

Aus der Klinik für Innere Medizin I
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
mit den Schwerpunkten
Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie
Direktor: Prof. Dr. Michael Pfreundschuh

Die Prävalenz von Progranulin-Autoantikörpern bei der Psoriasisarthropathie und bei der rheumatoiden Arthritis

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
Homburg/Saar
2015

vorgelegt von
Marina Zaks,
geboren am 14.07.1987 in Perm/ Russland

Erster Berichterstatter (Doktorvater): PD Dr. med. Gunter Aßmann

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung und Fragestellung	3
2.1	Autoantikörper	3
2.2	Progranulin	4
2.3	Weitere Kandidatenantigene	6
2.4	Psoriasis vulgaris	8
2.5	Psoriasisarthropathie	10
2.6	TNF- α -Aktivierung bei der Psoriasis und Psoriasisarthropathie	15
2.7	B-Lymphozyten bei der Psoriasis und Psoriasisarthropathie	17
2.8	Rheumatoide Arthritis	17
2.9	TNF- α -Aktivierung bei der rheumatoiden Arthritis	21
2.10	B-Zell-Aktivierung bei der rheumatoiden Arthritis	23
2.11	Fragestellung	23
3	Material und Methodik	25
3.1	Laborgeräte	25
3.2	Verbrauchsmaterialien	25
3.2.1	Molekularbiologische Materialien	25
3.2.2	Materialien der Zellkultur und der Expressionssysteme	25
3.2.3	Immunologische und proteinchemische Materialien	26
3.2.4	Lösungen und Medien	26
3.3	Methodik	27
3.3.1	Auswahl der Kandidatenantigene und deren Expression in eukaryotem HEK293 Expressionssystem	27
3.3.2	Patienten	27
3.3.3	Immunologische und proteinchemische Methodik	28
3.3.3.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	28
3.3.3.2	Sandwich- ELISA	29
3.3.3.3	ELISA zur Bestimmung des relativen Progranulin-Plasmaspiegels	30
3.3.3.4	Zytotoxizitätsassay	31
3.3.4	Statistik	32

4	Ergebnisse	33
4.1	Progranulin-Autoantikörper-ELISA bei der Psoriasisarthropathie	33
4.2	Immunglobulin-Klassen mit Immunglobulin-Subklassen bei der Psoriasisarthropathie	36
4.3	Plasmakonzentration von Progranulin	37
4.4	Zytotoxizitätsassay	39
4.5	Progranulin-Autoantikörper-ELISA bei der Psoriasis vulgaris	40
4.6	Progranulin-Autoantikörper-ELISA beim SAPHO-Syndrom	41
4.7	Progranulin-Autoantikörper-ELISA bei der rheumatoiden Arthritis	41
4.8	Progranulin-Autoantikörper-ELISA bei verschiedenen Kontrollgruppen	42
4.9	SLPI-Autoantikörper-ELISA bei Patienten mit Psoriasis und Psoriasisarthropathie	42
4.10	Serpin-B1-Autoantikörper-ELISA bei Patienten mit rheumatoider Arthritis	43
4.11	Ferritin-Autoantikörper-ELISA bei Patienten mit Psoriasis, Psoriasisarthropathie und rheumatoider Arthritis	43
5	Diskussion	45
5.1	Progranulin-Autoantikörper bei Psoriasis und Psoriasisarthropathie	45
5.2	Progranulin-Autoantikörper bei der rheumatoiden Arthritis	48
5.3	Progranulin-Autoantikörper beim SAPHO-Syndrom	49
5.4	Ferritin-Autoantikörper bei Patienten mit Psoriasis, Psoriasisarthropathie und rheumatoider Arthritis	49
5.5	SLPI-Autoantikörper bei Patienten mit Psoriasis und Psoriasisarthropathie	50
5.6	Serpin B1-Autoantikörper bei Patienten mit rheumatoider Arthritis	50
6	Literaturverzeichnis	51
7	Danksagung	63
8	Publikationen	64
9	Curriculum Vitae	65
10	Anhang: Patientencharakteristika	66

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Subgruppenanalyse der Psoriasisarthropathie-Patienten

Abbildung 2: Vorkommen von Progranulin-Autoantikörpern bei Psoriasisarthropathie, Psoriasis ohne Gelenkbeteiligung und gesunden Kontrollpersonen

Abbildung 3: Ig-Klassen und IgG-Subklassen der Progranulin-Autoantikörper bei Psoriasisarthropathie-Patienten

Abbildung 4: PGRN-Plasmakonzentration gesunder Kontrollpersonen und von Patienten mit Psoriasis, Psoriasisarthropathie und rheumatoider Arthritis

Abbildung 5: Zytotoxizitätsassay WEHI-Zelllinie

Abbildung 6: Zytotoxizitätsassay HT1080-Zelllinie

Abbildung 7: Vorkommen von Autoantikörpern gegen Ferritin-Schwerkette

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: CASPAR Kriterien für die Diagnose einer Psoriasisarthropathie

Tabelle 2: New York Criteria ASAS-Group

Tabelle 3: Klassifikationskriterien der rheumatoiden Arthritis nach ACR und EULAR

Tabelle 4: Labordiagnostische Charakteristika Psoriasisarthropathie-Patienten

Tabelle 5: Klinische Befallsarten Psoriasisarthropathie-Patienten

Tabelle 6: Medikation Psoriasisarthropathie-Patienten

Tabelle 7: Medikation Psoriasis vulgaris-Patienten

Tabelle 8: Weitere Patientencharakteristika rheumatoide Arthritis-Patienten

Tabelle 9: Medikation rheumatoide Arthritis- Patienten

Abkürzungsverzeichnis

ACPA	Antikörper gegen citrullinierte Peptide
ACR	American College of Rheumatology
ADAMTS	A disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin
AK	Antikörper
AKA	Antikeratin-Antikörper
APF	Antiperinukleäre Faktor
Atsttrin	Antagonist of TNF/TNFR Signaling via Targeting to TNF Receptors
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CAM	Cell adhesion molecule
CCP	Zyklisch citrulliniertes Peptide
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CRD	Cystein-rich domain
DIP	Distales Interphalangealgelenk
DMARDs	Disease modifying anti-rheumatic drugs
DR3	Death receptor 3
ED	Erstdiagnose
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
EULAR	European League against Rheumatism
FTLD	Frontotemporal lobar degeneration
HCl	Chlorwasserstoff
HLA	Human leukocyte antigen
Ig	Immunglobulin
IKK	I- κ B-Kinasen
IL	Interleukin
I κ B	Inhibitor of Kappa B
kDa	Kilo Dalton
MCV	Mutiertes citrulliniertes Vimentin
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NaCl	Natrium-Chlorid
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
OPC	Osteoclast precursor cells
OPD	O-Phenylen-Diamin
PAD	Peptidylarginin Deimasen
PGRN	Progranulin
PIP	Proximales Interphalangealgelenk
PsA	Psoriasisarthropathie
RA	Rheumatoide Arthritis
RANK	Receptor Activator of NF- κ B

RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Serpin B1	Serin-Protease-Inhibitor B1
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SLP2	Stomatin-like protein 2
SLPI	Secretory leukocyte protease inhibitor
TBS	Tris Buffered Saline
Tg	Thyreoglobulin
TL1A	TNF-like Ligand 1A
TMB	Tetramethylbenzin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR1	TNF-Rezeptor 1
TNFR2	TNF-Rezeptor 2
TNFRSF	TNF-Rezeptorsuperfamilie
TPO	Thyroidperoxidase
Tregs	Regulatorische T-Zellen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	Von Willebrand-Faktor

1 Zusammenfassung

Progranulin-Autoantikörper wurden im gesamten Spektrum der primären Vaskulitiden, beim systemischen Lupus erythematoses als auch bei der rheumatoiden Arthritis beschrieben (Thurner, *et al.* 2012). Obwohl sie unspezifisch für eine dieser Autoimmunerkrankungen sind, haben sie eine hohe Spezifität für einen ablaufenden Autoimmunprozess.

Progranulin ist ein sezerniertes Protein, das direkt die TNF-Rezeptoren 1 und 2 (TNFRSF 1 und 2) inhibiert (Tang, *et al.* 2011) und somit einen wichtigen Gegenspieler der TNF- α -vermittelten Entzündungskaskade darstellt. Progranulin-Autoantikörper neutralisieren sezerniertes Progranulin. Mittles ELISA wurde das Vorkommen dieser Progranulin-Autoantikörper in Seren von Patienten mit Psoriasisarthropathie, Psoriasis vulgaris und rheumatoider Arthritis untersucht. So konnte das Auftreten von Progranulin-Autoantikörpern in einer Subgruppe von Patienten mit Psoriasisarthropathie ($50/260 = 19,2\%$) nachgewiesen werden, obwohl diese Erkrankung generell als seronegativ bezeichnet wird. Bei Psoriasis-Patienten mit ausschließlich kutanem Befall ohne Gelenkbeteiligung konnten keine Progranulin-Autoantikörper nachgewiesen werden ($0/100 = 0\%$). Daher könnten Progranulin-Autoantikörper aufgrund der unterschiedlichen Prävalenz bei der Psoriasis ohne und mit Gelenkbeteiligung (Psoriasisarthropathie) als diagnostischer Biomarker für die Entwicklung einer Psoriasisarthropathie eingesetzt werden. Die durchgeführte Subgruppenanalyse zeigte, dass sich bei seropositiven Patienten die Psoriasisarthropathie häufiger als Daktylitis und Enthesitis äußerte, was indirekt auf eine erhöhte Krankheitsaktivität beziehungsweise einen schwereren Verlauf hindeutet.

Die neutralisierende Wirkung der Progranulin-Autoantikörper auf den Progranulin-Plasmaspiegel wurde bei seropositiven Patienten durch Spiegelbestimmung nachgewiesen. Die proinflammatorische Wirkung der Progranulin-Autoantikörper konnte in einem TNF- α induzierten Zytotoxizitätsassay in-vitro bestätigt werden.

Außerdem konnte das zuvor festgestellte häufige Auftreten von Progranulin-Autoantikörpern bei der rheumatoiden Arthritis ($16/44 = 36,7\%$) (Thurner, *et al.* 2012) mithilfe einer großen Kohorte von Patienten mit rheumatoider Arthritis ($41/146 = 28,1\%$) bestätigt werden.

Summary

Progranulin autoantibodies have been found in the whole spectrum of primary vasculitides as well as in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis (Thurner, *et al.* 2012). Although they lack specificity for one of the aforementioned diseases they still possess high specificity for an ongoing autoimmune process.

Progranulin is a secreted anti-inflammatory protein. By directly inhibiting the TNF receptor superfamily (TNFRSF) 1 and 2 (Tang, *et al.* 2011) progranulin is a crucial antagonist in the TNF-induced inflammation. Progranulin autoantibodies neutralize plasma concentration of secreted progranulin. Utilising ELISA we have investigated the occurrence of progranulin autoantibodies in patients with psoriatic arthritis, psoriasis vulgaris and rheumatoid arthritis. The prevalence of progranulin autoantibodies could be demonstrated in a subgroup of patients with psoriatic arthritis (50/260 =19.2%), even though it is known as a seronegative disease. Psoriasis patients without joint manifestation have shown no occurrence of progranulin autoantibodies (0/100 =0%). Hence the different prevalence of progranulin autoantibodies might be used as a diagnostic marker for the development of psoriatic arthritis.

Conducted analysis of subdivided groups has shown high frequency of dactylitis and enthesitis in patients possessing the progranulin autoantibodies, potentially indicating increased disease activity or, respectively, a more severe disease course. Measurements of the progranulin plasma levels displayed a neutralizing effect concerning the Progranulin plasma levels of seropositive patients in comparison to seronegative patients and healthy controls. A proinflammatory impact has been confirmed via TNF- α mediated cytotoxicity assays using WEHI-S and HT1080 cells.

Furthermore this thesis confirms formerly published evidence of progranulin autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis (16/44 = 36.7%) (Thurner, *et al.* 2012) by increasing the number of tested patients with rheumatoid arthritis (41/146 =28.1%).

2 Einleitung und Fragestellung

2.1 Autoantikörper

Als Autoantikörper werden Antikörper bezeichnet, die gegen körpereigene Antigene gerichtet sind. Autoantikörper können unterschieden werden in krankheitsspezifische und -unspezifische Autoantikörper, außerdem werden sie in pathogenetisch relevante und als Epiphänomen auftretende Antikörper unterteilt. Die pathogenetischen Mechanismen der Antikörper sind nicht nur in der Zerstörung des jeweiligen Antigens begründet. Allein durch die Bindung an das jeweilige Antigen können pathologische Vorgänge ausgelöst werden. 1903 stellte der französische Immunologe Nicolas Maurice Arthus fest, dass es bei wiederholten Injektionen eines Antigens zu einer lokalen entzündlichen Reaktion kommen kann (Arthus. 1903). Die nach ihm benannte Arthus-Reaktion bezeichnet die Entstehung von Immunglobulinen (Ig) oder Antikörpern (Ak) gegen das jeweils injizierte Antigen. Der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex aktiviert das Komplementsystem und führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion. Ein Beispiel einer solchen Entzündungsreaktion ist die Purpura Schönlein-Henoch, eine IgA-vermittelte Vaskulitis der kleinen Gefäße, die sich u.a. durch erhabene Hauteffloreszenzen mit Einblutungen sowie Beteiligung des Gastrointestinaltrakts, der Nieren und Gelenke vor allem im Kindesalter manifestiert (Kraft, *et al.* 1998).

Immunkomplexe können nicht nur durch Ablagerungen Schäden hervorrufen, sondern auch einen deutlich zytopathischen Effekt haben. Bei der rheumatoiden Arthritis, als Beispiel einer Typ III-Immun-Reaktion, sind Antikörper gegen die Fc-Region von IgG nachweisbar. Bei Bindung kommt es zur Anlagerung von Immunkomplexen und zur konsekutiven chronischen Gelenkentzündung.

Ein weiterer pathogenetischer Mechanismus von Antikörpern ist der neutralisierende Effekt auf sezernierte Mediatoren oder Enzyme. Brown *et al* beschrieben 2012 das Vorkommen von neutralisierenden Antikörpern gegen Interferon- γ , welche opportunistische Infektionen begünstigen und mit einer Immunschwäche assoziiert sind, die mit einer fortgeschrittenen HIV-Infektion vergleichbar ist. Diese Antikörper konnten bei 81% der Patienten mit Infektionen

mit nichttuberkulösen Mykobakterien (n=52) und bei 96% der Patienten aus dem südostasiatischen Raum mit opportunistischen Infektionen und normaler CD4-Zellzahl (n=45) nachgewiesen werden (Browne, *et al.* 2012). Ein weiteres Beispiel eines neutralisierenden Effekts durch Antikörper ist der Anti-ADAMTS13-Antikörper, der die physiologische Spaltung des von-Willebrand-Faktors (vWF) durch ADAMTS-13 verhindert und zur klassischen thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP oder Morbus Moschcowitz) führt. Charakteristische Symptome sind Thrombozytopenie, mikroangiopathische Hämolyse mit dem Vorkommen von Fragmentozyten, Nierenversagen und neurologische Ausfälle (Murrin & Murray. 2006, Ridolfi & Bell. 1981). ADAMTS13 gehört zur A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin motif (ADAMTS)-Familie, einer Gruppe von Peptidasen (Hurskainen, *et al.* 1999). Der vWF ist verantwortlich für die Bindung von Thrombozyten an die verletzte Endothelwand. Durch eine verhinderte Spaltung des vWF kommt es zur Bildung von Mikrothromben und zur mikroangiographischen Hämolyse (Tsai & Lian. 1998, Tsai. 2006).

2.2 Progranulin

Progranulin (PGRN) ist ein sezerniertes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 88 kDa (Toh, *et al.* 2011). Es besitzt ein N-terminales Signalpeptid und sieben Granulin-Motive, die jeweils 12 Cysteine und 6 daraus entstehende Disulfidbindungen enthalten (Bateman & Bennett. 2009). Der Abbau zu etwa 6 kDa schweren Granulinen erfolgt durch proteolytische Enzyme wie die neutrophile Elastase oder die Proteinase-3, die von neutrophilen Granulozyten sezerniert werden (Bateman & Bennett. 2009, Zhu, *et al.* 2002). Weiterhin wird PGRN durch die Matrix-Metalloproteinase-12 (MMP-12) (Suh, *et al.* 2012), MMP-14 und durch A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin-7 (ADAMTS-7) (Bai, *et al.* 2009) gespalten.

Das Vorkommen von PGRN konnte insbesondere in Epithelzellen, Leukozyten, Neuronen und Chondrozyten nachgewiesen werden (Liu & Bosch. 2012). Hohe Expressionsraten von PGRN bei Glioblastomen und anderen Hirntumoren (Liau, *et al.* 2000) und die Assoziation erhöhter PGRN-Spiegel mit Brustkrebs, Ovarial-

Karzinomen, multiplen Myelomen und dem hepatocellulären Karzinom wurden beschrieben (Bateman & Bennett. 2009, Cheung, *et al.* 2004, He, *et al.* 2003). Am Beispiel von SW-13-Zellen, einer Zelllinie eines humanen adrenergen Nebennierenkarzinoms, stimulierte PGRN sowohl die Proliferation des Tumors als auch die Infiltration von umliegendem Gewebe durch Tumorzellen und inhibierte die Apoptose (He, *et al.* 2002). 2013 konnte eine Assoziation zwischen einer hohen Plasmakonzentrationen von PGRN bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) und einer schlechteren Prognose festgestellt werden, so dass es möglicherweise als Risikomarker eingesetzt werden könnte (Gobel, *et al.* 2013). Neben seiner Rolle als Wachstumsfaktor ist es auch an der Wundheilung (Ong & Bateman. 2003) beteiligt. Außerdem inhibiert PGRN Entzündungsprozesse über eine verminderte Produktion und Freisetzung von Sauerstoffradikalen durch aktivierte neutrophile Granulozyten (Kessenbrock, *et al.* 2008) und insbesondere über eine Hemmung der TNF- α -vermittelten Immunantwort (Zhu, *et al.* 2002).

Haploinsuffizienz verursachende Mutationen des Granulins können zur Degeneration des Frontotemporallappens führen (frontotemporal lobar degeneration, FTLN). Diese sogenannte TDP43-positive FTLN ist die häufigste Ursache von Demenz vor dem 50. Lebensjahr und die vierthäufigste Ursache von Demenz in höherem Alter (Baker, *et al.* 2006).

Zusammenfassend übernimmt PGRN eine antiinflammatorische Rolle, während die einzelnen Granuline nicht antiinflammatorisch wirken (Cenik, *et al.* 2012). Auf der Suche nach der Ursache der antiinflammatorischen Wirkung und den entsprechenden Interaktionspartnern von PGRN wurde ein *yeast two Hybrid*-Screening durchgeführt (Tang, *et al.* 2011). Dabei stellte sich eine Interaktion zwischen den TNF-Rezeptoren 1 und 2 und PGRN heraus. Der TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) lässt sich ubiquitär nachweisen, der TNF-Rezeptor 2 (TNFR2) wird hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert (Luo, *et al.* 2006). Rekombinantes menschliches PGRN besitzt eine höhere Affinität zum TNFR2 als TNF- α selbst. Durch diese Hemmung der TNF-Rezeptoren 1 & 2 ist PGRN ein wichtiger physiologischer Gegenspieler von TNF- α . Dies konnte auch in vivo in Mausmodellen der Kollagen-induzierten-Arthritis, der Kollagen-Antikörper-induzierten Arthritis (Tang, *et al.* 2011) und der Oxazolol-induzierten-Dermatitis gezeigt werden (Zhao, *et al.* 2013). PGRN-Knockout-Mäuse (GRN^{-/-})

entwickelten deutlich schwerere Krankheitsverläufe als Kontrollmäuse. Nach Gabe von rekombinantem humanen PGRN zeigte sich ein kompletter Stillstand der Krankheitsprogression. Ähnlich reagierten die Mäuse auf die Gabe von Atsttrin, einem rekombinanten PGRN-Derivat bestehend aus den 3 Granulin-Motiven F-A-C und Teilen der entsprechenden Verbindungsregionen. Atsttrin (Antagonist of TNF/TNFR Signaling via Targeting to TNF Receptors) wurde anhand der identifizierten TNF-Rezeptor-affinen PGRN-Domäne entwickelt. Einzelne Granulin-Einheiten oder Verbindungsregionen waren nicht in der Lage den TNF-Rezeptor zu binden, so dass Granulin-Einheiten mit ihren entsprechenden Verbindungsregionen hergestellt wurden, um herauszufinden, ob diese in der Lage sind, den Rezeptor zu binden oder ob das gesamte Molekül für eine Rezeptorbindung benötigt wird. Von diesen Granulin-Einheiten mit ihren jeweiligen Verbindungsregionen zeigten F, A und C eine schwache Bindung zum TNF-Rezeptor woraufhin ein Molekül-Derivat aus Teilen dieser 3 Granulin-Motive und aus Teilen der entsprechenden Verbindungsregionen erstellt wurde. In weiteren Schritten wurden Teile der Granulin-Einheiten entfernt, um die Rezeptorbindungsstelle genauer zu definieren. Das entstandene Molekül Atsttrin ist das kleinst mögliche Molekül, das noch eine starke Bindung an den TNF-Rezeptor zeigte (Lai, *et al.* 2012, Tang, *et al.* 2011).

2.3 Weitere Kandidatenantigene

Secretory leukocyte protease inhibitor

Der oben beschriebene Abbau von PGRN zu Granulinen wird u.a. durch den *secretory leukocyte protease inhibitor* (SLPI) gehemmt. So bindet SLPI an PGRN und verhindert dadurch die Spaltung durch die neutrophile Elastase (Zhu, *et al.* 2002). SLPI besteht aus zwei identischen je 6 kDa schweren Peptiden mit jeweils vier Disulfidbrücken (Grutter, *et al.* 1988). Eine Studie mit SLPI^{-/-} Mäusen zeigte, dass die Wundheilung durch fehlendes SLPI beeinträchtigt wird, jedoch durch die Applikation von PGRN ausgeglichen werden kann. Insofern liegt es nahe, dass ein SLPI-Mangel zu einem verminderten PGRN-Plasmaspiegel führen kann (Zhu, *et al.* 2002). SLPI-neutralisierende Autoantikörper könnten demzufolge auch zu einem PGRN-Mangel führen und damit proinflammatorisch wirken.

Serin-Protease-Inhibitor B1

Ein anderer Inhibitor der neutrophilen Elastase ist der Serin-Protease-Inhibitor B1 (Serpine B1). In einem Mausmodell von Uchiyama *et al.* zur Rolle von Serpin B1 bei der Pathogenese der Colitis ulcerosa konnte nachgewiesen werden, dass Serpin B1 die Funktion der neutrophilen Elastase inhibiert (Uchiyama, *et al.* 2012). Da die neutrophile Elastase zu den Enzymen gehört, die für die Spaltung von PGRN zu den jeweiligen Granulinen verantwortlich sind, führt eine Inhibition der neutrophilen Elastase zu einer höheren Konzentration von PGRN.

Weiterhin wurde 2012 in einer Arbeit von Lyons *et al.* publiziert, dass Serpin-B1-Mutationen neben PR3-Mutationen das Risiko an einer ANCA-assoziierten Vaskulitis zu erkranken maßgeblich erhöhen (Lyons, *et al.* 2012), was die zentrale Rolle von Serpin B1 bei generalisierten entzündlichen Erkrankungen unterstreicht.

