sich Waschschrte mit 10 vol 1x His-Bindungspuffer und stringenter mit 6 vol 1x His-Waschpuffer an. Die Proteine wurden fraktioniert mit 1x His-Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die Eluate wurden mittels Westernblots, bei denen anti-Poly-Histidin (Qiagen) und anti-GPI-positive Seren (bekannt durch die Westernblots mit der kommerziellen GPI-Aufreinigung) überprüft. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford bestimmt (mit bovinem Serumalbumin, BSA, als Standard).

4.19 ELISA

Zur genauen Quantifizierung der Konzentrationen von anti-PGM-IgG, anti-GPI-IgG und anti-CKM-IgG in den Seren und SF wurde ein ELISA eingesetzt. Als unabhängiges Kontrollantigen wurde BSA verwendet. Folgende Reaktionsbedingungen erwiesen sich als optimal: ELISA-Platten (Nunc) wurden o/n mit 5 µg/ml rekPGM sowie mit 20 µg/ml rekGPI, rekCKM, BSA und der kommerziellen GPI-Aufreinigung (jeweils in PBS) beschichtet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden freie Bindungsstellen durch Inkubation mit einem Blockierreagenz auf Gelatinebasis (Roche) für 1 h bei 37°C belegt. Anschließend wurden die Platten zweimal mit PBST gewaschen. Die Serum- und SF-Proben wurden in einer Verdünnung von 1:400 in Blockierreagenz o/n bei 4°C auf die Platten gegeben. Die Platten wurden dann dreimal mit PBST gewaschen, bevor zur Detektion von gebundenem Immunglobulin G Meerrettich-Peroxidase konjugiertes F(ab')₂ Fragment von affinitätsaufgereinigtem anti-humanem-IgG (aus Ziege, Rockland Immunochemicals) in einer Verdünnung von 1:50.000 in Blockierreagenz hinzugefügt wurde. Vor Zugabe der Substratlösung (TMB, Pierce) wurde dreimal mit PBST gewaschen. Die Farbentwicklung wurde nach 20 min Inkubation bei RT durch Zugabe eines gleichen Volumens 2 M H₂SO₄ gestoppt. Die Differenz der Extinktionen bei 450 nm und 630 nm wurde mittels eines Platten-Photometers gemessen. Ein Leerwert (kein Antigen, nur Blockierreagenz) wurde für jede Patientenprobe (d.h. unspezifische Bindung des Serums bzw. SF an das Blockierreagenz) bestimmt und von den spezifischen Extinktionen subtrahiert. Alle Messungen wurden mindestens zweifach durchgeführt. Die Standardisierung der unterschiedlichen Messungen erfolgte durch Einschluss eines Serums in alle Experimente, das mäßig positiv auf alle drei Antigene reagierte.

5 ERGEBNISSE

5.1 Messung der GPI Aktivität

5.1.1 GPI-AKTIVITÄT IN SERUM UND SF

Die Enzymaktivität der GPI wurde als Surrogatparameter für die Konzentration des nativen Antigens in 299 Seren (von 95 JIA Patienten, 6 Arthralgie Patienten, 34 RA Patienten und 10 gesunden Individuen) und 35 SF (von 20 JIA Patienten und 2 RA Patienten) bestimmt. In Abb. 8 und Tab. A1 sind die Ergebnisse für die Serumproben zusammengefaßt.

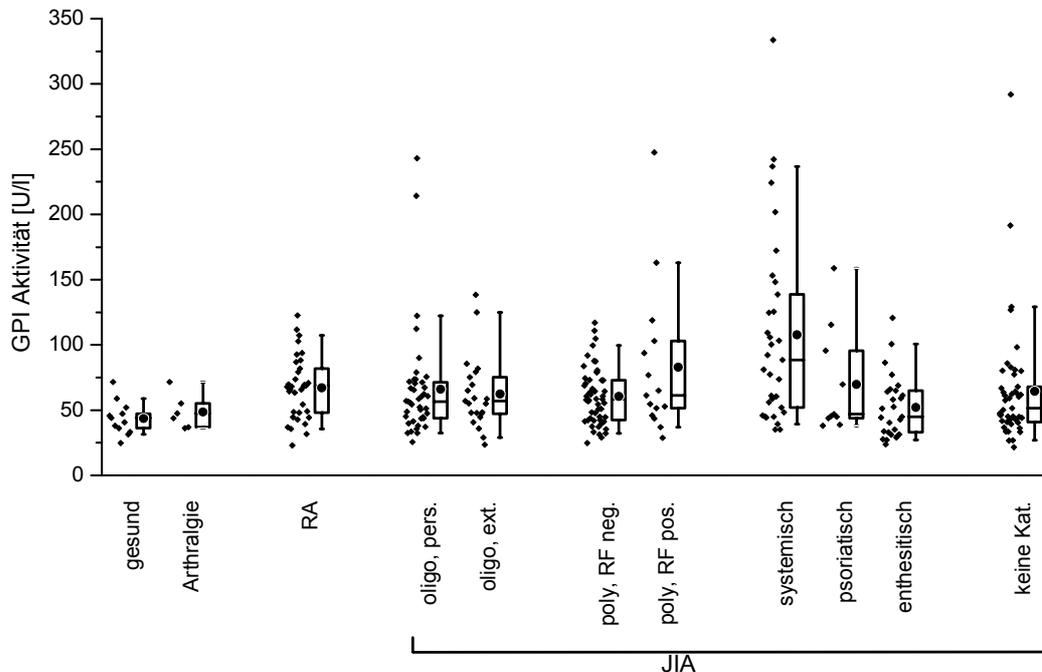


Abbildung 8: GPI-Aktivität im Serum von Patienten mit verschiedenen Diagnosen

Der Normbereich für die GPI-Aktivität im Serum liegt bei 15-75 U/l (Messung bei 25°C) (Bodansky und Schwartz, 1966). Nur der Mittelwert bei systemischer JIA (107,9 U/l) lag statistisch signifikant über diesem Normbereich ($p = 0,0138$). Diese Patientengruppe war auch die einzige, die gegenüber der von uns

verwendeten gesunden Kontrollgruppe signifikant höhere Enzymaktivitäten aufwies ($p < 0,01$, Tab. A2 und A3).

Ein Vergleich aller Mittelwerte miteinander (Tukey-Kramer-Test, Tab. A4) zeigte, dass die systemische JIA auch innerhalb der JIA hinsichtlich der Serum-GPI-Aktivitäten eine Sonderstellung einnahm: Sie zeigte signifikant höhere Mittelwerte als die anderen JIA-Untergruppen (Ausnahme: Psoriasis-JIA, nicht kategorisierbare JIA und polyartikuläre, RF positive JIA).

Wenn auch nicht signifikant, so war aber doch auffallend, dass der zweithöchste Mittelwert bei der polyartikulären, RF positiven Verlaufsform (82,94 U/l) und dass die niedrigsten Mittelwerte bei gesunden Kontrollen (43,63 U/l) und bei Patienten, die an nicht entzündlichen Gelenkbeschwerden litten (48,56 U/l), gefunden wurden. Dies legte die Vermutung nahe, dass die GPI-Aktivität im Serum – und damit das native Antigen – mit zunehmender entzündlicher Aktivität der zu Grunde liegenden Krankheit ansteigt, wenn auch nur sehr schwach ausgeprägt.

Bei JIA-Patienten wurde im Vergleich zu gesunden Kontrollen, Arthralgie und RA auch eine deutliche Zunahme der Variationsbreite und eine rechtsgipflige Verteilung (d.h. der Mittelwert ist größer als der Median) beobachtet. Dies führt zu der Feststellung, dass eine deutliche Aktivitätszunahme durchaus bei einzelnen Patienten gemessen werden konnte, allerdings nicht in ganzen Diagnosegruppen.

Inwieweit ein laborchemischer Wert als Diagnostikum geeignet ist, lässt sich anhand von Receiver-Operator-Kurven (ROC) darstellen. Hierbei wird die Sensitivität eines Tests gegen 100% - Spezifität für unterschiedliche Grenzwerte aufgetragen. Ein perfekter Test würde eine Fläche unter der Kurve (AUC) von 1 ergeben. In Abb. 9 sind die ROC Kurven für die Serum-GPI-Aktivität für alle JIA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Abb. 9a) und für Patienten mit systemischer JIA im Vergleich zu allen anderen JIA-Patienten (Abb. 9b) dargestellt. Die AUC beträgt 0,70 bzw. 0,71 . Dies sowie die Form der Kurve verdeutlicht, dass für die Serum-GPI-Aktivität kein Grenzwert mit hoher Sensitivität und Spezifität zur Diagnose einer JIA

bzw. Differenzierung der systemischen JIA von anderen JIA-Formen festgelegt werden kann.

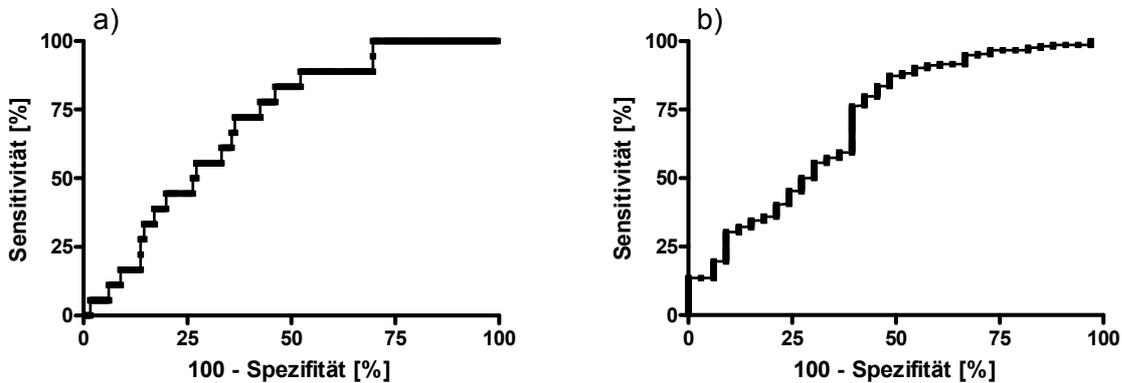


Abbildung 9: ROC-Kurven für die Serum-GPI-Aktivität bei a) JIA Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen und b) Patienten mit systemischer JIA im Vergleich zu allen anderen JIA-Patienten. Die AUC beträgt bei a) 0,70 und bei b) 0,71.

Die Bestimmung der GPI-Aktivität in SF von JIA- (n = 20) und RA- (n = 2) Patienten lieferte zum Teil extrem erhöhte Werte (bis zu 2780 U/l), wobei mehr als 50 % der SF-Messwerte zwei Standardabweichungen über dem Mittelwert der Serum-messwerte lag (Abb. 10 und Tab. A5).

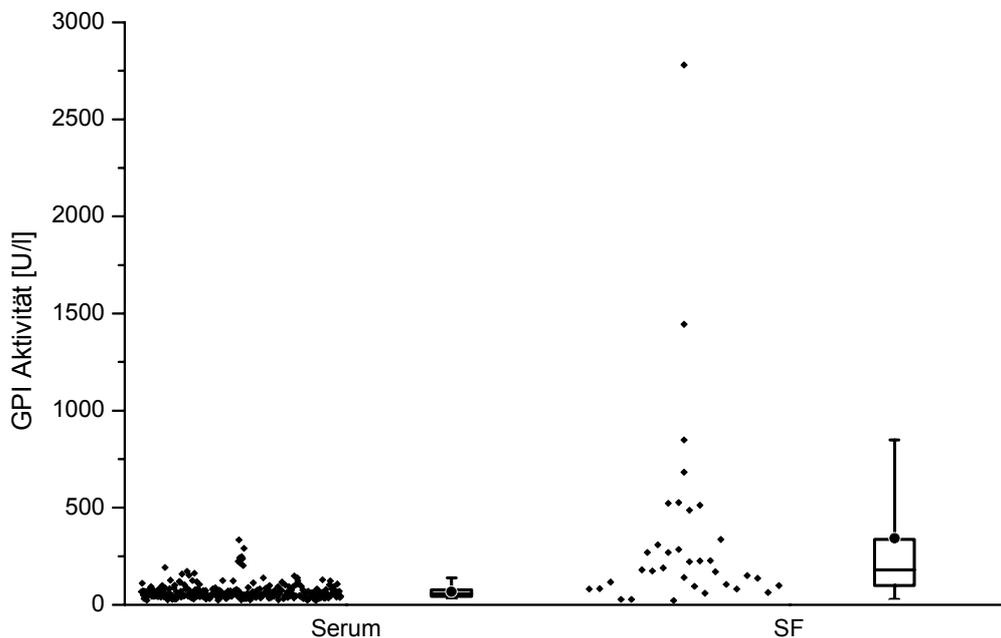


Abbildung 10: GPI-Aktivität in Serum und SF.

Ein Zusammenhang zwischen der GPI-Aktivität im Serum und in der SF schien nicht zu bestehen (Tab. 9): So gab es Seren mit verhältnismäßig hoher GPI-Aktivität, bei denen in der SF eine mittlere zu messen war und umgekehrt.

Serum		SF	
Rang	GPI [U/l]	GPI [U/l]	Rang
1	26,60	116,46	3
2	32,39	189,84	7
3	33,28	80,40	1
4	35,26	268,62	9
5	35,68	849,45	14
6	41,23	169,86	6
7	46,89	2779,50	15
8	52,46	80,91	2
9	55,04	486,89	11
10	58,70	225,64	8
11	78,98	141,13	4
12	85,65	525,60	13
13	105,80	522,30	12
14	126,70	150,47	5
15	291,80	337,00	10

Tabelle 9: Korrelation der GPI-Aktivität im Serum und entsprechenden SF-Proben (n = 15). Serumprobe und die gleichzeitig entnommene SF stehen in einer Zeile nebeneinander. Sowohl für die Serum- als auch für die SF-Werte sind die Ränge in Graustufen kodiert: Die fünf niedrigsten Werte sind hellgrau hinterlegt, die mittleren fünf mittelgrau und die höchsten fünf dunkelgrau.

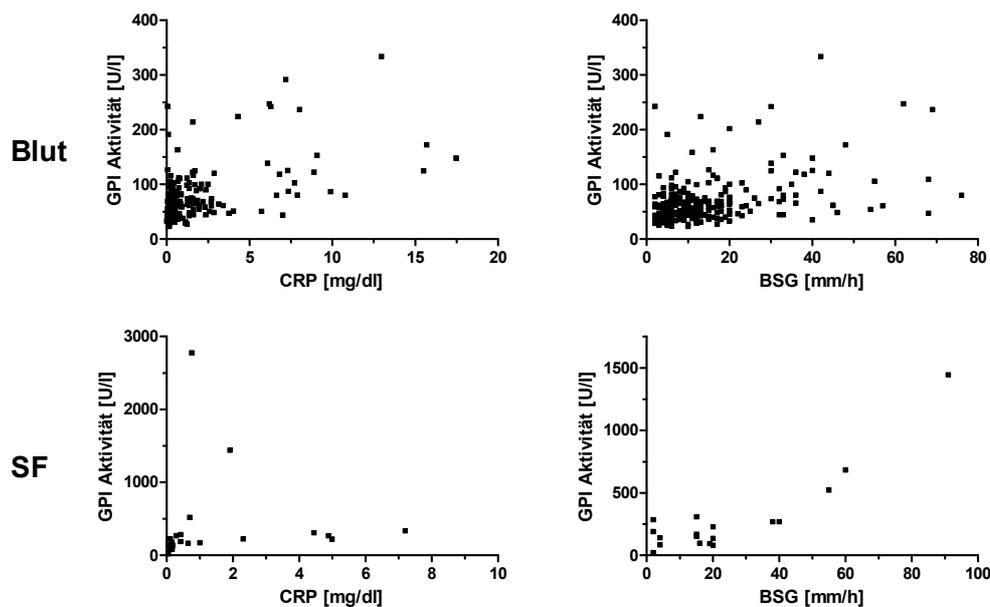


Abbildung 11: Korrelation der GPI-Aktivität mit den Entzündungsparametern BSG und CRP. Die statistischen Größen sind in Tabelle 10 wiedergegeben.

	CRP	BSG
Blut	n = 252 $r_s = 0,4821$ $p < 0,0001$	n = 253 $r_s = 0,3877$ $p < 0,0001$
SF	n = 22 $r_s = 0,7064$ $p = 0,0002$	n = 18 $r_s = 0,4956$ $p = 0,0365$

Tabelle 10: Korrelation der GPI-Aktivität mit den Entzündungsparametern BSG und CRP

Der Zusammenhang zwischen GPI-Aktivität und Krankheitsaktivität wurde durch die Korrelation mit dem C-reaktiven Protein (CRP) und der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) überprüft (Abb. 11 und Tab. 10). Für beide Parameter war die Korrelation im Serum nur schwach ausgeprägt, wohingegen in der SF eine stärkere Tendenz zu erkennen war. Dies galt insbesondere für sehr hohe BSG-Werte.

5.1.2 ETABLIERUNG EINER MESSMETHODE FÜR DIE GPI-AKTIVITÄT

Da das kommerzielle Reagenziensystem zur Bestimmung der GPI-Aktivität inzwischen nicht mehr zur Verfügung steht, wurden ein Protokoll adaptiert (Beutler, 1984) und etabliert, mit dem es auch weiterhin möglich ist, diesen Parameter zu bestimmen. Gezeigt sind die Messergebnisse für ein Serum (Abb. 12).

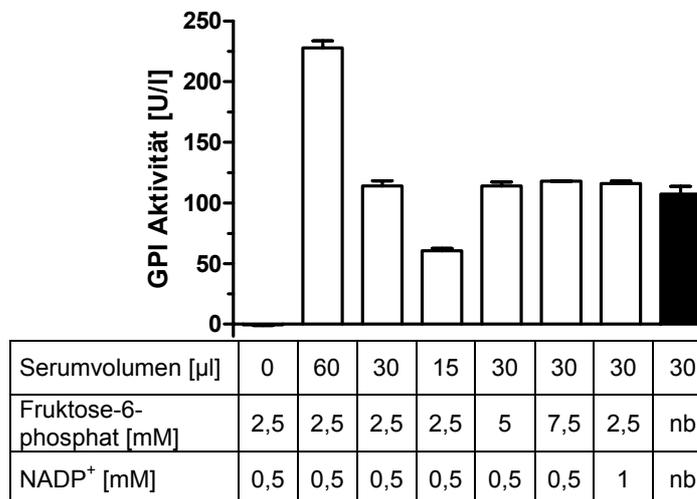


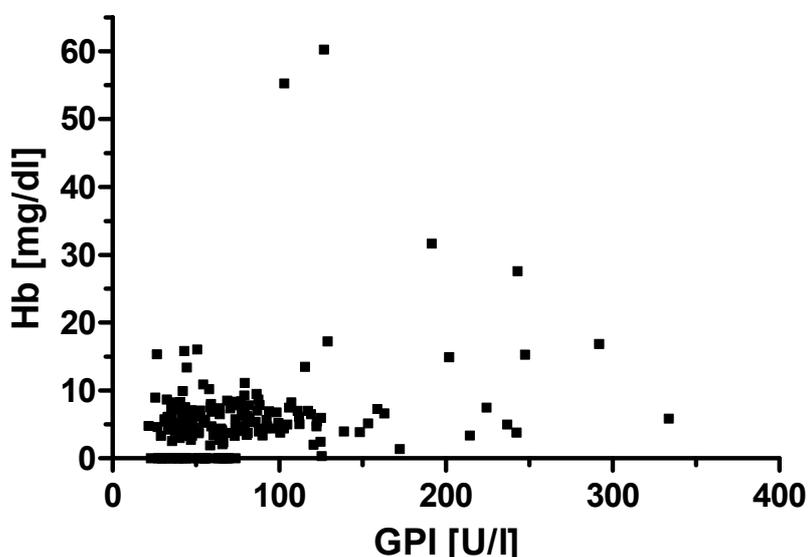
Abbildung 12: Etablierung von Meßbedingungen für die GPI-Aktivität (dargestelltes Serum TE26, 040202). Schwarzer Balken: Bestimmung mit dem kommerziellen Reagenziensystem.

Ohne Zugabe des Serums war keine GPI-Aktivität nachweisbar. Somit enthielt die Reaktionslösung keine Verunreinigung durch GPI oder Glukose-6-phosphat. Eine Verdopplung bzw. Halbierung des Probenvolumens führte zu den erwarteten Verän-

derungen der GPI-Aktivität. Der Messwert für das Probenvolumen von 30 µl entsprach dem, der für das gleiche Volumen mit dem kommerziellen Reagenziesystem gewonnen wurde. Eine Erhöhung der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase-, Fruktose-6-phosphat- oder NADP⁺-Konzentration hatte keinen Einfluss auf den Messwert, d.h. die Zunahme der Extinktion war ausschließlich von der GPI-Aktivität des zugegebenen Serums abhängig.

5.1.3 VERGLEICH DER GPI-AKTIVITÄT MIT DER LDH-AKTIVITÄT UND DER HÄMOGLOBIN-KONZENTRATION

Das bei Weitem größte Reservoir an GPI-Aktivität im Blut stellen Erythrozyten dar. Um auszuschließen, dass erhöhte GPI-Aktivitäten auf eine Hämolyse zurückzuführen waren, die während der Probenaufarbeitung oder auch schon vor der Blutentnahme stattgefunden haben könnte, wurde die Serum-Hämoglobin-Konzentration bestimmt (Abb. 13). Um den Einfluss von Zellyse oder Nekrose anderer Zellen für erhöhte



	n	GPI [U/l]				Hb [mg/dl]				rs	p
		Min	Max	Mittel	sdv	Min	Max	Mittel	sdv		
Blut	185	21,63	333,7	76,32	50,84	0,0	60,28	5,96	6,97	0,2388	0,0011
SF	15	22,08	2780	377	706,5	-1,15	3,34	0,06	1,00	nb	nb

Abbildung 13: Korrelation von GPI-Aktivität und freiem Serumhämoglobin. SF enthält Hb nur in vernachlässigbaren Konzentrationen, daher wurde auf die Durchführung einer Korrelationsanalyse verzichtet.

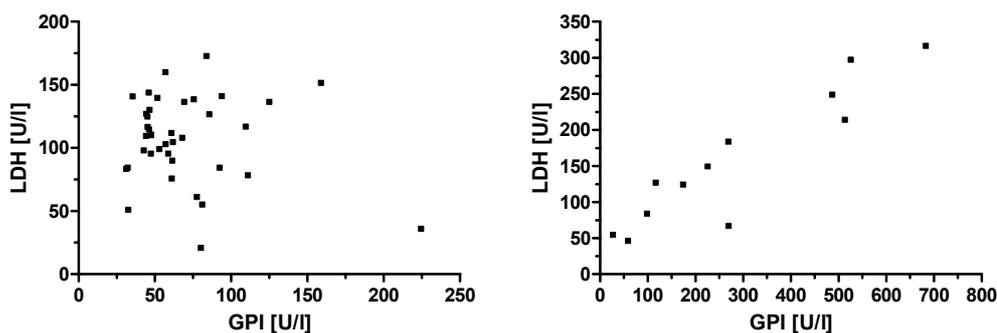
GPI-Aktivitäten abschätzen zu können, wurde die Aktivität eines anderen zytosolischen Enzyms, der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität, gemessen. In der SF ließen sich nur geringste Mengen Hämoglobin nachweisen, die die zum Teil extrem hohen GPI-Aktivitäten nicht erklären konnten.

Im Serum konnten im Mittel 5,96 mg/dl Hämoglobin gemessen werden. Erythrozyten enthalten durchschnittlich 60,8 U GPI pro 1 g Hämoglobin (Beutler, 1984); mit dieser Angabe läßt sich abschätzen, wieviel Serum-Hämoglobin beispielsweise für eine GPI-Aktivität von 200 U/l zu erwarten wäre, wenn diese auf Hämolyse zurückzuführen wäre:

$$\frac{200 \text{ U}_{\text{GPI}}}{\text{l}} \times \frac{\text{g}_{\text{Hb}}}{60.8 \text{ U}_{\text{GPI}}} \times \frac{\text{l} \times 1000 \text{ mg}_{\text{Hb}}}{10 \text{ dl} \times \text{g}_{\text{Hb}}} = 329 \frac{\text{mg}_{\text{Hb}}}{\text{dl}}$$

Ein solch hoher Wert wurde in keiner Probe gefunden. Weiterhin spricht auch ein Korrelationskoeffizient von $r_S = 0,2388$ gegen Hämolyse als Ursache für erhöhte GPI-Aktivitäten.

Ebensowenig konnte eine Korrelation zwischen der LDH- und der GPI-Aktivität im Serum nachgewiesen werden. In der SF hingegen war diese sehr ausgeprägt ($r = 0,9265$ bei $p < 0,0001$). Somit ist die Aktivitätserhöhung zytosolischer Enzyme nicht auf die GPI beschränkt, vielmehr kann dies als Hinweis auf einen massiven, auf die Gelenkskavität begrenzten Zelluntergang gedeutet werden (Abb. 14).



	n	GPI [U/l]				LDH [U/l]				r_P	p
		Min	Max	Mittel	sdv	Min	Max	Mittel	sdv		
Blut	39	31,13	224,3	68,97	37,43	20,9	173,0	107,4	33,65	-0,1388	0,3995
SF	12	26,94	683,1	287,2	214,6	46,1	316,6	159,5	93,33	0,9265	<0,0001

Abbildung 14: Korrelation von GPI- und LDH-Aktivität. Abkürzungen: Minimum (Min), Maximum (Max), Mittelwert (Mittel), Standardabweichung (sdv), Korrelationskoeffizient nach Pearson(r_P)

5.2 Detektion von Antikörpern gegen GPI und andere Autoantigene

5.2.1 MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE EINER GPI-AUFREINIGUNG

Ein gelelektrophoretische Analyse der kommerziellen GPI-Aufreinigung aus Kaninchenmuskel, die ursprünglich als Detektionsantigen für anti-GPI-IgG in ELISA vorgesehen war, zeigte ein erhebliches Ausmaß an kontaminierenden Proteinen (Abb. 15). In Immunoblots von Auftrennungen dieser Aufreinigung, die mit humanen Seren und anschließend mit Peroxidase-konjugiertem anti-human-IgG inkubiert wurden, zeigte sich, dass auch diese Verunreinigungen IgG binden (Abb. 17). Somit wurde Abstand von der Idee genommen, diese Aufreinigung im ELISA einzusetzen.

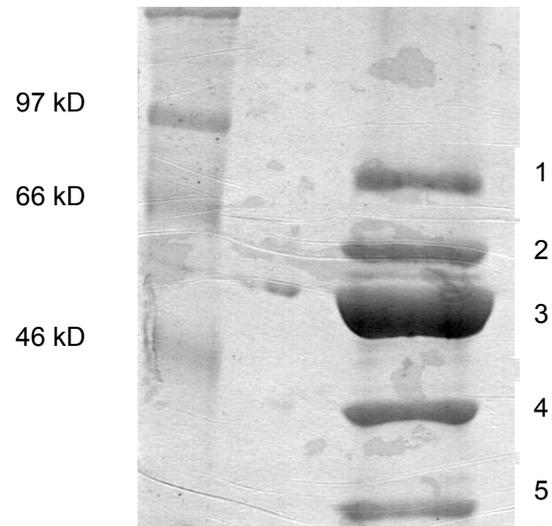


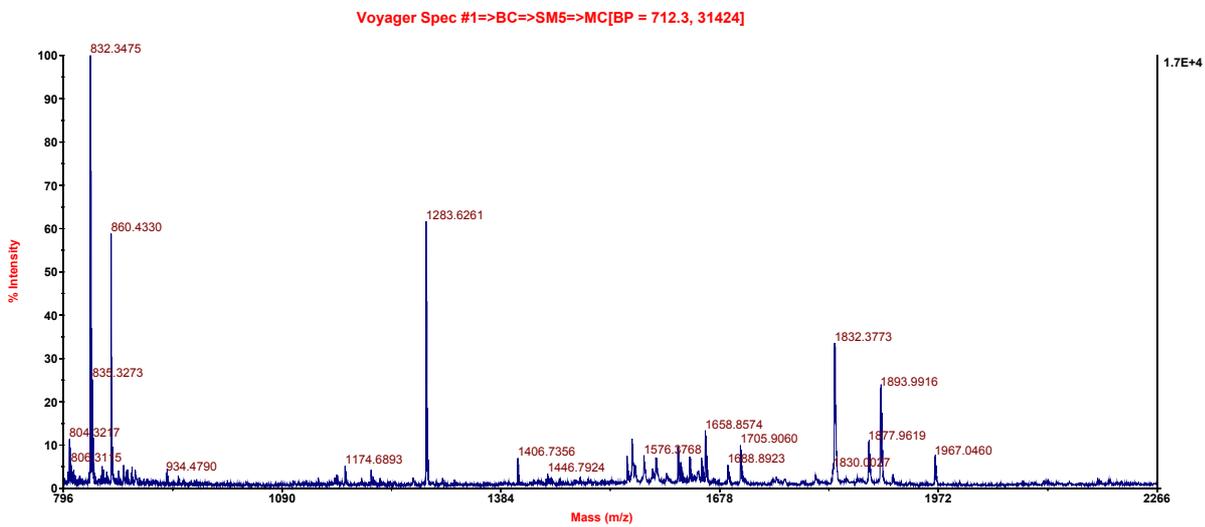
Abbildung 15: 10% SDS-PAGE der kommerziellen GPI-Aufreinigung aus Kaninchenmuskel. Links: Molekulargewichtstandard. Rechts: Banden-nummerierung (siehe Massenspektren).

Die verunreinigenden Proteine wurden mittels MALDI-TOF-MS identifiziert. Die Massenspektren sind in Abb. 16 dargestellt. In Tab. 11 sind die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt. Alle Proteine stammten erwartungsgemäß aus *Oryctolagus cuniculus* (Kaninchen). Es zeigte sich, dass die dominierende Bande tatsächlich GPI enthält. Warum gerade Transferrin, Phosphoglukomutase, Kreatinkinase M, Fruktose-1,6-Bisphosphatase und Glyzerol-3-phosphat-Dehydrogenase in dieser Aufreinigung gefunden wurden, bleibt unklar, da die Aufreinigungsprozedur unbekannt ist. Bande 2 und 3 bzw. Bande 5 und 6 liefen im SDS-PAGE umgekehrt zu ihrer anhand der relativen Masse erwarteten Position. Dies kann beim GPI sicherlich auf die sehr große Menge an Protein zurückgeführt werden, was häufig zu anomalem Laufverhalten führt. Ebenso sind posttranslationale Modifikation in Erwägung zu ziehen, da die in Tab. 11 verwendeten relativen Massen anhand der Sequenzen berechnet wurden.

Bande	Protein	theoretische M _r [Da]	Score
1	Transferrin	76.670	87
2	Phosphoglukomutase	61.427	157
3	Glukose-6-phosphat-Isomerase	62.615	78
4	Kreatinkinase M	43.112	70
5	Fruktose-1,6-Bisphosphatase	36.793	84
6	Glyzerol-3-phosphat-Dehydrogenase	37.478	89

Tabelle 11: Durch MALDI-TOF-MS identifizierte Proteine in der kommerziellen GPI-Aufreinigung aus Kaninchenmuskel. Score ist definiert als $-10 \times \log_{10}p$, mit p als der absoluten Wahrscheinlichkeit dafür, dass der Treffer bei der Datenbanksuche zufällig ist.

Bande 1



Bande 2

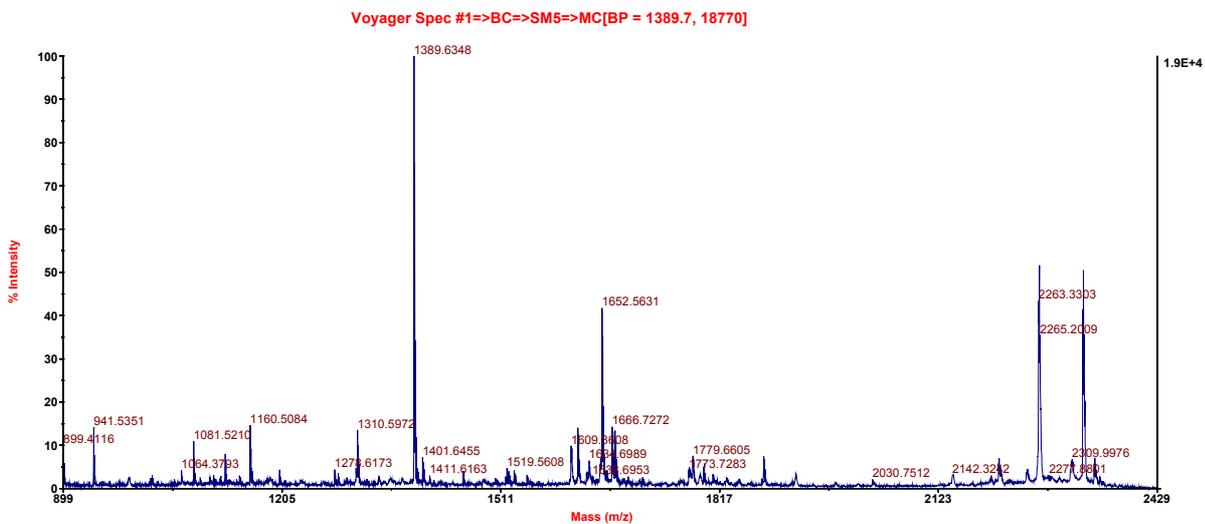
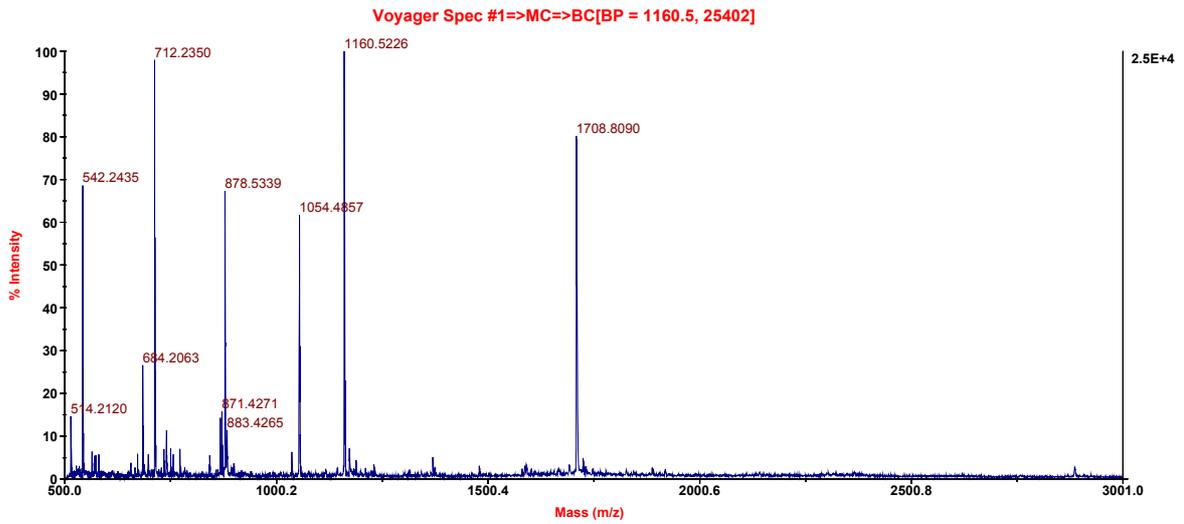
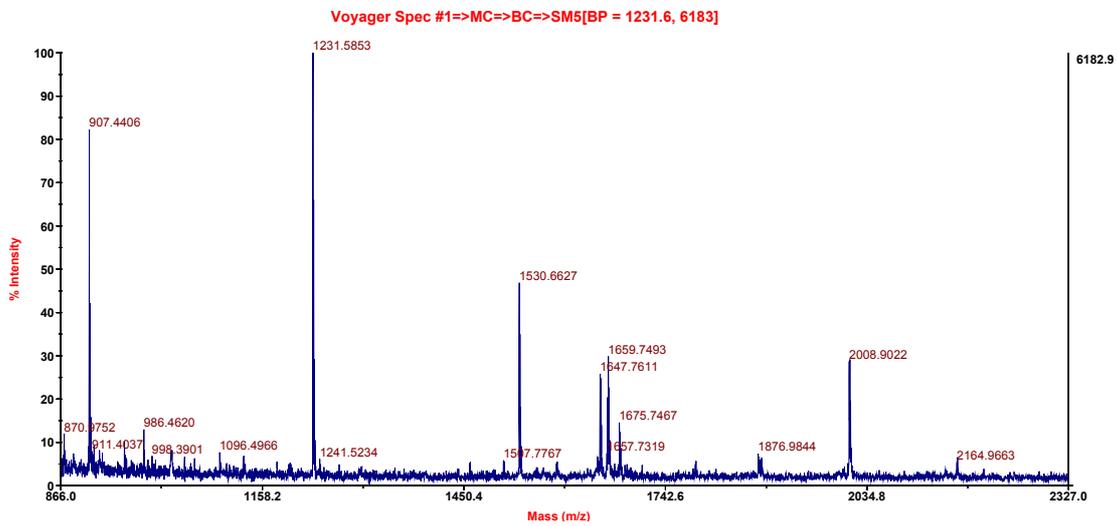


Abbildung 16: Massenspektren der Banden 1 bis 6.

