

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. Dezember 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/097125 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/02010

(22) Internationales Anmeldedatum:
30. Mai 2002 (30.05.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 27 572.2 30. Mai 2001 (30.05.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): PATHOARRAY GMBH [DE/DE]; Pine Private Equity,
Jägerstrasse 51, 10117 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HÄUPL, Thomas
[DE/DE]; Am Schützenwäldchen 59, 15537 Erkner (DE).
UNGETHÜM, Ute [DE/DE]; Chausseestrasse 93, 10115
Berlin (DE). BLÄSS, Stefan [DE/DE]; Furkastrasse 74,
12107 Berlin (DE).

(74) Anwalt: WEHLAN, Helmut; Paul-Gesche-Strasse 1,
10315 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: TOOLS FOR THE DIAGNOSIS, MOLECULAR DEFINITION AND DEVELOPMENT OF TREATMENT OF
CHRONIC INFLAMMATORY JOINT DISEASES

(54) Bezeichnung: WERKZEUGE ZUR DIAGNOSTIK, MOLEKULAREN DEFINITION UND THERAPIEENTWICKLUNG
CHRONISCHER ENTZÜNDLICHER GELENKERKRANKUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to tools for the diagnosis, molecular definition and development of treatment of chronic inflammatory joint diseases and other inflammatory, infectious or tumourous diseases. According to the invention, genome data (genomics), proteome data (proteomics) and immunome data (immunomics) are used in the analysis and development of treatment of chronic joint diseases. The invention is based on the use of gene sequences and derived mRNAs and proteins, in addition to antibodies having a specific nature for the derived proteins, for characterising inflammatory and non-inflammatory rheumatic joint diseases, auto-immune diseases and infectious diseases. Etiologically significant pathogenicity principles of chronic inflammatory joint diseases which have been unclear until now can be derived from the examinations carried out. Furthermore, interpretation algorithms can be created for the classification, prognosis evaluation and treatment optimisation of said joint diseases, and new strategies for treatment and points of attack for medicaments can be derived.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Werkzeuge zur Diagnostik, molekularen Definition und Therapie-Entwicklung chronischer entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen auf der Grundlage von Genomdaten (Genomics), Proteomdaten (Proteomics) und Immunomdaten (Immunomics) in der Analyse und Therapie-Entwicklung bei chronischen Gelenkerkrankungen. Die Erfindung beruht auf der Verwendung von Gensequenzen sowie abgeleiteten mRNAs und Proteinen sowie auf Antikörpern mit Spezifität für die abgeleiteten Proteine zur Charakterisierung von entzündlich-rheumatischen und nicht-entzündlichen rheumatischen Gelenkerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Infektionserkrankungen. Aus den Untersuchungen können ätiologisch bedeutsame Pathogenitätsprinzipien der bislang ungeklärten chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen abgeleitet werden. Ferner können Interpretationsalgorithmen zur Klassifikation, Prognosebeurteilung und Therapieoptimierung dieser Gelenkerkrankungen aufgebaut und neue Therapiestrategien und Angriffspunkte für Medikamente abgeleitet werden.



WO 02/097125 A2

Werkzeuge zur Diagnostik, molekularen Definition und Therapieentwicklung chronischer entzündlicher Gelenkerkrankungen

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Werkzeuge zur Diagnostik, molekularen Definition und Therapie-Entwicklung chronischer entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen auf der Grundlage von Genomdaten (Genomics), Proteomdaten (Proteomics) und Immunomdaten (Immunomics) in der Analyse und Therapie-Entwicklung bei chronischen Gelenkerkrankungen. Die Erfindung beruht auf der Verwendung von Gensequenzen sowie abgeleiteten mRNAs und Proteinen sowie auf Antikörpern mit Spezifität für die abgeleiteten Proteine zur Charakterisierung von entzündlich-rheumatischen und nicht-entzündlichen rheumatischen Gelenkerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Infektionserkrankungen. Aus den Untersuchungen können ätiologisch bedeutsame Pathogenitätsprinzipien der bislang ungeklärten chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen abgeleitet werden. Ferner können Interpretationsalgorithmen zur Klassifikation, Prognosebeurteilung und Therapieoptimierung dieser Gelenkerkrankungen aufgebaut und neue Therapiestrategien und Angriffspunkte für Medikamente abgeleitet werden.

Charakteristik des bekannten Standes

Problemstellung

Chronisch entzündliche Gelenkerkrankungen sind ätiologisch nicht geklärt. Die rheumatoide Arthritis (RA - Abkürzungsverzeichnis hinter den Beispielen) ist der klassische Vertreter dieser Erkrankungen. Wesentliche Krankheitsabläufe finden in der entzündlich veränderten Synovialmembran statt und führen zur chronischen Gelenkschädigung. Das klinische Erscheinungsbild präsentiert sich sehr heterogen und legt nahe, dass es sich um verschiedene Entitäten mit dem gemeinsamen Symptom der destruktiven Synovitis handelt. Diese Erkrankungen sind auch als systemische Erkrankungen zu verstehen, bei denen zahlreiche Veränderungen im Blut beobachtet werden und mitunter schwerwiegende Organmanifestationen auftreten können.

Überschießende Entzündungsaktivitäten durch Fehlregulationen in der Entzündungskaskade werden als hauptverantwortliche Pathomechanismen diskutiert. Ferner werden Autoimmunreaktionen beschrieben, die eine Beteiligung des spezifischen humoralen und zellulären Immunsystems am Krankheitsprozeß nahelegen. Es werden jedoch auch andere Mechanismen wie enzymatische Gewebeerstörung, Zell- und Gewebeproliferation oder Regeneration diskutiert, die in der Pathogenese ebenfalls eine wichtige Rolle spielen könnten.

Ob diese genannten Pathomechanismen die einzigen und alleinrelevanten sind, konnte bislang nicht abschließend geklärt werden. Auch ist unbekannt, welche Parameter all diese Veränderungen gleichzeitig erfassen können. Als Folge des ungenügenden pathophysiologischen Verständnisses existieren zwar viele Medikamente, die Hauptvertreter verfolgen jedoch nur ein wesentliches Therapiekonzept:

Orientierend an dem gemeinsamen Symptom der überschießenden Entzündung zielt die aktuelle Therapie nämlich auf die Unterdrückung der Entzündung ab. So genannte Basistherapien besitzen immunmodulatorischen und krankheitsmodifizierenden Charakter. Sie greifen in Grundmechanismen des Zellstoffwechsels und der Zellaktivität ein (z.B. Methotrexat, Azathioprin). Die umfassenden Prinzipien der molekularen Wirkungsweise dieser Therapien bei den Gelenkerkrankungen sind jedoch nur unzureichend bekannt. Deshalb fehlen auch entsprechende Parameter, um die Therapieeffizienz einzelner Basistherapien differentiell und spezifisch im Individualfall zu kontrollieren.

Bisherige Werkzeuge

Patienten mit Gelenkentzündung werden im klinischen Alltag heute nach folgenden Kriterien beurteilt: berichteter Krankheitsverlauf (Anamnese), klinische Untersuchung (Befallsmuster der Gelenke, Organbefall), Entzündungsparameter (unspezifische Entzündungshinweise aus der Serumelektrophorese, der Blutsenkung und dem C-reaktiven Protein), Autoimmunparameter (Rheumafaktor, antinukleäre Antikörper und wenige spezielle Autoantikörper wie anti-Ro, -La, -U1RNP, -Sm, -Histon, -Scl70, -Centromer, -dsDNA, -Phospholipid-Antikörper), genetische Disposition über HLA-Marker (DR4, B27, DR3), Bildgebung (destruktive Veränderungen in den Röntgenbefunden der Gelenke), erweiterte Organdiagnostik durch Routineparameter der Labordiagnostik (Leberenzyme, Muskelenzyme, Nierenretentionswerte) und ggf. weiterführende sonographische, radiologische und magnetresonanztomographische Techniken. Diese liefern nur sehr eingeschränkt Aussagen über die prognostisch zu erwartende Aggressivität der Erkrankung oder die konkrete Erfolgsaussicht eines Basistherapeutikums im individuellen Krankheitsfall. Zudem sind die Diagnosekriterien heute nicht darauf ausgelegt, die Vielfalt der Erscheinungsformen innerhalb der häufigsten Arthritis-Erkrankung, der RA, ausreichend zu klassifizieren (1 - Referenzen hinter den Beispielen). Insbesondere in der Frühphase der Erkrankung ist die Diagnosestellung schwierig und unsicher. Aber bereits nach einem Jahr Krankheitsdauer sind bei der Mehrzahl der Patienten irreversible Gelenkschädigungen eingetreten. Aus Früh-Arthritis-Studien ist bekannt, dass eine frühere Sicherung der Diagnose, gefolgt von einer adäquaten Therapie, entscheidende Verbesserungen in der langfristigen Entwicklung der Erkrankung mit sich bringt. Es werden deshalb dringend neue Methoden und Kriterien benötigt, die über das klinische Bild hinausgehend molekulare Merkmale integrieren.

Auch die Verlaufskontrolle für den Therapie-Erfolg wird bislang mit Hilfe von oben genannten Methoden der Diagnostik durchgeführt. Viele dieser Parameter verändern sich nur sehr langsam. Sie

erfordern viele Wochen bis Monate Verlaufsbeobachtung, um die Aussage zu treffen, ob das gewählte Medikament wirksam ist. Nicht selten muss wegen mangelhafter Besserung und Progredienz der Erkrankung auf ein anderes Medikament umgestellt werden. Grundsätzlich ist eine Heilung der Erkrankungen mit den derzeit verfügbaren Medikamenten nicht möglich.

5 *Experimentelle Ansätze*

Über die etablierten Werkzeuge hinaus gibt es zahlreiche experimentelle Ansätze, die Diagnostik insbesondere der RA zu verbessern.

Dies betrifft die Suche nach Schlüsselproteinen, die 1.) den Entzündungsablauf in einer zentralen Position aufrechterhalten bzw. verhindern können, die 2.) maßgeblich an der enzymatischen Zerstörung der Knorpel- und Knochenmatrix beteiligt sind bzw. diese Enzyme inhibieren oder die 3.) regenerative und reparative Prozesse induzieren bzw. deren Gegenspieler inhibieren können. So zeigt sich die Rolle der entzündungsvermittelnden Zytokine Tumornekrosefaktor (TNF-) alpha und Interleukin (IL-) 1 beta als wesentlich und hat entsprechende Therapieansätze in die klinische Anwendung gebracht. Obgleich eine Hemmung von TNF-alpha in vielen Fällen eine mit herkömmlichen Mitteln nicht ausreichend beeinflussbare RA lindern kann, führen die Erfolge dennoch nicht zu einer Heilung der Erkrankung. Zum Teil ist die Hemmung so stark, dass Infektionen oder gar septische Komplikationen entstehen und dennoch keine ausreichende Kontrolle der Arthritis erreicht wird. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass der TNF-alpha-Entzündungsweg zumindest nicht der einzige zentrale Pathomechanismus der Erkrankung sein kann. Neben den beiden genannten Zytokinen wird die Rolle zahlreicher weiterer Botenstoffe in der Pathogenese der Arthritis erforscht. Zudem treten die angeschlossenen intrazellulären Signalwege zunehmend in das Blickfeld therapeutischer Interventionsmöglichkeiten.

Ferner stehen Matrixmetalloproteinasen und Cathepsine im Mittelpunkt der enzymatischen Zerstörung von Knorpel und Knochen.

Untersuchungen zu regenerativen Mechanismen stehen erst am Anfang der Erforschung. Vorrangig sind hier Botenstoffe aus der Transforming Growth Factor (TGF-) beta-Familie zu benennen. Eine Vielzahl dieser Vertreter spielt eine große Rolle in der Entwicklung des Bewegungsapparates. Erste Untersuchungen an Synovialgewebe und Knorpel haben gezeigt, dass Vertreter dieser Gruppe von Wachstumsfaktoren und Morphogenen auch im erwachsenen Synovialgewebe produziert werden. Bei entzündlichen Gelenkerkrankungen konnte in eigenen Untersuchungen gezeigt werden, dass einzelne dieser Faktoren offensichtlich relativ erniedrigt sind. Ferner konnte für Bone Morphogenetic Protein (BMP-) 7 gezeigt werden, dass die zelluläre Invasion in sich formierendes künstliches Knorpelgewebe unterdrückt wird (2).

Viele der genannten Faktoren und Enzyme sind auch bei anderen Gelenkerkrankungen wie der Osteoarthritis oder den reaktiven Arthritiden zu finden und stellen für sich betrachtet keinen diagnostisch wegweisenden Parameter dar.

Die experimentellen Ansätze zielen auch darauf ab, dass bei der RA autoreaktive T- und B-Zellen auftreten und die Erkrankung zu den Autoimmunerkrankungen gezählt wird. Dies geht zurück auf die Entdeckung des sogenannten Rheumafaktors, eines Autoantikörpers, der gegen Immunglobulin G gerichtet ist. Rheumafaktoren treten jedoch nur bei etwa zwei Drittel der RA-Patienten auf, dafür aber auch bei anderen rheumatischen und nicht-rheumatischen Erkrankungen und sogar in bis zu 5% der Gesunden (mit zunehmendem Lebensalter noch deutlich darüber). Das Auftreten von Rheumafaktoren scheint unter bestimmten pathologischen Gegebenheiten, wie z.B. der bakteriellen Endokarditis, eine physiologische Reaktion des Körpers zu sein. Autoreaktive B-Zellen mit Spezifität für IgG liegen offenbar bei einem Großteil der Bevölkerung vor und können durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert werden. Der Begriff "Rheumafaktor" ist dennoch erhalten geblieben, weil sich lediglich für die RA eine diagnostische und prognostische Bedeutung ergibt.

Gleiche Charakteristika gelten aber qualitativ für nahezu alle bislang bekannten Autoantikörper bei der RA: eine Frequenz der positiven Patienten liegt deutlich unter 100% und die Krankheitsspezifität teilweise ebenfalls deutlich unter 100%. Der klinisch ausgeprägten Heterogenität der RA in Befallsmuster, Intensität der Entzündung und schubweisem Verlauf steht somit eine Heterogenität der immunologisch fehlregulierten Prozesse gegenüber. Diese klinische und immunologische Heterogenität unterstützt ebenfalls die Vermutung, dass die "rheumatoide Arthritis" ein Sammelbegriff für unterschiedliche Krankheitsentitäten sein könnte. Als Paradebeispiel dient hier die Unterscheidung in RF-positive und -negative (RF – Rheumafaktoren) RA, wobei der ersteren Form ein schwererer Verlauf mit höherem Destruktionspotential und systemischer humoraler Aktivität nachgesagt wird. Der Begriff seronegativ impliziert fälschlicherweise sogar das Fehlen jeglicher Autoantikörper. Aber weder für den Rheumafaktor noch für irgendeine der bekannten Autoreaktivitäten konnte bislang eine Ursächlichkeit für die Entstehung der RA oder einer ihrer postulierten Untergruppen oder Verlaufsformen nachgewiesen werden.

Autoantikörper werden bei anderen rheumatischen Autoimmunerkrankungen wie den Kollagenosen mit dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) als Hauptvertreter zur diagnostischen Einteilung verwendet. Eine primäre Pathogenität dieser Autoantikörper wird immer wieder diskutiert. Sicher ist bei hohem Autoantikörper-Titer in Verbindung mit einer unkontrollierten überschießenden Freisetzung von Autoantigenen im Krankheitsschub die daraus folgende Immunkomplexbildung und Komplementaktivierung mit Organschädigungen insbesondere der Niere und vaskulitischen Merkmalen assoziiert. Die Bedeutung autoreaktiver B- und T-Zellen für die RA ist jedoch ungeklärt. Stattdessen werden immer neue Autoantigene als Ziele einer autoreaktiven Immunantwort bei der RA beschrieben. Einige dieser Antigene sind biochemisch und in Bezug auf ihre Antigenität gut charakterisiert, von anderen hingegen sind erst wenige Parameter bekannt. Für ihre Entdecker waren

einige Autoantikörper sehr vielversprechend, weil B- und/oder T-Zell-Antwort scheinbar hoch RA-spezifisch waren. Das Interesse an diesen Antikörpern nahm aber dann immer schnell ab, wenn dieselben Autoreaktivitäten auch bei anderen Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden konnten. Mittlerweile sind zahlreiche T-zelluläre Autoreaktivitäten bei der RA charakterisiert, von denen nur die wenigsten RA-spezifisch sind.

Heatshock Proteine

Die RA wurde früh in den Verdacht gebracht, eine Infektionserkrankung zu sein. Es wurden daher diverse xenogene – meist mikrobielle und virale – Antigenquellen untersucht, um potentielle Erreger als Trigger für Autoreaktivität nachzuweisen. Eines der potentiell RA-induzierenden Agenzien war *Mycobacterium tuberculosis*, weil es im Tiermodell die Adjuvans-Arthritis induziert, eine Erkrankung, die in gewissen Aspekten der menschlichen RA ähnelt. Diese experimentelle Erkrankung konnte auch ausgelöst werden durch mykobakterielles Heatshockprotein 65 (mt-Hsp65) oder mit T-Zellen, die für dieses Antigen spezifisch sind. Heatshockproteine helfen natürlichen Proteinen bei der korrekten Faltung und erzeugen Tertiär- und Quartärstrukturen. mt-Hsp65 ist homolog zu dem essentiellen Hsp60 bei Säugern. Berichte über mt-Hsp65-spezifische T-Zellen und Antikörper in Synovialflüssigkeit von RA-Patienten legten nahe, dass das stark homologe humane Hsp60 als Autoantigen bei RA-Patienten erkannt würde. Jedoch sind diese Antikörper nicht RA-spezifisch: Sie treten auch bei Patienten mit Reiter-Syndrom, SLE und aktiver Tuberculose, wie auch bei Gesunden auf.

Obwohl die Reaktivität gegen mt-Hsp65 bei der RA keine dominante Rolle zu spielen scheint, könnte humanes Hsp60 dennoch in der Pathogenese der RA bedeutsam sein: In seiner Aminosäuresequenz besitzt humanes Hsp60 eine Identität über Bereiche von 11 bis 22 Aminosäuren mit Proteinen wie Cytokeratin und Hsp90. Es ist daher denkbar, dass autoreaktive T-Zellen oder Antikörper gegen diese Proteine ursprünglich von einer natürlich auftretenden – aber strikt regulierten – Hsp60-Reaktivität herrühren.

Dna J

Dna J, das bakterielle Stressprotein mit Homologie zu dem Säuger-Hsp70, weist die Aminosäuresequenz QKRAA auf, bekannter unter dem Namen *Shared Epitope*, welches für die RA prädisponiert (3). Dieses Epitop kommt ebenfalls in dem Epstein-Barr-Virus (EBV)-kodierte Protein gp110 vor. Dna J ist das Ziel autoreaktiver T-Zellen bei RA, nicht aber bei Gesunden (4). Obwohl noch unbekannt ist, wie Shared Epitope für die RA prädisponiert, ist ein denkbarer Mechanismus die Erzeugung des Shared Epitope-Peptides aus Nicht-MHC-Proteinen und deren anschließenden Präsentation auf MHC Klasse II-Molekülen unter Auslösung einer Immunantwort gegen Fremd (EBV-gp110) und Selbst (MHC Klasse II).

EBV-codiertes nukleäres Antigen

Epstein-Barr-Virus (EBV) ist schon früh in den Verdacht geraten, die RA auszulösen, obwohl es erst jüngst in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten nachgewiesen werden konnte. Ein Antikörper, gerichtet gegen das EBV-kodierte nukleäre Antigen (EBNA-1), zeigte starke Reaktivität mit einem p62-Protein aus synovialen Deckzellen bei Patienten mit RA. EBNA-1 beinhaltet eine Glycin-Alaninreiche Repeat-Sequenz (IR-3), die von Autoantikörpern bei Patienten mit RA, SLE, systemischer Sclerose (SSc) und infektiöser Mononucleose sowie bei gesunden Individuen mit vergleichbaren Häufigkeiten erkannt werden. EBNA-1 weist Kreuzreaktivität mit zahlreichen humanen Proteinen auf, typischerweise über die IR-3-Sequenz. Darunter sind im wesentlichen p62 und p542, wobei das letztere hauptsächlich von Antikörpern aus Patienten mit infektiöser Mononucleose, aber auch aus RA-Patienten erkannt wird. p542 wurde jüngst als 71k-Komponente von hnRNPs identifiziert aufgrund seiner hohen Sequenzidentität mit dem Maus-hnRNP namens Raly und Ähnlichkeiten mit dem humanen hnRNP C2.

