

Aus der Medizinischen Klinik mit
Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

“Untersuchungen über das Expressionsverhalten von
Ro52 und TNF α in Monozyten beim Sjögren-Syndrom“

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Markus Gerl
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. F. Hiepe
2. Prof. Dr. med. Th. Dörner
3. Prof. Dr. med. Chr. Baerwald

Datum der Promotion: 30.01.2009

Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Überschrift	Seite
1.	Einleitung	4
1.1.	Das Sjögren-Syndrom	4
1.1.1.	Allgemeines	4
1.1.2.	Epidemiologie	6
1.1.3.	Systemische Manifestationen	7
1.1.4.	Komplikationen und Risiken	8
1.1.5.	Diagnose und Differentialdiagnose	9
1.1.5.1.	Klassifikationsprinzipien	11
1.1.5.2.	Ausschlußkriterien	11
1.1.6.	Therapie	12
1.2.	Das Immunsystem	13
1.2.1.	Monozyten	14
1.2.1.1.	Allgemeines	14
1.2.1.2.	Bestimmung der Monozytenzahl im Blut	15
1.2.2.	Das Monozyten-Makrophagen-System	16
1.2.2.1.	Rolle der Monozyten/ Makrophagen bei Autoimmunerkrankungen	18
1.2.3.	Autoantikörper	19
1.2.3.1.	Allgemeines	19
1.2.3.2.	Rheumafaktoren	19
1.2.3.3.	Antikörper gegen Zellkerne – Antinukleäre Antikörper (ANA)	19
1.2.3.4.	Ro/ SS-A und La/ SS-B	21
1.2.3.4.1.	Antikörper gegen Ro/ SS-A und La/ SS-B	22
1.2.4.	Zytokine	25
1.2.4.2.	Benennung und Einteilung der Zytokine	25
1.2.5.	Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α)	29
1.2.6.	DNA-Polymorphismus/ Bandenmuster	30
1.3.	TNF α -Promotorpolymorphismus	31
1.4.	Fragestellung	33
2.	Material und Methoden	35
2.1.	Patientengruppe und Kontrollgruppe sowie deren Medikation	35

Kapitel	Überschrift	Seite
2.2.	Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut	35
2.3.	Magnetische Zellsortierung	37
2.4.	Durchflusszytometrische Untersuchung des Probenmaterials	38
2.5.	mRNA-Präparation aus Monozyten	41
2.6.	Photometrische Konzentrationsbestimmung	41
2.7.	Polymerasekettenreaktion (PCR) mittels LightCycler®	42
2.7.1.	Prinzip der LightCycler® -Technologie	42
2.7.2.	Prinzip der quantitativen PCR	44
2.7.3.	PCR- Monitoring mit Hybridisationsproben	45
2.7.4.	Relative Quantifizierung über externe Standards („kinetische PCR“)	46
2.7.5.	Standardkurven	47
2.7.6.	Realtime Multiplex-PCR	48
2.8.	Immunometrischer Assay für Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), Interleukin 1 beta, Interleukin 6, Interleukin 8 und Interleukin 10	51
2.8.1.	Immunometrischer Assay für Tumornekrosefaktor alpha (TNF α)	52
2.8.2.	Immunometrische Assays für IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10	52
2.9.	Polymorphismusanalyse der Promotorregion des TNF α -Gens auf DNA- Ebene	53
2.9.1.	Präparation von DNA aus Vollblut	53
2.9.2.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	54
2.9.3.	Agarosegel-Elektrophorese	56
2.9.4.	Enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte	58
2.9.5.	Sequenzierung	58
3.	Ergebnisse	61
3.1.	Verwendbarkeit der Proben von Spendern mit primärem Sjögren- Syndrom und der Proben der Kontrollspender	61
3.2.	Optimierung der Anreicherung von Monozyten	61
3.3.	Quantität und Qualität der mRNA-Präparation	63
3.4.	Ergebnis der Polymerasekettenreaktion mittels LightCycler®- Technologie	63
3.4.1.	Analyse der Haushaltsgene	64

Kapitel	Überschrift	Seite
3.4.2.	Auswertung der PCR für die Bestimmung der Expression von monozytärer Ro52- und TNF α -mRNA	65
3.4.3.	Expression von Ro52-mRNA in Monozyten von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom	66
3.4.4.	Expression von Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) in Monozyten von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom	67
3.4.5.	Vergleich des Expressionsverhaltens von Ro52 zu TNF α	68
3.5.	Ergebnis der immunometrischen Assays – Blutplasmaanalyse der Zytokine	70
3.6.	Vergleich des Expressionsverhaltens von TNF α auf mRNA-Ebene von Monozyten zur TNF α -Konzentration im Blutplasma	72
3.7.	Ergebnis der Polymorphismusanalyse im TNF α -Promotorbereich auf DNA-Ebene	73
3.8.	Vergleich des Expressionsverhaltens von monozytärer TNF α -mRNA und dem Vorliegen eines Polymorphismus im TNF α -Promotorbereich der DNA	75
4.	Diskussion	77
4.1.	Bedeutung der Ro52-Expression in Monozyten beim Sjögren-Syndrom	78
4.2.	Relevanz der TNF α -Expression beim Sjögren-Syndrom	80
4.3.	Möglicher Einfluß von TNF α □□ auf die Expression von Ro52 in Monozyten	82
4.4.	Nachweis eines DNA-Polymorphismus im TNF α Promotorbereich -308 beim Sjögren-Syndrom	83
4.5.	Ausblick	84
4.6.	TNF α als mögliches therapeutisches Target beim Sjögren-Syndrom	85
5.	Zusammenfassung	86
6.	Literatur	87

1. Einleitung

1.1. Das Sjögren-Syndrom

1.1.1. Allgemeines

Das Sjögren-Syndrom ist eine chronische Autoimmunerkrankung. Autoimmunerkrankungen sind Krankheiten, deren Prinzip darin besteht, dass das Abwehrsystem des Menschen eine falsche Zielvorgabe erhalten hat: Anstelle der Bekämpfung pathogener Gewebe oder einzelner pathogener Zellen werden körpereigene Gewebe oder Zellen ohne Krankheitswert erkannt und bekämpft. Dies führt zu häufig langandauernden Erkrankungen und nicht selten zum Verlust von Organfunktionen oder sogar zum vorzeitigen Tod. Die genauen Ursachen der einzelnen Autoimmunerkrankungen sind jedoch nur teilweise bekannt. Als wahrscheinlich wird heute angesehen, dass ein äußeres Ereignis das funktionierende Abwehrsystem „irritiert“. Grundsätzlich können Autoimmunerkrankungen jedes Organ treffen. Diese Erkrankungen sind multifaktoriell [1].

Das Sjögren-Syndrom ist durch das Auftreten von trockenen Augen sowie einem trockenen Mund (Xerostomie) charakterisiert. Der Verlust der Tränenflüssigkeit bedingt eine *Keratokonjunktivitis sicca*. Der Rückgang des Speichels fördert die Kariesentstehung, Zunahme oraler Infektionen und kann zu Beschwerden beim Schlucken und Schmerzen im Mundraum führen [2]. Erste Untersuchungen dieser Erkrankung wurden 1898 von H. Mikulicz durchgeführt, man nannte die Erkrankung zunächst Mikulicz-Syndrom. Bekannter wurde die Erkrankung unter dem Namen Sjögren-Syndrom durch den schwedischen Augenarzt Hendrik Sjögren, welcher erstmals 1933 das gleichzeitige Auftreten der trockenen Augen (sogenannte Sicca-Symptomatik), des trockenen Mundes sowie einer fakultativen rheumatoiden Arthritis beschrieb [3]. Eine zunehmende diagnostische Differenzierung von verschiedenen Erkrankungen mit Sicca-Symptomen ist erst in jüngerer Zeit gelungen, welche eine Anzahl internistischer und vornehmlich rheumatologischer Erkrankungen betrifft. Das Sjögren-Syndrom als chronisch-progressive Autoimmunerkrankung der exokrinen Drüsen findet sich neben seiner primären Form auch als sekundäre Erkrankung bei einer Vielzahl weiterer Autoimmunerkrankungen (siehe Abb.1). Dazu zählen z.B. die rheumatoide Arthritis, der systemische Lupus erythematodes, die progressive systemische Sklerodermie und deren Überlappungssyndrome, aber auch Patienten mit primär biliärer Zirrhose und autoimmuner Hepatitis, multipler Sklerose, Myasthenia gravis, autoimmuner Thyreoiditis u.a. Von

differentialdiagnostischer Bedeutung ist dabei die Abgrenzung zu einer „Sicca“-Symptomatik bei weiteren Erkrankungen ohne erkennbare autoimmune Grundlage [4, 5], wie z.B. die Fibromyalgie, Depressionen, die Sarkoidose sowie Infektionen mit dem HI- und Hepatitis-C-Virus. Zugleich findet sich im Rahmen einer „Graft-versus-Host“-Erkrankung nach allogener Knochenmarktransplantation häufig eine Sicca-Symptomatik. Andere Ursachen einer Sicca-Symptomatik sind bekannte Nebenwirkungen von mehr als 300 Medikamenten [4].

Die Patienten mit einem SS können zusätzlich an Entzündungen der Gelenke (*Arthritis*), der Muskulatur (*Myositis*), der Nerven (*Neuropathie*), der Schilddrüse (*Thyroiditis*), der Niere (*Nephritis*) oder anderer Organe/ Gewebe leiden. Insbesondere kommt es häufig zu einer ausgeprägten Müdigkeit und Schlafstörungen bzw. Schlaflosigkeit. Man kann zwei Arten von Müdigkeit und Abgeschlagenheit unterscheiden [2]:

- 1) Die erste Form ist die späte Morgen- oder Mittagsabgeschlagenheit. Die Betroffenen stehen morgens ausgeschlafen auf. Im Tagesverlauf kommt es mehrfach zu einem Abfall der Leistungsfähigkeit. Als Ursache wird ein entzündlicher oder stoffwechselbedingter Prozeß vermutet. Die Patienten beschreiben ihre Abgeschlagenheit wie die Symptome einer Grippe, welche auf der Freisetzung von bestimmten Entzündungshormonen beruht (sogenannte *Interleukine* = Entzündungsbotenstoffe). Um zu bestimmen, ob die Abgeschlagenheit Folge von aktiven Entzündungen ist, werden Bluttests unternommen. Die Bestimmung der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), des C-reaktiven Proteins (CRP) oder weiterer Laborparameter sind hierbei hilfreich.
- 2) Eine zweite Form der Müdigkeit ist die frühmorgendliche Abgeschlagenheit. Hierbei wacht der Patient am Morgen auf und fühlt sich dennoch nicht ausgeschlafen. Er ist weiterhin müde und nicht erholt vom zurückliegenden Schlaf. Diese Form der Schlafstörung kann auch zusammen mit der oben genannten Form auftreten. Die Patienten haben in erster Linie Schlafstörungen aufgrund der Muskel- und Gelenkschmerzen. Letztlich führen auch Beschwerden aufgrund der Mund- und Augentrockenheit zu Schlafstörungen. Da Sjögren Patienten am Tage meist viel trinken, müssen sie nachts häufig zur Toilette, wodurch der gesunde Schlaf unterbrochen wird. Durch eine Optimierung der symptomatischen Therapie (mit Tränen- oder Speichelersatz sowie Luftbefeuchtern) sollte es zu einer Verbesserung des Schlafs kommen. Dennoch kann es zu vorübergehenden Schlafstörungen kommen. Es sollten keine weiteren negativen Schlafgewohnheiten vorliegen.

Es erfolgte die Einteilung in ein primäres (keine Assoziation mit einer anderen Autoimmunerkrankung) und sekundäres Sjögren-Syndrom (Assoziation mit rheumatoider Arthritis oder anderen rheumatologischen Erkrankungen, siehe Abb. 1).

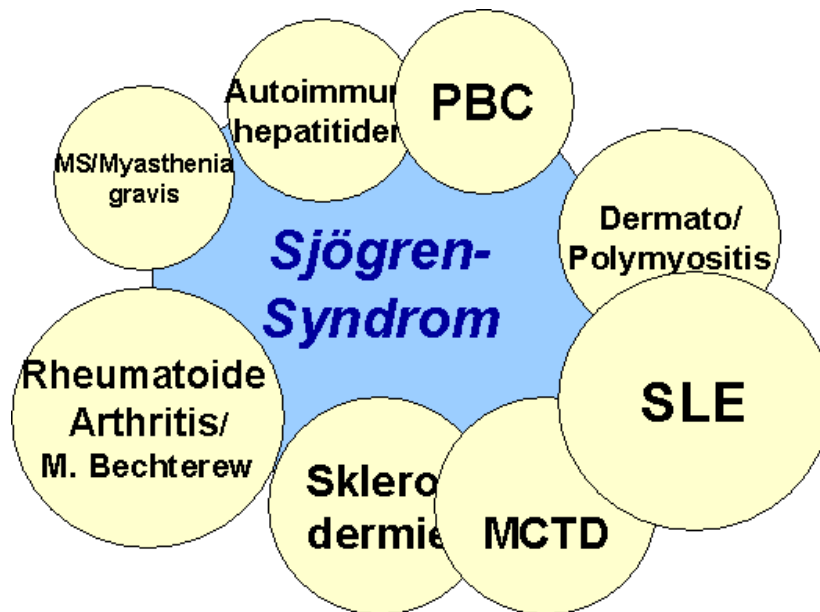


Abb.1: Sekundäres Sjögren-Syndrom in Verbindung mit anderen Autoimmunerkrankungen [4]

1.1.2. Epidemiologie

Das weibliche Geschlecht wird von der Erkrankung bei einem Geschlechtsindex von neun Frauen zu einem Mann deutlich häufiger betroffen [5, 6]. Eine Zunahme der Erkrankungsfrequenz im mittleren Alter ist zu beobachten, allerdings erlauben bessere diagnostische Möglichkeiten zunehmend eine Diagnosestellung in jüngerem Alter. Obgleich keine exakten Angaben zur Prävalenz vorliegen, wird die Häufigkeit des Sjögren-Syndroms im Alter über 50 Jahre mit ein bis drei Prozent in Europa angegeben. Das Sjögren-Syndrom ist in seiner primären und sekundären Form die zweithäufigste entzündliche rheumatische Erkrankung nach der rheumatoiden Arthritis [5, 6].

1.1.3. Systemische Manifestationen

Klinisch stehen bei Patienten mit Sjögren-Syndrom die Mundtrockenheit mit reduzierter Speichelproduktion sowie die Beschwerden einer Keratokonjunktivitis sicca im Vordergrund, die 75 bis 90 % der Patienten angeben. Nicht in jedem Falle liegt eine Koinzidenz beider Beschwerdekompexe vor.

Die oralen Leitbeschwerden sind Mundtrockenheit, Brennen beim Kauen von trockenen Speisen bzw. die Notwendigkeit, ständig etwas Flüssigkeit als Speichellersatz zu sich zu nehmen. Begleitend kommt es zu Geschmacksstörungen und einer eingeschränkten Fähigkeit, über längere Zeit ununterbrochen zu sprechen. Von hoher diagnostischer Relevanz für ein Sjögren-Syndrom sind Schlafunterbrechungen durch Trinken geringer Flüssigkeitsmengen sowie charakteristische Durchschlafstörungen. Ausgeprägte und frühzeitige Karies sind ebenfalls charakteristisch.

Eine Schwellung der Parotis in initialen Erkrankungsphasen (ca. 30 bis 50 %) wird von den Patienten zumeist als wiederholte Mumpserkrankung des Erwachsenen fehlgedeutet. Die Entzündungen der Parotis als auch der Submandibulardrüsen erscheinen bilateral, sind indolent und persistieren über längere Zeit. Nur in ca. 10 % sind die exkretorischen Drüsen der Nasen-, Rachen-, Tracheal- sowie Vaginalschleimhaut in den Erkrankungsprozeß einbezogen. Reduzierte Drüsensekretionen des Gastrointestinaltraktes (mit der Folge von Mukosaatrophien des Ösophagus, atrophischer Gastritis und subklinischer Pankreatitis), des Genitaltraktes und der Haut können auftreten.

Extraglanduläre Manifestationen der Erkrankung treten in ca. 10 bis 15 % der Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom auf [5-7]. Die Häufigkeit von systemischen Beschwerden von Patienten mit einem Sjögren-Syndrom sind in Tabelle 1 aufgeführt. In frühen Erkrankungsphasen dominieren Arthralgien ohne Schwellungen der Metakarpophalangeal- und proximalen Interphalangealgelenke sowie unspezifische Leistungseinschränkungen, die oftmals zunächst auch aufgrund positiver Rheumafaktoren an eine rheumatoide Arthritis denken lassen.