Bande 3



Bande 4



Bande 5

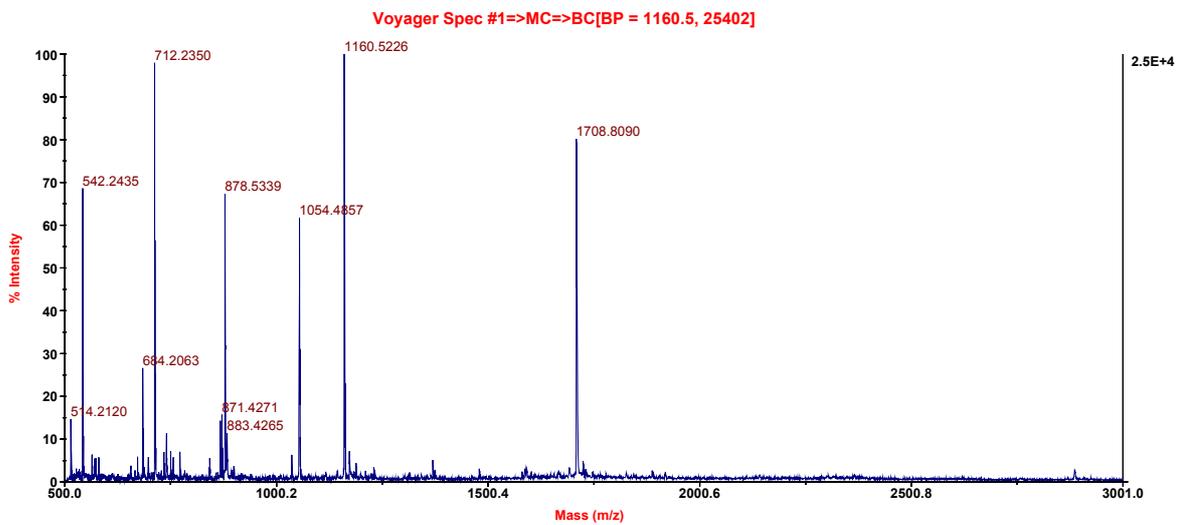


Abbildung 16, Fortsetzung: Massenspektren der Banden 1 bis 6.

Bande 6

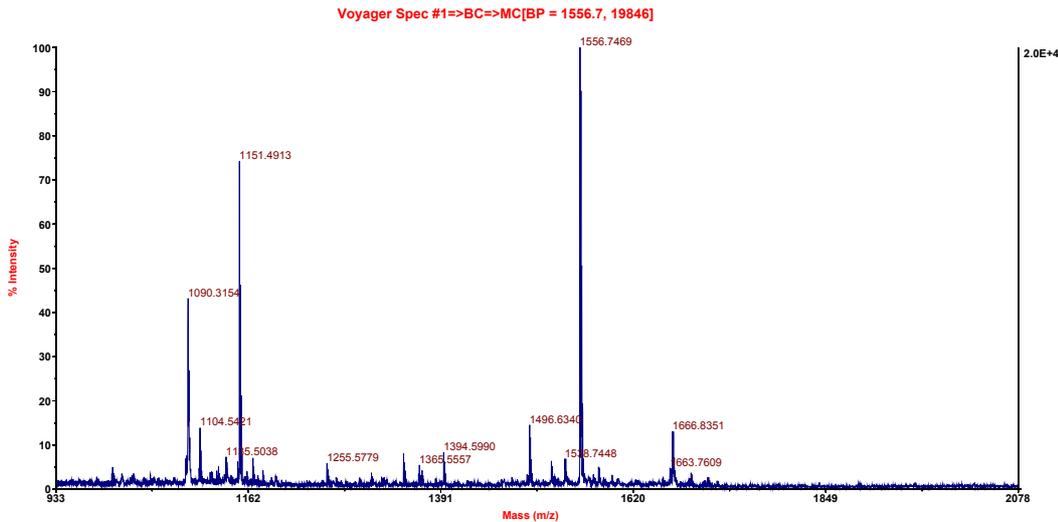


Abbildung 16, Fortsetzung: Massenspektren der Banden 1 bis 6.

5.2.2 UNTERSUCHUNG VON IGG-ANTIKÖRPERN IN SEREN UND SF MITTELS IMMUNOBLOT

Die kommerzielle GPI-Aufreinigung wurde in Immunoblots zur Detektion von IgG-Antikörpern, die an Proteine dieser Aufreinigung binden, eingesetzt. Getestet wurden 252 Seren (von 87 JIA Patienten, 6 Arthralgie Patienten, 32 RA Patienten und 9 gesunden Individuen) und 29 SF (von 19 JIA Patienten und 2 RA Patienten). Dabei zeigte sich, dass nicht nur GPI sondern auch die verunreinigenden Proteine (Abb. 17) von IgG-Antikörpern gebunden wurden. Dies war insbesondere für die Phosphoglukomutase und die Kreatinkinase der Fall.

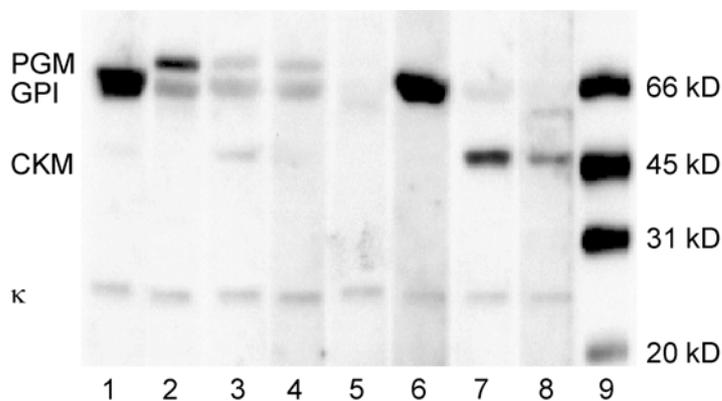


Abbildung 17: Immunoblot zur Detektion von IgG-Antikörpern gegen Proteine der kommerziellen GPI-Aufreinigung. Bei den Spuren 1-8 diente Serum von JIA-Patienten als Sonde. Neben GPI bindet IgG auch an andere Proteine. Spur 9 enthält einen HRP-markierten Molekulargewichtsstandard. Die κ -Leichtkette wurde als interner Standard in jeden Immunoblot eingeschlossen.

Wurde nur eine einzelne Bande detektiert, handelte es sich in der Regel um anti-GPI-IgG. Häufig wurden aber auch mehrere Banden sichtbar. Die Chemilumineszenz dieser Banden wurde densitometrisch bestimmt und ins Verhältnis gesetzt zu derjenigen, die durch Bindung des Detektionsantikörpers (Peroxidase-konjugiertes anti-IgG) an den internen Standard, die κ -Leichtkette, entstand. Durch dieses Vorgehen war es möglich, die Konzentration von Antikörpern verschiedener Spezifität semi-quantitativ zu bestimmen. Dabei war es jedoch aufgrund der schlechten Auflösung nicht möglich IgG-Antikörper, die an Fruktose-1,6-Bisphosphatase und an Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase zu unterscheiden. Dies war aber von untergeordneter Bedeutung, da nur in 5 der 252 Seren und 7 der 29 SF eine Bindung an diese Proteine nachweisbar war. Ähnlich selten war eine Bindung an Transferrin zu messen (31 Seren, keine SF).

In Abb. 18 und Tab. A6 sind die Ergebnisse für die Bindung an GPI zusammenfassend dargestellt. In einigen Blots wurde rekombinantes HIV-1 gp120 Protein als Kontrollantigen eingesetzt: In keinem Versuch wurde eine Bindung an dieses Protein nachgewiesen.

Für anti-GPI-Antikörper im Serum zeigte die einfache Varianzanalyse, dass mindestens zwei Mittelwerte sich signifikant unterschieden ($p < 0,0001$, Tab. A7).

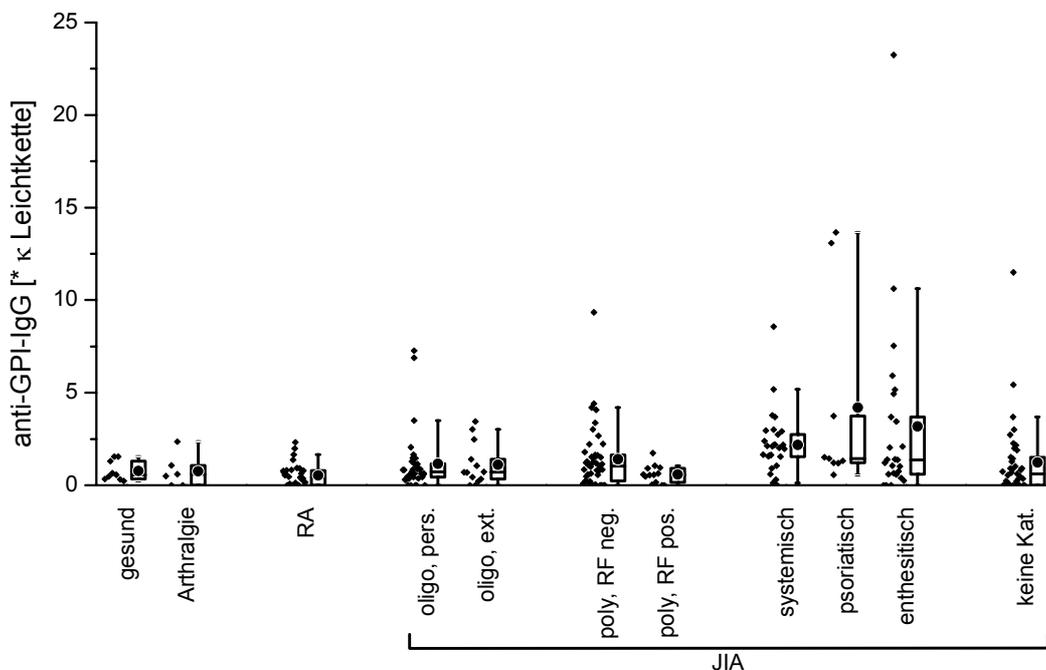


Abbildung 18: anti-GPI-IgG im Serum von Patienten mit verschiedenen Diagnosen. Messung durch densitometrische Analyse von Immunoblots.

Der Vergleich der verschiedenen Patientengruppen mit der gesunden Kontrollgruppe zeigte, dass in der Gruppe der psoriatischen Arthritis vermehrt anti-GPI-IgG gefunden wurde ($p < 0,05$, Tab. A8). Beim Vergleich aller Patientengruppen miteinander (Tab. A9) fiel auf, dass sich bei der psoriatischen Arthritis eine höhere Konzentration an anti-GPI-Antikörpern fand als bei RF positiven und der nicht kategorisierbaren Verlaufsform (jeweils $p < 0,05$). Sowohl die psoriatische und die Enthesitis-assoziierte Verlaufsform wiesen höhere anti-GPI-IgG-Konzentrationen auf als die persistierende oligoartikuläre JIA ($p < 0,05$) und die RA ($p < 0,01$). Insbesondere war bemerkenswert, dass in der Gruppe der RA keine signifikant höhere Konzentration an anti-GPI-IgG gefunden wurde als in der gesunden Kontrollgruppe oder auch anderen Patientengruppen. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der ursprünglichen Publikation über anti-GPI-IgG bei RA (Schaller et al., 2001). Vielmehr gab es sogar Patientengruppen wie die psoriatische und die Enthesitis-assoziierte JIA, die sich durch höhere anti-GPI-IgG-Konzentration auszeichneten als die RA-Seren. Der höchste Median wurde für die systemische JIA beobachtet. Einzelne Seren mit hohen anti-GPI-Konzentrationen fanden sich in allen JIA-Patientengruppen, aber nicht bei den gesunden Kontrollen, den Arthralgie Patienten und insbesondere bei den RA Patienten.

Es konnte weder eine Anreicherung noch eine Depletion von anti-GPI-IgG in der SF (29 Proben) im Vergleich zum Serum (252 Proben) beobachtet werden ($p = 0,3958$, Abb. 19 und Tab. A10). In Tab. 12 sind die Konzentrationen von anti-GPI-IgG im Serum den entsprechenden, gleichzeitig entnommenen in SF gegenübergestellt: Hohe Konzentrationen von anti-GPI-IgG im Serum gingen nicht notwendigerweise mit einer Erhöhung in der SF einher und umgekehrt.

Abb. 20, 21 und Tab. A11, A12, A14, A15 fassen die Ergebnisse für die anti-CKM-IgG und anti-PGM-IgG-Konzentrationen im Serum zusammen. Für die anti-PGM-IgG waren im Gegensatz zu allen anderen nur 251 Serumproben auswertbar. Für beide Antikörper konnte mittels einfacher Varianzanalyse kein Unterschied zwischen den einzelnen Patientengruppen gefunden werden (anti-CKM-IgG: $p = 0,5606$; anti-PGM-IgG: $p = 0,3205$).

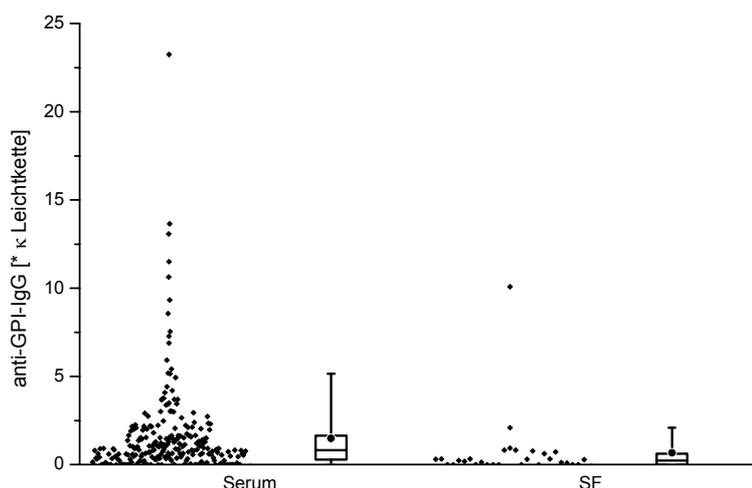


Abbildung 19: anti-GPI-IgG-Konzentration (densitometrisch) in Serum und SF.

Serum		SF	
Rang	anti-GPI-IgG *κ Leichtkette	anti-GPI-IgG *κ Leichtkette	Rang
1,5	0,00	0,00	2
1,5	0,00	0,00	2
3	0,63	0,82	7
4	1,05	0,30	6
5	1,14	0,00	2
6	1,16	0,93	8
7	1,36	0,18	4
8	1,43	0,24	5

Tabelle 12: Korrelation der anti-GPI-IgG-Konzentration im Serum und entsprechenden SF-Proben (n = 8). Serumprobe und gleichzeitig entnommene SF stehen in einer Zeile nebeneinander. Sowohl für die Serum- als auch für die SF-Werte sind die Ränge in Graustufen kodiert: Die drei niedrigsten sind hellgrau hinterlegt, die mittleren zwei mittelgrau und die drei höchsten dunkelgrau.

Einzelne Proben mit zum Teil deutlich erhöhten Konzentrationen an anti-PGM-IgG wurden in allen Gruppen gefunden außer bei Arthralgie und erweiterter oligoartikulärer JIA. Die höchsten Werte wurden bei der RA und der persistierenden oligoartikulären JIA beobachtet. Bei den anti-CKM-IgG verhielt es sich ähnlich, allerdings wurden in fast allen Gruppen bei weniger als 50% überhaupt eine lumineszierende Bande beobachtet. Für beide Antikörperspezifitäten gilt, dass sich die Mittelwerte der Konzentrationen im Serum nicht signifikant von denen in SF unterschieden (anti-CKM-IgG: $p = 0,3958$; anti-PGM-IgG: $p = 0,1364$; Abb. 22, 23 und Tab. A13, 16). Auch für anti-PGM-IgG wurde keine Korrelation der Serumwerte mit Werten entsprechender, gleichzeitig gewonnener SF gefunden (Tab. 13). Eine entsprechende Aussage für die anti-CKM-IgG konnte nicht gemacht werden, da es insgesamt nur zwei Paare gab, bei denen eine Bande beobachtet wurde.

Weder im Serum noch in der SF bestand eine signifikante Korrelation zwischen den Antikörperkonzentrationen aller drei Spezifitäten mit der Entzündungsaktivität (CRP oder BSG) oder der GPI Aktivität (Abb. 24-26).

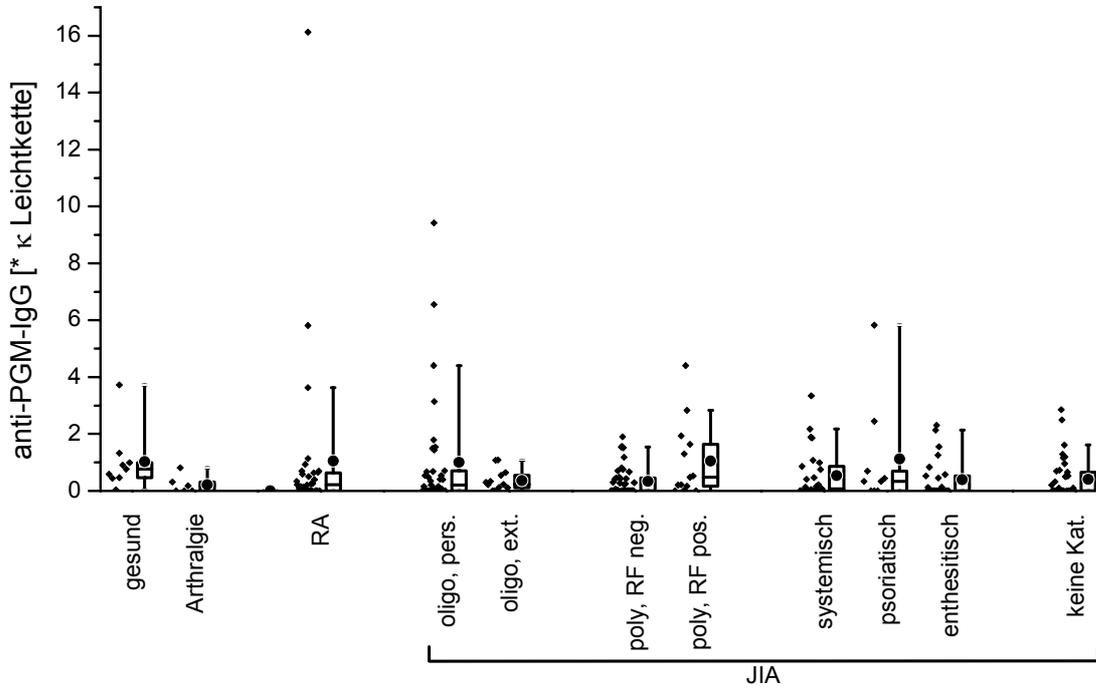


Abbildung 20: anti-PGM-IgG (densitometrisch) im Serum von Patienten mit verschiedenen Diagnosen.

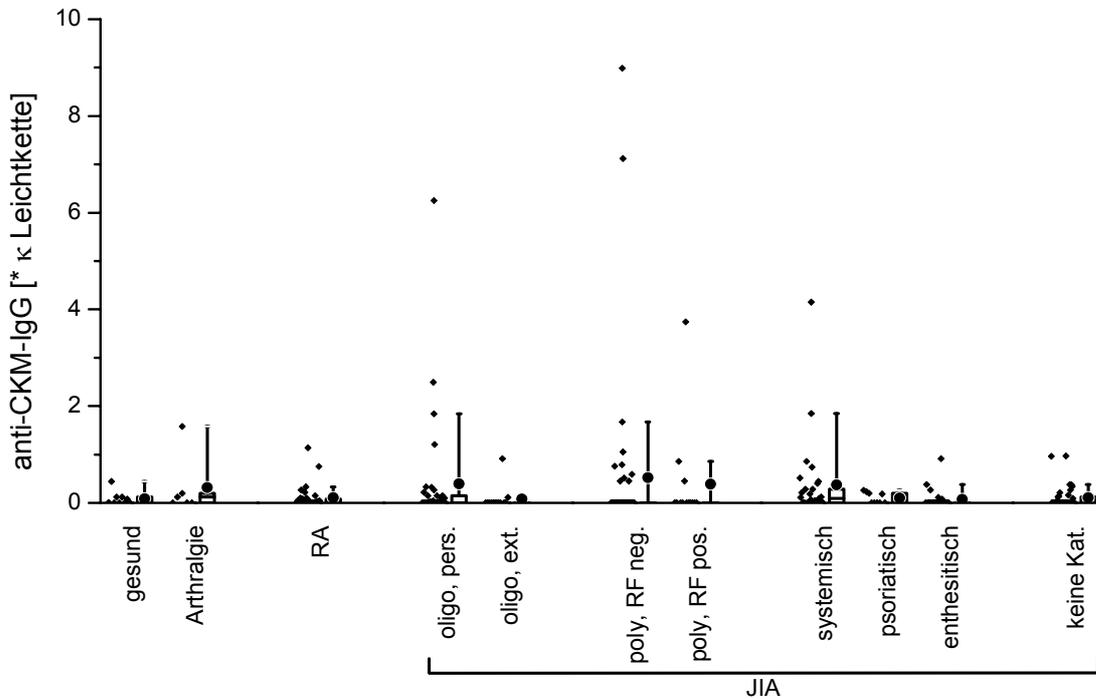


Abbildung 21: anti-CKM-IgG (densitometrisch) im Serum von Patienten mit verschiedenen Diagnosen.

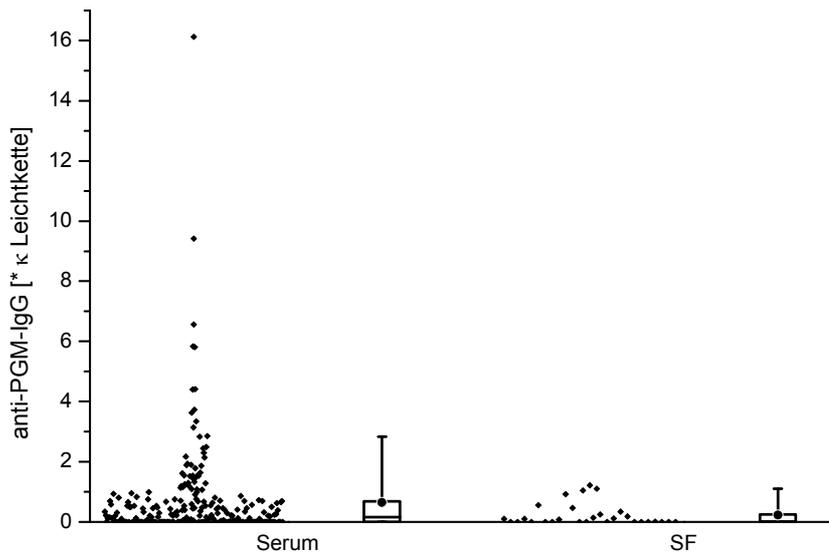


Abbildung 22: anti-PGM-IgG-Konzentration (densitometrisch) in Serum und SF.

Serum		SF	
Rang	anti-PGM-IgG *κ Leichtkette	anti-PGM-IgG *κ Leichtkette	Rang
1,5	0,00	0,56	6
1,5	0,00	0,00	1,5
3	0,09	0,14	4
4	0,11	0,01	3
5	0,40	1,10	8
6	0,45	1,05	7
7	0,70	0,00	1,5
8	1,16	0,47	5

Tabelle 13: Korrelation der anti-PGM-IgG-Konzentration im Serum und entsprechenden SF-Proben (n = 8). Serumprobe und gleichzeitig entnommene SF stehen in einer Zeile nebeneinander. Sowohl für die Serum- als auch für die SF-Werte sind die Ränge in Graustufen kodiert: Die drei niedrigsten sind hellgrau hinterlegt, die mittleren zwei mittelgrau und die drei höchsten dunkelgrau.

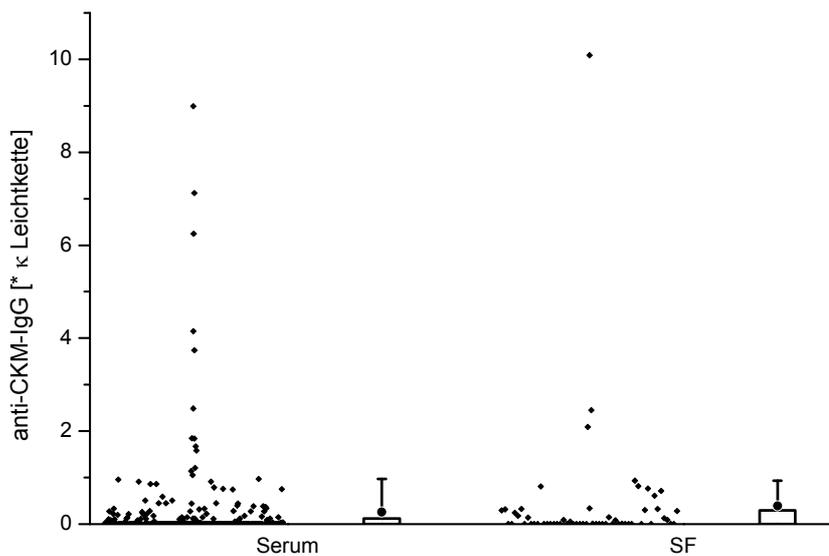
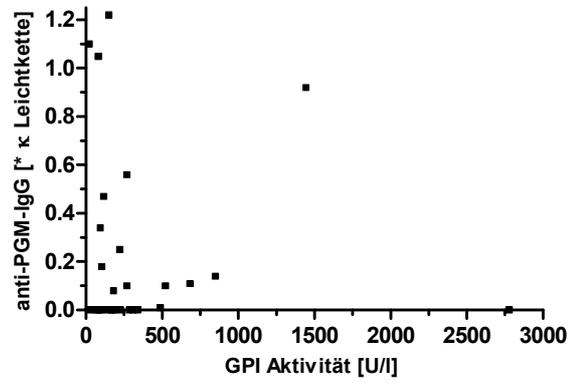
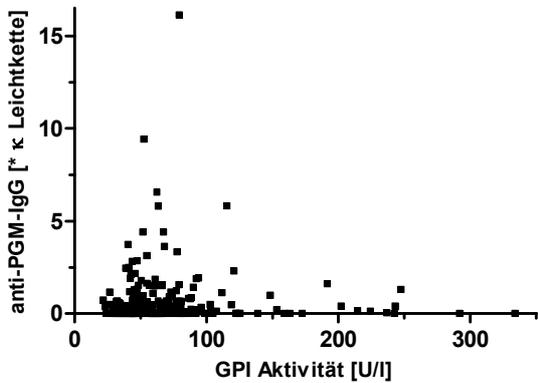
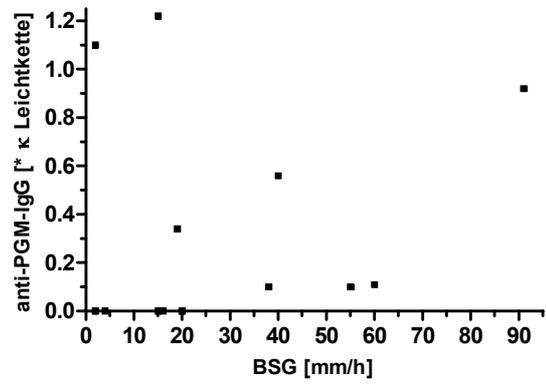
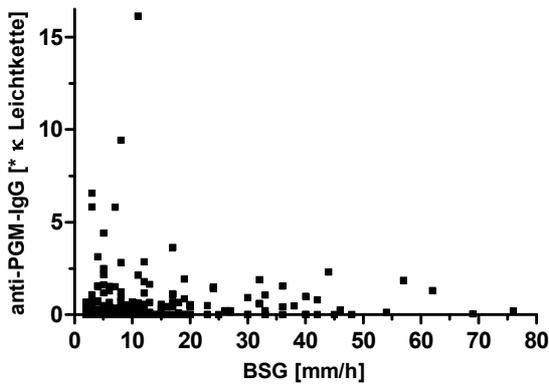
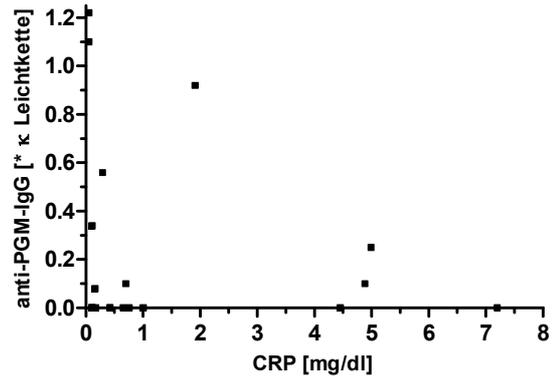
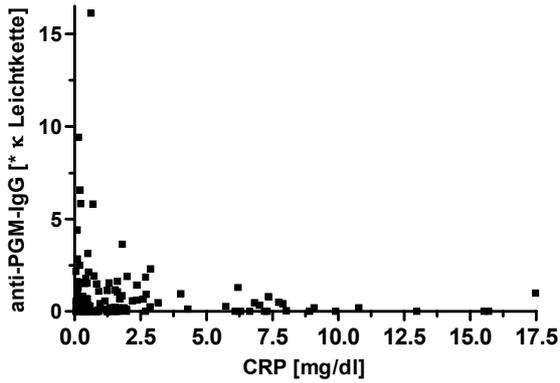


Abbildung 23: anti-CKM-IgG-Konzentration (densitometrisch) in Serum und SF.

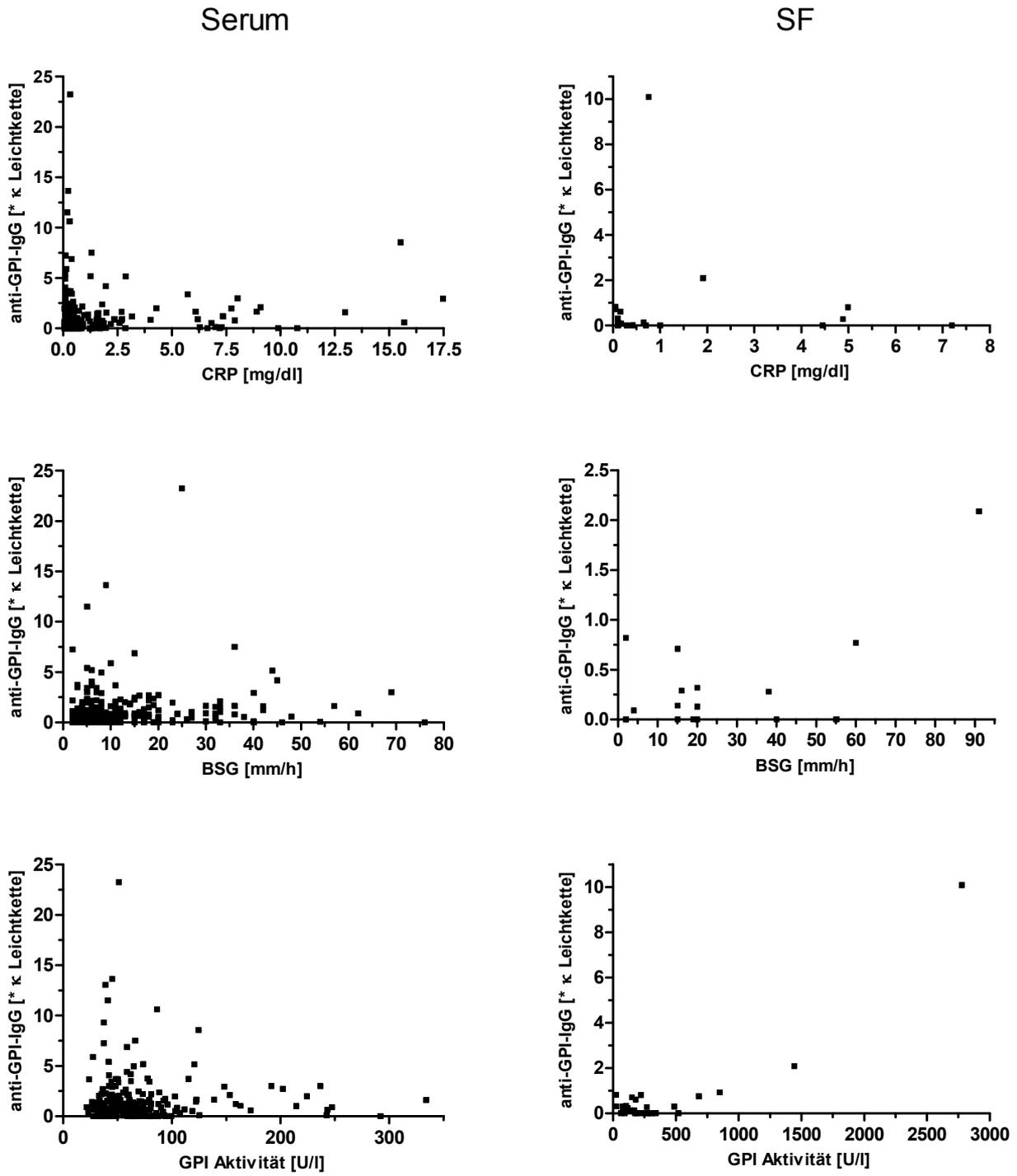
Serum

SF



	Serum	SF
CRP	n = 212 $r_s = 0,1055$ $p = 0,1258$	n = 20 $r_s = -0,1948$ $p = 0,4106$
BSG	n = 214 $r_s = 0,0824$ $p = 0,2298$	n = 17 $r_s = 0,3104$ $p = 0,2254$
GPI Aktivität	n = 251 $r_s = 0,0502$ $p = 0,4286$	n = 29 $r_s = -0,0003$ $p = 0,9989$

Abbildung 24: Korrelation der anti-PGM-IgG-Konzentrationen mit der GPI-Aktivität und den Entzündungsparametern BSG und CRP. Es findet sich weder im Serum noch in SF eine signifikante Korrelation.

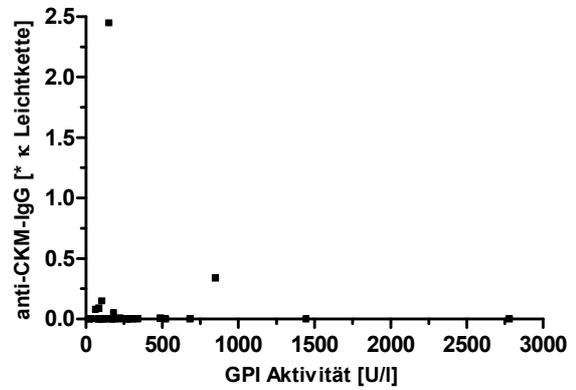
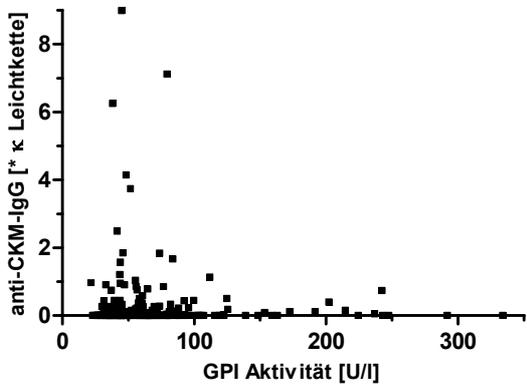
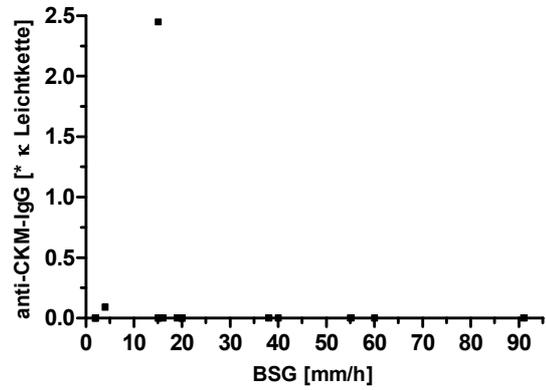
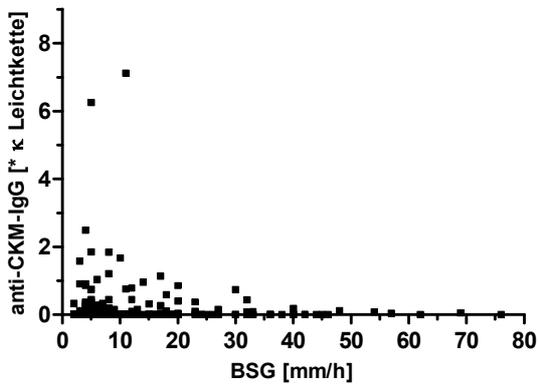
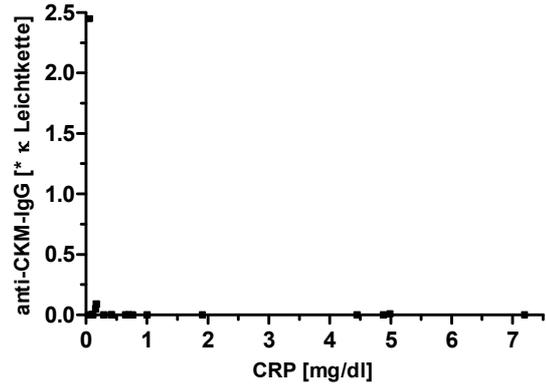
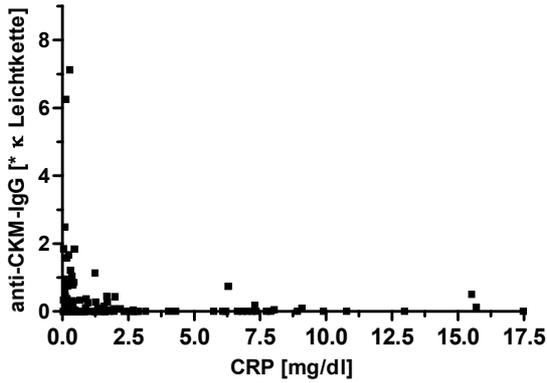


	Serum	SF
CRP	n = 213 $r_s = -0,0231$ $p = 0,7371$	n = 20 $r_s = -0,0980$ $p = 0,6811$
BSG	n = 215 $r_s = 0,0820$ $p = 0,2312$	n = 17 $r_s = 0,1970$ $p = 0,4485$
GPI Aktivität	n = 252 $r_s = 0,0060$ $p = 0,9247$	n = 29 $r_s = 0,1081$ $p = 0,5766$

Abbildung 25: Korrelation der anti-GPI-IgG-Konzentrationen mit der GPI-Aktivität und den Entzündungsparametern BSG und CRP. Es findet sich weder im Serum noch in SF eine signifikante Korrelation.