Sa-Antigen; Filaggrin, citrullinierte Peptide/Proteine

Das Sa-Antigen (5), wie auch Filaggrin sind zwei seit neuerem bekannte Antigene, die nicht im entzündeten Gelenk vorkommen, aber die Aufmerksamkeit wegen der sehr RA-spezifischen Immunantwort auf sich zogen. Das Sa-Antigen ist ein 50k-Protein aus humaner Milz und Placenta. Sa-spezifische Antikörper kommen bei 43% der RA-Patienten vor und haben eine Krankheitsspezifität von 78% bis 99%. Filaggrin ist ein 42k-Protein, das intermediäre Filamente, insbesondere Cytokeratin, vernetzt und im Endothel vorkommt. Filaggrin-spezifische Antikörper scheinen die gleichen zu sein, wie der lange zuvor beschriebene "Antiperinukleäre Faktor" und die sogenannten Antikeratin-Antikörper. Die Hauptdeterminante des oder der Epitope, die von Anti-Filaggrin-Antikörpern erkannt werden, ist Citrullin, ein posttranslationell modifiziertes Arginin (6, 7). Die Sensitivität dieser Antikörper liegt zwischen 36% und 91% und die Spezifität zwischen 66% und 100%. Obwohl Filaggrin nur extra-artikulär vorkommt, konnte Citrullin mittlerweile auch in Synovialzellen nachgewiesen werden.

Collagen II

Collagen Typ II ist eine wesentliche Komponente des Gelenkknorpels und erscheint daher prädisponiert als Autoantigen für die RA. Folgerichtig haben sich viele Studien mit der Rolle der Collagen-spezifischen Immunantwort beschäftigt. Maus-T-Zellen, die mit bovinem Collagen Typ II reagieren, sind spezifisch für ein Epitop, das auch in humanem Collagen II vorkommt und darüber hinaus auch mit einem wichtigen T-Zell-Epitop aus Mäusen mit Collagen-induzierter Arthritis überlappt. Collagen Typ II ist eine Komponente der extrazellulären Matrix, die Tripelhelices aus identischen Tropocollagen-Untereinheiten ausbildet, die wiederum aus dem noch größeren Procollagen prozessiert werden. B-Zellen mit Spezifität für Collagen scheinen in den entzündeten

Gelenken von Patienten mit RA vermehrt aufzutreten. Collagen II-spezifische T-Zellen treten sowohl bei RA-Patienten wie auch bei Gesunden auf.

Besonderes Interesse galt der Collagen-Reaktivität im Rahmen der oralen Toleranz-Studien bei RA. Orale Toleranz kann im Tiermodell durch Antigene erzeugt werden, die in dem Kompartiment der (autoimmunen) Entzündung vorkommen, aber nicht notwendigerweise selbst in das Entzündungsgeschehen involviert sind. Wird ein solches Antigen oral appliziert, werden offenbar T-Zellen mit Spezifität für das gefütterte Antigen toleriert und können dann an anderem Ort, dem entzündeten Gelenk, über suppressive Faktoren, z.B. IL-10 und TGF- β , die sogenannte Bystander-Suppression erzeugen. Derart Collagen II-spezifische T-Zellen sollten die Entzündung bei RA heruntermodulieren. Jedoch haben drei Placebo-kontrollierte Doppelblindstudien zu oraler Toleranz durch die Applikation von Collagen II keine bemerkenswerte Verbesserung der Krankheitsaktivität ergeben. Ähnliches gilt bislang für die klinischen Studien mit Peptiden aus Hsp65 (Subreum).

Chondrozyten Antigen 65 (CH65)

Chondrozytenmembranen wurden als Ziel autoreaktiver T-Zellen bei RA- und Arthrose-Patienten beschrieben (8), wohingegen T-Zellen normaler Spender nicht reagierten. Darüber hinaus werden Chondrozytenmembranen bei 70% der RA-Patienten von Autoantikörpern erkannt. Antigen ist das knorpelspezifische CH65, welches eine Sequenzähnlichkeit zu mykobakteriellem Hsp65 und bestimmten Cytokeratinen aufweist. CH65 besitzt einen hohen Anteil an Glycin - ähnlich wie, aber nicht identisch mit Hsps. Die Sequenzen ähneln zwar denen von Cytokeratinen, sind aber dennoch völlig untypisch für diese. Solche Ähnlichkeiten verlocken zu der Annahme eines molekularen Mimikry zwischen mykobakteriellen und humanen Hsps mit anderen Proteinen. Dennoch findet sich keinerlei Kreuzreaktivität zwischen monoklonalen Antikörpern mit Spezifität für CH65, Cytokeratin oder Hsp65. T-Zell-Reaktivität wurde nur gegen ungereinigte Chondrozytenmembranen untersucht.

HC gp39

In der Synovialflüssigkeit treten viele Autoantigene auf, die nur bei kleinen Patienten- und Kontroll-Kohorten getestet wurden. Ein Beispiel ist das Human Cartilage Glycoprotein (HC gp39), ein wichtiges Produkt, das von artikulären Chondrozyten, Synovialzellen, Makrophagen später Differenzierungsstadien und Neutrophilen sezerniert wird. Der gp39-Spiegel ist bei Patienten mit degenerativer Gelenkerkrankung verglichen mit Gesunden in Serum und Synovialflüssigkeit erhöht. Später wurde gezeigt, dass ein erhöhter Titer nicht nur bei Osteoarthritis, sondern auch bei kolorektalem Karzinom, alkoholbedingter Leberzirrhose und Brustkrebs auftritt. gp39 hat nicht nur eine Bedeutung bei dem Umbau von Gewebe und der Degradation der extrazellulären Matrix, sondern es ist auch Ziel autoreaktiver T-Zellen bei der RA. Demzufolge sind auch Peptide aus der gp39-Sequenz daraufhin getestet worden, HLA-DR4 (DRB1*0401) zu binden und T-Zellen zu stimulieren. gp39-reaktive T-Zellen konnten bei 8 von 18 RA-Patienten und 3 von 11 Gesunden nachgewiesen

werden. Im Tiermodell führt eine Immunisierung von Balb/c-Mäusen zu einer chronischen Arthritis mit Schüben, die wiederum mit nasaler Applikation des gp39 kuriert werden konnte.

Rheumafaktor

Das bestbekannte Autoantigen der RA ist zugleich nicht gewebespezifisch, sondern kann nahezu ubiquitär auftreten. Es ist das Immunglobulin G (IgG) als das Ziel weiterer Antikörper, der sogenannten Rheumafaktoren (RF). Der Rheumafaktor ist nach wie vor der einzige serologische Parameter, der in den American College of Rheumatology (ACR)-Kriterien enthalten ist. Die pathologische Relevanz der RF für die RA wird immer noch kontrovers diskutiert, weil RF auch bei Patienten mit SLE, Sjögren Syndrom, Endokarditis, Lebererkrankungen und sogar bei Gesunden vorkommen. Der RF-Titer ist nicht streng mit klinischer oder serologischer Aktivität der RA oder der Gelenkerstörung korreliert.

hnRNP A2-Protein (RA33)

Das A2-Protein von humanen nukleären Ribonukleoproteinen (hnRNPs) ist ein ubiquitäres Protein, das ursprünglich als RA33 Autoantigen beschrieben wurde. Nachfolgend wurde dessen Identität mit der A2-Komponente gezeigt wie auch die Reaktivität mit Seren von Patienten mit SLE, Mischkollagenosen (Mixed Connective Tissue Disease; MCTD) und anderen. A2 ist mit zahlreichen anderen Faktoren komplexiert, die zusammengesetzt die hnRNPs im Zellkern ausmachen. Die exakte Funktion des A2 ist unbekannt, jedoch nimmt man eine Funktion beim Splicen der humanen nukleären Ribonukleinsäure (hnRNA) an. Daher hat A2 auch zwei RNA-Bindungsdomänen sowie ein Kernimport/-export-Signal. Antikörper bei RA und SLE richten sich gegen die Region zwischen den RNA-Bindungsdomänen, während die von MCTD-Patienten (Mixed Connective Tissue Disease – Mischkollagenose) ein diskontinuierliches Epitop erkennen, das sich aus beiden RNA-Bindungsdomänen zusammensetzt. Es ist noch nicht klar, wie das Immunsystem mit A2 in Kontakt kommt. Aus Sicht des Homunculus sind jedoch hnRNPs gute Kandidaten-Antigene für die RA. Bislang lässt sich aber nur spekulieren, dass unter bestimmten Umständen A2 an die Zelloberfläche gelangt, so z.B. beim Zerfall von Zellen im Rahmen einer Entzündung.

Calpastatin

Calpastatin ist ein ubiquitäres zytoplasmatisches Protein mit einer molekularen Masse von 72k und vier inhibitorischen Domänen für Calpaine. Calpaine umfassen eine Familie von Cystein-Proteasen, die unter dem Verdacht stehen, an der Gelenkerstörung bei rheumatischen Erkrankungen beteiligt zu sein. Calpaine kommen zytoplasmatisch vor und sind stringent reguliert durch Calciumionen für die Aktivierung und durch Calpastatin für die Inhibition. Nach Aktivierung von Zellen kommt Calpastatin auch extrazellulär vor und ist derart für Antikörper zugänglich. Calpastatin wird durch Autoantikörper erkannt bei Patienten mit RA, SLE, Polymyositis/Dermatomyositis (PM/DM), MCTD, aktivierter Arthrose und venöser Thrombose. Im Tiermodell an Calpastatin-defizienten Ratten lassen sich keine

Symptome einer Arthritis auslösen. Calpastatin, Calpaine und Calpastatin-spezifische Antikörper kommen in den entzündeten Gelenken von RA- und OA-Patienten vor und können daher in die Pathogenese dieser Erkrankungen involviert sein.

Calreticulin

5 Calreticulin ist ein ubiquitäres Protein des endoplasmatischen Reticulum (ER), welches unter bestimmten Bedingungen auch im Zellkern, dem Zytoplasma und auf der Zelloberfläche vorkommt. Es ist ein hoch konserviertes Ca^{++} -bindendes Protein. Calreticulin ist das Ziel von Autoantikörpern bei verschiedenen Erkrankungen autoimmunen oder entzündlichen Ursprungs, im wesentlichen bei SLE und Onchozerkose, aber auch bei RA. Schließlich bindet der RA-assoziierte Haplotyp DR4Dw4/DR53
10 ein Peptid aus Calreticulin.

BiP (Heavy Chain Binding Protein)

Ein weiteres vielversprechendes Zielantigen für den Homunculus der RA ist das ubiquitäre BiP (Binding Protein), das ursprünglich als Heavy Chain Binding Protein beschrieben wurde, da es mit den schweren Ketten von Immunglobulinen interagiert. BiP ist selbst ein residentes ER-Protein und besitzt
15 eine Peptidsequenz, die dafür sorgt, dass es normalerweise nicht exportiert wird. Mittlerweile ist bekannt, dass BiP ein sogenanntes molekulares Chaperon (Anstandsdame) ist und als solches mit den meisten Proteinen interagiert, die in das endoplasmatische Reticulum (ER) befördert werden und den sekretorischen Weg beschreiten. Über diese essentielle Funktionalität hinaus wird BiP durch Stressfaktoren wie Schwermetallionen oder Agenzien, die den Calciumionen-Haushalt der Zelle oder
20 die Integrität der Proteinbiosynthese beeinflussen, überexprimiert. Es kann unter diesen Bedingungen dann sogar im Zellkern, aber auch auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

BiP ist das Ziel autoreaktiver Antikörper und T-Zellen bei 66% der RA-Patienten und ursprünglich vor dem Hintergrund der RA als p68 beschrieben. Die Krankheitsspezifität dieser Autoantikörper liegt mit 99% extrem hoch. Das Antigen ist O-glykosyliert, und es wird spekuliert, dass diese Modifikation eine
25 regulatorische Funktion wie Mono-O-GlcNAc bei vielen anderen Proteinen haben könnte. In diesen Proteinen ist der Schalter von der O-GlcNAc zur O-Phosphat-Modifikation mit einem Wechsel des Aktivierungszustandes oder des zellulären Kompartments gekoppelt. Ähnlich könnte ein stressinduzierter Shift des BiP von ER zu Kern oder Zelloberfläche von pathogenetischer Bedeutung sein. Die eher unnatürliche Präsenz von BiP auf der Zelloberfläche könnte als Alarm- und
30 Aktivierungssignal für andere Zellen gelten, so auch für Zellen des Immunsystems. Bei der RA könnte eine solche Aktivierung durch eine lokale Infektion oder durch anderweitig entzündlich beschädigtes Gewebe geschehen. BiP könnte durch Zell- oder Gewebebeschädigung auf die Oberfläche geschädigter Zellen gelangen und dort dann Ziel autoreaktiver T-Zellen werden. Es gibt Anzeichen dafür, dass diese BiP-reaktiven T-Zellen auch natürlicherweise vorkommen, welche nach Abklingen
35 der verursachenden Bedingungen durch regulatorische T-Zellen wieder herunterreguliert werden. Diese regulatorischen Zellen sind antigenspezifisch und HLA-restringiert. Dabei ist offenbar die HLA-

Restriktion der regulatorischen T-Zellen unterschieden von der HLA-Restriktion der Effektor-T-Zellen und lässt sich spezifisch inhibieren. Hier könnte insbesondere auch wieder das Epitop O-GlcNAc eine besondere Rolle spielen: Es ist gut denkbar, dass dieses Epitop nicht nur Ziel der Autoantikörper- sondern auch der T-Zell-Antwort ist.

5 p205

Ein weiteres Protein, das aus Synovialflüssigkeit isoliert wurde, dessen Funktion jedoch weit über dieses Kompartiment hinaus geht, ist das p205-Antigen. Es ist Ziel autoreaktiver T-Zellen bei RA-Patienten. p205 wird auch in der Synovialmembran exprimiert und ist wahrscheinlich dasjenige Antigen mit der höchsten T-Zell-stimulatorischen Kapazität bei der RA überhaupt und erreicht teilweise sogar die Proliferationsrate, die mit Synovialflüssigkeit oder gar mit dem Lektin Phytohämagglutinin (PHA) erzielt werden kann. Die Funktion des p205-Antigens ist noch unbekannt. Es besitzt jedoch eine 11 Aminosäuren lange Sequenz, die identisch mit einem Bereich aus IgG ist, nämlich in der Region zwischen den konstanten Domänen C_H2 und C_H3, einem Bereich, in dem Rheumafaktoren binden. Dieser Bereich des p205 wird sowohl von monoklonalen Rheumafaktoren gebunden als auch von autoreaktiven T-Zellen erkannt. Ferner leisten p205-spezifische T-Zellen bei Stimulation mit cognatem Antigen B-Zell-Hilfe zur Sekretion von Rheumafaktoren. Es ist daher anzunehmen, dass hiermit erstmalig ein Antigen gefunden ist, das T-Zell-Reaktivität aufweist und darüber hinaus in der Lage ist, B-Zellen mit Spezifität für IgG Hilfe zur Affinitätsreifung zu geben. Im Gegensatz dazu konnte eine T-Zell-Reaktivität gegen intaktes IgG oder IgG-Fragmente bislang nicht gefunden werden. Möglicherweise handelt es sich bei der Aminosäuresequenz des p205 um ein Peptid, das *in vivo* bei der Prozessierung von IgG offenbar nicht oder in nicht ausreichenden Mengen entsteht. Somit erscheint es wahrscheinlich, dass Autoreaktivität gegen p205 die Produktion von Rheumafaktoren bei der RA induziert.

Diese Zusammenstellung RA-assoziiierter Autoreaktivitäten zeigt, dass viele verschiedene Autoantigene im Verlauf der RA zum Ziel des Immunsystems werden. Diese werden in mehr oder weniger starkem Ausmaß auch bei anderen rheumatischen und nicht-rheumatischen Erkrankungen, bis hin zum gesunden Zustand, Ziel des Immunsystems. Es bleibt somit festzustellen, dass nach dem Stand der Technik keine Autoreaktivität für sich alleine genommen geeignet ist, die Diagnostik der RA, weder in den Frühstadien noch im Verlauf oder für das Monitoring von Therapie, zu verbessern.

30

Das Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, chronisch entzündliche Gelenkerkrankungen besser erkennbar und behandelbar zu machen. Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der nachfolgend beschriebenen "Werkzeuge zur Diagnostik, molekularen Definition und Therapieentwicklung bei

chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen" und anderen entzündlichen, infektiösen oder tumorösen Erkrankungen gelöst.

High-Throughput Verfahren wie DNA-Array- oder Protein-Array-Technologie ermöglichen die gleichzeitige Bestimmung einer großen Anzahl verschiedener Parameter (9). Es können Gen-
5 Expressionen bestimmt werden auf mRNA-Ebene mittels DNA-Arrays durch Hybridisierung von markierten RNA oder cDNA-Proben und auf Protein-Ebene mittels Arrays von ausgewählten Protein-spezifischen Antikörpern (10). Ferner können Immunreaktivitäten mittels Arrays von ausgewählten Antigenen erfasst werden (11).

10 Zunächst ist erforderlich, die Gene und Proteine zu definieren, die für die Erkrankung relevant sind und zur Beurteilung herangezogen werden.

Die erfindungsgemäßen Werkzeuge zur Diagnostik und Therapie-Entwicklung bei entzündlichen Gelenkerkrankungen beruhen auf der Verwendung einer solchen definierten Auswahl von Parametern (Tabelle 1 und 2). Unter Verwendung dieser hier genannten Gene zur Genexpressionsanalytik im Array-Verfahren wird eine grundsätzlich neue Diagnostik ermöglicht.

15 Für DNA-Arrays zur Bestimmung spezifischer mRNA-Expressionsmuster bei Arthritiden können die in Tabelle 1 benannten Gene in ihrer Gesamtheit verwendet werden, sowie solche Gene in ihrer Gesamtheit, die für die Proteine, die in Tabelle 2 benannt sind, kodieren; darüber hinaus sind auch Gene oder Teilsequenzen einzelner oder einer Auswahl der in Tabelle 1 genannten Gene nutzbar, oder Teilsequenzen sowie Gene oder Teilsequenzen einzelner oder einer Auswahl der Gene oder
20 Teilsequenzen, die die in Tabelle 2 genannten Proteinen kodieren.

Für die Charakterisierung der Autoimmunreaktivitäten können die in Tabelle 2 benannten Proteine in ihrer Gesamtheit verwendet werden, sowie solche Proteine, die von den in Tabelle 1 benannten Genen kodiert werden. Ferner können auch eine reduzierte Auswahl dieser Proteine, ausgewählte Teile der Proteine in Form von Oligo- oder Polypeptiden oder auch Modifikationen derselben zum Einsatz
25 kommen. Auf Protein-Ebene sind insbesondere auch posttranslationale Modifikationen (z.B. Glykosylierung, Phosphorylierung etc.) zu berücksichtigen, die für eine Diskriminierung zwischen rheumatischen Erkrankungen relevant sein können. Die Proteine, Protein-Teilsequenzen sowie modifizierte Proteine und Protein-Teilsequenzen werden zusammen oder einzeln oder in Gruppen auf eine Trägermatrix aufgebracht, die geeignet ist, Patienten-Antikörper auf ihre Reaktivität gegenüber
30 einer oder mehrerer dieser Komponenten zu bestimmen. In der Folge ergibt sich für einen Patienten ein Profil von Reaktivitäten und Nicht-Reaktivitäten. Der gravierende Unterschied zwischen der Diagnostik nach dem Stand der Technik und der hier dargestellten ist die Ermittlung und Analyse jeweils einzelner Autoreaktivitäten bei dem Stand der Technik und der Ermittlung und Analyse einer Vielzahl von Autoreaktivitäten nach der Erfindung. Die Erfindung macht sich die unerwartete
35 Entdeckung zu Nutze, dass die Zusammenfassung mehrerer - für sich genommen ungeeigneter Autoreaktivitäten - zu einem oder mehreren Profilen, die beispielsweise eine RA in 100% der Fälle

von einer Nicht-RA (also anderen rheumatischen und nicht-rheumatischen Erkrankungen wie auch von dem gesunden Zustand) diskriminieren können. Die Zuordnung zu diskriminatorisch wirksamen Profilen erfolgt über einen geeigneten Algorithmus, optimal über einen selbst-lernenden, der in der Lage ist, auch zu einem späteren Zeitpunkt gewonnene Erkenntnisse einfließen zu lassen.

- 5 Für die Bestimmung von Proteinexpressionsmustern wurden Array-Systeme entwickelt aus proteinspezifischen Antikörpern. Durch Markierung der Proteine aus einem Proteinextrakt einer Probe können diese quantitativ nach spezifischer Bindung an ihren Antikörper auf dem Array nachgewiesen werden (10). Dementsprechend wird als molekulares Werkzeug im Sinne der Erfindung ein Array definiert, der aus verschiedenen Antikörpern oder Molekülen mit vergleichbarem proteinspezifischen Bindungsverhalten besteht, die zum Nachweis aller oder einer Auswahl der von den Genen der
10 Tabelle 1 abgeleiteten Proteine oder aller bzw. einer Auswahl der Proteine der Tabelle 2 dienen können.

Für die Diagnostik werden Biopsien aus dem Synovialgewebe, Synovialflüssigkeit, Blutzellen und auch Serum bzw. Plasma für die unterschiedlichen Array-Untersuchungen verwendet. Dabei können
15 die humoralen Autoreaktivitäten in den flüssigen Proben, die zellulären mit Blut- oder Synovialgewebszellen untersucht werden. Die Proteinexpression lässt sich in allen genannten Proben untersuchen, die Genexpression auf mRNA-Ebene im Synovialgewebe, in Zellen in der Synovialflüssigkeit oder in Blutzellen.