Allgemeinbeschwerden sind ausgeprägte Müdigkeit und Leistungsinsuffizienz, subfebrile Temperaturen, Myalgien und Arthralgien bei nicht-erosiver Arthritis. 35 % der Patienten klagen über eine Raynaud-Symptomatik, welche der Erkrankung um Jahre vorausgehen kann. Selten sind manifeste Synovitiden oder gar Gelenkdestruktionen. Ca. 5 bis 15 % der Patienten entwickeln im späteren Krankheitsverlauf eine erosive Arthritis und erfüllen die Kriterien einer rheumatoiden Arthritis mit sekundärem Sjögren-Syndrom. Bei ca. 25 % der

Patienten findet sich eine milde normochrome, normozytäre Anämie; seltener treten isolierte Thrombopenien auf. Vorrangig sind als extraglanduläre Organe die Lungen, Nieren, Blutgefäße, Muskeln und das retikuloendotheliale System betroffen. Dominierend tritt eine diffuse interstitielle Lungenerkrankung auf. Die renale Beteiligung in Form einer interstitiellen Nephritis wird klinisch durch Hyposthenurie und tubuläre Funktionsstörungen (renale Azidose Typ I) in ca. 30 % manifest. Membranöse bzw. membranoproliferative Glomerulonephritiden sprechen eher für das Vorliegen eines sekundären Sjögren-Syndroms bei systemischem Lupus erythematoses (SLE). Als Gefäßmanifestation kann eine Vaskulitis der kleinen und mittelgroßen Gefäße auftreten, die als palpable Purpura sowie Vaskulitiden der peripheren Nerven, der Lungen, der Nieren und des Gastrointestinaltraktes imponiert. Eine Einbeziehung des ZNS in die Vaskulitis kann zu Hemiparesen, Querschnittsmyelitis, hemisensorischen Defiziten, epileptischen Anfällen und zu motorischen Störungen führen. Als neurologische Manifestationen im Rahmen eines Sjögren-Syndroms finden sich oftmals sensorische und ataktische Neuropathien, der multiplen Sklerose ähnelnde Erkrankungsbilder, eine Myasthenie, Choreoathetosen, Guillian-Barre Syndrom und häufig Depressionen.

Tab. 1: Häufigkeit extraglandulärer Manifestationen beim Sjögren-Syndrom [8]

Leistungsinsuffizienz	60 - 75 %	Vaskulitiden	5 - 12 %
Arthralgien/Arthritis	50 - 60 %	Leberbeteiligung	5 - 10 %
Raynaud-Phänomen	30 - 40 %	Splenomegalie	5 - 10 %
Lymphadenopathie	10 - 15 %	Periphere Neuropathie	5 - 10 %
Lungenbeteiligung	15 - 25 %	Myositiden	1 - 5 %
Interstitielle Nephritis	10 - 20 %	Lymphome	5 - 8 %

1.1.4. Komplikationen und Risiken

B-Zell-Lymphome gelten mit einer Häufigkeit von 5 bis 8 % als typische Komplikation beim primärem Sjögren-Syndrom [9]. Weitere mögliche Komplikationen sind die o.g. neurologischen Manifestationen sowie die Entwicklung einer Lungenfibrose. Das Risiko, die Erkrankung von einem an das folgende Familienmitglied weiterzugeben, ist niedrig. Es besteht ein leicht erhöhtes Risiko für die Nachkommen der Patienten, diese Erkrankung zu entwickeln. Schwangere Patienten sollten ihren Gynäkologen über die Erkrankung

informieren, da die Autoantikörper die Plazenta überwinden können und dadurch zu Komplikationen beim Föten führen können [2].

1.1.5. Diagnose und Differentialdiagnose

In den vergangenen Jahren wurden diese international anerkannten Kriterien für das Sjögren-Syndrom etabliert, die eine ausreichende Sensitivität und Spezifität aufweisen. Die Erfüllung von vier der sechs Kriterien erlaubt die definitive Diagnose eines Sjögren-Syndroms (Tab.2) und fordert zugleich die Abgrenzung einer Sicca-Symptomatik bei anderen Erkrankungen. Es wird für die Diagnosestellung eine positive Histologie und/ oder der Nachweis spezifischer Autoantikörper gefordert. Bei Patienten über 60 Jahre müssen die eingeschränkte Aussagekraft des Schirmer-I-Tests und des unstimulierten Speichelflusses berücksichtigt werden (*).

Tab. 2. Internationale Konsensus-Kriterien des Sjögren-Syndroms [10]

- I. **Augensymptome:** Eine positive Antwort auf eine der folgenden Fragen:
 1. Leiden Sie täglich an persistierenden trockenen Augen seit mindestens 3 Monaten?
 2. Haben sie wiederholt Sand- bzw. Fremdkörpergefühle in den Augen?
 3. Verwenden sie mehr als dreimal täglich Augentropfen zum Tränenersatz?

- II. **Orale Symptome:** Eine positive Antwort auf eine der folgenden Fragen:
 1. Haben Sie seit mehr als drei Monaten täglich das Gefühl, einen trockenen Mund zu haben?
 2. Haben Sie als Erwachsener wiederholt oder anhaltend geschwollene Speicheldrüsen?
 3. Trinken Sie oft beim Essen, um trockene Speisen besser schlucken zu können?

- III. **Augenbefunde:** Ein objektiver Nachweis der Augenbeteiligung liegt vor, wenn einer der folgenden Befunde erhoben werden kann:
 1. Schirmer-I-Test positiv (5 mm / 5 min)*, siehe Abb.2
 2. Bengalrosa-Score positiv (van Bijsteveld-Score > 4)

IV. **Histopathologie:** Nachweis eines Fokus-Score 31 in einer kleinen Speicheldrüse. Dabei ist ein Fokus als ein Agglomerat von 50 mononukleären Zellen definiert; die Anzahl der Foci innerhalb von 4 mm² glandulären Gewebes ergeben den sog. Fokus-Score.

V. **Speicheldrüsenbefunde:** objektiver Nachweis der Speicheldrüsenbeteiligung ist definiert durch mindestens einen positiven Befund bei den folgenden Untersuchungen:

1. Speicheldrüsenzintigraphie
2. Parotissialografie
3. unstimulierter Speichelfluß (1.5 ml / 15 min)

VI. **Autoantikörper:** Serologischer Nachweis eines oder der beiden folgenden Autoantikörper:

1. Antikörper gegen Ro(SS-A) bzw. La(SS-B)
2. Antinukleäre Antikörper (ANA)

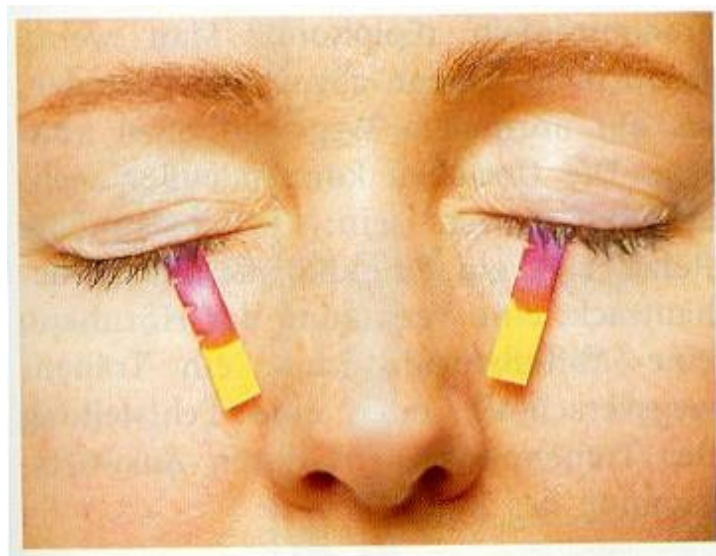


Abb. 2: Schirmer-Test [11]

1.1.5.1. Klassifikationsprinzipien

Die Diagnose des Sjögren-Syndroms wird weltweit sehr unterschiedlich gestellt, da es bislang keine einheitlichen Klassifikationskriterien der Erkrankung gibt. Eine übliche Einteilung beinhaltet die Erfüllung von vier aus sechs möglichen Kriterien (siehe 1.1.5.). Diese ist dann indikativ für ein primäres Sjögren-Syndrom. Bei Patienten mit anderen Erkrankungen autoimmuner Grundlage (z.B. andere entzündliche Bindegewebserkrankungen) wäre das Vorliegen von Symptomen der Gruppe I oder II sowie zwei der Befunde unter III bis V indikativ für ein *sekundäres* Sjögren-Syndrom [12].

Bei dem Verdacht auf ein Sjögren-Syndrom müssen zunächst objektive Tests zur Messung der Mund- und Augentrockenheit erfolgen. Für die Messung der Tränenproduktion hat sich der Schirmer-Test (Abb. 2) bewährt, bei dem den Patienten ein Filterpapier in die Augenwinkel gehängt wird. Nach 5 Minuten kann abgelesen werden, wie weit der Tränenfilm in das Papier eingedrungen ist. Werte unter 5 mm/ 5 min gelten als krankhaft. Zur Messung der Speichelproduktion erfolgen verschiedene Tests. Häufig bevorzugt man wegen der einfachen Durchführung den Saxon-Test, bei dem die Patienten über 2 Minuten auf einem Gaze-Schwamm kauen. Der Schwamm wird vorher und nachher gewogen. So kann die Speichelmenge, die sich im Schwamm gesammelt hat, einfach bestimmt werden.

Wenn die Tränen- und / oder Speichelproduktion vermindert ist und somit objektiv ein Sicca-Syndrom vorliegt, sollten Labortests erfolgen. Die am häufigsten als Marker des Sjögren-Syndroms verwendeten Autoantikörper gegen Ro/SS-A liegen bei bis zu 96% der Patienten vor [13], haben aber nur eine Spezifität von 14 % (siehe auch 1.2.). Anhand neuerer Studien werden Antikörper gegen alpha-Fodrin bei 75 % der Patienten mit eindeutig gesichertem primärem Sjögren-Syndrom beobachtet [13]. Diese Antikörper sind zwar ebenfalls nicht spezifisch für das Sjögren-Syndrom, eignen sich aber wegen ihrer relativen Häufigkeit als Suchtest und korrelieren zudem mit der entzündlichen Aktivität der Erkrankung. Hier ist eine Zusammenschau mit der Klinik bedeutsam.

1.1.5.2. Ausschlusskriterien

Ausschlusskriterien sind präexistente Non-Hodgkin-Lymphome (NHL), HIV-Infektion bzw. AIDS, Hepatitis-C-Virus, Amyloidose, Sarkoidose, „Graft-versus-host-disease“ nach allogener Knochenmarktransplantation, Hyperlipoproteinämie und bakterielle oder virale Sialadenitis. Außerdem haben ca. 300 Medikamente eine Reduktion der exokrinen

Drüsenfunktion als Nebenwirkung, vor allem Antidepressiva, Antihypertensiva, Neuroleptika, und Parasympatholytika. Auch Depressionen können mit einem „Sicca“-Syndrom einhergehen, lassen aber auf Grund fehlender Entzündungen die Diagnose eines Sjögren-Syndroms nicht zu [12].

Bei HIV-Patienten mit „Sicca-Symptomatik“ entwickelt sich häufig eine diffuse infiltrative Lymphozytose (DILS) verschiedener innerer Organe, einschließlich der Speicheldrüsen. Obwohl das klinische Bild mit 85 % Xerostomie, 40 % Keratokonjunktivitis sicca, 90 % bilaterale Parotisschwellung und pathologischem Sialogramm einem Sjögren-Syndrom ähnelt, finden sich histopathologisch CD8+T-Zellfoci mit einigen Plasmazellen in der Lippendrüsenbiopsie. Neben diesem immunpathologischen Unterschied zu den CD4+ T-Zellfoci beim klassischen Sjögren-Syndrom, sind die typischen antinukleären Antikörper (ANA), Anti-Ro/ SS-A und Anti-La/ SS-B Autoantikörper bzw. Rheumafaktoren in der Regel nicht nachweisbar.

1.1.6. Therapie

Die Erkrankung ist bislang nur symptomatisch zu behandeln. Spezielle Aspekte der augen- und zahnärztlichen Behandlung der Patienten mit Sjögren-Syndrom schließen die Verordnung künstlicher Tränen- und Speichelflüssigkeit ein, wobei die individuelle Verträglichkeit und Akzeptanz eine große Rolle spielen. Als bester Speichelersatz hat sich Wasser erwiesen. In Einzelfällen haben sich Bromhexin oral in hohen Dosen (3x 16 mg/d) oder die orale Gabe von Pilocarpin (max. 4 x 5 mg/d) als effektiv erwiesen [4, 5]. Natrium-Fluorid-haltige Zahnpasten sowie die Verordnung von Chlorhexidin als Zusätze zur regelmäßigen Mundspülung unterstützen signifikant die Kariesprophylaxe.

Keine kontrollierte Studie belegt die Wirksamkeit von sog. Basistherapeutika beim Sjögren-Syndrom. Als Allgemeinmaßnahme ist der Aufenthalt an Orten mit niedriger Luftfeuchtigkeit zu meiden. Es besteht keine Indikation für die systemische Gabe von Immunsuppressiva bei Sjögren-Syndrom. Phasen hoher Krankheitsaktivität mit ausgeprägter Vaskulitis, hämolytischer Anämie/ Thrombopenie sowie selten einer Pleuroperikarditis lassen sich gut mit geringen Dosen Prednisolon kupieren (siehe auch Medikation der Patientengruppe). Insgesamt sind Glukokorticoide und Immunsuppressiva für Schübe von extraglandulären Manifestationen (schwere Lungenbeteiligung und Vaskulitiden) indiziert [4]. Darüberhinaus werden nichtsteroidale Antiphlogistika, darunter selektive Cyclooxygenase-Hemmer (COX-2-

Hemmer), zur Behandlung von Entzündungen und Schmerzen bei arthritischen Begleitbeschwerden eingesetzt.

Zur Zeit laufen Studien, bei denen Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom mit einem monoklonalem Anti-CD-22-Antikörper behandelt werden. Dieser wirkt gegen B-Zellen. Medikamente mit CD-22-Antikörpern sind z.B. bei der Therapie mancher Non-Hodgkin-Lymphome zugelassen [14].

1.2. Das Immunsystem

Wenn man vom Immunsystem spricht, unterscheidet man zunächst ein angeborenes bzw. innates von einem erworbenen, adaptiven System. Das nicht adaptive Immunsystem bedeutet, dass sich die Form der Abwehr nicht durch charakteristische Veränderungen dem jeweiligen Mikroorganismus anpasst. Die Komponenten dieses Abwehrsystems sind schon einsatzbereit, noch ehe der Organismus mit pathogenen Mikroben in Kontakt gekommen ist. Seine Fähigkeit, die einzelnen Erreger voneinander zu unterscheiden, ist noch nicht sehr ausgeprägt, und seine Effizienz wird durch wiederholte Auseinandersetzungen mit dem gleichen Erreger nicht verstärkt. Zusätzlich zu dieser einfach strukturierten Abwehr hat sich bei den Vertebraten ein hochspezialisiertes und komplex reguliertes Abwehrsystem entwickelt, das spezifisch auf jeden Erreger reagiert, und dessen Effizienz durch jeden neuen Kontakt mit demselben Erreger verstärkt wird. Man nennt es daher erworbenes oder adaptives Immunsystem.

Das Immunsystem setzt sich aus verschiedenen Zellen zusammen, die unterschiedliche Rollen in der Abwehr von Antigenen spielen. Diese Zellen werden hauptsächlich im Knochenmark gebildet und gelangen über das periphere Blut in unterschiedliche Gewebe. Eine wichtige Rolle in der Immunabwehr spielen antigenpräsentierende Zellen (APC), die Antigene aufnehmen, zerkleinern und deren Bausteine an ihrer eigenen Zelloberfläche in Assoziation mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) den Lymphozyten vorführen.

Die T-Zelle dockt mit einem Rezeptor an den MHC-Rezeptor dieser Zellen an. Wenn ein zweiter, variabler Rezeptorteil der T-Zelle das Antigen bindet, wird es als fremd erkannt und beide Zellen werden aktiviert. Die spezifische Immunabwehr, die zu einem immunologischen Gedächtnis führt, wird angeworfen. Unter den Lymphozyten aktivieren Th-2 Zellen (T-Helferzellen der Klasse 2) die B-Zellen. Von diesen vermehren sich daraufhin die wenigen Zellen, welche spezifische Antikörper gegen die präsentierten Strukturen produzieren. Die ersten Antikörper passen noch ungenau, doch durch Feinabstimmung werden sie nach und

nach hochaffin. Andererseits werden durch Th-1-Zellen zytotoxische Lymphozyten aktiviert, vor allem die natürlichen Killerzellen (NK), welche die eingedrungenen Bakterienzellen, infizierten Wirtszellen oder die erkannten Tumorzellen abtöten. Das angeborene Immunsystem verfügt über kein immunologisches Gedächtnis, ist dafür aber viel schneller als das spezifische System, welches erst verzögert große Mengen des Antikörpers produzieren kann. Die Granulozyten und auch die Makrophagen erkennen allgemeine Merkmale von Bakterien und anderen Fremdkörpern und reagieren auf sie. Ein humorales Komplementsystem ergänzt die Immunantwort [1].

Die Aktivität des gesamten Immunsystems wird durch bestimmte Botenmoleküle (z.B. Interleukine) gesteuert, welche den Immunzellen mitteilen, ob sie aktiv oder inaktiv sein sollen [2].

1.2.1. Monozyten

1.2.1.1. Allgemeines

Monozyten machen zwei bis acht Prozent der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) aus. Unter diesen stellen sie mit 12 bis 20 μm die größten dar. Außerdem sind sie unter den weißen Blutkörperchen am besten in der Lage, Blutzellen, Bakterien und Gewebetrümmer zu phagozytieren. Sie besitzen einen großen, meist hufeisenförmigen, gebuchteten Kern [15] (siehe Abb. 3).