Serum

SF



	Serum	SF
CRP	n = 213 $r_s = -0,0786$ $p = 0,2531$	n = 20 $r_s = -0,1956$ $p = 0,4084$
BSG	n = 215 $r_s = -0,0285$ $p = 0,6776$	n = 17 $r_s = -0,2954$ $p = 0,2497$
GPI Aktivität	n = 252 $r_s = 0,0300$ $p = 0,6350$	n = 29 $r_s = -0,0766$ $p = 0,6928$

Abbildung 26: Korrelation der anti-CKM-IgG-Konzentrationen mit der GPI-Aktivität und den Entzündungsparametern BSG und CRP. Es findet sich weder im Serum noch in SF eine signifikante Korrelation.

5.2.3 KLONIERUNG HUMANER GPI, CKM UND PGM

Ausgehend von der Beobachtung, dass PGM, GPI und CKM aus der kommerziellen GPI-Aufreinigung im Westernblot am häufigsten als Ziel von Autoantikörpern nachgewiesen wurden, wurden die entsprechenden humanen Proteine rekombinant hergestellt, um diese im ELISA zur quantitativen Bestimmung der Antikörperkonzentrationen einzusetzen. Hierzu wurden die entsprechenden kodierenden Sequenzen in einen Expressionsvektor kloniert, dem N-terminal eine Poly-Histidin-Sequenz angefügt wurde. Somit konnten die Proteine affinitätschromatographisch aufgereinigt werden. Abb. 27 zeigt exemplarisch einen mit Ponceau S sowie einen mit anti-poly-Histidin angefärbten Blot einer Aufreinigung rekombinanter, humaner

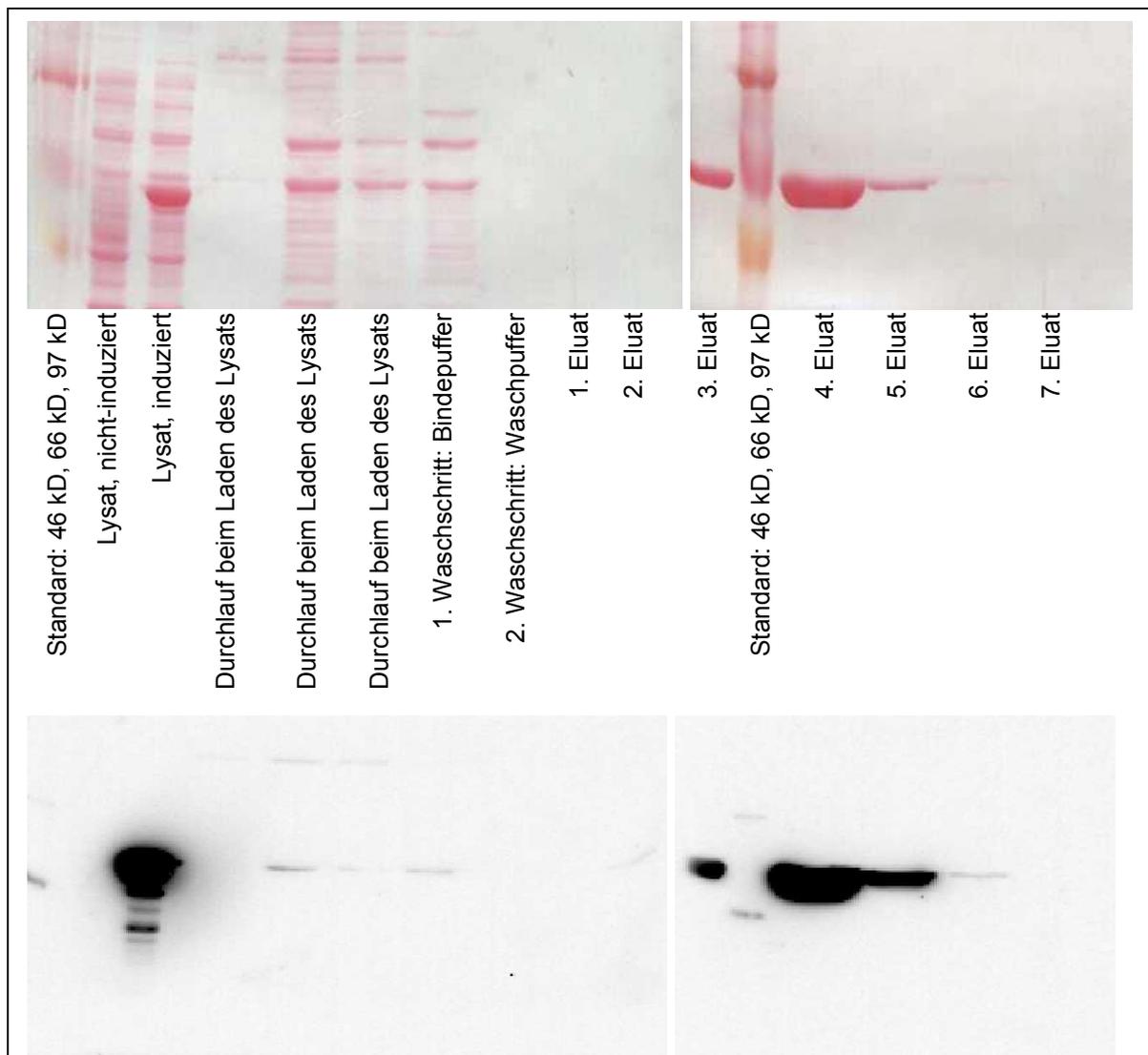


Abbildung 27: Aufreinigung rekombinanter, humaner GPI. Proben verschiedener Schritte der Aufreinigungsprozedur. Oben Ponceau S-gefärbter Blot, unten Immunoblot mit anti-poly-Histidin als Sonde.

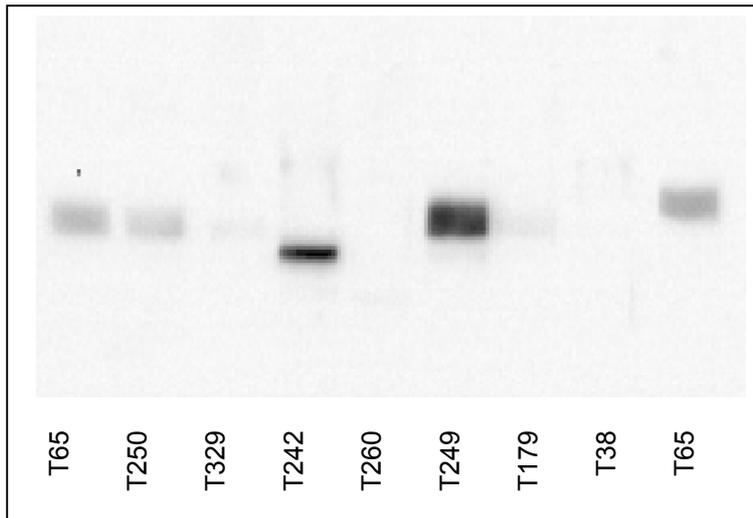


Abbildung 28: Immunoblot mit rekombinanter, humaner GPI als Antigen und Seren von JIA-Patienten als Sonde. Die beiden Proben des Patienten T65 wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen. Dass diese Banden scheinbar nicht auf gleicher Höhe liegen, ist begründet in der Vorgehensweise: Nach dem Transfer wurde der Blot in Streifen geschnitten, die für die Inkubation mit den Seren unabhängig voneinander behandelt wurden. Diese Streifen wurden dann zur Aufnahme wieder so gut es ging aneinander gelegt.

GPI. Erwartungsgemäß fehlte die im Lysat der induzierten Bakterien sehr prominente Bande von erwarteter Größe bei dem der nicht-induzierten. Wenig GPI fand sich im Durchlauf sowie in der ersten Waschlösung. Das eluierte GPI war sehr rein. Im Westernblot wurde dieses Protein von anti-poly-Histidin gebunden.

Die Verwendung von humanen Seren als Sonden in einem Westernblot lieferte eine einzelne Bande (Abb.

28). Die Aufreinigung von rekombinanten CKM und PGM lieferte ähnliche Ergebnisse.

5.2.4 BESTIMMUNG VON IGG-ANTIKÖRPERN GEGEN GPI, PGM UND CKM IM SERUM MITTELS ELISA

Rekombinate, humane CKM, GPI und PGM, sowie die kommerzielle, unreine GPI-Aufreinigung und als unabhängiges Protein BSA und wurden in ELISA zur Detektion von IgG-Autoantikörpern eingesetzt.

Für das indifferente Antigen BSA sind die Daten in Tab. A17 und Abb. 29 zusammengefaßt (278 Seren von 95 JIA-Patienten, 8 Arthralgie-Patienten, 33 RA-Patienten und 11 gesunden Individuen sowie 38 SF von 27 JIA-Patienten). Auffallend

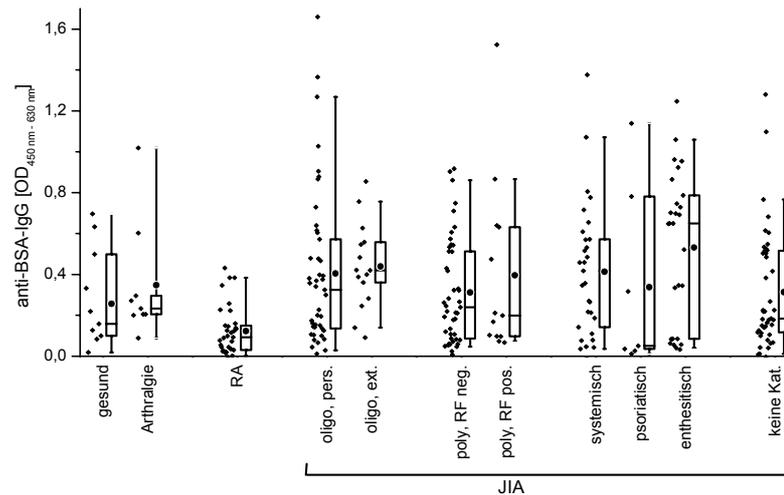


Abbildung 29: anti-BSA-IgG im Serum von Patienten mit verschiedenen Diagnosen. Messung durch ELISA.

war, dass in der RA-Gruppe die niedrigste anti-BSA-IgG-Konzentration gemessen wurde. Die einfache Varianzanalyse zeigte, dass mindestens zwei Mittelwerte sich signifikant unterschieden ($p = 0,0004$, Tab. A18). Beim Vergleich der Patientengruppen mit den gesunden Individuen wurde kein signifikanter Unterschied beobachtet (Tab. A19), wohl aber beim Vergleich aller Gruppen miteinander: Die RA-Gruppe wies einen signifikant niedrigeren Mittelwert auf als die oligoartikuläre, systemische und enthesitische JIA (Tab. A20).

Die Daten für die anti-GPI-IgG-Konzentrationen sind in Tab. A21 und Abb. 30 dargestellt (287 Seren von 96 JIA-Patienten, 8 Arthralgie-Patienten, 34 RA-Patienten

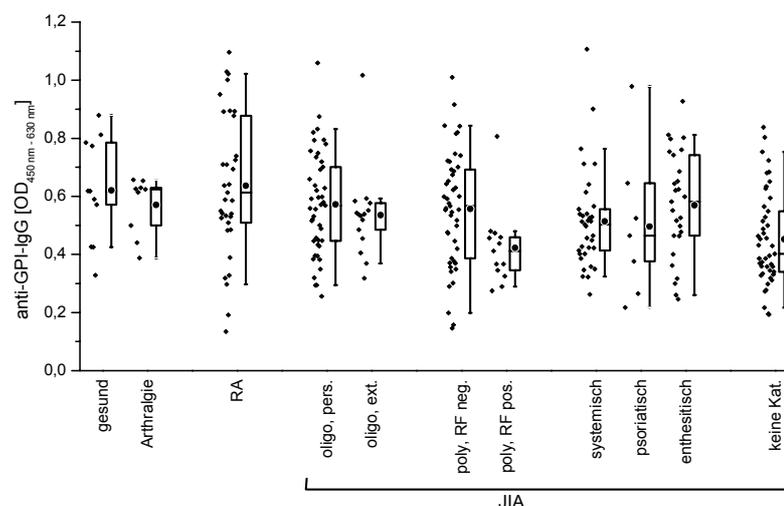


Abbildung 30: anti-GPI-IgG (ELISA) im Serum von Patienten mit verschiedenen Diagnosen.

und 11 gesunden Individuen sowie 39 SF von 28 JIA-Patienten). Hier stach hervor (Tab. A22 und A24), dass bei der RF positiven JIA, die ja als juveniles Pendant zur RA gesehen wird, deutlich niedrigere anti-GPI-IgG-Konzentrationen gemessen werden konnten. Ebenfalls war der Mittelwert bei der nicht-kategorisierbaren JIA niedriger als bei der RA. Insgesamt bleibt aber festzuhalten, dass keine großen Unterschiede in den Gruppen nachzuweisen waren, insbesondere wurde in keiner Patientengruppe ein höherer Mittelwert als bei der gesunden Kontrollgruppe gefunden (Tab. A23).

Ähnlich war das Ergebnis für die anti-PGM-IgG-Konzentrationen (Tab. A25 und Abb. 31; 286 Seren von 96 JIA-Patienten, 8 Arthralgie-Patienten, 34 RA-Patienten und 11 gesunden Individuen sowie 39 SF von 28 JIA-Patienten). Auch hier wurde für die RF positive polyartikuläre JIA der niedrigste Mittelwert gefunden. Wiederum wurde kein Unterschied der Patientengruppen von der gesunden Kontrollgruppe gefunden (Tab. A27). Lediglich der Mittelwert für die persistierende oligoartikuläre JIA war geringgradig höher als der bei der systemischen oder der nicht-kategorisierbaren JIA (Tab. A26 und A28).

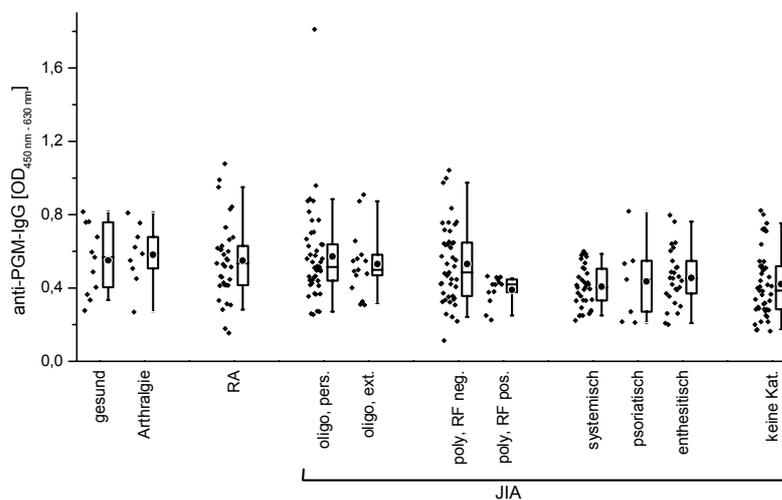


Abbildung 31: anti-PGM-IgG (ELISA) im Serum von Patienten mit verschiedenen Diagnosen.

Die niedrigsten Konzentration an anti-CKM-IgG wurden wiederum bei der RF positiven polyartikulären JIA gefunden (Tab. A29 und Abb. 32; insgesamt 286 Seren von 96 JIA-Patienten, 8 Arthralgie-Patienten, 34 RA-Patienten und 11 gesunden Individuen sowie 39 SF von 28 JIA-Patienten). Für diese Antikörper wurde eine signifikant niedrigere Konzentration bei der systemischen Verlaufsform im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe gefunden (Tab. A30 und A31). Bei dem Vergleich

aller Mittelwerte hob sich die RA von der systemischen und von der nicht-kategorisierbaren JIA ab (Tab. A32). Für die RA wurde der höchste Mittelwert gefunden, der jedoch nahezu identisch mit dem der gesunden Kontrollgruppe war.

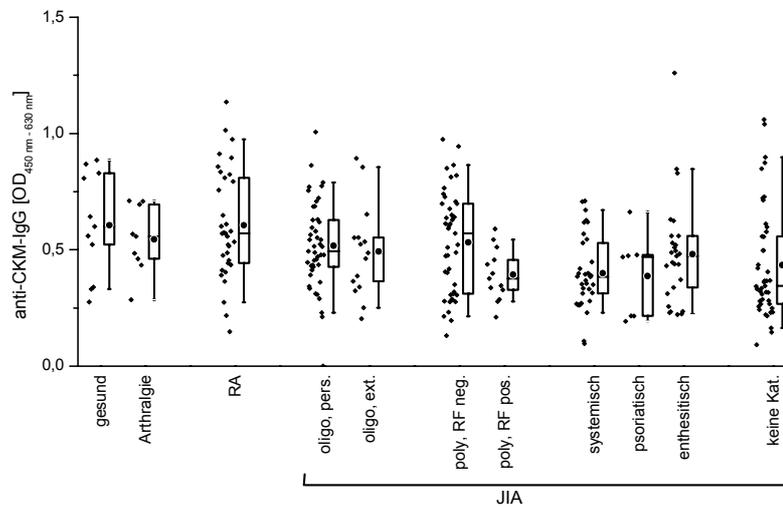


Abbildung 32: anti-CKM-IgG (ELISA) im Serum von Patienten mit verschiedenen Diagnosen.

Bei der Verwendung der unreinen, kommerziellen GPI-Aufreinigung aus Kaninchenmuskel (Tab. A33 und Abb 33; insgesamt 275 Seren von 93 JIA-Patienten, 8 Arthralgie-Patienten, 30 RA-Patienten und 11 gesunden Individuen sowie 38 SF von 27 JIA-Patienten) wurde der höchste Mittelwert für die RA bestimmt. Insbesondere fanden sich in dieser Gruppe einige Individuen mit deutlich erhöhten Konzentration an Antikörpern gegen diese GPI-Aufreinigung. Dabei war der Unterschied zur systemischen ($p < 0,01$) und zur nicht-kategorisierbaren ($p < 0,001$) JIA signifikant (Tab. A34-A36).

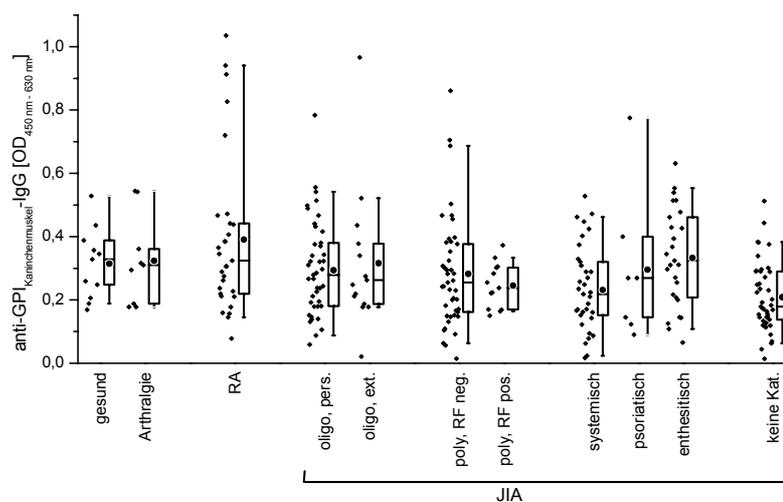


Abbildung 33: IgG, das an die kommerzielle GPI-Aufreinigung bindet (ELISA), im Serum von Patienten mit verschiedenen Diagnosen.

5.2.5 BESTIMMUNG VON IGG-ANTIKÖRPERN GEGEN GPI, PGM UND CKM IN SYNOVIALFLÜSSIGKEIT MITTELS ELISA

Die anti-BSA-IgG-Konzentration in der SF unterschied sich nicht signifikant von der im Serum ($p = 0,2446$, Abb. 34, Tab. A37). Signifikant niedriger war die Konzentration von anti-GPI-IgG (Abb. 35, Tab. A38), anti-PGM-IgG (Abb. 36, Tab. A39) und anti-CKM-IgG (Abb. 37, Tab. A40) sowie von Antikörpern gegen die unreine kommerzielle GPI-Aufreinigung (Abb. 38, Tab. A41) in der SF als im Serum.

Wiesen Patienten eine hohe Konzentration an anti-BSA-IgG im Serum auf, so war sie in der Regel auch in der SF erhöht (Tab. 14). Das gleiche galt für die anti-GPI-IgG- (Tab. 15), anti-CKM-IgG (Tab. 17) und schwächer für die anti-PGM-IgG- (Tab. 16) Konzentration.

5.2.6 VERGLEICH DER ANTIKÖRPERKONZENTRATIONEN MIT DER GPI- UND DER ENTZÜNDUNGSAKTIVITÄT

Erwartungsgemäß war keine Korrelation der GPI-Aktivität mit den Konzentrationen der Antikörper mit Spezifität für PGM, CKM und BSA nachzuweisen, weder im Serum noch in der SF. Mit der anti-GPI-IgG, sowohl gegen das rekombinante GPI als auch gegen die kommerzielle Aufreinigung, war eine signifikante, aber schwache Korrelation in der SF zu erkennen ($r_s = 0,3884$ bzw. $r_s = 0,4008$, Abb. 39). Im Serum hingegen verhielten sich diese Werte eher gegenläufig.

Ein Vergleich der Entzündungsaktivität, gemessen durch die beiden Parameter CRP und BSG, fiel unterschiedlich aus. Während für das CRP keine Zusammenhang mit den Antikörperkonzentrationen erkennbar war (Abb. 40), zeigte die BSG in SF eine statistisch signifikante positive Korrelation mit der anti-GPI-IgG-Konzentration, wiederum gegen beide verwendeten GPI-Antigene ($r_s = 0,8167$ bzw. $r_s = 0,7584$, Abb. 41), aber auch mit der anti-PGM-IgG-Konzentration ($r_s = 0,7334$).

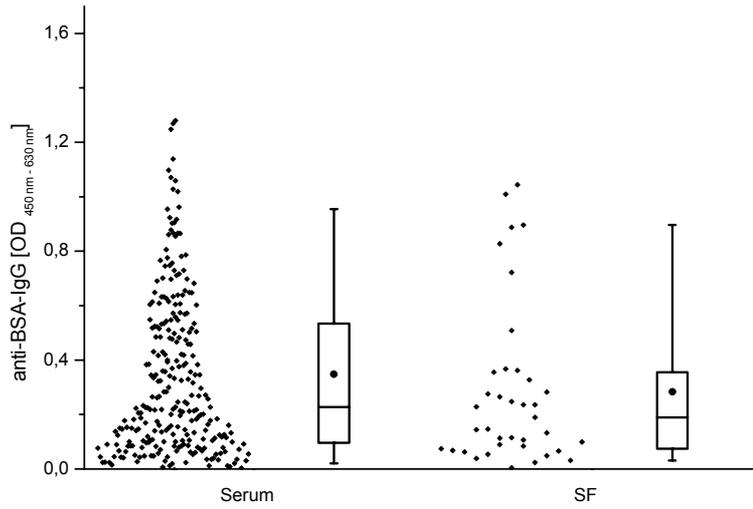


Abbildung 34: anti-BSA-IgG-Konzentration (ELISA) in Serum und SF.

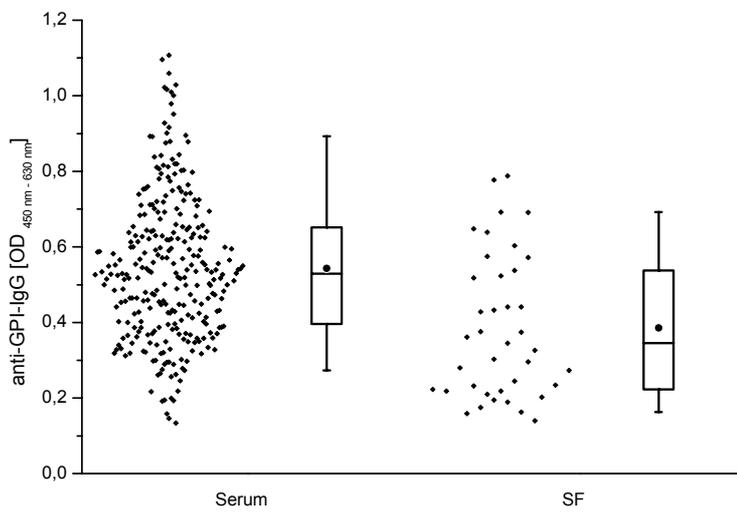


Abbildung 35: anti-GPI-IgG-Konzentration (ELISA) in Serum und SF.

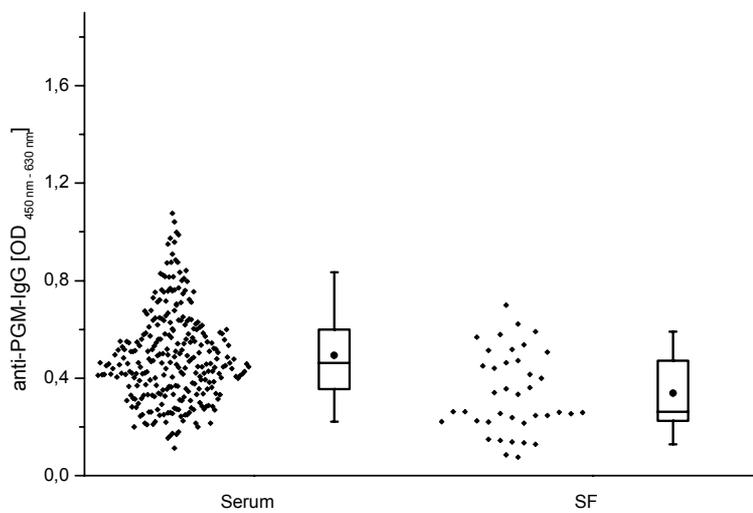


Abbildung 36: anti-PGM-IgG-Konzentration (ELISA) in Serum und SF.

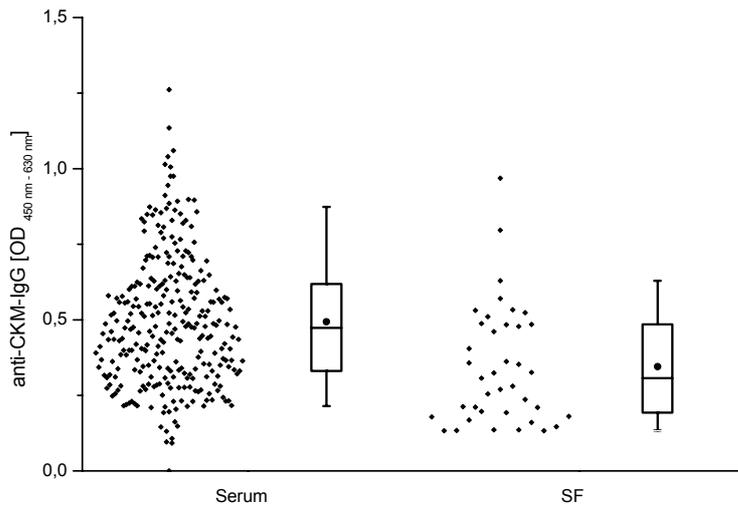


Abbildung 37: anti-CKM-IgG-Konzentration (ELISA) in Serum und SF.

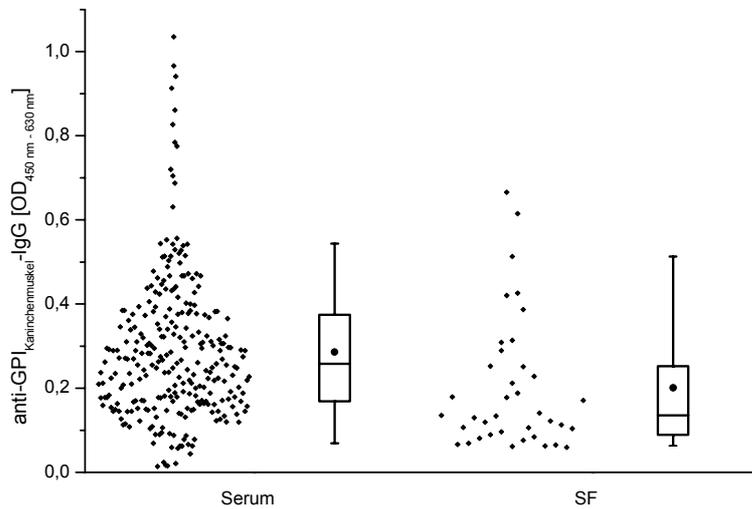


Abbildung 38: Konzentration von IgG, das an die kommerzielle Aufreinigung bindet, (ELISA) in Serum und SF.

	Serum		SF	
Rang	OD _{450 nm - 630 nm}		OD _{450 nm - 630 nm}	Rang
1	0,012		0,031	1
2	0,110		0,068	3
3	0,126		0,228	5
4	0,196		0,054	2
5	0,420		0,327	6
6	0,430		0,509	7
7	0,485		0,089	4
8	0,962		1,044	8

Tabelle 14: Korrelation der anti-BSA-IgG-Konzentration im Serum und entsprechenden SF-Proben (n = 8). Serumprobe und gleichzeitig entnommene SF stehen in einer Zeile nebeneinander. Sowohl für die Serum- als auch für die SF-Werte sind die Ränge in Graustufen kodiert: Die drei niedrigsten sind hellgrau hinterlegt, die mittleren zwei mittelgrau und die drei höchsten dunkelgrau.

Tabellen 15-18: Zur Korrelation stehen Serumprobe und gleichzeitig entnommene SF in einer Zeile nebeneinander. Sowohl für die Serum- als auch für die SF-Werte sind die Ränge in Graustufen kodiert: Die drei niedrigsten sind hellgrau hinterlegt, die mittleren drei mittelgrau und die vier höchsten (in Tabelle 18 die drei höchsten) dunkelgrau.

Serum		SF	
Rang	OD _{450 nm -630 nm}	OD _{450 nm -630 nm}	Rang
1	0,195	0,159	1
2	0,295	0,163	2
3	0,34	0,428	5
4	0,377	0,433	6
5	0,427	0,303	4
6	0,449	0,189	3
7	0,498	0,572	10
8	0,528	0,441	7,5
9	0,537	0,441	7,5
10	0,539	0,518	9

Tabelle 15: Korrelation der anti-GPI-IgG-Konzentration im Serum und entsprechenden SF-Proben (n = 10).

Serum		SF	
Rang	OD _{450 nm -630 nm}	OD _{450 nm -630 nm}	Rang
1	0,170	0,129	2
2	0,345	0,400	6
3	0,394	0,518	9
4	0,442	0,086	1
5	0,46	0,361	5
6	0,478	0,341	4
7	0,496	0,472	8
8	0,509	0,622	10
9	0,579	0,441	7
10	0,582	0,220	3

Tabelle 16: Korrelation der anti-PGM-IgG-Konzentration im Serum und entsprechenden SF-Proben (n = 10).

Serum		SF	
Rang	OD _{450 nm -630 nm}	OD _{450 nm -630 nm}	Rang
1	0,145	0,133	1
2	0,331	0,307	5
3	0,334	0,146	2
4	0,350	0,485	9
5	0,366	0,270	4
6	0,384	0,326	6
7	0,47	0,197	3
8	0,497	0,461	7
9	0,511	0,478	8
10	0,653	0,531	10

Tabelle 17: Korrelation der anti-CKM-IgG-Konzentration im Serum und entsprechenden SF-Proben (n = 10).

Serum		SF	
Rang	OD _{450 nm -630 nm}	OD _{450 nm -630 nm}	Rang
1	0,078	0,212	6
2	0,09	0,059	1
3	0,115	0,178	5
4	0,131	0,066	2
5	0,167	0,289	8
6	0,178	0,130	4
7	0,212	0,089	3
8	0,374	0,252	7
9	0,539	0,615	9

Tabelle 18: Korrelation der Konzentration von IgG, das an die kommerzielle GPI-Aufreinigung bindet, im Serum und entsprechenden SF-Proben (n = 10).

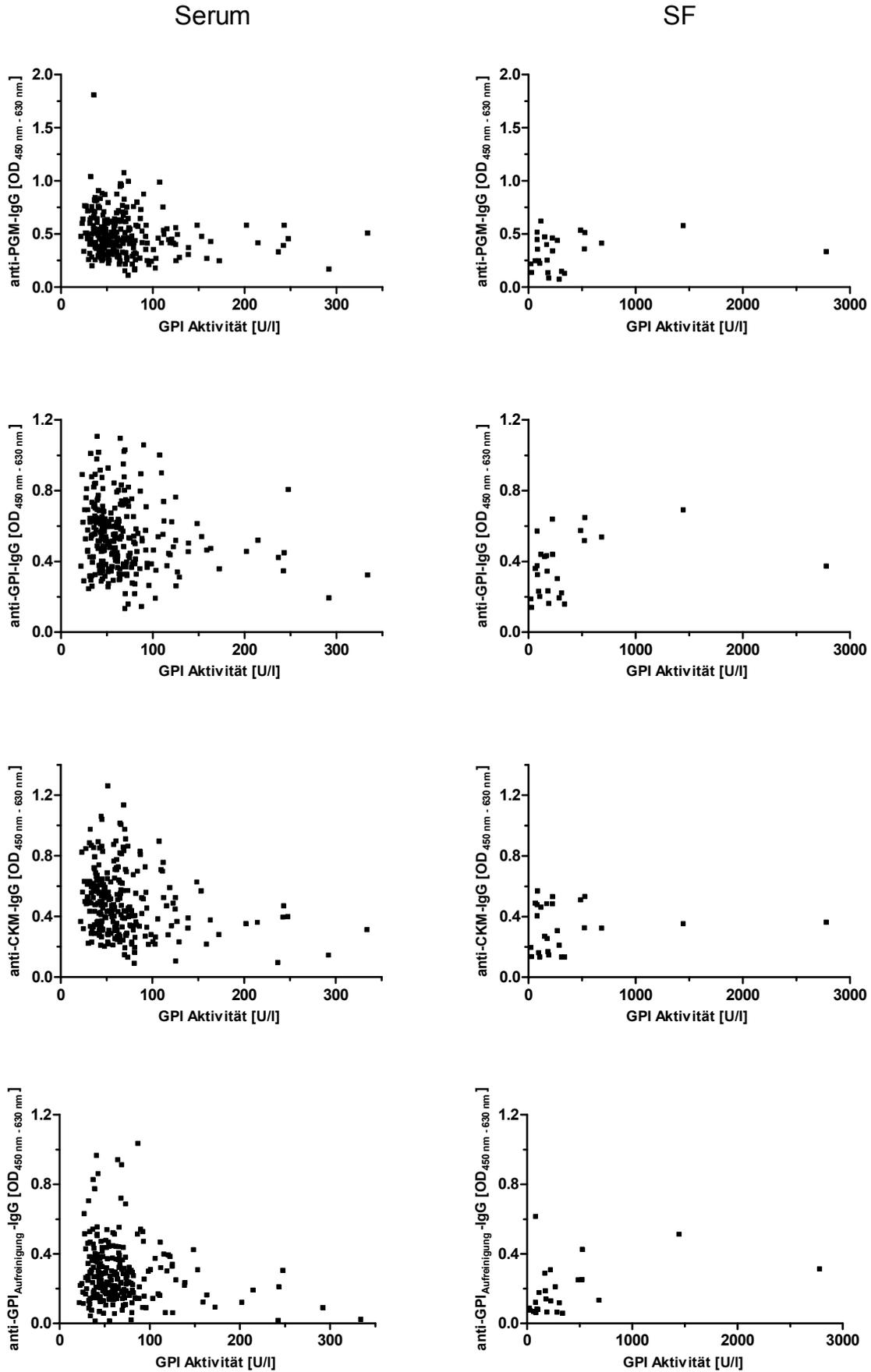
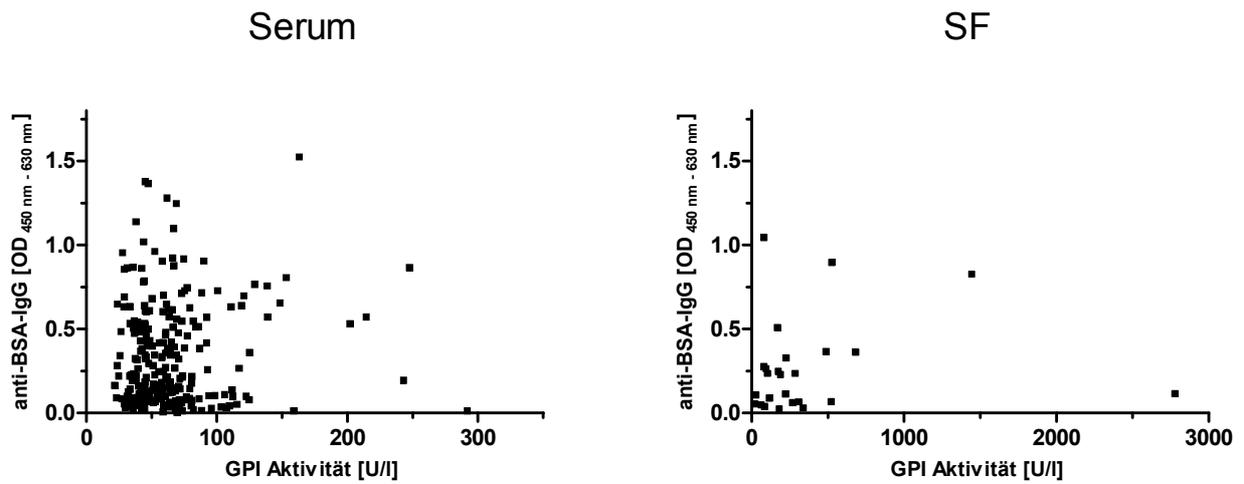


Abbildung 39: Korrelation der ELISA-IgG-Konzentrationen mit der GPI-Aktivität.