Ferritin

Neben seiner Hauptfunktion als Speicherprotein von Eisen konnte in Modellen von Antigen-induzierter Arthritis eine Beteiligung von Ferritin bei der Gelenkzerstörung gezeigt werden. So könnten Immunkomplexe, die Ferritin beinhalten, in den Gelenkknorpel einwandern und dort eine Entzündung auslösen (Ohno, *et al.* 1978). In einer Studie von Mewar *et al.* wurden bei 16% (n=366) der Patienten mit manifester rheumatoider Arthritis und bei 19% (n=118) der Patienten mit frühem Krankheitsstadium Ferritin-Autoantikörper nachgewiesen. Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des Autoantikörpers und radiologischen Schäden gezeigt werden (Mewar, *et al.* 2005). Vor kurzem wurden Autoantikörper gegen die Ferritin-Schwerkette (FTH: *ferritin terminus heavy chain*) bei anderen rheumatologischen Erkrankungen beschrieben: Diese kommen hochtitrig im Schub der Riesenzellarthritis vor und binden vor allem am N-Terminus (Baerlecken, *et al.* 2012).

2.4 Psoriasis vulgaris

Die Psoriasis vulgaris ist eine chronisch entzündliche Erkrankung, die sich in Haut und Hautanhangsgebilden manifestiert. Die Prävalenz der Psoriasis betrug 2005 etwa 2,5% in Deutschland. Die Geschlechterverteilung ist ausgeglichen (Augustin, *et al.* 2010). Mit einer Prävalenz von 1,5% in Großbritannien (Gelfand, *et al.* 2005) und 2% in den USA (Langley, *et al.* 2005) gehört sie zu den häufigsten Hautkrankheiten der Industriestaaten (Naldi. 2004). Weltweit unterliegt die Prävalenz jedoch einer starken Variabilität. Bei den Ureinwohnern Australiens (Green. 1984) und Südamerikas (Convit. 1962) liegt die Prävalenz bei nahezu 0%, während sie bei den Bewohnern der Färöer-Inseln auf bis zu 2,8% ansteigen kann (Lomholt. 1964). Daten zur weltweiten Epidemiologie der Psoriasis deuten darauf hin, dass die Prävalenz abhängig von der Entfernung zum Äquator ist, mit niedrigen Erkrankungszahlen in den äquatornahen Ländern und hohen Erkrankungszahlen in äquatorfernen Gebieten (Parisi, *et al.* 2013).

Charakteristische Komorbiditäten der Psoriasis sind eine erhöhte Prävalenz des metabolischen Syndroms und damit einhergehend ein erhöhtes Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis (Gisondi, *et al.* 2007) sowie speziell eine erhöhte Prävalenz der koronaren Herzerkrankung (Ludwig, *et al.* 2007). Auch eine Assoziation mit anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa durch möglicherweise korrespondierende pathophysiologische Mechanismen konnte beobachtet werden (Augustin, *et al.* 2010).

Die Disposition für die Erkrankung ist erblich, es sind 9 spezifische Gene (PSOR 1-9) bekannt, die mit der Psoriasis assoziiert sind (Bowcock & Krueger. 2005).

Genetische Untersuchungen zeigten eine häufige Assoziation mit HLA-Cw*0602, welches sich auf Chromosom 6p21 befindet. Gujohansson *et al.* zeigten, dass homozygote Träger ein 23-fach erhöhtes Risiko und heterozygote Träger ein neunfach erhöhtes Risiko haben an Psoriasis zu erkranken. Homozygote Träger zeigten außerdem einen früheren Krankheitsbeginn, unterschieden sich jedoch nicht in Befallsart, Krankheitsverlauf oder anderen klinischen Parametern (Gudjonsson, *et al.* 2003).

Eine Induktion der Erkrankung kann durch verschiedene Triggerfaktoren wie zum Beispiel mechanische Verletzungen oder postinfektiös nach einer

respiratorischen Infektion mit Streptokokken der Gruppe A (Norrlind. 1955) ausgelöst werden. Unspezifische mechanische Reizungen können die Entstehung eines lokalen Entzündungsherdes auslösen. Dieser Vorgang ist typisch für die Psoriasis und wird als Köbner-Phänomen bezeichnet. Eine Infektion der Haut mit *Staphylococcus aureus* kann zur Exazerbation der Erkrankung durch Superantigenexpression und konsekutiver Immunstimulation der Haut führen (Tomi, *et al.* 2005). Zahlreiche Assoziationen zwischen Induktion und Exazerbation der Psoriasis bei Patienten mit negativer Familienanamnese und der Einnahme von bestimmten Medikamenten konnten nachgewiesen werden: Am deutlichsten ist die Datenlage für Lithium (Carter. 1972), ACE-Hemmer, β -Blocker und nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) (Cohen, *et al.* 2005) sowie Antimalariamittel wie Hydroxychloroquin und Chloroquin (Cornbleet. 1956). Es gibt allerdings Autoren, die diesen Zusammenhang als Zufallsbefunde darstellen, da die Psoriasis eine häufige Erkrankung ist und die genannten Medikamente vielfach eingesetzt werden (Fry & Baker. 2007).

Klinik

Die Patienten leiden unter erhabenen erythematösen Plaques. Dabei handelt es sich um gerötete, klar begrenzte Stellen mit silbrig-weißer Schuppung. Die Schuppung entsteht durch die Hyperproliferation der Epidermis und mangelnde Ausreifung der Keratinozyten. Parakeratose, ein Vorgang bei dem durch mangelnde Differenzierung Zellkerne im Stratum corneum verbleiben, ist charakteristisch für die Psoriasis. Durch erhöhte mitotische Aktivität der basalen Keratinozyten kommt es zur Akanthose, einer Verbreiterung der Epidermis. Im Abstrich lassen sich dendritische Zellen, Makrophagen und T-Zellen in der Dermis nachweisen. In der Epidermis befinden sich vermehrt neutrophile Granulozyten und T-Zellen (Nestle, *et al.* 2009).

Therapie

Die Psoriasis wird lokal, phototherapeutisch und systemisch behandelt. Als Lokalthérapeutika eignen sich Salben mit Salizylsäure oder Vitamin-D-Analoga. Salben mit Glukokortikoiden werden nur kurzfristig und in Kombination eingesetzt, da nach dem Absetzen die Symptome in stärkerer Ausprägung

rezidivieren und die Glukokortikoide langfristig zu einer Atrophie der Epidermis führen (Boehncke. 2012). Die Überlegenheit einer Kombinationstherapie von Glukokortikoiden mit einem Vitamin-D-Derivat konnte 2004 nachgewiesen werden (Kragballe, *et al.* 2004). Reicht die topische Behandlung nicht aus, so kann eine Phototherapie mit UV-A oder UV-B und dem Wirkungsverstärker Psoralen erfolgen. Die Langzeitanwendung führt jedoch als Nebenwirkung zu verfrühter Hautalterung und erhöhtem Risiko einer malignen Transformation (Stern, *et al.* 1998). Als systemische Therapie werden Fumarsäure oder klassische Immunsuppressiva wie Cyclosporin A und Methotrexat eingesetzt. Bei fehlender therapeutischer Wirkung können auch TNF- α -Blocker wie Etanercept, Infliximab und Adalimumab eingesetzt werden (Boehncke. 2012). Weiterhin zeigt Ustekinumab, ein Antikörper gegen p40, einen Bestandteil von Interleukin-12 und Interleukin-23, bei der Psoriasis eine gute Wirksamkeit (Gottlieb, *et al.* 2009).

2.5 Psoriasisarthropathie

Die Psoriasisarthropathie (oder Psoriasisarthritis, PsA) gehört zur Gruppe der seronegativen Spondylarthritiden. Dazu werden außerdem die ankylosierende Spondylitis, die reaktive Arthritis, die Enteropathie-assoziierten Arthritiden, die undifferenzierte Spondylarthritis und die juvenile Spondylarthritis gezählt. Charakteristisch sind die chronisch-entzündlichen Manifestationen axialer oder peripherer Gelenke, der Sehnenansätze sowie bestimmte extraartikuläre Manifestationen, wie z.B. einer Uveitis, und das Fehlen spezifischer Autoantikörper (Bijlsma. 2012).

Klinik

Eine Haut- und Nagelbeteiligung beginnt meist einige Jahre vor der Gelenkbeteiligung kann aber auch als seltene Form der PsA ohne Hautbefall (*sine psoriase*) auftreten. Die Patienten leiden unter schuppenden, geröteten, klar begrenzten Stellen der Haut, die insbesondere an den Streckseiten der Extremitäten auftreten. Patienten mit Nagelbeteiligung entwickeln häufiger eine PsA. Die Daten zur Prävalenz einer Gelenkbeteiligung bei Psoriasis-Patienten

variieren je nach Autor von 10% (Veale & FitzGerald. 2002) bis zu 30% (Finzel & Englbrecht. 2011).

Befall

1973 wurden von Moll und Wright fünf verschiedene Manifestationsformen beschrieben, die sich im Verlauf der Erkrankung überschneiden oder abwechseln können. Sie unterschieden dabei den gesonderten Befall der distalen und proximalen Interphalangealgelenke (DIP, PIP), die mutilierende Polyarthrit, die symmetrische Polyarthrit ähnlich der rheumatoiden Arthritis, die asymmetrische Oligoarthrit und die Spondylarthrit mit Sakroilitis (Moll & Wright. 1973). Bei der asymmetrischen Oligoarthrit sind meist ein großes Gelenk sowie die Gelenke der Mittelhand- oder Mittelfußknochen befallen. Typisch ist auch der Befall einzelner distaler Interphalangealgelenke. Ein axialer Befall im Sinne einer Spondylarthropathie liegt in 40% der Fälle vor (Radtke, *et al.* 2011). Charakteristisch für die PsA sind Enthesitis, Daktylitis und der strahlenförmige Befall. Bei der Enthesitis (von griechisch *ένθεσης*, Ansatz) handelt es sich um eine Entzündung der Sehnenansatzpunkte, die sich als Druck- oder Spontanschmerz äußern kann. Auch Nagelansätze sind Enthesen und stellen somit eine Verbindung zum Nagelbefall der Psoriasis dar. Die Daktylitis (von griechisch *δάκτυλος*, Finger) ist eine Weichteilentzündung der Sehnen und Sehnenscheiden eines Fingers, die sich in einer Schwellung (sog. "Wurstfinger") des kompletten Fingers zeigt (Wollina, *et al.* 2010). Der strahlenförmige Befall beschreibt eine Weichteilentzündung über dem Grund-, Mittel- und Endgelenk eines Fingers bzw. Zehs. Eine axiale Beteiligung zeigt sich häufig in einer asymmetrischen Sakroilitis, die bis zu 75% der Patienten als Spondylarthrit psoriatica betrifft (Bijlsma. 2012). Eine Sonderform der PsA ist das SAPHO-Syndrom, bestehend aus dem Symptomkomplex Synovitis, Akne, palmoplantarer Pustulose, Hyperostosis und Osteitis (Assmann & Simon. 2011). Pathogenetisch, klinisch und therapeutisch handelt es sich hier um ein eigenständiges Erkrankungsbild.

Diagnose-Kriterien der Psoriasisarthropathie

Als Diagnosekriterien der PsA werden die 2006 aufgestellten *Classification criteria for psoriatic arthritis* (CASPAR) Kriterien verwendet. Die CASPAR-Study-Group entwickelte diese Kriterien 2006 auf Grundlage der Untersuchung von 588 Patienten mit PsA und 536 Kontrollen mit RA, Spondylitis ankylosans, undifferenzierter Arthritis und anderen Erkrankungen. Die CASPAR-Kriterien haben eine Spezifität von 98,7% und eine Sensitivität von 91,4% (Taylor, *et al.* 2006). Die Diagnose einer PsA erfordert nach den CASPAR-Kriterien neben einer entzündlichen Erkrankung der Gelenke, Wirbelsäule oder Sehnen das Erreichen von mindestens drei Punkten mithilfe der folgenden Kriterien:

Kriterien	Punkte
1. Bestehende Psoriasis	2 Punkte
oder Psoriasis in der Krankengeschichte	1 Punkt
oder positive Familienanamnese für Psoriasis	1 Punkt
2. Nagelbeteiligung der Psoriasis	1 Punkt
3. Rheumafaktor negativ	1 Punkt
4. Bestehende Daktylitis oder bekannte Daktylitis in der Krankengeschichte	1 Punkt
5. Radiologischer Beweis einer gelenknahen Knochenneubildung	1 Punkt

Tabelle 1: CASPAR Kriterien für die Diagnose einer Psoriasisarthropathie
(nach: Taylor, *et al.* 2006)

Bildgebung

Das konventionelle Röntgen dient zur Diagnosestellung und Verlaufskontrolle. Typisch für die PsA ist das gleichzeitige Auftreten von erosiven und proliferativen Veränderungen wie Erosionen, Osteolysen, Periostitis, Gelenkspaltverschmälerungen und Ankylosen mit entsprechendem Befallsmuster. Bei besonders schweren Verlaufsformen entwickelt sich eine Arthritis mutilans (5%), die durch subtotale entzündlich-einschmelzende Gelenkdestruktionen zum

vollständigen Funktionsverlust des Gelenks führt (Radtke, *et al.* 2011). Für die Beurteilung des Iliosakralgelenks werden die New York Klassifikationskriterien der Assessment in Spondylo-Arthritis international Society (ASAS) von 2009 verwendet (Sieper, *et al.* 2009).

Stufe 0	Keine Veränderungen
Stufe 1	Verdächtige Veränderungen (unklare Grenzen im Gelenkspalt)
Stufe 2	Minimale Veränderungen (einzelne Erosionen, periartikuläre Sklerose kleiner Gelenkflächen)
Stufe 3	Fortgeschrittene Veränderungen (deutliche periartikuläre Sklerose, zahlreiche Erosionen mit Gelenkspaltvergrößerung, mögliche teilweise Ankylose)
Stufe 4	Ankylose

Tabelle 2: New York Criteria ASAS-Group

(nach: Sieper, *et al.* 2009)

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ermöglicht eine frühere Diagnostik von spezifischen Veränderungen, da insbesondere frühe Entzündungszeichen im Röntgen nicht sichtbar sind. Sichtbare Merkmale einer akuten entzündlichen Läsion im MRT sind Knochenmarködem, Synovitis, Tendinitis und Entzündungen des Bandapparates. Diese sind in STIR-Sequenzen, in T2-gewichteten Aufnahmen oder nach Gabe von Kontrastmittel in T1-gewichteten Aufnahmen sichtbar. Bei einer Sakroilitis zeigt sich ein Knochenmarködem im Iliosakralgelenk und den beteiligten Knochen.

Typisch für die PsA ist dabei der unilaterale asymmetrische Befall. Chronisch entzündliche Prozesse sind charakterisiert durch subchondrale Sklerosen, Erosionen, Ankylosen und Akkumulation von periartikulärem Fettgewebe im Knochenmark. Zur Diagnose werden T1-gewichtete Aufnahmen verwendet (Sieper, *et al.* 2009, Sudol-Szopinska & Urbanik. 2013).

Biomarker

Seit ihrer Erstbeschreibung durch Moll und Wright 1973 gilt die PsA als seronegative Arthritis (Moll & Wright. 1973), und auch in den CASPAR Kriterien von 2006 ist die Seronegativität ein Diagnosekriterium der PsA (Taylor, *et al.*

2006). Im Gegensatz zur rheumatoiden Arthritis sind die Patienten meist negativ für den Rheumafaktor oder Anti-CCP-Antikörper. Auch typische Entzündungsparameter wie das C-reaktive Protein oder die Blutsenkungsgeschwindigkeit verhalten sich uneinheitlich und sind nur teilweise als Verlaufsparemeter geeignet.

Therapie

Als Initialtherapie für sowohl peripheren als auch axialen Befall sind nicht steroidale Antirheumatika (NSAR) wirksam. Sie vermindern Schmerzen und Gelenkschwellungen, haben aber keine Auswirkungen auf die Hautbeteiligung oder den Krankheitsverlauf (Nash & Clegg. 2005, Sarzi-Puttini, *et al.* 2001). Systemische Glukokortikoide werden nur bei leichtem und oligoartikulärem Befall eingesetzt. Eine Monotherapie mit systemischen Steroiden ist nicht empfehlenswert, da sie sich negativ auf den Hautbefall auswirken kann (Finzel & Englbrecht. 2011).

Bei den *disease modifying anti rheumatic drugs* (DMARDs) handelt es sich um krankheitsmodifizierende Antirheumatika, die die gesteigerte Immunreaktion beeinflussen. Ihre wichtigste Indikation ist die Verhinderung fortschreitender gelenkdestruierender Verläufe. Der Folsäure-Antagonist Methotrexat führt zu signifikanten Verbesserungen des Druckschmerzes und der Bewegungsfähigkeit (Nash & Clegg. 2005). Der Pyrimidinsynthesehemmer Leflunomid verbessert Gelenkschwellungen und Schmerzen und hat zudem positive Auswirkungen auf den Hautbefund (Kaltwasser, *et al.* 2004, Liang & Barr. 2001). Auch Ciclosporin A, ein Calcineurininhibitor, wirkt sowohl auf Haut- als auch auf Gelenkbefall (Steinsson, *et al.* 1990). Die Antimalariamittel Chloroquin oder Hydroxychloroquin haben meist eine Exazerbation des Hautbefalls zur Folge und werden im Gegensatz zur Therapie der rheumatoiden Arthritis bei der Psoriasisarthropathie selten eingesetzt (Nash & Clegg. 2005). Das in der Therapie der Psoriasis mit Erfolg eingesetzte Fumarat zeigt bei der PsA keinen therapeutischen Effekt auf den Gelenkbefall (Peeters, *et al.* 1992).

Aus der Gruppe der Biologika führen TNF- α -Blocker wie Etanercept, Infliximab, Adalimumab oder Golimumab zu einer Reduktion der Krankheitsaktivität von Psoriasis vulgaris und PsA. Das Fusionsprotein Etanercept bindet lösliches TNF- α und verhindert dadurch dessen Bindung an den TNF-Rezeptor. Es führt zu

einer signifikanten Reduktion von Haut- und Gelenkbeschwerden und verhindert die radiologische Progression (Mease, *et al.* 2004). Studien mit den TNF- α -Antikörpern Infliximab und Adalimumab führten zu vergleichbaren Ergebnissen (Antoni, *et al.* 2005, Gladman, *et al.* 2007). Liegt eine Enthesitis und Daktylitis vor, die nicht auf NSARs oder intraartikuläre Injektionen anspricht, so werden DMARDs zurückhaltend eingesetzt und eine Therapie mit TNF- α -Blockern bevorzugt (Antoni, *et al.* 2005). Ein weiteres Biologikum ist der Interleukin-12- und Interleukin-23-Inhibitor Ustekinumab, der mit Erfolg bei der Therapie der Psoriasis eingesetzt wird. McInnes *et al.* veröffentlichten 2013 die Ergebnisse einer Studie (n=615) zur Therapie der PsA mit Ustekinumab, die eine signifikante Symptomverbesserung im Vergleich zur Placebogruppe zeigte (McInnes, *et al.* 2013).

Letztlich ist die Therapie der PsA abhängig von Krankheitsaktivität und Manifestation. Die Therapieleitlinien der *Group for Research and Assessment of Psoriasis and Psoriatic Arthritis* (GRAPPA) von 2006 empfehlen bei peripherer Arthritis eine Stufentherapie mit NSARs und intraartikulären Steroidinjektionen. Bei mangelndem Ansprechen folgt die Therapie mit DMARDs und erst daraufhin eine Therapie mit Biologicals. Im Gegensatz dazu wird bei axialem Befall, Enthesitis oder Daktylitis nach fehlendem Therapieerfolg mit NSARs und Steroiden unmittelbar die Therapie mit Biologicals empfohlen (Kavanaugh & Ritchlin. 2006).

Trotz zahlreicher Therapieoptionen ist die Symptombefreiung nicht immer zügig erreichbar, da es keine prognostischen Marker gibt, die ein Ansprechen auf bestimmte Medikamente voraussagen können.

2.6 TNF- α -Aktivierung bei der Psoriasis und Psoriasis-arthropathie

TNF- α ist wesentlich an Stimulation und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion beteiligt. Durch verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen wird die Leukozytenmigration in entzündetem Gewebe stimuliert. Gleichzeitig induziert TNF- α die Synthese von

IL-12 und IL-18, die wiederum die Bildung von Interferon- γ fördern und somit die Entzündungsreaktion fortsetzen. Durch eine Therapie mit TNF- α -Blockern entsteht ein Mangel an Interferon- γ , so dass eine Exazerbation einer latenten Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* erfolgen kann. Daher sollte jeder Patient vor Therapiebeginn mit TNF- α -Blockern auf eine mögliche Tuberkulose untersucht werden (Keane, *et al.* 2001). Eine erhöhte Expression von IL-17, IL-22 und IL-23 in den Hautläsionen von Psoriasispatienten konnte mehrfach bestätigt werden (Liu, *et al.* 2007, Lowes, *et al.* 2008). In der Haut ist IL-17 für die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und IL-22 für eine verminderte Keratinozytendifferenzierung verantwortlich. IL-22 behandelte Haut zeigt nach kurzer Zeit die Entstehung von Akanthose und Parakeratose (Nogales, *et al.* 2008).

Bei der PsA wird durch Zytokine der Knochenstoffwechsel beeinflusst, so dass entzündliche Knochenerosionen entstehen können. Maßgeblich beteiligt am Knochenstoffwechsel sind Osteoblasten und Osteoklasten. Die Osteoblasten sind verantwortlich für Knochenaufbau und die Osteoklasten für Resorption. Ein Ungleichgewicht dieser Prozesse mit Überwiegen der Knochenresorption kann zu Erkrankungen wie Osteoporose führen. Osteoklasten entstehen aus monozytären Osteoklastenvorläuferzellen (OPC, osteoclast precursor cells). Diese exprimieren auf ihrer Oberfläche den Rezeptor RANK (Receptor activator of nuclear factor κ B). Bei Bindung von RANK mit seinem Liganden RANKL (Receptor activator of nuclear factor κ B Ligand) erfolgt eine Stimulation der Osteoklastendifferenzierung. Sezerniert wird RANKL von Osteoblasten und aktivierten T-Lymphozyten. Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6 induzieren die erhöhte Expression von RANKL in Synoviozyten und Osteoblasten (Maeda, *et al.* 2013). Th-17-Zellen induzieren durch Produktion von IL-17 ebenfalls eine erhöhte Expression von RANKL (Sato, *et al.* 2006). Ein Gegenspieler von RANKL ist das ebenfalls von Osteoblasten sezernierte Osteoprotegerin (OPG), welches RANK kompetitiv hemmen kann (Teitelbaum. 2000). Richtlin *et al.* berichteten, dass die Konzentration der OPC in direktem Zusammenhang mit der entzündlichen Knochenzerstörung steht. So hatten PsA-Patienten mit radiologisch gesicherten Erosionen eine signifikant höhere Konzentration von OPCs als PsA-Patienten ohne Erosionen. Zusätzlich wurde die OPC- Konzentration bei PsA-Patienten vor und während einer Anti-TNF- α -Therapie gemessen. Hier zeigte sich eine

signifikante Reduktion der OPCs nach Einleitung der Anti-TNF- α -Therapie (Ritchlin, *et al.* 2003). Dies bestätigt die in-vitro-Experimente von Lam *et al.*, dass unter Kostimulation mit TNF- α nur 1% der üblichen RANKL-Konzentration benötigt wird, um die Osteoklastogenese zu aktivieren (Lam, *et al.* 2000).