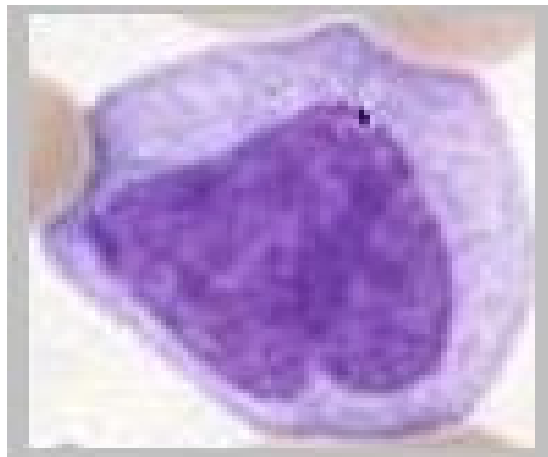


Abb. 3: Monozyt [16]

Monozyten bleiben zwei bis drei Tage im Blutkreislauf. Danach wandern sie in das umgebende Gewebe ein, wo sie größer werden und dann als Histiozyten oder Gewebsmakrophagen bezeichnet werden. Dort leben sie Monate bis Jahre. Sie sind vor allem in Lymphknoten, Lunge, Leber, Milz und Knochenmark zu finden. Gemeinsam mit den basophilen Granulozyten vermitteln und fördern sie allergische Reaktionen [17, 18].

1.2.1.2. Bestimmung der Monozytenzahl im Blut

Monozyten werden im Differenzialblutbild bestimmt. Folgende Normal- bzw. Referenzwerte gelten (Tab.3, geringe Schwankungen von Labor zu Labor sind möglich):

Tab. 3: Referenz-/ Normalwerte [15]

REFERENZ- / NORMALWERTE	alte Einheit	SI-Einheit
Erwachsene	285 - 500/ μ l (3 - 7 %)	0,03 - 0,07*
* Entspricht dem Anteil der Monozyten an der Gesamtleukozytenzahl		

Eine Erhöhung der Monozytenzahl (Monozytose) findet sich regelmäßig auf dem Höhepunkt einer Infektion, der "monozytären Überwindungsphase". Das kann entweder die Wendung zur Heilung ankündigen, aber auch einen Rückfall bedeuten [15].

Außerdem findet man eine Monozytose im Rahmen folgender Erkrankungen [16]:

- Bestimmte Bakterielle Infektionen: Tuberkulose, Entzündungen der Herzklappen (subakute bakterielle Endokarditis), Syphilis, Brucellose, Typhus
- Erholungsphase nach akuten Infektionen
- Einzeller und Rickettsieninfektionen: Rocky mountain spotted fever (Felsengebirgsfleckfieber), Malaria, Trypanosomiasis (Schlafkrankheit), Kala-Azar (Leishmaniase)
- Leberzirrhose
- Bösartige Erkrankungen des Blutes: monozytäre Leukämien, Morbus Hodgkin, Non-Hodgkin-Lymphome, chronisch myeloische Leukämie und andere myeloproliferative Syndrome, multiples Myelom, maligne Histiozytose
- Verschiedene Tumoren: bes. Eierstock-, Magen- und Brusttumoren sowie Melanom

- Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises: Lupus Erythematoses, Rheumatoide Arthritis
- Granulomatöse Erkrankungen: Sarkoidose, Colitis Ulcerosa, Morbus Crohn
- Chronische, hochdosierte Kortikoidtherapie
- Lipoidspeicherkrankheiten, Hand-Schüller-Christiansche Erkrankung
- Medikamente: Manche Antibiotika
- Relative Erhöhungen der Monozyten (angegeben in % der weißen Blutkörperchen) entstehen natürlich bei der Verminderung der anderen weißen Blutkörperchen

Darüberhinaus kann die Monozytenzahl auch niedriger ausfallen (Monozytopenie). Folgende Krankheiten bzw. Umstände sind bekannt [16]:

- Haarzelleukämie
- Aplastische Anämie
- Relative Verminderungen der Monozyten

1.2.2. Das Monozyten-Makrophagen-System

Wenn es einem Fremdelement gelingt, die primären protektiven Schutzmechanismen zu überwinden und es in das darunterliegende Gewebe eingedrungen ist, stellt sich ihm die zweite Reihe des Abwehrmechanismus entgegen: die phagozytierenden Zellen.

Die Funktionsweise dieser sehr heterogenen Zellfraktion ist einfach, sie nehmen unspezifisch als fremd erkannte Zellen auf. Viele andere Zellen vermögen auf ähnliche Weise zu agieren, Phagozyten jedoch können große Partikel verinnerlichen, z.T. zwei Mikrometer im Durchmesser, oder sogar noch mehr. Sie haben einen ganz besonderen Mechanismus, mit dem sie dies bewerkstelligen. Die Verinnerlichung kleiner Partikel wird gewöhnlich Endozytose, die größerer Partikel Phagozytose genannt. Zytologen unterscheiden bei der Endozytose noch die Pinozytose, das Zelltrinken (unspezifische Aufnahme von kleinen Tröpfchen extrazellulärer Flüssigkeit, ohne einen spezifischen Adhäsionsmechanismus), und die rezeptorabhängige Endozytose, die einen Kontakt mit der äußeren Zellmembran, über einen spezifischen Liganden, voraussetzt.

Der umgekehrte Prozeß der Endozytose ist die Exozytose, bei der Partikel von der Zelle ausgestoßen werden. Beide Mechanismen, sowohl die Endozytose als auch die Exozytose, setzen die Bildung von intrazellulären Vesikeln voraus. Diese Vesikel haben, von ihrer

Funktion abhängig, unterschiedliche Namen: Endosomen, Pinosomen, Phagosomen. Sowohl die Bildung dieser Vesikel als auch ihre Dissolution funktionieren in einer Weise, dass zu keinem Zeitpunkt der Inhalt der Vesikel mit dem Zytosol in Kontakt gerät (siehe Abb. 4).

Zellen der Monozyten- bzw. Makrophagenlinie phagozytieren Bakterien über einen ähnlichen Mechanismus. Monozyten/ Makrophagen tragen außer den Fc- und CR1-Rezeptoren auch Zuckerrezeptoren, z. B. für Mannose und Fucose. Da derartige Zucker Bestandteile u. a. von Hefezellwänden sind, ist es wahrscheinlich, dass diese Rezeptoren ebenfalls an der Phagozytose beteiligt sind. Bei der Entfernung von Keimen aus der Zirkulation spielen die ortsständigen Makrophagen, vor allem die der Leber, eine entscheidende Rolle: Antikörper- und komplementbeladene Partikel werden aus dem durchströmenden Blut filtriert und entfernt ("immune clearance"). Über die Phagozytose hinaus haben Monozyten/ Makrophagen noch weitere Funktionen. Für die Immunantwort entscheidend sind dabei die Antigenpräsentation und die Produktion von Mediatoren, vor allem des Interleukin 1.

Monozyten bzw. Makrophagen synthetisieren eine Vielzahl von Proteinen, Arachidonsäuremetaboliten und Sauerstoffradikale. Desweiteren sind sie zur extrazellulären Abtötung von Zielzellen befähigt. Dieser Vorgang ist ebenfalls antikörperabhängig. Die Abtötung wird wahrscheinlich durch freigesetzte Substanzen vermittelt. Der genaue Mechanismus, über den Monozyten/ Makrophagen toxisch wirken, ist noch nicht vollständig aufgeklärt [19]. Die Phagozytose setzt die Bildung von Pseudopoden voraus, um große Partikel zu verinnerlichen. Die Pinozytose ist eine unspezifische Aufnahme extrazellulärer Moleküle. Die rezeptormedierte Endozytose ist die spezifische Aufnahme von Makromolekülen, die von Oberflächenrezeptoren gebunden werden [19].

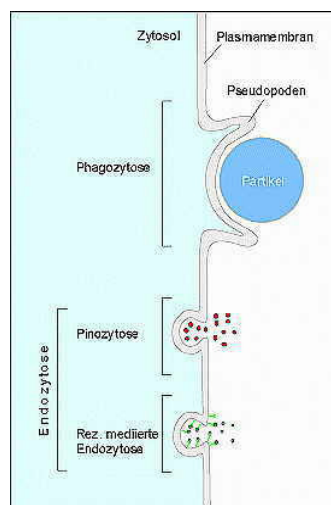


Abb. 4: Die Phagozytose und die beiden Formen der Endozytose [19]

1.2.2.1. Rolle der Monozyten/ Makrophagen

bei Autoimmunerkrankungen

Monozyten sind potentiell antigenpräsentierende Zellen (APCs). Somit sind sie in der Lage, (Auto)-Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und sie T- sowie B-Zellen zu präsentieren. Dadurch kann eine (Auto)-Immunreaktion ausgelöst werden. Makrophagen bzw. Monozyten gelten – nicht nur bei rheumatoiden Erkrankungen - als TNFa Produzenten und stellen somit Problem und Angriffspunkt in den Untersuchungen dar [20].

Bei Patienten mit Sjögren-Syndrom konnte gezeigt werden, dass Monozyten bzw. Makrophagen in den kleinen Speicheldrüsen des Lippengewebes akkumuliert auftreten [21-25]. Deshalb wäre es möglich, dass sie auch beim Sjögren-Syndrom eine Rolle in der Pathogenese spielen könnten. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis konnte analog gezeigt werden, dass in der Synovialflüssigkeit gehäuft Makrophagen auftreten. Dieses gehäufte Auftreten korreliert mit der chronischen Entzündung und Gelenkzerstörung bei dieser Patientengruppe [26].

Weiterhin ist bekannt, dass Monozyten bei Patienten mit systemischem Lupus erythemathodes eine verminderte Fähigkeit zur Phagozytose besitzen. Als Folge werden apoptotische Zellen nicht vollständig eliminiert. Dies könnte eine Ursache dafür sein, dass Antigene gehäuft auftreten und dann zur Autoimmunität beitragen [27-29]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass in Lymphknotenbiopsien von Patienten mit systemischem Lupus erythemathodes (SLE) die Anzahl von Makrophagen, die apoptotisches Material phagozytiert haben, verringert war. Gleichzeitig war die Zahl der apoptotischen Zellen erhöht. Dabei trat das apoptotische Material direkt assoziiert mit follikulären dendritischen Zellen auf. Deswegen vermutet man, dass dadurch nukleäre Autoantigene an diese follikulären dendritischen Zellen binden und damit aktivierend auf autoreaktive B-Zellen wirken könnten [30].

Bisher wurden nur Monozyten von Patienten mit SLE, rheumatoider Arthritis u.a. rheumatischen Erkrankungen untersucht, nicht aber von Patienten mit Sjögren-Syndrom. Dasselbe gilt analog auch für Mausmodelle.

1.2.3. Autoantikörper

1.2.3.1. Allgemeines

Von Abwehrzellen produzierte Antikörper können sich gegen eigene körpereigene Bestandteile - sowohl einzelne Zellen als auch ganze Organe – richten [31]. Man nennt diese Antikörper Autoantikörper. Dazu gehören auch die antinukleären Antikörper (ANA). Sie richten sich gegen konservierte, d.h. in allen Zellen vorkommende, nukleäre Antigene [13]. Autoantikörper im Serum sind vor allem bei Patienten mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises ein charakteristischer Befund. So kann man auch im Blut von Patienten mit (primärem) Sjögren-Syndrom diese Antikörper finden. Ein serologischer Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA) oder Antikörpern gegen Ro/SS-A bzw. La/SS-B ist möglich (siehe 1.2.3. und 1.2.4.).

1.2.3.2. Rheumafaktoren

Dies sind Antikörper die gegen die Fc-Region (konstante [Schwerketten-]Region) eines anderen Antikörpers (Immunglobulin der IgG-Klasse) gerichtet sind. Diese lassen sich bei fast 95% aller Sjögren Patienten nachweisen. Mit zunehmendem Alter lassen sich diese Antikörper aber auch bei Gesunden nachweisen. Die pathogenetische Rolle der Rheumafaktoren beim Sjögren-Syndrom ist unklar [32].

1.2.3.3. Antikörper gegen Zellkerne - Antinukleäre Antikörper (ANA)

Autoantikörper gegen Zellkerne im Serum sind vor allem bei Patienten mit entzündlichen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, vor allem bei Kollagenosen, ein charakteristischer Befund. Sie kommen aber auch bei Erkrankungen anderer Art vor. Beispiele für Autoimmunerkrankungen und deren Prävalenz zeigt die folgende Tabelle:

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich, weisen rund $\frac{3}{4}$ aller Patienten mit Sjögren-Syndrom antinukleäre Antikörper (ANA) im Serum auf. Der ANA-Test wird als Screeningtest angesehen, wenn eine Kollagenose – wie also auch das Sjögren-Syndrom - vermutet wird [1]. Spezifisch ist dieser Test jedoch nicht.

Tab. 4: Autoimmunerkrankung und Prävalenz von ANA [31]

Erkrankung (Assoziationsgruppe)	Prävalenz
Medikamenten induzierter Lupus erythematodes	100 %
Mischkollagenose (MCTD, Sharp-Syndrom)	100 %
Systemischer Lupus erythematodes (SLE) aktiv	95-100 %
Systemischer Lupus erythematodes (SLE) inaktiv	80-100 %
Systemische Sklerose	85-95 %
Sjögren-Syndrom	bis zu 96 %
Polymyositis und Dermatomyositis	30-50 %
Andere rheumatische Krankheiten	20-50 %
Chronisch-aktive Hepatitis	30-40 %
Rheumatoide Arthritis	20-40 %
Colitis Ulcerosa	26 %

1.2.3.4. Ro/SS-A und La/SS-B

Ro-Ribonukleoproteine (RNPs) bestehen aus ein bis vier kleinen zytoplasmatischen RNAs (Y1-Y5) und mindestens zwei Proteinen: Das 60kD-Protein Ro60 und das 48kD-Phosphoprotein La [33, 34]. Ro60 und La gehören zur Familie der RNA-bindenden Proteine, die durch eine konservierte RNA-bindende Domäne von ca. 80 Aminosäuren charakterisiert sind. Ein drittes Protein mit der molekularen Masse von 52kD (Ro52) ist ebenfalls an Ro-RNPs gebunden. Dessen Assoziation daran ist jedoch noch nicht klar belegt [35-40]. Ro52 gehört zu einer Gruppe von Proteinen, bei denen man annimmt, dass sie an der Zellaktivierung und -transformation beteiligt sind [41, 42]. Die Bindungsstelle von Ro60 an Y-RNAs besteht aus einer hochkonservierten Struktur, die durch Basenbindung des 3'- mit dem 5'-Ende zustande kommt. Für Ro52 dagegen konnte bisher noch keine Bindungsstelle identifiziert werden. Es wird angenommen, dass eine Assoziation von Ro52 mit Ro-RNPs über die Interaktion mit Ro60 erfolgt [36]. Die Funktion des La-Proteins, das etwa 50-fach häufiger auftritt als die Ro-Proteine, ist teilweise bekannt. So konnte gezeigt werden, dass La essentiell für eine korrekte RNA-Polymerase-III-Transkription ist [43-45]. Dem La-Protein konnte auch eine Funktion in der Entspiralisierung von DNA und dsRNA [46, 47] sowie in der Translation bestimmter viraler RNAs zugeschrieben werden [48-50]. La spielt demnach eine Rolle in der Regulation der Translation (cytoplasmatisch) und in der Regulation der Transkription (nukleär). Ro/SSA-Antigene sind Komplexe aus Ro-Proteinen und YRNAs und können immunregulatorische Effekte ausüben. In Transfektionsexperimenten konnte an kultivierten PBMCs gezeigt werden, dass Y1-RNA vor allem in Monozyten die Expression von IFN- α induzieren kann [51]. Es wird diskutiert, dass Immunkomplexe, die Y1-RNA enthalten, somit mitverantwortlich sein können für die in SLE häufig beobachtete erhöhte IFN- α -Produktion. IFN- α ist ein Typ-1-Interferon, dem eine bedeutende Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen zukommt. Dem Zytokin werden immunregulatorische Effekte zugeschrieben, die z.B. das Überleben, Differenzierung und die Funktion von Immunzellen in der Immunantwort beinhalten. Darüberhinaus begünstigen Typ-1-Interferone die Expression von MHC-I und MHC-II Molekülen und regulieren die Zellmigration durch die Induktion der Expression verschiedener Zytokine [52, 53] und sogar SLE-assoziiertes Autoantigene [54]. Sjögren-Patienten weisen ein aktiviertes Typ-1-Interferon-System auf. So wurden in den Speicheldrüsen dieser Patienten sowohl IFN- α -produzierende Zellen [55] als auch IFN- α Expression [56] nachgewiesen, die durch RNA-haltige Immunkomplexe hervorgerufen wird. Ro ist im Cytoplasma und im Nukleus

lokalisiert, wobei eine Assoziation mit Y-RNAs nur im Cytoplasma zu finden ist [57-59]. Strukturanalysen von Ro identifizierten es als ein Mitglied Zink-Finger-Protein-Familie, die im allgemeinen eine Fähigkeit zur DNA-Bindung oder zur Gen-Regulation besitzen. Es wurde daher spekuliert, dass Ro als Transkriptionsfaktor fungiert [60-63]. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass Ro52 im Ubiquitin-Signalweg involviert ist. Ubiquitin ist ein 76-Aminosäuren großes Polypeptid, das evolutiv hoch konserviert ist. Seine aktivierte Form wird mit Hilfe der E3-Ubiquitin-Ligase kovalent an Lysin-Reste von Zielproteinen gebunden [64]. Ro52 enthält eine RING-Finger-Domäne an seinem N-terminalen Ende, wodurch Ro52 als E3-Ligase die Ubiquitinierung von Proteinen steuern kann [65]. Poly-ubiquitinierte Proteine werden in den Proteasomen in ATP-abhängiger Weise degradiert [64]. Demzufolge kann dem Ro52-Protein eine kritische Rolle in vielen biologischen Prozessen zugeschrieben werden. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Ro52 sich in vivo selbst ubiquitiniert, wobei es als U3-Ubiquitin-Ligase fungiert [66, 67]. Ro52 liegt in vivo hauptsächlich mono-ubiquitiniert vor, aber auch die poly-ubiquitinierte Form von Ro52 wurde nachgewiesen [68]. Eine Poly-Ubiquitinierung reguliert die proteasomale Erkennung und Degradation von Proteinen, wohingegen eine Mono-Ubiquitination Prozesse wie z.B. Membrantransport und Transkription steuert [69]. In Seren von SS-Patienten wurden Autoantikörper gegen beide Formen von ubiquitiniertem Ro52 gefunden, wobei die meisten Seren jedoch auf die mono-ubiquitinierte Form reagierten [67]. Eine neuere Studie zeigt, dass Ro52 in PBMCs von Sjögren-Patienten im Vergleich zu Normal Spendern stärker expremiert wird und, abhängig von der RING-Domäne, bei Sjögren-Patienten direkt für die Induktion von Apoptose verantwortlich sein kann und damit die Autoimmunität fördern könnte [68].