Für die Untersuchung mittels DNA-Arrays wird aus dem Gewebe oder den Zellproben aus Blut bzw.
20 Synovialflüssigkeit die RNA extrahiert. Unter Verwendung etablierter Protokolle für die Amplifikation (12) und die Markierung der abgeleiteten cDNA bzw. cRNA (13) wird eine Probe für eine DNA-Array-Hybridisierung hergestellt.

Die in der Tabelle genannten Gene liefern mit ihrer bekannten Sequenz (siehe Accession-Nummer GeneBank – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) die Vorlage, um für jedes Gen spezifische Sonden
25 abzuleiten. Diese Sonden werden in einem Array zusammengestellt, entweder durch Auftragen der fertigen Sonden über spezifische Druckverfahren (14) oder durch ortsspezifische Synthese wie bei der Photolithographie auf eine Festphase (15, 16).

Die Hybridisierung der markierten Probe auf dem Array liefert über die orts- und genspezifische Bindung quantitative Signale, die in ein Expressionsprofil /-muster übersetzt werden können. Die
30 Muster werden mit verschiedenen etablierten Methoden der Beurteilung korreliert, einschließlich der histologischen Merkmale und der Klassifikation. Durch zusätzlichen Vergleich mit verschiedenen Gelenkerkrankungen wie der Osteoarthritis, der Psoriasisarthritis, reaktiven Arthritiden oder anderen z.B. auch undifferenzierten Arthritiden erlaubt dies eine Einteilung der Patienten in verschiedene Gruppen gemäß dem jeweils entsprechenden Expressionsprofil.

Neuartigkeit des Ansatzes

Um zuverlässige Parameter für die Array-Untersuchung zu definieren, die eine Gruppierung und Beurteilung der Gelenkerkrankungen zulassen, wurden umfangreiche Vergleichsuntersuchungen durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Gelenkerkrankungen herangezogen und eine bislang
5 erstmalig verwendete Kombination von verschiedenen, sich zum Teil ergänzenden Methoden gewählt.

So wurde Synovialgewebe von RA, Osteoarthrose und normalen Gelenken untersucht. Zur differentiellen Genexpressionsanalyse wurde zunächst die "representational difference analysis" (17, 18) durchgeführt. Sie besitzt den Vorteil, dass alle in der Probe vorhandenen mRNAs berücksichtigt werden, auch dann, wenn ihre Sequenz bislang noch unbekannt ist. Der Nachteil besteht in einer
10 starken Selektion der ausgeprägtesten Expressionsunterschiede. Ergänzend dazu wurde deshalb zusätzlich die Genexpression mittels zwei verschiedener Methoden der DNA-Array-Hybridisierung durchgeführt, zum einen auf cDNA Filter-Arrays (19), zum anderen auf Oligonucleotid Mikro-Arrays (U.S. Patente Nr. 5,445,934; 5,744,305; 5,700,637 und 5,945,334 sowie EP 619321 und 373203). Diese ermöglichen es nach dem heutigen Kenntnisstand, weitgehend alle bekannten humanen Gene zu
15 berücksichtigen und für jedes dieser Gene individuell die Expression vergleichend zwischen den Gewebeproben darzustellen. Schließlich wurde mittels semiquantitativer Polymerasekettenreaktion (PCR) (real-time PCR) die differentielle Genexpression für ausgewählte Gene an einem größeren Probenkollektiv verifiziert.

Außerdem wurden Gewebe histologisch charakterisiert und entsprechend der histologischen
20 Einteilung auch mit dem zugehörigen differentiellen Genexpressionsmuster verglichen. Es wurden die in der Tabelle 1 aufgeführten Gene als differentiell exprimierte Gene sowohl zwischen den verschiedenen chronischen Gelenkerkrankungen und auch gegenüber normalem Synovialgewebe indentifiziert. Damit sind diese Gene bedeutsam für die Charakterisierung der chronischen Gelenkerkrankungen.

25 Es besteht somit auch eine Neuartigkeit im gewählten Ansatz, die relevanten Gene zu identifizieren. Zum anderen zeigte die Liste der gefundenen Gene, dass die meisten bislang noch nicht mit entzündlich-rheumatischen Gelenkerkrankungen in Verbindung gebracht wurden und ebenfalls neuartige Bewertungskriterien für die Diagnostik, die Erforschung der Pathophysiologie und die Behandlung der chronischen Gelenkerkrankungen liefern.

30 Die Merkmale der Erfindung gehen aus den Elementen der Ansprüche und aus der Beschreibung hervor, wobei sowohl einzelne Merkmale als auch mehrere in Form von Kombinationen vorteilhafte Ausführungen darstellen, für die mit dieser Schrift Schutz beantragt wird. Diese Merkmale setzen sich aus bekannten Elementen – den in Tabelle 1 benannten Genen oder Teilsequenzen sowie solchen Genen oder Teilsequenzen, die für die Proteine, die in Tabelle 2 benannt sind, kodieren – und neuen
35 Elementen – den neuen Werkzeugen, die auf der Verwendung einer definierten Auswahl von Parametern (Tabelle 1 und 2) beruhen – zusammen, die in ihrer Kombination zu den

erfindungsgemäßen Werkzeugen führen und unter Verwendung der genannten Gene zur Genexpressionsanalytik im Array-Verfahren eine grundsätzlich neue Diagnostik und Therapie-Entwicklung bei entzündlichen Gelenkerkrankungen ermöglichen.

Die erfindungsgemäßen Werkzeuge beruhen auf der Verwendung eines High-Throughput Verfahrens
5 der (Micro-) Array-Hybridisierung und / oder eines High-Throughput Verfahrens mit Techniken der Polymerase-Ketten-Reaktion zur (Semi-) Quantifizierung.

Sie sind des weiteren dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung einer markierten Patientenprobe und einer zweiten unterschiedlich markierten Kontrollprobe zur vergleichenden Doppel-Hybridisierung an einen (Micro-) Array zusammen mit der Patientenprobe (rot/grün
10 Vergleichs-Hybridisierung) beruhen. Es können die Proben auch auf getrennten Arrays untersucht werden und danach miteinander verglichen werden.

Erfindungsgemäß handelt es sich um Werkzeuge für diagnostische Zwecke, die auf der Verwendung

- einzelner, einer Auswahl oder aller aus den Gensequenzen in Anspruch 1 bis 3 abgeleiteten Proteine bzw. Peptide

15 - einzelner Proteine, einer Auswahl von Proteinen oder aller Proteine, die in der Tabelle 2 genannt sind sowie

- von Teilsequenzen einzelner Proteine, einer Auswahl von Proteinen oder aller Proteine, die in der Tabelle 1 genannt sind

beruhen.

20 Sie beziehen Proteine oder Protein-Teilsequenzen ein, die in ihrer Sequenz identisch zu den in der Tabelle 1 abgeleiteten Proteinen oder den in der Tabelle 2 genannten Proteinen sind oder mindestens 80% Sequenzidentität besitzen. Des weiteren sind sie dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung von

25 - High-Throughput Verfahren in der Protein-Expressionsanalytik (hochauflösende, zweidimensionale Protein-Gelelektrophorese, MALDI-Techniken)

- High-Throughput Verfahren in der Protein-Spotting Technik (Protein Arrays) zum Screening von Autoantikörpern als diagnostisches Werkzeug für entzündliche Gelenkerkrankungen und andere entzündliche, infektiöse oder tumoröse Erkrankungen beim Menschen

30 - High-Throughput Verfahren in der Protein-Spotting Technik (Protein Arrays) zum Screening von autoreaktiven T-Zellen als diagnostisches Werkzeug für entzündliche Gelenkerkrankungen und andere entzündliche, infektiöse oder tumoröse Erkrankungen beim Menschen sowie

- Nicht-High-Throughput Verfahren in der Protein-Spotting Technik zum Screening von autoreaktiven T-Zellen als diagnostisches Werkzeug für entzündliche Gelenkerkrankungen und andere entzündliche, infektiöse oder tumoröse Erkrankungen beim Menschen

beruhen.

Ferner beruhen die erfindungsgemäßen Werkzeuge auf der Verwendung

- von Antikörpern, die spezifisch für Proteine oder Teilsequenzen sind, die unter den Ansprüchen 6 bis 9 aufgeführt sind sowie

- 5 - der entsprechenden homologen Sequenzen einer anderen Spezies zur Analytik in Tierexperimenten oder zur Diagnostik bei Tieren mit entzündlichen Gelenkerkrankungen und anderen entzündlichen, infektiösen oder tumorösen Erkrankungen.

Die erfindungsgemäßen Werkzeuge eignen sich als diagnostische Werkzeuge zum Nachweis genetischer Veränderungen (Mutationen)

- 10 - in den unter Anspruch 1 bis 3 genannten Genen oder deren Regulationssequenzen (Promotor, Enhancer, Silencer, spezifische Sequenzen für die Bindung weiterer regulatorischer Faktoren) sowie
- in den Genen oder deren Regulationssequenzen (Promotor, Enhancer, Silencer, spezifische Sequenzen für die Bindung weiterer regulatorischer Faktoren), die für die in der Tabelle 2 genannten Proteine codieren.

- 15 Ferner eignen sie sich als Werkzeuge zur molekularen Definition entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der in Anspruch 1 bis 3 benannten Gene, DNA-Sequenzen oder davon abgeleitete Proteine oder Peptide sowie der Proteine und Protein-Teilsequenzen aus Anspruch 6 bis 9 oder den dafür codierenden Gensequenzen.

- 20 Die erfindungsgemäßen Werkzeuge werden des weiteren eingesetzt

- zum Therapie-Entscheid entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der in Anspruch 1 bis 3 benannten Gene, DNA-Sequenzen oder davon abgeleitete Proteine oder Peptide

- 25 - zur Verlaufskontrolle/Therapiekontrolle entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der in Anspruch 1 bis 3 benannten Gene, DNA-Sequenzen oder davon abgeleitete Proteine oder Peptide

- als molekulare Werkzeuge zur Entwicklung von Therapiekonzepten, die die direkte oder indirekte Beeinflussung der Expression der in Anspruch 1 bis 3 benannten Gene oder Gensequenzen beinhalten

- 30 - zur Entwicklung von Therapiekonzepten, die die direkte oder indirekte Beeinflussung der Expression der in Anspruch 6 bis 9 benannten Proteine oder Protein-Teilsequenzen zum Inhalt haben

- zur Entwicklung von Therapiekonzepten, die die direkte oder indirekte Beeinflussung autoreaktiver T-Zellen, gerichtet gegen die in Anspruch 8 bis 11 benannten Proteine oder Protein-Teilsequenzen, beinhalten

- zur Beeinflussung der biologischen Wirkung der aus den in Anspruch 1 bis 3 benannten Gensequenzen abgeleiteten Proteine
 - zur Beeinflussung der unmittelbaren molekularen Regelkreise, in die die in Anspruch 1 bis 3 benannten Gene und davon abgeleiteten Proteine eingebunden sind
 - 5 - zur Entwicklung von Therapiekonzepten unter Design und Verwendung von Interpretationsalgorithmen, die die genannten Gene und Sequenzen und deren Regulationsmechanismen verwenden, um Therapiekonzepte, -wirkungen, -optimierungen oder Krankheitsprognosen erkennen zu lassen oder vorausszusagen sowie
 - zur Entwicklung von biologisch wirksamen Medikamenten (Biologicals) unter Verwendung von
10 Genen, Gensequenzen, Regulation von Genen oder Gensequenzen, oder unter Verwendung von Proteinen, Proteinsequenzen, Fusionsproteinen nach Ansprüchen 1 bis 3 und 6 bis 9 oder unter Verwendung von Antikörpern oder autoreaktiven T-Zellen nach den Ansprüchen 10 bis 14.
- Die erfindungsgemäße Verwendung der beanspruchten Werkzeuge liegt in der
- Untersuchung von Blutproben oder Gewebeproben in der medizinischen Diagnostik
 - 15 - Anwendung in der Analytik nach Beispiel 1 sowie in der
 - Anwendung für Therapiekonzepte nach Beispiel 2.

Material und Methoden

Patienten und Gewebeasservierung

- 20 Alle Patienten wurden nach den ACR-Kriterien für RA (1) und OA (20) ausgewählt. Synovialgewebe wurde in RPMI-Medium (RPMI – handelsübliches Zellkulturmedium, Verdünnungsmedium RPMI 1640; Moore, G. E. et al., J. Am. Assoc. 199, 519 - 524, 1967), unter Zusatz von Penicillin und Streptomycin (je 100U/ml), vom Operationssaal direkt ins Labor gebracht. Nach Präparation der Synovialmembran wurden die Proben sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der
25 Proben bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -80°C . Es wurden für die Representational Difference Analysis (RDA), die Hybridisierungen auf Unigene Filter-Arrays (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>) und die Hybridisierung auf Affymetrix Arrays Normalspender (ND), Osteoarthrose (OA) und rheumatoide Arthritis Synovialgewebeproben verwendet.

30 *RNA-Isolation*

Zur RNA-Gewinnung wurden die Proben homogenisiert: Gewebemengen <50mg wurden mit Mörser und Pistill unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff zu Pulver zerrieben und anschließend in

- Guanidinium-Isothiocyanat enthaltender Lösung (RLT-Puffer der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland – www.qiagen.com/literature/handbooks/rna/rny96/1019545_PREHB_RNY96_prot2.pdf) lysiert. Größere Gewebemengen wurden mit einem Gewebe-Homogenisator; IKA-Ultra-Turrax T 25 (Jahnke & Kunkel, Staufen) in eiskalter Guanidinium-Isothiocyanat enthaltender Lösung (RLT-Puffer der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland) zerkleinert. Die RNA-Isolierung erfolgte mit einem modifizierten Protokoll, das die Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski (21) nutzt und anschließend aus der wässrigen Phase sofort die RNA mittels QIAGEN-RNAsy-Kit (Handbuch des Herstellers <http://www.qiagen.com/literature/rnalit.asp#mini>) extrahiert. Der Kit wurde gemäß Herstellerprotokoll eingesetzt. Die RNA wurde in 30-100µl RNase-freies Wasser eluiert.
- 10 Zur Qualitätskontrolle wurde die optische Dichte (OD) bei 260 nm (OD260) gemessen, das Verhältnis OD260/OD280nm bestimmt und eine Gelelektrophorese in 1%-iger Agarose durchgeführt. DNA-Kontaminationen konnten gegebenenfalls entweder im Gel detektiert oder nach Erststrangsynthese in einer PCR mit einem Intron-Primer für Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) nachgewiesen werden. In diesen Ausnahmefällen wurde zusätzlich mit DNase verdaut, entsprechend dem Protokoll von QIAGEN.
- 15

Erststrangsynthese

- Für die cDNA-Synthese wurde Superscript II Reverse Transcriptase (RT), einschließlich des 5-fach-Reaktionspuffers von Invitrogen/Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland <http://www.invitrogen.com>) verwendet. Die eingesetzten RNA-Mengen betragen 3-5µg für die semiquantitative PCR sowie 10-20µg für die RDA und die Array-Hybridisierungen in einem Endvolumen von 20µl. Der Reaktionsansatz für die Umschreibung in cDNA enthielt folgende Komponenten: 500ng des jeweiligen Oligonukleotids (Oligo(dT)₁₂₋₁₈; T7-Oligo (dT₂₄)) als Primer, 50 mM Tris, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, deoxy-Nukleotid-Triphosphat (dNTP) Mischung mit jedem Nukleotid in 1mM Endkonzentration, 40U RNase-Inhibitor and 20U SuperscriptTM II RT. Die Inkubationsdauer betrug 1 Stunde und 30min., und im Anschluss daran erfolgte die Inaktivierung der Enzyme durch 15min. Erhitzen auf 72°C.
- 20
- 25

Zweitstrangsynthese

- Zur cDNA wurden 90µl Aqua dest. pipettiert, 30µl 5fach-Zweitstrangpuffer folgender Zusammensetzung: 500mM KCl, 50mM Ammoniumacetat, 25mM MgCl₂, 0,75mM beta-Nikotinamid-Adenen Dinukleotid (β-NAD) und 0,25mg/ml bovinem Serumalbumin (BSA) sowie 3µL einer 10mM dNTP-Lösung und Enzymlösung folgender Aktivitäten und Mengen: 1µl E.coli Ligase (10U/µl), 4µl DNA Polymerase I (10U/µl) und 1µl RNaseH (2U/µl)(Invitrogen/Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland). Die Inkubation betrug 2 Stunden bei einer Temperatur von 16°C. Nach Zusatz von 2µl einer T4-DNA-Polymerase (5U/µl) wurde für weitere 30 min. bei 16°C inkubiert.
- 30

Subtraktive Hybridisierung und RDA

Die PCR Suppression Subtractive Hybridization (SSH) (22) wurde nach der Arbeitsvorschrift des Herstellers des PCR Select Kits (Clontech, Palo Alto, USA <http://www.clontech.com/pcr-select/index.shtml>) durchgeführt. Der Verdau der doppelsträngigen cDNA erfolgte mit dem
5 Restriktionsenzym RsaI von Rhodopseudomonas sphaeroides. Für die RDA (18) wurde die doppelsträngige cDNA mit dem Restriktionsenzym DPNII –von Diplococcus pneumoniae (20U in 100µl) geschnitten. Anschließend wurde an Adapterprimer (RBgl12, RBgl24) ligiert und amplifiziert gemäß publizierten Protokollen (17, 18). Das Tester-Amplikon wurde nach erneutem Restriktionsverdau mit DPNII durch Ligation an ein weiteres Adapter-Oligonukleotid erhalten (JBgl12
10 und JBgl24 bzw. NBgl 12 und NBgl24(18)) in der zweiten Subtraktionsrunde).

Nach der Hybridisierung wurden bei beiden Methoden die sich vom Tester ableitenden Sequenzen selektiv über PCR amplifiziert und dadurch im Subtraktionsprodukt angereichert.

Beschreibung der Subtraktionsansätze

Die RDA-Protokolle wurden so variiert, dass es möglich war, sowohl geringer wie auch verstärkt
15 exprimierte Gene in den Proben von RA, OA und Normalspendergeweben zu identifizieren.

Dabei wurde:

- 1 OA (Driver) subtrahiert von RA (Tester), um Sequenzen zu erhalten, die stärker in RA als in OA-Geweben exprimiert sind
- 2 RA (Driver) subtrahiert von ND (Tester), um Sequenzen zu erhalten, die in RA geringer
20 exprimiert sind als in ND-Proben
- 3 ND (Driver) subtrahiert von OA (Tester), um Sequenzen zu erhalten, die stärker in OA als in ND-Geweben exprimiert sind

Herstellung der Subtraktionsbanken- Klonierung, Sequenzierung und Datenbankvergleiche

Die Subtraktionsprodukte des SSH-Ansatzes wurden in einen pCRII vector (TA-Cloning Kit; Invitrogen, Heidelberg, Germany <http://www.invitrogen.com>) kloniert. Die Subtraktionsprodukte aus
25 der RDA wurden in einen pBluescript KS⁺II vector (Stratagene, La Jolla, USA <http://www.stratagene.com/vectors/selection/plasmid1.htm>) kloniert, der zuvor mit dem Restriktionsenzym BamHI von Bacillus amyloliquefaciens geschnitten und anschließend dephosphoryliert und gereinigt wurde. Etwa 150 Klone wurden isoliert und sequenziert unter
30 Verwendung eines ABI 377 Sequenzier-Gerätes (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany <http://home.appliedbiosystems.com>). Sequenziert wurde nach dem Dye Terminator Chemistry Protokoll des Herstellers unter Verwendung eines T7-Primers.

Die Sequenzvergleiche erfolgten nach Eliminierung der Vektorsequenzen unter Nutzung der Genebank und NCBI-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Microarray-Hybridisierung

Es wurden zwei verschiedene Chiptechnologien eingesetzt: 1.) Es wurden Filter benutzt, auf denen PCR-Produkte von cDNA-Klonen der UNIGENE Bibliothek (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>) gespottet waren. Die Hybridisierung erfolgte dabei bei 65°C mit ³³P-markierten cDNA-Proben nach Erststrangsynthese mit Oligo(dT₍₁₂₋₁₈₎)(23, 24). 2.) Es erfolgten mit MicroArrays (HU95A; HU95B, HU95C, HU95D und HU95E) der Firma Affymetrix (Affymetrix Inc., Santa Clara, USA www.affymetrix.com) Hybridisierungen, bei denen es sich um Oligonucleotid-Arrays handelt, deren Basenfolge sich von 12.000 bekannten Genen und 24.000 Expressed Sequence Tag (EST-) Einträgen ableitet. Die Synthese der markierten Proben erfolgte entsprechend dem technischen Manual des Herstellers (Affymetrix Inc., Santa Clara, USA).