2.7 B-Lymphozyten bei der Psoriasis und Psoriasisarthropathie

Bemerkenswerterweise konnte ein signifikant gehäuftes Vorkommen von B-Zellen in der Haut von Patienten mit PsA (n=15) nachgewiesen werden, während die Haut von Patienten mit Psoriasis ohne Gelenkbeteiligung (n=5) und gesunden Kontrollen (n=4) keine B-Zellen enthielt (Veale, *et al.* 1994). Obwohl die PsA seit ihrer Erstbeschreibung als seronegative Erkrankung definiert ist, die im Unterschied zur rheumatoiden Arthritis keine Autoantikörper in Form von Rheumafaktoren bildet, scheinen diese Ergebnisse darauf hinzudeuten, dass B-Lymphozyten doch eine gewisse Rolle in der Pathogenese der PsA spielen können. Diese Rolle ist aber bis heute nicht abschließend geklärt.

2.8 Rheumatoide Arthritis

Epidemiologie und Klinik

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist die häufigste chronisch entzündliche rheumatische Erkrankung. Die Prävalenz der Erkrankung ist variabel. Sie liegt in Spanien bei 0,5% (Carmona, *et al.* 2002), in Finnland bei 0,8% (Aho, *et al.* 1998). Bei afrikanischen Ureinwohnern in Südafrika konnte kein einziger Fall von RA nachgewiesen werden (n=543) (Brighton, *et al.* 1988). Beim Chippewa-Stamm der amerikanischen Ureinwohner dagegen zeigte sich eine Prävalenz von 6,8% (Harvey, *et al.* 1981). Die Geschlechterverteilung vor dem 50. Lebensjahr zeigt einen deutlich häufigeren Befall bei Frauen, so ist die Inzidenz vor dem 50. Lebensjahr bei Frauen um das Vier- bis Fünffache erhöht. Nach dem 50. Lebensjahr liegt das Geschlechterverhältnis bei 2:1 (Kvien, *et al.* 2006). Eine familiäre Häufung ist bekannt. Typisch ist ein symmetrischer Befall der proximalen Finger- und Zehenmittelgelenke, der Mittelhandgelenke und der

Handgelenke, gekennzeichnet durch berührungsempfindliche und geschwollene Gelenke mit eingeschränkter Bewegungsfähigkeit. Die Gelenkdestruktion und Funktionsminderungen können zu einem erheblichen Verlust von Lebensqualität führen. Begleitende Sehnenscheiden- oder Schleimbeutelentzündungen können vorkommen. Außerdem ist die RA eine systemische Erkrankung, die sich durch Fieber, Abgeschlagenheit und Gewichtsverlust äußern kann. Extraartikuläre Symptome einer bestehenden RA können Lungenfibrose, Sicca-Symptomatik, Immunkomplex-Vaskulitiden und Rheumaknoten an Haut und inneren Organen sein. In Einzelfällen kann es bei Krankheitsbeginn auch zum entzündlichen Befall von Organen sowie zu Pleuritis oder Perikarditis kommen (Bijlsma. 2012).

Biomarker der rheumatoiden Arthritis

In den 1930er Jahren beschrieb Waaler erstmals den Rheumafaktor (Waaler. 1939). Seit 1988 ist dieser in den Klassifikationskriterien für die RA des *American College of Rheumatology* aufgeführt. Beim Rheumafaktor handelt es sich um einen Autoantikörper der Klasse IgM, der gegen die Fc-Region von IgG gerichtet ist. Die diagnostische Spezifität ist allerdings eingeschränkt, da er auch bei Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen (zum Beispiel Kollagenosen) oder auch Infektionen mit Hepatitis C erhöht sein kann. Auch bei Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom konnte eine erhöhte Prävalenz nachgewiesen werden (Assmann, *et al.* 2014) . Außerdem steigt die Prävalenz mit dem Lebensalter, so sind mehr als 10% aller gesunden Kontrollpersonen über 60 Jahre seropositiv für den Rheumafaktor (Feist, *et al.* 2007).

Neben dem Rheumafaktor werden auch andere Autoantikörper mit der RA in Verbindung gebracht. 1964 konnten Nienhuis *et al.* einen sogenannten antiperinukleären Faktor (APF) nachweisen, der bei 50% (n=105) der Patienten mit RA gefunden wurde. Dieser richtet sich gegen keratohyaline Granula, die sich in der menschlichen Mundschleimhaut befinden. Bei Patienten mit Morbus Bechterew (n=42) konnte dieser Antikörper nicht (0/42) und bei Patienten mit SLE nur selten nachgewiesen werden (1/12). Allerdings gab es keine Hinweise auf eine pathogenetische Bedeutung des APFs in der RA (Nienhuis & Mandema. 1964). 1979 wurde von Young *et al.* ein Antikeratin-Antikörper (AKA) beschrieben, der bei 58% (n=129) der Patienten mit RA nachgewiesen wurde (Young, *et al.* 1979). Auch in diesem Fall blieb unklar, welcher Teil des Keratins

als Antigen wirkt und in welchem Zusammenhang dieser Anti-Keratin-Antikörper zur Krankheitsentwicklung steht.

Schellekens *et al.* konnten 1998 schließlich eine Verbindung zwischen dem gehäuften Auftreten von AKA und APF nachweisen. In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Antikörper primär gegen Fillagrin gerichtet sind, was ebenfalls von keratinproduzierenden Zellen gebildet wird. Die Bindung der Antikörper erfolgt nur an eine citrullinierte Form des Fillagrins. Bei der Citrullinierung handelt es sich um eine von Peptidylarginin Deimasen (PAD) katalysierte posttranslationale Modifizierung von der Aminosäure Arginin zu Citrullin. Gegen dieses sekundär-modifizierte Protein kann es zum Bruch der Selbsttoleranz kommen. In einem ELISA mit verschiedenen synthetischen Peptiden, die Citrullin enthielten, konnten Antikörper im Serum von 76% der RA-Patienten (n=134) nachgewiesen werden. Als Referenzgruppe dienten hierbei 154 Seren von Patienten mit anderen rheumatischen Beschwerden (u.a. Spondylitis ankylosans, Sklerodermie, PsA). Zur Untersuchung der Spezifität wurden zusätzlich je 50 Seren von Patienten mit SLE, Sklerodermie, Dermatomyositis und dem Sjörgen-Syndrom hinzugezogen. Bei insgesamt 288 Proben zeigten die Antikörper eine Spezifität von 96% (Schellekens, *et al.* 1998), die deutlich über der des Rheumafaktors liegt.

Diagnostisch lassen sich diese Antikörper gegen citrullinierte Peptide (ACPA) nutzen, indem synthetische zyklisch citrullinierte Peptide (CCP) oder mutiertes citrulliniertes Vimentin (MCV) als Antigene verwendet werden.

Diagnostik

Die Diagnose erfolgt nach den gemeinsamen Kriterien des *American College of Rheumatology* (ACR) und der *European League Against Rheumatism* (EULAR) von 2010 (Aletaha, *et al.* 2010). Für diese Kriterien werden das Ausmaß und die Dauer der Gelenkbeteiligung, Rheumafaktor- und Anti-CCP-Serologie und ein Anstieg der laborchemischen Entzündungsmarker (BSG oder CRP) beurteilt. Für die Diagnose einer RA müssen mindestens sechs von zehn Punkten erreicht werden (Tabelle 3).

Arthritis mit Schwellung von min. 1 Gelenk			Punkte
A	Gelenkbeteiligung	1 großes Gelenk	0
		2-10 große Gelenke	1
		1-3 kleine Gelenke (mit oder ohne Beteiligung großer Gelenke)	2
		4-10 kleine Gelenke (mit oder ohne Beteiligung großer Gelenke)	3
		> 10 Gelenke (mindestens 1 kleines Gelenk)	5
B	Serologie	Rheumafaktor (RF) negativ und Anti-CCP negativ	0
		RF leicht positiv oder Anti-CCP leicht positiv	2
		RF hoch positiv oder Anti-CCP hoch positiv	3
C	Entzündungswerte	CRP und BSG normal	0
		CRP oder BSG auffällig	1
D	Symptombdauer	< 6 Wochen	0
		> 6 Wochen	1

Tabelle 3 Klassifikationskriterien der rheumatoiden Arthritis nach ACR und EULAR
(nach Aletaha, *et al.* 2010)

Therapie

Die Leitlinien der EULAR empfehlen bei Diagnosestellung einer RA eine unmittelbare Therapie mit DMARDs. Medikament der ersten Wahl ist vorzugsweise niedrigdosiertes Methotrexat subcutan mit Folsäuregabe am Folgetag als Mono- oder Kombinationstherapie mit einem anderen DMARD. Bei Kontraindikationen oder Intoleranz für Methotrexat können stattdessen Leflunomid, Sulfasalazin oder Gold verwendet werden. Kontraindikationen sind chronische Infektionen, Leber- und Nierenfunktionsstörungen und Störungen der Hämatopoese. Glukokortikoide in Kombination mit DMARDs sollten nur kurzfristig eingesetzt werden und bei Symptomverbesserung ein Ausschleichversuch bis unterhalb der Cushing-Schwelle (<7,5 mg Prednisolon-Äquivalent) unternommen werden. Bei mangelndem Ansprechen auf eine DMARD-Therapie kann entweder ein anderes DMARD oder ein Biological ausgewählt werden. Bei schlechten

Prognosekriterien ist ein Biological zu bevorzugen. Schlechte Prognosekriterien sind das Vorkommen von Autoantikörpern wie Rheumafaktor und Anti-CCP, eine hohe Krankheitsaktivität, erhöhte Entzündungswerte und ein frühes Auftreten von erosiven Veränderungen. Patienten, die nicht auf Methotrexat oder andere DMARDs ansprechen, sollten mit einem TNF- α -Blocker wie Etanercept, Infliximab etc. in Kombination mit Methotrexat behandelt werden. Alternativ ist die Monotherapie mit dem Interleukin-6-Rezeptor-Antikörper Tocilizumab zugelassen. Falls Patienten nicht auf eine TNF- α -Blocker-Therapie ansprechen, sollte ein anderer TNF- α -Blocker oder der B-Zell-depletierende monoklonale Anti-CD20-Antikörper Rituximab verwendet werden. Bei sehr starkem Befall und Kontraindikation für Biologicals und kann auf Azathioprin oder Cyclosporin A zurückgegriffen werden (Smolen, *et al.* 2010).

2.9 TNF- α -Aktivierung bei der rheumatoiden Arthritis

Grundlage der Pathophysiologie der RA ist eine Typ III und Typ IV-Immunreaktion nach Coombs und Gell. Bei der Typ III-Reaktion kommt es zur Bildung von Immunkomplexen durch Autoantikörper wie den Rheumafaktor und Anti-CCP. Da diese Autoantikörper von B-Zellen gebildet werden, wird diese Theorie vereinfacht auch als B-Zell-Ansatz bezeichnet. Bei der Typ IV-Immunreaktion findet eine T-Effektor-Zell vermittelte Immunreaktion statt. Durch ein unbekanntes Antigen entsteht eine Gelenkentzündung, die schließlich zur Zerstörung des Gelenkapparates führt (Murphy. 2011). In beiden Fällen wird die Entzündungsreaktion durch TNF- α -Freisetzung und andere proinflammatorische Zytokine initiiert.

So wie bei der Psoriasis und bei der PsA spielen Th17-Zellen auch bei der RA eine wichtige Rolle. Sie sezernieren Interleukin 17A, welches zusammen mit TNF- α die Aktivierung von Fibroblasten und Chondrozyten stimuliert. Regulatorische T-Zellen (Tregs), die im Synovium von Patienten mit RA nachgewiesen wurden, zeigen eine Funktionsminderung im Vergleich zu Tregs im peripheren Blut (Behrens, *et al.* 2007).

Die Gelenkhautentzündung (Synovitis) wird durch neutrophile Granulozyten und insbesondere Makrophagen vermittelt. Diese tragen durch Freisetzung von

proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , Interleukin-1, Interleukin-6, Interleukin-23 und Antigenpräsentation zur lokalen Entzündungsreaktion bei. Nach erfolgreicher Therapie mit Biologicals konnte eine reduzierte Makrophageninfiltration im Synovium festgestellt werden (Haringman, *et al.* 2005). Neutrophile Granulozyten verstärken die Entzündung durch Bildung und Freisetzung von Prostaglandinen, Proteinase und reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) (Cascao, *et al.* 2010).

Ein zentrales proinflammatorisches Zytokin ist TNF- α , welches zahlreiche Funktionen in der Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion besitzt. Es verstärkt die Gefäßpermeabilität und führt zu einer gesteigerten Angiogenese durch Steigerung der Sensitivität der Endothelzellen für den Vascular endothelial growth factor (VEGF) (Clauss, *et al.* 2001). Durch TNF- α wird die T-Zell-Rezeptor-Signalkaskade abgeschwächt (Isomaki, *et al.* 2001) und die Funktionsfähigkeit und Anzahl der Tregs negativ beeinflusst (McDevitt, *et al.* 2002, Yang, *et al.* 1994). Zusätzlich trägt es durch Expressionsinduktion von IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-18, IFN γ , TGF β , Leukotrienen, Prostaglandinen und akute-Phase-Proteinen zur Aufrechterhaltung der Entzündung bei (Schottelius, *et al.* 2004). Durch Aktivierung der Inhibitor-of-kappaB-Kinasen (IKK) und gesteigertem Abbau von Inhibitor of kappaB (I- κ B), kommt es außerdem zu einer erhöhten nukleären Konzentration von NF- κ B und konsekutiv zur Ausschüttung von Zytokinen wie TNF- α , IL-6 und IL-8 (Gottlieb. 2001).

1994 untersuchten Elliott *et al.* erstmals die Wirkung eines monoklonalen TNF- α -Antikörpers namens cA2 auf die RA. Das Ergebnis zeigte eine signifikante Verbesserung der Symptomatik im Vergleich zu Patienten, die ein Placebo erhalten hatten (Elliott, *et al.* 1994). Seitdem spielen TNF- α -Blocker eine zentrale Rolle in der Therapie der auf DMARDs therapierefraktären RA. Trotzdem profitieren nicht alle Patienten von dieser Therapie, was vermuten lässt, dass es verschiedene pathogenetische Subtypen der RA gibt.

2.10 B-Zell-Aktivierung bei der rheumatoiden Arthritis

Der monoklonale Anti-CD20-Antikörper Rituximab, der für die Therapie maligner B-Non-Hodgkin-Lymphome entwickelt wurde, ist seit 2006 auch für die therapierefraktäre RA in Deutschland zugelassen. In einer Studie von Cohen *et al.* mit 520 Patienten, die zuvor ungenügendes Ansprechen auf eine TNF- α -Blocker-Therapie gezeigt hatten, konnte eine signifikante Symptomverbesserung im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Experimentalgruppe erhielt Rituximab in Kombination mit MTX. Die Kontrollgruppe erhielt Placebo und MTX (Cohen, *et al.* 2006). Die Wirksamkeit von Rituximab spricht für eine entscheidende Rolle der B-Zellen bei der Pathogenese der RA. Allerdings lässt sie sich nicht nur auf die Autoantikörperbildung reduzieren, da sich die Behandlung nur mäßig auf die Autoantikörperspiegel auswirkt (Edwards, *et al.* 2004, McInnes & Schett. 2011). Die Serum-Konzentrationen von RF und ACCP ändern sich nicht signifikant unter Rituximabtherapie. So könnte der therapeutische Effekt von Rituximab auch durch eine verminderte Autoantigen-Präsentation und Zytokinproduktion durch B-Zellen vermittelt sein.

2.11 Fragestellung

Die PsA gilt seit ihrer Erstbeschreibung als seronegative Erkrankung, bei der keine Rheumafaktoren oder andere Autoantikörper nachgewiesen werden konnten. Das Vorkommen von PGRN-Autoantikörpern bei seronegativen Arthritiden (Thurner, *et al.* 2012) veranlasste daher zu der Fragestellung, ob diese Autoantikörper auch bei der PsA nachgewiesen werden können. In Screeninguntersuchungen mit Seren von Patienten mit unterschiedlichen chronisch entzündlichen Erkrankungen zeigte sich ein gehäuftes Auftreten von PGRN-Autoantikörpern bei Patienten mit PsA. Da fast alle Patienten vor Ausbruch der PsA schon jahrelang an Psoriasis leiden, stellte sich die Frage, ob PGRN-Autoantikörper auch schon bei Patienten ohne Gelenkbefall nachzuweisen sind oder womöglich erst bei fortgeschrittenem Krankheitsbild mit Arthritis auftreten.

Daher sollte neben dem Vorkommen von PGRN-Autoantikörpern bei der PsA auch die Häufigkeit bei der Psoriasis ohne Gelenkbeteiligung und einer gesunden

Kontrollgruppe untersucht werden. PGRN-Autoantikörper zeigten bei systemischen Vaskulitiden einen neutralisierenden Effekt auf den PGRN-Plasmaspiegel. Dieser neutralisierende Effekt sollte in dieser Arbeit bei der PsA und RA überprüft werden. Ein möglicher proinflammatorischer Effekt von neutralisierenden PGRN-Autoantikörpern sollte mittels TNF- α induzierten Zytotoxizitätsassays untersucht werden. Die 2011 von Tang *et al.* erstmals beschriebene Bindung von PGRN an den TNF-Rezeptoren 1 und 2 (Tang, *et al.* 2011) , die 2013 von Chen *et al.* und Etemadi *et al.* in Frage gestellt wurde (Chen, *et al.* 2013, Etemadi, *et al.* 2013) sollte ebenfalls funktionell in TNF- α -induzierten Zytotoxizitätsassays mit Seren von PGRN-Autoantikörper-negativen und –positiven Patienten untersucht werden.

Außerdem sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der Prävalenz der PGRN-Autoantikörper und jeweiligen klinischen Charakteristika geprüft werden. Ein niedriger PGRN-Plasmaspiegel könnte auch durch einen verstärkten Abbau erklärt werden. SLPI und Serpin B1 verhindern als Inhibitoren der neutrophilen Elastase und der Proteinase 3 den Abbau von PGRN. Eine weitere Frage dieser Doktorarbeit war daher die Untersuchung von SLPI und Serpin B als mögliche Kandidatenautoantigene bei der PsA und der RA.

Zusätzlich stellte sich die Frage, ob das Vorkommen der PGRN-Autoantikörper bei der RA bei einer größeren Fallzahl (zuvor n=44) bestätigt werden kann und inwiefern sich die Prävalenz bei der RA und PsA unterscheidet.

Darüber hinaus sollte das mögliche Vorkommen von FTH-Autoantikörpern bei der PsA untersucht werden. Mewar *et al.* konnten diese bei der RA nachweisen und von Baerlacken *et al.* beschrieben kürzlich das spezifische Auftreten von hochtitrigen Autoantikörpern gegen den N-Terminus des FTH bei der aktiven Riesenzellarteritis. (Baerlecken, *et al.* 2012, Mewar, *et al.* 2005).

3 Material und Methodik

3.1 Laborgeräte

ELISA-Platte, 96-Well (NUNC Maxisorp F) Langenseebold

ELISA-Lesegerät Victor² 1420 Multilabel Counter Wallac, Freiburg

Gefrierschrank -80° C Nunc, Wiesbaden

Gefrierschrank -20° C Liebherr, Stuttgart

Kühlschrank 4° C Bosch, Stuttgart

Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl Eppendorf, Hamburg

Zentrifugen 5415 R Eppendorf, Hamburg 23

3.2 Verbrauchsmaterialien

3.2.1 Molekularbiologische Materialien

Aqua dest.	Merck, Darmstadt
Dinatriumphosphat	Merck, Darmstadt
Zitronensäure	Merck, Darmstadt
Gelatine	Merck, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Molkerei Hochwald
NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
OPD	Sigma, St. Louis (USA)
Streptavidin Peroxidase	Roche, Mannheim
Triton X-100	Merck, Darmstadt
TRIS	Roth, Karlsruhe
Trizma Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe

3.2.2 Materialien der Zellkultur und der Expressionssysteme

FLAG-tagged-PGRN (vom Labor zur Verfügung gestellt)

FLAG-tagged-FTH1 (vom Labor zur Verfügung gestellt)

FLAG-tagged-Serpin B1 (vom Labor zur Verfügung gestellt)

FLAG-tagged-SLPI	(vom Labor zur Verfügung gestellt)
Zytotoxizitätsassay	(EZ4U, Biomedica)
WEHI-S-Zelllinie	(vom Labor zur Verfügung gestellt)
HT 1080-Zelllinie	(vom Labor zur Verfügung gestellt)

3.2.3 Immunologische und proteinchemische Materialien

Ziegen anti-human-IgG Antikörper	(Dianova, Hamburg)
Maus anti-FLAG Antikörper	(Sigma, München)
Schaf subklassenspezifisches anti-human-IgG1	(Binding Site, UK)
Schaf subklassenspezifisches anti-human-IgG2	(Binding Site, UK)
Schaf subklassenspezifisches anti-human-IgG3	(Binding Site, UK)
Schaf subklassenspezifisches anti-human-IgG4	(Binding Site, UK)

3.2.4 Lösungen und Medien

POX-OPD-Entwickler (10 ml)

Lösung A: 0,2 M Dinatriumphosphat *2 H₂O 3,56 g in 100 ml aqua dest

Lösung B: 0,1 M Citronensäure * 1 H₂O 2,1 g in 100 ml aqua dest

2,5 ml Lösung A + 2,5 ml Lösung B + 5 ml aqua dest. + 1 Tablette OPD + 5 µl
H₂O₂ (30%)

TBS (tris buffered Saline)

8,76 g NaCl

6,05 g TRIZMA Hydrochlorid

1,4 g TRIS

Ad 1 l aqua dest

TBS-Tx

TBS + 0,1% Tx 100

Zugabe von 1 ml Tx 100

Coating Puffer (5 ml)

A: 2,12 g NaCO₃ ad 100 ml aqua dest

B: 1,68 g NaHCO₃ ad 100 ml aqua dest

1,7 ml A + 0,8 ml B + 7,5 ml aqua dest

3.3 Methodik

3.3.1 Auswahl der Kandidatenantigene und deren Expression in eukaryotem HEK293 Expressionssystem

In Vorarbeiten wurden mithilfe eines modifizierten SEREX-Verfahrens (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) (Sahin, *et al.* 1995) Seren auf high-density Protein Macroarrays mit Klonen der hEX und UniPex cDNA Expressionsbibliotheken (Bioscience, Dublin, Irland) inkubiert. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Um mögliche unspezifische Bindungsstellen zu Komponenten des bakteriellen Expressionssystems zu verhindern, wurden die verdünnten Seren mit 1 ml Matrix-gebundenen E.coli-Lysaten zweifach über Nacht bei 4° C präabsorbiert. Bei dem E.coli-Lysat handelte es sich um einen Expressionsklon von SLP-2, der auch auf dem Proteinarray vertreten ist. Rekombinantes PGRN wurde auf dem oben genannten Macroarray als Kandidatenantigen identifiziert, c-terminal FLAG-getaggtes PGRN wurde mittels Liposomentransfektion in HEK 293 Zelllinie transfiziert. Darauf folgte Expression, Lyse und anschließend die Expressionsüberprüfung im Western Blot mittels Flag-Antikörpern. Das Lysat konnte in einer Konzentration von 10µg/ml für die ELISA-Untersuchungen verwendet werden.