1.2.3.4.1. Antikörper gegen Ro/SS-A und La/SS-B

Gegen Ro/SS-A und La/SS-B werden bei Kollagenosen – wie dem primären Sjögren Syndrom oder systemischen Lupus erythemathodes (SLE) – Antikörper gebildet [70].

Im Speichel und im Serum von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom wurden anti-Ro/SS-A und anti-La/SS-B-Antikörper (Immunglobulin A [IgA] sowie Immunglobulin G [IgG]) gefunden. Die Häufigkeit des Auftretens von IgA anti-Ro/SS-A-Antikörper, IgA anti-La/SS-B-Antikörper, IgG anti-RoSS-A-Antikörper und IgG anti-La/SS-B-Antikörper im Serum dieser Patienten lag bei 45%, 50%, 43% bzw. 21%; im Speichel waren es analog 31%, 33%, 40% bzw. 19%.. Diese Patienten wiesen signifikante Korrelationen von Serum- und Speichelspiegeln für IgA anti-Ro/SS-A-Antikörpern und zwischen Serum- und

Speichelspiegeln von IgA anti-La/SS-B-Antikörpern auf. Außerdem lagen signifikante Korrelationen zwischen Serum- und Speichelspiegeln von IgG anti-Ro/SS-A-Antikörpern und zwischen Serum- und Speichelspiegeln von IgG anti-La/SS-B-Antikörpern bei den Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom vor. Man geht von einer lokalen Produktion der Autoantikörper sowie einer Beziehung zwischen lokaler und systemischer Antikörperantwort aus [71].

Anti-Ro/SS-A und anti-La/SS-B-Spiegel korrelieren sowohl mit den Rheumafaktor-Titern als auch mit der Konzentration von Gesamt-Globulin, IgG, und IgA, aber nicht mit den IgM-Konzentrationen. Eine weitere Korrelation besteht zwischen den ANA-Titern und den Spiegeln von anti-Ro/SS-A. HLA-DR3-positive Patienten zeigen höhere Spiegel von anti-Ro/SS-A und anti-La (SS-B [72].

Anti-Ro/SS-A-Antikörper haben neben dem Sjögren-Syndrom [73] klinische Assoziationen zu folgenden Erkrankungen: Systemischer Lupus erythematodes (SLE) [74], Pneumonitis [75], Lymphopenie [76], Purpura [72], Photosensitivität [77], leukozytoklastische Vaskulitis [78], subakuter kutaner Lupus erythematodes (LE) [74], ANA-negativer SLE [79], kongenitaler Herzblock [80-82], neonataler LE [83] sowie homozygoter C2- und C4-Mangel [84].

Anti-La/SS-B-Antikörper werden ebenfalls mit Sjögren-Syndrom [80], SLE [85], kongenitalem Herzblock [80], neonatalem LE [86], Photosensitivität [77], subakutem kutanem LE [74] und seltener mit Nephritis [73, 81] assoziiert.

Die Mechanismen, die zur Produktion von Autoantikörpern gegen nukleäre Autoantigene führen, sind bis heute noch nicht genau bekannt. Man nimmt an, dass bestimmte Stressfaktoren zur Translokation der Autoantigene auf die Zelloberfläche führen können und diese dann für das Immunsystem erkennbar werden [87]. Neuere Arbeiten gehen davon aus, dass z.B. ein Defizit an Östrogen zur Entstehung von pathogenen Autoantigenen beim primären Sjögren-Syndrom führen könnte. Der Mechanismus ist allerdings noch unklar [88].

Eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Autoimmunität beim Sjögren-Syndrom wird der Apoptose zugeschrieben [89], die einen aktiven und geregelten Prozeß des Zelltodes darstellt. Während des apoptotischen Prozesses werden intrazelluläre Moleküle in sogenannten apoptotischen Membranblasen akkumuliert. So konnte in normalen apoptotischen Zellen z.B. auch nukleäres 52 kD- Ro/ SSA in apoptotischen Membranblasen nachgewiesen werden [90]. In Speicheldrüsenzellen konnte gezeigt werden, dass die Induktion von Apoptose zu einer Relokalisation von zellulären Antigenen, u.a. 52 kD-Ro/ SSA, auf die Zellmembran führt, was einen Mechanismus für die Autoantigenproduktion beim Sjögren-Syndrom darstellen könnte [91].

Beim Sjögren-Syndrom wird vor allem auch den Apoptose-begleitenden Modifikationen von zellulären Antigenen, z.B. durch proteolytischen Abbau und andere posttranslationale Mechanismen, eine Rolle für die Entstehung von Autoimmunität zugeschrieben [92]. Im Zuge der Apoptose durchläuft die Zellmembran charakteristische Veränderungen, die essentiell für einen geregelten Abbau der Zelle durch Makrophagen sind. Defekte im Abbau des apoptotischen Materials führen zum Verlust der Membranintegrität und infolgedessen zu einer unkontrollierten Freisetzung intrazellulärer Moleküle in das umgebende Gewebe. Diese können das Immunsystem aktivieren und die Entstehung einer Autoimmunität begünstigen [93]. In Hautbiopsien von Patienten mit SLE konnte solch ein defekter Abbau von apoptotischen Zellen nachgewiesen werden. Außerdem zeigten Makrophagen, die aus CD34-positiven SLE-Stammzellen generiert wurden, Defekte in ihrer Funktion [94]. Obwohl es bisher keine vergleichbaren Studien für das Sjögren-Syndrom gibt, könnten dort ähnliche Mechanismen zur Entstehung der Autoimmunität angenommen werden.

Ein weiterer allgemein anerkannter Mechanismus, der zu Autoimmunität führen kann, stellt die Antigen-Proteolyse innerhalb des Endosom-Lysosom-Signalweges dar, bei dem Antigene prozessiert werden, die über MHC-II-Moleküle präsentiert werden [95]. Bei strukturell veränderten Antigenen kann es zu einer veränderten Hierarchie der Epitope kommen, die auf MHC-II-Moleküle geladen werden, wodurch es zu einer Präsentation von Antigenen kommen kann, die vorher verborgen waren, z.B. nukleäre Antigene [92]. Dies wiederum würde zu einer Aktivierung autoreaktiver T-Zellen und infolgedessen zu einer Aktivierung von Autoantikörper-produzierenden B-Zellen und wahrscheinlich auch cytotoxischen Lymphozyten führen [89, 96].

Tab. 5: Differenzierung der ANA-Antigene Ro/SS-A und La/SS-B sowie Prävalenz ihrer assoziierter Krankheiten [31]

Antigen	Krankheit	Prävalenz
Ro/SS-A	Sjögren-Syndrom Systemischer Lupus erythematoses Neonatales Lupus-Syndrom	40 - 95 % 20 - 60 % 100 %
La /SS-B	Sjögren-Syndrom Systemischer Lupus erythematoses	40 - 95 % 10 - 20 %

1.2.4. Zytokine

1.2.4.1. Allgemeines

Zytokine sind Eiweißmoleküle, die von Immunzellen, aber auch von nicht immunologischen Zellen gebildet und freigesetzt werden. Die Zytokine dienen den Immunzellen als "Botenstoffe", über die sie miteinander "kommunizieren". Sie steuern und koordinieren so die Abwehr von Krankheitserregern. Zytokine sind damit mitverantwortlich für den erfolgreichen Ablauf einer Immunreaktion. Sie wirken dabei als Wachstumsfaktoren, aktivieren oder deaktivieren Zellen und dienen als Schutz vor Gewebeschädigungen [97]. Zytokine müssen nicht in die Zelle eindringen, um eine Wirkung zu erzielen, sondern sie docken lediglich an einen so genannten Rezeptor an, der auf der Zelloberfläche sitzt. Durch diese Bindung werden dann bestimmte biologische Reaktionen innerhalb der Zelle ausgelöst und weitergeleitet.

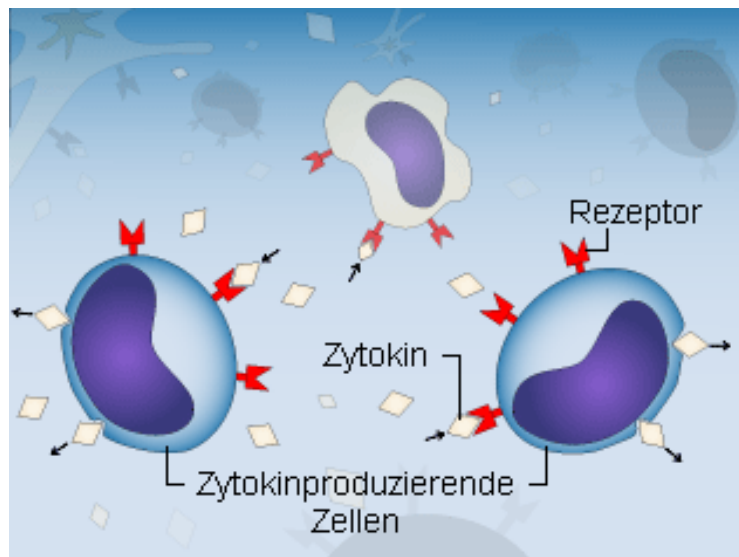


Abb.5: Zytokine werden von Zellen gebildet (meist Immunzellen) und vermitteln ihre Wirkung durch Bindung an Oberflächenrezeptoren. Diese können sich sowohl auf der zytokinproduzierenden Zelle als auch auf anderen (Immun-)Zellen befinden [97].

1.2.4.2. Benennung und Einteilung der Zytokine

Die Zytokine haben keine einheitliche Namensgebung. Viele Zytokine werden als Interleukine (IL-) bezeichnet und sind von 1 bis mittlerweile 33 durchnummeriert (es werden immer wieder neue Zytokine entdeckt [98]). Andere Zytokine sind nach ihrer Funktion benannt, wie z.B. Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α) [97].

Die Einteilung von Zytokinen erfolgt meist nach ihren Effekten während einer Immunantwort. Hierbei unterscheidet man entzündungsfördernde und entzündungshemmende Zytokine:

- **Proinflammatorische Zytokine** sorgen dafür, dass bei Eindringen eines Erregers Immunzellen zum Infektionsort gelockt werden, es zu verstärkter Durchblutung des betroffenen Gewebes kommt und die Immunzellen aktiviert werden.
- **Antiinflammatorische Zytokine** dagegen sorgen dafür, dass nach erfolgreicher Bekämpfung des Krankheitserregers die Entzündung wieder zum Erliegen kommt und die aktivierten Zellen wieder abgeschaltet werden. Weiterhin reguliert das Wechselspiel zwischen entzündungsfördernden und -hemmenden Zytokinen den effektiven Ablauf der Immunabwehr.

Die entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Zytokine sind bei einer Immunreaktion in bestimmten Mengen im Körper vorhanden, sie befinden sich in einer Balance. Diese Balance ist Voraussetzung dafür, dass der Erreger effektiv bekämpft wird, aber auch dass die Immunreaktion wieder zum Erliegen kommt [97].

Wenn die Balance und damit das Zusammenwirken von entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Zytokinen gestört ist, kommt es zu schwerwiegenden Erkrankungen. Entweder kann der Krankheitserreger nicht effektiv beseitigt werden oder die Immunreaktion kommt nicht zum Erliegen, obwohl der Erreger nicht mehr vorhanden ist. Liegen z.B. die Entzündungsreaktion fördernden Zytokine im Überschuss vor bzw. sind zu wenig die Entzündung hemmende Zytokine vorhanden, wird diese und mit ihr die Erkrankung chronisch. Derartige Erkrankungen sind z.B. die rheumatoide Arthritis, das Sjögren-Syndrom, der systemische Lupus erythemathodes, die Psoriasis oder der Morbus Crohn.

Zu den Zytokinen, die den Entzündungsprozess anregen (entzündungsfördernde Zytokine), gehören z.B. Tumornekrosefaktor (TNF)- α , IFN (Interferon)- γ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor (M-CSF) und Granulozyten/Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor (GM-CSF). Zytokine, die hemmende Wirkung auf die Entzündungsantwort haben (entzündungshemmende Zytokine), sind z.B. IL-10 und transformierender Wachstumsfaktor (TGF)- β [97].

Aus der Tabelle 6 geht hervor, dass vor allem die Zytokine IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 und Tumornekrosefaktor-alpha ($\text{TNF}\alpha$) eine Rolle bei Monozyten/ Makrophagen-abhängigen Immunantworten spielen. Man weiß, dass besonders $\text{TNF}\alpha$ eine besondere Bedeutung bei Autoimmunerkrankungen spielt, z.B. auch beim Sjögren-Syndrom (siehe 1.2.5.).

Tabelle 6: Wichtige Zytokine und ihre Rolle bei (Auto)-Immunprozessen [97]

Zytokin	Produzierende Zelle	Wirkung
IL-1	Monozyten/Makrophagen	Fieber, T-Zell-Aktivierung, Makrophagenaktivierung
IL-2	T-Zellen	Wachstum von T-Zellen
IL-4	T-Zellen, Mastzellen	B-Zell-Aktivierung, hemmt T _H 1-Zellen
IL-5	T-Zellen, Mastzellen	Wachstum und Differenzierung der eosinophilen Zellen
IL-6	Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, Endothelzellen	Wachstum und Differenzierung von T- und B-Zellen, Produktion von Proteinen der akuten Phase, Fieber
IL-8	Monozyten/Makrophagen, Synoviozyten, Endothelzellen, Fibroblasten	Stärkster Chemotaxisfaktor für Granulozyten
IL-10	Monozyten/Makrophagen, T-Zellen	Entzündungshemmend, B-Zell stimulierend
IL-12	Monozyten/Makrophagen, B-Zellen	Aktiviert NK-Zellen, induziert Differenzierung von CD4-T-Zellen zu T _H 1-Zellen
IL-13	T-Zellen	Wachstum von B-Zellen, hemmt T _H 1-Zellen und die Produktion inflammatorischer Zytokine durch Makrophagen
IFN (Interferon)-γ	T-Zellen, NK-Zellen	Aktivierung von Makrophagen, erhöhte Menge von MHC-Molekülen, hemmt T _H 2-Zellen
GM-CSF (Granulozyten/Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor)	Monozyten/ Makrophagen, T-Zellen	Stimuliert Wachstum der myeloiden Vorläuferzellen, besonders der dendritischen Zellen
M-CSF (Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor)	Monozyten/ Makrophagen	Stimuliert Wachstum und Differenzierung der myeloiden Vorläuferzellen
TNF (Tumornekrosefaktor)-α	Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, NK-Zellen	Lokale Entzündung, Endothelaktivierung
TGF (Transformierender Wachstumsfaktor) -β	Monozyten, T-Zellen	Hemmt Zellwachstum, entzündungshemmend

1.2.5. Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α)

Der Tumornekrosefaktor-alpha gehört zur Gruppe der Immunmodulatoren oder Zytokine. Die wichtigsten TNF α -Produzenten sind aktivierte Monozyten und Makrophagen. Aber auch eine Reihe anderer Zellen (Lymphozyten, NK-Zellen, Neutrophile, Mastzellen usw.) kann zur TNF α Produktion angeregt werden [99, 100]. TNF α spielt eine wichtige Rolle bei Immun- und Entzündungsprozessen. Es aktiviert Makrophagen und erhöht die Zytotoxizität von Monozyten und NK-Zellen. TNF α induziert aber nicht nur eine Entzündungsreaktion, sondern es bewirkt im weiteren Verlauf einer Entzündungsreaktion auch deren Limitierung, indem TNF α unter anderem die Produktion von IL-10 induziert [101, 102]. Eine Aktivierung von Monozyten zur TNF α Produktion erfolgt u. a. nach einer Stimulation durch bakterielle Komponenten, wie LPS oder Superantigen [103]

TNF α spielt eine Rolle in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis. Eine Überproduktion dieses Zytokins vor allem durch Makrophagen sowie eine erhöhte Expression der TNF α -Rezeptoren wird im Synovium und in den Gelenken von diesen Patienten beobachtet. Weiterhin behalten mononukleäre Zellen aus den Gelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis in vitro ihre Fähigkeit zur Produktion von proinflammatorisch wirkenden Zytokinen bei, so z.B. von TNF α aber auch IL-1, IL-8 und GM-CSF. Eine Neutralisierung mit entsprechenden Antikörpern führt dabei zu einer Reduktion dieser Zytokine [104, 105]. Die Behandlung dieser Patienten mit TNF α -Blockern führt zur klinischen Verbesserung und stellt die Methode der Wahl dar.