Die fluoreszenz-markierte Probe wird synthetisiert nach Umschreibung mit einem Oligo-dT₂₄-Primer, der eine T7-Polymerase-Bindungsstelle besitzt. Die Markierungsreaktion erfolgte mit T7-RNA-Polymerase und biotinylierten dNTPs entsprechend dem Hersteller-Protokoll (ENZO-Biochem, New York, USA, <http://www.enzo.com/entrance.html>).

In beiden Chip-Analysen wurden die zu testende Probe und die Referenzprobe auf separaten Filtern hybridisiert. Der Vergleich der Signal-Intensitäten erfolgte nach Normalisierung.

Auswertung der Chipergebnisse- Entscheidungsmatrix

Auswertung der Signal-Intensitäten erfolgte mit der für den entsprechenden Array entwickelten Software nach Normalisierung und Ermitteln eines Intensitätswertes für die entsprechende Probe gemäß der Tukey's Biweight Methode (<http://mathworld.wolfram.com/TukeysBiweight.html>).

Für die Auswertung der Unigene-Filterarrays wurde der Algorithmus am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin-Dahlem entwickelt (<http://algorithmics.molgen.mpg.de/>), für die Chips der Firma Affymetrix wurde die MicroArraySuite 5.0 Software (<http://www.affymetrix.com/products/software/specific/mas.affx>) einschließlich der Standardeinstellungen bzw. Vorgaben des Herstellers eingesetzt.

Für die Auswertung der Affymetrix-Arrays wurde für die Normalisierung der Daten die Target Intensität auf 100 und der Normalisierungsfaktor auf 1 gesetzt und der Skalierungsfaktor für jede Probe errechnet. Chips mit vergleichbaren Skalierungsfaktoren (Faktor<4) wurden in die Vergleichsanalysen einbezogen. Entscheidungskriterium für den Nachweis eines Genes (Detection p Value) wurde auf <0.05 eingestellt. Unter Nutzung der DMT 3.0 Software (<http://www.affymetrix.com/products/software/specific/dmt.affx>) von Affymetrix wurden die Vergleichsanalysen für die entsprechenden Arrays durchgeführt.

Dabei werden im Wilcoxon-Test (<http://faculty.vassar.edu/lowry/wilcoxon.html>) die Differenzen zwischen den Perfekt Matches und den Perfekt- und Mismatch-Intensitäten berechnet und mit dem Entscheidungskriterium Cut-Off (γ -Wert <0.04) verglichen. In der Ausgabe der Ergebnisse für den

Vergleich der jeweiligen Chips wird ein Change- Call (erhöht, marginal erhöht, keine Änderung oder erniedrigt) sowie das Signal Log Ratio, ein Maß für den Faktor der Änderung angegeben (logarithmierter Faktor).

Entscheidungskriterium:

- 5 Es wurden jeweils für alle Proben die Vergleichsanalysen (jede Probe gegen jede der anderen Gruppe: ND, OA, RA) durchgeführt.

Für die Unigene-Filterhybridisierungen wurde ein Signalunterschied >2 für mindestens 3 von 4 Vergleichen und ein Detektionssignal mit einem p-Wert $<0,01$ berücksichtigt.

- 10 Für die Arrays der Firma Affymetrix wurde wie folgt verfahren: Jede RA-Probe wurde mit jeder der OA-Proben sowohl in Richtung erhöhter, wie auch erniedigter Expression verglichen. Gene, die in 80% dieser Vergleiche eine Auslenkung im Sinne „erhöht“ bzw. „erniedigt“ anzeigten bei einem Regulationsfaktor > 2 (Signal Log Ratio >1), wurden als Kandidatengene ausgewählt. Im U95A Chip wurde das Auswahlkriterium auf einen Regulationsfaktor >3 gesetzt.

Semiquantitative PCR

- 15 Aus den detektierten Sequenzbereichen wurden Primer ausgewählt, die eine vergleichbare Annealingtemperatur und Produktlänge aufwiesen. Zur Primersuche wurde die DNASTAR Primer Select Software (DNASTAR Inc., Madison, USA <http://www.dnastar.com/>) verwendet. Die Primersynthese erfolgte bei Gibco-Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland). Für die Semiquantifizierung der PCR-Produkte wurde das real time PCR-System GeneAmp 5700 und der
- 20 Sybr-Green-PCR-Core Kit (Applied Biosystem, Weiterstedt, Germany; <http://europe.appliedbiosystems.com/>) eingesetzt.

- Die cDNA-Mengen wurden für alle Proben anhand der real-time-Amplifikationsergebnisse für GAPDH-spezifische Primer aufeinander abgestimmt. Die Quantifizierung der PCR-Produkte verschiedener weiterer Gene erfolgte in Relation zum GAPDH-spezifischen Produkt als internem
- 25 Standard. Zur Kontrolle wurde für alle Proben β -Actin amplifiziert und als zweites Haushaltsgen mitbestimmt.

| Genbezeichnung | AccNr | Primer-Lokalisation | Produktlänge (bp) |
|----------------|----------|-------------------------|-------------------|
| VDUP1 | NM006472 | 665...684 / 863...840 | 199 |
| TIMP4 | U76456 | 143...159 / 336...317 | 194 |
| GPX3 | NM002084 | 424...443 / 528...510 | 105 |
| β Actin | X00351- | 654...675 / 841...819 | 188 |
| MMP1 | X05231 | 874...895 / 1080...1057 | 207 |
| MMP3 | X05232 | 973...996 / 1157...1136 | 185 |

| | | | |
|--------|----------|---------------------------|-----|
| LTBP4 | M22490 | 511...534 / 760...737 | 250 |
| GADD45 | M60974 | 457...475 / 573...557 | 116 |
| CLU | NM001831 | 1384...1404 / 1509...1489 | 126 |
| Ca12 | NM001218 | 930...949 / 1 049...1031 | 196 |

Immunhistochemie

Eine Probe der Synovialmembran wurde für die histopathologische Beurteilung verwendet. Dazu wurden Kryoschnitte in einer Dicke von 6 µm angefertigt, luftgetrocknet und anschließend in einem
 5 1:1 Gemisch aus Aceton und Methanol fixiert. Die Hämatoxilin-färbung wurde nach Standardprotokollen durchgeführt und nach histopathologischen Beurteilungskriterien unterteilt (25).

Methoden und Ergebnisse zur Immunom-Analyse

Um Autoreaktivitätsmuster auf dem T- und B-Zell-Level zu bestimmen (das Immunom), die spezifisch für die RA sind und die somit die Erkrankung von anderen rheumatischen und nicht-
 10 rheumatischen Erkrankungen diskriminiert. Die Kenntnis des RA-spezifischen Immunoms ist von herausragender Bedeutung, um diagnostische Werkzeuge zu entwickeln, die eine Arthritis sehr viel früher und sicherer als eine RA diagnostizieren bzw. als eine RA ausschließen als bislang möglich. Dieses wiederum erlaubt es, die RA medikamentös unter Kontrolle zu halten, bevor irreversible Gelenk- und Knochenschädigungen eingetreten sind.

15 Dazu wurden die Techniken der Proteomics eingesetzt, um durch hochauflösende 2D-Gelelektrophorese gewebespezifische Protein-Muster zu erzeugen. Diese wurden durch Techniken der Immunomics nach bekannten und unbekanntem Autoreaktivitäten gescreent. Proteinspots mit einer nutzbaren Sensitivität und Spezifität werden durch Sequenzierung und MALDI-TOF (26) identifiziert. Diese Proteine werden anschließend auf T-Zell-Autoreaktivität in derselben Kohorte gescreent.

20 Erfindungsgemäß sind Autoreaktivitätsmuster etabliert worden, die absolut RA-spezifisch sind. Bei dieser Analyse ist von großer Bedeutung, dass keine einzelne Autoreaktivität diese Spezifität erzielt hat. Dies wird erst durch die Kombination mehrerer Autoreaktivitäten erreicht. Solche Muster, die einen Patienten mit RA eindeutig unterscheiden von einem mit einer anderen rheumatischen oder nicht-rheumatischen Erkrankung, umfassen die Autoantigene citrullinierte Peptide (Cit), IgG, BiP
 25 (Heavy Chain Binding Protein), Calpastatin (Calp), RA33 (hnRNP A2) und Calreticulin (Calr). Die Tabelle zeigt alle möglichen Kombinationen von fünf dieser Autoreaktivitäten (RF, Cit, BiP, RA33 und Calp) sowie die beiden möglichen Zustände "positiv" und "negativ". Die hervorgehobenen Muster sind (statistisch signifikant, $p < 0.01$, Whitney U Test, <http://faculty.vassar.edu/lowry/utest.html>) ausschließlich bei der RA exprimiert. Fig. 1 zeigt die Sensitivitäten aller möglicher Kombinationen für
 30 die RA sowie die Kontroll-Kohorten. Die RA-spezifischen Muster sind analog zu Tabelle 1 hervorgehoben und umfassen im wesentlichen diejenigen, die 4- und 5-fach positiv für die

Einzelparameter sind. Die Kombination derjenigen Autoreaktivitätsprofile, die ausschließlich bei der RA auftreten, ergibt eine Sensitivität von 54%.

RA-exklusiv exprimierte Muster der drei Autoreaktivitäten, gerichtet gegen IgG, Cit und BiP (RF+Cit+BiP+ and RF-Cit+BiP+) ergeben eine Gesamtsensitivität von 43%. RA-exklusive Muster der vier Autoreaktivitäten, gerichtet gegen IgG, Cit, BiP und RA33 (RF+Cit+BiP+RA33+, RF+Cit+BiP-RA33+ and RF+Cit+BiP+RA33-) weisen eine Gesamtsensitivität von 40% auf. Bei der Analyse von sechs Mustern wird eine Sensitivität von 60% erzielt.

Ersten Untersuchungen zufolge sind diese Muster auch bei Patienten mit früher RA relevant. Weitere Kandidaten-Antigene, die bereits charakterisiert sind, umfassen das Sa-Antigen(5), das vermutlich aus α -Enolase und citrulliniertem Vimentin besteht.

Die Identifikation des Immunoms der RA ist nicht nur von diagnostischer, sondern auch von pathogenetischer Relevanz. Wenn diejenigen T-zellulären Autoreaktivitäten, die die frühe RA treiben, identifiziert sind, erscheint es möglich, spezifisch wirksame Therapie-Protokolle zu entwickeln.

| | RF | Citrullin | BiP | Calpastatin | RA33 |
|----|----|-----------|-----|-------------|------|
| 1 | - | + | - | - | - |
| 2 | - | + | + | - | - |
| 3 | + | + | - | + | + |
| 4 | - | + | + | + | + |
| 5 | + | - | + | + | + |
| 6 | + | + | + | - | + |
| 7 | + | - | - | + | + |
| 8 | - | - | + | + | + |
| 9 | + | - | + | + | - |
| 10 | - | + | + | + | - |
| 11 | + | + | - | + | - |
| 12 | - | + | - | + | + |
| 13 | + | + | + | - | - |
| 14 | + | + | - | - | + |
| 15 | - | + | + | - | + |
| 16 | + | - | + | - | + |
| 17 | - | - | + | + | - |
| 18 | - | - | - | + | + |
| 19 | - | + | - | + | - |
| 20 | + | - | - | + | - |
| 21 | + | - | - | - | + |
| 22 | - | - | + | - | + |
| 23 | + | - | + | - | - |
| 24 | - | + | + | - | - |
| 25 | + | + | - | - | - |
| 26 | - | + | - | - | + |
| 27 | - | - | - | + | - |

| | RF | Citrullin | BiP | Calpastatin | RA33 |
|----|----|-----------|-----|-------------|------|
| 28 | - | - | + | - | - |
| 29 | - | - | - | - | + |
| 30 | - | + | - | - | - |
| 31 | + | - | - | - | - |
| 32 | - | - | - | - | - |

Tab. 1 Autoreaktivitätsmuster mit RF, Citrullin, BiP, Calpastatin und RA33

Dargestellt sind alle 32 möglichen Fünffach-Kombinationen der Autoreaktivitäten gegen IgG (RF), Citrullin, BiP, Calpastatin und RA33. Die RA-spezifischen Kombinationen sind analog
5 Figur 1 farbig unterlegt.

Nutzen

Es werden komplexe molekulare Muster erfasst. Diese können durch mathematische Berechnungsmodelle in Gruppen und Verwandtschaftsgrade eingeteilt werden. Die daraus ableitbare
10 Einteilung und das Wissen über die Assoziation z.B. mit der Dauer der Erkrankung, der klinischen Krankheitsaktivität (Disease Activity Score (Ref.)), der Entzündungsaktivität gemessen an der Erhöhung des C reaktivem Proteins oder Blutsenkung, der radiologischen Gelenkzerstörung und dem spezifischen Medikamenteneinfluss lassen folgende Rückschlüsse aus der Array-Analyse ziehen:
15 Zuordnung des Krankheitsbildes zu einer definierten Diagnose und zu einer molekular abgrenzbaren Untergruppe, Beurteilung der Krankheitsaktivität und der zu erwartenden Progredienz (Prognoseabschätzung), Erfolgsaussichten der verschiedenen Therapieformen, Empfehlung zum therapeutischen Vorgehen (z.B. Methotrexat statt Leflunomid oder Kombination Sulfasalazin mit Methotrexat statt Methotrexat allein) und schließlich Überwachung des Therapieerfolges.

Durch Einsatz vor und während definierter medikamentöser Behandlungsmaßnahmen kann erfasst
20 werden, welche der verwendeten Gene durch das Medikament beeinflusst werden. Es wird damit gemessen, wie das Medikament die für die Krankheit typischerweise veränderte Genexpression beeinflusst. Daraus lassen sich ablesen, welche krankheitsassoziierten molekularen Veränderungen trotz Therapie immer noch aktiv sind. Aus der Kenntnis über die Funktion dieser pathologisch aktiven Gene lassen sich prinzipiell pathophysiologische Abläufe der Gelenkerkrankungen erschließen und
25 neue Therapiekonzepte ableiten.

Zusammenstellung der Gene**Tabelle 1:**

| Accesion Nummer | Unigene Kodierung | Gen Name | Methode | Regulation |
|------------------------|--------------------------|--|--------------------|-------------------|
| X57809 | Hs.181125 | | RDA, Affymetrix | RA>OA |
| X58141 | | | RDA | RA>OA |
| X63527 | Hs.252723 | ribosomal protein L19 | RDA | RA>OA |
| U10362 | Hs.75864 | chromosome 5 open reading frame 8 | RDA | RA>OA |
| M80244 | Hs.184601 | NM_003486 | RDA | RA>OA |
| M24594 | Hs.20315 | interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 | RDA | OA>RA |
| U01244 | Hs.79732 | fibulin 1 isoform C precursor NM_006485 | RDA | RA>OA |
| X02761 | Hs.287820 | fibronectin 1, isoform 1 preproprotein | RDA | RA>OA , OA>NS |
| L01124 | Hs.165590 | ribosomal protein S13 | RDA | NS>RA |
| M65062 | Hs.107169 | insulin-like growth factor binding protein 5 | RDA | |
| M15330 | Hs.126256 | interleukin 1, beta | | |
| L13210 | Hs.79339 | galectin 3 binding protein | RDA | |
| X05232 | Hs.83326 | matrix metalloproteinase 3 preproprotein | | RA>NS, OA |
| M22490 | Hs.68879 | bone morphogenetic protein 4 | RDA, Affymetrix | NS>RA |
| AL034397 | | | RDA | OA>NS |
| M22806 | | | RDA | OA>NS |
| X06256 | Hs.149609 | integrin alpha 5 precursor | Unigene | NS>RA |
| L49169 | Hs.75678 | FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B | Unigene | NS>RA |
| AB002409 | Hs.57907 | small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 21 | Unigene | RA>NS |
| X03473 | Hs.226117 | H1 histone family, member 0 | RDA | OA>NS |
| M92843 | Hs.343586 | zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse) | Unigene | NS>RA |
| M21121 | Hs.241392 | small inducible cytokine A5 (RANTES) | Affymetrix | RA>OA |
| U05259 | | | Affymetrix | RA>OA |
| U80114 | Hs.247987 | | Affymetrix | RA>OA |
| U81234 | Hs.164021 | small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 6 (granulocyte chemotac | Affymetrix | RA>OA |
| D11086 | Hs.84 | interleukin 2 receptor, gamma chain precursor | Affymetrix | RA>OA |

| gamma chain, precursor | | | | |
|------------------------|-----------|---|------------|----------|
| X97267 | | | Affymetrix | RA>OA |
| U23852 | | | Affymetrix | RA>OA |
| AA522530 | Hs.111244 | RTP801 | Affymetrix | RA>OA |
| AF037335 | Hs.5338 | carbonic anhydrase XII precursor | Affymetrix | RA>OA |
| U97145 | Hs.19317 | GDNF family receptor alpha 2 | Affymetrix | RA>OA |
| AA919102 | Hs.95327 | CD3D antigen, delta polypeptide (TiT3 complex) | Affymetrix | RA>OA |
| M63928 | Hs.180841 | CD27 antigen | Affymetrix | RA>OA |
| Z49194 | Hs.2407 | POU domain, class 2, associating factor 1 | Affymetrix | RA>OA |
| AL031983 | | | Affymetrix | RA>OA |
| D15050 | Hs.232068 | | Affymetrix | RA>OA |
| X92997 | Hs.342651 | | Affymetrix | RA>OA |
| J03910 | | | Affymetrix | RA>OA |
| J04132 | Hs.97087 | T-cell receptor zeta chain precursor | Affymetrix | RA>OA |
| M55153 | Hs.8265 | transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase) | Affymetrix | RA>OA |
| M12959 | Hs.74647 | | Affymetrix | RA>OA |
| AF031815 | Hs.89230 | potassium intermediate | Affymetrix | RA>OA |
| L31584 | | | Affymetrix | RA>OA |
| X54489 | | | Affymetrix | RA>OA |
| AF043129 | | | Affymetrix | RA>OA |
| X59871 | Hs.169294 | transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box) | Affymetrix | RA>OA |
| AI743134 | Hs.21858 | trinucleotide repeat containing 3 | Affymetrix | RA>OA |
| Y13323 | Hs.145296 | disintegrin protease | Affymetrix | RA>OA |
| U77735 | Hs.80205 | pim-2 oncogene | Affymetrix | RA,OA>NS |
| U58515 | Hs.154138 | chitinase 3-like 2 | Affymetrix | RA,OA>NS |
| M17016 | Hs.1051 | granzyme B precursor | Affymetrix | RA>OA |
| X03066 | Hs.1802 | major histocompatibility complex, class II, DO beta | Affymetrix | RA,OA>NS |
| M28170 | Hs.96023 | CD19 antigen | Affymetrix | RA,OA>NS |
| L24564 | Hs.1027 | Ras-related associated with diabetes | Affymetrix | NS>RA |
| M68840 | Hs.183109 | monoamine oxidase A | Affymetrix | NS>RA |
| U76456 | Hs.190787 | tissue inhibitor of metalloproteinase 4 precursor | Affymetrix | OA>RA |
| D13814 | Hs.89472 | angiotensin receptor 1 NM_004835 | Affymetrix | NS>RA |
| AA420624 | Hs.183109 | monoamine oxidase A | Affymetrix | OA>RA |
| X51757 | Hs.3268 | heat shock 70kD protein 6 (HSP70B') | Affymetrix | NS>RA |

| | | | | |
|----------|-----------|---|------------|----------|
| U29344 | Hs.83190 | fatty acid synthase | Affymetrix | NS>RA |
| L19871 | Hs.460 | activating transcription factor 3 long isoform NM_004024 | Affymetrix | NS>RA |
| J02611 | Hs.75736 | apolipoprotein D precursor | Affymetrix | NS>RA |
| M12272 | Hs.2523 | class I alcohol dehydrogenase, gamma subunit | Affymetrix | NS>RA |
| L34041 | Hs.348601 | glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble) | Affymetrix | NS>RA |
| L12760 | Hs.1872 | phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble) | Affymetrix | OA>RA |
| M63978 | | | Affymetrix | RA>OA |
| S95936 | Hs.284176 | transferrin precursor | Affymetrix | NS>RA |
| U42031 | Hs.7557 | FK506-binding protein 5 | Affymetrix | NS>RA |
| Z97171 | | | Affymetrix | NS>RA |
| S69790 | | | Affymetrix | NS>RA |
| U41843 | Hs.295362 | DR1-associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha) | Affymetrix | OA,NS>RA |
| AL049653 | | | Affymetrix | NS>RA |
| M31682 | Hs.1735 | inhibin beta B subunit precursor | Affymetrix | NS>RA |
| AF009767 | Hs.132898 | fatty acid desaturase 1 | Affymetrix | NS>RA,OA |
| X02910 | Hs.241570 | tumor necrosis factor (cachectin) | | |
| AB023152 | Hs.12183 | | Affymetrix | NS>RA,OA |
| U37283 | Hs.300946 | Microfibril-associated glycoprotein-2 | Affymetrix | OA,NS>RA |
| X05451 | Hs.158295 | | Affymetrix | OA,NS>RA |
| W26480 | Hs.132898 | fatty acid desaturase 1 | Affymetrix | NS>RA |
| D14874 | Hs.394 | adrenomedullin | Affymetrix | RA>NS |
| M12174 | Hs.204354 | ras homolog gene family, member B | Affymetrix | NS>RA |
| M60974 | Hs.80409 | growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha | Affymetrix | NS>RA |
| S62138 | | | Affymetrix | NS>RA |
| X16706 | Hs.301612 | FOS-like antigen 2 | Affymetrix | NS>RA |
| X56667 | Hs.106857 | calbindin 2, full length protein isoform NM_007087 | Affymetrix | NS>RA |
| H15814 | | | Affymetrix | NS>RA |
| AL021977 | | | Affymetrix | NS>RA |
| U80055 | | | Affymetrix | NS>RA |
| U09564 | Hs.75761 | SFRS protein kinase 1 | Affymetrix | RA>OA |
| U14407 | Hs.168132 | interleukin 15 | Affymetrix | RA>OA |
| U27185 | Hs.82547 | retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1 | Affymetrix | RA>OA |
| Z35278 | Hs.170019 | runt-related transcription factor 3 | Affymetrix | RA>OA |