3.3.2 Patienten

Es wurden insgesamt 516 Seren von Patienten mit PsA, Psoriasis, SAPHO-Syndrom und RA untersucht. Die Proben der Patienten mit PsA und SAPHO-Syndrom wurden prospektiv zwischen Oktober 2011 und Juli 2012 in der rheumatologischen Ambulanz der Universitätsklinik des Saarlandes, in der rheumatologischen Ambulanz der Universitätsklinik Frankfurt und in einer

rheumatologischen Ambulanz in Berlin-Lichtenberg gesammelt. Die Proben der Patienten mit Psoriasis und RA wurden von der Klinik für Innere Medizin I und der Klinik für Dermatologie der Universitätsklinik des Saarlandes zur Verfügung gestellt. Alle Proben wurden im Rahmen von diagnostischen Blutentnahmen entnommen und bei -20°C aufbewahrt. Die Patienten mit PsA erhielten diese Diagnose von Rheumatologen nach den CASPAR-Kriterien. Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Ärztkammer des Saarlandes genehmigt (Ethikantrag Nr. 242/11). Die Kontrollgruppe bestand aus Seren von gesunden Personen. Zusätzlich wurden Seren von Patienten mit Adipositas, Seren von Bewohnern eines Altersheims ohne akute Erkrankungen, Patienten mit durchgemachter Sepsis und Patienten mit Melanom untersucht.

3.3.3 Immunologische und proteinchemische Methodik

3.3.3.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein Nachweisverfahren, bei dem das Vorhandensein eines bestimmten Moleküls indirekt durch Antikörperbindung nachgewiesen wird. Durch Kopplung eines Enzyms an den Detektionsantikörper und die darauffolgend katalysierte Reaktion kann das Vorhandensein des gesuchten Stoffes über das entstehende Produkt nachgewiesen werden. Der Antikörper wird an eine Mikrotiterplatte gebunden und mit der Probe inkubiert. Ist das gesuchte Antigen in der Probe enthalten, so bindet es an den Antikörper auf der Platte und lässt sich in weiteren Schritten durch einen Detektionsantikörper und ein Reporterenzym nachweisen.

Der ELISA wurde 1971 von Perlmann und Engvall (Engvall & Perlmann. 1971) in Schweden und von Schuurs und Weemen (Van Weemen & Schuurs. 1971) in den Niederlanden erstmals beschrieben, und löste den Radioimmunassay (RIA) ab, ein Verfahren das zur quantitativen Bestimmung von Substanzen radioaktiv gekennzeichnete Antigene oder Antikörper verwendet und von Yalow und Berson 1960 erstmals beschrieben wurde (Yalow & Berson. 1960). Vorteil des ELISAs ist die nicht benötigte radioaktive Kennzeichnung, wodurch die Durchführung im Vergleich zum RIA deutlich erleichtert wird.

3.3.3.2 Sandwich- ELISA

Uotila *et al.* beschrieben 1981 erstmals ein Verfahren, bei dem ein Coating-Antikörper und ein Detektionsantikörper verwendet wurden, die das gesuchte Antigen von zwei Seiten binden. Diese Antikörper binden an verschiedene Epitope, so dass sie nicht um eine Bindungsstelle konkurrieren. Der Sandwich-ELISA ermöglicht eine bessere Antigenpräsentation, wodurch eine höhere Spezifität erreicht werden kann (Uotila, *et al.* 1981).

Durchführung des Progranulin- Autoantikörper- ELISA

Als coat wurde jedes Well mit 50 µl murinem anti-FLAG mAb (Sigma, München) in einer Verdünnung von 1:2500 mit dem Coating Puffer bei 4°C über Nacht inkubiert. Um unspezifische Bindungen an freien Proteinbindestellen zu blocken, wurde jedem Well 100 µl 1,5% (w/v) Gelatine in TBS für eine Stunde bei Raumtemperatur hinzugegeben. Im nächsten Schritt wurden 50 µl C-terminal FLAG-getaggttes rekombinantes humanes PGRN (10 µg/ml) hinzugegeben. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Platte mit TBS-Puffer dreifach gewaschen.

Die Seren der Patienten wurden jeweils 1:100 in TBS verdünnt und davon jeweils 50 µl pro Well auf die Platte pipettiert, wobei pro Serum immer zwei benachbarte Wells gewählt wurden. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde erneut dreifach mit TBS-Tx gewaschen.

Im nächsten Schritt wurde jedem Well je 50 µl biotinylierte Ziegen anti-human-IgG-Antikörper (Dianova, Hamburg) (Verdünnung 1:2500) als Detektionsantikörper hinzugefügt. Nach einer Stunde wurde erneut mit TBS gewaschen. Als Reporterenzym diente mit Streptavidin gelabelte Peroxidase, welche mittels Streptavidin eine hochaffine Bindung mit dem Biotin des Detektionsantikörpers eingeht. 50 µl Streptavidin-POX in einer Verdünnung von 1: 50000 wurden pro Well hinzupipettiert. Nach 10 Minuten wurde die Strep-Pox verworfen und erneut dreifach mit TBS gewaschen.

Daraufhin wurde jedes Well mit 100 µl O-Phenyl-Diamin (OPD) versehen. OPD löst als Substrat der Peroxidase eine Farbreaktion aus. Bei positiven Proben kommt es zu einem Farbumschlag von transparent zu gelb. Diese Farbreaktion wurde mit 20 µl 3M HCl pro Well abgestoppt. Die Messung der Absorption erfolgte photometrisch im ELISA-Lesegerät (Victor 2, Wallac, Freiburg) bei 490

nm. Eine Probe galt als positiv, wenn der gemessene Wert höher war als der dreifache Wert der Standardabweichung der Negativproben.

Ferritin-heavy chain- Autoantikörper-ELISA

Der Nachweis von Autoantikörpern gegen Ferritin heavy chain (FTH1) wurde durch einen ELISA mit FTH1-Volllänge und einen ELISA mit FTH1-27aa analog zum PGRN-ELISA durchgeführt. Statt C-Terminal FLAG-getaggetem PGRN wurde C-Terminal FLAG-getaggetes Volllänge-FTH bzw. C-Terminal FLAG-getaggetes FTH-27aa verwendet.

Secretory leukocyte protease inhibitor- Autoantikörper-ELISA

Das Vorkommen von Autoantikörpern gegen SLPI wurde ebenfalls mithilfe eines Sandwich-ELISAs untersucht. Es wurde C-terminal FLAG-getaggetes SLPI verwendet.

Serpin B1- Autoantikörper-ELISA

Die Suche nach Serpin-B1-Autoantikörpern erfolgte ebenfalls analog zum PGRN-ELISA mit einem Sandwich-ELISA. Es wurde C-terminal FLAG-getaggetes Serpin B1 verwendet.

ELISA zur Bestimmung der IgG-Subklassen

Der Elisa erfolgte analog zum PGRN-Antikörper-ELISA, jedoch wurden biotinylierte subklassen-spezifische Anti-humane IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 von Schafen in einer Verdünnung von 1:5000 als Detektionsantikörper verwendet.

3.3.3.3 ELISA zur Bestimmung des relativen Progranulin-Plasmaspiegels

Die Plasmakonzentration von PGRN wurde mit einem kommerziell erhältlichen ELISA Kit (AdipoGen, South Korea) nach Anweisungen des Herstellers bestimmt.

Durchführung:

100 µl Startlösung wurden in die jeweiligen Wells in zweifacher Ausführung zur Doppelbestimmung pipettiert. Dazu wurden jeweils 100 µl verdünntes Serum

(1:200) hinzugefügt und die abgedeckten Platten für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Nach einer Stunde wurde der Inhalt des Wells verworfen und 300 µl Waschpuffer hinzugefügt und verworfen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt.

Daraufhin wurden 100 µl der vorverdünnten biotinylierten Detektionsantikörperlösung in jedes Well zupipettiert und die Platten abgedeckt bei 37°C für 1 Stunde inkubiert.

Nach einem erneuten Waschschrift wurden 100 µl verdünnter Detektor (Peroxidase gelabeltes Streptavidin) hineingegeben und die Platte abgedeckt bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Daraufhin wurde die Platte fünffach gewaschen (siehe oben).

Jedem Well wurden 100 µl Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat Lösung hinzugefügt, wodurch die Peroxidaseaktivität quantifiziert werden kann. Innerhalb von ca. 10 Minuten trat eine Farbreaktion ein, die durch die Gabe von 100 µl Stop-Lösung terminiert wurde. Es erfolgte die Messung bei 450 nm mit dem Photometer (Wallac, Freiburg), die direkt proportional zur Konzentration von PGRN ist. Der Medianwert der Konzentration der gesunden Kontrollgruppe wurde als 100% gesetzt.

3.3.3.4 Zytotoxizitätsassay

Ein nicht-radioaktiver TNF- α -induzierter Zytotoxizitätsassay (EZ4U, Biomedica) wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt, wofür die hoch-TNF- α -sensitive murine Fibrosarkom-Zelllinie WEHI-S als Ziel-Zelllinie verwendet wurde. 1986 konnte die hohe Sensitivität dieser Zelllinie gegenüber TNF- α nachgewiesen werden (Espevik & Nissen-Meyer. 1986). Der EZ4U Assay beruht auf dem Nachweis der Reduktion von Tetrazolium in Formazan, die durch Mitochondrien erfolgt und dementsprechend nur von lebenden Zellen durchgeführt werden kann. Der Farbumschlag des fast farblosen Tetrazoliums in das rote Formazan bietet daher den Nachweis für die Zellvitalität.

Die Interaktion von humanem rekombianten PGRN mit murinen TNFR1&2 *in vivo* und *in vitro* wurde bereits von Tang *et al.* demonstriert (Tang, *et al.* 2011). Als humane Kontroll-Zelllinie wurde die humane TNF- α -sensitive HT-1080 Fibrosarkom Zelllinie verwendet.

4×10^4 WEHI-S Zellen oder respektive 4×10^4 HT-1080 Zellen wurden in 200 μ l Medium ausgesät und bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert.

Um mögliche Differenzen zwischen Seren von PsA-Patienten mit und ohne PGRN-Autoantikörpern, Patienten mit Psoriasis und gesunden Kontrollpersonen festzustellen, wurde das Serum eines PGRN-Autoantikörper-positiven Patienten mit PsA, das Serum eines PGRN-Autoantikörper-negativen Patienten mit PsA, das Serum eines Patienten mit Psoriasis und das Serum einer gesunden Kontrollperson verwendet. Seren von Patienten, die eine TNF-Blocker-Therapie oder andere Biologika erhielten wurden zuvor ausgeschlossen.

Die genannten Seren wurden in Verdünnungsstufen von 1:4 bis 1:512 zu kultivierten WEHI-S- und HT1080-Zellen hinzugegeben. Daraufhin folgte die Zugabe von TNF- α (100 pg/ml).

WEHI-S- und HT1080-Zellen ohne Zugabe von TNF- α und Serum wurden als negative Kontrollen, Zellen mit alleiniger Zugabe von TNF- α (100 pg/ml) wurden als positive Kontrollen verwendet. Nach 24 h Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO₂ wurden 20 μ l Chromophor Substat pro Well hinzugegeben. Der Farbumschlag entsteht, wenn das darin enthaltende Tetrazolium zu Formazan reduziert wird, dieser Vorgang kann nur in lebenden Zellen erfolgen. Die Adsorption wurde bei einer OD von 450 nm gemessen.

3.3.4 Statistik

Die Unterschiede in Geschlecht und Alter bei den PsA- und Psoriasispatienten sowie bei den gesunden Kontrollen wurden mit dem t-Test berechnet. Das Vorkommen von PGRN-Autoantikörpern bei Patienten mit PsA und Psoriasis ohne Gelenkbeteiligung wurde mit dem Chi-Quadrat-Test untersucht. Ebenso das Vorkommen der Autoantikörper nach Einteilung der PsA- und RA-Patienten in Subgruppen. Die Analyse der unterschiedlichen PGRN-Plasmaspiegel erfolgte mithilfe des Mann-Whitney-Tests. Ein Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Alle statistischen Untersuchungen erfolgten mit SPSS 19.0 für Windows.

4 Ergebnisse

4.1 Progranulin-Autoantikörper-ELISA bei der Psoriasisarthropathie

260 Proben von Patienten mit PsA wurden getestet. Davon waren 50 (19,23%) seropositiv für PGRN-Autoantikörper. In dieser Patientenkohorte befanden sich 136 weibliche und 105 männliche Patienten (Geschlecht unbekannt: 19). Das mediane Alter betrug 54 Jahre (Minimum: 24; Maximum: 81; Anzahl Alter unbekannt: 22). Die Erstdiagnose (ED) der Psoriasis vulgaris erfolgte median im 35. Lebensjahr (Anzahl Alter bei ED unbekannt: 48). Die Erstdiagnose der PsA erfolgte median im 46. Lebensjahr (Anzahl Alter bei ED PsA unbekannt: 26). Acht Patienten litten unter einer PsA ohne Hautbeteiligung (Psoriasisarthritis sine psoriase).

Die PsA-Patienten zeigten folgende labordiagnostische Charakteristika:

Rheumafaktor	7,8 % positiv (4/51)	unbekannt: 209
HLA B27	32,7% positiv (36/110)	unbekannt: 150

Tabelle 4: Labordiagnostische Charakteristika Psoriasisarthropathie-Patienten

Vier von 51 getesteten Patienten waren positiv für den Rheumafaktor. Ein gleichzeitiges Auftreten des Rheumafaktors und von PGRN-Autoantikörpern konnte nicht nachgewiesen werden.

36 von 110 getesteten Patienten waren positiv für HLA-B27. Unter diesen 36 Patienten waren 6 Patienten seropositiv für den PGRN-Autoantikörper (6/36; 16,66%).

Erosiver Befall	44,91% positiv (106 /236)	unbekannt:24
Enthesitis	39,26% positiv (75/191)	unbekannt: 69
Daktylitis	37,67% positiv (55/146)	unbekannt: 114
Axiale Beteiligung	27,45% positiv (56/204)	unbekannt: 56

Tabelle 5: Klinische Befallsarten Psoriasisarthropathie-Patienten

Die PsA-Patienten zeigten die in Tabelle 5 dargestellten Befallsarten.

<i>Therapiemodus</i>	<i>Anzahl der Patienten</i>
DMARDs Monotherapie	127
DMARDs Kombination	21
Biologicals	26
Biologicals + DMARDs	22
Andere	36
Unbekannt	28

Tabelle 6: Medikation Psoriasisarthropathie-Patienten

Abk.: DMARDs : disease modifying antirheumatic drugs

Die getesteten Patienten wurden je nach Therapiemodus in verschiedene Subgruppen eingeteilt (Tabelle 6).

Die Assoziation der PGRN-Autoantikörper mit den Charakteristika der Subgruppen wurde statistisch berechnet. Es konnte kein Unterschied zwischen PGRN-Autoantikörper-positiven und –negativen Patienten hinsichtlich des Alters der Erstmanifestation festgestellt werden, jedoch waren die seropositiven Patienten älter als die seronegativen Patienten (21% älter als 50 Jahre vgl. 15,4% älter als 50 Jahre; $p=0,016$). Bei PsA-Patienten mit Enthesitis oder Daktylitis traten PGRN-Autoantikörper signifikant häufiger auf ($p=0,001$; $p=0,002$) als bei Patienten ohne diese Befallsarten. Ein statistisch signifikanter Unterschied des Auftretens von PGRN-Autoantikörpern zwischen Patienten mit oder ohne axialen Befall konnte nicht festgestellt werden.

Hinsichtlich der Therapieformen konnte ein signifikant gehäuftes Auftreten von PGRN-Autoantikörpern bei TNF-Blocker-Therapie festgestellt werden (20,8% TNF-Blocker, 17,4% keine TNF- Blocker, $p=0,020$) (Abbildung 1).

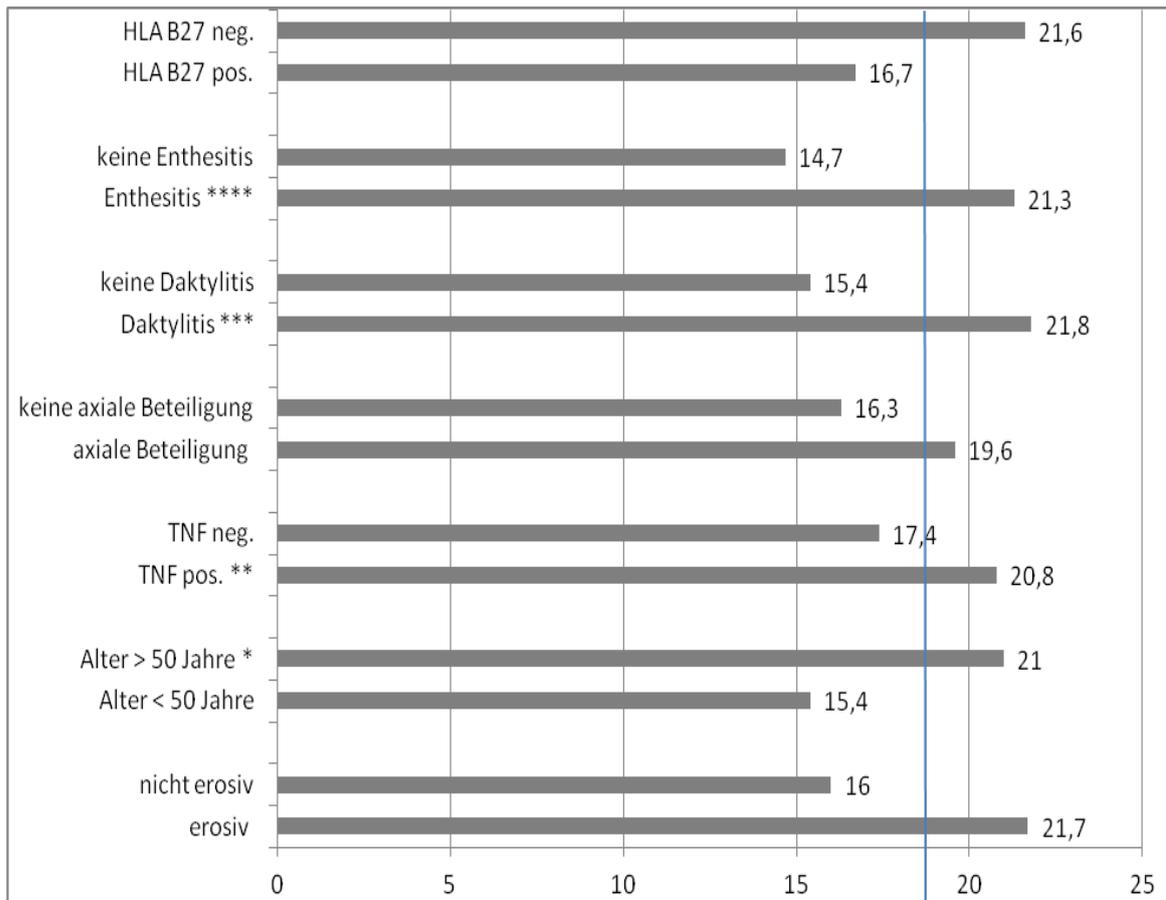


Abbildung 1: Subgruppenanalyse der Psoriasisarthropathie-Patienten Die Abbildung zeigt die prozentuale Verteilung der PGRN-Autoantikörper-positiven Patienten in den unterschiedlichen Subgruppen der PsA-Patienten. * $p=0,016$; ** $p=0,020$; *** $p=0,002$; **** $p=0,001$. Die Trendlinie kennzeichnet das durchschnittliche Vorkommen von PGRN-Autoantikörpern bei 19,23% der getesteten PsA-Patienten.

Abk.: PsA: Psoriasisarthropathie; TNF neg/pos: Patienten ohne/mit anti-TNF- α -Therapie; PGRN-AK: Progranulin-Autoantikörper

Verglichen mit Psoriasis-Patienten ohne Gelenkbeteiligung und gesunden Kontrollen zeigten PsA-Patienten ein hoch signifikant häufigeres Vorkommen von PGRN-Autoantikörpern (Abbildung 2).

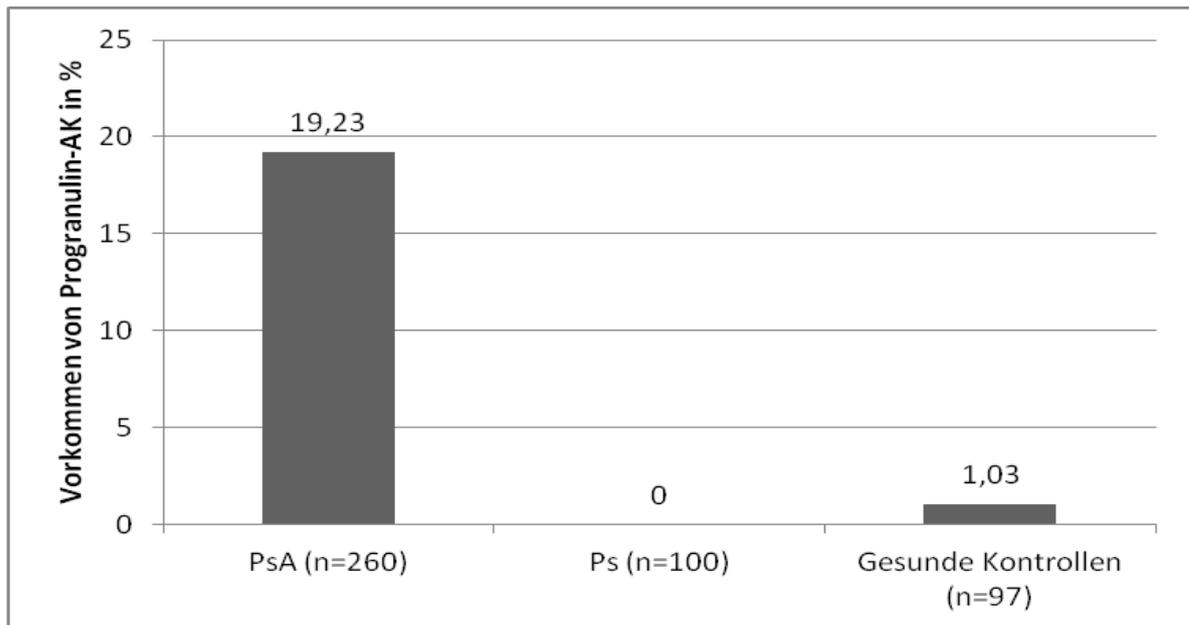


Abbildung 2: Vorkommen von Progranulin-Autoantikörpern bei Psoriasisarthropathie, Psoriasis ohne Gelenkbeteiligung und gesunden Kontrollpersonen
 Die Abbildung zeigt die Häufigkeit von PGRN-Autoantikörpern bei der PsA im Vergleich zur Psoriasis ohne Gelenkbeteiligung und zur gesunden Kontrollgruppe ($p=0,00001$) (Turner, et al. 2013)

Abk.: PsA: Psoriasisarthropathie; Ps: Psoriasis vulgaris

4.2 Immunglobulin-Klassen mit Immunglobulin-Subklassen bei der Psoriasisarthropathie

Die PGRN-Autoantikörper enthaltenden Seren wurden auf ihre Immunglobulinklasse untersucht. Die PGRN-Autoantikörper aller 50 seropositiven Proben waren IgG-Antikörper (50/50). Daraufhin wurden die Autoantikörper auf ihre IgG-Subklassen untersucht. Bei 44 von 50 Proben (88%) handelte es sich um Antikörper der IgG1-Subklasse, eine Probe von 50 (2%) enthielt Antikörper der IgG2-Subklasse. Bei 5/50 (10%) handelte es sich um Antikörper der IgG3-Subklasse und kein Serum enthielt PGRN-Autoantikörper der Subklasse IgG4 (0%).