TNF α spielt möglicherweise auch eine Rolle beim systemischen Lupus erythemathodes (SLE). Es wird in der Haut unter dem Einfluß von UV-Strahlung vermehrt aus Keratinozyten und Mastzellen freigesetzt [106-111]. Außerdem sind die TNF α -Spiegel im Serum von SLE-Patienten erhöht [112]. Dies korreliert mit der Krankheitsaktivität [113, 114].

Es wird auch angenommen, dass TNF α eine Bedeutung in der Pathogenese des Sjögren-Syndroms spielen könnte. In in-vitro-Experimenten konnte gezeigt werden, dass TNF α eine Hochregulation des Apoptoserezeptors Fas in Zellen der Linie HSG (humane Speicheldrüsenzellen) erzeugen kann. Daraus wurde geschlossen, dass bei Patienten mit Sjögren-Syndrom TNF α die Fas-Expression und nachfolgend Apoptose in diesen Zellen induzieren kann [115, 116]. TNF α wird in den Speicheldrüsen von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom von infiltrierenden mononukleären Zellen produziert [117].

Desweiteren wurde bei Sjögren-Patienten in mehr als der Hälfte (33 von 60) der Tränenproben TNF α detektiert. In den Tränenproben der entsprechenden Kontrollgruppe ohne Sjögren-Syndrom wurde in keinem Fall TNF α gefunden [118].

Vaskulitiden sind meist Folge einer Störung des Immunsystems. Auch hier spielt TNF α eine wesentliche Rolle: Die T-Zell-assoziierte Vaskulitis läuft im Wesentlichen über die CD 4-Lymphozyten ab. Sie ist Ausdruck einer spezifischen zellulären Immunreaktion. Extravasale Monozyten/ Makrophagen induzieren über TNF α oder Komplementfaktoren die Bindung von T-Lymphozyten. Dabei können sich die Makrophagen zu Riesenzellen entwickeln und mit den umgebenden T-Lymphozyten Granulome bilden [119].

Viele Zellen verfügen über TNF-Rezeptoren, so dass TNF eine Vielzahl von biochemischen Prozessen auslösen kann. Eine davon ist die Beeinträchtigung des Tumorwachstums durch die Veränderung der Bildung von Oberflächenproteinen, u.a. von solchen, welche die Bindung an andere Zellen sowie die Produktion von Wachstumsfaktoren bewirken. TNF α schädigt auch die Gefäße von Tumoren, so dass mikroskopisch kleine Thrombosen entstehen und Immunzellen in den Tumor eindringen können [120].

1.2.6. DNA-Polymorphismus / Bandenmuster

Das Genom des Menschen ist weitgehend sequenziert, und etwa 30 000 bis 40 000 Gene sind identifiziert. Dies ist ein wichtiger Schritt, um molekularbiologische Abläufe im menschlichen Körper besser zu verstehen. Für die Aufklärung der erblichen Ursachen von Krankheiten ist aber darüber hinaus noch ein weiterer Aspekt von großer Bedeutung: Die Kenntnis der individuellen Unterschiede in der Erbinformation, der genetischen Variabilität. Sie stellt den Schlüssel dar, mit dem sich jene genetischen Unterschiede aufspüren lassen, die bestimmte physiologische Abläufe verändern und so zur Entstehung von Krankheiten beitragen [121].

Polymorphismen der Erbinformation sind Varianten der Sequenz der Erbinformation, die es erlauben z. B. Nachkommen ihren Eltern zuzuordnen. Jeder Mensch erhält die Hälfte der DNA von der Mutter und die andere Hälfte vom Vater. Alle Menschen besitzen daher zwei Kopien jeder DNA-Sequenz, je eine Sequenz vom Vater und eine von der Mutter (Abb.6).. Diese beiden DNA-Sequenzen sind meist unterschiedlich lang

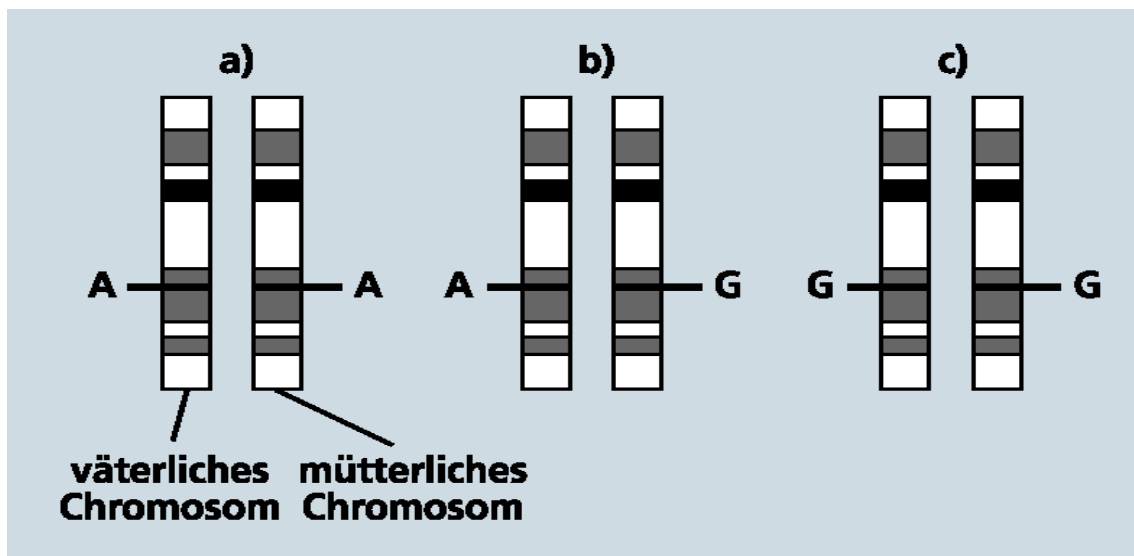


Abb. 6: Die Körperzellen des Menschen sind diploid, enthalten also das Genom in zweifacher Ausführung, wobei eine Kopie von der Mutter und eine vom Vater stammt. Eine Person kann für eine Sequenzvariation, beispielsweise einen SNP (single nucleotide polymorphism), welcher die beiden Allele A und G hat, homozygot oder heterozygot sein. a und c) Das väterliche und das mütterliche Chromosom tragen dasselbe Allel. Die Person ist für den SNP homozygot (Genotyp A/A oder G/G). b) Das väterliche und das mütterliche Chromosom tragen jeweils ein unterschiedliches Allel. Die Person ist für den SNP heterozygot (Genotyp A/G) [121].

1.3. TNF α -Promotorpolymorphismus

TNF α -Promotorpolymorphismen scheinen sowohl eine Rolle in der Pathogenese als auch beim Krankheitsverlauf verschiedener Autoimmunerkrankungen zu spielen, beispielsweise bei der juvenilen idiopathischen Arthritis. Das TNF-308A Allel ist häufiger bei der seropositiven, aber nicht in der seronegativen polyartikulären juvenilen idiopathischen Arthritis zu finden und könnte mit der Schwere der Erkrankung im Zusammenhang stehen, während das häufige TNF-308G Allel dabei einen protektiven Einfluss haben könnte. Das TNF-238A Allel ist dagegen mit der juvenilen Psoriasisarthritis assoziiert [122]. Es ist bekannt, dass es bei Vorliegen eines Polymorphismus in der TNF α - Promotorregion zu einer Beeinflussung der Transkriptionsrate und der Freisetzung dieses Zytokins kommt. Dabei weiß

man, dass das Vorliegen des Polymorphismus an den Positionen -238 und -308 zu einer erhöhten Transkriptionsrate und einer verstärkten TNF α - Freisetzung führt [123].

Das Thema TNF α -Promotorpolymorphismus bei Patienten mit SLE wird kontrovers diskutiert. Man geht davon aus, dass bei der kaukasischen Rasse eine Assoziation zum TNF α -308-Allel vorliegt. Für die afroamerikanische Rasse gilt dies nicht [124].

Es wird bereits im Rahmen der rheumatoiden Arthritis (RA) die Möglichkeit von prognostischen und therapeutischen Möglichkeiten bei Vorliegen des Polymorphismus an den Positionen -238 und - 308 diskutiert [125].

Bei Patienten mit Sjögren-Syndrom liegen derzeit keine Erkenntnisse über eine Verknüpfung mit dem TNF α -Promotor-Polymorphismus vor.

1.4. Fragestellung

Für das Sjögren-Syndroms ist der serologische Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA), speziell von Antikörpern gegen Ro/SS-A bzw. La/SS-B, charakteristisch. Die Prävalenz von Autoantikörpern gegen Ro/SS-A beim primärem Sjögren-Syndrom wird mit bis zu 96% angegeben [13].

Das Autoantigen Ro52 – die 52 kD-Komponente von Ro/SS-A – ist primär zumeist im Kern lokalisiert. Allerdings scheint eine Translokation auf die Zelloberfläche in Folge verschiedener Streßfaktoren möglich, sodass es für das Immunsystem erkennbar wird [87]. Ro52 ist eine Interferon-induzierbare E3-Ligase, die den Transkriptionsfaktor IRF-8 ubiquiniert und die Zytokinexpression in Makrophagen erhöhen kann (Kong HJ et al. J Immunol 179: 26-30, 2007).

Monozyten könnten als potentielle Antigen-präsentierende Zellen (APCs) eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Sjögren Syndroms einnehmen. So lassen sich Monozyten und Makrophagen gehäuft im entzündeten Speicheldrüsengewebe von Sjögren-Patienten nachweisen [126-129]. In ihrer Funktion als APCs könnten sie in diesen Geweben Autoantigene aufnehmen und diese im weiteren Verlauf der Immunreaktion T- und B-Zellen präsentieren. Somit könnten Monozyten an der Induktion und Aufrechterhaltung einer Autoantikörperantwort beteiligt sein.

Monozyten sowie Makrophagen gelten darüber hinaus als Hauptproduzenten des proinflammatorischen Zytokins TNF α . Dieses spielt bei chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen eine große Rolle. In *in vitro* Experimenten induzierte TNF α den Apoptose-Rezeptor Fas in Speicheldrüsengangszellen, die dadurch eine erhöhte Apoptose zeigten [115, 116]. Man nimmt an, dass dies zu einer erhöhten Freisetzung von Autoantigenen führt. TNF α wurde auch vermehrt in der Tränenflüssigkeit [118] und im Speicheldrüsengewebe [117] von Sjögren-Patienten gefunden.

Desweiteren zeigte eine Arbeit unserer Gruppe, dass eine *in vitro* Behandlung mit TNF α eine zeitabhängige transiente Hochregulation der Ro52-mRNA-Expression in Keratinocyten von gesunden Spendern bewirkt, die nach vier Stunden Inkubationszeit das Maximum der Expression erreicht. Die Hochregulation von Ro52-mRNA wird von einer Erhöhung der Ro52-Protein-Expression begleitet, die 20 bis 24 Stunden nach der Behandlung messbar ist. Die TNF α induzierte Erhöhung der Ro52-mRNA und des Proteins ist abhängig von der

Bindung des Zytokins an die Untereinheit TNF-RI des TNF α Rezeptors. TNF-RII spielt eine inhibitorische Rolle bei der TNF-RI-vermittelten Erhöhung der Ro52 Expression [130].

In verschiedenen Autoimmunerkrankungen konnte eine Assoziation mit einem DNA-Polymorphismus an den Positionen -238 und -308 in der Promotorregion des TNF α -Gens beobachtet werden. Dieser DNA-Polymorphismus kann zu einer erhöhten Transkriptionsrate und einer verstärkten Freisetzung von TNF α führen [123].

Ausgehend von der Literatur und den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde die Rolle der Monozyten in der Pathogenese des Sjögren Syndroms untersucht, wobei folgende Fragen zu beantworten waren:

1. Welches basale Expressionsniveau zeigen monozytäre TNF α - und Ro52-mRNAs von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom im Vergleich zu einer Gruppe von Normalspendern ?
2. Korreliert das Expressionsniveau von monozytärer TNF α -mRNA mit dem der Ro52-mRNA ?
3. Wie hoch sind die Plasmaspiegel von TNF α und anderer ausgewählter Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10) bei Patienten mit Sjögren-Syndrom im Vergleich zu Gesunden ?
4. Besteht eine Korrelation zwischen den TNF α -Plasmaspiegeln und der Expression monozytärer TNF α -mRNA ?
5. Weisen Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom einen DNA-Polymorphismus in der TNF α -Promotoregion (Positionen -238 und -308) auf und gibt es einen Zusammenhang zu ihren TNF α -Plasmaspiegeln bzw. ihrer TNF α -mRNA-Expression ?

2. Material und Methoden

2.1. Patientengruppe und Kontrollgruppe sowie deren Medikation

Insgesamt wurden 79 Blutproben á 30 bis 40 ml aufgearbeitet, davon 51 unterschiedliche Proben von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom und 28 Proben von Kontrollspendern.

Die Diagnose der Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom war klinisch, laborchemisch bzw. entsprechend den europäischen Klassifikationskriterien gesichert (siehe unter 1.1.5.). Es wurde heparinisiertes Blut von 42 weiblichen und acht männlichen Patienten verwendet.

Die Patienten erhielten - in Abhängigkeit vom subjektiven Wohlbefinden und ihren Begleitbeschwerden - folgende Medikationen:

Celexoxib*	200 mg/d	-	3 von 50 Patienten (1 von 3 Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme nicht mehr therapiert)
Prednisolon*	5 mg/d	-	8 von 50 Patienten (5 von 8 Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme nicht mehr therapiert)

Andere Immunsuppressiva oder Antimalaria-Medikamente kamen nicht zum Einsatz.

Die Kontrollgruppe setzte sich aus zwei weiblichen und vier männlichen Spendern zusammen. Alle Spender waren gesund und nahmen zum Zeitpunkt der Untersuchung bzw. im näheren Zeitraum davor keine Medikamente ein. Zur Etablierung des Systems wurden diesen sechs Spendern insgesamt 28 Blutproben abgenommen.

2.2. Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Periphere mononukleäre Zellen (B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen, Thrombozyten), kurz PBMC's, können mit Hilfe von Ficoll-Paque bei Raumtemperatur durch eine Dichtegradientenzentrifugation von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen getrennt werden [131]. Ficoll ist ein ungeladenes Saccharose-Polymer, dessen Dichte (1,07 g/ml) so gewählt ist, dass Erythrozytenaggregate und tote Zellen die Ficollschicht passieren können, Granulozyten in die Ficollphase eindringen und Lymphozyten, Monozyten sowie Thrombozyten sich in der Interphase ansammeln (siehe Abb. 7). Der Überstand besteht aus Plasma und PBS.

Zur Gewinnung der PBMC's wurden zunächst 15ml Ficoll-Paque™ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durch Zentrifugation über 20 Sekunden bei 1000 rpm unter die durchlässige Trennscheibe (biologisch inertes Polyethylen) der 50 ml Leucosep®-Röhrchen (Greiner GmbH, Frickenhausen) positioniert. Danach wurden jeweils ca. 30 bis 40 ml antikoagulierten humanen Vollblutes 1:2 mit PBS verdünnt und auf die Trennscheibe der Leucosep®-Röhrchen gegeben. Im Anschluß erfolgte die Zentrifugation bei Raumtemperatur für 20 Minuten mit 1800 rpm im Ausschwingrotor ohne Bremsassistenten.

Der Überstand aus Plasma und PBS wurde für spätere immunometrische Assays (siehe 2.8) und die magnetische Zellsortierung (siehe 2.3.) abgesaugt und bei - 20 °C eingefroren. Danach wurde die Interphase in ein 50 ml Falcon®-Tube (Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg) mittels einer 5 ml-Pipette überführt, auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und anschließend für 10 Minuten bei 1500 rpm und 4 °C gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes und Resuspension des Zellpellets wurde dieser Vorgang wiederholt und eine Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer vorgenommen.