| | | | | |
|---------------|-----------|---|------------|-------|
| M12886 | Hs.303157 | | Affymetrix | RA>OA |
| L05424 | | | Affymetrix | RA>OA |
| L09230 | Hs.301921 | chemokine (C-C motif) receptor 1 | Affymetrix | RA>OA |
| L22075 | Hs.1666 | guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13 | Affymetrix | RA>OA |
| M28130 | | | Affymetrix | RA>OA |
| M29696 | Hs.237868 | interleukin 7 receptor | Affymetrix | RA>OA |
| M31165 | Hs.29352 | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6 | Affymetrix | RA>OA |
| M16038 | Hs.80887 | v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog | Affymetrix | RA>OA |
| X83490 | | | Affymetrix | RA>OA |
| D13666 | Hs.136348 | osteoblast specific factor 2 (fasciclin I-like) | Affymetrix | RA>OA |
| L10717 | Hs.211576 | IL2-inducible T-cell kinase | Affymetrix | RA>OA |
| X04500 | Hs.126256 | interleukin 1, beta | Affymetrix | RA>OA |
| U24153 | Hs.30692 | p21 (CDKN1A)-activated kinase 2 | Affymetrix | RA>OA |
| M32315 | Hs.256278 | tumor necrosis factor receptor 2 (75kD) | Affymetrix | RA>OA |
| U51903 | Hs.78993 | IQ motif containing GTPase activating protein 2 | Affymetrix | RA>OA |
| AF002700 | Hs.19317 | GDNF family receptor alpha 2 | Affymetrix | RA>OA |
| U37518 | Hs.83429 | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 | Affymetrix | RA>OA |
| HG1103-HT1103 | | | Affymetrix | RA>OA |
| HG3521-HT3715 | | | Affymetrix | RA>OA |
| AF024710 | | | Affymetrix | RA>OA |
| U01134 | Hs.138671 | fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor | Affymetrix | RA>OA |
| U27467 | Hs.227817 | BCL2-related protein A1 | Affymetrix | RA>OA |
| M79321 | Hs.80887 | v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog | Affymetrix | RA>OA |
| J04765 | Hs.313 | secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T- lymphocyte | Affymetrix | RA>OA |
| M21154 | Hs.262476 | S-adenosylmethionine decarboxylase 1 precursor | Affymetrix | RA>OA |
| AF098641 | Hs.306278 | | Affymetrix | RA>OA |
| D63789 | Hs.174228 | small inducible cytokine subfamily C member 2 | Affymetrix | RA>OA |

| | | subfamily C, member 2 | | |
|----------|-----------|--|------------|-------|
| S68134 | Hs.351252 | cAMP responsive element modulator | Affymetrix | RA>OA |
| AB014515 | Hs.323712 | KIAA0615 gene product | Affymetrix | RA>OA |
| AI800499 | Hs.161002 | | Affymetrix | RA>OA |
| Y13710 | Hs.16530 | small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 18, pulmonary and activat | Affymetrix | RA>OA |
| AJ011915 | Hs.184376 | synaptosomal-associated protein, 23kD | Affymetrix | RA>OA |
| AF030339 | Hs.286229 | plexin C1 | Affymetrix | RA>OA |
| X17042 | Hs.1908 | proteoglycan 1, secretory granule | Affymetrix | RA>OA |
| AF059214 | Hs.194687 | cholesterol 25-hydroxylase | Affymetrix | RA>OA |
| D42043 | Hs.79123 | | Affymetrix | RA>OA |
| M24283 | Hs.168383 | intercellular adhesion molecule 1 precursor | Affymetrix | RA>OA |
| AF042729 | Hs.171776 | inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1 | Affymetrix | RA>OA |
| M64595 | Hs.173466 | ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 | Affymetrix | RA>OA |
| AA868382 | Hs.198253 | major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1 | Affymetrix | RA>OA |
| AB006746 | Hs.198282 | phospholipid scramblase 1 | Affymetrix | RA>OA |
| X00437 | Hs.303157 | | Affymetrix | RA>OA |
| M59287 | | | Affymetrix | RA>OA |
| AA725102 | Hs.51305 | v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian) | Affymetrix | RA>OA |
| M97935 | Hs.21486 | signal transducer and activator of transcription 1, 91kD | Affymetrix | RA>OA |
| X54134 | Hs.31137 | protein tyrosine phosphatase, receptor type, E | Affymetrix | RA>OA |
| U89942 | Hs.83354 | lysyl oxidase-like 2 | Affymetrix | RA>OA |
| AF099935 | Hs.17839 | TNF-induced protein | Affymetrix | RA>OA |
| M93056 | | | Affymetrix | RA>OA |
| M97936 | | | Affymetrix | RA>OA |
| AI887421 | Hs.82547 | retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1 | Affymetrix | RA>OA |
| D50532 | Hs.54403 | macrophage lectin 2 (calcium dependent) | Affymetrix | RA>OA |
| AI813532 | Hs.256278 | tumor necrosis factor receptor 2 (75kD) | Affymetrix | RA>OA |

| | | | | |
|----------|-----------|--|------------|-------|
| U02020 | Hs.239138 | pre-B-cell colony-enhancing factor | Affymetrix | RA>OA |
| X05276 | Hs.250641 | tropomyosin 4 | Affymetrix | RA>OA |
| AF006516 | Hs.24752 | spectrin SH3 domain binding protein 1 | Affymetrix | RA>OA |
| AB018301 | Hs.22039 | | Affymetrix | RA>OA |
| AB010812 | Hs.22900 | nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3 | Affymetrix | RA>OA |
| AF052124 | Hs.313 | secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte | Affymetrix | RA>OA |
| AB008775 | Hs.104624 | aquaporin 9 | Affymetrix | RA>OA |
| AF024714 | Hs.105115 | absent in melanoma 2 | Affymetrix | RA>OA |
| M28696 | Hs.278443 | Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor for (CD32) | Affymetrix | RA>OA |
| X62573 | | | Affymetrix | RA>OA |
| X07834 | Hs.318885 | superoxide dismutase 2, mitochondrial | Affymetrix | RA>OA |
| AL050267 | Hs.23889 | DKFZP564A032 protein | Affymetrix | RA>OA |
| U83461 | Hs.24030 | solute carrier family 31 (copper transporters), member 2 | Affymetrix | RA>OA |
| AB018285 | Hs.321707 | | Affymetrix | RA>OA |
| AF007875 | Hs.5085 | dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1 | Affymetrix | RA>OA |
| X78686 | Hs.89714 | small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 5 (epithelial-derived n | Affymetrix | RA>OA |
| AF053712 | Hs.115770 | | Affymetrix | RA>OA |
| AF006083 | Hs.5321 | ARP3 actin-related protein 3 homolog | Affymetrix | RA>OA |
| AL050025 | Hs.5344 | adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit | Affymetrix | RA>OA |
| M17017 | Hs.624 | interleukin 8 | Affymetrix | RA>OA |
| AI651024 | Hs.15780 | | Affymetrix | RA>OA |
| AF038172 | | | Affymetrix | RA>OA |
| M55542 | Hs.62661 | guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kD | Affymetrix | RA>OA |
| U11276 | Hs.169824 | killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1 | Affymetrix | RA>OA |
| Z19585 | Hs.75774 | thrombospondin 4 | Affymetrix | OA>RA |
| L27560 | | | Affymetrix | OA>RA |
| M98539 | | | Affymetrix | OA>RA |
| J00153 | | | Affymetrix | OA>RA |

| | | | | |
|----------|-----------|--|------------|-------|
| M25079 | Hs.155376 | hemoglobin, beta | Affymetrix | OA>RA |
| M80482 | Hs.170414 | paired basic amino acid cleaving system 4 | Affymetrix | OA>RA |
| L48215 | Hs.155376 | hemoglobin, beta | Affymetrix | OA>RA |
| AA524547 | Hs.160318 | phospholemman, isoform b precursor NM_005031 | Affymetrix | OA>RA |
| AL038340 | | | Affymetrix | OA>RA |
| AI381790 | Hs.74120 | adipose specific 2 | Affymetrix | OA>RA |
| X00129 | Hs.76461 | retinol-binding protein 4, plasma precursor | Affymetrix | OA>RA |
| U66619 | Hs.71622 | SWI | Affymetrix | OA>RA |
| M30038 | Hs.334455 | alpha tryptase I precursor | Affymetrix | OA>RA |
| U13666 | Hs.184907 | G protein-coupled receptor 1 | Affymetrix | OA>RA |
| L05144 | Hs.1872 | phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble) | Affymetrix | OA>RA |
| U39447 | Hs.198241 | copper containing amine oxidase 3 precursor | Affymetrix | OA>RA |
| AL049313 | | | Affymetrix | OA>RA |
| AL050125 | | | Affymetrix | OA>RA |
| D12485 | | | Affymetrix | OA>RA |
| X78416 | Hs.3155 | casein, alpha | Affymetrix | OA>RA |
| AB028998 | Hs.6147 | | Affymetrix | OA>RA |
| AB020629 | Hs.38095 | ATP-binding cassette, sub-family A member 8 | Affymetrix | OA>RA |
| X03350 | Hs.4 | class I alcohol dehydrogenase, beta subunit | Affymetrix | OA>RA |
| AJ224677 | Hs.7122 | scrapie responsive protein 1 | Affymetrix | OA>RA |
| AB018317 | Hs.22201 | | Affymetrix | OA>RA |
| AF009314 | | | Affymetrix | OA>RA |
| L77730 | | | Affymetrix | OA>RA |
| D76435 | Hs.41154 | Zic family member 1 (odd-paired homolog, Drosophila) | Affymetrix | OA>RA |
| W28828 | Hs.133988 | | Affymetrix | OA>RA |
| M73720 | | | Affymetrix | OA>RA |
| M55150 | Hs.73875 | fumarylacetoacetase | Affymetrix | OA>RA |
| U13616 | Hs.75893 | ankyrin 3, isoform 2 NM_020987 | Affymetrix | OA>RA |
| AB005293 | Hs.103253 | perilipin | Affymetrix | OA>RA |
| L07765 | Hs.76688 | carboxylesterase 1 (monocyte) | Affymetrix | OA>RA |
| X82209 | Hs.268515 | meningioma 1 | Affymetrix | OA>RA |
| J03507 | Hs.78065 | complement component 7 precursor | Affymetrix | OA>RA |
| AF013570 | Hs.78344 | smooth muscle myosin heavy chain 11, isoform SM1 NM_022870 | Affymetrix | OA>RA |
| U70370 | Hs.84136 | paired-like homeodomain transcription factor 1 | Affymetrix | OA>RA |

| | | | | |
|----------|-----------|--|------------|-------|
| | | transcription factor 1 | | |
| U75744 | Hs.88646 | deoxyribonuclease I-like 3 | Affymetrix | OA>RA |
| M60278 | Hs.799 | diphtheria toxin receptor | Affymetrix | OA>RA |
| | | (heparin-binding epidermal growth factor-like growth f | | |
| AF042166 | Hs.81008 | filamin B, beta (actin binding protein 278) | Affymetrix | OA>RA |
| J00123 | | | Affymetrix | OA>RA |
| AI207842 | Hs.8272 | prostaglandin D2 synthase (21kD, brain) | Affymetrix | OA>RA |
| AA128249 | Hs.83213 | fatty acid binding protein 4, adipocyte | Affymetrix | OA>RA |
| AA152406 | Hs.114346 | cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 1 (muscle) precursor | Affymetrix | OA>RA |
| AF093118 | Hs.11494 | fibulin 5 | Affymetrix | OA>RA |
| L38486 | Hs.296049 | | Affymetrix | OA>RA |
| U66689 | | | Affymetrix | OA>RA |
| AF049884 | Hs.350266 | Arg | Affymetrix | OA>RA |
| AB011089 | Hs.12372 | tripartite motif protein TRIM2 | Affymetrix | OA>RA |
| AF060568 | | | Affymetrix | OA>RA |
| AF059293 | Hs.114948 | cytokine receptor-like factor 1 | Affymetrix | OA>RA |
| AC003107 | Hs.1584 | cartilage oligomeric matrix protein precursor | Affymetrix | OA>RA |
| J05037 | Hs.76751 | serine dehydratase | Affymetrix | OA>RA |
| D45371 | Hs.80485 | adipose most abundant gene transcript 1 | Affymetrix | OA>RA |
| U78190 | | | Affymetrix | OA>RA |
| U24578 | Hs.444 | serine | Affymetrix | OA>RA |
| M15856 | Hs.180878 | lipoprotein lipase precursor | Affymetrix | OA>RA |
| AF055033 | Hs.107169 | insulin-like growth factor binding protein 5 | Affymetrix | OA>RA |
| AA976838 | Hs.268571 | apolipoprotein C-I precursor | Affymetrix | OA>RA |
| L13698 | Hs.65029 | growth arrest-specific 1 | Affymetrix | OA>RA |
| AB020316 | Hs.134015 | uronyl-2-sulfotransferase | Affymetrix | OA>RA |
| U32324 | Hs.64310 | interleukin 11 receptor, alpha | Affymetrix | OA>RA |
| S67070 | Hs.78846 | heat shock 27kD protein 2 | Affymetrix | OA>RA |
| M12529 | Hs.169401 | apolipoprotein E | Affymetrix | OA>RA |
| D50495 | Hs.80598 | transcription elongation factor A (SII), 2 | Affymetrix | OA>RA |
| D00632 | Hs.336920 | plasma glutathione peroxidase 3 precursor | Affymetrix | OA>RA |
| AI760613 | Hs.29283 | | Affymetrix | RA>OA |
| AW014646 | Hs.303157 | | Affymetrix | RA>OA |
| W74027 | Hs.132906 | 19A24 protein | Affymetrix | RA>OA |

| | | | | |
|----------|-----------|---|------------|-------|
| W72338 | Hs.23703 | | Affymetrix | RA>OA |
| AI805006 | Hs.8882 | | Affymetrix | RA>OA |
| W67655 | | | Affymetrix | RA>OA |
| AA631460 | Hs.285814 | | Affymetrix | RA>OA |
| AI741321 | Hs.10760 | asporin (LRR class 1) | Affymetrix | RA>OA |
| AI983115 | Hs.132781 | class I cytokine receptor | Affymetrix | RA>OA |
| AI535730 | Hs.262958 | | Affymetrix | RA>OA |
| AA977937 | Hs.102308 | potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8 | Affymetrix | RA>OA |
| AA447232 | Hs.334838 | | Affymetrix | RA>OA |
| AI720806 | Hs.49943 | | Affymetrix | RA>OA |
| W23237 | Hs.296162 | | Affymetrix | RA>OA |
| AI762695 | Hs.146381 | RNA binding motif protein, X chromosome | Affymetrix | RA>OA |
| AI653211 | Hs.96657 | | Affymetrix | RA>OA |
| AA633405 | Hs.1101 | POU domain, class 2, transcription factor 2 | Affymetrix | RA>OA |
| N78018 | Hs.267566 | hypothetical protein FLJ20371 | Affymetrix | RA>OA |
| AI625959 | Hs.112242 | | Affymetrix | RA>OA |
| T66196 | Hs.111554 | ADP-ribosylation factor-like 7 | Affymetrix | RA>OA |
| AI697841 | Hs.20450 | BCM-like membrane protein precursor NM_014036 | Affymetrix | RA>OA |
| AA569128 | Hs.283021 | chloride intracellular channel 5 | Affymetrix | OA>RA |
| R53594 | Hs.260164 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI970898 | Hs.234898 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI972390 | Hs.348493 | | Affymetrix | OA>RA |
| N23769 | Hs.26691 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI806324 | Hs.28625 | | Affymetrix | OA>RA |
| N28741 | Hs.75354 | | Affymetrix | OA>RA |
| AL040912 | Hs.31595 | oligodendrocyte transmembrane protein | Affymetrix | OA>RA |
| AI681917 | Hs.3321 | | Affymetrix | OA>RA |
| AW006235 | Hs.41502 | hypothetical protein FLJ21276 | Affymetrix | OA>RA |
| W73819 | Hs.352100 | | Affymetrix | OA>RA |
| T77033 | Hs.182364 | | Affymetrix | OA>RA |
| AW015787 | Hs.237731 | | Affymetrix | OA>RA |
| N30858 | Hs.44234 | triggering receptor expressed on myeloid cells 2 | Affymetrix | OA>RA |
| AI810669 | Hs.44829 | | Affymetrix | OA>RA |
| N49922 | Hs.1787 | proteolipid protein1 (Pelizaeus-Merzbacher disease, spastic paraplegia 2, uncomp) | Affymetrix | OA>RA |
| AA082546 | Hs.48516 | | Affymetrix | OA>RA |

| | | | | |
|----------|-----------|---|------------|-------|
| AI694320 | Hs.6295 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI632283 | Hs.47448 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA039324 | Hs.201925 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA877186 | Hs.90250 | | Affymetrix | OA>RA |
| R42166 | Hs.94000 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI631882 | Hs.6510 | thyrotropin-releasing hormone degrading ectoenzyme | Affymetrix | OA>RA |
| W68636 | Hs.168640 | ankylosis, progressive homolog NM_054027 ankylosis, progressive homolog | Affymetrix | OA>RA |
| AA700227 | Hs.10119 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI948584 | Hs.350495 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI678080 | Hs.141693 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI732274 | Hs.11006 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI341383 | Hs.349764 | | Affymetrix | OA>RA |
| Z99386 | Hs.173638 | | Affymetrix | OA>RA |
| W95023 | Hs.173933 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI860775 | Hs.98506 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA464846 | Hs.103262 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI751698 | Hs.184907 | G protein-coupled receptor 1 | Affymetrix | OA>RA |
| AA545730 | Hs.293821 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA181060 | Hs.349283 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA195184 | | | Affymetrix | OA>RA |
| AI680541 | Hs.23767 | hypothetical protein FLJ12666 | Affymetrix | OA>RA |
| AI659533 | Hs.348490 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI750575 | Hs.173933 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI870335 | Hs.32450 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA160945 | Hs.14479 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI936699 | Hs.193784 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI130027 | Hs.293539 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA081093 | Hs.68055 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA142913 | Hs.71721 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI984000 | Hs.37482 | COP22 for nonclathrin coat protein zeta-COP | Affymetrix | OA>RA |
| AI864898 | Hs.43125 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI670876 | Hs.44276 | homeo box C10 | Affymetrix | OA>RA |
| AA541787 | Hs.23837 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA775711 | Hs.348392 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI659927 | Hs.6634 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI084224 | Hs.53542 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI123555 | Hs.81796 | | Affymetrix | OA>RA |
| W73230 | Hs.7913 | | Affymetrix | OA>RA |
| W27376 | Hs.8395 | hypothetical protein FLJ10781 | Affymetrix | OA>RA |
| AW022607 | Hs.12482 | glyceronephosphate O-acyltransferase | Affymetrix | OA>RA |
| W70242 | Hs.58086 | | Affymetrix | OA>RA |