	Serum	SF
anti-PGM-IgG	n = 261 $r_s = -0,1862$ $p = 0,0025$	n = 26 $r_s = 0,0728$ $p = 0,7237$
anti-GPI-IgG	n = 262 $r_s = -0,1826$ $p = 0,0030$	n = 26 $r_s = 0,3884$ $p = 0,0499$
anti-CKM-IgG	n = 261 $r_s = -0,2504$ $p < 0,0001$	n = 26 $r_s = 0,1611$ $p = 0,4319$
anti-GPI _{Aufreinigung} -IgG	n = 250 $r_s = -0,1447$ $p = 0,0221$	n = 25 $r_s = 0,4008$ $p = 0,0471$
anti-BSA-IgG	n = 253 $r_s = 0,0005$ $p = 0,9932$	n = 25 $r_s = 0,2258$ $p = 0,2778$

Abbildung 39 (Fortsetzung): Korrelation der ELISA-IgG-Konzentrationen mit der GPI-Aktivität.

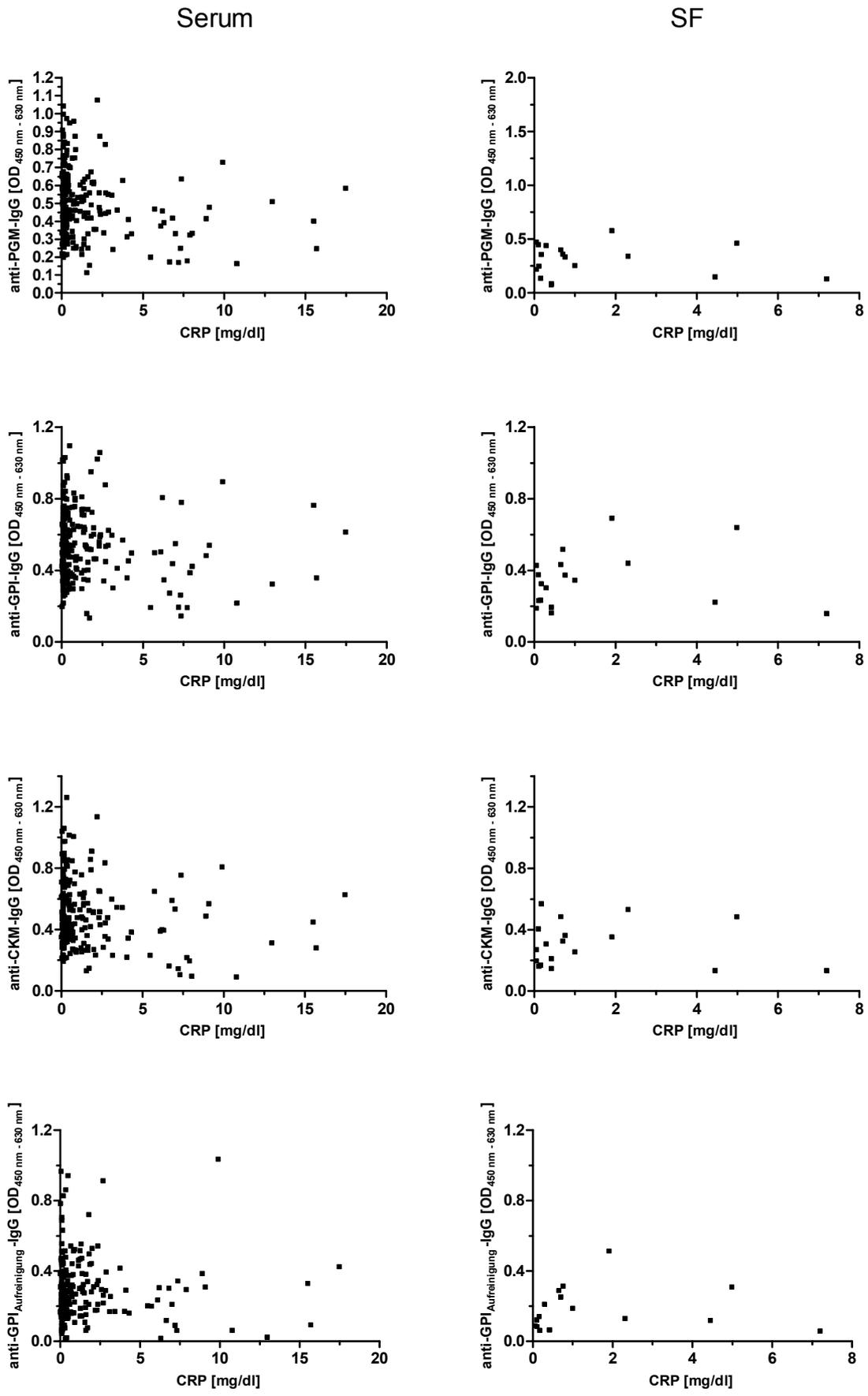
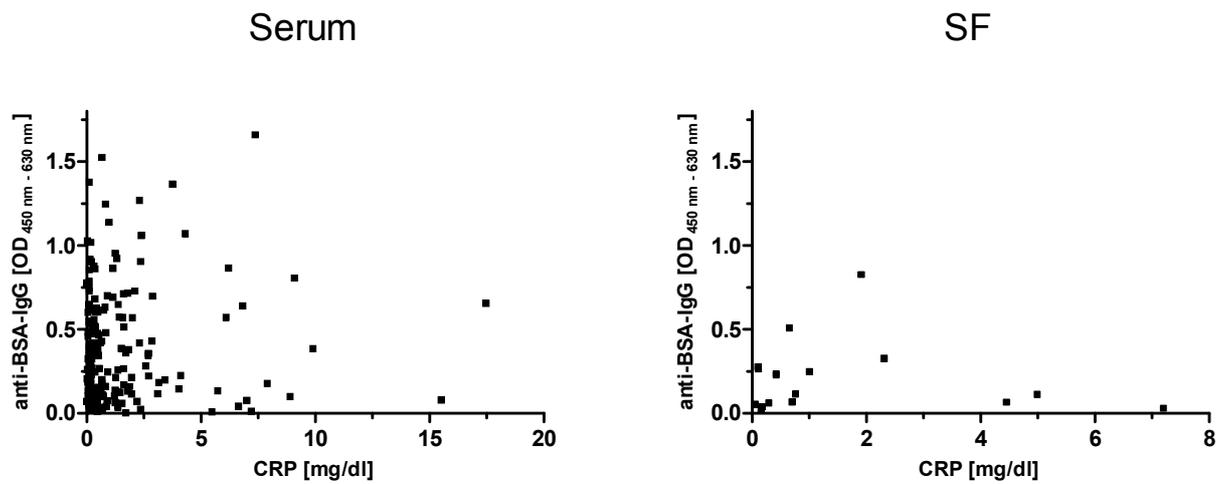


Abbildung 40: Korrelation der ELISA-IgG-Konzentrationen mit der CRP-Konzentration.



	Serum	SF
anti-PGM-IgG	n = 236 $r_s = -0,1230$ $p = 0,0591$	n = 18 $r_s = -0,0527$ $p = 0,8355$
anti-GPI-IgG	n = 237 $r_s = -0,0636$ $p = 0,3294$	n = 18 $r_s = 0,2014$ $p = 0,4228$
anti-CKM-IgG	n = 236 $r_s = -0,1527$ $p = 0,0189$	n = 18 $r_s = 0,0269$ $p = 0,9157$
anti-GPI _{Aufreinigung} -IgG	n = 227 $r_s = 0,0081$ $p = 0,9039$	n = 17 $r_s = 0,2636$ $p = 0,3066$
anti-BSA-IgG	n = 228 $r_s = 0,0437$ $p = 0,5114$	n = 17 $r_s = 0,0993$ $p = 0,7045$

Abbildung 40 (Fortsetzung): Korrelation der ELISA-IgG-Konzentrationen mit der CRP-Konzentration

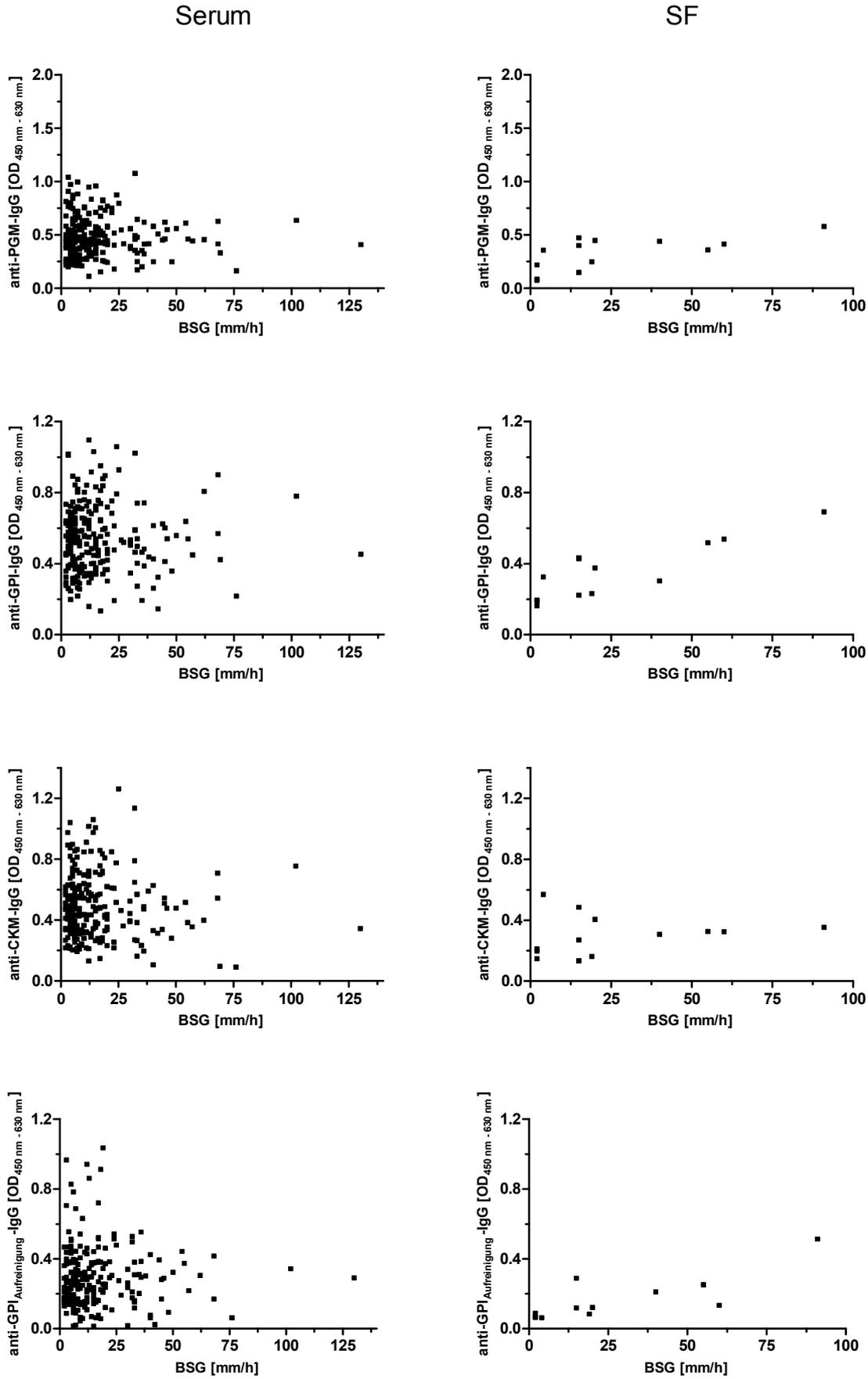
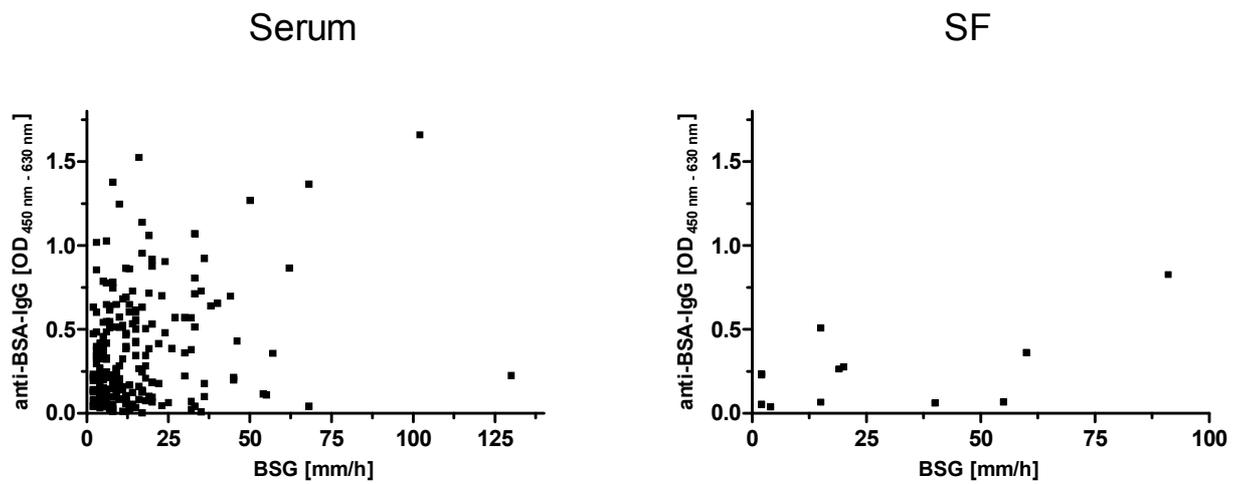


Abbildung 41: Korrelation der ELISA-IgG-Konzentrationen mit der BSG.



	Serum	SF
anti-PGM-IgG	n = 235 $r_S = 0,0039$ $p = 0,9532$	n = 13 $r_S = 0,7334$ $p = 0,0043$
anti-GPI-IgG	n = 236 $r_S = 0,0172$ $p = 0,7926$	n = 13 $r_S = 0,8167$ $p = 0,0007$
anti-CKM-IgG	n = 235 $r_S = -0,0552$ $p = 0,3996$	n = 13 $r_S = 0,3834$ $p = 0,1960$
anti-GPI _{Aufreinigung} -IgG	n = 226 $r_S = 0,0690$ $p = 0,3020$	n = 12 $r_S = 0,7584$ $p = 0,0042$
anti-BSA-IgG	n = 227 $r_S = 0,1990$ $p = 0,0026$	n = 12 $r_S = 0,4833$ $p = 0,1115$

Abbildung 41 (Fortsetzung): Korrelation der ELISA-IgG-Konzentrationen mit der BSG

6 DISKUSSION

Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung der humoralen Immunantwort gegen das systemische, zytosolische Antigen Glukose-6-phosphat-Isomerase bei Patienten, die an einer Juvenilen Idiopathischen Arthritis leiden.

Die hier dargestellten Ergebnisse (tabellarische Übersicht der Ergebnisse in den den Tab. A42-A45) zeigen, dass GPI, aber auch andere Proteine wie CKM und PGM von Autoantikörpern vom IgG-Typ erkannt werden. Dies gilt für RA- und JIA-Patienten, jedoch auch für gesunde Individuen. Diese Beobachtungen stehen zwar im Widerspruch zu einer Studie, die eine hohe Spezifität und Sensitivität von anti-GPI-IgG für die RA gezeigt hat (Schaller et al., 2001), aber sie stimmen überein mit eine Reihe von aktuelleren Untersuchungen an größeren Studienpopulationen (Herve et al., 2003; Kassahn et al., 2002; Matsumoto et al., 2003; Schubert et al., 2002).

Die hier dargestellten Daten sind die erste detaillierte Analyse zur Bedeutung von anti-GPI-IgG bei der JIA. Matsumoto und Kollegen hatten in ihre große Studie über anti-GPI-IgG bei humanen Arthritiden, insbesondere bei RA, 19 Seren von 4 JIA-Patienten eingeschlossen (Matsumoto et al., 2003). Diese Proben zeigten eine leicht erhöhte GPI-Reaktivität. Aufgrund des Alters der Patienten (29 +/- 6 Jahre) und aufgrund der langen Krankheitsdauer (17 Jahre im Mittel) können diese wenigen Proben nicht als repräsentativ für die JIA angesehen werden. In einer erst kürzlich publizierten Studie unterschied sich eine Gruppe aus 82 JIA-Patienten hinsichtlich der GPI-Reaktivität nicht von der gesunden Kontrollgruppe (Schmitt et al., 2004). Jedoch wurden in dieser Publikation keine Angaben zur genauen Diagnose und zur Epidemiologie der untersuchten Patienten gemacht. Somit beinhalten die hier dargestellten Daten die erste Untersuchung zur GPI-Reaktivität unter Berücksichtigung aller JIA-Untergruppen.

Auch wenn bei der JIA und ihren Untergruppen für Konzentrationen von anti-GPI-IgG, anti-PGM-IgG oder anti-CKM-IgG teilweise statistisch signifikant unterschiedliche Mittelwerte gefunden wurden, bleibt festzuhalten, dass die beobachteten Differenzen marginal waren. Dies erlaubt in keinem der Fälle die Festlegung eines

Grenzwertes, der sowohl eine gute Sensitivität als auch Spezifität erreicht. Daher eignet sich die Bestimmung dieser Parameter nicht zu diagnostischen Zwecken.

Somit ist nahe liegend, dass anti-GPI-IgG, das im Mausmodell nachweislich arthritogen ist, kein allgemeines, pathogenes Agens bei der JIA ist. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass in Einzelfällen eine Immunantwort gegen GPI an der Auslösung einer Arthritis beteiligt ist. Denn vereinzelt wurden sehr hohe anti-GPI-IgG-Konzentrationen beobachtet. Zur Beurteilung der pathogenetischen Relevanz dieser hohen anti-GPI-IgG-Titer müssten diese Patienten weiterhin beobachtet werden und deren Krankheitsverlauf mit den Antikörperkonzentrationen korreliert werden. Eine weitere Nachweismöglichkeit für die Pathogenität dieser Antikörper wäre ihr Transfer in ein humanisiertes Mausmodell (Naparstek und Plotz, 1993). Ein negatives Ergebnis könnte aber auch auf unterschiedliche Effektormechanismen bei Mensch und Maus zurückgeführt werden; daher würde nur ein positiver Ausgang Hinweise auf die Pathogenität dieser Antikörper geben (Ji et al., 2002a).

Um sehr feine Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen herauszuarbeiten, waren die untersuchten Gruppen zu klein. Eine Untergruppenanalyse erschien dennoch sinnvoll, da – wie in der Einleitung dargestellt – es zahlreiche Hinweise darauf gibt, dass JIA nicht als homogenes Krankheitsbild gesehen werden darf.

Bei den densitometrisch, semiquantitativ ausgewerteten Immunoblots zur Bestimmung des anti-GPI-IgG wiesen die psoriatische und die Enthesitis-assoziierte JIA signifikant erhöhte Mittelwerte im Vergleich zu anderen Diagnosen auf. Dies ist auf einige Individuen zurückzuführen, die sehr hohe anti-GPI-IgG-Konzentrationen zeigten. Der höchste Median war bei der systemischen JIA zu beobachten. Im ELISA mit rekombinantem, humanem GPI konnte dies nicht bestätigt werden. Somit können diese im Immunoblot erhöhten Antikörperkonzentrationen als Epiphänomen einer ausgeprägten, chronischen Entzündung gedeutet werden, die bei weniger stringenten Bedingungen nachgewiesen wurden.

Für Antikörper der beiden anderen Spezifitäten (CKM und PGM) konnte in den Immunoblots kein signifikanter Unterschied für die Konzentrationen nachgewiesen werden. Dabei muss berücksichtigt werden, dass diese beiden Proteine die kommer-

zielle GPI-Aufreinigung aus Kaninchenmuskel zwar verunreinigen, aber in deutlich geringerer Konzentration als GPI in diesem Versuchsaufbau zur Quantifizierung der Antikörper zum Einsatz kamen. So sind auch die deutlich niedrigeren Messwerte zu erklären. Die Konzentration des Antigens bei der Bestimmung von Antikörpern ist für die Sensitivität aber von entscheidender Bedeutung. Dieser Versuchsaufbau war also optimiert zur Detektion von anti-GPI-IgG; Unterschiede bei den beiden anderen Antikörperspezifitäten können dem Nachweis entgangen sein.

Die ELISA waren für jedes Antigen einzeln optimiert. Darauf können Unterschiede in den Ergebnissen zwischen den ELISA und Immunoblots zurückgeführt werden, aber auch darauf, dass der Immunoblot weniger stringent war und darauf, dass unterschiedliche Antigene verwendet wurden. In den Immunoblots wurde natives, aus Kaninchenmuskel aufgereinigtes Antigen verwendet, das entsprechend post-translational modifiziert war. Im ELISA wurden rekombinante, humane Antigene eingesetzt. Zwar besteht eine hohe Homologie zwischen den entsprechenden Proteinen aus Mensch und Kaninchen (GPI zu 93% identisch, PGM und CKM jeweils zu 97%), aber durch die rekombinante Expression in *E.coli* fehlen post-translationale Modifikationen. Weiterhin lagen die Proteine im Immunoblot in denaturierter Form vor, während sie im ELISA noch ihre nativen Konfigurationen innehatten.

Im ELISA wurde der einzige signifikante Unterschied zwischen der gesunden Kontrollgruppe und Patienten für anti-CKM-IgG gefunden: Erstaunlicherweise war bei der systemischen JIA die Konzentration niedriger als bei der gesunden Kontrollgruppe. Dies ist nochmals ein Hinweis darauf, dass erhöhte Autoantikörperkonzentrationen nicht notwendigerweise zu einer pathologischen Autoimmunreaktion führen.

Bei der RA wurde im ELISA signifikant mehr anti-GPI-IgG gefunden als bei RF positiver, polyartikulärer und nicht kategorisierbarer JIA (jeweils Faktor ca. 1,5). Bei nicht kategorisierbarer JIA wurde im Vergleich zur RA weiterhin signifikant weniger anti-CKM-IgG und IgG, das an die kommerzielle Aufreinigung bindet, gefunden (Faktor ca. 1,5 bzw. 2). Für diese beiden Antikörperspezifitäten wurden bei der systemischen JIA ebenfalls niedrigere Werte gemessen als bei der RA (jeweils Faktor ca. 1.5). Die bis hierher erwähnten erhöhten Antikörperkonzentrationen bei

der RA waren nicht auf IgG einer unspezifischen Hypergammaglobulinämie zurückzuführen, da für das anti-BSA-IgG der niedrigste Mittelwert für diese Patientengruppe gemessen wurde. Somit war im ELISA ein Trend zu erhöhten anti-GPI-IgG und anti-CKM-IgG bei der RA zu beobachten, doch war dieser nicht sehr ausgeprägt und auch wenig spezifisch.

Für die anti-PGM-IgG wurden die höchsten Werte bei der persistierend oligoartikulären JIA gefunden; diese Werte waren signifikant höher (Faktor ca. 1,5) als bei der systemischen Verlaufsform und der nicht-kategorisierbaren JIA. Die Messwerte für IgG, das an die verunreinigte, kommerzielle GPI-Aufreinigung bindet, decken sich mit der Summe aus anti-GPI-, anti-PGM- und anti-CKM-IgG.

In den Immunoblots konnte weder eine Anreicherung noch eine Depletion der Autoantikörper in der SF nachgewiesen werden. Im ELISA waren die Konzentrationen der IgG, die an die rekombinanten Proteine und die kommerzielle GPI-Aufreinigung binden, signifikant niedriger in der SF. Eine Anreicherung von anti-GPI-IgG in der Gelenkskavität wie sie im Mausmodell gefunden wurde (Wipke et al., 2002), war zumindest in Form von in der SF gelösten Antikörpern nicht nachzuweisen.

Signifikante positive Korrelationen zwischen Autoantikörperkonzentration und Krankheitsaktivität wurden nur in der SF gefunden. Hier waren die BSG und anti-PGM-IgG, anti-GPI-IgG und IgG, das die kommerzielle GPI-Aufreinigung bindet, positiv korreliert. Dabei ist aber zu berücksichtigen, dass in der SF niedrigere Antikörperkonzentration als im Serum gemessen wurden. Letzteres spricht gegen eine lokale Autoantikörperproduktion oder -anreicherung. Die BSG repräsentiert die Entzündungsaktivität über einen längeren Zeitraum, als das CRP. Weiterhin hat das CRP eine deutliche kürzere Halbwertszeit als IgG. Sind Antikörperkonzentrationen während des Krankheitsverlaufes also erhöht (pathogenetisch oder als Epiphänomen), so wird eine Überlappung mit einer erhöhten BSG eher nachzuweisen sein als mit dem CRP.

Die Serum-GPI-Aktivität als Maß für die Konzentration des nativen Antigens war bei der systemischen JIA im Vergleich zu mehreren anderen JIA-Verlaufsformen, zur Arthralgie, zu gesunden Kontrollpersonen und zur RA signifikant erhöht. Dabei waren

die Serum-GPI-Aktivitäten schwach positiv mit den Entzündungsparametern CRP und BSG korreliert, aber nicht mit den SF-GPI-Aktivitäten. Letztere waren extrem erhöht. In der SF waren die GPI-Aktivitäten stark positiv korreliert mit der LDH-Aktivität, nicht aber im Serum. Die LDH ist wie die GPI ein zytosolisches Enzym des Intermediärstoffwechsels. Somit deutet diese positive Korrelation auf einen massiv erhöhten, auf die Gelenkskavität begrenzten Zelluntergang hin. Im Serum war weiterhin keine Korrelation mit der Serum-Hämoglobin-Konzentration festzustellen, womit Erythrozyten als Quelle für erhöhte GPI-Aktivitäten ausgeschlossen werden konnten.

Immunhistochemische Untersuchungen zeigten eine veränderte bzw. gesteigerte Expression von GPI in arthritischen Gelenken (Mensch: Schaller et al., 2001; Maus: Matsumoto et al., 2002). Zusammen mit der hier beobachteten stark erhöhten Konzentration des nativen Antigens in der Gelenkskavität könnte dies auf lokale Dysregulation der GPI-Expression oder Immunantwort gegen GPI hindeuten. Sollte allerdings eine humorale Immunreaktion gegen das lokal stark erhöhte GPI stattfinden, wäre zu erwarten, dass eine erhöhte anti-GPI-IgG Konzentration in der Gelenkskavität nachzuweisen gewesen wäre. Diese war jedoch im Vergleich zu den Serumwerten erniedrigt. Des Weiteren war die Korrelation von GPI-Aktivität und anti-GPI-IgG-Konzentration sehr schwach. Somit liegt die Annahme nahe, dass es sich bei der stark erhöhten GPI-Aktivität im Gelenk um ein Epiphänomen des lokalen Entzündungsprozesses und Zellunterganges handelt. Neben dieser lokalen GPI-bezogenen Dysregulation wurde aufgrund von Daten aus dem Mausmodell vorgeschlagen, dass die initiale Immunantwort gegen GPI zwar systemisch stattfindet, die Immunkomplexablagerung aber nur im Gelenk zur Aktivierung der Komplementkaskade führt (Matsumoto et al., 2002). Dies erscheint insofern möglich, da auf der Knorpeloberfläche zellgebundene Komplementinhibitoren fehlen (Fearon, 1978; Meri und Pangburn, 1990). Immobilisierte Antigen-Antikörper-Komplexe auf der Knorpeloberfläche könnten somit eine potentes Substrat zur Komplementaktivierung darstellen. Allerdings sprechen unsere Daten gegen eine ausgeprägte systemische Immunreaktion gegen GPI, da die anti-GPI-Konzentrationen bei gesunden Kontrollen und Patienten ähnlich waren.

Aus den hier untersuchten JIA-Patienten konnten keine Rückschlüsse auf die Bedeutung der GPI-Reaktivität für die Krankheitsauslösung gezogen werden, da nur sehr wenige Patienten unmittelbar zu Krankheitsbeginn in diese Studie aufgenommen wurden. Sollten anti-GPI-IgG von pathogenetischer Relevanz sein, wäre aber zu erwarten gewesen, dass das Ausmaß der GPI-Reaktivität mit der Krankheitsaktivität ausgeprägt korrelieren würde. Dies war jedoch nicht der Fall. Matsumoto und Kollegen haben 225 RA-Patienten zu Krankheitsbeginn auf anti-GPI-IgG untersucht und konnten keine Erhöhung nachweisen (Matsumoto et al., 2003).

Die sich widersprechenden Ergebnisse aus früheren Studien zur Spezifität und Sensitivität von anti-GPI-IgG bei der RA wurden teilweise auf unterschiedliche Studienpopulationen zurückgeführt. So wurden in die Studie, die eine deutliche, spezifische GPI-Reaktivität bei RA-Patienten nachwies, viele Patienten mit dem aggressiven Felty-Syndrom eingeschlossen (Schaller et al., 2001). Inzwischen ist eine weitere Studie erschienen, die zeigt, dass GPI-Reaktivität mit extraartikulären Komplikationen der RA assoziiert ist (van Gaalen et al., 2004). In der von uns untersuchten JIA-Gruppe waren Patienten mit systemischer JIA, der sehr aggressiven und komplikationsreichen Verlaufsform, eingeschlossen. Diese Patienten zeigten zum Teil ausgeprägte Krankheitsaktivität, aber keine verstärkte humorale Immunantwort gegen GPI, wenngleich native Antigen vermehrt im Serum nachgewiesen werden konnte. Somit darf angenommen werden, dass kein Zusammenhang zwischen Aggressivität bzw. Komplikationsträchtigkeit und GPI-Reaktivität bei der JIA vorliegt.

Es bleibt also festzuhalten, dass die Bestimmung von anti-GPI-IgG keine diagnostische Bedeutung für die JIA hat, und diese eine klinische Diagnose bleibt. Ein JIA-spezifischer, serologischer Marker, der eine frühe Bestätigung der Diagnose und damit gezielte therapeutische Intervention erlauben würde, fehlt also weiterhin.

Bei Autoantikörpern, die bei Autoimmunerkrankungen gefunden werden, sollte pathologische von pathogenetischer Relevanz strikt getrennt werden. Pathogene Antikörper sind unmittelbar an dem Entstehen von Symptomen beteiligt, während pathologische Antikörper als Epiphänomen der Erkrankung zu sehen sind. Die pathogenetische Relevanz der anti-GPI-IgG im KxN/B-Mausmodell darf als eindeutig erwiesen angesehen werden. Ein ähnlich eindeutig pathogener Antikörper wurde für

humane Arthritiden bisher nicht gefunden. Als spezifisch pathologisch dürfen die anti-CCP-Antikörper bei der RA betrachtet werden.

Antikörper, die Autoantigene binden, können das pathogene Agens bei Autoimmunerkrankungen darstellen. Dies ist beispielsweise gesichert für die autoimmune, hämolytische Anämie. Dabei fallen pathogene Autoantikörper weder durch abnormale Vorläuferzellen noch durch die für den B-Zellrezeptor verwendeten Gensequenzen auf; somit gehören sie scheinbar zum "normalen" Immunglobulin-Repertoire.

Autoantikörper sind allerdings nicht per se pathologisch oder pathogen; vielmehr gehören sie sogar zum physiologischen Repertoire des gesunden Immunsystems. Solche natürlichen Autoantikörper sind in der Regel vom IgM-Typ und von niedriger Affinität. Gelegentlich gehören sie aber auch zur IgG-Klasse und zeigen eine mittlere Affinität (Avrameas und Ternynck, 1993). Antikörper gegen Kernantikörper (antinuclear antibodies, ANA) (Tan et al., 1997) oder gegen Hitzeschockproteine (Kindas-Mugge et al., 1993) kommen häufig auch bei gesunden Individuen vor. Der Rheumafaktor, der sogar zu den Diagnosekriterien der RA gilt, taucht mit zunehmendem Alter ebenfalls häufiger in gesunden Individuen auf (Smolen, 1996). Auch die hier dargestellten Daten zeigen, dass Autoantikörper nicht notwendigerweise pathologisch sind. Für alle drei untersuchten Spezifitäten (GPI, CKM und PGM) fanden wir bei einigen gesunden Kontrollpersonen Antikörper der IgG-Klasse. Autoantikörpern sollte also nur dann eine pathologische oder pathogene Relevanz zugeschrieben werden, wenn ihr Auftreten mit Symptomen verbunden ist.

Bei humanen Arthritiden wie der RA und der JIA tauchen zahlreiche Autoantikörper auf (für die RA siehe Tab. 2). Bei der JIA weisen 75 - 85 % der oligoartikulären und 40 - 50 % der polyartikulären Verlaufsformen einen positiven ANA-Titer auf. Bei der systemischen JIA werden ANA in der Regel nicht gefunden. Ein Zusammenhang zwischen positiven ANA-Titern und dem Auftreten einer Uveitis ist beschrieben. RF werden bei 5 - 10 % der JIA-Patienten gefunden, die fast ausnahmslos polyartikuläre Verläufe aufweisen (Cassidy und Petty, 2001). Die für die RA sehr spezifischen anti-CCP-Antikörper werden bei der JIA nahezu ausschließlich beim RF positiven, polyartikulären Verlauf gefunden (van Rossum et al., 2003). Dies ist neben der überlap-

penden HLA-Assoziation ein weiterer Hinweis dafür, dass es sich bei dieser Krankheit um die juvenile Manifestation einer RA handelt. Eine Immunantwort gegen Kollagen-II wurde immer wieder sowohl bei der RA als auch bei der JIA diskutiert. Kollagen-II ist ein Hauptbestandteil des Gelenkknorpels und eine Immunantwort gegen dieses Protein ist zumindest im Tiermodell arthritogen (Courtenay et al., 1980). Bisher gibt es keine große Studie zum Auftreten von anti-Kollagen-II-Antikörpern bei der JIA. Jedoch wurde in bisher zwei Untersuchungen mit 10 bzw. 9 JIA-Patienten gezeigt, dass die orale Verabreichung von Kollagen-II (aus Huhn bzw. Rind) zu einer deutlichen klinischen Verbesserung führte, die auf orale Toleranzinduktion zurückgeführt wurde (Barnett et al., 1996; Myers et al., 2001). Diese Erkenntnisse wurden bisher nicht auf größere Studienpopulationen übertragen.