Abb. 7: Isolierung von mononukleären Zellen aus dem Vollblut mittels Leucosep®-Röhrchen (Greiner) vom Befüllen bis zur Entnahme

Folgende Schichtung ergibt sich nach der Zentrifugation (von oben nach unten):

- | | |
|-----------|---|
| a) Plasma | b) angereicherte Zellfraktion (Interphase aus Lymphozyten / PBMC's) |
| c) Ficoll | d) poröse Trennscheibe aus biologisch inertem Polyethylen |
| e) Ficoll | f) Sediment aus Erythrozyten und darüber Granulozyten |

2.3. Magnetische Zellsortierung

Zur Isolierung verschiedener Zellen wurde das magnetische Zelltrennungssystem MACS[®] (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) verwendet. Bei diesem System werden sehr kleine, supermagnetische Partikel (ca. 50nm) eingesetzt, die nicht viel größer als Antikörper sind. Die Antikörper können ähnlich wie Fluorochrome auf verschiedene Weise mittels monoklonaler Antikörper spezifisch an bestimmte Zellen gebunden werden. Die Bindung kann direkt über Antikörper-Magnetpartikel-Konjugate erfolgen oder indirekt über Anti-Antikörper-Magnetpartikel-Konjugate. Die Trennung spezifisch markierter Zellen von unmarkierten Zellen erfolgt in einem Hochgradienten-Magnetfeld, das durch Insertion einer aus ferromagnetischen Stahlpartikeln bestehenden Säulenmatrix in das Magnetfeld eines Hochleistungspermanentmagneten erzeugt wird. Wird die Zellsuspension über die Säule gegeben, bleiben die magnetisch markierten Zellen an den Stahlkugeln hängen, während die unmarkierten Zellen die Säule durchlaufen und als negative Fraktion aufgefangen werden. Die markierten Zellen lassen sich durch Ausspülen der Säule außerhalb des Magnetfeldes gewinnen (Elution). Das MACS[®]-System kann zur Anreicherung oder zum Ausschluß einer Zellpopulation (Depletion) aus einer Gesamtzellpopulation eingesetzt werden. Zur Kontrolle der Separation werden Originalfraktion, negative oder positive Fraktion anschließend durchflußzytometrisch analysiert. Für die Monozytenisolierung wurde der „monocyte isolation kit“ (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) verwendet. Es handelt sich um eine negative Sortierung [132]. Zunächst wurde das Zellpellet aus der Ficoll-Aufreinigung in ein 2 ml Eppendorf-Tube (Eppendorf AG, Hamburg) überführt und mit Patientenpuffer aufgefüllt. Der Puffer (50 ml) bestand aus 90 % PBS (phosphate buffered saline; pH 7,4), 10 % autologem Serum, 0,5 % BSA (bovine serum albumin, Karlsruhe) und 2 mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden). Es erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C mit 2000 rpm für 8 Minuten. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 60 µl Puffer/ 10⁷ Zellen resuspendiert und 20 µl FCR-Blocking-Reagenz/ 10⁷ Zellen und sowie 20 µl Hapten-Antikörper-Mix/ 10⁷ Zellen (hapten-konjugierte Antikörper gegen CD3, CD7, CD19, CD 45RA, CD56 und anti-IgE) zugegeben. Zusätzlich wurden 20 µl CD15 MicroBeads/ 10⁷ Zellen (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) hinzugegeben, da spätere Reinheitsüberprüfungen zu große Granulozytenpopulationen im Eluat ergeben haben. Dann wurden die Reagentien verwirbelt, bei 4 °C für 10 Minuten dunkel inkubiert und die Zellen zweimal gewaschen. Dazu wurde jeweils mit Patientenpuffer auf 2 ml aufgefüllt und bei 4 °C mit 2000 rpm für 8 Minuten zentrifugiert.

Jetzt wurden 20 µl FCR-Blocking-Reagenz/ 10^7 Zellen und - um die Zellen zu magnetisieren – 20 µl MACS-Anti-Hapten-MicroBeads/ 10^7 Zellen zugegeben.

Nun wurden die Reagentien erneut verwirbelt, bei 4 °C für 15 Minuten dunkel inkubiert und die Zellen mit Patientenpuffer gewaschen. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das Pellet in 500 µl Patientenpuffer resuspendiert und auf eine MACS[®]-Column LS überführt. Später wurden in drei Schritten jeweils 3 ml des Patientenpuffers auf die Säule gegeben. Das Eluat wurde in ein 15 ml Falcon-Tube (Greiner GmbH, Frickenhausen) aufgefangen und mit PBS aufgefüllt und bei 4 °C mit 1500 rpm für 10 Minuten gewaschen.. Es wurde ein Aliquot von ca. 200.000 Zellen zur nachfolgenden durchflußzytometrischen Reinheitsüberprüfung am FACS[®] (Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg) abgenommen und die übrigen depletierten Zellen zwecks mRNA-Präparation weiterverarbeitet.

2.4. Durchflußzytometrische Untersuchung des Probenmaterials

Die aus der magnetischen Zellsortierung gewonnenen Zellen wurden auf ihre Reinheit bezüglich Monozyten mit Hilfe der Technik der Durchflußzytometrie untersucht. Die Messungen erfolgten an einem FACS[®]-Durchflußzytometer (Fluorescence Activated Cell Analysis) mit Argon-Laser (Becton Dickinson Bioscience , Heidelberg).

Die Methode der Durchflußzytometrie ermöglicht die Analyse und Charakterisierung einzelner Zellen aufgrund ihrer fluoreszierenden und lichtstreuenden Eigenschaften. Dazu werden Zellen in Suspension durch spezielle Vorrichtungen des Durchflußzytometers in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl wie Perlen einer Perlenkette aneinandergereiht („hydrodynamische Fokussierung“) und passieren so einzeln einen Laserstrahl. Physikalische Zelleigenschaften wie Größe und Granularität bestimmen die charakteristische Streuung des Laserlichtes. Die Streuung entlang des Laserlichtstrahls in Vorwärtsrichtung gibt Auskunft über die Größe der Zelle, d. h. je größer die Zelle, desto größer ist die Streuung in Vorwärtsrichtung. Der Parameter für die Vorwärtsstreuung wird als FSC (forward scatter) bezeichnet. Desweiteren erfolgt eine von der Granularität abhängige Streuung im rechten Winkel zum einfallenden Licht. Diese Seitwärtsstreuung wird auch SSC (sideward scatter) genannt und ist umso höher, je größer die Granularität der Zelle ist.

Die Zellen können auch mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Diese Fluoreszenzfarbstoffe werden vom Laserlicht angeregt, d.h. ihre Elektronen werden auf ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Zurückfallen der Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau emittieren sie Lichtenergie, die als Fluoreszenz sichtbar wird. Durch den Energieverlust während des Strahlungsüberganges besitzt das energieärmere emittierte Licht

stets eine größere Wellenlänge als das energiereichere absorbierte Licht. Die Absorption des Lichts ist abhängig vom Laser, der Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert, und vom Fluorochrom, dessen Absorptionsspektrum im selben Wellenlängenbereich liegen muß. Bei Markierung von Zellen mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen muß beachtet werden, dass sich die Absorptions- und Emissionsspektren voneinander unterscheiden.

Die gewonnenen Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften werden von speziellen Detektoren erfasst und verstärkt (sogenannter Photomultiplier, PMT). Über spezielle Computer-Software werden die verschiedenen Parameter der Zelle gespeichert und analysiert.

Die Vorteile der Durchflußzytometrie liegen in der Möglichkeit mehrere verschiedene Parameter einer Zelle simultan zu erfassen. Zusätzlich können innerhalb von Sekunden mehrere Tausend Zellen erfasst werden, wodurch eine aussagekräftige Statistik ermöglicht wird.

Die Aufnahme der Zellparameter erfolgte mit Hilfe der Software CellQuest[®] Version 3.0 (Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg) und die Auswertung mittel FCS-Express[®] Version 2.0 (De Novo, Ontario, Kanada).

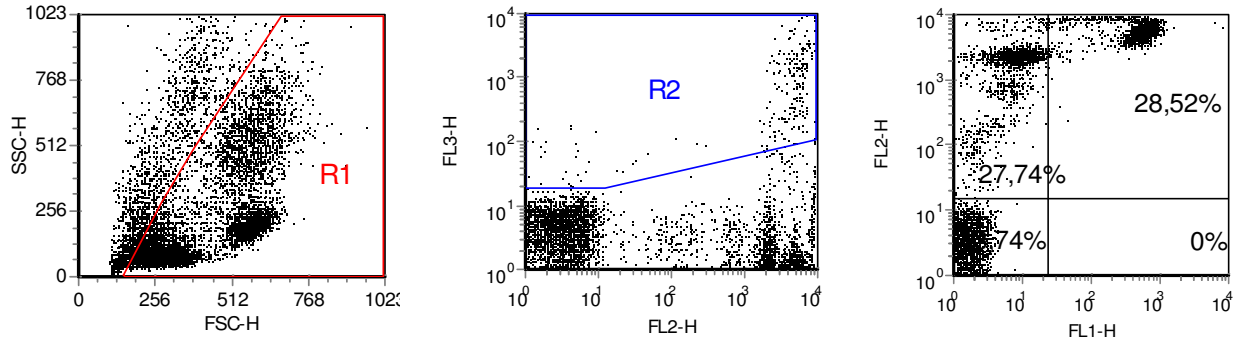
Für die durchflusszytometrische Untersuchung von Oberflächenmolekülen der Zellen wurden diese mit spezifischen, monoklonalen Maus-Antikörpern markiert. Es wurden nur direktmarkierte Antikörper verwendet. Die Antikörper wurden zuvor an PBMC's austitriert und die geeignete Konzentration für die folgenden Färbungen eingesetzt: Anti-CD14-FITC 1:50 (Deutsches Rheumaforschungszentrum, Berlin) und anti-CD45-PE 3:50 (Pharmingen, San Diego, Kalifornien, U.S.A.). Pro Färbung wurden ca. 200.000 Zellen verwendet, die in 50 µl PBS (phosphat buffered saline; pH 7,4) resuspendiert wurden. Nach Antikörperzugabe wurde bei 4 °C für 25 Minuten im Dunkeln inkubiert, anschließend mit 2 ml PBS gewaschen und zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen, Propidiumiodid zugegeben (1µg/ ml) und im Durchflusszytometer analysiert.

Bei der Auswertung der Messungen wurden die Regionen R1 sowie R2 (siehe Abb. 11) gesetzt, um tote bzw. apoptotische Zellen auszuschliessen. Mit Hilfe der Region R1 wurden die toten/ apoptotischen Zellen anhand ihrer Größe und mit der Region R2 aufgrund der Propidiumiodid-Negativität diskriminiert. Apoptotische Zellen schrumpfen und ihre Membran wird für Propidiumiodid zunehmend durchlässig.

Die lebende Population wurde in einem neuen Diagramm dargestellt, indem die Fluoreszenzen der zugegeben Antikörper gezeigt wurden. Dabei entspricht Fluoreszenz 1 (FL1) CD14 und Fluoreszenz 2 (FL2) CD45 (siehe Abb.8).

Eine Weiterverwendung der analysierten Zellpopulation erfolgte nur, wenn deren Reinheit bezüglich monozytärer Zellen $\geq 85 \%$ war.

A)



B)

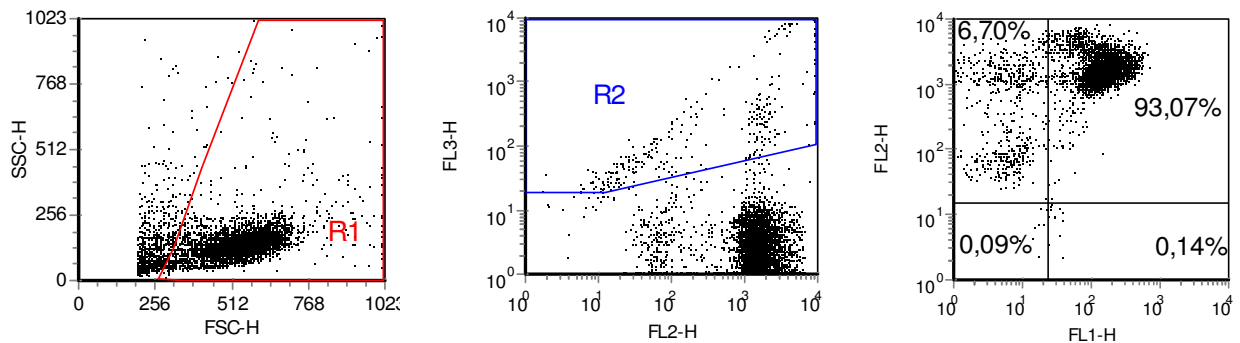


Abb. 8: Durchflußzytometrische Analyse von Monozyten am FACS®

Apoptotische Zellen werden durch das Setzen der Regionen R1 (Streulichteigenschaft) und R2 (Propidiumiodidaufnahme) diskriminiert. Das jeweils dritte Bild zeigt die lebenden Zellen, die sich in R1 und außerhalb von R2 befinden. Fluoreszenz 1 zeigt die Expression von CD14 und Fluoreszenz 2 die Expression von CD45. Die Monozyten befinden sich im oberen rechten Quadranten des Punktdiagramms. A) FACS-Kontrolle nach Einsatz des monocyte isolation kit (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) mit starker Granulozytenverunreinigung. B) FACS-Kontrolle nach Einsatz des monocyte isolation kit sowie zusätzlicher Markierung mit CD15 MicroBeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) und minimierter Leukozytenverunreinigung

2.5. mRNA-Präparation aus Monozyten

Für die Extraktion von Messenger-RNA aus Monozyten wurde der OligotexTM mRNA Mini Kit (Quiagen GmbH, Hilden) verwendet. Die Extraktion erfolgte aus Monozyten, die zuvor durch Ficoll-Aufreinigung und die magnetische Zelltrennung MACS[®] (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) isoliert wurden (siehe unter 2.1. und 2.2.). Es war darauf zu achten, dass möglichst RNase-frei gearbeitet wurde (Reinigung der Arbeitsplatte, Handschuhe, Redeverbot, Verwendung von RNase-freien Eppendorf Safe-Lock Tubes).

Zunächst wurden die Zellen in zwei 2 ml Eppendorf Safe-Lock Tubes (Eppendorf AG, Hamburg) überführt und mit Hilfe eines Lysepuffergemisches aus 1 ml Lysepuffer OL1 und 30 µl Mercaptoethanol (Sigma, Taufkirchen) lysiert. Anschließend wurde das Lysat – um die Zellen noch besser aufzuschließen – über eine 2 ml Spritze und eine 0,7 mm Kanüle mehrfach angesaugt und durchgespritzt sowie für zirka 30 Sekunden verwirbelt. Nun erfolgte die Abzentrifugation der Zelltrümmer für 15 Minuten bei 13000 rpm mit anschließender Absaugung des Überstandes in zwei frische 2 ml Eppendorf Safe-Lock Tubes unter Verwerfung des Pellets. Dem klaren Überstand wurden bei 36 °C jeweils 20 µl OligotexTM-Suspension zugesetzt und für 3 Minuten bei 36 °C sowie für weitere 7 Minuten bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Durchmischen inkubiert. Nach der Zentrifugation für 8 Minuten bei 13000 rpm wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in je 200 µl Puffer OW1 resuspendiert und auf zwei OligotexTM mRNA Spin-Columns überführt. Jetzt wurde für 40 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert, das OligotexTM-Pellet in je 150 µl Puffer OW2 resuspendiert und auf einer neuen Spin-Column vereinigt. Anschließend erfolgte wieder eine Zentrifugation für 40 Sekunden bei 13000 rpm, der Waschpuffer wurde aus der Spin-Column entfernt und erneut in 300 µl Puffer OW2 resuspendiert. Der Einsatz der Spin-Column mit dem OligotexTM-Pellet wurde in ein neues Tube umgesetzt, nachdem für 40 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert wurde. Abschließend wurde bei 72 °C zweimal mit je 50 µl OEB-Elutionpuffer resuspendiert und jeweils für 40 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. Das gesammelte Eluat wird nun - wie unter 2.6. beschrieben – photometrisch quantifiziert.

2.6. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Mittels photometrischer Bestimmung der Absorption bei 260 nm und 280 nm wurden die Konzentration und die Reinheit der Nukleinsäuren untersucht (SHIMADZU UV-1202, UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Zunächst erfolgte bei 260 nm

ein Nullabgleich, nachdem 80 µl RNase-freies Wasser in die Küvette positioniert wurden. Dann wurden 8 µl des Wassers entnommen und im Gegenzug 8 µl des Eluats der mRNA- bzw. DNA-Präparation hinzugefügt.

Die Berechnung der mRNA-Konzentration, gemessen bei 260 nm und einer Verdünnung von 1:10, erfolgte folgendermaßen: Dilutionfaktor für RNA gleich 40 mal Verdünnungsfaktor 10 ist gleich einem Gesamtfaktor von 400. Somit entspricht einer Absorption von 0,001 ein mRNA-Gehalt von 0,4 ng/µl. Bei der Berechnung der DNA-Konzentration wurde analog verfahren.

Durch die Bestimmung des Quotienten der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Absorption ($A_{260} : A_{280}$) erhält man eine Information über die Reinheit der Nukleinsäurepräparation. Liegt der Quotient für RNA im Bereich zwischen 1,9 und 2,0, handelt es sich um eine reine Präparation. Bei niedrigeren Quotienten kann man eine Verunreinigung durch Proteine und/oder andere Stoffe erkennen. Eine genaue Bestimmung der Nukleinsäuremenge ist dann nicht möglich.

2.7. Polymerasekettenreaktion (PCR) mittels LightCycler®

2.7.1. Prinzip der LightCycler® -Technologie

Mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) - Amplifizierung ist es möglich geworden, aus kleinsten Mengen von Nukleinsäurefragmenten zuverlässig DNA nachzuweisen. Die bisherige Möglichkeit einer Analyse mittels konventionellen PCR erfolgte semiquantitativ.