| | | | | |
|----------|-----------|--|------------|-------|
| W25528 | Hs.89319 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA947123 | Hs.8861 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA528821 | Hs.235857 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA131648 | Hs.23767 | hypothetical protein FLJ12666 | Affymetrix | OA>RA |
| R12398 | Hs.21075 | GTF2I repeat domain- containing 1, isoform 1 NM_005685 | Affymetrix | OA>RA |
| W52683 | Hs.107260 | hypothetical protein DKFZp586H0623 | Affymetrix | OA>RA |
| W72194 | Hs.108924 | ponsin NM_015385 | Affymetrix | OA>RA |
| AA885516 | Hs.104627 | | Affymetrix | OA>RA |
| W68796 | Hs.237731 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI879337 | Hs.323432 | mammalian inositol hexakisphosphate kinase 2 | Affymetrix | OA>RA |
| W45581 | Hs.23133 | | Affymetrix | OA>RA |
| N98637 | Hs.7759 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI809953 | Hs.123933 | | Affymetrix | OA>RA |
| T68423 | Hs.11873 | | Affymetrix | OA>RA |
| AL044670 | Hs.182364 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA779895 | Hs.19339 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI719167 | Hs.12731 | | Affymetrix | OA>RA |
| T99215 | Hs.168640 | ankylosis, progressive homolog NM_054027 ankylosis, progressive homolog | Affymetrix | OA>RA |
| AA534296 | Hs.20953 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI819043 | Hs.21342 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI762879 | Hs.86437 | | Affymetrix | RA>OA |
| W61000 | Hs.238730 | | Affymetrix | RA>OA |
| AL043192 | Hs.103378 | | Affymetrix | RA>OA |
| AI741313 | Hs.103657 | | Affymetrix | RA>OA |
| AI031674 | Hs.236494 | ras-related GTP-binding protein | Affymetrix | RA>OA |
| AA670193 | | | Affymetrix | RA>OA |
| AW005250 | Hs.238936 | | Affymetrix | RA>OA |
| AA682496 | Hs.270737 | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b | Affymetrix | RA>OA |
| AI128225 | Hs.914 | | Affymetrix | RA>OA |
| AW026543 | Hs.238936 | | Affymetrix | RA>OA |
| AI991095 | Hs.293441 | | Affymetrix | RA>OA |
| AI872510 | Hs.181125 | | Affymetrix | RA>OA |
| AI828404 | Hs.300697 | | Affymetrix | RA>OA |
| AI807353 | Hs.237868 | interleukin 7 receptor | Affymetrix | RA>OA |
| AL048481 | Hs.11571 | | Affymetrix | RA>OA |
| AW014626 | Hs.10949 | | Affymetrix | RA>OA |
| AI400414 | | | Affymetrix | RA>OA |
| AI655112 | Hs.16179 | hypothetical protein FLJ23467 | Affymetrix | RA>OA |
| AI936345 | Hs.95549 | hypothetical protein | Affymetrix | RA>OA |

| | | | | |
|----------|-----------|---|------------|-------|
| AI961907 | Hs.179573 | alpha 2 type I collagen preproprotein | Affymetrix | RA>OA |
| AI743730 | Hs.30822 | hypothetical protein FLJ11110 | Affymetrix | RA>OA |
| AI990512 | Hs.34192 | | Affymetrix | RA>OA |
| AI741715 | Hs.1466 | glycerol kinase | Affymetrix | RA>OA |
| T66305 | Hs.12920 | hypothetical protein FLJ20668 | Affymetrix | RA>OA |
| AA424160 | Hs.165909 | | Affymetrix | RA>OA |
| AI075407 | Hs.296083 | | Affymetrix | RA>OA |
| AA811088 | Hs.24143 | WASP-interacting protein | Affymetrix | RA>OA |
| AI978918 | Hs.179608 | retinol dehydrogenase homolog | Affymetrix | RA>OA |
| AA740831 | Hs.193514 | | Affymetrix | RA>OA |
| W84421 | Hs.349096 | | Affymetrix | RA>OA |
| AA233208 | Hs.91165 | hypothetical protein | Affymetrix | RA>OA |
| AA886976 | Hs.95821 | osteoclast stimulating factor 1 | Affymetrix | RA>OA |
| AA864400 | Hs.71215 | docking protein 2, 56kD | Affymetrix | RA>OA |
| AI073984 | Hs.14453 | interferon consensus sequence binding protein 1 | Affymetrix | RA>OA |
| AI983633 | Hs.179573 | alpha 2 type I collagen preproprotein | Affymetrix | RA>OA |
| AI564488 | Hs.300697 | | Affymetrix | RA>OA |
| AI655781 | Hs.237868 | interleukin 7 receptor | Affymetrix | RA>OA |
| AA814195 | Hs.184465 | hypothetical protein FLJ11259 | Affymetrix | RA>OA |
| AI916783 | Hs.234149 | hypothetical protein FLJ20647 | Affymetrix | RA>OA |
| AA829355 | Hs.267993 | hypothetical protein FLJ10143 | Affymetrix | RA>OA |
| N66595 | Hs.24283 | | Affymetrix | RA>OA |
| AA165400 | Hs.10927 | | Affymetrix | RA>OA |
| AI478759 | Hs.234149 | hypothetical protein FLJ20647 | Affymetrix | RA>OA |
| AI655719 | Hs.2157 | Wiskott-Aldrich syndrome protein | Affymetrix | RA>OA |
| N63815 | Hs.110121 | SEC7 homolog | Affymetrix | RA>OA |
| AW001184 | Hs.44672 | hypothetical protein FLJ10470 | Affymetrix | RA>OA |
| N21390 | Hs.5888 | | Affymetrix | RA>OA |
| AA587944 | Hs.259737 | FN5 protein | Affymetrix | RA>OA |
| AI951459 | Hs.7337 | hypothetical protein FLJ10936 | Affymetrix | RA>OA |
| AA464464 | Hs.10949 | | Affymetrix | RA>OA |
| AI692538 | Hs.11135 | | Affymetrix | RA>OA |
| AI817147 | Hs.181301 | cathepsin S | Affymetrix | RA>OA |
| AI263085 | Hs.17914 | CD20-like precursor | Affymetrix | RA>OA |
| W58252 | Hs.182793 | golgi phosphoprotein 2 | Affymetrix | RA>OA |
| AA056180 | Hs.70704 | | Affymetrix | RA>OA |

| | | | | |
|----------|-----------|--|------------|-------|
| AA224174 | Hs.111099 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI571452 | Hs.11169 | Gene 33 | Affymetrix | OA>RA |
| AA155952 | Hs.349303 | | Affymetrix | OA>RA |
| W68504 | Hs.191098 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI200456 | Hs.48516 | | Affymetrix | OA>RA |
| AW003093 | Hs.349764 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI190027 | Hs.38034 | | Affymetrix | OA>RA |
| R52934 | Hs.8562 | hypothetical protein FLJ20374 | Affymetrix | OA>RA |
| W44633 | Hs.301296 | | Affymetrix | OA>RA |
| AW024474 | Hs.44276 | homeo box C10 | Affymetrix | OA>RA |
| AI806502 | Hs.334800 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI492370 | Hs.105606 | hypothetical protein FLJ20512 | Affymetrix | OA>RA |
| AW021179 | Hs.90443 | NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8 (23kD) (NADH- coenzyme Q reductase | Affymetrix | OA>RA |
| AI679110 | Hs.323067 | | Affymetrix | OA>RA |
| R85633 | | | Affymetrix | OA>RA |
| N91161 | Hs.117176 | poly(A)-binding protein, nuclear 1 | Affymetrix | OA>RA |
| AW020657 | | | Affymetrix | OA>RA |
| AI871043 | Hs.173233 | hypothetical protein FLJ10970 | Affymetrix | OA>RA |
| N39237 | Hs.44977 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI949833 | Hs.21914 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA679297 | Hs.109494 | secreted protein of unknown function | Affymetrix | OA>RA |
| AI962647 | Hs.182364 | | Affymetrix | OA>RA |
| AL037611 | Hs.285902 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI871278 | Hs.301804 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI357650 | Hs.28847 | AD026 protein | Affymetrix | OA>RA |
| AI149793 | Hs.38034 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI797684 | Hs.39619 | hypothetical protein LOC57333 | Affymetrix | OA>RA |
| R52250 | Hs.348297 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI669738 | Hs.128856 | CSR1 protein | Affymetrix | OA>RA |
| AA058770 | Hs.18987 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI039005 | Hs.164680 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI936560 | Hs.6136 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA521373 | Hs.9469 | pleckstrin homology domain-containing, family A (phosphoinositide binding specif | Affymetrix | OA>RA |
| H15888 | Hs.27621 | sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembran | Affymetrix | OA>RA |
| AI333793 | Hs.337062 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA523172 | Hs.103135 | | Affymetrix | OA>RA |

| | | | | |
|-----------|-----------|---|--------------|-----------------|
| AI860960 | Hs.352081 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI355848 | Hs.35841 | nuclear factor I | Affymetrix | OA>RA |
| AI982754 | Hs.75106 | clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testos | Affymetrix | OA>RA |
| AI800218 | Hs.289019 | latent transforming growth factor beta binding protein 3 | Affymetrix | OA>RA |
| AW016356 | Hs.126857 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA968552 | Hs.25523 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI634557 | Hs.28107 | | Affymetrix | OA>RA |
| AW025494 | Hs.95867 | hypothetical protein EST00098 | Affymetrix | OA>RA |
| AA628405 | Hs.339352 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI810399 | Hs.55940 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA029735 | Hs.159993 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA723927 | Hs.209569 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI799784 | Hs.49696 | | Affymetrix | OA>RA |
| AI817330 | Hs.110477 | dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 3 | Affymetrix | OA>RA |
| AI990803 | Hs.293782 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA034418 | Hs.30627 | | Affymetrix | OA>RA |
| AA115295 | Hs.284208 | DKFZP434N161 protein | Affymetrix | OA>RA |
| AI673281 | Hs.181444 | hypothetical protein | Affymetrix | OA>RA |
| W63805 | Hs.84344 | CGI-135 protein | Affymetrix | OA>RA |
| AA427597 | | TGFβ-induc early growth response 2 | Unigene | NS>RA |
| AA806239 | | IG-ALPHA2-C REGION | Unigene | RA>NS |
| AB014518 | | KIAA0618 | Unigene | RA>NS |
| AB021871 | | AK1 | RDA, Unigene | RA>OA, RA>NS |
| AF 000984 | | DBY altern transcript 2 | Affymetrix | NS>RA |
| AF 001691 | | cornified envelope precursor | Affymetrix | NS>RA |
| AF005058 | | CXC | | |
| AF0605668 | | leukemia zink finger PLZF | Affymetrix | OA>RA |
| AF068293 | | HDCMB07P/PCM-1 | Unigene | RA>NS |
| AF105036 | | GKLF | RDA | OA>NS |
| AF182035 | | a Actin | RDA | OA>NS |
| AF182035 | | myosin light chain | RDA | OA>NS |
| AF216292 | | BIP | | |
| AF218004 | | CSNK1A1 | Unigene | RA>NS |
| AJ000542 | | natural killer cell receptor p58 | RDA | RA>OA |
| J05008 | | EDN1 | Affymetrix | NS>RA |
| L08187 | | cytokine receptor EBI 3 | RDA | RA>OA |
| L31581 | | EBI1/CCR7 | Affy | RA>NS |
| L37036 | | ENA-78 | =Affymetrix | RA>OA |

| | | | |
|------------|--|-----------------|--------------|
| M10988 | TNF μ | | |
| M19997 | elongation factor 2 | RDA | RA>OA |
| M29469 | Ig rearranged k chain (VJ regions) | RDA, Affymetrix | RA>OA |
| M31164 | TSG6 | RDA, Unigene | RA>OA, RA>NS |
| M83248 | OSTP (Osteopontin) | RDA, Affymetrix | RA>OA |
| NM_002450 | Metallomethionein | Unigene | NS>RA |
| NM_003573 | TGF β -BP4 | Unigene | RA>NS |
| NM_000362 | TIMP-3 | RDA | NS>RA |
| NM_000396 | Cathepsin K | RDA | RA>OA, OA>NS |
| NM_0006091 | SDF1 | RDA | OA>NS |
| NM_001908 | Cathepsin B | RDA | OA>NS |
| NM_002084 | glutathion peroxidase 3 | RDA | NS>RA |
| NM_002229 | Jun B | Unigene | NS>RA |
| NM_002989 | SLC | Unigene | RA>NS |
| NM_003966 | SEMA5A | RDA | RA>OA |
| NM_004039 | Annexin II | RDA | RA>OA, OA>NS |
| NM_005368 | Myoglobin | RDA | OA>NS |
| NM_006472 | VDUP1 | RDA, Unigene | NS>RA |
| NM_007016 | Mysin light polypeptid2 | RDA | OA>NS |
| NM_015675 | GADD45B/MYD118 | RDA, Unigene | NS>RA |
| R75775 | EGR1 | Unigene | NS>RA |
| U070136 | megakaryocyte stimulating factor | RDA, Unigene | NS>RA |
| U34690 | CORO1A/ p57 | Unigene | RA>NS |
| U93569 | L1 element | RDA, Unigene | RA>OA; RA>NS |
| X03754 | SCYA3 (MIP a) /GOS19 | Unigene | RA>NS |
| X0523 | MMP1 | | |
| X14723 | Clustrin / SP40 | RDA, Unigene | NS>RA |
| X15332 | collagen III a1 | RDA, Unigene | RA>OA |
| X54629 | c-myc | RDA, Unigene | NS>RA |
| X54629 | pHL-1 gene | RDA | NS>RA |
| X58122 | Nebulin | RDA | OA>NS |
| X62996 | mitochondrial mRNA | RDA | OA>NS |
| X63596 | TRE-2 | RDA | RA>OA |
| X65968 | PMP22 | Unigene | RA>NS |
| X88971 | HLA DRB1 | RDA | RA>OA |
| X94771 | EMP3 | Unigene | RA>NS |
| XM 008868 | latent transforming growth factor beta binding prot. LTBP4 | RDA, Unigene | NS>RA |
| XM_031289 | interleukin 8 | =Affymetrix | RA>OA |
| XM012651 | collagen I a1 | RDA | RA>OA |

Zusammenstellung der ProteineTabelle 2:

| Protein | Beispiel für Accession |
|--|-----------------------------------|
| 78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP 78) (Immunoglobulin heavy chain binding protein) (BIP) (Endoplasmic reticulum lumenal Ca ²⁺ binding protein grp78) | P11021 |
| Citrullinierte Peptide (d.h. Peptide, die die deiminierte Form der Aminosäure Arginin [Citrullin] beinhalten) | |
| Sa-Antigen | |
| RA33 / Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2 / hnRNP B1) | P22626 |
| Calpain inhibitor (Calpastatin) (Sperm BS-17 component) | P20810 |
| Calreticulin precursor (CRP55) (Calregulin) (HACBP) (ERp60) | P27797 |
| Synovial stimulatory protein P205 | P80697 |
| Filaggrin precursor | P20930 |
| Fibrin | |
| Fibrinogen alpha/alpha-E chain precursor [Contains: Fibrinopeptide A] | P02671 |
| Fibrinogen beta chain precursor [Contains: Fibrinopeptide B] | P02675 |
| Fibrinogen gamma chain precursor (PRO2061) | P02679 |
| DnaJ | |
| Ig gamma-1 chain C region | P01857 |
| Ig gamma-2 chain C region | P01859 |
| Ig gamma-3 chain C region (Heavy chain disease protein) (HDC) | P01860 |
| Ig gamma-4 chain C region | P01861 |
| 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (Hsp60) (60 kDa chaperonin) (CPN60) (Heat shock protein 60) (HSP-60) (Mitochondrial matrix protein P1) (P60 lymphocyte protein) (HuCHA60) | P10809 |
| EBNA-1 NUCLEAR PROTEIN | P03211 |
| IR-3, Internal Repeat Region (in EBNA-1 u.a. Proteinen) | |
| Chitinase-3 like protein 1 precursor (Cartilage glycoprotein-39) (GP-39) (39 kDa synovial protein) (YKL-40) | P36222 |
| Collagen alpha 1(II) chain precursor [Contains: Chondrocalcin] | P02458 |
| CH65, Chondrocyte Antigen 65 | |
| Collagen-binding protein 2 precursor (Colligin 2) (Rheumatoid arthritis related antigen RA-A47) | P50454 |
| 47 kDa heat shock protein precursor (Collagen-binding protein 1) (Colligin 1) | P29043 |
| Chitinase 3-like protein 2 precursor (YKL-39) (Chondrocyte protein 39) | Q15782 |
| Chitinase 3-like protein 2 precursor (YKL-39) (Chondrocyte protein 39) | Q15783 |

| | |
|--|----------|
| Chitinase 3-like protein 2 precursor (YKL-39) (Chondrocyte protein 39) | Q15749 |
| Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase) (Lung cancer antigen NY-LU-1) | P04075 |
| Proteoglycan link protein precursor (Cartilage link protein) (LP) | P10915 |
| Matrix metalloproteinase-19 precursor (MMP-19) (Matrix metalloproteinase RASI) | Q99542 |
| MMP-19 (matrix metalloproteinase) | CAA63299 |
| Aggrecan core protein precursor (Cartilage-specific proteoglycan core protein) (CSPCP) (Chondroitin sulfate proteoglycan core protein 1) | P16112 |
| Ezrin (p81) (Cytovillin) (Villin 2) | P15311 |
| Radixin | P35241 |
| Moesin (Membrane-organizing extension spike protein) | P26038 |

Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

5

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Anwendung in der klinischen Diagnostik

Ein Patient mit Gelenkbeschwerden seit 4 Monaten hat asymmetrische Schwellungen und Schmerzhaftigkeit in 2 Fingergrund- und 1 Fingermittegelenk sowie dem rechten Handgelenk. Die Morgensteifigkeit beträgt ca 30 Minuten. Radiologisch zeigen sich beginnende erosive Veränderungen in einem Zehengrundgelenk. Das C-reaktive Protein ist im Normbereich, die Senkung leicht erhöht, der Rheumafaktor und HLA-DR4 negativ. Es besteht keine familiäre Vorbelastung hinsichtlich einer entzündlich rheumatischen Erkrankung.

Es erfolgt eine ambulante Vorstellung zur minimalinvasiven arthroskopischen Entnahme einer Synovialisbiopsie am rechten Handgelenk. Von 4 Gewebeproben mit je ca 10mg Gewicht wird eine kleine Probe in Formalin fixiert für die nachfolgende histologische Beurteilung. Die verbleibenden Gewebestücke werden in RNA-Lysepuffer aufgenommen, zerkleinert und die RNA nach Standardprotokoll extrahiert. Nach Umschreibung in cDNA erfolgt die in vitro Transkription in eine Biotin-markierte cRNA als Abschrift der cDNA. Die cRNA wird fragmentiert und eingesetzt für die Hybridisierung auf dem DNA-Array.

Der Array wird von einem kommerziellen Anbieter für die Fertigung von DNA-Arrays wie z.B. Affymetrix hergestellt. Dort werden aus den Sequenzen in der Tabelle 1 und den für die Proteine in Tabelle 2 kodierenden Gensequenzen geeignete Oligo-Nucleotide bestimmt, die eine spezifische Hybridisierung mit den jeweiligen cRNA-Sequenzen ermöglichen. Diese Sequenzen werden entweder

als Oligonucleotide synthetisiert und auf einen Array-Träger gedruckt oder direkt z.B. mit photolithographischen Verfahren auf dem Träger synthetisiert.

Die Hybridisierung erfolgt nach vorgegebenem Protokoll des Herstellers. Der DNA-Array wird mit einem Scanner ausgelesen. Die Übersetzung der Bildinformation in Expressions-Signale erfolgt über Standard-Software wie z.B. „Micro-Array Suite“ von Affymetrix. Es liegen nun die Signale zur RNA-Expressionsstärke der in Tabelle 1 und 2 genannten Gene bzw. Proteine vor. Auf der Basis dieser hier neu definierten Auswahl von Genen für die diagnostische Beurteilung und Therapieentwicklung bei Gelenkerkrankungen wurden in Vorversuchen klinisch und histologisch charakterisierte Gewebeproben nach Clusteranalyse hierarchisch zueinander eingeteilt. Durch die vergleichende Assoziation mit klinischen Befunden wurde diese Einteilung insbesondere in Abhängigkeit von der Form der Erkrankung (Arthrose, reaktive Arthritis, rheumatoide Arthritis, Untergruppen der rheumatoiden Arthritis), der Aktivität der Erkrankung und damit der Prognose sowie der Beeinflussbarkeit der pathologisch veränderten Genexpression durch ein gegebenes Medikament getroffen. Die Signaldaten des oben genannten Patienten werden nun mit dieser Datenbank verglichen. Dadurch kann eine Zuordnung zu einer dieser Gruppen erfolgen und auf die dazugehörigen klinischen Assoziationen rückgeschlossen werden. Es ergeben sich somit Aussagen zu der Diagnose, der Aktivität, der Prognose und den Therapieoptionen im individuellen Krankheitsfall.