Zum besseren Verständnis des Ablaufs von Autoimmunerkrankungen wie der JIA sollte dieser in drei Phasen unterteilt werden: Krankheitsauslösung, Krankheitsaufrechterhaltung und Effektormechanismen. In der KxN/B-Mauslinie sind diese drei Phasen sehr schön zu beobachten. So ist zur Krankheitsauslösung ein definierter ternärer Komplex aus MHC-II-Molekül, präsentiertem Peptid und TZR notwendig. Die Krankheit wird aufrechterhalten durch Antikörper, die GPI binden. Mit nachlassender Antikörperkonzentration klingen die arthritischen Symptome ab (Korganow et al., 1999). Bei den Effektormechanismen und Destruktionsprozessen sind Mastzellen, Komplementkaskade und inflammatorische Zytokine involviert. Somit erlaubt dieses Tiermodell gezielte Beobachtungen in verschiedenen Phasen einer Autoimmunerkrankung. Weiterhin können in diesem Tiermodell Antigen-abhängige und -unabhängige Prozesse im pathogenetischen Verlauf der Arthritismanifestation unterschieden werden.

Zahlreiche Hinweise sprechen bei der JIA für einen Antigen-abhängigen Prozess. Neben der HLA-Assoziation (Albert und Scholz, 1998; Glass und Giannini, 1999; Thomson und Donn, 2002) sind dies der Phänotyp (Silverman et al., 1993) und die Oligoklonalität (Bernstein et al., 1993; Sioud et al., 1992) der in der Gelenkskavität vorherrschenden T-Zellen. Gefäßnah werden Ansammlungen CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten gefunden, die von B-Zellen umgeben sind (Murray et al., 1996). Somit scheint auch das humorale Immunsystem beteiligt. Die Analyse des synovialen B-Zellrepertoires bei RA-Patienten weist auf eine lokale, Antigen-vermittelte Immun-

antwort hin: So sind die V_H -Gene der meisten B-Zellen aus synovialen Keimzentren kaum mutiert, was nahelegt, dass sie erst kürzlich in die Gelenkshöhle eingewandert sind (Kim und Berek, 2000). Die wenigen Mutationen, die in den variablen Regionen gefunden werden, sind sehr überlappend (Clausen et al., 1998). Entsprechende Daten zur Situation bei der JIA gibt es bisher nicht.

In der K/BxN-Mauslinie sind eindeutig Antikörper krankheitsvermittelnd, jedoch kommt B-Zellen auch unabhängig von ihrer Funktion als Vorläuferzellen Autoantikörper-sezernierender Plasmazellen eine Bedeutung bei der Entwicklung pathologischer Autoreaktivität zu: Im murinen Modell des SLE konnte gezeigt werden, dass B-Zellen bzw. davon abgeleitete Plasmazellen trotz einer Mutation, die die Sekretion von Immunglobulinen unterbindet, entscheidend an der Entwicklung des Krankheitsbildes beteiligt sind (Chan et al., 1999). Neben ihrer Funktion als Plasmazellvorläufer sind B-Zellen auch potente Antigen-präsentierende Zellen. Eine B-Zell-depletion könnte somit auch Auswirkungen auf die T-Zell-B-Zell-Kooperation haben.

Derzeit sind noch keine therapeutischen Strategien etabliert, die die Antigen-abhängigen Prozesse des spezifischen Immunsystems zum Ziel haben (mit Ausnahme der o.a. Toleranzinduktion durch orale Gabe von Kollagen-II bei kleinen Studienpopulationen). Bei der RA wurden jedoch erfolgversprechende Ergebnisse durch den Einsatz eines chimären, murin-humanen, monoklonalen Antikörpers (Rituximab) gegen das B-Zell-spezifische Antigen CD20 erzielt: Verabreichung von Methotrexat und Hochdosiskortison führte nach 24 Wochen zu einer 50% Verbesserung der Symptomatik in 13% der Fälle. Durch Addition des Antikörpers wurde bei 43% der Patienten eine ähnlich deutliche Besserung erzielt (Edwards et al., 2004). Die Applikation dieses anti-CD20-Antikörpers führte zu einer Depletion von B-Zellen im peripheren Blut. Plasmazellen, die $CD20^-$ sind, nahmen nur initial ab und blieben dann konstant. Ähnlich verhielten sich $CD3^+$ Zellen. Die Autoren führten diese Beobachtung auf die Verabreichung von Kortikosteroiden zurück. Die Immunglobulin-Spiegel blieben für IgG, IgM und IgA unverändert im Normbereich; weiterhin wurde keine Abnahme des anti-Tetanus-Titers beobachtet (Edwards et al., 2004). Somit darf angenommen werden, dass der therapeutische Effekt dieses Antikörpers nicht in der Hemmung der Antikörperproduktion begründet liegt, sondern in der Beeinflussung der B-Zellfunktion. Nahe liegt die Annahme, dass B-Zellen, die ja in großer

Zell in der Synovia von RA-Patienten vorkommen, in ihrer Funktion als Antigen-präsentierende Zellen gehemmt werden. Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen die Bedeutung von B-Zellen für die Pathogenese der RA. Sie weisen auf einen praktikablen Ansatz einer therapeutischen Beeinflussung des spezifischen Immunsystems hin. Ob diese Beobachtungen auf die JIA übertragbar sind, bleibt abzuwarten.

Zu den etablierten therapeutischen Optionen bei der JIA gehört die Suppression der Entzündungsantwort durch steroidale und nicht-steroidale Antiphlogistika sowie eine Immunsuppression durch Zytostatika. Daneben gewinnen in letzter Zeit Medikamente an Bedeutung, die proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α oder IL-1 inaktivieren (Elliott et al., 1997; Lahdenne et al., 2003; Manners, 2002). Der erfolgreiche Einsatz dieser Medikamente zeigt, dass der nicht unmittelbar Antigen-abhängigen Freisetzung dieser Zytokine eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung der JIA-Symptome zukommt.

Ein weiterer Antigen-unabhängiger Prozess des angeborenen Immunsystems ist die Aktivierung der Komplementkaskade über deren alternativen Weg bei der JIA (Aggarwal et al., 2000). Damit unterscheidet sich die JIA von der RA, für die eine Aktivierung über den klassischen Weg angenommen wird (Ji et al., 2002a; Zvaifler, 1973). Die Komplementaktivierung über den alternativen Weg ist eine interessante Parallele zum K/BxN-Mausmodell (Ji et al., 2002a). Die arthritogenen Antikörper in diesem Mausmodell sind in der Regel vom IgG1-Typ. Murines IgG1 ist ein schlechter Aktivator der Komplementkaskade über den klassischen Weg. Für die Aktivierung über den alternativen Weg wird diskutiert, dass es zur Bildung von Komplexen des Oberflächen-gebundenen Komplementfaktors C3b und arthritogenem IgG kommt. Unter Vermittlung von Properdin könnte dieser Komplex dann Faktor B des alternativen Weges binden (Ji et al., 2002a). Ein Therapieversuch durch Inhibition der Komplementkaskade, beispielsweise durch einen C5a-Antagonisten, zeigte im Tierversuche erfolgversprechende Ergebnisse (Banda et al., 2002).

Dass der humoralen Immunantwort bei der Pathogenese humaner Arthritiden wieder vermehrte Aufmerksamkeit zuteil wird, ist nicht zuletzt eine Folge der K/BxN-Mauslinie. Auch wenn dieses Modell durch Klarheit besticht, wirft es eine bisher nicht

beantwortbare Frage auf: Wie führt eine Immunreaktion gegen ein systemisches Antigen zu einer so ausgeprägt lokalisierten Antwort. Insbesondere stellt sich diese Frage, da für GPI bisher keine Gelenk- oder Knorpel-spezifische Funktion oder Expression bekannt ist.

Es wurde vorgeschlagen, dass Knorpel für GPI einen "molekularen Schwamm" darstellt, der GPI über zahlreiche, niedrig affine Bindungen an Zuckerreste der Proteoglykane im Knorpel hält (Matsumoto et al., 2002). Die Beobachtung, dass anti-GPI auf der Knorpeloberfläche arthritischer Gelenke verstärkt nachweisbar war, ist gut mit diesem Modell zu vereinbaren, denn über die lokale Entzündungsantwort kommt es zu einem Zelluntergang, der wiederum zur Freisetzung von intrazellulärer GPI führt. In der hier dargestellten Arbeit deutete ja auch die stark positive Korrelation von LDH und GPI in der Gelenkskavität auf einen massiven, lokal begrenzten Zelluntergang hin. Matsumoto et al. erschien die Bindung, ein "Aufsaugen", der GPI im Knorpel auch deswegen sinnvoll, weil die natürlichen Substrate der GPI phosphorylierte Zucker sind. Hier muss allerdings eingewendet werden, dass phosphorylierte Zucker, insbesondere Glukose-6-phosphat und Fruktose-6-phosphat, Substrat zahlreicher Enzyme sind. Somit kann dies zwar die Bindung an Knorpel erklären, aber keineswegs die Spezifität. Aus Tumorgewebe konnte ein hochaffiner GPI-Rezeptor (gp78) isoliert und kloniert werden (Watanabe et al., 1991). Ob dieser Rezeptor im Knorpel- oder Pannusgewebe vorkommt, ist bisher nicht untersucht worden. Für das Knorpelgewebe, auf dessen Oberfläche die anti-GPI-Akkumulation bei der K/BxN-Mauslinie gefunden wird, dürfte ein bedeutsames Vorkommen dieses oder eines anderen zellgebundenen GPI-Rezeptors unwahrscheinlich sein, da Knorpel zum weitaus größten Teil aus extrazellulärer Matrix besteht.

Neben dem "molekularen Schwamm" für GPI im Gelenk schlagen Matsumoto et al. als weitere Möglichkeit für die lokale Begrenzung der Erkrankung eine Gelenk-spezifische Komplementaktivierung auf der Knorpeloberfläche aufgrund fehlender inhibitorischer Moleküle wie DAF und MCP vor (Matsumoto et al., 2002). Dies ist sicherlich ein interessanter Erklärungsansatz. Allerdings kann er nicht beantworten, warum die Arthritis bei der K/BxN-Mauslinie verschiedene Gelenke ausspart. So sind Schulter und Hüfte nie betroffen (Wipke et al., 2002). Die mechanische Bean-

spruchung dürfte für diese beiden Gelenke ähnlich hoch sein wie für die betroffenen Gelenke. Die Frage des Befallsmusters stellt sich nicht nur für dieses murine Modell, sondern auch für die humanen Krankheitsbilder, und ist bisher unbeantwortet.

GPI ist ein systemisches Antigen. Eine erhöhte Serum-GPI-Aktivität wurde beispielsweise auch bei einigen neoplastischen Erkrankungen beobachtet. Beim Bronchialkarzinom (Gomm et al., 1988) und bei der akuten myeloischen Leukämie (Xu et al., 1996) wurden ähnliche hohe Serum-GPI-Aktivitäten beobachtet, wie sie bei einigen der Arthritis-Patienten gefunden wurden. Eine Arthritis-Symptomatik für diese Tumor-Patienten wurde jedoch nicht beschrieben. Somit geht eine verstärkte Exposition des Immunsystems mit dem Autoantigen GPI nicht notwendigerweise mit einer pathologischen Autoimmunreaktion einher. Auch die aufgrund einer Neoplasie erhöhten Serum-GPI-Aktivitäten dürften – wie die in der SF erhöhten Werte – auf einen erhöhten Zellumsatz zurückzuführen sein. Die Serum-GPI-Aktivität als Tumormarker wurde mangels Spezifität aufgegeben.

Wie es zu der systemischen Autoreaktivität bei der K/BxN-Mauslinie kommt, ist noch unklar. Diese Mauslinie entstand durch die Kreuzung der T-Zell-Rezeptor-transgenen Mauslinie KRN mit der NOD-Mauslinie. Der KRN-Rezeptor erkennt ursprünglich bovine RNase, die durch Klasse-II MHC A^k-Moleküle präsentiert wird (Kouskoff et al., 1996). Dieser KRN-Rezeptor zeigt jedoch auch eine Kreuzreaktivität mit MHC A^{g7}-Molekülen, die mit Peptiden aus GPI beladen sind. Für die Krankheitsauslösung ist nur der KRN-T-Zellrezeptor notwendig und kein anderer endogener TZR (Mangialaio et al., 1999).

Die autoreaktiven T-Zellen entkommen der klonalen Deletion und konnten im peripheren Blut nachgewiesen werden (Kouskoff et al., 1996). Mittels *in vivo* Stimulation des KRN-Rezeptors durch das V_β6-stimulierende Superantigen *mtv7* wurde keine Arthritis ausgelöst (Mangialaio et al., 1999). Dies zeigt, dass Stimulation des KRN-T-Zellrezeptors ohne MHC-Peptid-Komplex nicht zu einer pathologischen Autoimmunreaktion führt. Arthritis entwickelt sich somit nur dann, wenn die beiden genetischen Elemente – der KRN-T-Zellrezeptor und der MHC A^{g7} –, die für sich alleine nicht arthritogen sind, aufeinander treffen.

Ohne MHC A⁹⁷ werden GPI reaktive T-Zellen im Thymus nicht positiv selektiert. Erstaunlich ist aber, dass GPI reaktive T-Zellen im Kontext von MHC A⁹⁷ der negativen Selektion entkommen. Fehlende Expression im Thymus kann nicht die Ursache sein, da es sich bei GPI um ein glykolytisches Enzym handelt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die KRN-T-Zellrezeptor exprimierenden Zellen noch eine weitere TZR α - oder TZR β -Kette exprimieren (Kouskoff et al., 1996). Ein solcher unvollständiger Allelausschluss ist für den TZR α -Lokus bekannt, für den TZR β -Kette jedoch ungewöhnlich (Heath und Miller, 1993). Mit diesem unvollständigen Allelausschluss kann erklärt werden, wie autoreaktive T-Zellen der negativen Selektion entkommen: T-Zellen, die einen autoreaktiven TZR schwach exprimieren, entgehen der negativen Selektion durch einen zweiten, nicht-autoreaktiven TZR. Das Erkennen eines Antigens in der Peripherie über den nicht-autoreaktiven TZR führt dann zur Aktivierung der T-Zelle und Hochregulation des autoreaktiven TZR, und damit zu pathologischer Autoreaktivität (Zal et al., 1996). Da es bei der K/BxN-Mauslinie zur Ausbildung von Symptomen kommt, muss angenommen werden, dass die Mechanismen der peripheren Toleranzinduktion und -aufrechterhaltung diese autoreaktiven T-Zellen nicht kontrollieren können.

Ferner muss erwartet werden, dass bei der Entwicklung der Arthritis in der K/BxN-Mauslinie die Mechanismen der B-Zell-Toleranz ebenfalls versagen. B-Zellen werden kontinuierlich im Knochenmark generiert. Noch unreif wandern sie in periphere lymphatische Organe. Dort bilden sie eine heterogene Population aus naiven B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen (Rajewsky, 1996). Im murinen System konnte gezeigt werden, dass nur 3% der $1-2 \times 10^7$ täglich im Knochenmark gebildeten unreifen B-Zellen das reife B-Zellkompartiment erreichen (Allman et al., 1993). Während des Reifungsprozesses unterliegen B-Zellen sowohl positiver als auch negativer Selektion. Für die negative Selektion dieser Zellpopulation sind drei Mechanismen bekannt: Deletion (Hartley et al., 1991), Anergie (Goodnow et al., 1988) und Änderung der Rezeptorspezifität, "receptor editing" (Gay et al., 1993; Hertz und Nemazee, 1997; Tiegs et al., 1993). Letztere erfolgt durch eine Erhöhung der RAG-1- und RAG-2-Aktivität, beides Enzyme, die am Umbau der Rezeptorsequenzen essentiell beteiligt sind. In der Maus beträgt der Anteil an solchen "umgebauten" Antikörpern 25% (Casellas et al., 2001).

In einer Untersuchung von B-Zellen, die aus dem Knochenmark und Blut dreier gesunder Individuen gewonnen wurden, wurde versucht, die Anzahl autoreaktiver B-Zellen zu quantifizieren. Dabei wurden zum einen Antikörper gegen ein Zelllysate humaner Epithelzellen (Bestimmung von antinukleären Antikörpern) und zum anderen Antikörper gegen definierte Antigene wie DNA, Insulin und LPS bestimmt. 75,9% der frühen, unreifen Prä-B-Zellen produzierten autoreaktive Rezeptoren. Der Anteil an B-Zellen, die das Knochenmark verlassen und noch autoreaktiv sind, beträgt 40,7%. Im reifen B-Zellkompartiment sind noch immer 20% der produzierten Antikörper autoreaktiv (Wardemann et al., 2003). Mehr als die Hälfte der frühen, unreifen Prä-B-Zellen war polyreaktiv. Diese wurden jedoch zu fast 90% negativ selektiert, so dass im reifen B-Zellkompartiment nur noch 4,3% polyreaktive B-Zellen nachzuweisen waren (Wardemann et al., 2003). Humorale Autoreaktivität kann somit also nicht nur auf Polyreaktivität zurückgeführt werden. Die autoreaktiven Immunglobulin-Sequenzen zeichneten sich in zwei Eigenschaften von den übrigen ab: Sie enthielten signifikant längere CDR3-Regionen (komplementaritätsbestimmende Region) und waren stärker positiv geladen (Wardemann et al., 2003).

V-, D- und J-Gensegmente, die Immunglobuline kodieren, haben eine evolutionäre Selektion von mehr als 200 Millionen Jahren hinter sich. Besonders aggressiv autoreaktive Genfragmente dürften diesem Druck nicht stand gehalten haben. Dass dennoch ein so großer Anteil von B-Zellen Autoreaktivität zeigt, kann zurückgeführt werden auf den großen evolutionären Vorteil, den eine Vielfalt an V-, D- und J-Gensegmenten mit sich bringt, und auf den Rekombinationsmechanismus, bei dem einzelne Nukleotide zufällig eingefügt oder deletiert werden. Die durch diese Mechanismen vermittelte Antikörpervielfalt und Flexibilität bringt ein hohes Ausmaß an Autoreaktivität mit sich. Die Deletion der autoreaktiven B-Zellen ist unvollständig, so dass es immer noch zu einer ausgeprägten Produktion autoreaktiver Antikörper kommt. Für den humoralen Zweig des Immunsystems war schon früher klar, dass Autoreaktivität in Form von natürlichen Autoantikörpern durchaus unter physiologischen Bedingungen vorkommt (Coutinho et al., 1995; Lacroix-Desmazes et al., 1998). Bei 20% autoreaktiven B-Zellen ist aber auch naheliegend, dass schon kleine Veränderungen im Milieu dieser Zellen zu pathologischer Autoimmunreaktion führen können. Diese Veränderungen werden Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Ein Tiermodell, wie die K/BxN-Mauslinie, an deren Arthritis-Entwicklung

zweifelsfrei Autoantikörper ursächlich beteiligt sind, werden bei diesen Untersuchungen hilfreich sein.

Die K/BxN-Mauslinie hat gezeigt, dass Autoreaktivität gegen ein systemisches Antigen lokal-begrenzte Symptome auslösen kann. Die bestechende Klarheit dieses Modells steht aber im krassen Gegensatz zu unserem Verständnis der zu Grunde liegenden Prozesse. So bleibt auch weiterhin unklar, warum sämtliche "Einrichtungen" versagen, die die Bildung von "Gewebsautotoxinen" normalerweise verhindern. Klar ist aber, dass das systemische Antigen GPI kein allgemeines arthritogenes Autoantigen bei humanen Arthritiden, weder bei der RA noch bei der JIA darstellt. Das auslösende Ereignis dieser Autoimmunerkrankungen bleibt somit weiter im Dunkeln.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Die Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA) ist die häufigste rheumatische Erkrankung im Kindesalter. Auch wenn es zahlreiche Hinweise darauf gibt, dass es sich um eine Autoimmunerkrankung handelt, sind die der Pathogenese zu Grunde liegenden Vorgänge dieses Krankheitsbildes noch weitestgehend unbekannt. Ein suffizientes Tiermodell zur Erforschung dieser Krankheit ist ebenfalls bisher nicht gefunden worden.

In der K/BxN-Mauslinie entwickelt sich am Tag 25 bis 35 spontan eine Arthritis der distalen Gelenke. Die Krankheit in diesem Mausmodell wird ausgelöst durch eine Autoimmunreaktion gegen das systemische Antigen Glukose-6-phosphat-Isomerase (GPI), ein zytosolisches Enzym der Glykolyse und Glukoneogenese. Die Krankheit kann durch Transfer von anti-GPI-Antikörpern in gesunde Wildtyp-Mäuse übertragen werden. Die Symptomatik erkrankter Mäuse deckt sich in auffallender Weise mit dem Erkrankungsbild menschlicher Arthritiden. Daher sollte hier untersucht werden, inwieweit eine humorale Autoimmunreaktion gegen GPI für die Pathogenese der JIA von Bedeutung ist.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine humorale Immunantwort gegen GPI kein allgemeines pathogenetisches Prinzip bei der JIA ist. Auch wenn einige Patienten eine erhöhte Konzentration von anti-GPI-IgG im Serum zeigten, konnte für keine Patientengruppe methodenunabhängig eine erhöhte Konzentration von anti-GPI-IgG in Serum oder SF nachgewiesen werden. Das native Antigen, bestimmt durch die GPI-Aktivität, war erhöht im Serum von Patienten mit systemischer Verlaufsform der JIA. Ebenso fand sich eine lokalisierte Erhöhung der GPI-Aktivität in der SF. Diese ging mit einer Konzentrationserhöhung der Laktatdehydrogenase-Aktivität einher. Daraus lässt sich folgern, dass ein massiv erhöhter Zellumsatz in der Gelenkshöhle zu einer Freisetzung von GPI führt, und somit die Voraussetzung für eine Exposition des Immunsystems mit diesem Antigen gegeben sind. Die in einer initialen Studie zur Spezifität und Sensitivität einer Immunantwort gegen GPI bei RA verwendete GPI-Präparation enthielt Verunreinigungen in beträchtlichem Ausmaß. Diese wurden in dieser Arbeit identifiziert. Es zeigte sich, dass auch diese Proteine

IgG-Antikörper binden, aber ebenfalls ohne Spezifität für die JIA oder eine ihrer Untergruppen.

Es bleibt also festzuhalten, dass das K/BxN-Mausmodell grundlegende Untersuchungen zum Verständnis von Autoimmunreaktionen erlaubt, ohne jedoch ein Modell für die Pathogenese humaner Arthritiden zu sein.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Aggarwal, A., Bhardwaj, A., Alam, S. und Misra, R. (2000). Evidence for activation of the alternate complement pathway in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 39, 189-92.

Aggarwal, A. und Misra, R. (1994). Juvenile chronic arthritis in India: is it different from that seen in Western countries? *Rheumatol Int* 14, 53-6.

Albert, E. D. und Scholz, S. (1998). Juvenile arthritis: genetic update. *Baillieres Clin Rheumatol* 12, 209-18.

Allman, D. M., Ferguson, S. E., Lentz, V. M. und Cancro, M. P. (1993). Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. *J Immunol* 151, 4431-44.

Amraei, M. und Nabi, I. R. (2002). Species specificity of the cytokine function of phosphoglucose isomerase. *FEBS Lett* 525, 151-5.

Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S. J., von Boehmer, H., Bronson, R., et al. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298, 1395-401.

Ansell, B. M., Bywaters, E. G. und Lawrence, J. S. (1969). Familial aggregation and twin studies in Still's disease. Juvenile chronic polyarthritis. *Rheumatology* 2, 37-61.

Arguedas, O., Porras, O. und Fath, A. (1995). Juvenile chronic arthritis in Costa Rica. A pilot referral study. *Clin Exp Rheumatol* 13, 119-23.

Arnett, F. C., Edworthy, S. M., Bloch, D. A., McShane, D. J., Fries, J. F., Cooper, N. S., Healey, L. A., Kaplan, S. R., et al. (1988). The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31, 315-24.

Austin, L. M., Ozawa, M., Kikuchi, T., Walters, I. B. und Krueger, J. G. (1999). The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J Invest Dermatol* 113, 752-9.

Avrameas, S. und Ternynck, T. (1993). The natural autoantibodies system: between hypotheses and facts. *Mol Immunol* 30, 1133-42.

Bakker, N. P., van Erck, M. G., Zurcher, C., Faaber, P., Lemmens, A., Hazenberg, M., Bontrop, R. E. und Jonker, M. (1990). Experimental immune mediated arthritis in rhesus monkeys. A model for human rheumatoid arthritis? *Rheumatol Int* 10, 21-9.

- Banda, N. K., Kraus, D., Vondracek, A., Huynh, L. H., Bendele, A., Holers, V. M. und Arend, W. P.** (2002). Mechanisms of effects of complement inhibition in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 46, 3065-75.
- Barnett, M. L., Combitchi, D. und Trentham, D. E.** (1996). A pilot trial of oral type II collagen in the treatment of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39, 623-8.
- Bernstein, B. H., Miltenburg, A. M., van Laar, J. M., Hertzberger, R. und Breedveld, F. C.** (1993). T cell receptor rearrangements in juvenile rheumatoid arthritis: a search for oligoclonality. *Clin Exp Rheumatol* 11, 209-13.
- Beutler, E.** (1984). Glucose Phosphate Isomerase. In *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*, E. Beutler, ed.
- Bodansky, O. und Schwartz, M. K.** (1966). Phosphohexose Isomerase: Clinical Aspects, Vol 9 (New York, Academic Press).
- Bordet, J.** (1898). *Ann Inst Pateur* 12, 688-95.
- Brewer, E. J., Bass, J. C. und Cassidy, J. T.** (1972). Criteria for the classification of juvenile rheumatoid arthritis. *Bulletin on the Rheumatic Diseases* 23, 712-9.
- Brewer, E. J., Jr., Bass, J., Baum, J., Cassidy, J. T., Fink, C., Jacobs, J., Hanson, V., Levinson, J. E., et al.** (1977). Current proposed revision of JRA Criteria. JRA Criteria Subcommittee of the Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Section of The Arthritis Foundation. *Arthritis Rheum* 20, 195-9.
- Brunner, H. I., Ivaskova, E., Haas, J. P., Andreas, A., Keller, E., Hoza, J., Havelka, S., Scholz, S., et al.** (1993). Class I associations and frequencies of class II HLA-DRB alleles by RFLP analysis in children with rheumatoid-factor-negative juvenile chronic arthritis. *Rheumatol Int* 13, 83-8.
- Bukulmez, H., Thompson, S. D., Horn, P., Giannini, E. H., Glass, D. N. und Colbert, R. A.** (2001). Tapasin polymorphism is associated with systemic onset juvenile rheumatoid arthritis (SoJRA). *Arthritis Rheum* 44, 1707.
- Burd, P. R., Rogers, H. W., Gordon, J. R., Martin, C. A., Jayaraman, S., Wilson, S. D., Dvorak, A. M., Galli, S. J., et al.** (1989). Interleukin 3-dependent and -independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. *J Exp Med* 170, 245-57.
- Callen, J. P.** (2000). Dermatomyositis. *Lancet* 355, 53-7.
- Casellas, R., Shih, T. A., Kleinewietfeld, M., Rakonjac, J., Nemazee, D., Rajewsky, K. und Nussenzweig, M. C.** (2001). Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science* 291, 1541-4.
- Cassidy, J. T. und Petty, R. E.** (2001). *Textbook of pediatric rheumatology*, 4th edn (Philadelphia, W.B. Saunders Company).

- Chan, O. T., Hannum, L. G., Haberman, A. M., Madaio, M. P. und Shlomchik, M. J.** (1999). A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med* 189, 1639-48.
- Chaput, M., Claes, V., Portetelle, D., Cludts, I., Cravador, A., Burny, A., Gras, H. und Tartar, A.** (1988). The neurotrophic factor neuroleukin is 90% homologous with phosphohexose isomerase. *Nature* 332, 454-5.
- Chen, W. und Wahl, S. M.** (2003). TGF-beta: the missing link in CD4(+)CD25(+) regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 85-9.
- Clausen, B. E., Bridges, S. L., Jr., Lavelle, J. C., Fowler, P. G., Gay, S., Koopman, W. J. und Schroeder, H. W., Jr.** (1998). Clonally-related immunoglobulin VH domains and nonrandom use of DH gene segments in rheumatoid arthritis synovium. *Mol Med* 4, 240-57.
- Clemens, L. E., Albert, E. und Ansell, B. M.** (1983). HLA studies in IgM rheumatoid-factor-positive arthritis of childhood. *Ann Rheum Dis* 42, 431-4.
- Clemens, L. E., Albert, E. und Ansell, B. M.** (1985). Sibling pairs affected by chronic arthritis of childhood: evidence for a genetic predisposition. *J Rheumatol* 12, 108-13.
- Consortium, T. F.-G. A.** (1997). An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat Genet* 17, 399-403.
- Courtenay, J. S., Dallman, M. J., Dayan, A. D., Martin, A. und Mosedale, B.** (1980). Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 283, 666-8.
- Coutinho, A., Kazatchkine, M. D. und Avrameas, S.** (1995). Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol* 7, 812-8.
- Davidson, A. und Diamond, B.** (2001). Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 345, 340-50.
- De Maria, A., Malnati, M., Moretta, A., Pende, D., Bottino, C., Casorati, G., Cottafava, F., Melioli, G., et al.** (1987). CD3+4-8-WT31-(T cell receptor gamma+) cells and other unusual phenotypes are frequently detected among spontaneously interleukin 2-responsive T lymphocytes present in the joint fluid in juvenile rheumatoid arthritis. A clonal analysis. *Eur J Immunol* 17, 1815-9.
- Diament-Berger, M. S.** (1891). *Du Rheumatism Nouveau (Polyarthrite deformante) chez les Enfants* (Paris, Lecrosnier et Babe Libraires).
- Donn, R., Alourfi, Z., De Benedetti, F., Meazza, C., Zeggini, E., Lunt, M., Stevens, A., Shelley, E., et al.** (2002). Mutation screening of the macrophage migration inhibitory factor gene: positive association of a functional polymorphism of macrophage migration inhibitory factor with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 46, 2402-9.

- Donn, R. P., Barrett, J. H., Farhan, A., Stopford, A., Pepper, L., Shelley, E., Davies, N., Ollier, W. E., et al.** (2001a). Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. British Paediatric Rheumatology Study Group. *Arthritis Rheum* 44, 802-10.
- Donn, R. P., Shelley, E., Ollier, W. und Thomson, W.** (2001b). A Novel 5'Flanking Region Polymorphism of Macrophage Inhibitory Factor (MIF) is Associated with UK Juvenile Idiopathic Arthritis. Paper presented at: Juvenile Rheumatology.
- Edwards, J. C., Blades, S. und Cambridge, G.** (1997). Restricted expression of Fc gammaRIII (CD16) in synovium and dermis: implications for tissue targeting in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 108, 401-6.
- Edwards, J. C. W., Szczepanski, L., Szechinski, J., Filipowicz-Sosnowska, A., Emery, P., Close, D. R., Stevens, R. M. und Shaw, T.** (2004). Efficacy of B-Cell-Targeted Therapy with Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 350, 2572-81.
- Ehrlich, P.** (1902). *Verh Ges Dtsch Naturforsch Aerzte* 1, 250-75.
- Ehrlich, P. und Morgenroth, J.** (1901). Ueber Hämolysine. *Berlin Klin Wochenschr* 38, 251-5.
- Elliott, M. J., Woo, P., Charles, P., Long-Fox, A., Woody, J. N. und Maini, R. N.** (1997). Suppression of fever and the acute-phase response in a patient with juvenile chronic arthritis treated with monoclonal antibody to tumour necrosis factor-alpha (cA2). *Br J Rheumatol* 36, 589-93.
- Epplen, C., Rumpf, H., Albert, E., Haas, P., Truckenbrodt, H. und Epplen, J. T.** (1995). Immunoprinting excludes many potential susceptibility genes as predisposing to early onset pauciarticular juvenile chronic arthritis except HLA class II and TNF. *Eur J Immunogenet* 22, 311-22.
- Faik, P., Walker, J. I., Redmill, A. A. und Morgan, M. J.** (1988). Mouse glucose-6-phosphate isomerase and neuroleukin have identical 3' sequences. *Nature* 332, 455-7.
- Fearon, D. T.** (1978). Regulation by membrane sialic acid of beta1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 1971-5.
- Feldmann, M., Brennan, F. M. und Maini, R. N.** (1996). Rheumatoid arthritis. *Cell* 85, 307-10.
- Fishman, D., Faulds, G., Jeffery, R., Mohamed-Ali, V., Yudkin, J. S., Humphries, S. und Woo, P.** (1998). The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102, 1369-76.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A. und Rudensky, A. Y.** (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330-6.

- Forre, O. und Smerdel, A.** (2002). Genetic epidemiology of juvenile idiopathic arthritis. *Scand J Rheumatol* 31, 123-8.
- Forre, O., Thoen, J., Dobloug, J. H., Egeland, T., Kvien, T. K., Mellbye, O. J. und Natvig, J. B.** (1982). Detection of T-lymphocyte subpopulation in the peripheral blood and the synovium of patients with rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis using monoclonal antibodies. *Scand J Immunol* 15, 221-6.
- Funasaka, T., Haga, A., Raz, A. und Nagase, H.** (2001). Tumor autocrine motility factor is an angiogenic factor that stimulates endothelial cell motility. *Biochem Biophys Res Commun* 285, 118-28.
- Gare, B. A.** (1998). Epidemiology. *Baillieres Clin Rheumatol* 12, 191-208.
- Gare, B. A. und Fasth, A.** (1992). Epidemiology of juvenile chronic arthritis in southwestern Sweden: a 5-year prospective population study. *Pediatrics* 90, 950-8.
- Gattorno, M., Facchetti, P., Ghiotto, F., Vignola, S., Buoncompagni, A., Prigione, I., Picco, P. und Pistoia, V.** (1997). Synovial fluid T cell clones from oligoarticular juvenile arthritis patients display a prevalent Th1/Th0-type pattern of cytokine secretion irrespective of immunophenotype. *Clin Exp Immunol* 109, 4-11.
- Gay, D., Saunders, T., Camper, S. und Weigert, M.** (1993). Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med* 177, 999-1008.
- Gerli, R., Bistoni, O., Russano, A., Fiorucci, S., Borgato, L., Cesarotti, M. E. und Lunardi, C.** (2002). In vivo activated T cells in rheumatoid synovitis. Analysis of Th1- and Th2-type cytokine production at clonal level in different stages of disease. *Clin Exp Immunol* 129, 549-55.
- Glass, D. N. und Giannini, E. H.** (1999). Juvenile rheumatoid arthritis as a complex genetic trait. *Arthritis Rheum* 42, 2261-8.
- Gomm, S. A., Keevil, B. G., Thatcher, N., Hasleton, P. S. und Swindell, R. S.** (1988). The value of tumour markers in lung cancer. *Br J Cancer* 58, 797-804.
- Goodnow, C. C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T. B., Smith-Gill, S. J., Brink, R. A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J. S., et al.** (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334, 676-82.
- Gordon, J. R. und Galli, S. J.** (1990). Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* 346, 274-6.
- Gorelik, L. und Flavell, R. A.** (2000). Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 12, 171-81.
- Griesmacher, A. und Peichl, P.** (2001). Autoantibodies associated with rheumatic diseases. *Clin Chem Lab Med* 39, 189-208.

- Grom, A. A., Thompson, S. D., Luyrink, L., Passo, M., Choi, E. und Glass, D. N.** (1993). Dominant T-cell-receptor beta chain variable region V beta 14+ clones in juvenile rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11104-8.
- Haffejee, I. E.** (1995). Rheumatoid arthritis and connective tissue disorders: juvenile chronic arthritis. *Baillieres Clin Rheumatol* 9, 59-63.
- Haffejee, I. E., Raga, J. und Coovadia, H. M.** (1984). Juvenile chronic arthritis in black and Indian South African children. *S Afr Med J* 65, 510-4.
- Haga, A., Niinaka, Y. und Raz, A.** (2000). Phosphohexose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin/maturation factor is a multifunctional phosphoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1480, 235-44.
- Hartley, S. B., Crosbie, J., Brink, R., Kantor, A. B., Basten, A. und Goodnow, C. C.** (1991). Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature* 353, 765-9.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J. V., Steinman, R. M., et al.** (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194, 769-79.
- Heath, W. R. und Miller, J. F.** (1993). Expression of two alpha chains on the surface of T cells in T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 178, 1807-11.
- Hertz, M. und Nemazee, D.** (1997). BCR ligation induces receptor editing in IgM+IgD- bone marrow B cells in vitro. *Immunity* 6, 429-36.
- Herve, C. A., Wait, R. und Venables, P. J.** (2003). Glucose-6-phosphate isomerase is not a specific autoantigen in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 42, 986-8.
- Hori, S., Nomura, T. und Sakaguchi, S.** (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-61.
- Jacobson, D. L., Gange, S. J., Rose, N. R. und Graham, N. M.** (1997). Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 84, 223-43.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. und Shlomchik, M.** (2001). *Immunobiology: the immune system in health and disease*, 5th edn (New York, Garland Publishing).
- Jeffery, C. J., Bahnson, B. J., Chien, W., Ringe, D. und Petsko, G. A.** (2000). Crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase, a glycolytic enzyme that moonlights as neuroleukin, autocrine motility factor, and differentiation mediator. *Biochemistry* 39, 955-64.
- Jerne, N. K.** (1974). Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris)* 125C, 373-89.