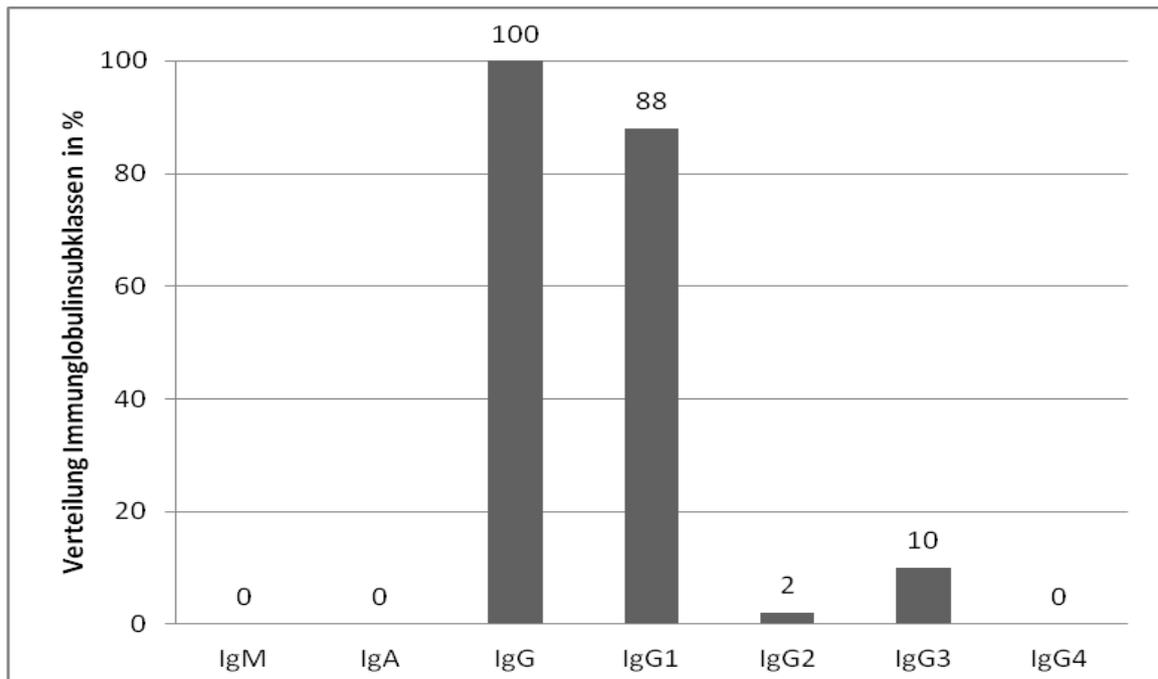


Abbildung 3: Ig-Klassen und IgG-Subklassen der Progranulin-Autoantikörper bei Psoriasisarthropathie-Patienten Das Diagramm zeigt die jeweiligen Immunglobulinklassen und –subklassen von IgG der untersuchten PGRN-Autoantikörper.

Abk.: Ig: Immunglobulin; PGRN: Progranulin

4.3 Plasmakonzentration von Progranulin

Die Plasmakonzentration von PGRN wurde mit einem kommerziell erhältlichen ELISA gemessen. Das Ergebnis zeigte eine deutliche Reduktion des Plasmalevels von PGRN bei Patienten mit PsA (n=10), die Autoantikörper gegen PGRN besitzen im Vergleich zu Patienten mit PsA (n=10) ohne diese Autoantikörper (Mann-Whitney Test: $p=0,001$; Abb.4 x_1). Auch im Vergleich zu Patienten mit Psoriasis ohne Gelenkbeteiligung (n=10) (Mann-Whitney Test: $p<0,001$, Abb.4 x_2) und im Vergleich zu gesunden Kontrollen (n=10) (Mann-Whitney Test: $p<0,001$; Abb.4 x_3) zeigte sich eine deutliche Reduktion. PsA-Patienten ohne PGRN-Autontikörper zeigten eine tendenziell niedrigere Plasmakonzentration als Psoriasispatienten ohne Gelenkbeteiligung (Mann-Whitney Test: $p=0,055$; Abb.4 x_4) und gesunde Kontrollen (Mann-Whitney Test: $p=0,019$; Abb.4 x_5).

PGRN-Autoantikörper-positive Patienten mit RA hatten eine signifikant niedrigere Plasmakonzentration im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ($p<0,001$; Abb.4 x_6) und Patienten mit RA ohne PGRN-Autoantikörper ($p=0,001$; Abb.4 x_7). Der

Median der PGRN-Plasmakonzentration gesunder Kontrollpersonen wurde als 100%-Wert festgelegt.

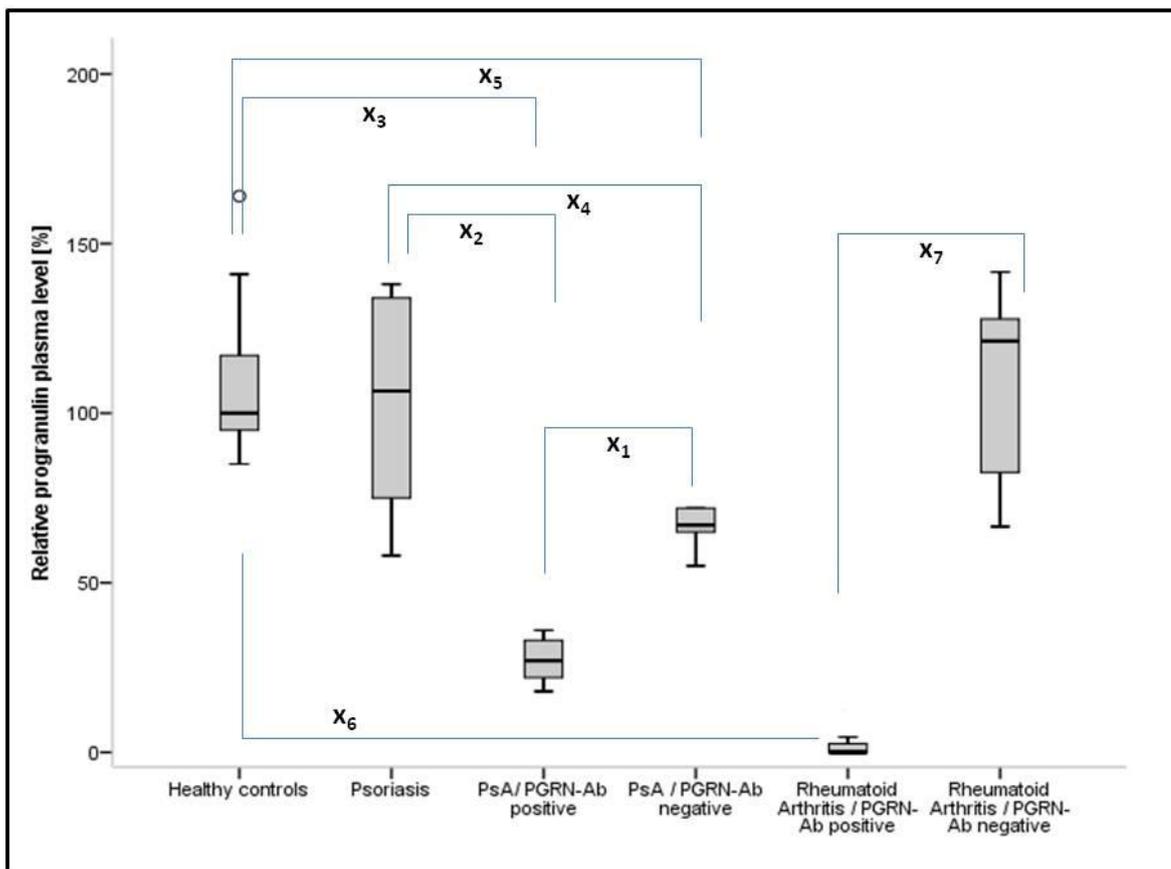


Abbildung 4: Progranulin-Plasmakonzentration gesunder Kontrollpersonen und von Patienten mit Psoriasis, Psoriasisarthropathie und rheumatoider Arthritis Die Abbildung zeigt die unterschiedliche PGRN-Plasmakonzentration der untersuchten Gruppen. PGRN-Autoantikörper-positive Patienten mit PsA oder RA zeigen eine deutlich niedrigere Plasmakonzentration als die Vergleichsgruppen. Beachtlich ist außerdem die vergleichsweise niedrige Plasmakonzentration bei PsA-Patienten, die keine PGRN-Autoantikörper besitzen.

Abk.: PGRN: Progranulin; PsA: Psoriasisarthropathie; RA: rheumatoide Arthritis; Ab: Antibody/Antikörper

- x₁: PsA PGRN-Autoantikörper positiv zu PsA PGRN-Autoantikörper negativ
- x₂: PsA PGRN-Autoantikörper positiv zu Psoriasis ohne Gelenkbeteiligung
- x₃: PsA PGRN-Autoantikörper positiv zu gesunden Kontrollen
- x₄: PsA PGRN-Autoantikörper negativ zu Psoriasis ohne Gelenkbeteiligung
- x₅: PsA PGRN-Autoantikörper negativ zu gesunden Kontrollen
- x₆: RA PGRN-Autoantikörper positiv zu gesunden Kontrollen
- x₇: RA PGRN-Autoantikörper positiv zu RA PGRN-Autoantikörper negativ

4.4 Zytotoxizitätsassay

Um die TNF- α -inhibierenden Eigenschaften von PGRN im Serum zu untersuchen, wurden Zytotoxizitätsassays mit Seren gesunder Kontrollpatienten, Patienten mit Psoriasis und von PGRN-Autoantikörper-positiven und -negativen Patienten durchgeführt. Die TNF- α induzierte Toxizität an WEHI-S und HT-1080 Zellen konnte durch die Zugabe von Seren von gesunden Kontrollpersonen, Patienten mit Psoriasis und PGRN-Autoantikörper-negativen PsA-Patienten signifikant vermindert werden im Vergleich zu Seren von Patienten mit PGRN-Autoantikörpern. Diese Unterschiede waren bis zu einer Verdünnung von 1:64 signifikant.

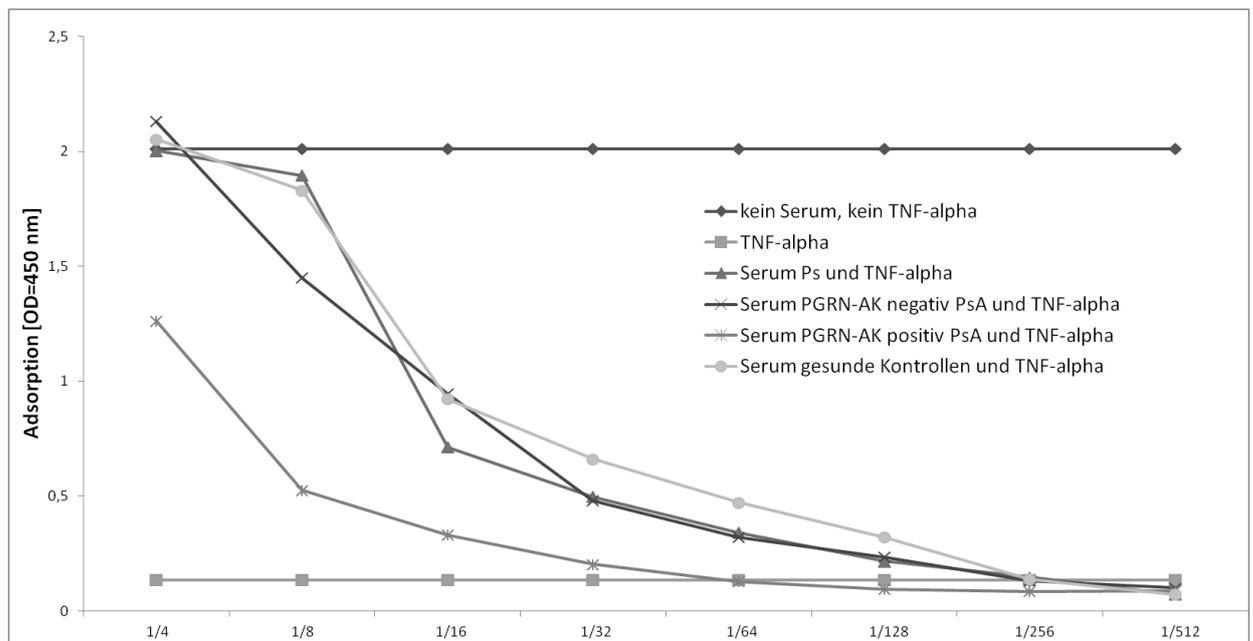


Abbildung 5: Zytotoxizitätsassay WEHI-s-Zelllinie Die Extinktion von gefärbtem Formazan bei 450nm als Vitalitätsmarker der murinen WEHI-s-Zellen nach Zugabe von Serum und TNF- α

Abk: Ps: Psoriasis vulgaris; PGRN-AK: Progranulin-Autoantikörper; PsA: Psoriasisarthropathie

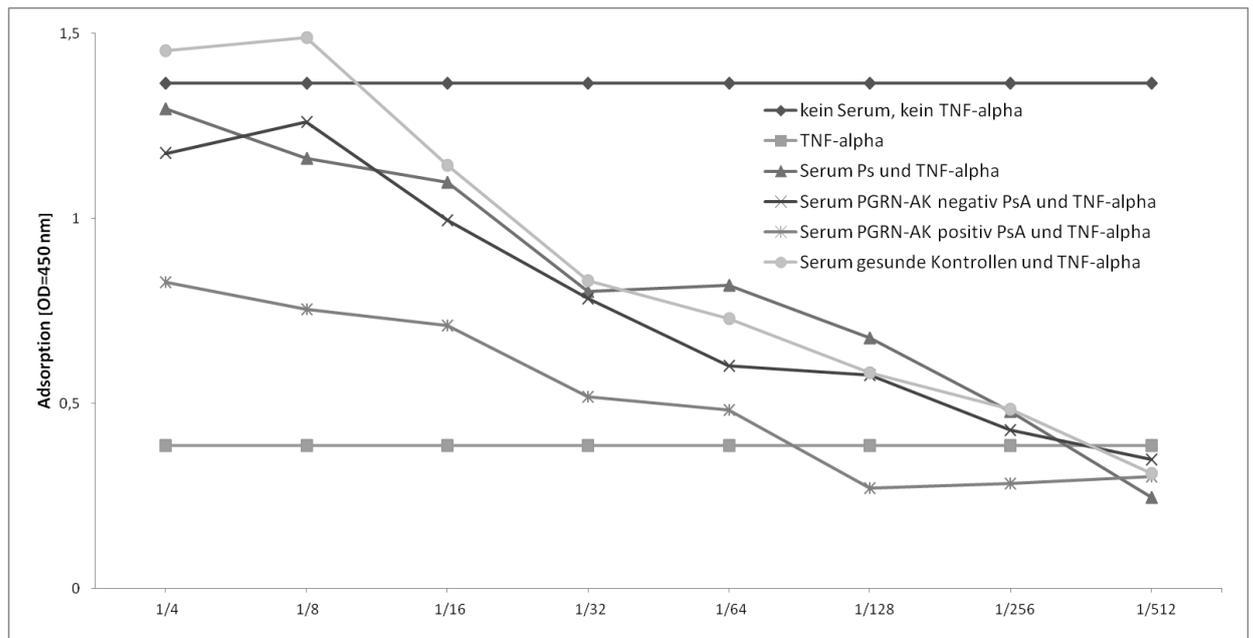


Abbildung 6: Zytotoxizitätsassay HT1080-Zelllinie Die Extinktion von gefärbtem Formazan bei 450nm als Vitalitätsmarker der humanen HT-1080-Zellen nach Zugabe von Serum und TNF- α

Abk: Ps: Psoriasis vulgaris; PGRN-AK: Progranulin-Autoantikörper; PsA: Psoriasisarthropathie

4.5 Progranulin-Autoantikörper-ELISA bei der Psoriasis vulgaris

100 Proben von Patienten mit Psoriasis vulgaris wurden getestet. Alle Proben waren negativ. In dieser Patientengruppe befanden sich 31 weibliche und 69 männliche Patienten. Das mediane Alter betrug 51 Jahre (Minimum: 26 Jahre; Maximum: 80 Jahre). Die Erstdiagnose der Psoriasis vulgaris erfolgte im Median im 33. Lebensjahr (Minimum: 6. Lebensjahr; Maximum: 74. Lebensjahr; Anzahl Alter bei ED unbekannt: 54).

Die getesteten Patienten erhielten die in Tabelle 7 beschriebene Medikation.

Therapiemodus	Anzahl der Patienten (n=100)
DMARDs Monotherapie	1
Biologicals	7
Andere (Fumarat, etc)	46
Unbekannt	46

Tabelle 7: Medikation Psoriasis vulgaris- Patienten

Abk.: Ps: Psoriasis vulgaris; DMARDs : disease modifying antirheumatic drugs

4.6 Progranulin-Autoantikörper-ELISA beim SAPHO-Syndrom

10 Seren von Patienten mit SAPHO-Syndrom wurden auf den PGRN-Autoantikörper untersucht. Es konnten keine PGRN-Autoantikörper nachgewiesen werden.

4.7 Progranulin-Autoantikörper-ELISA bei der rheumatoiden Arthritis

146 Proben von Patienten mit RA wurden auf das Vorhandensein von PGRN-Autoantikörpern untersucht. Von diesen 146 Proben waren 41 seropositiv für den PGRN-Autoantikörper (28,1%).

In dieser Patientengruppe befanden sich 118 weibliche und 28 männliche Patienten. Das mediane Alter betrug 58 Jahre (Minimum: 25; Maximum: 84 Jahre). Die Erstdiagnose der RA erfolgte im Median im Alter von 53 Jahren (Minimum 19, Maximum 73 Jahre; Anzahl Alter bei ED unbekannt: 14).

Weitere Patientencharakteristika:

Rheumafaktor	70,89% positiv (95/134)	unbekannt:12
Anti-CCP	49,54% positiv (54/109)	unbekannt:37
Erosionen	44,36% positiv (59/133)	unbekannt:13

Tabelle 8: Weitere Patientencharakteristika rheumatoide Arthritis-Patienten

Von den 41 PGRN-Autoantikörper-positiven Patienten mit RA waren 27 zusätzlich seropositiv für den Rheumafaktor (65,9%), 16 Patienten seropositiv für Anti-CCP (39,0%) und 20 Patienten zeigten einen radiologischen Nachweis von Erosionen (48,79%).

Die Medikation der Patienten wurde in verschiedene Subgruppen eingeteilt:

Therapiemodus	Anzahl der Patienten (n=146)	davon PGRN-AutoAK positiv
DMARDs Monotherapie	56	16
DMARDs Kombination	19	5
Biologicals	6	2
Biologicals + DMARDs	30	9
Andere	26	7
Unbekannt	9	2

Tabelle 9: Medikation Patienten mit rheumatoider Arthritis

Abk.: DMARDs : disease modifying antirheumatic drugs; PGRN: Progranulin;
Auto-AK: Autoantikörper

63 von 146 Patienten erhielten zusätzlich eine Steroid-Therapie. Von den 41 PGRN-Autoantikörper-positiven Patienten erhielten 20 eine Steroidtherapie.

4.8 Progranulin-Autoantikörper-ELISA bei verschiedenen Kontrollgruppen

In der Kontrollgruppe von 97 gesunden Blutspendern konnte nur bei einem ein niedriger Titer für PGRN-Autoantikörper nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurden Patienten mit Adipositas (n=40), Bewohner eines Altersheims (n=48), Patienten mit durchgemachter Sepsis (n=22) und Patienten mit Melanom (n=98) auf den PGRN-Autoantikörper untersucht. In der Gruppe der Altersheimbewohner enthielt ein Serum den Autoantikörper (1/48), die anderen Seren waren alle negativ für PGRN-Autoantikörper.

4.9 SLPI-Autoantikörper-ELISA bei Patienten mit Psoriasis und Psoriasisarthropathie

89 Psoriasis- und 118 PsA-Patienten wurden auf den SLPI-Autoantikörper im Serum untersucht. Dieser konnte bei keinem Patienten nachgewiesen werden.

4.10 Serpin-B1-Autoantikörper-ELISA bei Patienten mit rheumatoider Arthritis

75 Patienten mit RA wurden auf einen Autoantikörper gegen Serpin-B1 untersucht. Alle untersuchten Patienten waren seronegativ.

4.11 Ferritin-Autoantikörper-ELISA bei Patienten mit Psoriasis, Psoriasisarthropathie und rheumatoider Arthritis

Das Vorkommen von Autoantikörpern gegen die Ferritin-Schwerkette (FTH) wurde mithilfe eines ELISAs gegen FTH-Volllänge und gegen ein FTH-Fragment der N-terminalen 27 Aminosäuren gemessen. Bei 89 Psoriasis-Patienten mit ausschließlich kutanen Manifestationen und 48 PsA-Patienten konnte kein Autoantikörper gegen FTH-Volllänge nachgewiesen werden. Bei neun von 39 Patienten mit RA konnte ein FTH-Autoantikörper nachgewiesen werden (23%).

Ein Autoantikörper gegen 27aa-FTH konnte bei einem von 89 Ps-Patienten (1,5%) und einem von 48 (2%) PsA-Patienten nachgewiesen werden. Bei der RA waren vier von 39 Patienten (10,5%) positiv für den 27aa-FTH-Autoantikörper.

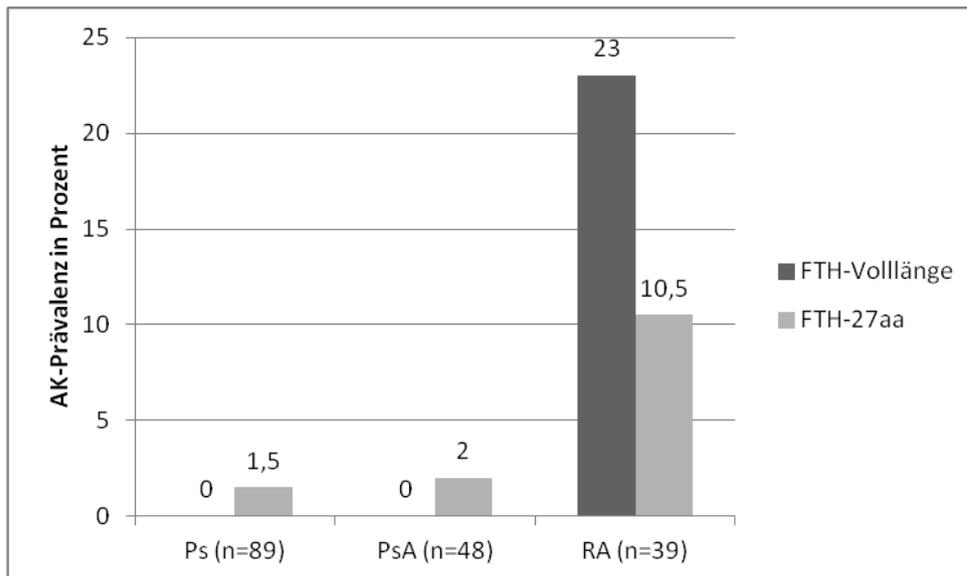


Abbildung 7: Vorkommen von Autoantikörpern gegen Ferritin-Schwerkette Die Balken stellen die Häufigkeiten von FTH-Autoantikörpern bei Patienten mit Psoriasis, PsA und RA dar. Der dunkle Balken entspricht der Häufigkeit für FTH-Volllänge-Autoantikörper während die hellen Balken die Häufigkeit der 27aa-FTH-Autoantikörper darstellen.