Beispiel 2: Anwendung für Therapiebeurteilung

Ein Patient mit chronischer Gelenkentzündung seit 5 Jahren und der Diagnose rheumatoide Arthritis hat fortschreitende spezifische radiologische Veränderungen in mehreren Fingergelenken, begleitet von Schmerzen und Schwellungen in mehreren Fingergelenken, dem linken Ellbogengelenk und dem rechten Sprunggelenk trotz aktueller Basistherapie mit 15mg Methotrexat pro Woche. Es erfolgt eine ambulante Vorstellung zur minimalinvasiven arthroskopischen Entnahme einer Synovialisbiopsie am linken Ellbogengelenk. Mehrere Proben von ca 30mg Gesamtgewicht werden in Lysepuffer aufgenommen, zerkleinert und die RNA extrahiert. Die Aufarbeitung der Probe erfolgt vergleichbar zu dem Vorgehen in Beispiel 1. Es wird der gleiche DNA-Chip wie in Beispiel 1 zur Analyse verwendet. Nach Hybridisierung, Auslesen des Hybridisierungsergebnisses in eine Bilddatei und Übersetzen in eine Signalinformation für jedes der untersuchten Gene erfolgt eine Zuordnung zu definierten Expressionsmustern. Diese wurden in Vorversuchen festgelegt unter Verwendung der hier neu definierten Auswahl von Genen aus Tabelle 1 und 2. Dabei wurde die Veränderung des Expressionsprofils einer Probe in Abhängigkeit von der zugehörigen Gelenkerkrankung unter Einfluss definierter Medikamente mit definierten Konzentrationen analysiert. Die Profile wurden hierarchisch eingeteilt unter Berücksichtigung der Assoziation zu den verwendeten Medikamenten und der verwendeten Dosis. Wird mit diesen definierten Expressionsmustern die Patientenprobe verglichen, wird anhand der Zuordnung zu einem bestimmten Muster und den damit assoziierten Wirksamkeitsaussagen eine Abschätzung möglich, ob das gegebene Medikament Methotrexat mit

einer höheren Dosierung erfolgreich sein könnte, oder ob eine Umstellung erfolgen sollte auf ein Medikament, dessen Wirkungsprofil am besten die pathologischen Veränderungen in diesem individuellen Fall zu beeinflussen vermag.

Beispiel 3: Autoreaktivitätsprofile bei der RA

5 Die RA unterscheidet sich von anderen rheumatischen sowie von anderen entzündlichen Erkrankungen durch die Ausbildung von Autoantikörpern. Dabei wird eine Diskriminierung zwischen RA und nicht-RA nicht durch eine Antikörper-Reaktivität gewährleistet, sondern durch verschiedene Profile unterschiedlicher Autoreaktivitäten. Es ist somit möglich, über die Bestimmung der RA-spezifischen Autoreaktivitätsprofile eine gesicherte Diagnostik zu erstellen, Therapieverläufe zu
10 kontrollieren und Vorsorgeuntersuchungen durchzuführen.

Antikörper richten sich gegen Antigene oder spezifischer gegen Epitope, die bei einer spezifischen Antikörper-Antigen-Reaktion von den Paratopen gebunden werden. Epitop ist per Definition der Bereich eines Antigens, der mit einem Antikörper spezifisch (d.h. mit dessen Paratop) in Wechselwirkung tritt. Üblicherweise versteht man hierunter eine 16 bis 20 Aminosäuren große
15 Peptidsequenz eines Proteins. Diese Sequenz kann konsekutiv (kontinuierliches Epitop) oder unterbrochen (diskontinuierliches Epitop) sein. Typischerweise sind jedoch für die spezifische Wechselwirkung von Antikörper und Antigen aber nur wenige Aminosäuren, in seltenen Fällen auch nur eine einzige Aminosäure, notwendig und hinreichend. Zwischenzeitlich ist bekannt, dass selbst Nukleinsäuren als Antigen fungieren können. Besondere Bedeutung gewinnen zunehmend
20 posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung, Acylierung, Glykosylierung, Methylierung, Deiminierung u.a.. Da diese Modifikationen oftmals regulatorische Funktion aufweisen, scheinen diese in besonderer Weise Zielstruktur von Antikörpern zu sein, insbesondere unter pathologischen Bedingungen. Da bei einigen RA-assoziierten Autoantigenen schon gezeigt wurde, dass bestimmte posttranslationale Modifikationen Epitope für Autoantikörper bilden, muss besonderes
25 Augenmerk darauf gelegt werden, dass diese Strukturen für das Testsystem realisiert werden.

Die in Tabelle 2 gelisteten Proteine sind als RA-assoziierte Autoantigene beschrieben. Die Relevanz der meisten dieser Einzelkomponenten für die Diagnostik der RA ist jedoch gering bzw. nicht ersichtlich. Das gleiche gilt für die auf mRNA-Ebene überexprimierten Gene, die in Tabelle 1 gelistet sind. Für sich genommen sind diese Komponenten nicht geeignet, die RA-Diagnostik wesentlich zu
30 verbessern. Dies zeigt sich daran, dass praktisch die Mehrheit der in Tabelle 1 und 2 gelisteten Proteine nicht für diese Zwecke zum Patent angemeldet ist. Lediglich einige wenige Proteine sind derart charakteristisch, dass eine Relevanz für die RA angenommen wurde. Dies betrifft z.B. das BiP (Heavy Chain Binding Protein), das Ziel einer Immunreaktion bei der RA ist. Hier ist beispielsweise eine posttranslationale Modifikation in Form einer Glykosylierung zu berücksichtigen, da diese
35 Bestandteil von Epitopen ist, die sowohl für die Erkennung von Autoantikörpern aus RA als auch für die Unterscheidung zwischen RA- und nicht-RA-Autoantikörpern erforderlich ist. Des weiteren wurde

die posttranslational von Arginin in Citrullin umgewandelte Aminosäure als wesentliches Epitop für RA-assoziierte Autoantikörper beschrieben(6). Eine ähnlich hohe Bedeutung für die RA-Diagnostik weisen das Sa-Antigen (5), das RA33-Antigen, und das Calpastatin auf.

Dennoch waren diese Komponenten für sich genommen nicht geeignet, eine eindeutige
5 Diagnosestellung der RA oder gar ein Therapiemonitoring zu ermöglichen. Der hier erfindungsgemäß dargestellte neue Ansatz bezieht sich auf das Immunom der RA. Das Immunom der RA umfasst die Gesamtheit der autoreaktiven Antikörper, die in der RA auftreten sowie die Gesamtheit der von diesen erkannten Autoantigene bzw. Auto-Epitope. Unerwarteterweise konnte festgestellt werden, dass es erstmalig möglich ist, durch Betrachtung der Kombination RA-assoziiierter Autoantikörper eine
10 Erkrankung eindeutig als RA zu definieren. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass unterschiedliche Muster von Autoantikörpern existieren, die ausschließlich bei der RA auftreten. Diese Muster beziehen auch solche Autoantigene bzw. Autoreaktivitäten mit ein, die für sich genommen unbedeutend für die RA erschienen. Dies ist umso überraschender, als erste Schritte in diese Richtung von anderen Gruppen nicht zu diesem Ergebnis geführt haben, obwohl betont wird, dass die
15 wichtigsten Autoantigene von acht verschiedenen Autoimmunerkrankungen des Menschen zum Einsatz kamen (11). Das gleiche trifft für einen Ansatz zu, in dem Autoantigene eingesetzt wurden, die für eine andere rheumatische Erkrankung, den systemischen Lupus erythematodes (SLE), relevant sind. Offenbar besteht der wesentliche Unterschied zwischen bereits publizierten Ansätzen und dem hier beschriebenen zum einen in der Art der Analyse (multivariant), zum anderen in der Komposition
20 der Autoantigene. Erst eine genügend hohe Anzahl von RA-relevanten Autoreaktivitäten ermöglicht eine eindeutige Diagnosestellung. Somit stellt also die Gesamtheit der RA-assoziierten Autoantikörper und Autoantigene eine Information dar, die – zusammen mit anderen Techniken (ProteinArray-Technologie (27), Datenverarbeitung) – u.a. als Werkzeug für die Diagnostik und Klassifizierung der RA nutzbar gemacht werden kann. Auch ein Experte auf diesem Gebiet hätte durch Analogieschlüsse
25 nicht auf diesen Nutzungsgrad kommen können. Das Immunom der RA oder auch bereits Teilmengen des Immunoms der RA können dazu genutzt werden, die RA eindeutig von anderen Erkrankungen oder dem gesunden Zustand abzugrenzen. Eine wirtschaftliche Nutzung der unerwarteten Erfindung ist darüber hinaus auch erst durch die in der heutigen Zeit vorhandenen oder noch in der Entwicklung befindlichen Möglichkeiten der High-Throughput-Technologien möglich. Dies bezieht sich
30 insbesondere auf die Multiparameter-Analyse von Autoreaktivitäten, da es hier erforderlich ist, eine Vielzahl von Untersuchungen parallel und unter Einsatz kleinster Patienten-Probenmengen durchzuführen.

Proteine oder Protein-Teilsequenzen der in Tab. 2 aufgeführten Komponenten oder Proteine und Protein-Teilsequenzen, die von den in Tab. 1 aufgeführten Genen kodiert werden, inclusive der ggf.
35 für die Diskriminierung von RA und nicht-RA erforderlichen posttranslationalen Modifikationen, werden synthetisiert und für die Erstellung von Autoreaktivitätsprofilen bereitgestellt. Die Synthese kann durch einen beliebigen molekularbiologischen an sich bekannten Ansatz erfolgen oder aber

durch einen beliebigen proteinchemischen Ansatz. Darüber hinaus ist auch die halbartefizielle (in vitro-Translation) oder artefizielle Synthese nach dem Stand der Technik geeignet, die genannten Proteine oder Protein-Teilsequenzen herzustellen.

ProteinArray / PeptidArray (28)

5 Proteine oder Proteinteilsequenzen gemäß Tabelle 2 oder 1 werden alle oder nur eine für die immunomische Diskriminierung von Krankheitsbildern nützliche Auswahl dieser dazu verwendet, eine Testmöglichkeit zu erstellen, die geeignet ist, den Autoreaktivitätsstatus eines Individuums zu bestimmen. Dies betrifft insbesondere die Auswahl von Citrullin, BiP, p205, IgG, Calpastatin, RA33, Sa-Antigen und Calreticulin. Hierzu werden die Proteine getrennt in räumlich auflösbaren Positionen
10 auf eine Trägermatrix nach bekanntem aufgebracht. Position und Identität eines jeden immobilisierten Proteins, Peptids, modifizierten Proteins oder modifizierten Peptids sind bekannt. Das Microformat erlaubt den parallelen Nachweis von tausenden unterschiedlichen Antigenen und/oder Autoantigenen (Proteinen / Peptiden) im Submikroliter-Bereich von Humansenen. Bevorzugt ist die Erstellung eines ProteinArray, eines Hochdichte-Filters oder eines Hoch-Dichte Glasträgers oder einer anderen im
15 Hochdichte-Verfahren hergestellten Matrix, die beschichtet oder unbeschichtet mit den Proteinen bzw. Protein-Teilsequenzen gekoppelt wird. Beispielsweise können Proteine oder Protein-Teilsequenzen auf derivatisierte oder beschichtete/aktivierte Glasträger aufgestempelt werden, oder aber der Auftrag erfolgt im Ink Jet-Verfahren, kapillar oder durch direkte Synthese auf den Array unter Verwendung von photolithographischen Masken oder von digitalen Mikrospiegeln. Anstelle von Glasträgern können
20 auch Membranen und Filter, Polystyren-Matrices, Nanowell-Platten sowie Micropartikel Verwendung finden (29).

Der ProteinArray wird mit einer geeigneten Verdünnung von Patientenserum oder auch von Patienten-Gelenkergüssen inkubiert. Während dieser Inkubation können etwaig vorhandene Antikörper mit Spezifität für eine oder mehrere Protein-Komponenten an diese Protein-Antigene binden.
25 Anschließend erfolgt ein Waschschriff, um ungebundene Antikörper und Serum-Komponenten zu entfernen. Anschließend erfolgt Inkubation mit einem Zweitantikörper, der zum einen geeignet ist, eine erfolgte Antigen-Antikörper-Reaktion über Bindung des Erstantikörpers zu markieren und zum anderen eine geeignete Markierung, die eine Visualisierung und Quantifizierung erlaubt, geeigneterweise einen kovalent gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff oder einem kovalent gekoppeltem
30 Enzym, das aus einem Vorläufer einen Farbstoff bilden kann. Anschließend erfolgt ein weiterer Waschschriff, um überschüssigen Zweitantikörper zu entfernen.

SuspensionsArray (30)

Der SuspensionsArray verwendet als Matrix Plastik-Partikel, die mit den genannten Proteinen beschichtet werden. Dabei unterscheiden sich die optischen Eigenschaften der Partikel, die mit einem
35 bestimmten Protein gekoppelt sind, von denen, die mit einem anderen Protein gekoppelt sind. Die immunomische Bestimmung erfolgt analog durch Inkubation mit Patientenserum oder anderen

Körperflüssigkeiten. Über die Antikörperbindung wird direkt oder wieder indirekt durch einen geeigneten Zweitantikörper ein weiteres optisches (fluoreszierendes) Signal gesetzt. Die Analyse erfolgt dann in einem Vielfarben-Fluorescence Aktivated Cell (FAC-) Scan.

Zeitaufgelöste ProteinArrays (31)

- 5 Eine Polystyren-Oberfläche wird mit verschiedenen Proteinen oder Protein-Teilsequenzen aus Tabellen 1 und 2 gekoppelt. Die zu analysierenden Antikörper der Patientenserum werden biotinyliert unter Verwendung eines aktiven Biotin-Esters. Alternativ können zur Vermeidung von Inter-Patienten-Schwankungen durch unterschiedliche Biotinylierungseffizienz auch biotinylierte Sekundäntikörper verwendet werden, die spezifisch für humane Antikörper sind. Patienten-
10 Antikörper werden dann mit den Protein-gekoppelten Polystyren-Oberflächen inkubiert. Nach anschließendem Waschschrift erfolgt Detektion mittels Streptavidin, das mit einem fluoreszierenden Europium-Chelat gekoppelt ist. Der Nachweis erfolgt nach einem Wasch- und Trocknungsschritt mittels laserangeregter, zeitaufgelöster Festphasenfluoreszenzanalyse.

Daten-Muster und multifaktorielle Analyse

- 15 Parameter (z.B. die Autoreaktivitäten, die sich aus den in Tabelle 1 und 2 gelisteten Proteinen / Autoantigenen ergeben; z.B. die Autoreaktivitäten RF/ citrullin/ BIP/ Calpastatin/ Calreticulin/ RA33) werden so vollständig wie möglich bestimmt. Daten-Muster einzelner Patienten mit mehr als zwei aus sechs Missing Values werden a-priori von der Analyse ausgeschlossen.

- Die Auswertung des Immundetektionssystems liefert für jeden Patienten und jede Autoreaktivität
20 entweder ein negatives oder ein positives Ergebnis. Alternativ sind auch kontinuierliche Werte (ProteinArray, ELISA) möglich, die entweder artefiziell (mathematisch) oder über einen kontrollgruppenbezogenen (Analyse gegen geeignete Kontrollgruppe, z.B. age- und sex-matched gesunde Kontrollen oder Kontroll-Patienten mit einer anderen Erkrankung) Cut Off in positiv und negativ unterteilt werden. Jedes Daten-Muster wird mit dem CLASSIF1 Programm-System(32)
25 analysiert und klassifiziert.

In einem ersten Schritt werden Tripel-Matrix-Charaktere einer jeden klinischen Diagnose-Kategorie in die erste Referenz-Klassifizierungsmaske eingegeben. Jeder Patient wird dann gemäß der höchsten Positionsübereinstimmung zwischen der Patienten-Maske und einer klinischen Referenz-Maske klassifiziert.

- 30 In einem zweiten Schritt werden diejenigen Daten-Spalten eliminiert, die den Tripel-Matrix-Charakter "0" für alle Referenz-Masken aufweisen, da diese nicht in der Lage sind, zwischen den Krankheits-Entitäten zu diskriminieren.

- In einem dritten Schritt eliminiert der CLASSIF1-Algorithmus vorübergehend entweder einzelne Parameter oder Kombinationen von zwei Parametern in allen Permutationen aus dem
35 Klassifikationsprozess. Das gesamte Datenset wird dann reklassifiziert. Parameter, die durch ihr

vorübergehendes Entfernen das Klassifikationsergebnis beeinträchtigen, sind informativ, da offenbar keine essentielle Information verloren geht. Der Informationsgehalt eines jeden Parameters wird zwischenzeitlich durch den Algorithmus bereitgehalten, nach der Operation wieder eingesetzt und der nächste Parameter bzw. das nächste Parameterpaar zeitweise extrahiert und analog analysiert. Das zeitweise Entfernen und Wiedereinsetzen wird so lange durchgeführt, bis der Informationsgehalt aller Parameter, entweder einzeln oder in Kombination, bekannt ist. Parameter, die sich als unformativ entweder einzeln oder in Kombination mit einem weiteren Parameter erwiesen haben, werden eliminiert. Die verbleibende Sequenz informativer Parameter bildet die Referenz-Klassifikations-Maske für die jeweilige klinische Prediktionskategorie.

5 In einem vierten Schritt wird die Klassifizierung optimiert durch Klassifizierung der Percentil-Schwellenwerte 10/90%, 15/85%, 20/80%, 25/75% und 30/70% mit anschließender Auswahl des am besten diskriminierenden Paares. Die besten Klassifikationsergebnisse werden typischerweise zwischen den 10/90% und 25/75% Perzentilenpaaren erzielt. Negative und positive prädiktive Werte in einer Confusion Matrix liefern Informationen darüber, wie gut Referenz- und zu testende Proben durch das oder die verwendeten Muster diskriminiert werden.

Zusätzlich werden die Daten-Muster eines jeden Patienten einer multifaktoriellen Analyse unterzogen. Die Multifaktoren für fünf Parameter-Muster wurden durch Multiplikation oder Division der verschiedenen Parameter in allen möglichen Kombinationen erhalten, gefolgt von Standardisierung der fünf Daten-Spalten gegenüber den Mittelwerten der RA-Referenz-Gruppe. Anschließend wurden die Mittelwerte für jeden Parameter der übrigen Patienten-Gruppen (z.B. OA, reA, PsoA, andere) ermittelt. Multifaktoren aller Parameter-Permutationen wurden entweder durch Multiplikation ermittelt, wenn der Parameter-Mittelwert der betreffenden Patientengruppe gegenüber dem Referenzwert (RA) erhöht war, oder durch Division, wenn der Wert erniedrigt war.

20 Die multifaktorielle Datenbank beinhaltet die gemessenen Parameter (RF/ Citrullin/ BiP/ Calpastatin/ Calreticulin/ RA33). 26 Multifaktoren wurden durch den CLASSIF1-Algorithmus klassifiziert. Hierfür wurden alle Zahlen einer jeden Datenbank-Spalte entweder in – (kleiner als die untere Perzentile der Werteverteilung der Referenzpatienten [RA]), 0 (zwischen unterer und oberer Perzentile) oder + (größer als die obere Perzentile) Tripel-Matrix-Charaktere transformiert. Im Anschluss an die Transformation der Datenbank-Spalten wird eine Confusion Matrix zwischen klinischer Diagnose und Computer-Klassifikation etabliert.

30 Die Diagonalwerte dieser Confusion Matrix repräsentieren die Spezifität der Referenzproben und die Sensitivität für die zu testenden Proben. Diese werden während des anschließenden iterativen Lernprozesses weiter optimiert. Eine optimale Klassifizierung ist erreicht, wenn alle Proben korrekt klassifiziert sind, wenn also alle Diagonalwerte der Confusion Matrix 100% erreichen und die Werte der nicht diagonalen Felder 0% sind. Der Lernprozess dient der Eliminierung nicht-informativer Parameter und somit einer Anreicherung der diskriminierenden Parameter.

Legende zur Figur

Figur 1: Autoreaktivitätsmuster mit RA33, RF, Citrullin, BiP und Calpastatin

- 5 Dargestellt sind alle 32 möglichen Kombinationen der Autoreaktivitäten gegen IgG (RF), Citrullin, BiP, Calpastatin, RA33 und Calpastatin für die Krankheitsentitäten RA (rheumatoide Arthritis), reA (reaktive Arthritis), OA (Osteoarthrose), PsoA (Psoriasis-assoziierte Arthritis) und andere.