- Ji, H., Ohmura, K., Mahmood, U., Lee, D. M., Hofhuis, F. M., Boackle, S. A., Takahashi, K., Holers, V. M., et al.** (2002a). Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* 16, 157-68.
- Ji, H., Pettit, A., Ohmura, K., Ortiz-Lopez, A., Duchatelle, V., Degott, C., Gravallesse, E., Mathis, D., et al.** (2002b). Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody-induced arthritis. *J Exp Med* 196, 77-85.
- Kassahn, D., Kolb, C., Solomon, S., Bochtler, P. und Illges, H.** (2002). Few human autoimmune sera detect GPI. *Nat Immunol* 3, 411-2; discussion 2-3.
- Kelly, P. T. und Haponik, E. F.** (1994). Goodpasture syndrome: molecular and clinical advances. *Medicine (Baltimore)* 73, 171-85.
- Khattari, R., Cox, T., Yasayko, S. A. und Ramsdell, F.** (2003). An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4, 337-42.
- Kiessling, U., Doring, E., Listing, J., Meincke, J., Schontube, M., Strangfeld, A. und Zink, A.** (1998). Incidence and prevalence of juvenile chronic arthritis in East Berlin 1980-88. *J Rheumatol* 25, 1837-43.
- Kim, H. J. und Berek, C.** (2000). B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2, 126-31. Epub 2000 Feb 24.
- Kindas-Mugge, I., Steiner, G. und Smolen, J. S.** (1993). Similar frequency of autoantibodies against 70-kD class heat-shock proteins in healthy subjects and systemic lupus erythematosus patients. *Clin Exp Immunol* 92, 46-50.
- Kisielow, P., Bluthmann, H., Staerz, U. D., Steinmetz, M. und von Boehmer, H.** (1988). Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* 333, 742-6.
- Kitamura, D., Roes, J., Kuhn, R. und Rajewsky, K.** (1991). A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 350, 423-6.
- Knight, S. C., Fryer, P., Griffiths, S., Harding, B., Dixey, J. und Mansell, B.** (1989). Class II antigens on dendritic cells from the synovial fluids of patients with inflammatory arthritis. *Clin Exp Immunol* 78, 19-25.
- Korganow, A. S., Ji, H., Mangialaio, S., Duchatelle, V., Pelanda, R., Martin, T., Degott, C., Kikutani, H., et al.** (1999). From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* 10, 451-61.
- Kouskoff, V., Korganow, A. S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C. und Mathis, D.** (1996). Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 87, 811-22.
- Kunnamo, I., Kallio, P. und Pelkonen, P.** (1986). Incidence of arthritis in urban Finnish children. A prospective study. *Arthritis Rheum* 29, 1232-8.

- Kuruvilla, A. P., Shah, R., Hochwald, G. M., Liggitt, H. D., Palladino, M. A. und Thorbecke, G. J.** (1991). Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune diseases in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2918-21.
- Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S. V., Mouthon, L., Ayoub, A., Malanchere, E., Coutinho, A. und Kazatchkine, M. D.** (1998). Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Methods* 216, 117-37.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lahdenne, P., Vahasalo, P. und Honkanen, V.** (2003). Infliximab or etanercept in the treatment of children with refractory juvenile idiopathic arthritis: an open label study. *Ann Rheum Dis* 62, 245-7.
- Lee, D. M., Friend, D. S., Gurish, M. F., Benoist, C., Mathis, D. und Brenner, M. B.** (2002). Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science* 297, 1689-92.
- Letterio, J. J. und Roberts, A. B.** (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 16, 137-61.
- Liblau, R. S., Singer, S. M. und McDevitt, H. O.** (1995). Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 16, 34-8.
- Liston, A., Lesage, S., Wilson, J., Peltonen, L. und Goodnow, C. C.** (2003). Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* 4, 350-4.
- Maccioni, M., Zeder-Lutz, G., Huang, H., Ebel, C., Gerber, P., Hergueux, J., Marchal, P., Duchatelle, V., et al.** (2002). Arthritogenic monoclonal antibodies from K/BxN mice. *J Exp Med* 195, 1071-7.
- Mangialaio, S., Ji, H., Korganow, A. S., Kouskoff, V., Benoist, C. und Mathis, D.** (1999). The arthritogenic T cell receptor and its ligand in a model of spontaneous arthritis. *Arthritis Rheum* 42, 2517-23.
- Manners, P. J.** (2002). State of the art: Juvenile idiopathic arthritis. *APLAR Journal of Rheumatology* 5, 29-34.
- Manners, P. J. und Bower, C.** (2002). Worldwide prevalence of juvenile arthritis why does it vary so much? *J Rheumatol* 29, 1520-30.
- Marrack, P., Kappler, J. und Kotzin, B. L.** (2001). Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med* 7, 899-905.
- Matsumoto, I., Lee, D. M., Goldbach-Mansky, R., Sumida, T., Hitchon, C. A., Schur, P. H., Anderson, R. J., Coblyn, J. S., et al.** (2003). Low prevalence of antibodies to glucose-6-phosphate isomerase in patients with rheumatoid arthritis and a spectrum of other chronic autoimmune disorders. *Arthritis Rheum* 48, 944-54.

- Matsumoto, I., Maccioni, M., Lee, D. M., Maurice, M., Simmons, B., Brenner, M., Mathis, D. und Benoist, C.** (2002). How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease. *Nat Immunol* 3, 360-5.
- Matsumoto, I., Staub, A., Benoist, C. und Mathis, D.** (1999). Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science* 286, 1732-5.
- Meri, S. und Pangburn, M. K.** (1990). Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of complement: regulation via a sialic acid/polyanion binding site on factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3982-6.
- Metallnikoff, S.** (1900). *Ann Inst Pasteur* 14, 577-89.
- Morgan, M. E., Suttmuller, R. P., Witteveen, H. J., van Duivenvoorde, L. M., Zanelli, E., Melief, C. J., Snijders, A., Offringa, R., et al.** (2003). CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 48, 1452-60.
- Moroldo, M. B., Tague, B. L., Shear, E. S., Glass, D. N. und Giannini, E. H.** (1997). Juvenile rheumatoid arthritis in affected sibpairs. *Arthritis Rheum* 40, 1962-6.
- Murray, K. J., Luyrink, L., Grom, A. A., Passo, M. H., Emery, H., Witte, D. und Glass, D. N.** (1996). Immunohistological characteristics of T cell infiltrates in different forms of childhood onset chronic arthritis. *J Rheumatol* 23, 2116-24.
- Myers, L. K., Higgins, G. C., Finkel, T. H., Reed, A. M., Thompson, J. W., Walton, R. C., Hendrickson, J., Kerr, N. C., et al.** (2001). Juvenile arthritis and autoimmunity to type II collagen. *Arthritis Rheum* 44, 1775-81.
- Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H. S., Kudoh, J., Minoshima, S., Heino, M., Krohn, K. J., Lalioti, M. D., et al.** (1997). Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* 17, 393-8.
- Nakamura, K., Kitani, A. und Strober, W.** (2001). Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194, 629-44.
- Naparstek, Y. und Plotz, P. H.** (1993). The role of autoantibodies in autoimmune disease. *Annu Rev Immunol* 11, 79-104.
- Odum, N., Morling, N., Platz, P., Hofmann, B., Ryder, L. P., Heilmann, C., Pedersen, F. K., Nielsen, L. P., et al.** (1987). Increased prevalence of late stage T cell activation antigen (VLA-1) in active juvenile chronic arthritis. *Ann Rheum Dis* 46, 846-52.
- Ozen, S., Alikasifoglu, M., Bakkaloglu, A., Duzova, A., Jarosova, K., Nemcova, D., Besbas, N., Vencovsky, J., et al.** (2002). Tumour necrosis factor alpha G-->A -238 and G-->A -308 polymorphisms in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 41, 223-7.
- Pearson, C. M.** (1956). Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med* 91, 95-101.

- Peterson, L. S., Mason, T., Nelson, A. M., O'Fallon, W. M. und Gabriel, S. E.** (1996). Juvenile rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota 1960-1993. Is the epidemiology changing? *Arthritis Rheum* 39, 1385-90.
- Petty, R. E., Southwood, T. R., Baum, J., Bhattay, E., Glass, D. N., Manners, P., Maldonado-Cocco, J., Suarez-Almazor, M., et al.** (1998). Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban, 1997. *J Rheumatol* 25, 1991-4.
- Piccirillo, C. A., Letterio, J. J., Thornton, A. M., McHugh, R. S., Mamura, M., Mizuhara, H. und Shevach, E. M.** (2002). CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* 196, 237-46.
- Pignatti, P., Vivarelli, M., Meazza, C., Rizzolo, M. G., Martini, A. und De Benedetti, F.** (2001). Abnormal regulation of interleukin 6 in systemic juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 28, 1670-6.
- Pongpanich, B. und Daengroongroj, P.** (1988). Juvenile rheumatoid arthritis: clinical characteristics in 100 Thai patients. *Clin Rheumatol* 7, 257-61.
- Prahalad, S., Kingsbury, D. J., Griffin, T. A., Cooper, B. L., Glass, D. N., Maksymowych, W. P. und Colbert, R. A.** (2001). Polymorphism in the MHC-encoded LMP7 gene: association with JRA without functional significance for immunoproteasome assembly. *J Rheumatol* 28, 2320-5.
- Prahalad, S., Ryan, M. H., Shear, E. S., Thompson, S. D., Glass, D. N. und Giannini, E. H.** (2000). Twins concordant for juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43, 2611-2.
- Priori, R., Medda, E., Conti, F., Cassara, E. A., Danieli, M. G., Gerli, R., Giacomelli, R., Franceschini, F., et al.** (2003). Familial autoimmunity as a risk factor for systemic lupus erythematosus and vice versa: a case-control study. *Lupus* 12, 735-40.
- Rachelefsky, G. S., Terasaki, P. I., Katz, R. und Stiehm, E. R.** (1974). Increased prevalence of W27 in juvenile rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 290, 892-3.
- Rajewsky, K.** (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751-8.
- Raman, K. und Mohan, C.** (2003). Genetic underpinnings of autoimmunity--lessons from studies in arthritis, diabetes, lupus and multiple sclerosis. *Curr Opin Immunol* 15, 651-9.
- Ramsey, C., Winqvist, O., Puhakka, L., Halonen, M., Moro, A., Kampe, O., Eskelin, P., Pelto-Huikko, M., et al.** (2002). Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Hum Mol Genet* 11, 397-409.
- Roitt, I. M., Doniach, D., Campbell, P. N. und Vaughan Hudson, R.** (1956). Auto-antibodies in Hashimoto's disease (lymphadenoid goitre). *The Lancet* 2, 820-1.

- Savolainen, A., Saila, H., Kotaniemi, K., Kaipianen-Seppanen, O., Leirisalo-Repo, M. und Aho, K.** (2000). Magnitude of the genetic component in juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis* 59, 1001.
- Schaller, M., Burton, D. R. und Ditzel, H. J.** (2001). Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. *Nat Immunol* 2, 746-53.
- Schellekens, G. A., de Jong, B. A., van den Hoogen, F. H., van de Putte, L. B. und van Venrooij, W. J.** (1998). Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 101, 273-81.
- Schmitt, A., Schubert, D., Sengler, C. und Kamradt, T.** (2004). Autoantibodies against glucose-6-phosphate isomerase are not a diagnostic marker for juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis* 63, 463.
- Schubert, D., Schmidt, M., Zaiss, D., Jungblut, P. R. und Kamradt, T.** (2002). Autoantibodies to GPI and creatine kinase in RA. *Nat Immunol* 3, 411.
- Scola, M. P., Thompson, S. D., Brunner, H. I., Tsoras, M. K., Witte, D., Van Dijk, M. A., Grom, A. A., Passo, M. H., et al.** (2002). Interferon-gamma:interleukin 4 ratios and associated type 1 cytokine expression in juvenile rheumatoid arthritis synovial tissue. *J Rheumatol* 29, 369-78.
- Sha, W. C., Nelson, C. A., Newberry, R. D., Kranz, D. M., Russell, J. H. und Loh, D. Y.** (1988). Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature* 336, 73-6.
- Shevach, E. M.** (2000). Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 18, 423-49.
- Shimizu, K., Tani, M., Watanabe, H., Nagamachi, Y., Niinaka, Y., Shiroishi, T., Ohwada, S., Raz, A., et al.** (1999). The autocrine motility factor receptor gene encodes a novel type of seven transmembrane protein. *FEBS Lett* 456, 295-300.
- Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., et al.** (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359, 693-9.
- Silverman, E. D., Isacovics, B., Petsche, D. und Laxer, R. M.** (1993). Synovial fluid cells in juvenile arthritis: evidence of selective T cell migration to inflamed tissue. *Clin Exp Immunol* 91, 90-5.
- Sinha, A. A., Lopez, M. T. und McDevitt, H. O.** (1990). Autoimmune diseases: the failure of self tolerance. *Science* 248, 1380-8.
- Sioud, M., Kjeldsen-Kragh, J., Suleyman, S., Vinje, O., Natvig, J. B. und Forre, O.** (1992). Limited heterogeneity of T cell receptor variable region gene usage in juvenile rheumatoid arthritis synovial T cells. *Eur J Immunol* 22, 2413-8.

- Smolen, J. S.** (1996). Rheumatoid Arthritis. In Manual of Biological Markers, R. N. Maini, and W. J. van Venrooij, eds. (Amsterdam, Kluwer Academic Publishers), pp. 1-18.
- Solomon, S., Kolb, C., Mohanty, S., Jeisy-Walder, E., Preyer, R., Schollhorn, V. und Illges, H.** (2002). Transmission of antibody-induced arthritis is independent of complement component 4 (C4) and the complement receptors 1 and 2 (CD21/35). *Eur J Immunol* 32, 644-51.
- Starr, T. K., Jameson, S. C. und Hogquist, K. A.** (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21, 139-76.
- Still, G. F.** (1897). On a form of chronic joint disease in children. *Medical and Chirurgical Transactions* 80, 1-13.
- Sun, Y. J., Chou, C. C., Chen, W. S., Wu, R. T., Meng, M. und Hsiao, C. D.** (1999). The crystal structure of a multifunctional protein: phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5412-7.
- Tan, E. M., Feltkamp, T. E., Smolen, J. S., Butcher, B., Dawkins, R., Fritzler, M. J., Gordon, T., Hardin, J. A., et al.** (1997). Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum* 40, 1601-11.
- Targoff, I. N.** (2000). Update on myositis-specific and myositis-associated autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol* 12, 475-81.
- Thompson, S. D., Grom, A. A., Bailey, S., Luyrink, L., Giannini, E. H., Murray, K., Passo, M. H., Lovell, D. J., et al.** (1995). Patterns of T lymphocyte clonal expansion in HLA-typed patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 22, 1356-64.
- Thomson, W., Barrett, J. H., Donn, R., Pepper, L., Kennedy, L. J., Ollier, W. E., Silman, A. J., Woo, P., et al.** (2002). Juvenile idiopathic arthritis classified by the ILAR criteria: HLA associations in UK patients. *Rheumatology (Oxford)* 41, 1183-9.
- Thomson, W. und Donn, R.** (2002). Juvenile idiopathic arthritis genetics - what's new? What's next? *Arthritis Res* 4, 302-6.
- Thorbecke, G. J., Shah, R., Leu, C. H., Kuruvilla, A. P., Hardison, A. M. und Palladino, M. A.** (1992). Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7375-9.
- Tiegs, S. L., Russell, D. M. und Nemazee, D.** (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* 177, 1009-20.
- Tomer, Y.** (2002). Genetic dissection of familial autoimmune thyroid diseases using whole genome screening. *Autoimmun Rev* 1, 198-204.
- Towner, S. R., Michet, C. J., Jr., O'Fallon, W. M. und Nelson, A. M.** (1983). The epidemiology of juvenile arthritis in Rochester, Minnesota 1960-1979. *Arthritis Rheum* 26, 1208-13.

- Trentham, D. E., Townes, A. S. und Kang, A. H.** (1977). Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 146, 857-68.
- van Boekel, M. A., Vossenaar, E. R., van den Hoogen, F. H. und van Venrooij, W. J.** (2002). Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res* 4, 87-93.
- van Gaalen, F. A., Toes, R. E., Ditzel, H. J., Schaller, M., Breedveld, F. C., Verweij, C. L. und Huizinga, T. W.** (2004). Association of autoantibodies to glucose-6-phosphate isomerase with extraarticular complications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50, 395-9.
- van Rossum, M., van Soesbergen, R., de Kort, S., ten Cate, R., Zwinderman, A. H., de Jong, B., Dijkmans, B. und van Venrooij, W. J.** (2003). Anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibodies in children with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 30, 825-8.
- Vencovsky, J., Jarosova, K., Ruzickova, S., Nemcova, D., Niederlova, J., Ozen, S., Alikasifoglu, M., Bakkaloglu, A., et al.** (2001). Higher frequency of allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 44, 2387-91.
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J. W., Meffre, E. und Nussenzweig, M. C.** (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301, 1374-7.
- Watanabe, H., Carmi, P., Hogan, V., Raz, T., Silletti, S., Nabi, I. R. und Raz, A.** (1991). Purification of human tumor cell autocrine motility factor and molecular cloning of its receptor. *J Biol Chem* 266, 13442-8.
- Watanabe, H., Takehana, K., Date, M., Shinozaki, T. und Raz, A.** (1996). Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide. *Cancer Res* 56, 2960-3.
- Wedderburn, L. R., Maini, M. K., Patel, A., Beverley, P. C. und Woo, P.** (1999). Molecular fingerprinting reveals non-overlapping T cell oligoclonality between an inflamed site and peripheral blood. *Int Immunol* 11, 535-43.
- Wedderburn, L. R., Robinson, N., Patel, A., Varsani, H. und Woo, P.** (2000). Selective recruitment of polarized T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamed joints of children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 43, 765-74.
- Weyand, C. M., Xie, C. und Goronzy, J. J.** (1992). Homozygosity for the HLA-DRB1 allele selects for extraarticular manifestations in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 89, 2033-9.
- Wipke, B. T., Wang, Z., Kim, J., McCarthy, T. J. und Allen, P. M.** (2002). Dynamic visualization of a joint-specific autoimmune response through positron emission tomography. *Nat Immunol* 3, 366-72.

- Wood, P. H.** (1978). Nomenclature and classification of arthritis in children. In *The care of rheumatic children*, E. Munthe, ed. (Basel, European League Against Rheumatism), pp. 47-50.
- Wucherpfennig, K. W., Zhang, J., Witek, C., Matsui, M., Modabber, Y., Ota, K. und Hafler, D. A.** (1994). Clonal expansion and persistence of human T cells specific for an immunodominant myelin basic protein peptide. *J Immunol* *152*, 5581-92.
- Wynne-Roberts, C. R., Anderson, C. H., Turano, A. M. und Baron, M.** (1978). Light- and electron-microscopic findings of juvenile rheumatoid arthritis synovium: comparison with normal juvenile synovium. *Semin Arthritis Rheum* *7*, 287-302.
- Xu, W., Seiter, K., Feldman, E., Ahmed, T. und Chiao, J. W.** (1996). The differentiation and maturation mediator for human myeloid leukemia cells shares homology with neuroleukin or phosphoglucose isomerase. *Blood* *87*, 4502-6.
- Zal, T., Weiss, S., Mellor, A. und Stockinger, B.** (1996). Expression of a second receptor rescues self-specific T cells from thymic deletion and allows activation of autoreactive effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 9102-7.
- Zamvil, S., Nelson, P., Trotter, J., Mitchell, D., Knobler, R., Fritz, R. und Steinman, L.** (1985). T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature* *317*, 355-8.
- Zhou, Z. und Menard, H. A.** (2002). Autoantigenic posttranslational modifications of proteins: does it apply to rheumatoid arthritis? *Curr Opin Rheumatol* *14*, 250-3.
- Zvaifler, N. J.** (1973). The immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Adv Immunol* *16*, 265-336.

9 ANHANG

9.1 Statistiken

GPI-AKTIVITÄT

	GPI-AKTIVITÄT										
	gesund	Arthralgie	RA	oligoartikulär		polyartikulär		systemisch	psoriatisch	enthesitisch	keine Kategorie
				persistent	extended	RF negativ	RF positiv				
Anzahl Proben	12	6	34	41	22	53	15	33	10	27	46
Anzahl Probanden	10	6	34	22	9	17	5	9	5	13	15
	alle folgenden Werte (außer cv) in U/l										
Minimum	24,80	36,10	23,00	25,75	23,55	24,79	28,92	35,13	38,05	23,83	21,63
25% Perzentile	34,71	36,51	46,34	43,63	45,84	42,29	45,85	50,21	41,29	31,49	40,62
Median	42,36	45,73	68,00	56,56	56,07	58,25	61,40	88,41	46,16	45,03	50,91
75% Perzentile	49,60	63,45	84,41	71,61	77,26	73,14	103,10	143,50	105,50	64,94	72,66
Maximum	71,66	71,57	122,50	242,90	138,50	117,10	247,40	333,70	158,80	120,60	291,80
Mittelwert	43,63	48,56	67,14	66,02	62,27	60,40	82,94	107,90	69,76	52,07	64,44
sdv	12,83	13,34	24,18	42,45	27,82	21,57	57,79	72,49	40,88	24,04	45,95
sem	3,70	5,45	4,15	6,63	5,93	2,96	14,92	12,62	12,93	4,63	6,78
cv [%]	29,40	27,47	36,01	64,30	44,68	35,70	69,67	67,19	58,60	46,16	71,30
95% CI											
untere Grenze	35,48	34,56	58,70	52,62	49,94	54,46	50,94	82,18	40,52	42,56	50,80
obere Grenze	51,79	62,56	75,57	79,42	74,61	66,35	114,90	133,60	99,00	61,58	78,09

Tabelle A1: GPI-Aktivität im Serum von Patienten mit verschiedenen Diagnosen. Abkürzungen: Standardabweichung (sdv), mittlerer Fehler (sem), Variationskoeffizient (cv), Konfidenzintervall (CI).

In der folgenden Tab. A2 sind die charakteristischen Daten der Varianzanalyse zur GPI-Aktivität im Serum von JIA-Patientin unterschiedlicher Subtypen aufgeführt. Eine einfache Varianzanalyse beruht auf der Zerlegung der Gesamtvariabilität aller Messdaten in zwei Komponenten: eine innerhalb der Subtypen und eine zwischen den Subtypen. Mithilfe eines F-Tests kann dann entschieden werden, ob die Variabilität zwischen den Subtypen statistisch signifikant größer ist als die innerhalb der Subtypen. Hierzu werden die mittleren Quadratsummen (MQ), die sich aus den Abweichungsquadraten oder Quadratsummen (SQ) dividiert durch die Anzahl der Freiheitsgrade (FG) ergeben, zueinander ins Verhältnis gesetzt.

	SQ	FG	MQ
zwischen den Gruppen	76650	10	7665
innerhalb der Gruppen	474500	288	1648
Gesamt	551100	298	
	F	p	
	4,652	<0,0001	

Tabelle A2: Einfache Varianzanalyse zum Vergleich der Mittelwerte für die GPI-Aktivität in den verschiedenen Patientengruppen. Mindestens zwei Mittelwerte sind signifikant verschieden ($p < 0,0001$).

Die folgenden Tab. A3 und A4 zeigen die charakterischen Daten des Dunnett- bzw. Tukey-Tests zum Vergleich Serum-GPI-Aktivitäten verschiedener Patientengruppen mit gesunden Individuen bzw. untereinander. Dargestellt sind die Differenzen der Mittelwerte, die statistische Prüfgröße q sowie der p-Wert und das 95% Konfidenzintervall der Mittelwertdifferenz.

Gesund im Vgl. zu	Δ Mittelwerte	q	p	95% CI Δ Mittelwerte
Arthralgie	-4,928	0,2428	> 0,05	-60,58 bis 50,73
RA	-23,5	1,725	> 0,05	-60,88 bis 13,87
oligoartikulär, persistent	-22,39	1,68	> 0,05	-58,92 bis 14,15
oligoartikulär, extended	-18,64	1,28	> 0,05	-58,59 bis 21,31
polyartikulär, RF negativ	-16,77	1,292	> 0,05	-52,36 bis 18,81
polyartikulär, RF positiv	-39,31	2,501	> 0,05	-82,42 bis 3,800
systemisch	-64,25	4,696	< 0,01	-101,8 bis -26,73
psoriatisch	-26,13	1,503	> 0,05	-73,79 bis 21,53
enthesitisch	-8,433	0,5988	> 0,05	-47,05 bis 30,19
keine Kategorie	-20,81	1,582	> 0,05	-56,89 bis 15,27

Tabelle A3: Dunnett-Test zum Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Patientengruppen mit der gesunden Kontrollgruppe. Bei der systemischen JIA unterscheidet sich der Mittelwert signifikant ($p < 0,01$) von der gesunden Kontrollgruppe.

	Serum	SF
Anzahl Proben	299	35
Anzahl Probanden	145	22
alle folgenden Werte (außer cv) in U/l		
Minimum	21,63	22,08
25% Perzentile	42,91	94,13
Median	57,66	180,6
75% Perzentile	76,79	337
Maximum	333,7	2780
Mittelwert	67,72	341,4
sdv	43,01	509,3
sem	2,487	86,08
cv [%]	63,51	149,19
95% CI		
untere Grenze	62,83	166,4
obere Grenze	72,61	516,3

Tabelle A4: siehe nächste Seite.

Tabelle A5: GPI-Aktivität in Serum und SF.

Vergleichspaar	Δ Mittelwerte	q	p	95% CI Δ Mittelwerte
gesund vs Arthralgie	-4,928	0,3434	P > 0,05	-71,45 bis 61,60
gesund vs RA	-23,5	2,439	P > 0,05	-68,18 bis 21,17
gesund vs oligoart., pers.	-22,39	2,377	P > 0,05	-66,06 bis 21,28
gesund vs oligoart., ext.	-18,64	1,81	P > 0,05	-66,39 bis 29,11
gesund vs polyart., RF neg.	-16,77	1,828	P > 0,05	-59,31 bis 25,77
gesund vs polyart., RF pos.	-39,31	3,536	P > 0,05	-90,84 bis 12,22
gesund vs systemisch	-64,25	6,641	P < 0,001	-109,1 bis -19,40
gesund vs psoriatisch	-26,13	2,126	P > 0,05	-83,10 bis 30,84
gesund vs enthesitisch	-8,433	0,8469	P > 0,05	-54,60 bis 37,73
gesund vs keine Kategorie	-20,81	2,237	P > 0,05	-63,94 bis 22,32
Arthralgie vs RA	-18,58	1,462	P > 0,05	-77,49 bis 40,34
Arthralgie vs oligoart., pers.	-17,46	1,392	P > 0,05	-75,62 bis 40,70
Arthralgie vs oligoart., ext.	-13,71	1,037	P > 0,05	-74,99 bis 47,57
Arthralgie vs polyart., RF neg.	-11,84	0,9579	P > 0,05	-69,15 bis 45,47
Arthralgie vs polyart., RF pos.	-34,38	2,48	P > 0,05	-98,65 bis 29,89
Arthralgie vs systemisch	-59,33	4,657	P < 0,05	-118,4 bis -0,2738
Arthralgie vs psoriatisch	-21,2	1,43	P > 0,05	-89,91 bis 47,51
Arthralgie vs enthesitisch	-3,506	0,2706	P > 0,05	-63,56 bis 56,55
Arthralgie vs keine Kategorie	-15,88	1,275	P > 0,05	-73,63 bis 41,87
RA vs oligoart., pers.	1,116	0,1676	P > 0,05	-29,75 bis 31,98
RA vs oligoart., ext.	4,865	0,6195	P > 0,05	-31,54 bis 41,27
RA vs polyart., RF neg.	6,733	1,068	P > 0,05	-22,50 bis 35,97
RA vs polyart., RF pos.	-15,81	1,777	P > 0,05	-57,05 bis 25,44
RA vs systemisch	-40,75	5,81	P < 0,01	-73,26 bis -8,235
RA vs psoriatisch	-2,622	0,254	P > 0,05	-50,49 bis 45,24
RA vs enthesitisch	15,07	2,037	P > 0,05	-19,23 bis 49,37
RA vs keine Kategorie	2,696	0,4153	P > 0,05	-27,40 bis 32,79
oligoart., pers. vs oligoart., ext.	3,749	0,4942	P > 0,05	-31,42 bis 38,91
oligoart., pers. vs polyart., RF neg.	5,617	0,941	P > 0,05	-22,06 bis 33,29
oligoart., pers. vs polyart., RF pos.	-16,92	1,954	P > 0,05	-57,07 bis 23,23
oligoart., pers. vs systemisch	-41,87	6,237	P < 0,01	-72,98 bis -10,75
oligoart., pers. vs psoriatisch	-3,738	0,3693	P > 0,05	-50,67 bis 43,19
oligoart., pers. vs enthesitisch	13,95	1,962	P > 0,05	-19,02 bis 46,93
oligoart., pers. vs keine Kategorie	1,58	0,2562	P > 0,05	-27,00 bis 30,16
oligoart., ext. vs polyart., RF neg.	1,869	0,2567	P > 0,05	-31,88 bis 35,61
oligoart., ext. vs polyart., RF pos.	-20,67	2,151	P > 0,05	-65,22 bis 23,88
oligoart., ext. vs systemisch	-45,61	5,774	P < 0,01	-82,24 bis -8,992
oligoart., ext. vs psoriatisch	-7,487	0,684	P > 0,05	-58,23 bis 43,26
oligoart., ext. vs enthesitisch	10,21	1,238	P > 0,05	-28,01 bis 48,42
oligoart., ext. vs keine Kategorie	-2,169	0,2916	P > 0,05	-36,66 bis 32,32
polyart., RF neg. vs polyart., RF pos.	-22,54	2,685	P > 0,05	-61,45 bis 16,37
polyart., RF neg. vs systemisch	-47,48	7,461	P < 0,001	-76,99 bis -17,98
polyart., RF neg. vs psoriatisch	-9,355	0,9454	P > 0,05	-55,23 bis 36,52
polyart., RF neg. vs enthesitisch	8,337	1,229	P > 0,05	-23,12 bis 39,80
polyart., RF neg. vs keine Kategorie	-4,038	0,6981	P > 0,05	-30,85 bis 22,77
polyart., RF pos. vs systemisch	-24,94	2,791	P > 0,05	-66,38 bis 16,49
polyart., RF pos. vs psoriatisch	13,18	1,125	P > 0,05	-41,13 bis 67,50
polyart., RF pos. vs enthesitisch	30,88	3,341	P > 0,05	-11,97 bis 73,73
polyart., RF pos. vs keine Kategorie	18,5	2,168	P > 0,05	-21,06 bis 58,06
systemisch vs psoriatisch	38,13	3,68	P > 0,05	-9,903 bis 86,16
systemisch vs enthesitisch	55,82	7,495	P < 0,001	21,29 bis 90,35
systemisch vs keine Kategorie	43,44	6,635	P < 0,001	13,09 bis 73,80
psoriatisch vs enthesitisch	17,69	1,665	P > 0,05	-31,56 bis 66,95
psoriatisch vs keine Kategorie	5,318	0,531	P > 0,05	-41,11 bis 51,74
enthesitisch vs keine Kategorie	-12,37	1,778	P > 0,05	-44,63 bis 19,88

Tabelle A4: Tukey-Test zum Vergleich aller Mittelwerte der GPI-Aktivität in verschiedenen Patientengruppen. Signifikante Unterschiede sind fett hervorgehoben.

DENSITOMETRISCHE BESTIMMUNG VON IGG-ANTIKÖRPERN GEGEN GPI

	gesund	Arthralgie	RA	oligoartikulär		polyartikulär		systemisch	psoriatisch	enthesitisch	keine Kategorie
				persistent	extended	RF negativ	RF positiv				
Anzahl Proben	9	6	32	35	13	43	13	28	9	25	39
Anzahl Probanden	9	6	32	20	8	13	5	9	5	13	14
alle folgenden Werte (außer cv) in *κ Leichtkette											
Minimum	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,56	0,00	0,00
25% Perzentile	0,33	0,00	0,00	0,37	0,27	0,21	0,09	1,30	1,21	0,59	0,00
Median	0,56	0,54	0,40	0,73	0,70	1,04	0,56	2,07	1,44	1,36	0,61
75% Perzentile	1,43	1,71	0,80	1,16	1,94	1,64	0,93	2,83	8,41	4,31	1,51
Maximum	1,55	2,35	2,31	7,27	3,44	9,33	1,74	8,57	13,65	23,25	11,50
Mittelwert	0,77	0,75	0,52	1,15	1,11	1,41	0,59	2,18	4,19	3,17	1,22
sdv	0,54	0,88	0,61	1,63	1,15	1,71	0,50	1,73	5,28	4,96	2,07
sem	0,18	0,36	0,11	0,28	0,32	0,26	0,14	0,33	1,76	0,99	0,33
cv [%]	69,9	117,9	116,9	141,2	103,3	121,6	85,2	79,3	125,9	156,2	169,7
95% CI											
untere Grenze	0,36	-0,18	0,30	0,59	0,42	0,88	0,28	1,51	0,14	1,13	0,55
obere Grenze	1,19	1,67	0,74	1,71	1,81	1,94	0,89	2,85	8,25	5,22	1,89

Tabelle A6: anti-GPI-IgG (densitometrisch) im Serum von Patienten mit verschiedenen Diagnosen.

	SQ	FG	MQ
zwischen den Gruppen	207,3	10	20,73
innerhalb der Gruppen	1306	241	5,419
Gesamt	1513	251	
	F	p	
	3,825	<0,0001	

Tabelle A7: Einfache Varianzanalyse zum Vergleich der Mittelwerte in den verschiedenen Patientengruppen. Mindestens zwei Mittelwerte sind signifikant verschieden (p < 0,0001).

Gesund im Vgl. zu	Δ Mittelwerte	q	p	95% CI Δ Mittelwerte
Arthralgie	0,03	0,02	P > 0,05	-3,35 bis 3,40
RA	0,25	0,29	P > 0,05	-2,16 bis 2,66
oligoartikulär, persistent	-0,38	0,44	P > 0,05	-2,77 bis 2,01
oligoartikulär, extended	-0,34	0,34	P > 0,05	-3,11 bis 2,43
polyartikulär, RF negativ	-0,63	0,74	P > 0,05	-2,98 bis 1,71
polyartikulär, RF positiv	0,19	0,19	P > 0,05	-2,59 bis 2,96
systemisch	-1,41	1,58	P > 0,05	-3,86 bis 1,04
psoriatisch	-3,42	3,11	P < 0,05	-6,43 bis -0,403
enthesitisch	-2,40	2,65	P > 0,05	-4,89 bis 0,0862
keine Kategorie	-0,45	0,52	P > 0,05	-2,81 bis 1,92

Tabelle A8: Dunnett-Test zum Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Patientengruppen mit der gesunden Kontrollgruppe. Bei der psoriatischen JIA unterscheidet sich der Mittelwert signifikant (p < 0,05) von der gesunden Kontrollgruppe.