Mit der LightCycler®-Technologie bietet Roche Diagnostics (Mannheim) neuerdings Echtzeit- oder realtime-PCR-Technologie in Deutschland an. Das Prinzip des LightCyclers® stellt dabei ein neu entwickeltes Geräte- und Analysensystem dar (siehe Abb.9 und 10), das nicht nur sehr schnelle Cyclingzeiten für die PCR, sondern auch die gleichzeitige online und realtime Detektion der Reaktionskinetik erlaubt. Die ultraschnellen Cyclingzeiten zeigen sich z.B. in 30 PCR-Zyklen in weniger als 30 Minuten. Dies wird durch effiziente Aufheiz- und Abkühlungsprozesse erreicht, die durch wechselnde Zufuhr von heißer Luft und Luft mit Umgebungstemperatur gekennzeichnet sind. Der Einsatz von Glaskapillaren als Reaktionsgefäße und deren günstigem Verhältnis von Oberfläche zu Volumen stellt die gewünschte Temperatur im Reaktionsansatz innerhalb von Millisekunden ein. Die Glaskapillaren dienen aber auch als optisches Element zur Sammlung von Licht, d.h. zur Echtzeit-Fluoreszenzmessung der Probe. Echtzeit- oder online-Detektion bedeutet die

Wahrnehmung eines Fluoreszenzsignals während jedem PCR-Zyklus und dessen Visualisierung auf dem Monitor.

Im SybrGreen[®]-Format wird das Signal am Ende der Elongationsphase gemessen, wenn die größte Menge an doppelsträngiger DNA vorliegt. Im sogenannten „Hybridisation Probe Format“ wird in der Übergangsphase zwischen „Primer annealing“ und „Elongation“ detektiert. Dies ist die Temperatur, bei der die Hybridisations-Proben vollständig gebunden haben und der Fluoreszenz-Energietransfer (FRET) mit maximaler Effizienz abläuft [133].



Abb. 9: LightCycler[®] (Roche)

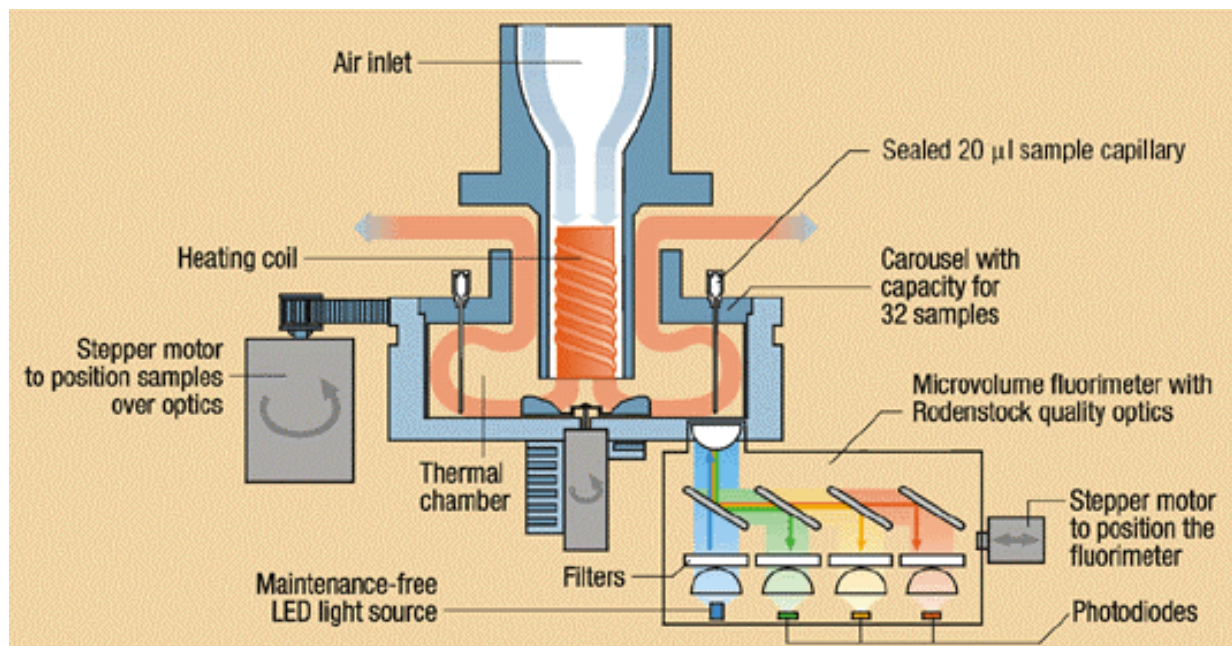


Abb. 10: Schemazeichnung des LightCyclers[®] (Roche)

2.7.2. Prinzip der quantitativen PCR

Das PCR- Reaktionsprofil ist in 3 Segmente unterteilt:

- in eine frühe „Background- Phase“,
- eine exponentielle Wachstumsphase (log- Phase) und
- eine Plateauphase.

Die „Background-Phase“ dauert, bis ein Signal des PCR-Produktes größer als das „Background-Signal“ des Systems ist. Die exponentielle Wachstumsphase beginnt mit der Detektion von ausreichend amplifiziertem PCR-Produkt (Akkumulation) oberhalb des „Background-Signals“ und endet mit dem Abfall der Reaktionseffizienz mit Eintritt in die Plateauphase. Während der Log-Phase kann die Amplifikation durch folgende Gleichung beschrieben werden [133]:

$$T_n = T_0(E)^n$$

T_n entspricht der Menge von Target (Produkt) bei Zyklus n ;

T_0 entspricht der initialen Menge von Target (Produkt) und

E bezeichnet die Effizienz der Amplifikation.

Die maximal mögliche Effizienz der quantitativen PCR ist 2: Jedes PCR-Produkt wurde in jedem Zyklus repliziert.

Der minimale Wert beträgt 1: Dies ist mit einer Null-Amplifikation gleichzusetzen ist.

Eine exponentielle Amplifizierung ist nicht immer mit einer quantitativen Analyse gleichzusetzen. Geringe Unterschiede in der Amplifikationseffizienz können zwischen zwei Proben, die über 40 Zyklen vervielfältigt werden, zu großen Unterschieden führen. Die Nichtbeachtung dieser Tatsache führt zu der Gefahr von Fehlern - vor allem in Bezug auf Analyse und Bewertung der Messergebnisse. Die Frage, warum sich die Anwendung der quantitativen PCR trotzdem weiter entwickelt hat, liegt in der um Größenordnungen höheren Sensitivität gegenüber den besten Blotting-Verfahren und einem etwa zehnfach größeren dynamischen Messbereich. Die hervorragende Sensitivität und ihr großer Messbereich haben die Etablierung einer quantitativen PCR-Methode lohnenswert gemacht.

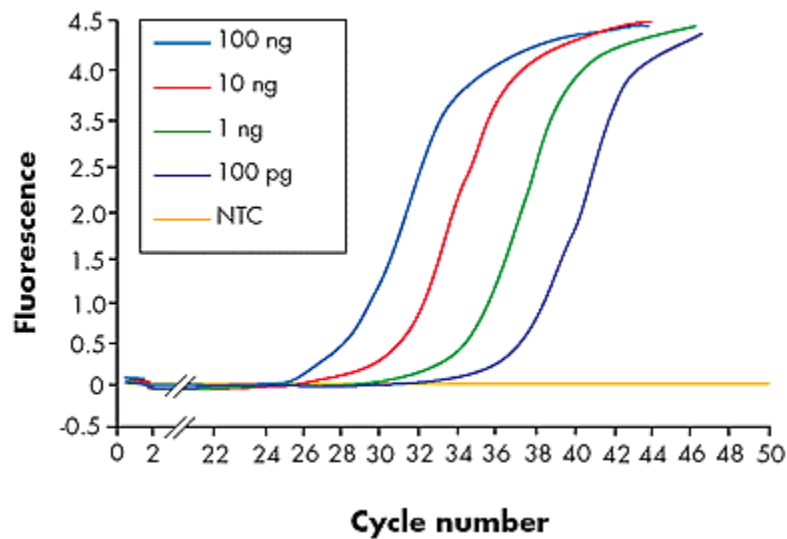


Abb. 11: Typische realtime PCR-Graphen bei einer LightCycler®-Anwendung von Proben bekannter Konzentration in unterschiedlicher Verdünnung (Roche)

Der PCR- Zyklus, bei dem jede Reaktion sich über das Background-Signal des Systems erhebt, ist abhängig von der Menge an Transkriptionsprodukten, die zu Beginn der Reaktion vorhanden sind. Nach der obigen Gleichung läßt sich folgendes ableiten: Wenn 10^8 Kopien zu Beginn der Reaktion vorliegen und die Reaktion eine Effizienz von 1,9 aufweist, wird das erste spezifische Signal bei Zyklus 8,4 sichtbar werden. Wenn die Reaktion mit 10^3 Kopien beginnt, wird das entsprechende Signal bei Zyklus 24,6 (siehe Abb. 11, hellblaue Kurve) erscheinen. Wenn die Reaktion mit einer einzelnen Kopie ablaufen würde müsste für ein spezifisches Signal bis Zyklus 36 gewartet werden. Eine entsprechende Negativkontrolle, z.B. destilliertes Wasser, sollte nicht über das Hintergrundrauschen hinaus sichtbar sein (siehe Abb. 11, gelbe Kurve).

2.7.3. PCR- Monitoring mit Hybridisationsproben

Das Hybridisationsprobenformat ist für Detektion und Quantifizierung von DNA geeignet und liefert eine maximale Spezifität für die Produktidentifikation. Zusätzlich zu den für die konventionelle PCR-Reaktion benötigten Komponenten werden zwei speziell synthetisierte, sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide für die Detektion benötigt. Diese erlauben einen hochspezifischen Nachweis von Amplifikationsprodukten. Die Spenderprobe ist am 3'- Ende mit Fluoreszin gekoppelt und absorbiert das von der Licht-Emitterenden-Diode (LED) des Light Cyclers® ausgestrahlte Licht. Die daneben befindliche

Empfängerprobe absorbiert die von der Spenderprobe abgestrahlte Resonanzenergie. Die Empfängerprobe ist mit einem Fluoreszinfarbstoff, dem LC[®] Red 640, gekoppelt. Ein Fluoreszenzsignal der Empfängerprobe wird nur ausgestrahlt, wenn beide Proben an dem Einzelstrang des Amplifikationsproduktes gebunden haben. Der Prozess des Energietransfers von einem zum anderen Farbstoff wird Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) genannt (Abb.12).

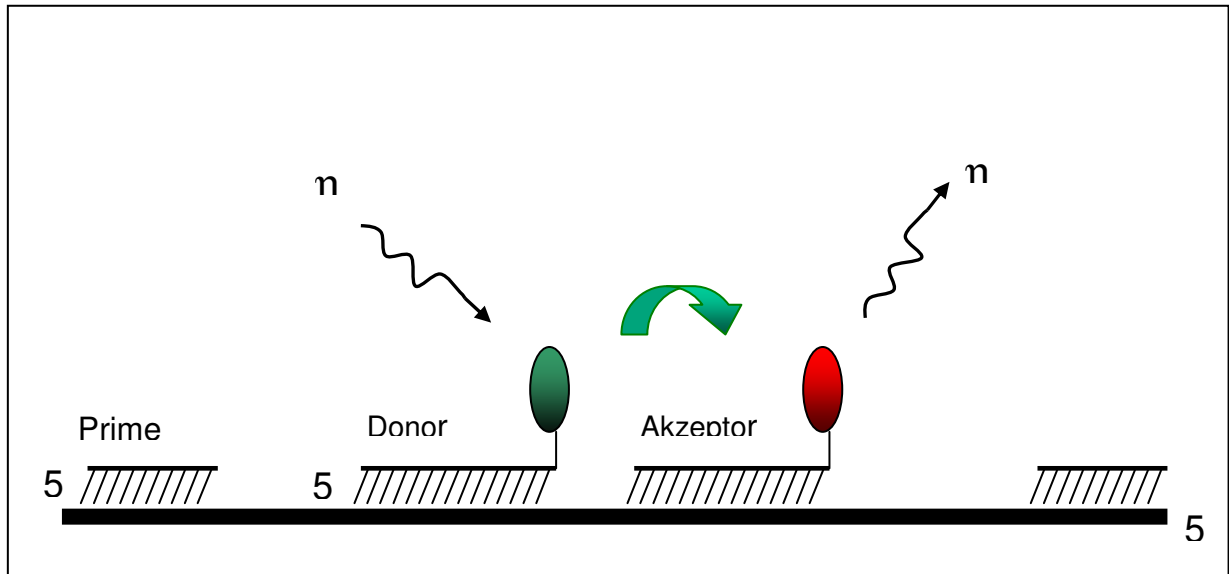


Abb. 12: Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (Roche)

2.7.4. Relative Quantifizierung über externe Standards („kinetische PCR“)

Die Idee einer relativen Quantifizierung über externe Standards ist einfach, aber mit der traditionellen „Endpunkt-PCR“ eine große Herausforderung. Um quantitative Informationen aus vier bis fünf exponentiellen Zyklen von 40 PCR-Zyklen zu erhalten, werden sehr viele Versuchsansätze benötigt oder die Versuchsergebnisse sind schon vor dem Experiment gesichert.

Mit der realtime-PCR kann die exponentielle Phase der Reaktion leicht identifiziert werden: Mit den Daten über die Konzentration des PCR-Produktes (Molekülzahl) aus jedem Zyklus kann der Untersucher den exponentiellen Bereich nach Beendigung der PCR sehr einfach festlegen.

2.7.5. Standardkurven

Abbildung 11 zeigt eine Standardkurve von Datenpunkten. Diese kann wie folgt interpretiert werden: Es gilt die Annahme, dass ein einzelner Punkt der Amplifikationskurve immer dieselbe Menge an PCR-Produkt in jeden Graphen repräsentiert. Dieser Datenpunkt wird mit dem Begriff „Crossing Point“ (CP) belegt. Wenn die Anzahl der Kopien eines PCR-Produktes am CP als K und die Zykluszahl als CP bezeichnet werden, gilt nach Gleichung [133]

$$K = T_0(E)^{CP} \quad \text{oder linearisiert gilt:} \quad \text{LogK} = \log T_0 + (Cp \times \log E).$$

Die initiale Konzentration des Standards (T_0) ist benutzerdefiniert vorgegeben, die Zykluszahl am CP ist die Messgröße. Die Umstellung der Gleichung in die Form $y=mx+b$ ergibt:

$$CP = -(1/\log E) \times \log T_0 + (\log K / \log E)$$

Diese Gleichung beinhaltet den Logarithmus der initialen Templatekopien, die auf der x-Achse dargestellt sind sowie die Zykluszahl am CP auf der y-Achse.

Der Slope des Graphen ist der negative reziproke Wert des Logarithmus der Effizienz (E) bzw.

$$E = -10^{1/\text{slope}}$$

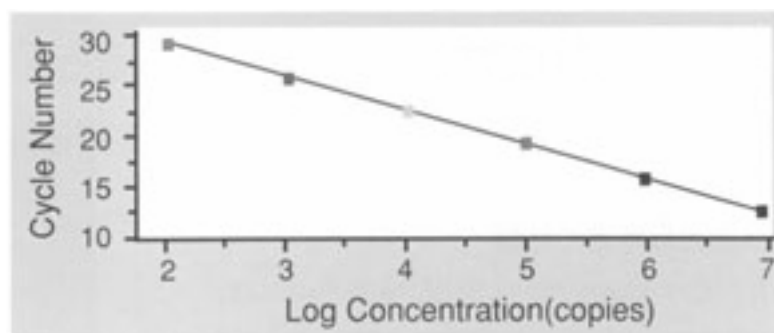


Abb. 13: Lineare Regressionsgerade von Verdünnungsserien

Es gibt keinen einfachen Weg, mit dem die Effizienz einer realtime PCR kontrolliert werden kann. Es ist aber möglich, die Effizienz von Proben im Bereich der Target-Konzentration konstant zu halten und eine durchschnittliche Effizienz zweier Proben zu ermitteln.

Die graphische Darstellung des CP und des Logarithmus der Target-Konzentration von Verdünnungsserien der Proben ermöglicht einen Vergleich der durchschnittlichen Effizienz (siehe Abb. 13).

Für die Ermittlung der Verlagerung des Crossing Points (ΔCP) im Hinblick auf die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurde die folgende Gleichung verwendet:

$$\Delta CP = \text{Mittelwert Normalspender (verschiedene 3-fachansätze)} - \text{Patient} \times (3\text{-fachansatz})$$

Um den Faktor der Expressionveränderung zu ermitteln, wurde entsprechend der exponentiellen Amplifizierung ΔCP als Exponent eingesetzt:

$$\text{Faktor} = 2^{\Delta CP}$$

2.7.6. Realtime Multiplex-PCR

Für die Reaktionsansätze wurden der LightCycler[®] RNA Amplification Kit, das LightCycler[®] h- β 2M Housekeeping Gene Set (beide Roche, Mannheim) und Primer sowie Sonden von TIB[®] MOLBIOL (Berlin) verwendet.