Abk.: FTH: ferritin terminus heavy chain; Ps: Psoriasis vulgaris; PsA: Psoriasisarthritis; RA: rheumatoide Arthritis

5 Diskussion

5.1 Progranulin-Autoantikörper bei Psoriasis und Psoriasisarthropathie

Bei 19,23% der untersuchten PsA-Patienten ließen sich PGRN-Autoantikörper nachweisen. Nach gegenwärtigem Kenntnisstand hat der PGRN-Autoantikörper die höchste Prävalenz von allen bekannten Autoantikörpern in Seren von Patienten mit PsA. Die vorliegenden Ergebnisse haben zunächst zwei Einschränkungen in der klinischen Wertigkeit der entdeckten PGRN-Autoantikörper: Die Prävalenz ist verglichen mit Autoimmunmarkern anderer rheumatologischer Erkrankungen gering: 50-80% der RA-Patienten sind positiv für Anti-CCP, 50-90% der SLE-Patienten sind ANA-positiv. Außerdem sind PGRN-Autoantikörper nicht spezifisch für die PsA, sondern zeigen eine vergleichbare Prävalenz bei Vaskulitiden oder RA.

Peluso *et al.* untersuchten das Vorkommen von Thyreoglobulin-Autoantikörpern (Anti-Tg) und Thyroidperoxidase-Autoantikörpern (Anti-TPO) bei 357 Patienten mit seronegativen Spondylarthritiden, darunter Patienten mit PsA (n=108), Morbus Bechterew (n=24), undifferenzierter Spondylarthritis (n=85), reaktiver Arthritis (n=62), enteropathischer Arthritis (n=72) und 318 Kontrollpersonen. Die PsA-Patienten zeigten zu 14% ein Vorkommen von Anti-Tg-Autoantikörpern und zu 23% von Anti-TPO-Autoantikörpern, was jedoch durch die hohe Prävalenz von 24% der Hashimotothyreoditis bei den 357 Patienten mit Spondylarthritis zu erklären ist. Die gesunde Kontrollgruppe zeigte lediglich eine Prävalenz von 10% ($p < 0,05$) und ein Vorkommen von Anti-Tg-Autoantikörpern bei 8% und Anti-TPO-Autoantikörpern bei 9% (Peluso, *et al.* 2011). Hierbei wurde jedoch kein Vergleich zur Psoriasis ohne Gelenkbeteiligung oder anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen gestellt. Colmegna *et al.* untersuchten das Vorkommen von anti-20S-Proteasomen-Autoantikörpern bei Patienten mit PsA (n=36), SLE (n=24), RA (n=20) und gesunden Kontrollen (n=30). 27,8% der PsA-Patienten, 41,6% der SLE-Patienten, 5% der RA-Patienten und 0% der Kontrollpersonen waren seropositiv für den Autoantikörper (Colmegna, *et al.* 2008). Auch hier fehlt der Vergleich zu Patienten mit Psoriasis ohne Gelenkbeteiligung und die entsprechenden Ergebnisse bei den vergleichenden rheumatischen

Erkrankungen zeigen die Unspezifität des anti-20S-Proteasomen-Autoantikörpers.

Somit ist das Vorkommen von PGRN-Autoantikörpern bei PsA-Patienten mit einer Prävalenz von 19,23% und einer Prävalenz von 0% bei der Psoriasis ohne Gelenkmanifestation hoch signifikant und potentiell diagnostisch verwertbar. Um zu erfahren, ob es einen Zusammenhang zwischen den Autoantikörpern und Manifestationsformen der PsA gibt, wurden die Patienten in verschiedene Subgruppen nach Geschlecht, Alter, Symptomatik und Therapieregime eingeteilt und daraufhin mit dem χ^2 -Test statistisch analysiert. Dabei zeigte sich eine signifikant höhere Prävalenz der Autoantikörper bei Patienten mit Daktylitis und Enthesitis im Vergleich zu PsA-Patienten ohne diese Befallsart. Ein signifikant häufigeres Auftreten der Autoantikörper bei Patienten, die TNF- α Blocker als Therapie erhielten, könnte auf eine schwerere Verlaufsform der Erkrankung bei PGRN-Autoantikörper-positiven Patienten schließen lassen. Allerdings sind für einen gesicherten Zusammenhang mit einer TNF- α -blockierenden Therapie die untersuchten Fallzahlen zu gering. Dies gilt auch für die Analyse der retrospektiv gebildeten Subgruppen.

Bei den Untersuchungen der Plasmakonzentration von PGRN bei Patienten verschiedener Vergleichsgruppen wurde festgestellt, dass PGRN-Autoantikörper-positive Patienten eine deutlich niedrigere Plasmakonzentration an PGRN hatten als gesunde Kontrollen und Patienten mit Psoriasis ohne Gelenkbeteiligung. Da PGRN durch Bindung des TNFR1, TNFR2 und DR3 (Liu, *et al.* 2014, Tang, *et al.* 2011) einen physiologischen Gegenspieler zu TNF- α darstellt, führt eine niedrige PGRN-Plasmakonzentration zu einem proinflammatorischen Milieu. Dieser antagonistische Effekt von PGRN auf TNF- α bestätigte sich im Zytotoxizitätsassay. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen PGRN-Autoantikörper-positivem und -negativem Serum. So konnte die TNF- α -induzierte Toxizität durch das Serum von gesunden Kontrollen, Patienten mit Psoriasis und PGRN-Autoantikörper-negativen PsA-Patienten signifikant vermindert werden. Bei PGRN-Autoantikörper-positiven Seren von PsA-Patienten war dieser Effekt deutlich schwächer. Eine erniedrigte PGRN-Konzentration im Plasma führt also direkt zu einem schwächeren Antagonismus der TNF- α -induzierten Toxizität. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Beweis für die Bindung von PGRN an den TNF-Rezeptor die zuletzt von Chen *et al.* kontrovers diskutiert wurde, da weder mittels

Co-Immunopräzipitation noch mittels einer Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie eine Interaktion zwischen PGRN und den TNF-Rezeptoren nachgewiesen werden konnte (Chen, *et al.* 2013). Diese Ergebnisse wiederum wurden in einem Report von Liu *et al.*, die zuvor über die Bindung zwischen PGRN und TNFR-1 und TNFR2 berichtet hatten (Tang, *et al.* 2011), kritisch hinterfragt. Liu *et al.* gehen davon aus, dass Chen *et al.* nicht ausreichend aufgereinigtes PGRN verwendeten und deswegen keine Bindung zwischen PGRN und den TNF-Rezeptoren entstand. Bei einer weiteren Untersuchung der Interaktion zwischen PGRN und TNF-Rezeptoren konnten die Ergebnisse von Liu *et al.* bezüglich einer Bindung von PGRN an den TNF-Rezeptor bestätigt werden. Dabei konnten die extrazellulären cysteinreichen Domänen (cystein-rich domain, CRD) CRD2 und CRD3 von TNFR1 und TNFR2 als PGRN-Bindungsregionen identifiziert werden (Jian, *et al.* 2013). Zusätzlich konnte eine Interaktion zwischen dem PGRN-Derivat Atsttrin und einem weiteren Rezeptor der TNF-Rezeptorsuperfamilie, TNFRSF25 oder Death receptor 3 (DR3), festgestellt werden. Atsttrin bindet direkt an DR3, wodurch die Bindung des TNF-like Liganden 1A (TL1A) an DR3 verhindert wird. Die darauffolgende TL1A-vermittelte Genexpression wird ebenfalls inhibiert (Liu, *et al.* 2014)

Die Beeinträchtigung der TNF- α -induzierten Toxizität zeigt die besondere Rolle von PGRN in der Entstehung einer chronischen Entzündungsreaktion. Diese Beobachtung ist für die vorliegenden Ergebnisse von herausragender Bedeutung, da die zuvor genannten Autoimmunerkrankungen ihre autoinflammatorische Aktivität zu einem wesentlichen Anteil über TNF- α entfalten. So konnte bei 75 Patienten mit granulomatöser Polyangiitis (GPA) eine Assoziation zwischen positivem PGRN-Autoantikörper-Status und der Krankheitsaktivität festgestellt werden (Thurner, *et al.* 2012).

Bei den untersuchten PsA-Patienten fiel außerdem das tendenziell gehäufte Auftreten der PGRN-Autoantikörper unter den Patienten mit erosivem Befall ($p=0,061$) auf. Durch die proinflammatorische Wirkung der neutralisierenden Autoantikörper könnte der Nachweis von PGRN-Autoantikörpern als prognostischer Marker für einen schwereren Krankheitsverlauf und eventuell Ansprechen auf TNF-Blocker-Therapie verwendet werden. Der Nachweis neutralisierender PGRN-Autoantikörper könnte die Suche nach einer passenden Therapievariante erleichtern. Bei PGRN-Seropositivität ist demnach davon

auszugehen, dass ein Ungleichgewicht in der TNF- α -Kaskade vorliegt, da der physiologische Antagonist in Form von PGRN eine deutlich reduzierte Konzentration hat, was wiederum zu einer vermehrten TNF- α vermittelten chronischen Entzündungsreaktion führt. Entsprechend könnte diese Patientengruppe möglicherweise von einer Dosiserhöhung der TNF- α -Blocker-Therapie profitieren oder aber den Einsatz von Biologika unabhängig von der TNF- α -Blockade wie z.B. Ustekinumab bevorzugen.

Die genannten Erwägungen deuten daraufhin, dass PGRN-Autoantikörper das Potential für die klinische Anwendung als Biomarker in Diagnostik und Therapie der PsA haben. Voraussetzung hierfür ist aber, dass prospektive Studien an PsA-Patienten unter TNF- α -inhibierender Therapie mit Bestimmung des PGRN-Serostatus durchgeführt werden. Erst wenn anhand großer Fallzahlen und nach multivariaten Analysen PGRN-Autoantikörper einen unabhängigen Risikofaktor für das Therapieversagen TNF- α -blockierender Therapie darstellen, könnten PGRN-Autoantikörper als Therapie-Biomarker in Betracht kommen. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass PGRN-Autoantikörper bevorzugt bei PsA-Patienten mit ausgeprägter Krankheitsaktivität vorkommen: Enthesitis, Daktylitis, tendenziell auch erosive Gelenkzerstörung. Damit spiegelt zunächst das vermehrte Vorkommen der PGRN-Autoantikörper-positiven PsA-Patienten mit TNF- α -Blocker-Therapie eher die erhöhte Krankheitsaktivität wieder.

5.2 Progranulin-Autoantikörper bei der rheumatoiden Arthritis

Bei 28,1% der untersuchten Patienten mit RA konnten PGRN-Autoantikörper nachgewiesen werden. Somit zeigte sich ein etwas geringeres aber ähnlich hohes Vorkommen wie in den zuvor veröffentlichten Ergebnissen von Thurner *et al.*. Diese konnten PGRN-Autoantikörper mit einer Prävalenz von 36,4% bei 44 Patienten mit RA nachweisen (Thurner, *et al.* 2012). Von den 41 Proben, die im Rahmen dieser Doktorarbeit positiv auf PGRN-Autoantikörper untersucht wurden, konnten bei 27 Proben außerdem Rheumafaktoren und bei 16 Proben Anti-CCP-Antikörper nachgewiesen werden. 20 von den 41 PGRN-Autoantikörper-positiven Patienten zeigten einen erosiven Befall, was eine ähnliche Tendenz zur

Assoziation der PsA-Patienten mit erosivem Befall und PGRN-Autoantikörpern zeigt. Größere Studien mit Subgruppenanalysen zum erosiven Verlauf und Seropositivität sind hier noch ausstehend. Studien zum TNF- α -Therapie-Ansprechen könnten eine Assoziation mit PGRN-Seropositivität, ähnlich der Therapie mit TNF- α -Blockern bei der PsA, zeigen. Für eine weiterführende Auswertung mit Subgruppen der Patienten mit RA ist die Fallzahl jedoch zu gering.

5.3 Progranulin-Autoantikörper beim SAPHO-Syndrom

Bei keinem untersuchten Patienten mit SAPHO-Syndrom (n=10) konnten PGRN-Autoantikörper nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass es sich beim SAPHO-Syndrom um eine PsA-unabhängige Entität handelt. Die vorsichtige Schätzung hätte ein bis zwei PGRN-Autoantikörper-positve SAPHO-Patienten erwarten lassen. Obwohl das SAPHO-Syndrom nach Einzelberichten auf eine Therapie mit TNF-Blockern anspricht (Ben Abdelghani, *et al.* 2010) scheinen PGRN-Autoantikörper hier offensichtlich keine vorwiegende Rolle zu spielen. Um jedoch eine abschließende Aussage treffen zu können, muss das Vorkommen der Autoantikörper bei einem deutlich größeren Kollektiv untersucht werden.

5.4 Ferritin-Autoantikörper bei Patienten mit Psoriasis, Psoriasisarthropathie und rheumatoider Arthritis

Die Ergebnisse von Mewar *et al.*, die ein Vorkommen von Anti-Ferritin-Autoantikörpern bei 16% der Patienten mit manifester RA und bei 19% der Patienten im frühen Krankheitsstadium der RA beschrieben (Mewar, *et al.* 2005), konnten durch unsere Ergebnisse bestätigt werden. So konnte bei 9 von 39 (23%) Patienten Autoantikörper gegen die Ferritin-Schwerkette nachgewiesen werden. Autoantikörper gegen den N-Terminus der Ferritin-Schwerkette (27aa-FTH) konnten bei 1,5% der untersuchten PsA (n=85), 2% der untersuchten PsA-Patienten (n=48) und 10,5% der untersuchten RA-Patienten (n=39) nachgewiesen werden.

Baerlacken *et al.* publizierten 2012 eine Studie, die eine hohe Sensitivität und Spezifität von hochtitrigen Autoantikörpern gegen den N-Terminus der Ferritin-

Schwerkette für eine aktive Riesenzellarthritis nachwies (Baerlecken, *et al.* 2012). Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte bei 89 untersuchten Psoriasis- und 39 untersuchten PsA-Patienten nur bei jeweils einem das Vorkommen von Anti-FTH-Volllänge nachgewiesen werden. Obwohl Ferritin ein bekannter Mediator im Entzündungsgeschehen des Gelenks ist (Ohno, *et al.* 1978), scheint ein Autoimmunprozess gegen Bestandteile des Ferritins somit nicht an der Pathophysiologie der PsA beteiligt zu sein. Weitere Aussagen lassen sich anhand der niedrigen seropositiven Fallzahlen nicht machen.

5.5 SLPI-Autoantikörper bei Patienten mit Psoriasis und Psoriasisarthropathie

Die verminderte PGRN-Konzentration bei PsA-Patienten kann nach pathophysiologischen Erwägungen neben dem neutralisierenden Effekt der PGRN-Autoantikörper auch durch eine abgeschwächte Inhibition des physiologischen PGRN-Abbaus verursacht werden. Zhu *et al.* beschrieben 2002 die Hemmung des Abbaus von PGRN durch SLPI, welches durch Bindung an PGRN eine Spaltung durch die neutrophile Elastase verhindert (Zhu, *et al.* 2002). In einem ELISA auf der Suche nach Anti-SLPI-Autoantikörpern bei 89 Psoriasis- und 118 PsA-Patienten konnte er allerdings bei keinem Patienten nachgewiesen werden, so dass dieser Mechanismus bei PsA-Patienten keine Rolle zu spielen scheint.

5.6 Serpin B1-Autoantikörper bei Patienten mit rheumatoider Arthritis

Der Abbau von PGRN wird außerdem durch Serpin B1 beeinflusst, da es die Funktion der neutrophilen Elastase inhibiert und somit zu einem verminderten Abbau von PGRN führt (Uchiyama, *et al.* 2012). Daher wurden 75 Patienten mit RA auf Autoantikörper gegen Serpin B1 untersucht. Die Autoantikörper konnten in dieser Patientengruppe nicht nachgewiesen werden. Die Konzentration weiterer PGRN-spaltender Enzyme wie MMP-12, MMP-14 und ADAMTS-7 wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht untersucht. Die vorgelegten Ergebnisse lassen hier keine weiteren Schlussfolgerungen zu.

6 Literaturverzeichnis

1. Aho K, Kaipiainen-Seppänen O, Heliövaara M, *et al.* (1998) Epidemiology of rheumatoid arthritis in Finland. *Seminars in arthritis and rheumatism* 27:325-334
2. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, *et al.* (2010) 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and Rheumatism* 62:2569-2581
3. Antoni C, Krueger GG, de VK, *et al.* (2005) Infliximab improves signs and symptoms of psoriatic arthritis: results of the IMPACT 2 trial. *Annals of the Rheumatic Diseases* 64:1150-1157
4. Arthus M (1903) Injections répétées de serum du cheval chez le lapin. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales, Paris* 55:817-820
5. Assmann G & Simon P (2011) The SAPHO syndrome--are microbes involved?. *Best practice & research. Clinical rheumatology* 25(3):423-34
6. Augustin M, Reich K, Glaeske G, *et al.* (2010) Co-morbidity and age-related prevalence of psoriasis: Analysis of health insurance data in Germany. *Acta Dermato-Venereologica* 90:147-151
7. Baerlecken NT, Linnemann A, Gross WL, *et al.* (2012) Association of ferritin autoantibodies with giant cell arteritis/polymyalgia rheumatica. *Annals of the Rheumatic Diseases*
8. Bai XH, Wang DW, Kong L, *et al.* (2009) ADAMTS-7, a direct target of PTHrP, adversely regulates endochondral bone growth by associating with and inactivating GEP growth factor. *Molecular and cellular biology* 29:4201-4219
9. Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, *et al.* (2006) Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 442:916-919
10. Bateman A & Bennett HP (2009) The granulin gene family: from cancer to dementia. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 31:1245-1254

11. Behrens F, Himsel A, Rehart S, *et al.* (2007) Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 66:1151-1156
12. Ben Abdelghani K, Dran DG, Gottenberg JE, *et al.* (2010) Tumor necrosis factor-alpha blockers in SAPHO syndrome. *The Journal of rheumatology* 37:1699-1704
13. Bijlsma JWJ (ed) (2012) *EULAR Textbook on Rheumatic Diseases* . BMJ-Group,
14. Boehncke WH (2012) Modern therapy of psoriasis : evidence-based, patient-centered, goal-oriented. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 63:589-594
15. Bowcock AM & Krueger JG (2005) Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nature reviews. Immunology* 5:699-711
16. Brighton SW, de la Harpe AL, van Staden DJ, *et al.* (1988) The prevalence of rheumatoid arthritis in a rural African population. *The Journal of rheumatology* 15:405-408
17. Browne SK, Burbelo PD, Chetchotisakd P, *et al.* (2012) Adult-onset immunodeficiency in Thailand and Taiwan. *The New England journal of medicine* 367:725-734
18. Carmona L, Villaverde V, Hernandez-Garcia C, *et al.* (2002) The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. *Rheumatology (Oxford, England)* 41:88-95
19. Carter TN (1972) The relationship of lithium carbonate to psoriasis. *Psychosomatics* 13:325-327
20. Cascao R, Rosario HS, Souto-Carneiro MM, *et al.* (2010) Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmunity reviews* 9:531-535
21. Cenik B, Sephton CF, Kutluk Cenik B, *et al.* (2012) Progranulin: a proteolytically processed protein at the crossroads of inflammation and neurodegeneration. *The Journal of biological chemistry* 287:32298-32306
22. Chen X, Chang J, Deng Q, *et al.* (2013) Progranulin does not bind tumor necrosis factor (TNF) receptors and is not a direct regulator of TNF-dependent signaling or bioactivity in immune or neuronal cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:9202-9213

23. Cheung ST, Wong SY, Leung KL, *et al.* (2004) Granulin-epithelin precursor overexpression promotes growth and invasion of hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10:7629-7636
24. Clauss M, Sunderkotter C, Sveinbjornsson B, *et al.* (2001) A permissive role for tumor necrosis factor in vascular endothelial growth factor-induced vascular permeability. *Blood* 97:1321-1329
25. Cohen AD, Bonnef D, Reuveni H, *et al.* (2005) Drug exposure and psoriasis vulgaris: case-control and case-crossover studies. *Acta Dermato-Venereologica* 85:299-303
26. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, *et al.* (2006) Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis and Rheumatism* 54:2793-2806
27. Colmegna I, Sainz B, Jr, Citera G, *et al.* (2008) Anti-20S proteasome antibodies in psoriatic arthritis. *The Journal of rheumatology* 35:674-676
28. Convit J (1962) Investigation of the incidence of psoriasis amongst Latin-American Indians. *Proceedings of 13th Congress on Dermatology, Amsterdam: Excerpta Medica* 196:
29. Cornbleet T (1956) Action of synthetic antimalarial drugs on psoriasis. *The Journal of investigative dermatology* 26:435-436
30. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, *et al.* (2004) Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine* 350:2572-2581
31. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, *et al.* (1994) Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 344:1105-1110
32. Engvall E & Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8:871-874
33. Espevik T & Nissen-Meyer J (1986) A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *Journal of immunological methods* 95:99-105

34. Etemadi N, Webb A, Bankovacki A, *et al.* (2013) Progranulin does not inhibit TNF and lymphotoxin- α signalling through TNF receptor 1. *Immunology and cell biology* 91(10):661-4
35. Feist E, Egerer K, Burmester GR (2007) [Autoantibody profile in rheumatoid arthritis]. *Zeitschrift fur Rheumatologie* 66:212-218
36. Finzel S &Englbrecht M (2011) [Psoriatic arthritis : a permanent challenge for rheumatologists and patients--Part 1: epidemiology, pathogenesis and clinical course]. *Zeitschrift fur Rheumatologie* 70:685-697
37. Finzel S &Englbrecht M (2011) [Psoriatic arthritis - a permanent challenge for rheumatologists and patients: part 2: imaging diagnostics, classification and therapy]. *Zeitschrift fur Rheumatologie* 70:775-789
38. Fry L &Baker BS (2007) Triggering psoriasis: the role of infections and medications. *Clinics in dermatology* 25:606-615
39. Gelfand JM, Weinstein R, Porter SB, *et al.* (2005) Prevalence and treatment of psoriasis in the United Kingdom: a population-based study. *Archives of Dermatology* 141:1537-1541
40. Gisondi P, Tessari G, Conti A, *et al.* (2007) Prevalence of metabolic syndrome in patients with psoriasis: a hospital-based case-control study. *The British journal of dermatology* 157:68-73
41. Gladman DD, Mease PJ, Ritchlin CT, *et al.* (2007) Adalimumab for long-term treatment of psoriatic arthritis: forty-eight week data from the adalimumab effectiveness in psoriatic arthritis trial. *Arthritis and Rheumatism* 56:476-488
42. Gobel M, Eisele L, Mollmann M, *et al.* (2013) Progranulin is a novel independent predictor of disease progression and overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *PloS one* 8:e72107
43. Gottlieb A, Menter A, Mendelsohn A, *et al.* (2009) Ustekinumab, a human interleukin 12/23 monoclonal antibody, for psoriatic arthritis: randomised, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Lancet* 373:633-640
44. Gottlieb AB (2001) Psoriasis. *Immunopathology and immunomodulation. Dermatologic clinics* 19:649-57, viii
45. Green AC (1984) Australian Aborigines and psoriasis. *The Australasian Journal of Dermatology* 25:18-24