Vergleichspaar	Δ Mittelwerte	q	p	95% CI Δ Mittelwerte
gesund vs Arthralgie	0,0250	0,0288	P > 0,05	-4,00 bis 4,05
gesund vs RA	0,251	0,404	P > 0,05	-2,63 bis 3,13
gesund vs oligoart., pers.	-0,380	0,617	P > 0,05	-3,23 bis 2,47
gesund vs oligoart., ext.	-0,340	0,476	P > 0,05	-3,65 bis 2,97
gesund vs polyart., RF neg.	-0,635	1,05	P > 0,05	-3,43 bis 2,16
gesund vs polyart., RF pos.	0,187	0,262	P > 0,05	-3,12 bis 3,50
gesund vs systemisch	-1,41	2,23	P > 0,05	-4,33 bis 1,52
gesund vs psoriatisch	-3,42	4,40	P > 0,05	-7,02 bis 0,181
gesund vs enthesitisch	-2,40	3,75	P > 0,05	-5,37 bis 0,567
gesund vs keine Kategorie	-0,448	0,736	P > 0,05	-3,27 bis 2,37
Arthralgie vs RA	0,226	0,308	P > 0,05	-3,17 bis 3,62
Arthralgie vs oligoart., pers.	-0,405	0,557	P > 0,05	-3,78 bis 2,97
Arthralgie vs oligoart., ext.	-0,365	0,449	P > 0,05	-4,13 bis 3,40
Arthralgie vs polyart., RF neg.	-0,660	0,919	P > 0,05	-3,99 bis 2,67
Arthralgie vs polyart., RF pos.	0,162	0,200	P > 0,05	-3,61 bis 3,93
Arthralgie vs systemisch	-1,43	1,94	P > 0,05	-4,87 bis 2,00
Arthralgie vs psoriatisch	-3,44	3,97	P > 0,05	-7,47 bis 0,580
Arthralgie vs enthesitisch	-2,42	3,24	P > 0,05	-5,90 bis 1,05
Arthralgie vs keine Kategorie	-0,473	0,655	P > 0,05	-3,82 bis 2,87
RA vs oligoart., pers.	-0,631	1,57	P > 0,05	-2,50 bis 1,24
RA vs oligoart., ext.	-0,591	1,09	P > 0,05	-3,10 bis 1,92
RA vs polyart., RF neg.	-0,885	2,30	P > 0,05	-2,67 bis 0,897
RA vs polyart., RF pos.	-0,0637	0,118	P > 0,05	-2,57 bis 2,45
RA vs systemisch	-1,66	3,89	P > 0,05	-3,63 bis 0,316
RA vs psoriatisch	-3,67	5,91	P < 0,01	-6,55 bis -0,788
RA vs enthesitisch	-2,65	6,03	P < 0,01	-4,69 bis -0,613
RA vs keine Kategorie	-0,699	1,78	P > 0,05	-2,52 bis 1,12
oligoart., pers. vs oligoart., ext.	0,0401	0,0749	P > 0,05	-2,44 bis 2,52
oligoart., pers. vs polyart., RF neg.	-0,255	0,680	P > 0,05	-1,99 bis 1,48
oligoart., pers. vs polyart., RF pos.	0,567	1,06	P > 0,05	-1,91 bis 3,05
oligoart., pers. vs systemisch	-1,03	2,46	P > 0,05	-2,96 bis 0,907
oligoart., pers. vs psoriatisch	-3,04	4,94	P < 0,05	-5,89 bis -0,185
oligoart., pers. vs enthesitisch	-2,02	4,69	P < 0,05	-4,02 bis -0,0212
oligoart., pers. vs keine Kategorie	-0,0681	0,178	P > 0,05	-1,85 bis 1,71
oligoart., ext. vs polyart., RF neg.	-0,295	0,566	P > 0,05	-2,71 bis 2,12
oligoart., ext. vs polyart., RF pos.	0,527	0,816	P > 0,05	-2,47 bis 3,52
oligoart., ext. vs systemisch	-1,07	1,93	P > 0,05	-3,63 bis 1,49
oligoart., ext. vs psoriatisch	-3,08	4,31	P > 0,05	-6,39 bis 0,232
oligoart., ext. vs enthesitisch	-2,06	3,66	P > 0,05	-4,67 bis 0,550
oligoart., ext. vs keine Kategorie	-0,108	0,205	P > 0,05	-2,55 bis 2,34
polyart., RF neg. vs polyart., RF pos.	0,822	1,58	P > 0,05	-1,59 bis 3,24
polyart., RF neg. vs systemisch	-0,774	1,94	P > 0,05	-2,63 bis 1,08
polyart., RF neg. vs psoriatisch	-2,78	4,61	P > 0,05	-5,58 bis 0,0149
polyart., RF neg. vs enthesitisch	-1,77	4,26	P > 0,05	-3,69 bis 0,155
polyart., RF neg. vs keine Kategorie	0,187	0,513	P > 0,05	-1,50 bis 1,87
polyart., RF pos. vs systemisch	-1,60	2,89	P > 0,05	-4,16 bis 0,967
polyart., RF pos. vs psoriatisch	-3,60	5,05	P < 0,05	-6,92 bis -0,295
polyart., RF pos. vs enthesitisch	-2,59	4,60	P > 0,05	-5,20 bis 0,0231
polyart., RF pos. vs keine Kategorie	-0,635	1,20	P > 0,05	-3,08 bis 1,81
systemisch vs psoriatisch	-2,01	3,19	P > 0,05	-4,93 bis 0,915
systemisch vs enthesitisch	-0,992	2,19	P > 0,05	-3,09 bis 1,11
systemisch vs keine Kategorie	0,960	2,35	P > 0,05	-0,931 bis 2,85
psoriatisch vs enthesitisch	1,02	1,59	P > 0,05	-1,95 bis 3,99
psoriatisch vs keine Kategorie	2,97	4,88	P < 0,05	0,147 bis 5,79
enthesitisch vs keine Kategorie	1,95	4,63	P > 0,05	-0,00380 bis 3,91

Tabelle A9: Tukey-Test zum Vergleich aller Mittelwerte. Signifikante Unterschiede sind fett hervorgehoben.

	Serum	SF
Anzahl Proben	252	29
Anzahl Probanden	134	21
alle folgenden Werte (außer cv) in *κ Leichtkette		
Minimum	0,00	0,00
25% Perzentile	0,20	0,00
Median	0,73	0,24
75% Perzentile	1,55	0,66
Maximum	23,25	10,09
Mittelwert	1,41	0,67
sdv	2,41	1,87
sem	0,14	0,35
cv [%]	171,00	278,20
95% CI		
untere Grenze	1,13	-0,04
obere Grenze	1,69	1,38

Tabelle A10: anti-GPI-IgG-Konzentration (densitometrisch) in Serum und SF.

DENSITOMETRISCHE BESTIMMUNG VON IGG-ANTIKÖRPERN GEGEN PGM

	gesund	Arthralgie	RA	oligoartikulär		polyartikulär		systemisch	psoriatisch	enthesitisch	keine Kategorie
				persistent	extended	RF negativ	RF positiv				
Anzahl Proben	9	6	32	35	13	43	13	27	9	25	39
Anzahl Probanden	9	6	32	20	8	13	5	9	5	13	14
alle folgenden Werte (außer cv) in *κ Leichtkette											
Minimum	0,04	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
25% Perzentile	0,46	0,0	0,0	0,0	0,055	0,0	0,095	0,0	0,0	0,0	0,0
Median	0,76	0,09	0,21	0,20	0,23	0,0	0,48	0,07	0,34	0,0	0,0
75% Perzentile	1,2	0,56	0,65	0,70	0,60	0,45	1,8	0,86	1,6	0,55	0,66
Maximum	3,7	0,81	16	9,4	1,1	1,9	4,4	3,3	5,8	2,3	2,9
Mittelwert	1,0	0,22	1,1	1,0	0,36	0,33	1,1	0,53	1,1	0,40	0,41
sdv	1,1	0,32	3,0	2,0	0,38	0,51	1,3	0,86	1,9	0,69	0,69
sem	0,36	0,13	0,53	0,34	0,10	0,078	0,37	0,16	0,64	0,14	0,11
cv [%]	104,82	146,38	283,98	200,16	105,02	153,64	127,19	160,46	171,73	174,37	169,89
95% CI											
untere Grenze	0,20	-0,12	-0,025	0,31	0,13	0,17	0,24	0,20	-0,36	0,11	0,18
obere Grenze	1,9	0,55	2,1	1,7	0,59	0,49	1,9	0,87	2,6	0,68	0,63

Tabelle A11: anti-PGM-IgG (densitometrisch) im Serum von Patienten mit verschiedenen Diagnosen.

	SQ	FG	MQ
zwischen den Gruppen	25,9	10	2,59
innerhalb der Gruppen	537	240	2,24
Gesamt	563	250	
	F		p
	1,16		0,3205

Tabelle A12: Einfache Varianzanalyse zum Vergleich der Mittelwerte in den verschiedenen Patientengruppen. Die Mittelwerte unterscheiden sich nicht statistisch signifikant.

	Serum	SF
Anzahl Proben	251	29
Anzahl Probanden	134	21
alle folgenden Werte (außer cv) in *κ Leichtkette		
Minimum	0,0	0,0
25% Perzentile	0,0	0,0
Median	0,16	0,01
75% Perzentile	0,68	0,30
Maximum	16	1,2
Mittelwert	0,65	0,23
sdv	1,5	0,37
sem	0,095	0,070
cv [%]	231,97	163,97
95% CI		
untere Grenze	0,46	0,086
obere Grenze	0,83	0,37

Tabelle A13: anti-PGM-IgG-Konzentration (densitometrisch) in Serum und SF.

DENSITOMETRISCHE BESTIMMUNG VON IGG-ANTIKÖRPERN GEGEN CKM

Tabelle A14: siehe nächste Seite

	SQ	FG	MQ
zwischen den Gruppen	7,624	10	0,7624
innerhalb der Gruppen	210,8	241	0,8749
Gesamt	218,5	251	
	F		p
	0,8714		0,5606

Tabelle A15: Einfache Varianzanalyse zum Vergleich der Mittelwerte in den verschiedenen Patientengruppen. Die Mittelwerte unterscheiden sich nicht statistisch signifikant.

	gesund	Arthralgie	RA	oligoartikulär		polyartikulär		systemisch	psoriatisch	enthesitisch	keine Kategorie
				persistent	extended	RF negativ	RF positiv				
Anzahl Proben	9	6	32	35	13	43	13	28	9	25	39
Anzahl Probanden	9	6	32	20	8	13	5	9	5	13	14
alle folgenden Werte (außer cv) in *κ Leichtkette											
Minimum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
25% Perzentile	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Median	0,01	0,06	0,03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,075	0,0	0,0	0,0
75% Perzentile	0,12	0,89	0,09	0,15	0,0	0,0	0,23	0,34	0,22	0,0	0,12
Maximum	0,44	1,6	1,1	6,3	0,91	9,0	3,7	4,2	0,26	0,91	0,97
Mittelwert	0,086	0,32	0,11	0,39	0,078	0,52	0,39	0,37	0,097	0,07	0,10
sdv	0,14	0,62	0,24	1,2	0,25	1,7	1,0	0,84	0,12	0,20	0,23
sem	0,048	0,25	0,042	0,19	0,070	0,26	0,29	0,16	0,039	0,040	0,037
cv [%]	166,85	197,17	220,32	294,01	320,78	332,75	267,61	227,43	120,64	282,93	222,93
95% CI											
untere Grenze	-0,024	-0,34	0,022	-0,0039	-0,074	-0,013	-0,24	0,044	0,0070	-0,012	0,029
obere Grenze	0,20	0,97	0,20	0,79	0,23	1,1	1,0	0,69	0,19	0,15	0,18

Tabelle A14: anti-CKM-IgG (densitometrisch) im Serum von Patienten mit verschiedenen Diagnosen.

Tabelle A15: siehe vorherige Seite

	Serum	SF
Anzahl Proben	252	29
Anzahl Probanden	134	21
alle folgenden Werte (außer cv) in *κ Leichtkette		
Minimum	0,0	0,0
25% Perzentile	0,0	0,0
Median	0,0	0,0
75% Perzentile	0,12	0,01
Maximum	9,0	2,5
Mittelwert	0,26	0,11
sdv	0,93	0,46
sem	0,059	0,085
cv [%]	359,98	415,38
95% CI		
untere Grenze	0,14	-0,064
obere Grenze	0,37	0,28

Tabelle A16: anti-CKM-IgG-Konzentration (densitometrisch) in Serum und SF.

BESTIMMUNG VON SERUM-IGG-ANTIKÖRPERN GEGEN BSA DURCH ELISA

	gesund	Arthralgie	RA	oligoartikulär		polyartikulär		systemisch	psoriatisch	enthesitisch	keine Kategorie
				persistent	extended	RF negativ	RF positiv				
Anzahl Proben	11	9	33	45	15	45	13	30	7	27	43
Anzahl Probanden	11	8	33	23	9	17	5	9	5	12	15
alle folgenden Werte (außer cv) in OD_{450 nm -630 nm}											
Minimum	-0,0440	0,0890	-0,0290	-0,0230	0,0910	0,0070	0,0670	-0,0090	0,0120	0,0330	-0,0030
25% Perzentile	0,0840	0,2035	0,0275	0,1310	0,2830	0,0845	0,0970	0,1260	0,0270	0,0850	0,1130
Median	0,1580	0,2330	0,0920	0,3250	0,4200	0,2400	0,1990	0,3870	0,0510	0,6490	0,1840
75% Perzentile	0,4980	0,4490	0,1550	0,5880	0,5580	0,5230	0,6355	0,5905	0,7810	0,7860	0,5160
Maximum	0,6970	1,019	0,4310	1,659	0,8550	0,9170	1,524	1,377	1,139	1,247	1,280
Mittelwert	0,2568	0,3470	0,1232	0,4046	0,4383	0,3125	0,3964	0,4132	0,3376	0,5317	0,3134
sdv	0,2507	0,2884	0,1211	0,3837	0,2104	0,2576	0,4296	0,3260	0,4500	0,3700	0,2872
sem	0,0756	0,0962	0,0211	0,0572	0,0543	0,0384	0,1192	0,0595	0,1701	0,0712	0,0438
cv [%]	97,63	83,13	98,31	94,85	48,00	82,44	108,38	78,89	133,30	69,59	91,62
95% CI											
untere Grenze	0,0884	0,1253	0,0802	0,2893	0,3218	0,2351	0,1368	0,2915	-0,0786	0,3854	0,2251
obere Grenze	0,4253	0,5687	0,1661	0,5199	0,5549	0,3899	0,6560	0,5350	0,7537	0,6781	0,4018

Tabelle A17: anti-BSA-IgG (ELISA) im Serum von Patienten mit verschiedenen Diagnosen.

	SQ	FG	MQ
zwischen den Gruppen	3,20	10	0,320
innerhalb der Gruppen	25,3	267	0,0948
Gesamt	28,5	277	
	F		p
	3,38		0,0004

Tabelle A18: Einfache Varianzanalyse zum Vergleich der Mittelwerte in den verschiedenen Patientengruppen. Mindestens zwei Mittelwerte sind signifikant verschieden ($p = 0,0004$).

Gesund im Vgl. zu	Δ Mittelwerte	q	p	95% CI Δ Mittelwerte
Arthralgie	-0,0902	0,652	P > 0,05	-0,470 bis 0,290
RA	0,134	1,25	P > 0,05	-0,161 bis 0,428
oligoartikulär, persistent	-0,148	1,43	P > 0,05	-0,432 bis 0,136
oligoartikulär, extended	-0,182	1,48	P > 0,05	-0,517 bis 0,154
polyartikulär, RF negativ	-0,0557	0,537	P > 0,05	-0,340 bis 0,229
polyartikulär, RF positiv	-0,140	1,11	P > 0,05	-0,486 bis 0,207
systemisch	-0,156	1,44	P > 0,05	-0,454 bis 0,141
psoriatisch	-0,0808	0,542	P > 0,05	-0,489 bis 0,328
enthesitisch	-0,275	2,50	P > 0,05	-0,577 to 0,0274
keine Kategorie	-0,0566	0,544	P > 0,05	-0,342 to 0,229

Tabelle A19: Dunnett-Test zum Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Patientengruppen mit der gesunden Kontrollgruppe. Kein statistisch signifikanter Unterschied.

Vergleichspaar	Δ Mittelwerte	q	p	95% CI Δ Mittelwerte
gesund vs Arthralgie	-0,0902	0,921	P > 0,05	-0,544 bis 0,364
gesund vs RA	0,134	1,76	P > 0,05	-0,218 bis 0,485
gesund vs oligoart., pers.	-0,148	2,02	P > 0,05	-0,487 bis 0,192
gesund vs oligoart., ext.	-0,182	2,1	P > 0,05	-0,582 bis 0,219
gesund vs polyart., RF neg.	-0,0557	0,76	P > 0,05	-0,395 bis 0,284
gesund vs polyart., RF pos.	-0,14	1,56	P > 0,05	-0,553 bis 0,274
gesund vs systemisch	-0,156	2,04	P > 0,05	-0,512 bis 0,199
gesund vs psoriatisch	-0,0808	0,767	P > 0,05	-0,569 bis 0,407
gesund vs enthesitisch	-0,275	3,53	P > 0,05	-0,636 bis 0,0862
gesund vs keine Kategorie	-0,0566	0,77	P > 0,05	-0,398 bis 0,284
Arthralgie vs RA	0,224	2,73	P > 0,05	-0,156 bis 0,603
Arthralgie vs oligoart., pers.	-0,0576	0,724	P > 0,05	-0,426 bis 0,311
Arthralgie vs oligoart., ext.	-0,0913	0,995	P > 0,05	-0,517 bis 0,334
Arthralgie vs polyart., RF neg.	0,0345	0,434	P > 0,05	-0,334 bis 0,403
Arthralgie vs polyart., RF pos.	-0,0494	0,523	P > 0,05	-0,487 bis 0,388
Arthralgie vs systemisch	-0,0662	0,8	P > 0,05	-0,450 bis 0,317
Arthralgie vs psoriatisch	0,00943	0,0859	P > 0,05	-0,499 bis 0,518
Arthralgie vs enthesitisch	-0,185	2,2	P > 0,05	-0,573 bis 0,204
Arthralgie vs keine Kategorie	0,0336	0,42	P > 0,05	-0,337 bis 0,404
RA vs oligoart., pers.	-0,281	5,64	P < 0,01	-0,513 bis -0,0501
RA vs oligoart., ext.	-0,315	4,65	P < 0,05	-0,630 bis -0,000804
RA vs polyart., RF neg.	-0,189	3,79	P > 0,05	-0,421 bis 0,0420
RA vs polyart., RF pos.	-0,273	3,83	P > 0,05	-0,604 bis 0,0574
RA vs systemisch	-0,29	5,28	P < 0,05	-0,545 bis -0,0354
RA vs psoriatisch	-0,214	2,37	P > 0,05	-0,635 bis 0,206
RA vs enthesitisch	-0,409	7,23	P < 0,001	-0,671 bis -0,147
RA vs keine Kategorie	-0,19	3,78	P > 0,05	-0,424 bis 0,0434
oligoart., pers. vs oligoart., ext.	-0,0337	0,52	P > 0,05	-0,335 bis 0,267
oligoart., pers. vs polyart., RF neg.	0,0921	2,01	P > 0,05	-0,121 bis 0,305
oligoart., pers. vs polyart., RF pos.	0,00822	0,12	P > 0,05	-0,310 bis 0,326
oligoart., pers. vs systemisch	-0,00863	0,168	P > 0,05	-0,247 bis 0,229
oligoart., pers. vs psoriatisch	0,067	0,758	P > 0,05	-0,343 bis 0,477
oligoart., pers. vs enthesitisch	-0,127	2,4	P > 0,05	-0,373 bis 0,119
oligoart., pers. vs keine Kategorie	0,0912	1,96	P > 0,05	-0,124 bis 0,306
oligoart., ext. vs polyart., RF neg.	0,126	1,94	P > 0,05	-0,175 bis 0,427
oligoart., ext. vs polyart., RF pos.	0,0419	0,508	P > 0,05	-0,341 bis 0,425
oligoart., ext. vs systemisch	0,0251	0,365	P > 0,05	-0,294 bis 0,344
oligoart., ext. vs psoriatisch	0,101	1,01	P > 0,05	-0,361 bis 0,563
oligoart., ext. vs enthesitisch	-0,0934	1,33	P > 0,05	-0,419 bis 0,232
oligoart., ext. vs keine Kategorie	0,125	1,91	P > 0,05	-0,178 bis 0,428
polyart., RF neg. vs polyart., RF pos.	-0,0839	1,22	P > 0,05	-0,402 bis 0,234
polyart., RF neg. vs systemisch	-0,101	1,96	P > 0,05	-0,339 bis 0,137
polyart., RF neg. vs psoriatisch	-0,0251	0,284	P > 0,05	-0,435 bis 0,385
polyart., RF neg. vs enthesitisch	-0,219	4,14	P > 0,05	-0,465 bis 0,0265
polyart., RF neg. vs keine Kategorie	-0,000953	0,0205	P > 0,05	-0,216 bis 0,214
polyart., RF pos. vs systemisch	-0,0168	0,233	P > 0,05	-0,352 bis 0,318
polyart., RF pos. vs psoriatisch	0,0588	0,576	P > 0,05	-0,414 bis 0,532
polyart., RF pos. vs enthesitisch	-0,135	1,84	P > 0,05	-0,476 bis 0,205
polyart., RF pos. vs keine Kategorie	0,0829	1,2	P > 0,05	-0,237 bis 0,402
systemisch vs psoriatisch	0,0757	0,828	P > 0,05	-0,348 bis 0,499
systemisch vs enthesitisch	-0,119	2,05	P > 0,05	-0,386 bis 0,149
systemisch vs keine Kategorie	0,0998	1,93	P > 0,05	-0,140 bis 0,340
psoriatisch vs enthesitisch	-0,194	2,1	P > 0,05	-0,622 bis 0,234
psoriatisch vs keine Kategorie	0,0241	0,272	P > 0,05	-0,387 bis 0,436
enthesitisch vs keine Kategorie	0,218	4,08	P > 0,05	-0,0296 bis 0,466

Tabelle A20: Tukey-Test zum Vergleich aller Mittelwerte. Signifikante Unterschiede sind fett hervorgehoben.

BESTIMMUNG VON SERUM-IGG-ANTIKÖRPERN GEGEN REKOMBINANTE GPI DURCH ELISA

	gesund	Arthralgie	RA	oligoartikulär		polyartikulär		systemisch	psoriatisch	enthesitisch	keine Kategorie
				persistent	extended	RF negativ	RF positiv				
Anzahl Proben	11	9	34	45	15	46	13	35	7	27	45
Anzahl Probanden	11	8	34	23	9	17	5	9	5	12	16
alle folgenden Werte (außer cv) in OD _{450 nm -630 nm}											
Minimum	0,3290	0,3880	0,1340	0,2560	0,3180	0,1460	0,2750	0,2620	0,2180	0,2460	0,1930
25% Perzentile	0,4260	0,4705	0,4975	0,4400	0,4550	0,3820	0,3355	0,4020	0,2650	0,4640	0,3370
Median	0,6180	0,6240	0,6005	0,5690	0,5370	0,5630	0,4120	0,5030	0,4650	0,5820	0,4020
75% Perzentile	0,7850	0,6420	0,8850	0,7100	0,5770	0,6965	0,4665	0,5560	0,6460	0,7420	0,5570
Maximum	0,8790	0,6570	1,096	1,059	1,017	1,010	0,8070	1,107	0,9790	0,9280	0,8380
Mittelwert	0,6207	0,5704	0,6371	0,5725	0,5351	0,5574	0,4228	0,5142	0,4963	0,5700	0,4524
sdv	0,1785	0,1005	0,2452	0,1773	0,1560	0,1979	0,1347	0,1694	0,2590	0,1834	0,1613
sem	0,0538	0,0335	0,0421	0,0264	0,0403	0,0292	0,0374	0,0286	0,0979	0,0353	0,0240
cv [%]	28,75	17,63	38,49	30,97	29,15	35,51	31,86	32,95	52,20	32,17	35,65
95% CI											
untere Grenze	0,5008	0,4932	0,5515	0,5193	0,4487	0,4986	0,3414	0,4560	0,2567	0,4974	0,4040
obere Grenze	0,7406	0,6477	0,7226	0,6258	0,6215	0,6162	0,5042	0,5724	0,7359	0,6425	0,5009

Tabelle A21: anti-GPI-IgG (ELISA) im Serum von Patienten mit verschiedenen Diagnosen.

	SQ	FG	MQ
zwischen den Gruppen	1,04	10	0,104
innerhalb der Gruppen	9,49	276	0,0344
Gesamt	10,5	286	
	F	p	
	3,04	0,0011	

Tabelle A22: Einfache Varianzanalyse zum Vergleich der Mittelwerte in den verschiedenen Patientengruppen. Mindestens zwei Mittelwerte sind signifikant verschieden ($p = 0,0011$).

Gesund im Vgl. zu	Δ Mittelwerte	q	p	95% CI Δ Mittelwerte
Arthralgie	0,0503	0,603	$P > 0,05$	-0,178 bis 0,279
RA	-0,0163	0,254	$P > 0,05$	-0,193 bis 0,160
oligoartikulär, persistent	0,0482	0,773	$P > 0,05$	-0,123 bis 0,219
oligoartikulär, extended	0,0856	1,16	$P > 0,05$	-0,116 bis 0,287
polyartikulär, RF negativ	0,0634	1,02	$P > 0,05$	-0,107 bis 0,234
polyartikulär, RF positiv	0,198	2,61	$P > 0,05$	-0,0104 bis 0,406
systemisch	0,106	1,66	$P > 0,05$	-0,0693 bis 0,282
psoriatisch	0,124	1,39	$P > 0,05$	-0,121 bis 0,370
enthesitisch	0,0508	0,766	$P > 0,05$	-0,131 bis 0,233
keine Kategorie	0,168	2,70	$P > 0,05$	-0,00277 bis 0,339

Tabelle A23: Dunnett-Test zum Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Patientengruppen mit der gesunden Kontrollgruppe. Kein statistisch signifikanter Unterschied.

Vergleichspaar	Δ Mittelwerte	q	p	95% CI Δ Mittelwerte
gesund vs Arthralgie	0,0503	0,853	P > 0,05	-0,223 bis 0,323
gesund vs RA	-0,0163	0,359	P > 0,05	-0,227 bis 0,194
gesund vs oligoart., pers.	0,0482	1,09	P > 0,05	-0,156 bis 0,253
gesund vs oligoart., ext.	0,0856	1,64	P > 0,05	-0,156 bis 0,327
gesund vs polyart., RF neg.	0,0634	1,44	P > 0,05	-0,141 bis 0,267
gesund vs polyart., RF pos.	0,198	3,69	P > 0,05	-0,0510 bis 0,447
gesund vs systemisch	0,106	2,35	P > 0,05	-0,104 bis 0,317
gesund vs psoriatisch	0,124	1,96	P > 0,05	-0,169 bis 0,418
gesund vs enthesitisch	0,0508	1,08	P > 0,05	-0,167 bis 0,268
gesund vs keine Kategorie	0,168	3,82	P > 0,05	-0,0361 bis 0,373
Arthralgie vs RA	-0,0666	1,36	P > 0,05	-0,294 bis 0,161
Arthralgie vs oligoart., pers.	-0,00209	0,0436	P > 0,05	-0,224 bis 0,220
Arthralgie vs oligoart., ext.	0,0353	0,639	P > 0,05	-0,221 bis 0,292
Arthralgie vs polyart., RF neg.	0,0131	0,274	P > 0,05	-0,208 bis 0,235
Arthralgie vs polyart., RF pos.	0,148	2,60	P > 0,05	-0,116 bis 0,411
Arthralgie vs systemisch	0,0562	1,15	P > 0,05	-0,171 bis 0,283
Arthralgie vs psoriatisch	0,0742	1,12	P > 0,05	-0,232 bis 0,380
Arthralgie vs enthesitisch	0,000481	0,00954	P > 0,05	-0,233 bis 0,234
Arthralgie vs keine Kategorie	0,118	2,47	P > 0,05	-0,104 bis 0,340
RA vs oligoart., pers.	0,0645	2,17	P > 0,05	-0,0736 bis 0,203
RA vs oligoart., ext.	0,102	2,51	P > 0,05	-0,0865 bis 0,290
RA vs polyart., RF neg.	0,0797	2,69	P > 0,05	-0,0578 bis 0,217
RA vs polyart., RF pos.	0,214	5,01	P < 0,05	0,0161 bis 0,412
RA vs systemisch	0,123	3,89	P > 0,05	-0,0235 bis 0,269
RA vs psoriatisch	0,141	2,59	P > 0,05	-0,111 bis 0,393
RA vs enthesitisch	0,0671	1,99	P > 0,05	-0,0896 bis 0,224
RA vs keine Kategorie	0,185	6,20	P < 0,01	0,0465 bis 0,323
oligoart., pers. vs oligoart., ext.	0,0374	0,957	P > 0,05	-0,144 bis 0,219
oligoart., pers. vs polyart., RF neg.	0,0152	0,552	P > 0,05	-0,112 bis 0,143
oligoart., pers. vs polyart., RF pos.	0,150	3,63	P > 0,05	-0,0416 bis 0,341
oligoart., pers. vs systemisch	0,0583	1,97	P > 0,05	-0,0787 bis 0,195
oligoart., pers. vs psoriatisch	0,0762	1,43	P > 0,05	-0,171 bis 0,323
oligoart., pers. vs enthesitisch	0,00257	0,0805	P > 0,05	-0,145 bis 0,151
oligoart., pers. vs keine Kategorie	0,120	4,35	P > 0,05	-0,00802 bis 0,248
oligoart., ext. vs polyart., RF neg.	-0,0222	0,570	P > 0,05	-0,203 bis 0,158
oligoart., ext. vs polyart., RF pos.	0,112	2,26	P > 0,05	-0,118 bis 0,343
oligoart., ext. vs systemisch	0,0209	0,517	P > 0,05	-0,167 bis 0,208
oligoart., ext. vs psoriatisch	0,0388	0,647	P > 0,05	-0,239 bis 0,317
oligoart., ext. vs enthesitisch	-0,0348	0,825	P > 0,05	-0,231 bis 0,161
oligoart., ext. vs keine Kategorie	0,0827	2,12	P > 0,05	-0,0985 bis 0,264
polyart., RF neg. vs polyart., RF pos.	0,135	3,27	P > 0,05	-0,0563 bis 0,326
polyart., RF neg. vs systemisch	0,0431	1,47	P > 0,05	-0,0932 bis 0,179
polyart., RF neg. vs psoriatisch	0,0611	1,15	P > 0,05	-0,185 bis 0,308
polyart., RF neg. vs enthesitisch	-0,0126	0,396	P > 0,05	-0,160 bis 0,135
polyart., RF neg. vs keine Kategorie	0,105	3,82	P > 0,05	-0,0225 bis 0,232
polyart., RF pos. vs systemisch	-0,0915	2,15	P > 0,05	-0,289 bis 0,106
polyart., RF pos. vs psoriatisch	-0,0735	1,20	P > 0,05	-0,358 bis 0,211
polyart., RF pos. vs enthesitisch	-0,147	3,33	P > 0,05	-0,352 bis 0,0580
polyart., RF pos. vs keine Kategorie	-0,0297	0,718	P > 0,05	-0,221 bis 0,162
systemisch vs psoriatisch	0,0179	0,331	P > 0,05	-0,234 bis 0,270
systemisch vs enthesitisch	-0,0557	1,66	P > 0,05	-0,211 bis 0,0999
systemisch vs keine Kategorie	0,0618	2,09	P > 0,05	-0,0752 bis 0,199
psoriatisch vs enthesitisch	-0,0737	1,33	P > 0,05	-0,331 bis 0,184
psoriatisch vs keine Kategorie	0,0439	0,824	P > 0,05	-0,203 bis 0,291
enthesitisch vs keine Kategorie	0,118	3,68	P > 0,05	-0,0304 bis 0,265

Tabelle A24: Tukey-Test zum Vergleich aller Mittelwerte. Signifikante Unterschiede sind fett hervorgehoben.

BESTIMMUNG VON SERUM-IGG-ANTIKÖRPERN GEGEN REKOMBINANTE PGM DURCH ELISA

	gesund	Arthralgie	RA	oligoartikulär		polyartikulär		systemisch	psoriatisch	enthesitisch	keine Kategorie
				persistent	extended	RF negativ	RF positiv				
Anzahl Proben	11	9	34	45	15	45	13	35	7	27	45
Anzahl Probanden	11	8	34	23	9	17	5	9	5	12	16
alle folgenden Werte (außer cv) in OD _{450 nm -630 nm}											
Minimum	0,2770	0,2700	0,1540	0,2550	0,3080	0,1130	0,2250	0,2220	0,2110	0,2000	0,1640
25% Perzentile	0,3640	0,4785	0,4145	0,4320	0,4010	0,3540	0,3535	0,3300	0,2160	0,3550	0,2840
Median	0,5670	0,5870	0,5320	0,5150	0,4990	0,4850	0,4190	0,4020	0,4470	0,4520	0,3850
75% Perzentile	0,7580	0,7165	0,6470	0,6525	0,5820	0,6495	0,4520	0,5050	0,5490	0,5480	0,5205
Maximum	0,8160	0,8090	1,077	1,811	0,9090	1,042	0,4630	0,6000	0,8180	0,7970	0,8230
Mittelwert	0,5495	0,5809	0,5481	0,5713	0,5307	0,5305	0,3904	0,4071	0,4350	0,4556	0,4212
sdv	0,1894	0,1634	0,2147	0,2568	0,1784	0,2111	0,0779	0,1129	0,2215	0,1546	0,1818
sem	0,0571	0,0545	0,0368	0,0383	0,0461	0,0315	0,0216	0,0191	0,0837	0,0298	0,0271
cv [%]	34,47	28,13	39,18	44,96	33,62	39,80	19,94	27,75	50,93	33,94	43,15
95% CI											
untere Grenze	0,4222	0,4553	0,4732	0,4942	0,4319	0,4670	0,3433	0,3683	0,2301	0,3944	0,3666
obere Grenze	0,6767	0,7065	0,6231	0,6485	0,6295	0,5939	0,4374	0,4459	0,6399	0,5167	0,4758

Tabelle A25: anti-PGM-IgG (ELISA) im Serum von Patienten mit verschiedenen Diagnosen.

	SQ	FG	MQ
zwischen den Gruppen	1,26	10	0,126
innerhalb der Gruppen	10,3	275	0,0374
Gesamt	11,5	285	
	F	p	
	3,36	0,0004	

Tabelle A26: Einfache Varianzanalyse zum Vergleich der Mittelwerte in den verschiedenen Patientengruppen. Mindestens zwei Mittelwerte sind signifikant verschieden ($p = 0,0004$).

Gesund im Vgl. zu	Δ Mittelwerte	q	p	95% CI Δ Mittelwerte
Arthralgie	-0,0314	0,362	P > 0,05	-0,270 bis 0,207
RA	0,00131	0,0195	P > 0,05	-0,183 bis 0,185
oligoartikulär, persistent	-0,0219	0,336	P > 0,05	-0,200 bis 0,157
oligoartikulär, extended	0,0188	0,245	P > 0,05	-0,192 bis 0,229
polyartikulär, RF negativ	0,0190	0,292	P > 0,05	-0,159 bis 0,197
polyartikulär, RF positiv	0,159	2,01	P > 0,05	-0,0582 bis 0,376
systemisch	0,142	2,13	P > 0,05	-0,0410 bis 0,326
psoriatisch	0,114	1,22	P > 0,05	-0,142 bis 0,371
enthesitisch	0,0939	1,36	P > 0,05	-0,0958 bis 0,284
keine Kategorie	0,128	1,97	P > 0,05	-0,0502 bis 0,307

Tabelle A27: Dunnett-Test zum Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Patientengruppen mit der gesunden Kontrollgruppe. Kein statistisch signifikanter Unterschied.