10

Abkürzungsverzeichnis

| | | |
|----|--------|--|
| | ACR | American College of Rheumatologie |
| | BiP | Binding Protein, Heavy Chain Binding Protein |
| 15 | BSA | Rinder-Serum-Albumin (Bovine serum albumin) |
| | Calp | Calpastatin |
| | Calr | Calreticulin |
| | Calp | Calpastatin |
| | cDNA | complementary DNA, copy DNA |
| 20 | CH | Chondrocyte Antigen |
| | Cit | citrullinierte Peptide |
| | CrP | C-reaktives Protein |
| | DNA | Desoxyribonucleinsäure (desoxyribonucleic acid) |
| | DPNII | von Diplococcus pneumoniae |
| 25 | dNTP | Desoxynukleotidtriphosphate (equimolare Mischung aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP) |
| | dNTP | Deoxynucleotidtriphosphat |
| | EBNA-1 | Epstein Barr Virus Nuclear Antigen-1 |
| | EBV | Epstein-Barr-Virus |
| 30 | ER | endoplasmatisches Reticulum |
| | FACS | Fluorescence Activated Cell Sorting |
| | GAPDH | Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase |
| | HC | Human Cartilage |

| | | |
|----|------------|---|
| | HC gp39 | Human Cartilage Glycoprotein 39 |
| | HLA-System | Histokompatibilitäts-Antigene (HLA – human leucocyte antigen) |
| | HLA-DR4 | HLA-Merkmal, das eine erhöhte Assoziation mit einer rheumatoiden Arthritis aufweist |
| 5 | hnRNP | heterogenous ribonucleoprotein (RA33) |
| | Hsp | Heatshock Protein |
| | Ig | Immunglobulin |
| | IgG | Immunglobulin G |
| | IL- | Interleukin |
| 10 | IR-3 | Internal Repeat Region 3 |
| | MCTD | Mixed Connective Tissue Disease (Mischkollagenose) |
| | MHC- | Major Histocompatibilitäts Komplex |
| | MMP | Matrix Metalloproteinase |
| | mRNA | Messenger-Ribonucleinsäure |
| 15 | NAD | Nikotinamidadenindinukleotid |
| | NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| | ND | Normal Donor (Normalspender) |
| | OA | Osteoarthrose |
| | O-GlcNAc | O-N-Acetylglucosamin |
| 20 | PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| | PHA | Phytohemagglutinin |
| | PM/DM | Polymyositis / Dermatomyositis |
| | PsoA | Psoriasis-assoziierte Arthritis |
| | RA | Rheumatoide Arthritis |
| 25 | RA-A47 | Arthritis-related antigen |
| | RA33 | hnRNP A2 |
| | RDA | Representational Difference Analysis |
| | reA | reaktive Arthritis |
| | RF | Rheumafaktoren |
| 30 | RNA | Ribonucleinsäure |
| | RPMI | handelsübliches Zellkulturmedium, Verdünnungsmedium RPMI 1640; Moore, G. E. et al., J. Am. Assoc. 199, 519 - 524, 1967) |
| | RsaI | DNA-Restriktionsenzym RsaI von Rhodopseudomonas sphaeroides |
| | RT | Reverse Transcriptase (RT) |

| | | |
|---|------------|--|
| | Sa-Antigen | 50k-Protein aus humaner Milz und Placenta |
| | SLE | systemischer Lupus erythematodes |
| | SSH | Suppression Subtractive Hybridization |
| | TGF | transforming growth factor |
| 5 | UNIGENE | UniGene ist ein experimentelles System zur automatischen Partitionierung der GenBank Sequenzen in ein nicht-redundantes Set an genorientierten Clustern. |
| | YKL-39 | human cartilage-related protein |

10

Referenzen

1. Arnett, F. C., S. M. Edworthy, D. A. Bloch, D. J. McShane, J. F. Fries, N. S. Cooper, L. A. Healey, S. R. Kaplan, M. H. Liang, H. S. Luthra, and et al. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315.
2. Kaps, C., C. Bramlage, H. Smolian, A. Haisch, U. Ungethum, G. R. Burmester, M. Sittinger, G. Gross, and T. Haupl. 2002. Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction. *Arthritis Rheum* 46:149.
3. Roudier, J., G. Rhodes, J. Petersen, J. H. Vaughan, and D. A. Carson. 1988. The Epstein-Barr virus glycoprotein gp110, a molecular link between HLA DR4, HLA DR1, and rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 27:367.
4. Albani, S., E. C. Keystone, J. L. Nelson, W. E. Ollier, A. La Cava, A. C. Montemayor, D. A. Weber, C. Montecucco, A. Martini, and D. A. Carson. 1995. Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1:448.
5. Despres, N., G. Boire, F. J. Lopez-Longo, and H. A. Menard. 1994. The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 21:1027.
6. Schellekens, G. A., B. A. de Jong, F. H. van den Hoogen, L. B. van de Putte, and W. J. van Venrooij. 1998. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 101:273.
7. Girbal-Neuhauser, E., J. J. Durieux, M. Arnaud, P. Dalbon, M. Sebbag, C. Vincent, M. Simon, T. Senshu, C. Masson-Bessiere, C. Jolivet-Reynaud, M. Jolivet, and G. Serre. 1999. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol* 162:585.
8. Alsalameh, S., J. Mollenhauer, N. Hain, K. P. Stock, J. R. Kalden, and G. R. Burmester. 1990. Cellular immune response toward human articular chondrocytes. T cell reactivities against chondrocyte and fibroblast membranes in destructive joint diseases. *Arthritis Rheum* 33:1477.
9. DeRisi, J., L. Penland, P. O. Brown, M. L. Bittner, P. S. Meltzer, M. Ray, Y. Chen, Y. A. Su, and J. M. Trent. 1996. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 14:457.
10. Haab, B. B., M. J. Dunham, and P. O. Brown. 2001. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol* 2:RESEARCH0004.
11. Robinson, W. H., C. DiGennaro, W. Hueber, B. B. Haab, M. Kamachi, E. J. Dean, S. Fournel, D. Fong, M. C. Genovese, H. E. de Vegvar, K. Skriver, D. L. Hirschberg, R. I. Morris, S.

- Muller, G. J. Pruijn, W. J. van Venrooij, J. S. Smolen, P. O. Brown, L. Steinman, and P. J. Utz. 2002. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med* 8:295.
12. Eberwine, J. 1996. Amplification of mRNA populations using aRNA generated from
5 immobilized oligo(dT)-T7 primed cDNA. *Biotechniques* 20:584.
13. Cook, A. F., E. Vuocolo, and C. L. Brakel. 1988. Synthesis and hybridization of a series of
biotinylated oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 16:4077.
14. Okamoto, T., T. Suzuki, and N. Yamamoto. 2000. Microarray fabrication with covalent
attachment of DNA using bubble jet technology. *Nat Biotechnol* 18:438.
- 10 15. Fodor, S. P., J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, and D. Solas. 1991. Light-directed,
spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251:767.
16. Barone, A. D., J. E. Beecher, P. A. Bury, C. Chen, T. Doede, J. A. Fidanza, and G. H. McGall.
2001. Photolithographic synthesis of high-density oligonucleotide probe arrays. *Nucleosides
Nucleotides Nucleic Acids* 20:525.
- 15 17. Hubank, M., and D. G. Schatz. 1994. Identifying differences in mRNA expression by
representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 22:5640.
18. Lisitsyn, N., and M. Wigler. 1993. Cloning the differences between two complex genomes.
Science 259:946.
19. Bussow, K., E. Nordhoff, C. Lubbert, H. Lehrach, and G. Walter. 2000. A human cDNA
20 library for high-throughput protein expression screening. *Genomics* 65:1.
20. Altman, R., G. Alarcon, D. Appelrouth, D. Bloch, D. Borenstein, K. Brandt, C. Brown, T. D.
Cooke, W. Daniel, D. Feldman, and et al. 1991. The American College of Rheumatology
criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 34:505.
21. Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid
25 guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156.
22. Diatchenko, L., Y. F. Lau, A. P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S.
Lukyanov, K. Lukyanov, N. Gurskaya, E. D. Sverdlov, and P. D. Siebert. 1996. Suppression
subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific
cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6025.
- 30 23. Gress, T. M., J. D. Hoheisel, G. G. Lennon, G. Zehetner, and H. Lehrach. 1992. Hybridization
fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole
tissues. *Mamm Genome* 3:609.
24. Lennon, G. G., and H. Lehrach. 1991. Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries.
Trends Genet 7:314.
- 35 25. Krenn, V., A. Konig, F. Hensel, C. Berek, M. M. Souto Carneiro, W. Haedicke, Y. Wang, H.
Vollmers, and H. K. Muller-Hermelink. 1999. Molecular analysis of rheumatoid factor (RF)-
negative B cell hybridomas from rheumatoid synovial tissue: evidence for an antigen-induced
stimulation with selection of high mutated IgVH and low mutated IgVL/lambda genes. *Clin
Exp Immunol* 115:168.
- 40 26. Leushner, J. 2001. MALDI TOF mass spectrometry: an emerging platform for genomics and
diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 1:11.
27. MacBeath, G., and S. L. Schreiber. 2000. Printing proteins as microarrays for high-throughput
function determination. *Science* 289:1760.
28. Walter, G., K. Bussow, D. Cahill, A. Lueking, and H. Lehrach. 2000. Protein arrays for gene
45 expression and molecular interaction screening. *Curr Opin Microbiol* 3:298.
29. Spiro, A., M. Lowe, and D. Brown. 2000. A bead-based method for multiplexed identification
and quantitation of DNA sequences using flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 66:4258.
30. Nolan, J. P., and F. F. Mandy. 2001. Suspension array technology: new tools for gene and
protein analysis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47:1241.
- 50 31. Madersbacher, S., and P. Berger. 2000. Antibodies and immunoassays. *Methods* 21:41.
32. Valet, G., M. Valet, D. Tschöpe, H. Gabriel, G. Rothe, W. Kellermann, and H. Kahle. 1993.
White cell and thrombocyte disorders. Standardized, self-learning flow cytometric list mode
data classification with the CLASSIF1 program system. *Ann N Y Acad Sci* 677:233.

Patentansprüche

1. Werkzeuge zur Diagnostik, molekularen Definition und Therapieentwicklung chronischer entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der Sequenzen einzelner Gene, einer Auswahl von 5 Genen oder aller Gene, die in der Tabelle 1 genannt sind, sowie der Gene, die für die Proteine, die in der Tabelle 2 genannt sind, codieren.
2. Werkzeuge nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie Gensequenzen einbeziehen, die in ihrer Sequenz identisch zu den in der Tabelle 1 genannten Genen bzw. zu den Genen, die für die in der 10 Tabelle 2 genannten Proteine codieren, sind oder mindestens 80% Sequenzidentität in den Proteinkodierenden Abschnitten besitzen.
3. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie Sequenzabschnitte oder Teilsequenzen einbeziehen, die in ihrer Sequenz identisch sind zu den in der Tabelle 1 genannten und 15 unter Anspruch 2 fallenden Gene oder eine Sequenzidentität von mindestens 80% zu den entsprechenden Abschnitten der genannten Gene besitzen.
4. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung eines 20 4.1. High-Throughput Verfahrens der (Micro-) Array-Hybridisierung
4.2. High-Throughput Verfahrens mit Techniken der Polymerase-Ketten-Reaktion zur (Semi-) Quantifizierung
beruhen.
- 25 5. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung einer markierten Patientenprobe und einer zweiten unterschiedlich markierten Kontrollprobe zur vergleichenden Doppel-Hybridisierung an einen (Micro-) Array zusammen mit der Patientenprobe (rot/grün Vergleichs-Hybridisierung) beruhen.
- 30 6. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 für diagnostische Zwecke, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung einzelner, einer Auswahl oder aller aus den Gensequenzen in Anspruch 1 bis 3 abgeleiteten Proteine bzw. Peptide beruhen.
- 35 7. Werkzeuge nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung einzelner Proteine, einer Auswahl von Proteinen oder aller Proteine, die in der Tabelle 2 genannt sind, beruhen.

8. Werkzeuge nach den Ansprüchen 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung von Teilsequenzen einzelner Proteine, einer Auswahl von Proteinen oder aller Proteine, die in der Tabelle 1 genannt sind, beruhen.

5

9. Werkzeuge nach den Ansprüchen 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass sie Proteine oder Protein-Teilsequenzen einbeziehen, die in ihrer Sequenz identisch zu den in der Tabelle 1 abgeleiteten Proteinen oder den in der Tabelle 2 genannten Proteinen sind oder mindestens 80% Sequenzidentität besitzen.

10

10. Werkzeuge nach den Ansprüchen 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung von

10.1. High-Throughput Verfahren in der Protein-Expressionsanalytik (hochauflösende, zweidimensionale Protein-Gelelektrophorese, MALDI-Techniken)

15 10.2. High-Throughput Verfahren in der Protein-Spotting Technik (Protein Arrays) zum Screening von Autoantikörpern als diagnostisches Werkzeug für entzündliche Gelenkerkrankungen und andere entzündliche, infektiöse oder tumoröse Erkrankungen beim Menschen

20 10.3. High-Throughput Verfahren in der Protein-Spotting Technik (Protein Arrays) zum Screening von autoreaktiven T-Zellen als diagnostisches Werkzeug für entzündliche Gelenkerkrankungen und andere entzündliche, infektiöse oder tumoröse Erkrankungen beim Menschen

10.4. Nicht-High-Throughput Verfahren in der Protein-Spotting Technik zum Screening von autoreaktiven T-Zellen als diagnostisches Werkzeug für entzündliche Gelenkerkrankungen und andere entzündliche, infektiöse oder tumoröse Erkrankungen beim Menschen
beruhen.

25

11. Werkzeuge nach den Ansprüchen 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung von Antikörpern, die spezifisch für Proteine oder Teilsequenzen sind, die unter den Ansprüchen 6 bis 9 aufgeführt sind, beruhen.

30 12. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung der entsprechenden homologen Sequenzen einer anderen Spezies zur Analytik in Tierexperimenten oder zur Diagnostik bei Tieren mit entzündlichen Gelenkerkrankungen und anderen entzündlichen, infektiösen oder tumorösen Erkrankungen beruhen.

35 13. Werkzeuge nach den Ansprüchen 6 bis 11 als diagnostische Werkzeuge zum Nachweis genetischer Veränderungen (Mutationen) in den unter Anspruch 1 bis 3 genannten Genen oder deren

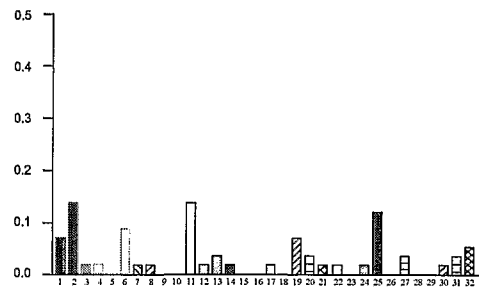
Regulationssequenzen (Promotor, Enhancer, Silencer, spezifische Sequenzen für die Bindung weiterer regulatorischer Faktoren).

- 5 14. Werkzeuge nach den Ansprüchen 6 bis 11 und 13 zum Nachweis genetischer Veränderungen (Mutationen) in den Genen oder deren Regulationssequenzen (Promotor, Enhancer, Silencer, spezifische Sequenzen für die Bindung weiterer regulatorischer Faktoren), die für die in der Tabelle 2 genannten Proteine codieren.
- 10 15. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 zur molekularen Definition entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der in Anspruch 1-3 benannten Gene, DNA-Sequenzen oder davon abgeleitete Proteine oder Peptide sowie der Proteine und Protein-Teilsequenzen aus Anspruch 6 bis 9 oder den dafür codierenden Gensequenzen.
- 15 16. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 zum Therapie-Entscheid entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der in Anspruch 1-3 benannten Gene, DNA-Sequenzen oder davon abgeleitete Proteine oder Peptide.
- 20 17. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 zur Verlaufskontrolle/Therapiekontrolle entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der in Anspruch 1-3 benannten Gene, DNA-Sequenzen oder davon abgeleitete Proteine oder Peptide.
- 25 18. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 als molekulare Werkzeuge zur Entwicklung von Therapiekonzepten, die die direkte oder indirekte Beeinflussung der Expression der in Anspruch 1-3 benannten Gene oder Gensequenzen beinhalten.
- 30 19. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 und 18 zur Entwicklung von Therapiekonzepten, die die direkte oder indirekte Beeinflussung der Expression der in Anspruch 6 bis 9 benannten Proteine oder Protein-Teilsequenzen beinhalten.
- 35 20. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 und 18 bis 19 zur Entwicklung von Therapiekonzepten, die die direkte oder indirekte Beeinflussung der autoreaktiver T-Zellen, gerichtet gegen die in Anspruch 8-11 benannten Proteine oder Protein-Teilsequenzen, beinhalten.

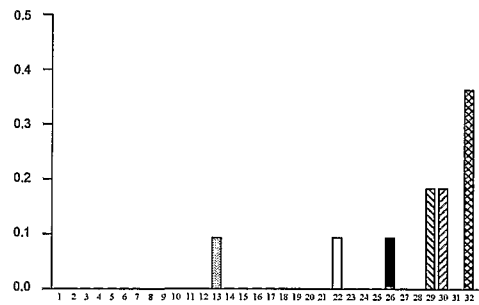
21. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 und 18 bis 20 zur Beeinflussung der biologischen Wirkung der aus den in Anspruch 1-3 benannten Gensequenzen abgeleiteten Proteine.
22. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 und 18 bis 21 zur Beeinflussung der unmittelbaren molekularen Regelkreise, in die die in Anspruch 1-3 benannten Gene und davon abgeleiteten Proteine eingebunden sind.
23. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 und 18 bis 22 zur Entwicklung von Therapiekonzepten unter Design und Verwendung von Interpretationsalgorithmen, die die genannten Gene und Sequenzen und deren Regulationsmechanismen verwenden, um Therapiekonzepte, -wirkungen, -optimierungen oder Krankheitsprognosen erkennen zu lassen oder vorausszusagen.
24. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 und 18 bis 22 zur Entwicklung von biologisch wirksamen Medikamenten (Biologicals) unter Verwendung von Genen, Gensequenzen, Regulation von Genen oder Gensequenzen, oder unter Verwendung von Proteinen, Proteinsequenzen, Fusionsproteinen nach Ansprüchen 1 bis 3 und 6 bis 9 oder unter Verwendung von Antikörpern oder autoreaktiven T-Zellen nach den Ansprüchen 10-14.
25. Array als molekulares Werkzeug, bestehend aus verschiedenen Antikörpern oder Molekülen mit vergleichbarem proteinspezifischen Bindungsverhalten, die zum Nachweis aller oder einer Auswahl der von den Genen der Tabelle 1 abgeleiteten Proteine oder aller bzw. einer Auswahl der Proteine der Tabelle 2 dienen.
26. Verwendung von Werkzeugen nach den Ansprüchen 1 bis 24 zur
 - 26.1. Untersuchung von Blutproben oder Gewebeproben in der medizinischen Diagnostik
 - 26.2. Anwendung in der Analytik nach Beispiel 1
 - 26.3. Anwendung für für Therapiekonzepte nach Beispiel 2.

Figur 1

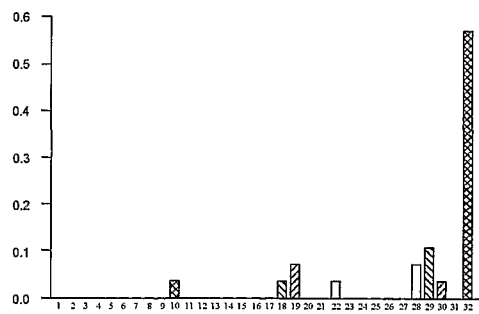
1 / 1



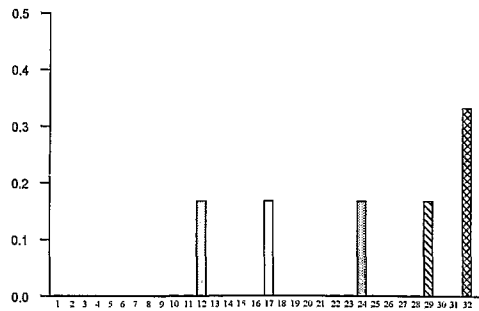
RA



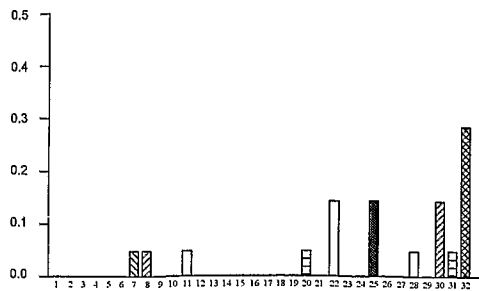
reA



OA



PsoA



Andere

| | | | |
|---------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于慢性炎症性关节疾病的诊断，分子定义和治疗的工具 | | |
| 公开(公告)号 | EP1395683A2 | 公开(公告)日 | 2004-03-10 |
| 申请号 | EP2002745109 | 申请日 | 2002-05-30 |
| 申请(专利权)人(译) | OLIGENE GMBH | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | OLIGENE GMBH | | |
| [标]发明人 | HAUPL THOMAS UNGETHUM UTE BLASS STEFAN | | |
| 发明人 | HÄUPL, THOMAS UNGETHÜM, UTE BLÄSS, STEFAN | | |
| IPC分类号 | G01N33/50 A61K48/00 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/564 G01N33/566 | | |
| CPC分类号 | C12Q1/6883 C12Q2600/158 | | |
| 代理机构(译) | wehlan， 赫尔穆特博士 | | |
| 优先权 | 10127572 2001-05-30 DE | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明涉及用于治疗慢性炎症性关节疾病和其他炎性，感染性或肿瘤性疾病的诊断，分子定义和开发的工具。根据本发明，基因组数据（基因组学），蛋白质组数据（蛋白质组学）和免疫组学数据（免疫组学）用于慢性关节疾病治疗的分析和开发。本发明基于使用基因序列和衍生的 mRNA 和蛋白质，以及对衍生蛋白质具有特定性质的抗体，用于表征炎性和非炎性风湿性关节疾病，自身免疫疾病和感染性疾病。迄今尚不清楚的慢性炎症性关节病的病因学显著致病原理可以从进行的检查中得出。此外，可以为所述关节疾病的分类，预后评估和治疗优化创建解释算法，并且可以导出用于治疗的新策略和药物攻击点。