46. Grutter MG, Fendrich G, Huber R, *et al.* (1988) The 2.5 Å X-ray crystal structure of the acid-stable proteinase inhibitor from human mucous secretions analysed in its complex with bovine alpha-chymotrypsin. *The EMBO journal* 7:345-351
47. Gudjonsson JE, Karason A, Antonsdottir A, *et al.* (2003) Psoriasis patients who are homozygous for the HLA-Cw*0602 allele have a 2.5-fold increased risk of developing psoriasis compared with Cw6 heterozygotes. *The British journal of dermatology* 148:233-235
48. Haringman JJ, Gerlag DM, Zwinderman AH, *et al.* (2005) Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 64:834-838
49. Harvey J, Lotze M, Stevens MB, *et al.* (1981) Rheumatoid arthritis in a Chippewa Band. I. Pilot screening study of disease prevalence. *Arthritis and Rheumatism* 24:717-721
50. He Z, Ismail A, Kriazhev L, *et al.* (2002) Progranulin (PC-cell-derived growth factor/acrogranin) regulates invasion and cell survival. *Cancer research* 62:5590-5596
51. He Z, Ong CH, Halper J, *et al.* (2003) Progranulin is a mediator of the wound response. *Nature medicine* 9:225-229
52. Hurskainen TL, Hirohata S, Seldin MF, *et al.* (1999) ADAM-TS5, ADAM-TS6, and ADAM-TS7, novel members of a new family of zinc metalloproteases. General features and genomic distribution of the ADAM-TS family. *The Journal of biological chemistry* 274:25555-25563
53. Isomaki P, Panesar M, Annenkov A, *et al.* (2001) Prolonged exposure of T cells to TNF down-regulates TCR zeta and expression of the TCR/CD3 complex at the cell surface. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166:5495-5507
54. Jian J, Zhao S, Tian Q, *et al.* (2013) Progranulin directly binds to the CRD2 and CRD3 of TNFR extracellular domains. *FEBS letters* 587:3428-3436
55. Kaltwasser JP, Nash P, Gladman D, *et al.* (2004) Efficacy and safety of leflunomide in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a multinational, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Arthritis and Rheumatism* 50:1939-1950

56. Kavanaugh AF & Ritchlin CT (2006) Systematic review of treatments for psoriatic arthritis: an evidence based approach and basis for treatment guidelines. *The Journal of rheumatology* 33:1417-1421
57. Keane J, Gershon S, Wise RP, *et al.* (2001) Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *The New England journal of medicine* 345:1098-1104
58. Kessenbrock K, Frohlich L, Sixt M, *et al.* (2008) Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin. *The Journal of clinical investigation* 118:2438-2447
59. Kraft DM, Mckee D, Scott C (1998) Henoch-Schonlein purpura: a review. *American Family Physician* 58:405-8, 411
60. Kragballe K, Noerrelund KL, Lui H, *et al.* (2004) Efficacy of once-daily treatment regimens with calcipotriol/betamethasone dipropionate ointment and calcipotriol ointment in psoriasis vulgaris. *The British journal of dermatology* 150:1167-1173
61. Kvien TK, Uhlig T, Odegard S, *et al.* (2006) Epidemiological aspects of rheumatoid arthritis: the sex ratio. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1069:212-222
62. Lai Y, Yu XP, Zhang Y, *et al.* (2012) Enhanced COMP catabolism detected in serum of patients with arthritis and animal disease models through a novel capture ELISA. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 20:854-862
63. Lam J, Takeshita S, Barker JE, *et al.* (2000) TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *The Journal of clinical investigation* 106:1481-1488
64. Langley RG, Krueger GG, Griffiths CE (2005) Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Annals of the Rheumatic Diseases* 64 Suppl 2:ii18-23; discussion ii24-5
65. Liang GC & Barr WG (2001) Open trial of leflunomide for refractory psoriasis and psoriatic arthritis. *J.Clin.Rheumatol.* 7:366-370
66. Liau LM, Lallone RL, Seitz RS, *et al.* (2000) Identification of a human glioma-associated growth factor gene, granulin, using differential immunosorption. *Cancer research* 60:1353-1360

67. Liu C, Li X, Gao W, *et al.* (2014) Progranulin-derived Atsstrin directly binds to TNFRSF25 (DR3) and inhibits TNF-like ligand 1A (TL1A) activity. *PLoS One* 9(3):e92743
68. Liu CJ & Bosch X (2012) Progranulin: a growth factor, a novel TNFR ligand and a drug target. *Pharmacology & therapeutics* 133:124-132
69. Liu H, Huang K, Wu Y, *et al.* (2007) The expression of interleukin-22 and S100A7, A8, A9 mRNA in patients with psoriasis vulgaris. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences* 27:605-607
70. Lomholt G (1964) Prevalence of Skin Diseases in a Population; a Census Study from the Faroe Islands. *Danish medical bulletin* 11:1-7
71. Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, *et al.* (2008) Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *The Journal of investigative dermatology* 128:1207-1211
72. Ludwig RJ, Herzog C, Rostock A, *et al.* (2007) Psoriasis: a possible risk factor for development of coronary artery calcification. *The British journal of dermatology* 156:271-276
73. Luo D, Luo Y, He Y, *et al.* (2006) Differential functions of tumor necrosis factor receptor 1 and 2 signaling in ischemia-mediated arteriogenesis and angiogenesis. *American Journal of Pathology* 169:1886-1898
74. Lyons PA, Rayner TF, Trivedi S, *et al.* (2012) Genetically distinct subsets within ANCA-Associated Vasculitis. *The New England journal of medicine* 367:214-223
75. Maeda K, Takahashi N, Kobayashi Y (2013) Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 91:15-23
76. McDevitt H, Munson S, Ettinger R, *et al.* (2002) Multiple roles for tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin alpha/beta in immunity and autoimmunity. *Arthritis research* 4 Suppl 3:S141-52
77. McInnes IB, Kavanaugh A, Gottlieb AB, *et al.* (2013) Efficacy and safety of ustekinumab in patients with active psoriatic arthritis: 1 year results of the phase 3, multicentre, double-blind, placebo-controlled PSUMMIT 1 trial. *Lancet* 382:780-789
78. McInnes IB & Schett G (2011) The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine* 365:2205-2219

79. Mease PJ, Kivitz AJ, Burch FX, *et al.* (2004) Etanercept treatment of psoriatic arthritis: safety, efficacy, and effect on disease progression. *Arthritis and Rheumatism* 50:2264-2272
80. Mewar D, Moore DJ, Young-Min S, *et al.* (2005) Antiferritin antibodies discovered by phage display expression cloning are associated with radiographic damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 52:3868-3872
81. Moll JM & Wright V (1973) Psoriatic arthritis. *Seminars in arthritis and rheumatism* 3:55-78
82. Murphy K, Taylor, Francis (2011) *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, USA
83. Murrin RJ & Murray JA (2006) Thrombotic thrombocytopenic purpura: aetiology, pathophysiology and treatment. *Blood reviews* 20:51-60
84. Naldi L (2004) Epidemiology of psoriasis. Current drug targets. *Inflammation and allergy* 3:121-128
85. Nash P & Clegg DO (2005) Psoriatic arthritis therapy: NSAIDs and traditional DMARDs. *Annals of the Rheumatic Diseases* 64 Suppl 2:ii74-ii77
86. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J (2009) Psoriasis. *The New England journal of medicine* 361:496-509
87. Nienhuis RL & Mandema E (1964) A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis; the perinuclear factor. *Annals of the Rheumatic Diseases* 23:302-305
88. Nograles KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E, *et al.* (2008) Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *The British journal of dermatology* 159:1092-1102
89. Norrlind R (1955) The significance of infections in the origination of psoriasis. *Acta Rheumatologica Scandinavica* 1:135-144
90. Ohno O, Tateishi H, Cooke TD (1978) Pathogenesis of chronic inflammation in experimental ferritin-induced arthritis. IV. Immuno-electron microscopic techniques in the study of articular collagenous tissues. *Arthritis and Rheumatism* 21:81-91

91. Ong CH & Bateman A (2003) Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell derived growth factor, acrogranin) in proliferation and tumorigenesis. *Histology and histopathology* 18:1275-1288
92. Parisi R, Symmons DP, Griffiths CE, *et al.* (2013) Identification and Management of Psoriasis and Associated Comorbidity (IMPACT) project team Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *The Journal of investigative dermatology* 133:377-385
93. Peeters AJ, Dijkmans BA, van der Schroeff JG (1992) Fumaric acid therapy for psoriatic arthritis. A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *British journal of rheumatology* 31:502-504
94. Peluso R, Lupoli GA, Del Puente A, *et al.* (2011) Prevalence of thyroid autoimmunity in patients with spondyloarthropathies. *The Journal of rheumatology* 38:1371-1377
95. Radtke MA, Reich K, Beikert F, *et al.* (2011) Psoriasis arthritis. An interdisciplinary challenge. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 62:779-790
96. Ridolfi RL & Bell WR (1981) Thrombotic thrombocytopenic purpura. Report of 25 cases and review of the literature. *Medicine* 60:413-428
97. Ritchlin CT, Haas-Smith SA, Li P, *et al.* (2003) Mechanisms of TNF-alpha- and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *The Journal of clinical investigation* 111:821-831
98. Sahin U, Tureci O, Schmitt H, *et al.* (1995) Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:11810-11813
99. Sarzi-Puttini P, Santandrea S, Boccassini L, *et al.* (2001) The role of NSAIDs in psoriatic arthritis: evidence from a controlled study with nimesulide. *Clinical and experimental rheumatology* 19:S17-S20
100. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, *et al.* (2006) Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *The Journal of experimental medicine* 203:2673-2682
101. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, *et al.* (1998) Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *The Journal of clinical investigation* 101:273-281

102. Schottelius AJ, Moldawer LL, Dinarello CA, *et al.* (2004) Biology of tumor necrosis factor- α - implications for psoriasis. *Experimental dermatology* 13:193-222
103. Sieper J, Rudwaleit M, Baraliakos X., *et al.* (2009) The Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68 Suppl 2:ii1-44
104. Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, *et al.* (2010) EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69:964-975
105. Steinsson K, Jonsdottir I, Valdimarsson H (1990) Cyclosporin A in psoriatic arthritis: an open study. *Annals of the Rheumatic Diseases* 49:603-606
106. Stern RS, Liebman EJ, Vakeva L (1998) Oral psoralen and ultraviolet-A light (PUVA) treatment of psoriasis and persistent risk of nonmelanoma skin cancer. PUVA Follow-up Study. *Journal of the National Cancer Institute* 90:1278-1284
107. Sudol-Szopinska I & Urbanik A (2013) Diagnostic imaging of sacroiliac joints and the spine in the course of spondyloarthropathies. *Polish journal of radiology / Polish Medical Society of Radiology* 78:43-49
108. Suh HS, Choi N, Tarassishin L, *et al.* (2012) Regulation of progranulin expression in human microglia and proteolysis of progranulin by matrix metalloproteinase-12 (MMP-12). *PLoS.One.* 7:e35115
109. Tang W, Lu Y, Tian QY, *et al.* (2011) The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science* 332:478-484
110. Taylor W, Gladman D, Helliwell P, *et al.* (2006) Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. *Arthritis and Rheumatism* 54:2665-2673
111. Teitelbaum SL (2000) Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289:1504-1508
112. Thurner L, Zaks M, Preuss KD, *et al.* (2013) Progranulin antibodies entertain a proinflammatory environment in a subgroup of patients with psoriatic arthritis. *Arthritis Research & Therapy* (2013) 15(6):R211.
113. Thurner L, Preuss KD, Fadle N, *et al.* (2012) Progranulin antibodies in autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*

114. Toh H, Chitramuthu BP, Bennett HP, *et al.* (2011) Structure, function, and mechanism of progranulin; the brain and beyond. *Journal of Molecular Neuroscience* : JMN 45:538-548
115. Tomi NS, Kranke B, Aberer E (2005) Staphylococcal toxins in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects. *Journal of the American Academy of Dermatology* 53:67-72
116. Tsai HM (2006) Current concepts in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Annual Review of Medicine* 57:419-436
117. Tsai HM & Lian EC (1998) Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *The New England journal of medicine* 339:1585-1594
118. Uchiyama K, Naito Y, Takagi T, *et al.* (2012) Serpin B1 protects colonic epithelial cell via blockage of neutrophil elastase activity and its expression is enhanced in patients with ulcerative colitis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 302:G1163-G1170
119. Uotila M, Ruoslahti E, Engvall E (1981) Two-site sandwich enzyme immunoassay with monoclonal antibodies to human alpha-fetoprotein. *Journal of immunological methods* 42:11-15
120. Van Weemen BK & Schuurs AH (1971) Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS letters* 15:232-236
121. Veale DJ, Barnes L, Rogers S, *et al.* (1994) Immunohistochemical markers for arthritis in psoriasis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 53:450-454
122. Veale DJ & FitzGerald O (2002) Psoriatic arthritis--pathogenesis and epidemiology. *Clinical and experimental rheumatology* 20:S27-33
123. Waaler E (1939) On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. 1939. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 115:422-38; discussion 439
124. Wollina U, Unger L, Heinig B, *et al.* (2010) Psoriatic arthritis. *Dermatol. Ther.* 23:123-136
125. Yalow RS & Berson SA (1960) Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *The Journal of clinical investigation* 39:1157-1175

126. Yang XD, Tisch R, Singer SM, *et al.* (1994) Effect of tumor necrosis factor alpha on insulin-dependent diabetes mellitus in NOD mice. I. The early development of autoimmunity and the diabetogenic process. *The Journal of experimental medicine* 180:995-1004
127. Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, *et al.* (1979) Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *British medical journal* 2:97-99
128. Zhao YP, Tian QY, Liu CJ (2013) Progranulin deficiency exaggerates, whereas progranulin-derived Atsttrin attenuates, severity of dermatitis in mice. *FEBS letters* 587:1805-1810
129. Zhu J, Nathan C, Jin W, *et al.* (2002) Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell* 111:867-878

7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Michael Pfreundschuh, Direktor der Klinik für Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit in seiner Klinik bedanken.

Ganz besonders danke ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Gunter Aßmann, geschäftsführender Oberarzt der Klinik für Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die Vermittlung des Themas und die Anbindung an das José-Carreras-Zentrum für Immun- und Gentherapie in Homburg. Herzlichen Dank für die zuverlässige Beratung, Hilfsbereitschaft und stetige Rückmeldung während des experimentellen Teils als auch im Schreibprozess dieser Arbeit.

Großer Dank gebührt auch Herrn Dr. Lorenz Thurner, Assistenzarzt in der Klinik für Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die hervorragende Betreuung, Geduld und Unterstützung in allen Fragestellungen; ohne dessen zahlreiche Denkanstöße wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Frau Natalie Fadle, medizinisch-technische Assistentin im José-Carreras-Zentrum für Immun- und Gentherapie in Homburg, danke ich für die engagierte und geduldige Anleitung des experimentellen Teils dieser Doktorarbeit. Bei Frau Dr.dipl.-math. Mei Fang Ong möchte ich mich für die Beratung bei der statistischen Auswertung der Daten zur Psoriasisarthriopathie bedanken. Außerdem bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Claudia Pföhler, Oberärztin der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die Bereitstellung der dermatologischen Daten.

Nicht zuletzt danke ich insbesondere meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums, die Unterstützung und für das ständige Vorbild hervorragender wissenschaftlicher Arbeit.

8 Publikationen

- **Progranulin antibodies entertain a proinflammatory environment in a subgroup of patients with psoriatic arthritis.** Thurner L, Zaks M, Preuss KD, Fadle N, Regitz E, Ong MF, Pfreundschuh M, Assmann G
Arthritis Research & Therapy (2013) 15(6):R211.
- **Progranulin antibodies in autoimmune diseases** Thurner L, Preuss KD, Fadle N, Regitz E, Klemm P, Zaks M, Kemele M, Hasenfus A, Csernok E, Gross WL, Pasquali JL, Martin T, Bohle RM, Pfreundschuh M
Journal of Autoimmunity (2012) 42:29-38

9 Curriculum Vitae

10 Anhang: Patientencharakteristika

Patientendaten Psoriasisarthropathie

Legende:

Geschlecht m= männlich w= weiblich

Alter bei: PE = Probenentnahme; ED= Erstdiagnose; PsA= Psoriasisarthropathie; Ps= Psoriasis
1= positiv; 0= negativ; n= unbekannt;

Befall: Ent. = Enthesitis; Dak. = Daktylitis

RF= Rheumafaktor; FA = Familienanamnese

Med.(Medikation): 1= DMARDs; 2=DMARDs Kombi; 3=Biologicals; 4= DMARDs + Biologicals,
5= NSARs/keine

Steroide: 1=zusätzliche Glukokortikoidgabe; 0=keine zusätzliche Glukokortikoidgabe

Nr.	Geschl.	Alter bei			Anti-PGRN	Befall:				RF	HLA-B27	FA	Med.	Steroide
		PE	ED PsA	ED Ps		Ent.	Dak.	axial	erosiv					
1	m	38	34	23	0	n	1	1	n	0	n	1	5	0
2	m	51	56	29	0	n	n	1	1	n	n	n	4	0
3	w	51	53	48	1	n	n	1	n	n	0	0	5	0
4	w	48	40	28	0	n	n	n	1	0	0	0	3	0
5	m	58	51	28	0	n	n	n	0	n	n	1	5	0
6	w	57	53	42	1	n	n	n	n	n	n	1	n	0
7	m	56	52	19	0	n	1	n	0	0	n	1	5	0
8	m	79	75	n	1	n	n	n	1	0	n	n	n	0
9	m	60	33	n	1	n	n	n	1	0	1	0	1	0
10	m	60	56	52	0	n	n	n	n	n	n	1	1	0
11	w	54	28	n	1	n	n	n	n	0	n	1	4	0
12	w	43	30	n	0	n	1	n	0	n	n	n	1	0
13	w	48	34	35	0	n	n	n	1	0	n	0	4	0
14	m	59	51	n	0	n	n	n	1	n	0	1	4	0
15	w	43	38	n	0	n	n	n	n	n	0	1	1	0
16	m	61	53	n	0	n	n	n	n	0	n	0	1	0
17	w	62	53	n	0	n	n	n	n	n	0	n	1	0
18	w	53	49	n	0	n	n	1	1	0	n	n	1	0
19	w	70	58	n	0	n	n	n	0	1	n	n	1	0
20	m	59	55	n	0	n	n	n	0	1	1	0	1	0
21	m	55	46	n	0	n	n	n	1	n	0	1	3	0
22	m	59	50	n	0	1	n	1	0	0	1	n	3	0
23	w	56	52	n	0	n	n	n	0	0	1	0	5	0
24	m	78	69	n	1	n	n	n	1	0	0	n	1	0
25	w	49	45	n	0	1	n	n	0	n	n	n	4	0
26	w	43	39	25	0	1	n	n	0	0	n	n	5	0
27	w	37	23	14	0	n	n	n	n	0	n	1	5	1
28	w	48	47	n	1	n	1	n	0	n	n	1	5	0
29	w	57	53	n	0	n	n	n	0	0	n	n	2	0
30	w	55	49	42	0	1	1	n	1	0	1	1	1	0
31	m	48	34	n	0	1	n	n	0	n	1	n	4	0

32	m	73	58	n	1	n	n	n	n	n	0	n	3	0
33	m	48	35	n	0	n	n	n	n	n	n	n	3	0
34	m	70	63	n	0	n	n	n	1	1	0	n	5	1
35	m	57	33	n	1	n	n	1	1	n	n	1	3	0
36	m	66	n	n	0	n	n	n	n	n	n	n	n	n
37	m	63	21	21	0	n	n	1	1	0	n	1	3	0
38	m	44	41	31	0	n	n	n	1	0	n	0	5	0
39	m	73	51	46	1	n	n	n	0	0	n	0	5	0
40	w	64	46	n	0	n	1	n	0	0	0	n	1	0
41	m	73	59	36	0	n	1	1	0	0	n	0	n	0
43	w	57	55	n	1	n	1	1	1	0	n	0	1	0
44	w	34	32	12	0	n	1	n	0	1	0	n	3	0
45	w	64	57	32	0	n	n	n	1	0	n	n	1	0
46	w	48	38	n	0	n	1	n	0	n	n	n	1	0
47	m	51	50	49	1	1	1	n	1	n	n	0	1	0
48	w	68	61	n	1	n	1	n	0	0	0	0	1	0
49	w	41	41	24	0	n	1	n	0	0	n	n	5	0
52	m	49	38	27	0	n	n	n	1	n	n	n	3	0
54	w	50	34	20	0	n	n	n	1	n	n	n	5	1
55	m	42	35	23	0	n	1	n	1	n	n	n	n	n
56	m	50	42	27	0	n	n	n	0	0	n	n	4	0
57	m	52	n	43	0	n	n	1	n	n	n	0	4	0
58	m	48	27	n	0	n	n	1	n	n	n	n	5	0
59	w		n	n	1	n	n	n	n	n	n	n	n	n
60	w	62	30	30	1	1	1	n	n	n	n	0	1	1
61	w	66	49	47	0	n	n	n	n	0	n	0	1	1
62	m	38	37	n	1	n	n	n	0	n	n	n	1	0
63	w	61	60	48	0	n	n	1	n	n	n	n	1	0
64	w	44	26	n	1	n	n	n	0	n	n	1	3	0
65	m	54	n	n	1	n	1	n	1	n	n	n	n	n
66	w	47	38	37	0	n	1	1	0	0	0	0	1	0
68	m	46	40	40	0	n	1	n	1	n	n	0	1	0
69	w	25	25	n	0	n	1	1	1	0	n	n	1	1
70	w	68	60	58	0	n	n	n	n	n	n	n	n	n
71	m	54	52	53	0	0	0	0	1	n	0	n	1	1
72	w	43	42	36	0	1	1	1	0	n	0	n	3	n
73	m	38	38	37	1	0	1	0	0	n	1	n	1	1
74	m	24	24	18	0	0	0	0	0	n	0	n	1	1
75	w	55	20	6	0	1	0	1	1	n	0	n	4	n
76	w	70	60	60	0	1	0	0	1	n	0	n	1	1
77	w	69	67	67	1	1	0	0	1	n	0	n	5	1
78	w	69	68	29	0	0	0	0	0	n	0	n	1	1
79	m	76	70	70	0	0	0	1	0	n	n	n	1	n
80	m	77	76	36	0	1	0	0	0	n	n	n	1	n
81	m	51	23	21	0	1	0	n	0	n	n	n	2	1