Vergleichspaar	Δ Mittelwerte	q	p	95% CI Δ Mittelwerte
gesund vs Arthralgie	-0,0314	0,512	P > 0,05	-0,316 bis 0,253
gesund vs RA	0,00131	0,0276	P > 0,05	-0,219 bis 0,221
gesund vs oligoart., pers.	-0,0219	0,476	P > 0,05	-0,235 bis 0,191
gesund vs oligoart., ext.	0,0188	0,346	P > 0,05	-0,233 bis 0,270
gesund vs polyart., RF neg.	0,0190	0,413	P > 0,05	-0,194 bis 0,232
gesund vs polyart., RF pos.	0,159	2,84	P > 0,05	-0,101 bis 0,419
gesund vs systemisch	0,142	3,01	P > 0,05	-0,0767 bis 0,361
gesund vs psoriatisch	0,114	1,73	P > 0,05	-0,192 bis 0,421
gesund vs enthesitisch	0,0939	1,92	P > 0,05	-0,133 bis 0,321
gesund vs keine Kategorie	0,128	2,79	P > 0,05	-0,0850 bis 0,341
Arthralgie vs RA	0,0327	0,639	P > 0,05	-0,205 bis 0,270
Arthralgie vs oligoart., pers.	0,00956	0,191	P > 0,05	-0,222 bis 0,241
Arthralgie vs oligoart., ext.	0,0502	0,871	P > 0,05	-0,217 bis 0,317
Arthralgie vs polyart., RF neg.	0,0504	1,01	P > 0,05	-0,181 bis 0,282
Arthralgie vs polyart., RF pos.	0,191	3,21	P > 0,05	-0,0843 bis 0,465
Arthralgie vs systemisch	0,174	3,40	P > 0,05	-0,0631 bis 0,411
Arthralgie vs psoriatisch	0,146	2,12	P > 0,05	-0,174 bis 0,465
Arthralgie vs enthesitisch	0,125	2,38	P > 0,05	-0,119 bis 0,369
Arthralgie vs keine Kategorie	0,160	3,20	P > 0,05	-0,0718 bis 0,391
RA vs oligoart., pers.	-0,0232	0,746	P > 0,05	-0,167 bis 0,121
RA vs oligoart., ext.	0,0175	0,413	P > 0,05	-0,179 bis 0,214
RA vs polyart., RF neg.	0,0177	0,569	P > 0,05	-0,126 bis 0,162
RA vs polyart., RF pos.	0,158	3,54	P > 0,05	-0,0489 bis 0,364
RA vs systemisch	0,141	4,29	P > 0,05	-0,0115 bis 0,294
RA vs psoriatisch	0,113	1,99	P > 0,05	-0,150 bis 0,376
RA vs enthesitisch	0,0926	2,63	P > 0,05	-0,0708 bis 0,256
RA vs keine Kategorie	0,127	4,09	P > 0,05	-0,0171 bis 0,271
oligoart., pers. vs oligoart., ext.	0,0407	0,998	P > 0,05	-0,148 bis 0,230
oligoart., pers. vs polyart., RF neg.	0,0409	1,42	P > 0,05	-0,0928 bis 0,174
oligoart., pers. vs polyart., RF pos.	0,181	4,20	P > 0,05	-0,0186 bis 0,381
oligoart., pers. vs systemisch	0,164	5,33	P < 0,05	0,0214 bis 0,307
oligoart., pers. vs psoriatisch	0,136	2,45	P > 0,05	-0,121 bis 0,394
oligoart., pers. vs enthesitisch	0,116	3,48	P > 0,05	-0,0385 bis 0,270
oligoart., pers. vs keine Kategorie	0,150	5,21	P < 0,05	0,0165 bis 0,284
oligoart., ext. vs polyart., RF neg.	0,000200	0,00491	P > 0,05	-0,189 bis 0,189
oligoart., ext. vs polyart., RF pos.	0,140	2,71	P > 0,05	-0,0999 bis 0,380
oligoart., ext. vs systemisch	0,124	2,93	P > 0,05	-0,0720 bis 0,319
oligoart., ext. vs psoriatisch	0,0957	1,53	P > 0,05	-0,194 bis 0,386
oligoart., ext. vs enthesitisch	0,0751	1,71	P > 0,05	-0,129 bis 0,279
oligoart., ext. vs keine Kategorie	0,109	2,69	P > 0,05	-0,0795 bis 0,298
polyart., RF neg. vs polyart., RF pos.	0,140	3,25	P > 0,05	-0,0595 bis 0,340
polyart., RF neg. vs systemisch	0,123	4,01	P > 0,05	-0,0194 bis 0,266
polyart., RF neg. vs psoriatisch	0,0955	1,72	P > 0,05	-0,162 bis 0,353
polyart., RF neg. vs enthesitisch	0,0749	2,25	P > 0,05	-0,0794 bis 0,229
polyart., RF neg. vs keine Kategorie	0,109	3,79	P > 0,05	-0,0244 bis 0,243
polyart., RF pos. vs systemisch	-0,0167	0,375	P > 0,05	-0,223 bis 0,189
polyart., RF pos. vs psoriatisch	-0,0446	0,696	P > 0,05	-0,342 bis 0,253
polyart., RF pos. vs enthesitisch	-0,0652	1,41	P > 0,05	-0,279 bis 0,149
polyart., RF pos. vs keine Kategorie	-0,0308	0,716	P > 0,05	-0,230 bis 0,169
systemisch vs psoriatisch	-0,0279	0,494	P > 0,05	-0,290 bis 0,234
systemisch vs enthesitisch	-0,0485	1,38	P > 0,05	-0,211 bis 0,114
systemisch vs keine Kategorie	-0,0142	0,460	P > 0,05	-0,157 bis 0,129
psoriatisch vs enthesitisch	-0,0206	0,354	P > 0,05	-0,289 bis 0,248
psoriatisch vs keine Kategorie	0,0138	0,248	P > 0,05	-0,244 bis 0,271
enthesitisch vs keine Kategorie	0,0343	1,03	P > 0,05	-0,120 bis 0,189

Tabelle A28: Tukey-Test zum Vergleich aller Mittelwerte. Signifikante Unterschiede sind fett hervorgehoben.

BESTIMMUNG VON SERUM-IGG-ANTIKÖRPERN GEGEN REKOMBINANTE CKM DURCH ELISA

	gesund	Arthralgie	RA	oligoartikulär		polyartikulär		systemisch	psoriatisch	enthesitisch	keine Kategorie
				persistent	extended	RF negativ	RF positiv				
Anzahl Proben	11	9	34	45	15	45	13	35	7	27	45
Anzahl Probanden	11	8	34	23	9	17	5	9	5	12	16
alle folgenden Werte (außer cv) in OD _{450 nm -630 nm}											
Minimum	0,2750	0,2850	0,1480	0,0	0,2040	0,1310	0,2100	0,0960	0,1930	0,2220	0,0920
25% Perzentile	0,3390	0,4475	0,4390	0,4195	0,3400	0,3090	0,3075	0,2800	0,2150	0,3110	0,2665
Median	0,6000	0,5580	0,5705	0,4940	0,4870	0,5710	0,3760	0,3840	0,4690	0,4730	0,3450
75% Perzentile	0,8290	0,7020	0,8165	0,6290	0,5530	0,6980	0,4845	0,5290	0,4780	0,5600	0,5680
Maximum	0,8850	0,7110	1,135	1,006	0,8930	0,9750	0,5900	0,7100	0,6630	1,261	1,060
Mittelwert	0,6055	0,5451	0,6058	0,5168	0,4923	0,5317	0,3924	0,3992	0,3870	0,4810	0,4344
sdv	0,2245	0,1450	0,2346	0,1877	0,1981	0,2199	0,1117	0,1557	0,1805	0,2288	0,2381
sem	0,0677	0,0483	0,0402	0,0280	0,0512	0,0328	0,0310	0,0263	0,0682	0,0440	0,0355
cv [%]	37,07	26,60	38,72	36,32	40,24	41,36	28,47	38,99	46,63	47,56	54,80
95% CI											
untere Grenze	0,4547	0,4336	0,5240	0,4604	0,3826	0,4656	0,3249	0,3458	0,2201	0,3905	0,3629
obere Grenze	0,7564	0,6566	0,6876	0,5732	0,6020	0,5978	0,4599	0,4527	0,5539	0,5715	0,5059

Tabelle A29: anti-CKM-IgG (ELISA) im Serum von Patienten mit verschiedenen Diagnosen.

	SQ	FG	MQ
zwischen den Gruppen	1,37	10	0,137
innerhalb der Gruppen	11,7	275	0,0427
Gesamt	13,1	285	
	F	p	
	3,20	0,0007	

Tabelle A30: Einfache Varianzanalyse zum Vergleich der Mittelwerte in den verschiedenen Patientengruppen. Mindestens zwei Mittelwerte sind signifikant verschieden ($p = 0,0007$).

Gesund im Vgl. zu	Δ Mittelwerte	q	p	95% CI Δ Mittelwerte
Arthralgie	0,0604	0,651	$P > 0,05$	-0,194 bis 0,315
RA	-0,000249	0,00347	$P > 0,05$	-0,197 bis 0,196
oligoartikulär, persistent	0,0887	1,28	$P > 0,05$	-0,102 bis 0,279
oligoartikulär, extended	0,113	1,38	$P > 0,05$	-0,112 bis 0,338
polyartikulär, RF negativ	0,0738	1,06	$P > 0,05$	-0,117 bis 0,264
polyartikulär, RF positiv	0,213	2,52	$P > 0,05$	-0,0191 bis 0,445
systemisch	0,206	2,89	$P < 0,05$	0,0104 bis 0,402
psoriatisch	0,219	2,19	$P > 0,05$	-0,0555 bis 0,493
enthesitisch	0,125	1,69	$P > 0,05$	-0,0782 bis 0,327
keine Kategorie	0,171	2,46	$P > 0,05$	-0,0195 bis 0,362

Tabelle A31: Dunnett-Test zum Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Patientengruppen mit der gesunden Kontrollgruppe. Die systemische JIA unterscheidet sich signifikant von der gesunden Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

Vergleichspaar	Δ Mittelwerte	q	p	95% CI Δ Mittelwerte
gesund vs Arthralgie	0,0604	0,920	P > 0,05	-0,244 bis 0,365
gesund vs RA	-0,000249	0,00491	P > 0,05	-0,235 bis 0,235
gesund vs oligoart., pers.	0,0887	1,81	P > 0,05	-0,139 bis 0,317
gesund vs oligoart., ext.	0,113	1,95	P > 0,05	-0,156 bis 0,382
gesund vs polyart., RF neg.	0,0738	1,50	P > 0,05	-0,154 bis 0,302
gesund vs polyart., RF pos.	0,213	3,56	P > 0,05	-0,0643 bis 0,491
gesund vs systemisch	0,206	4,09	P > 0,05	-0,0278 bis 0,440
gesund vs psoriatisch	0,219	3,09	P > 0,05	-0,109 bis 0,546
gesund vs enthesitisch	0,125	2,38	P > 0,05	-0,118 bis 0,367
gesund vs keine Kategorie	0,171	3,48	P > 0,05	-0,0567 bis 0,399
Arthralgie vs RA	-0,0607	1,11	P > 0,05	-0,315 bis 0,193
Arthralgie vs oligoart., pers.	0,0283	0,531	P > 0,05	-0,219 bis 0,276
Arthralgie vs oligoart., ext.	0,0528	0,858	P > 0,05	-0,233 bis 0,338
Arthralgie vs polyart., RF neg.	0,0134	0,251	P > 0,05	-0,234 bis 0,261
Arthralgie vs polyart., RF pos.	0,153	2,41	P > 0,05	-0,141 bis 0,446
Arthralgie vs systemisch	0,146	2,67	P > 0,05	-0,107 bis 0,399
Arthralgie vs psoriatisch	0,158	2,15	P > 0,05	-0,183 bis 0,499
Arthralgie vs enthesitisch	0,0641	1,14	P > 0,05	-0,197 bis 0,325
Arthralgie vs keine Kategorie	0,111	2,08	P > 0,05	-0,137 bis 0,358
RA vs oligoart., pers.	0,0890	2,68	P > 0,05	-0,0649 bis 0,243
RA vs oligoart., ext.	0,114	2,51	P > 0,05	-0,0964 bis 0,323
RA vs polyart., RF neg.	0,0741	2,23	P > 0,05	-0,0798 bis 0,228
RA vs polyart., RF pos.	0,213	4,48	P > 0,05	-0,00746 bis 0,434
RA vs systemisch	0,207	5,87	P < 0,01	0,0435 bis 0,370
RA vs psoriatisch	0,219	3,61	P > 0,05	-0,0623 bis 0,500
RA vs enthesitisch	0,125	3,31	P > 0,05	-0,0498 bis 0,299
RA vs keine Kategorie	0,171	5,16	P < 0,05	0,0175 bis 0,325
oligoart., pers. vs oligoart., ext.	0,0245	0,563	P > 0,05	-0,177 bis 0,226
oligoart., pers. vs polyart., RF neg.	-0,0149	0,484	P > 0,05	-0,158 bis 0,128
oligoart., pers. vs polyart., RF pos.	0,124	2,70	P > 0,05	-0,0889 bis 0,338
oligoart., pers. vs systemisch	0,118	3,57	P > 0,05	-0,0351 bis 0,270
oligoart., pers. vs psoriatisch	0,130	2,19	P > 0,05	-0,145 bis 0,405
oligoart., pers. vs enthesitisch	0,0358	1,01	P > 0,05	-0,129 bis 0,201
oligoart., pers. vs keine Kategorie	0,0824	2,68	P > 0,05	-0,0604 bis 0,225
oligoart., ext. vs polyart., RF neg.	-0,0394	0,906	P > 0,05	-0,241 bis 0,162
oligoart., ext. vs polyart., RF pos.	0,0999	1,80	P > 0,05	-0,157 bis 0,357
oligoart., ext. vs systemisch	0,0930	2,06	P > 0,05	-0,116 bis 0,302
oligoart., ext. vs psoriatisch	0,105	1,57	P > 0,05	-0,205 bis 0,415
oligoart., ext. vs enthesitisch	0,0113	0,239	P > 0,05	-0,207 bis 0,229
oligoart., ext. vs keine Kategorie	0,0579	1,33	P > 0,05	-0,144 bis 0,260
polyart., RF neg. vs polyart., RF pos.	0,139	3,03	P > 0,05	-0,0739 bis 0,353
polyart., RF neg. vs systemisch	0,132	4,02	P > 0,05	-0,0202 bis 0,285
polyart., RF neg. vs psoriatisch	0,145	2,44	P > 0,05	-0,130 bis 0,420
polyart., RF neg. vs enthesitisch	0,0507	1,43	P > 0,05	-0,114 bis 0,216
polyart., RF neg. vs keine Kategorie	0,0973	3,16	P > 0,05	-0,0455 bis 0,240
polyart., RF pos. vs systemisch	-0,00684	0,144	P > 0,05	-0,227 bis 0,213
polyart., RF pos. vs psoriatisch	0,00538	0,0786	P > 0,05	-0,312 bis 0,323
polyart., RF pos. vs enthesitisch	-0,0886	1,80	P > 0,05	-0,317 bis 0,140
polyart., RF pos. vs keine Kategorie	-0,0420	0,913	P > 0,05	-0,255 bis 0,171
systemisch vs psoriatisch	0,0122	0,202	P > 0,05	-0,268 bis 0,293
systemisch vs enthesitisch	-0,0818	2,19	P > 0,05	-0,255 bis 0,0917
systemisch vs keine Kategorie	-0,0352	1,07	P > 0,05	-0,188 bis 0,117
psoriatisch vs enthesitisch	-0,0940	1,52	P > 0,05	-0,381 bis 0,193
psoriatisch vs keine Kategorie	-0,0474	0,799	P > 0,05	-0,323 bis 0,228
enthesitisch vs keine Kategorie	0,0466	1,31	P > 0,05	-0,118 bis 0,211

Tabelle A32: Tukey-Test zum Vergleich aller Mittelwerte. Signifikante Unterschiede sind fett hervorgehoben.

BESTIMMUNG VON SERUM-IGG-ANTIKÖRPERN GEGEN DIE KOMMERZIELLE GPI-AUFREINIGUNG DURCH ELISA

	gesund	Arthralgie	RA	oligoartikulär		polyartikulär		systemisch	psoriatisch	enthesitisch	keine Kategorie
				persistent	extended	RF negativ	RF positiv				
Anzahl Proben	11	9	30	43	14	44	13	35	7	26	43
Anzahl Probanden	11	8	30	22	8	17	5	9	5	12	15
alle folgenden Werte (außer cv) in OD_{450 nm -630 nm}											
Minimum	0,1690	0,1780	0,0780	-0,0400	0,0210	0,0150	0,1500	-0,0090	0,0900	0,0660	0,0140
25% Perzentile	0,2060	0,1830	0,2155	0,1800	0,1825	0,1570	0,1695	0,1430	0,1230	0,2040	0,1340
Median	0,3280	0,3100	0,3150	0,2790	0,2555	0,2490	0,2380	0,2180	0,2690	0,3175	0,1790
75% Perzentile	0,3880	0,4515	0,4545	0,3800	0,4070	0,3795	0,3035	0,3200	0,4000	0,4695	0,2900
Maximum	0,5290	0,5440	1,035	0,7840	0,9660	0,8610	0,3730	0,5280	0,7750	0,6310	0,5120
Mittelwert	0,3141	0,3236	0,3908	0,2936	0,3158	0,2827	0,2452	0,2314	0,2959	0,3322	0,2089
sdv	0,1120	0,1412	0,2509	0,1583	0,2244	0,1758	0,0711	0,1386	0,2370	0,1550	0,1092
sem	0,0338	0,0471	0,0458	0,0241	0,0600	0,0265	0,0197	0,0234	0,0896	0,0304	0,0167
cv [%]	35,65	43,64	64,19	53,92	71,07	62,18	28,98	59,91	80,09	46,68	52,26
95% CI											
untere Grenze	0,2389	0,2150	0,2971	0,2449	0,1862	0,2293	0,2022	0,1838	0,0767	0,2695	0,1753
obere Grenze	0,3893	0,4321	0,4845	0,3423	0,4454	0,3361	0,2881	0,2790	0,5150	0,3948	0,2425

Tabelle A33: IgG, das an die kommerzielle GPI-Aufreinigung bindet (ELISA), im Serum von Patienten mit verschiedenen Diagnosen.

	SQ	FG	MQ
zwischen den Gruppen	0,804	10	0,0804
innerhalb der Gruppen	7,30	264	0,0276
Gesamt	8,10	274	
	F	p	
	2,91	0,0018	

Tabelle A34: Einfache Varianzanalyse zum Vergleich der Mittelwerte in den verschiedenen Patientengruppen. Mindestens zwei Mittelwerte sind signifikant verschieden ($p = 0,0018$).

Gesund im Vgl. zu	Δ Mittelwerte	q	p	95% CI Δ Mittelwerte
Arthralgie	-0,00946	0,127	P > 0,05	-0,215 bis 0,196
RA	-0,0767	1,31	P > 0,05	-0,238 bis 0,0841
oligoartikulär, persistent	0,0205	0,364	P > 0,05	-0,134 bis 0,175
oligoartikulär, extended	-0,00169	0,0253	P > 0,05	-0,186 bis 0,182
polyartikulär, RF negativ	0,0314	0,56	P > 0,05	-0,122 bis 0,185
polyartikulär, RF positiv	0,0689	1,01	P > 0,05	-0,118 bis 0,256
systemisch	0,0827	1,44	P > 0,05	-0,0750 bis 0,240
psoriatisch	0,0182	0,227	P > 0,05	-0,202 bis 0,239
enthesitisch	-0,0181	0,302	P > 0,05	-0,182 bis 0,146
keine Kategorie	0,105	1,87	P > 0,05	-0,0490 bis 0,259

Tabelle A35: Dunnett-Test zum Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Patientengruppen mit der gesunden Kontrollgruppe. Kein statistisch signifikanter Unterschied.

Vergleichspaar	Δ Mittelwerte	q	p	95% CI Δ Mittelwerte
gesund vs Arthralgie	-0,00946	0,179	P > 0,05	-0,254 bis 0,236
gesund vs RA	-0,0767	1,85	P > 0,05	-0,269 bis 0,115
gesund vs oligoart., pers.	0,0205	0,515	P > 0,05	-0,164 bis 0,205
gesund vs oligoart., ext.	-0,00169	0,0358	P > 0,05	-0,221 bis 0,218
gesund vs polyart., RF neg.	0,0314	0,792	P > 0,05	-0,152 bis 0,215
gesund vs polyart., RF pos.	0,0689	1,43	P > 0,05	-0,154 bis 0,292
gesund vs systemisch	0,0827	2,04	P > 0,05	-0,106 bis 0,271
gesund vs psoriatisch	0,0182	0,321	P > 0,05	-0,245 bis 0,282
gesund vs enthesitisch	-0,0181	0,427	P > 0,05	-0,214 bis 0,178
gesund vs keine Kategorie	0,105	2,65	P > 0,05	-0,0790 bis 0,289
Arthralgie vs RA	-0,0673	1,51	P > 0,05	-0,274 bis 0,140
Arthralgie vs oligoart., pers.	0,0299	0,694	P > 0,05	-0,170 bis 0,230
Arthralgie vs oligoart., ext.	0,00777	0,155	P > 0,05	-0,225 bis 0,241
Arthralgie vs polyart., RF neg.	0,0409	0,95	P > 0,05	-0,159 bis 0,240
Arthralgie vs polyart., RF pos.	0,0784	1,54	P > 0,05	-0,158 bis 0,315
Arthralgie vs systemisch	0,0922	2,1	P > 0,05	-0,112 bis 0,296
Arthralgie vs psoriatisch	0,0277	0,467	P > 0,05	-0,247 bis 0,302
Arthralgie vs enthesitisch	-0,0086	0,189	P > 0,05	-0,219 bis 0,202
Arthralgie vs keine Kategorie	0,115	2,66	P > 0,05	-0,0852 bis 0,314
RA vs oligoart., pers.	0,0972	3,48	P > 0,05	-0,0325 bis 0,227
RA vs oligoart., ext.	0,075	1,97	P > 0,05	-0,101 bis 0,251
RA vs polyart., RF neg.	0,108	3,88	P > 0,05	-0,0209 bis 0,237
RA vs polyart., RF pos.	0,146	3,73	P > 0,05	-0,0353 bis 0,327
RA vs systemisch	0,159	5,45	P < 0,01	0,0238 bis 0,295
RA vs psoriatisch	0,095	1,92	P > 0,05	-0,134 bis 0,324
RA vs enthesitisch	0,0587	1,86	P > 0,05	-0,0874 bis 0,205
RA vs keine Kategorie	0,182	6,5	P < 0,001	0,0522 bis 0,312
oligoart., pers. vs oligoart., ext.	-0,0222	0,612	P > 0,05	-0,190 bis 0,146
oligoart., pers. vs polyart., RF neg.	0,0109	0,433	P > 0,05	-0,106 bis 0,128
oligoart., pers. vs polyart., RF pos.	0,0485	1,3	P > 0,05	-0,124 bis 0,221
oligoart., pers. vs systemisch	0,0623	2,33	P > 0,05	-0,0618 bis 0,186
oligoart., pers. vs psoriatisch	-0,00223	0,0465	P > 0,05	-0,224 bis 0,220
oligoart., pers. vs enthesitisch	-0,0385	1,32	P > 0,05	-0,174 bis 0,0969
oligoart., pers. vs keine Kategorie	0,0847	3,34	P > 0,05	-0,0328 bis 0,202
oligoart., ext. vs polyart., RF neg.	0,0331	0,917	P > 0,05	-0,134 bis 0,200
oligoart., ext. vs polyart., RF pos.	0,0706	1,56	P > 0,05	-0,139 bis 0,281
oligoart., ext. vs systemisch	0,0844	2,27	P > 0,05	-0,0880 bis 0,257
oligoart., ext. vs psoriatisch	0,0199	0,366	P > 0,05	-0,232 bis 0,272
oligoart., ext. vs enthesitisch	-0,0164	0,42	P > 0,05	-0,197 bis 0,164
oligoart., ext. vs keine Kategorie	0,107	2,95	P > 0,05	-0,0609 bis 0,275
polyart., RF neg. vs polyart., RF pos.	0,0376	1,01	P > 0,05	-0,135 bis 0,210
polyart., RF neg. vs systemisch	0,0513	1,93	P > 0,05	-0,0721 bis 0,175
polyart., RF neg. vs psoriatisch	-0,0132	0,275	P > 0,05	-0,235 bis 0,209
polyart., RF neg. vs enthesitisch	-0,0494	1,7	P > 0,05	-0,184 bis 0,0854
polyart., RF neg. vs keine Kategorie	0,0738	2,93	P > 0,05	-0,0431 bis 0,191
polyart., RF pos. vs systemisch	0,0138	0,361	P > 0,05	-0,163 bis 0,191
polyart., RF pos. vs psoriatisch	-0,0507	0,92	P > 0,05	-0,306 bis 0,205
polyart., RF pos. vs enthesitisch	-0,087	2,18	P > 0,05	-0,272 bis 0,0982
polyart., RF pos. vs keine Kategorie	0,0362	0,974	P > 0,05	-0,136 bis 0,209
systemisch vs psoriatisch	-0,0645	1,32	P > 0,05	-0,290 bis 0,161
systemisch vs enthesitisch	-0,101	3,31	P > 0,05	-0,242 bis 0,0404
systemisch vs keine Kategorie	0,0225	0,839	P > 0,05	-0,102 bis 0,147
psoriatisch vs enthesitisch	-0,0363	0,725	P > 0,05	-0,268 bis 0,196
psoriatisch vs keine Kategorie	0,087	1,81	P > 0,05	-0,135 bis 0,309
enthesitisch vs keine Kategorie	0,123	4,22	P > 0,05	-0,0122 bis 0,259

Tabelle A36: Tukey-Test zum Vergleich aller Mittelwerte. Signifikante Unterschiede sind fett hervorgehoben.

VERGLEICH DER IGG-ANTIKÖRPER-KONZENTRATIONEN IN SERUM UND SF

	Serum	SF
Anzahl Proben	278	38
Anzahl Probanden	147	27
alle folgenden Werte (außer cv) in OD _{450 nm -630 nm}		
Minimum	-0,044	0,004
25% Perzentile	0,094	0,071
Median	0,23	0,17
75% Perzentile	0,53	0,36
Maximum	1,7	1,0
Mittelwert	0,35	0,28
sdv	0,32	0,30
sem	0,019	0,048
cv [%]	92,34	104,54
95% CI		
untere Grenze	0,31	0,19
obere Grenze	0,39	0,38

Tabelle 37: anti-BSA-IgG-Konzentration (ELISA) in Serum und SF Die Mittelwerte unterscheiden sich nicht statistisch signifikant ($p = 0,2446$).

	Serum	SF
Anzahl Proben	287	39
Anzahl Probanden	149	28
alle folgenden Werte (außer cv) in OD _{450 nm}		
Minimum	0,13	0,14
25% Perzentile	0,40	0,22
Median	0,53	0,35
75% Perzentile	0,65	0,54
Maximum	1,1	0,79
Mittelwert	0,54	0,39
sdv	0,19	0,19
sem	0,011	0,030
cv [%]	35,35	49,08
95% CI		
untere Grenze	0,52	0,32
obere Grenze	0,57	0,45

Tabelle A38: anti-GPI-IgG-Konzentration (ELISA) in Serum und SF Die Mittelwerte unterscheiden sich statistisch signifikant ($p < 0,0001$).

	Serum	SF
Anzahl Proben	286	39
Anzahl Probanden	149	28
alle folgenden Werte (außer cv) in OD _{450 nm}		
Minimum	0,11	0,076
25% Perzentile	0,36	0,22
Median	0,46	0,26
75% Perzentile	0,60	0,47
Maximum	1,8	0,70
Mittelwert	0,49	0,34
sdv	0,20	0,16
sem	0,012	0,026
cv [%]	40,79	48,76
95% CI		
untere Grenze	0,47	0,28
obere Grenze	0,52	0,39

Tabelle A39: anti-PGM-IgG-Konzentration (ELISA) in Serum und SF Die Mittelwerte unterscheiden sich statistisch signifikant ($p < 0,0001$).

	Serum	SF
Anzahl Proben	286	39
Anzahl Probanden	149	28
alle folgenden Werte (außer cv) in OD _{450 nm}		
Minimum	0,0	0,13
25% Perzentile	0,33	0,18
Median	0,47	0,31
75% Perzentile	0,62	0,49
Maximum	1,3	0,97
Mittelwert	0,49	0,35
sdv	0,21	0,20
sem	0,013	0,031
cv [%]	43,48	56,77
95% CI		
untere Grenze	0,47	0,28
obere Grenze	0,52	0,41

Tabelle A40: anti-CKM-IgG-Konzentration (ELISA) in Serum und SF Die Mittelwerte unterscheiden sich statistisch signifikant ($p < 0,0001$).

	Serum	SF
Anzahl Proben	275	38
Anzahl Probanden	142	27
alle folgenden Werte (außer cv) in OD_{450 nm}		
Minimum	-0,04	0,059
25% Perzentile	0,17	0,087
Median	0,26	0,13
75% Perzentile	0,37	0,27
Maximum	1,0	0,67
Mittelwert	0,29	0,20
sdv	0,17	0,16
sem	0,010	0,025
cv [%]	60,20	77,97
95% CI		
untere Grenze	0,27	0,15
obere Grenze	0,31	0,25

Tabelle A41: Konzentration von IgG, das an die kommerzielle GPI-Aufreinigung bindet, (ELISA) in Serum und SF Die Mittelwerte unterscheiden sich statistisch signifikant ($p < 0,0041$).

9.2 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse

Serum-GPI-Aktivität	systemische JIA	> gesunde Kontrollpersonen	p < 0,01 ¹
		Literaturwert	p = 0,0138 ²
		Arthralgie	p < 0,05 ³
		RA	p < 0,01 ³
		persistierend oligoartikuläre JIA	p < 0,01 ³
		erweitert oligoartikuläre JIA	p < 0,01 ³
		RF negative, polyartikuläre JIA	p < 0,001 ³
		Enthesitis-assoziierte JIA	p < 0,001 ³
		nicht kategorisierbare JIA	p < 0,001 ³
Serum-GPI-Aktivität	< SF-GPI-Aktivität		
Korrelationen			
Serum-GPI-Aktivität	SF-GPI-Aktivität	nicht korreliert	
	CRP	korreliert	r _S = 0,4821
	BSG	korreliert	r _S = 0,3877
SF-GPI-Aktivität	CRP	korreliert	r _S = 0,7064
	BSG	korreliert	r _S = 0,4956
Serum-GPI-Aktivität	Serum-Hb	nicht korreliert	
	Serum-LDH	nicht korreliert	
SF-GPI-Aktivität	SF-LDH	korreliert	r _S = 0,9265

Tabelle A42: Zusammenfassung der Ergebnisse der GPI-Aktivitätsmessungen. ¹Dunnett-Test, ²t-Test, ³Tukey-Test.

anti-GPI-IgG	Serum	Psoriasis JIA	> gesund	p < 0,05 ¹
			RA	p < 0,01 ³
			persistierend oligoartikuläre JIA	p < 0,05 ³
			RF positive, polyartikuläre JIA	p < 0,05 ³
			nicht kategorisierbare JIA	p < 0,05 ³
			Enthesitis-asso. JIA	> RA
			persistierend oligoartikuläre JIA	p < 0,05 ³
	Serum	SF	kein Unterschied nicht korreliert	
anti-CKM-IgG	kein Unterschied bei verschiedenen Patientengruppen kein Unterschied oder Korrelation zwischen Serum- und SF-Werten			
anti-PGM-IgG	kein Unterschied bei verschiedenen Patientengruppen, kein Unterschied und keine Korrelation bei Serum- und SF-Werten			
Korrelationen				
IgG-Antikörper aller drei Spezifitäten	nicht korreliert mit GPI-Aktivität, CRP oder BSG weder Serum- noch SF-Werte			

Tabelle A43: Zusammenfassung der Ergebnisse der densitometrisch-ausgewerteten Immunoblots. ¹Dunnett-Test, ³Tukey-Test.

anti-BSA-IgG		ANOVA	p < 0,0004
gesund		verschiedene Patientengruppen	kein Unterschied ¹
RA	<	pers. oligoartikuläre JIA	p < 0,01 ³
		erweitert oligoartikuläre JIA	p < 0,05 ³
		systemische JIA	p < 0,05 ³
		Enthesitis-assoziierte JIA	p < 0,001 ³
anti-GPI-IgG		ANOVA	p < 0,0011
gesund		verschiedene Patientengruppen	kein Unterschied ¹
RA	>	RF positive, polyartikuläre JIA	p < 0,05 ³
		nicht kategorisierbare JIA	p < 0,01 ³
anti-PGM-IgG		ANOVA	p < 0,0004
gesund		verschiedene Patientengruppen	kein Unterschied ¹
pers. oligoartikuläre JIA	>	systemische JIA	p < 0,05 ³
		nicht kategorisierbare JIA	p < 0,05 ³
anti-CKM-IgG		ANOVA	p < 0,0007
gesund	>	systemische JIA	p < 0,05 ¹
RA	>	systemische JIA	p < 0,01 ³
		nicht kategorisierbare JIA	p < 0,05 ³
IgG gegen kommerzielle GPI-Aufreinigung		ANOVA	p < 0,0018
gesund		verschiedene Patientengruppen	kein Unterschied ¹
RA	>	systemische JIA	p < 0,01 ³
		nicht kategorisierbare JIA	p < 0,001 ³

Tabelle A44: Zusammenfassung der Ergebnisse der ELISA-Ergebnisse I. ¹Dunnnett-Test, ³Tukey-Test.

Vergleich Serum und SF			Korrelation zusammengehöriger Serum- und SF-Proben
anti-BSA-IgG		$p = 0,2446^2$	positiv korreliert
anti-GPI-IgG	SF niedriger	$p < 0,0001^2$	positiv korreliert
anti-PGM-IgG	SF niedriger	$p < 0,0001^2$	schwach positiv korreliert
anti-CKM-IgG	SF niedriger	$p < 0,0001^2$	positiv korreliert
IgG gegen GPI-Aufreinigung	SF niedriger	$p = 0,0041^2$	nicht korreliert
Korrelationen			
SF- GPI-Aktivität	SF anti-GPI-IgG		$r_s = 0,3884$
	SF IgG gegen GPI-Aufreinigung		$r_s = 0,4008$
BSG	SF anti-PGM-IgG		$r_s = 0,7334$
	SF anti-GPI-IgG		$r_s = 0,8167$
	SF IgG gegen GPI-Aufreinigung		$r_s = 0,7584$
keine weiteren Korrelationen mit $r_s > 0,2 $			

Tabelle A45: Zusammenfassung der Ergebnisse der ELISA-Ergebnisse II. ²t-Test.

9.3 Veröffentlichungen

9.3.1 ORIGINALARBEITEN

Schepp, C. P., Dannecker, L., Haug, M., Kummerle-Deschner, J., Beck, H., Kotter, I., Holzer, U. und Dannecker, G. E. (2004). Autoantibodies in juvenile idiopathic arthritis: glucose-6-phosphate isomerase is not a specific target. *J Rheumatol* 31, 1630-1638.

Haug, M., Dannecker, L., Schepp, C. P., Kwok, W. W., Wernet, D., Buckner, J. H., Kalbacher, H., Dannecker, G. E. und Holzer, U. (2005). The heat shock protein Hsp70 enhances antigen-specific proliferation of hman CD4 (+) memory T cells. *Eur J Immunol (im Druck)*

Volz, T., Schwarz, G., Fleckenstein, B., Schepp, C. P., Haug, M., Roth, J., Wiesmuller, K. H. und Dannecker, G. E. (2004). Determination of the peptide binding motif and high-affinity ligands for HLA-DQ4 using synthetic peptide libraries. *Hum Immunol* 65, 594-601.

9.3.2 PUBLIZIERTE KONGRESSBEITRÄGE

Schepp, C. P., Haug, M., Dannecker, L. Kummerle-Deschner, J. und Dannecker, G. E. (2005). Autoantikörper gegen Glukose-6-phosphat-Isomerase. 101. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (Bremen, Germany).

Mueller, M., Schepp, C. P., Haug, M., Tzaribachev, N., Kummerle-Deschner, J., Hospach, A., Dannecker, G. E. und Holzer, U. (2005). Phenotyping of T-Cells from Peripheral Blood and Synovial Fluid from Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis and their Response to the Cytokine TGF-b1. 36th Annual Meeting of the DGfI - German Society of Immunology (Kiel, Germany).

Schepp, C. P., Haug, M., Dannecker, L., Kummerle-Deschner, J. und Dannecker, G. E. (2004b). Autoantibodies to Glucose-6-phosphate-Isomerase. Annual European Congress of Rheumatology (Berlin, Germany).

Schepp, C. P., Mueller, M., Haug, M., Kummerle-Deschner, J., Hospach, A., Dannecker, G. E. und Holzer, U. (2004c). Effect of TGF-b1 on T cells in Juvenile Idiopathic Arthritis. Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies for Immunology (Maastricht, NL).

Haug, M., Dannecker, L., Schepp, C. P., Wernet, D., Kwok, W. W., Dannecker, G. E. und Holzer, U. (2004). Hsp70-chaperoned antigenic peptides facilitate the presentation of MHC II-restricted epitopes and CD4+ memory T cell-activation. Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies for Immunology (Maastricht, NL).

Schepp, C. P., Haug, M., Beck, H. und Dannecker, G. E. (2003). Antibodies directed against Glucose-6-phosphate Isomerase in patients with juvenile idiopathic arthritis. 34th Annual Meeting of the DGfI - German Society of Immunology (Berlin, Germany).

Haug, M., Schepp, C. P., Hesse, N. C., Kalbacher, H., Holzer, U. und Dannecker, G. E. (2003). Heat shock proteins: Interaction with HLA-DR-molecules and the influence on the class II dependent antigen presentation. 34th Annual Meeting of the DGFI - German Society of Immunology (Berlin, Germany).

Schepp, C. P., Haug, M., Beck, H. und Dannecker, G. E. (2002). Juvenile Idiopathic Arthritis: Is It One Autoantibody? 33rd Annual Meeting of the DGFI - German Society of Immunology (Marburg, Germany).

Haug, M., Maier, J. T., Schepp, C. P., Kalbacher, H. und Dannecker, G. E. (2002). Interaction of 70 kDa heat shock proteins with HLA-DR molecules and its peptide fragments in rheumatoid arthritis. 33rd Annual Meeting of the DGFI - German Society of Immunology (Marburg, Germany).

9.4 Akademische Lehrer

H. Bisswanger, P. Bohley, F. Bonhoeffer, D. Christen, G.E. Dannecker, K. Eisele, K.-U. Fröhlich, G. Gauglitz, P. Grabmayr, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, B. Hamprecht, E. Lindner, D. Mecke, S. Neuhauss, H. Oberhammer, S. Pimplikar, K. Poralla, H. Probst, H.-G. Rammensee, K. Reutter, J. Scheel, H.-U. Schnitzler, J. Strähle, W. Voelter, U. Weser