82	w	45	41	12	0	1	0	0	0	n	0	n	1	n
83	w	41	33	29	1	1	0	1	0	n	0	n	1	n
84	m	53	49	13	0	1	0	1	0	n	0	n	5	n
85	w	45	45	keine Ps	0	0	0	1	1	n	0	1	1	1
86	w	63	52	50	0	0	0	0	0	n	n	n	1	1
87	w	79	78	71	0	0	0	0	0	n	0	n	1	n
88	w	39	39	29	0	1	0	1	0	n	0	n	3	n
89	w	50	48	7	0	1	1	0	0	n	0	n	1	n
90	w	58	47	48	0	0	0	0	1	n	n	n	1	n
91	w	34	32	27	0	0	0	1	0	n	0	n	1	n
92	w	59	50	keine Ps	0	0	1	0	1	n	0	1	1	n
93	w	55	50	49	0	0	0	0	0	n	0	n	1	n
94	w	66	64	56	0	1	0	0	0	n	n	n	2	n
95	w	78	59	56	0	0	0	0	1	n	n	n	1	1
96	m	52	40	10	0	0	0	1	0	n	0	n	2	1
97	w	51	47	n	1	0	0	0	0	n	0	1	1	n
98	w	69	58	n	0	1	0	0	1	n	0	n	2	1
99	m	72	70	55	0	0	0	0	1	n	0	n	1	n
100	w	62	56	23	0	1	0	0	0	n	n	n	1	n
101	w	54	38	32	0	1	1	1	1	n	n	n	4	n
102	m	47	39	21	0	1	0	1	1	n	1	n	2	n
103	w	63	61	61	0	0	0	0	0	n	0	n	2	1
104	w	81	72	16	0	0	1	0	1	n	n	n	2	1
105	m	65	58	45	0	0	1	1	1	n	n	n	1	n
106	w	68	56	63	0	1	1	1	1	n	n	n	1	1
107	m	51	43	35	0	n	0	0	1	n	1	n	1	n
108	w	61	58	56	0	0	1	1	0	n	n	n	1	1
109	m	72	66	65	0	0	0	0	0	n	n	n	5	n
110	w	69	57	45	0	0	0	0	0	n	n	n	1	n
111	w	55	38	25	1	n	0	1	1	n	n	n	4	1
112	w	48	44	47	0	1	1	0	0	n	0	1	5	n
113	w	54	35	29	0	1	1	0	1	n	n	n	2	1
114	w	54	43	43	0	n	1	0	0	n	0	n	3	n
115	m	68	55	23	1	1	1	0	1	n	n	n	1	n
116	w	60	50	n	0	1	0	0	1	n	n	1	1	1
117	m	53	42	38	0	0	1	0	1	n	n	n	4	1
118	w	52	32	20	0	1	1	0	0	n	n	n	5	1
119	m	40	40	25	1	0	0	1	0	n	0	n	1	n
120	w	79	72	28	0	0	0	0	0	n	n	n	1	1
121	w	47	29	31	0	0	1	0	0	0	0	n	5	n
122	w	68	49	53	0	0	0	0	0	n	n	n	1	n
123	w	35	33	20	0	0	1	0	0	n	0	n	1	n
124	m	30	28	14	0	0	1	1	0	n	0	n	4	n
125	m	50	41	10	0	0	1	0	0	n	n	n	1	n
126	w	52	30	49	1	1	0	1	0	n	1	n	3	n

127	m	70	52	30	0	0	0	0	0	n	n	n	3	n
128	w	51	49	keine Ps	0	1	0	1	0	n	0	1	1	n
129	w	39	38	10	1	1	1	0	0	n	n	n	1	n
130	w	52	51	keine Ps	0	1	0	0	0	n	0	1	1	1
131	w	77	59	63	0	0	0	0	0	n	n	n	1	1
132	w	58	48	46	0	0	0	1	1	n	0	n	1	n
133	m	68	52	22	0	0	0	1	1	n	n	n	2	1
134	w	57	46	54	0	0	0	1	0	n	0	1	2	1
135	w	47	45	keine Ps	0	0	0	0	0	n	1	1	1	n
136	w	61	49	41	0	0	0	1	0	n	1	n	1	n
137	m	42	39	39	0	0	0	1	1	n	0	n	1	1
138	w	75	65	59	0	1	0	0	1	n	0	n	1	1
139	w	41	40	19	0	n	0	1	1	n	0	n	1	n
140	w	48	40	keine Ps	0	0	0	0	1	n	1	n	5	n
141	w	39	37	12	0	1	1	1	0	n	0	n	2	n
142	w	61	59	49	1	0	n	0	0	n	0	n	1	n
143	w	59	49	49	0	1	0	0	1	n	0	n	4	n
144	w	38	34	20	0	1	0	1	0	n	0	n	5	1
145	m	52	43	20	0	n	0	0	0	n	0	n	1	n
146	w	43	38	12	1	1	0	1	0	n	0	n	3	n
147	m	36	33	30	0	1	1	0	1	n	1	n	3	n
148	w	69	39	39	0	1	0	0	1	n	1	n	5	n
149	w	69	47	63	0	1	0	0	0	n	0	n	2	n
150	w	43	32	37	0	n	1	1	0	n	1	1	4	n
151	w	63	52	22	1	0	1	0	1	n	n	n	1	n
152	m	57	43	40	0	0	0	0	1	n	0	n	1	n
153	m	58	45	35	0	1	1	0	1	n	0	n	2	n
154	m	46	45	keine Ps	0	0	1	0	1	n	0	1	1	1
155	m	47	46	21	0	0	0	0	0	n	0	n	1	1
156	w	53	52	30	0	0	0	0	0	n	1	n	1	1
157	w	72	63	20	1	1	0	0	0	n	0	n	1	1
158	w	47	28	37	0	1	0	0	1	n	1	n	2	n
159	w	42	41	32	1	1	0	0	0	n	0	n	3	n
160	w	72	63	20	0	0	0	0	1	n	n	n	4	1
161	w	62	58	keine Ps	0	0	1	0	1	n	n	n	1	1
162	m	71	48	46	0	1	1	0	1	n	n	n	3	n
163	w	50	46	12	0	0	0	0	1	n	0	n	1	n
164	w	43	33	30	0	0	0	0	0	n	1	n	1	n
165	w	53	41	40	0	1	0	0	0	n	0	n	1	n
166	w	43	38	20	1	1	0	1	1	n	0	n	2	n
167	w	33	30	15	0	0	0	n	n	n	n	n	5	1
168	m	76	66	51	0	0	0	0	0	n	n	n	1	1
169	w	68	58	49	0	n	0	0	0	n	n	n	1	1
170	w	61	55	55	1	1	1	0	0	n	0	n	1	n

171	m	75	52	50	1	0	0	0	1	n	n	n	5	n
172	w	56	45	18	0	0	1	0	0	n	n	n	1	n
173	w	56	48	44	0	1	1	0	0	n	n	n	1	n
174	w	61	50	23	0	1	1	1	0	n	0	n	1	1
175	w	56	39	27	0	1	0	0	0	n	0	n	4	n
176	w	66	63	6	0	1	0	0	1	n	0	n	1	n
177	m	70	62	58	0	1	0	0	0	n	n	1	4	n
178	m	51	48	47	0	0	0	0	0	n	n	n	1	n
179	w	60	49	48	0	1	0	0	0	n	n	n	2	1
180	w	53	45	10	0	1	0	1	0	n	0	n	2	n
181	w	36	33	33	0	1	0	1	0	n	0	1	3	n
182	m	60	54	53	0	0	1	0	0	n	0	n	1	n
183	w	52	47	48	0	n	0	0	0	n	1	n	4	n
184	m	48	44	39	1	0	0	0	1	n	0	n	4	n
185	m	25	22	13	0	0	1	n	0	n	n	n	3	n
186	m	49	42	12	0	0	0	0	0	n	0	n	2	n
187	m	54	49	39	0	0	n	0	1	n	n	n	1	n
188	m	48	41	8	0	0	n	0	0	n	n	n	4	n
189	m	59	52	44	0	0	n	0	1	n	n	n	3	n
190	m	47	19	19	1	0	n	1	1	n	n	n	3	n
191	m	51	47	31	0	1	n	0	1	n	n	n	1	n
192	w	47	43	39	0	0	n	0	0	n	n	n	5	n
193	m	42	26	16	0	0	n	0	0	n	n	n	1	n
194	w	37	34	30	0	0	n	1	0	n	n	n	1	n
195	m	n	n	n	0	n	n	n	n	n	n	n	n	n
196	w	52	46	46	1	0	n	0	0	n	n	n	1	1
197	m	58	46	35	0	0	n	0	0	n	n	n	5	n
198	w	37	37	18	0	0	n	0	1	n	n	n	5	n
199	w	61	58	61	0	0	n	0	0	n	n	n	1	n
200	w	n	n	n	0	0	n	0	0	n	n	n	1	n
201	w	74	66	65	0	0	n	0	0	n	n	n	1	1
202	m	63	58	28	0	0	n	0	1	n	n	n	1	1
203	m	41	36	36	0	0	n	0	1	n	n	n	1	n
204	w	32	26	22	0	0	n	0	0	n	n	n	5	n
205	m	75	67	66	0	0	n	0	0	n	n	n	1	n
206	m	71	46	41	1	0	n	0	0	n	n	n	1	1
207	w	77	71	71	0	0	n	0	0	n	n	n	1	n
208	w	49	44	44	0	0	n	0	0	n	n	n	1	1
209	w	60	48	48	0	0	n	0	1	n	n	n	1	n
210	m	61	45	43	0	1	n	1	0	n	n	n	4	n
211	w	42	38	28	1	0	n	0	0	n	n	n	1	n
212	m	26	21	23	0	1	n	0	1	n	n	n	1	n
213	m	70	52	56	1	0	n	0	1	n	n	n	2	n
214	m	65	58	33	0	0	n	0	0	n	n	n	5	n
215	w	72	28	27	0	0	n	0	1	n	n	n	1	n

216	m	60	59	48	0	0	n	0	1	n	n	n	5	n
217	w	76	64	61	0	0	n	0	1	n	n	n	1	n
218	m	46	39	32	0	0	n	0	0	n	n	n	1	n
219	m	43	33	33	0	0	n	0	0	n	n	n	1	n
220	w	42	39	24	0	0	n	0	0	n	n	n	5	n
221	m	52	46	45	1	0	n	0	1	n	n	n	1	n
222	m	62	50	50	0	0	n	0	1	n	n	n	5	n
223	m	54	48	44	1	1	n	0	1	n	n	n	5	n
224	w	68	56	47	0	0	n	0	1	n	n	n	1	n
225	m	58	51	48	0	0	n	0	0	n	n	n	1	n
226	w	71	66	61	0	0	n	0	1	n	n	n	3	n
227	m	59	44	39	0	0	n	0	0	n	n	n	1	n
228	w	66	66	51	0	0	n	0	1	n	n	n	5	n
229	m	44	34	34	0	0	n	1	1	n	n	n	1	n
230	m	50	31	28	0	1	n	0	0	n	n	n	1	n
231	w	79	77	71	0	0	n	0	0	n	n	n	1	n
232	m	48	24	22	0	0	n	0	1	n	n	n	1	n
233	m	44	n	9	0	0	n	0	0	n	n	n	1	n
234	w	35	32	32	1	0	n	0	0	n	n	n	1	n
235	m	49	40	36	0	0	n	0	1	n	n	n	1	n
236	m	44	37	37	0	0	n	0	1	n	n	n	1	n
237	w	62	46	44	1	0	n	0	1	n	n	n	1	n
238	m	31	26	16	0	1	n	1	0	n	n	n	3	n
239	m	44	35	35	0	0	n	0	0	n	n	n	1	n
240	m	41	40	34	0	0	n	0	0	n	n	n	1	n
241	w	81	51	56	0	0	n	0	1	n	n	n	1	1
242	m	51	48	44	1	0	n	0	0	n	n	n	1	n
243	w	45	37	36	0	0	n	0	1	n	n	n	2	n
244	m	40	24	24	0	1	n	0	1	n	n	n	1	n
245	m	46	23	14	0	0	n	0	1	n	n	n	3	n
246	m	31	27	26	0	0	n	1	0	n	n	n	1	1
247	n	n	n	32	0	1	0	1	1	0	1	1	n	n
248	n	n	n	55	1	1	0	0	1	0	0	0	n	n
249	n	n	n	26	0	1	0	0	0	0	1	0	n	n
250	n	n	n	26	0	1	1	0	1	0	1	0	n	n
251	n	n	n	41	0	1	0	0	1	0	1	1	n	n
252	n	n	n	n	0	0	0	0	0	0	1	1	n	n
253	n	n	n	25	0	0	0	0	1	0	1	1	n	n
254	n	n	n	n	0	1	n	0	0	0	1	n	n	n
255	n	n	n	n	1	1	n	0	1	0	1	n	n	n
256	n	n	n	6	0	0	0	0	0	0	1	1	n	n
257	n	n	n	n	0	1	n	1	1	0	1	n	n	n
258	n	n	n	n	0	n	n	n	n	n	n	n	n	n
259	n	n	n	57	1	0	1	0	1	0	1	1	n	n
260	n	n	n	27	1	1	0	1	1	0	1	0	n	n

261	n	n	n	n	0	1	n	0	1	0	1	0	n	n
262	n	n	n	n	0	0	n	0	1	0	1	n	n	n
263	n	n	n	n	0	1	0	0	0	0	1	0	n	n
264	n	n	n	39	0	0	0	0	1	0	1	0	n	n

Patientendaten Psoriasis

Legende:

Geschlecht: m= männlich w= weiblich

Alter bei: PE = Probenentnahme; ED= Erstdiagnose

1= positiv; 0= negativ; n= unbekannt;

Medikation: 1= DMARDs; 2=DMARDs Kombi; 3=Biologicals; 4= DMARDs + Biologicals,
5= NSARs/keine

Nr.	Geschlecht	Alter bei PE	Alter bei ED	PGRN-AK	Medikation
1	m	45	n	0	n
2	m	44	40	0	5
3	w	37	9	0	3
4	m	68	45	0	n
5	w	54	n	0	5
6	w	70	68	0	5
7	m	64	n	0	n
8	m	60	54	0	5
9	w	46	16	0	5
10	m	38	34	0	5
11	m	48	n	0	n
12	m	71	n	0	n
13	w	74	36	0	n
14	m	59	42	0	5
15	w	49	19	0	5
16	m	49	23	0	5
17	w	46	n	0	n
18	w	76	n	0	n
19	w	53	n	0	n
20	m	41	6	0	3
21	m	45	n	0	n
22	m	43	n	0	n
23	m	61	n	0	n
24	m	44	n	0	n
25	m	51	n	0	n
26	m	25	n	0	n
27	m	58	51	0	5
28	w	63	n	0	n
29	w	68	40	0	5
30	w	23	16	0	5
31	m	47	n	0	n
32	m	63	n	0	3
33	m	72	48	0	5
34	w	25	20	0	5
35	w	76	74	0	5
36	m	47	17	0	5
37	m	61	33	0	3

38	m	52	n	0	n
39	m	40	8	0	5
40	m	58	18	0	5
41	m	66	37	0	5
42	m	47	42	0	5
43	w	56	n	0	n
44	m	43	29	0	n
45	m	56	52	0	5
46	w	31	n	0	n
47	m	69	n	0	n
48	w	40	40	0	5
49	w	57	50	0	5
50	m	54	n	0	n
51	w	60	53	0	5
52	m	66	63	0	5
53	w	36	n	0	n
54	m	43	41	0	5
55	m	21	11	0	5
56	w	56	n	0	n
57	m	68	18	0	5
58	m	32	n	0	n
59	m	35	n	0	n
60	m	29	n	0	n
61	m	48	n	0	n
62	w	33	n	0	n
63	m	35	26	0	n
64	m	34	32	0	n
65	m	51	n	0	5
66	m	50	50	0	5
67	m	50	10	0	5
68	m	66	58	0	5
69	m	37	7	0	5
70	w	56	45	0	5
71	m	68	58	0	5
72	m	50	14	0	5
73	w	56	40	0	5
74	w	75	73	0	5
75	m	23	10	0	5
76	w	57	17	0	5
77	m	37	19	0	5
78	m	39	31	0	5
79	w	16	15	0	5
80	w	60	n	0	n
81	m	44	n	0	n
82	m	76	n	0	n

83	w	65	n	0	n
84	w	57	n	0	n
85	w	66	n	0	n
86	m	51	n	0	n
87	m	49	n	0	3
88	m	52	13	0	3
89	m	51	n	0	n
90	m	39	n	0	3
91	m	46	n	0	5
92	m	62	n	0	n
93	m	37	34	0	5
94	m	62	n	0	n
95	m	40	18	0	1
96	m	32	22	0	5
97	m	42	28	0	n
98	m	71	n	0	n
99	m	60	n	0	n
100	m	33	n	0	n

Patientendaten rheumatoide Arthritis

Legende:

Geschlecht m= männlich w= weiblich

Alter bei: PE = Probenentnahme; ED= Erstdiagnose

1= positiv; 0= negativ; n= unbekannt;

RF= Rheumafaktor

Meds: 1= DMARDs; 2=DMARDs Kombi; 3=Biologicals; 4= DMARDs + Biologicals,
5= NSARs/keine

Steroide: 1=zusätzliche Glukokortikoidgabe; 0=keine zusätzliche Glukokortikoidgabe

Nummer	Geschlecht	Alter bei PE	Alter bei ED	Anti-PGRN	RF	erosiv	Medikation	Steroide	A-CCP
1	w	61	61	0	1	1	1	0	0
2	m	64	63	0	0	0	1	0	1
3	w	63	54	0	1	1	4	1	n
4	m	56	55	1	0	0	1	0	0
5	w	54	40	0	1	1	1	0	0
6	w	66	56	1	1	1	1	1	0
7	m	61	60	0	0	0	2	1	0
8	w	64	63	0	1	1	4	1	1
9	w	57	55	1	0	0	4	0	0
10	m	56	55	1	1	1	4	0	0
11	w	72	66	1	1	0	4	1	1
12	w	49	34	0	1	0	4	0	0
13	m	58	53	1	1	1	2	0	0
14	w	77	63	1	1	1	2	0	n
15	m	66	62	0	1	0	2	0	1
16	w	67	58	0	1	1	2	0	0
17	m	n	41	1	0	1	4	0	1
18	m	59	58	0	0	0	4	1	1
19	w	39	30	1	1	1	1	1	1
20	w	56	56	0	0	0	5	0	0
21	w	72	64	0	0	0	1	0	1
22	m	66	49	0	1	n	5	1	0
23	w	n	62	0	1	1	4	1	1
24	w	42	25	1	1	0	2	1	0
25	w	54	47	0	1	1	2	0	0
26	w	56	50	0	1	0	3	1	n
27	w	58	58	0	1	0	5	0	1
28	w	72	72	1	1	0	5	0	1
29	w	58	53	0	0	0	2	0	n
30	w	n	49	0	0	1	4	0	0
31	w	52	43	0	1	1	1	0	n
33	m	63	49	0	1	0	1	1	0
34	w	60	53	1	1	1	4	1	1
35	w	71	64	1	1	1	1	1	n
36	w	48	46	0	1	0	4	0	1

37	w	63	56	0	1	1	4	1	0
38	w	69	61	1	1	0	4	0	0
39	w	71	52	0	1	1	4	1	0
40	w	73	68	1	1	1	4	1	0
41	w	54	52	0	1	0	2	1	0
42	w	59	58	0	1	1	1	1	1
43	m	46	44	0	1	0	4	1	1
44	w	47	36	1	0	0	1	1	0
45	w	63	61	0	0	1	1	1	0
46	w	76	56	0	1	1	5	0	1
47	w	56	30	0	0	0	2	0	1
48	w	69	66	1	0	0	1	0	0
49	w	77	19	0	1	1	2	0	0
50	m	71	61	1	1	1	4	0	1
51	w	37	35	0	1	0	1	0	1
52	w	50	43	0	1	0	1	0	n
53	w	41	24	0	1	1	4	0	1
54	m	71	71	1	1	0	5	0	0
55	w	58	57	1	1	1	1	0	1
56	w	58	54	0	1	0	2	1	0
57	w	56	51	0	0	0	1	0	0
58	w	66	54	0	0	0	2	1	1
59	w	29	29	0	1	0	5	1	0
60	w	84	65	1	1	0	5	1	1
61	w	46	46	1	0	0	5	1	
62	m	51	49	0	1	0	4	0	0
63	w	76	69	0	0	0	2	0	n
64	m	54	52	0	1	1	5	1	1
65	w	56	60	1	1	0	5	0	0
66	w	68	42	0	1	1	1	0	0
67	w	56	47	0	1	1	4	0	n
68	w	62	62	0	1	1	5	0	0
69	w	54	45	1	1	1	3	1	1
70	w	51	32	0	1	1	4	1	1
71	w	62	62	0	1	1	3	0	0
72	w	67	54	0	1	0	1	0	1
73	w	65	65	0	0	0	5	0	0
74	w	79	53	0	1	n	1	1	0
75	w	59	n	1	1	1	1	1	n
76	w	81	72	0	1	1	1	1	0
77	m	57	47	0	1	0	4	0	n
78	w	72	70	0	1	n	1	0	0
79	w	48	31	0	1	1	4	0	n
80	w	52	52	0	0	0	5	1	n
81	w	56	55	1	0	n	1	1	0

82	m	68	n	0	n	n	1	0	n
83	w	40	40	0	0	1	5	0	n
84	w	49	44	0	1	n	2	1	1
85	w	70	n	0	0	n	5	1	0
86	m	40	40	0	0	0	1	1	n
87	m	70	68	0	1	0	1	1	n
88	w	55	48	0	0	0	1	0	1
89	w	36	33	1	0	0	2	1	0
90	w	68	68	0	1	0	5	1	1
91	w	56	43	0	1	0	3	1	1
92	w	44	43	1	0	n	1	0	0
93	w	47	46	0	0	1	1	0	0
94	w	68	68	0	1	0	1	1	n
95	w	58	55	1	n	n	1	0	1
96	w	78	71	0	n	1	1	0	1
97	w	84	64	0	n	n	1	1	n
98	w	52	50	0	1	0	1	1	n
99	w	61	60	1	0	1	1	1	1
100	w	49	45	1	0	0	2	0	n
101	w	33	33	0	1	0	2	0	n
102	m	34	32	0	0	0	1	1	n
103	w	64	48	0	1	1	4	0	0
104	w	50	50	0	0	0	1	0	n
105	m	53	n	1	1	0	5	0	1
106	w	56	54	0	0	0	5	0	1
107	w	35	30	1	1	1	4	0	0
108	w	68	68	0	0	0	5	1	1
109	w	44	41	0	1	1	5	0	1
110	w	47	47	0	n	0	1	0	n
111	m	64	n	0	n	0	5	1	n
112	w	41	n	0	n	1	n	0	0
113	w	69	56	1	1	1	3	1	1
114	w	59	n	1	n	0	n	0	1
115	m	64	42	0	1	0	4	0	1
116	m	68	44	0	1	0	1	1	n
117	m	25	25	0	1	0	1	1	0
118	w	64	48	0	1	1	1	0	n
119	m	58	57	0	1	n	1	1	0
120	w	49	27	1	1	1	n	0	0
121	w	74	73	0	1	0	1	1	1
122	w	55	51	1	1	1	1	1	1
123	w	64	62	0	1	0	1	1	1
124	w	57	54	0	1	0	3	0	n
125	w	58	n	0	n	n	n	0	1
126	w	34	33	0	1	0	1	1	1

127	m	69	n	1	1	n	1	1	1
128	w	71	69	0	n	0	1	1	1
129	w	72	n	1	0	0	5	1	0
130	w	64	59	0	1	0	n	0	1
131	w	51	48	0	0	0	1	1	1
132	w	77	55	0	1	1	5	0	n
133	w	41	n	0	n	0	n	0	0
134	w	40	39	0	1	1	4	0	n
135	m	69	65	0	1	1	1	1	1
136	w	52	52	0	1	0	5	0	1
137	w	63	60	0	1	1	1	0	n
138	w	62	49	0	1	1	1	0	n
139	w	76	72	1	1	1	1	0	0
140	w	75	71	0	1	1	4	0	1
141	w	70	n	0	n	0	n	0	0
142	w	27	26	1	1	1	1	1	0
143	w	80	43	0	1	0	4	0	0
144	w	46	n	0	0	0	n	0	n
145	w	51	47	0	1	0	5	0	n
146	w	70	n	0	0	1	n	0	1
147	w	50	36	0	0	1	2	0	n