Zur Minimierung von Fehlern wurden Mastermix-Ansätze – entsprechend der Anzahl der zu messenden Proben - hergestellt, deren einfache Zusammenstellung folgendermaßen lautete (entsprechend Protokoll Roche, Mannheim):

β 2-Mikroglobulin-Mix (1x)

7,4 μ l Aqua (RNase frei)

3,2 μ l MgCl₂

4,0 μ l LC-Puffer

2,0 μ l Primer-Hybrid

0,4 μ l Enzym

17 μ l gesamt

TNF α -Mix6,4 μ l Aqua (RNase frei)3,2 μ l MgCl₂4,0 μ l LC-Puffer1,0 μ l TNF α -LC1,0 μ l TNF α -FL0,5 μ l Primer forward (0,41 μ M)0,5 μ l Primer reverse (0,41 μ M)0,4 μ l Enzym17 μ l gesamtRo52-Mix6,4 μ l Aqua (RNase frei)3,2 μ l MgCl₂4,0 μ l LC-Puffer1,0 μ l Ro-LC1,0 μ l Ro-FL0,5 μ l Primer forward (50pM/ μ l)0,5 μ l Primer reverse (50pM/ μ l)0,4 μ l Enzym17 μ l gesamt

Folgende Primer sowie Sonden von TIB[®] MOLBIOL (Berlin) wurden verwendet [61, 134]:

Primer TNF α :hu TNF α sense 5'- TTCTCCTTCCTgATCgTggChu TNF α antisense 5'- gCgTTTgggAAggTTggATSynthesemaßstab 0,2 μ mol; Kondition 127,3 μ molPrimer Ro52:

Ro52 F 5'- gCAgCAAAAAAACTTCCTggTTg

Ro52 A 5'- gAgCTgTggCACCTTCgATC

Synthesemaßstab 0,02 μ mol; Kondition 5 nmolSonden TNF α :TNF α LC Red 640 5'- CCACTggAgCTgCCCCTCAgCTTNF α FL Red 640 5'- gCATTggCCCggCggCggTTCbeide 2,0 μ MSonden Ro52:

Ro52 FL Red 640 5'- gCCTCTTTCTCCCCAaggATTCTCAgC

Ro52 LC Red 640 5'- CTCCTCTCATCCTTCTCCAgCTCCTgC

beide 2,0 μ M

Jeweils 17 µl aus dem entsprechenden Mix wurden in die Glaskapillaren gefüllt und um die Menge von 20 ng mRNA der Monozyten (siehe 2.5) ergänzt. Das System wurde zuvor auf 20 ng mRNA austitriert.

Um einen Anhaltspunkt für die Genauigkeit der Ergebnisse zu haben, wurden zum einen Dreifach-Ansätze angestrebt, zum anderen wurden die Titrationsen 1:10² bis 1:10⁶ von Proben mit bekanntem RNA-Gehalt (Roche, Mannheim) zum Vergleich mitlaufen gelassen. Nach der Funktionsüberprüfung des LightCyclers® im sogenannten Self-Test wurden neben der Definition der Proben und Farbausgabe die folgenden Einstellungen (laut Protokoll Roche, Mannheim):für die PCR vorgenommen (Tab. 7 bis 9):

Tab. 7: β2-Mikroglobulin

	Zyklen	Zieltemperatur in °C	Inkubationszeit in min:sec	Temperatur-Transitions- Rate in °C / sec
<i>Reverse Transkription: mRNA => cDNA</i>	1	56	20:00	20,00
<i>Denaturierung</i>	1	95	00:30	20,00
<i>Amplifikation: Strangaufweitung</i>	45	95	00:01	20,00
Primerbindung		59	00:15	20,00
Elongation		72	00:15	02,00
<i>Inaktivierung:</i>	1	40	01:00	20,00

Tab. 8: TNFα

	Zyklen	Zieltemperatur in °C	Inkubationszeit in min:sec	Temperatur-Transitions- Rate in °C / sec
<i>Reverse Transkription : mRNA => cDNA</i>	1	56	17:00	20,00
<i>Denaturierung:</i>	1	95	00:30	20,00

	Zyklen	Zieltemperatur in °C	Inkubationszeit in min:sec	Temperatur-Transitions- Rate in °C / sec
<i>Amplifikation:</i>				
Strangaufweitung	45	95	00:01	20,00
Primerbindung		59	00:20	20,00
Elongation		72	00:20	2,00
<i>Inaktivierung:</i>	1	40	01:00	20,00

Tab. 9: Ro 52

	Zyklen	Zieltemperatur in °C	Inkubationszeit in min:sec	Temperatur-Transitions- Rate in °C / sec
<i>Reverse</i>				
<i>Transkription:</i> mRNA => cDNA	1	56	17:00	20,00
<i>Denaturierung:</i>	1	95	00:30	20,00
<i>Amplifikation:</i>				
Strangaufweitung	45	95	00:01	20,00
Primerbindung		59	00:24	20,00
Elongation		72	00:25	02,00
<i>Inaktivierung:</i>	1	40	01:00	20,00

2.8. Immunometrischer Assay für Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), Interleukin 1 beta, Interleukin 6, Interleukin 8 und Interleukin 10

Im Blutplasma von Spendern mit primärem Sjögren-Syndrom und gesunden Kontrollspendern wurden in vitro quantitativ Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), Interleukin 1 beta (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 8 (IL-8) und Interleukin 10 (IL-10) bestimmt (Immulite[®], sequentieller immunometrischer Assay, DPC-Biermann GmbH, Bad Nauheim).

Wichtig für die Analyse war es, dass keine (Fibrin)-Gerinnsel in den Serumproben vorliegen, da diese zu fehlerhaften Analyseergebnissen führen. Außerdem durfte eine Lagerzeit des Probenmaterials (Plasma) von sechs Monaten bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht überschritten werden.

2.8.1. Immunometrischer Assay für Tumornekrosefaktor alpha (TNF α)

Jedes TNF α -Teströhrchen enthielt eine mit monoklonalem anti-TNF α Antikörper beschichtete Kugel aus Polystyrol, die vor Beginn der Inkubation auf Raumtemperatur gebracht wurde. Der zugesetzte TNF α -Assay-Mix bestand aus mit alkalischer Phosphatase (Rinderkalbsdarm) konjugiertem polyklonalem anti-TNF α (Hase) in Pufferlösung, lyophilisiertem TNF α in einer nichthumanen Serum-Puffermatrix und destilliertem Wasser. Es wurde solange durchmischt, bis das lyophilisierte Material vollständig aufgelöst war.

Die Probenträger wurden mit jeweils 100 μl Plasma sowie 250 μl TNF α -Assay-Mix befüllt. Ebenso wurden zur Qualitätskontrolle Poolseren mit IL-1 β eingesetzt. Die anschließende Inkubation erfolgte über 60 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Die Ergebnisse wurden vom Test-Gerät Immulite[®] (Immulite[®] Random Access Analyzer DPC-Biermann GmbH, Bad Nauheim) in Pikogramm je Milliliter ausgegeben [135].

2.8.2. Immunometrische Assays für IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10

Die weiteren Messungen für IL- β , IL-6, IL-8 und IL-10 erfolgten analog zum Assay für TNF α ; jedoch gab es Unterschiede sowohl in der Zusammensetzung als auch in der Menge der entsprechenden Ausgangsreagentien (Immulite[®] DPC-Biermann GmbH, Bad Nauheim) sowie bei den notwendigen Inkubationszeiten. Diese sahen im einzelnen folgendermaßen aus:

- Interleukin-1 beta:
- *IL-1 β -Teströhrchen*, enthält mit monoklonalem Anti-IL-1 β -Mausantikörper beschichtete Kugel
 - *75 μl Serum*
 - *100 μl IL-1 β -Assay-Mix* aus mit alkalischer Phosphatase (Rinderkalbsdarm) konjugiertem polyklonalem anti-IL-1 β (Hase) in Pufferlösung, lyophilisiertem IL-6 in einer nichthumanen Serum-Puffermatrix und destilliertem Wasser + *Inkubation: 60 min*

Analog waren die übrigen Ausgangsreagentien für IL-6, IL-8 und IL-10 zusammengesetzt. Diese waren jeweils mit dem entsprechenden monoklonalen Anti-Interleukin-Antikörper versehen. Die Inkubationszeiten waren mit 2x 30 Minuten (IL-6), 1x 30 Minuten (IL-8) und 1x 60 Minuten (IL-10) verschieden lang.

2.8. Polymorphismusanalyse der Promotorregion des TNF α -Gens auf DNA-Ebene

Die Analyse von Polymorphismen der Promotorregion, Positionen – 238 und – 308, des TNF α -Gens auf DNA-Ebene wurde in Kooperation mit der Abteilung für Molekularbiologie am Institut für Humangenetik der Charite, Campus Virchow Klinikum, durchgeführt.

Folgende Techniken wurde zur Polymorphismusanalyse eingesetzt:

1. Präparation von DNA aus Vollblut
2. Polymerasekettenreaktion (PCR)
3. Agarosegel-Elektrophorese
4. Enzymatische Aufreinigung
5. Sequenzierung

2.9.1. Präparation von DNA aus Vollblut

Für die Extraktion von DNA wurde der QIAamp[®] DNA Blood Maxi Kit (Quiagen GmbH, Hilden) verwendet. Die Extraktion erfolgte aus 10 ml heparinisierem Vollblut.

Zunächst wurden 500 μ l Protease und das Blut in ein 50 ml Falcon-Tube (Greiner GmbH, Frickenhausen) gegeben und kurz gemixt. Dann wurden 12 ml Buffer AL hinzugeben, dreimal für zirka fünf Sekunden gevortext und zehn Minuten bei 70 °C inkubiert.

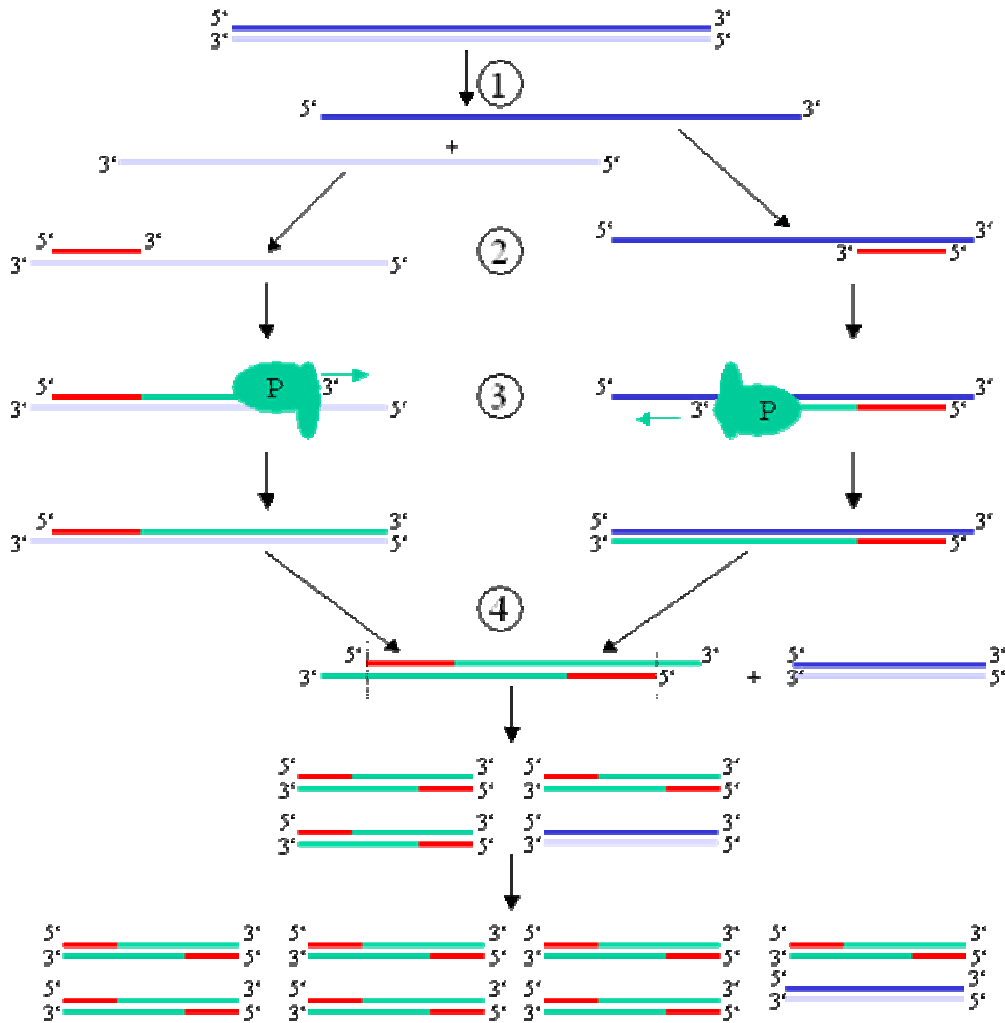
Jetzt wurden 10 ml 98-prozentiges Ethanol (Merck, Darmstadt) dazugegeben, verwirbelt und anschließend vorsichtig die Hälfte auf die Membran einer QIAamp Maxi column gegeben. Es erfolgte die Zentrifugation für drei Minuten bei 3000 rpm. Nach Verwerfung des Filtrats und Überführung des QIAamp Maxi column - Einsatzes in ein neues 50 ml Falcon-Tube, wurde mit der zweiten Hälfte analog verfahren und der Einsatz wiederum in ein frisches 50 ml Falcon-Tube überführt.

Nun wurden 5 ml Buffer AW1 – ohne den Rand zu befeuchten – hinzugegeben und für eine Minute bei 5000 rpm zentrifugiert. Im zweiten Waschschrift wurden 5 ml Buffer AW2 dazugegeben und für 15 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert sowie der Einsatz in ein neues 50 ml Falcon-Tube überführt.

Für die abschließende Elution wurde 1 ml Buffer AE direkt auf die Membran gegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der fünfminütigen Zentrifugation bei 5000 rpm wurde erneut 1 ml Buffer AE auf die Membran gegeben und analog inkubiert sowie zentrifugiert. Die Menge an Elutionspuffer AE kann halbiert oder auch verdoppelt werden; je nach dem, ob man einen größeren oder kleineren Gehalt an DNA pro Mikroliter wünscht. Auf den Gesamtgehalt an DNA hat diese Variation keinen Einfluß. Die Konzentration und die Reinheit wurden danach photometrisch überprüft (siehe Abschnitt 2.6.).

2.9.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine *in vitro* Methode, um einen definierten Bereich der DNA innerhalb kürzester Zeit millionenfach zu amplifizieren. Mehr zum Thema PCR unter 2.7. (Erklärung der LC-Technologie). Eine Übersicht liefert die Abbildung 14:



- (1) Schmelzen bei 96 °C. (2) Anlagerung bei 68 °C.
 (3) Verlängerung bei 72 °C (P = Polymerase). (4) Der erste Zyklus ist beendet

Abb. 14: Schema der Polymerasekettenreaktion (Magnus Manske, Diplombiologe, Köln)

Folgender Ansatz wurde verwendet:

3,0 µl	10x PCR- Puffer	0,3 µl	dNTP's / 10 mM
0,3 µl	50 pmol / µl Forward-Primer	0,2 µl	Amplitaq
0,3 µl	50 pmol / µl Reverse-Primer	22,0 µl	Aqua dest

Folgende Primer-Sequenzen wurden verwendet (MWG Biotech AG, Ebersberg):

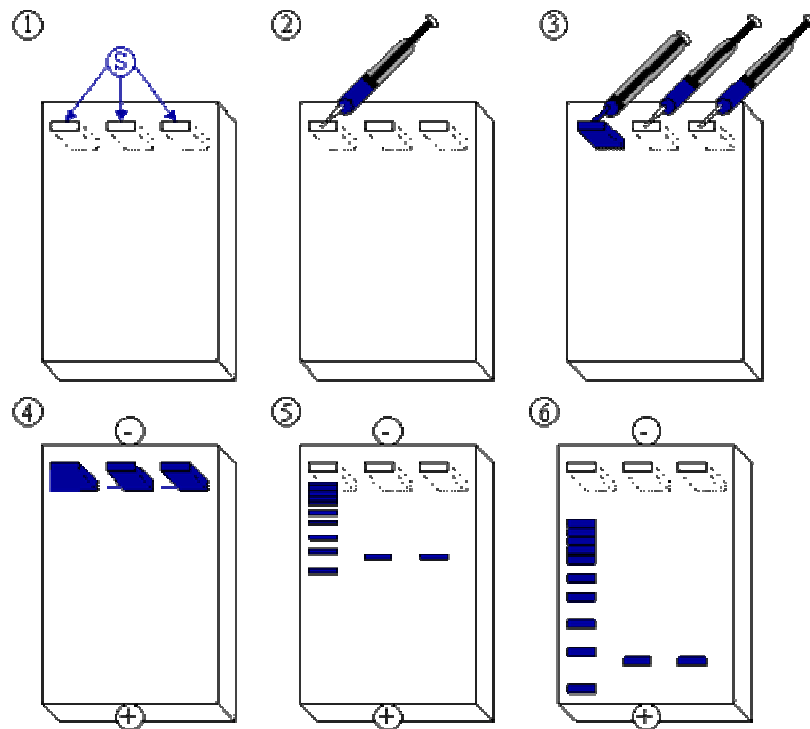
Primer TNF α -Forward: ctctccctcaaggactcagc
 Primer TNF α -Reverse: aaccagcgaaaacttccct

Nach der PCR lagen die amplifizierten Abschnitte noch verunreinigt mit Primern und anderen Ausgangsstoffen der Reaktion vor. Das entstandene Produkt wurde deswegen im zweiten Schritt enzymatisch aufgereinigt.

2.9.3. Agarosegel-Elektrophorese

Zur Kontrolle der PCR-Produkte wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden zwei-prozentige Agarosegele mit TBE-Puffer (90 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA, Roth, Karlsruhe) verwendet. Die Agarose-Gel-Elektrophorese ist die einfachste und effektivste Methode, DNA-Fragmente von 500 bis 25.000 Basen Länge voneinander zu trennen und zu identifizieren.

Das Prinzip der Agarosegel-Elektrophorese ist folgendes: Man löst Agarose in Elektrophoresepuffer durch Erhitzen und gießt daraus mit Hilfe eines Kammes ein Gel. Die Kammzinken bilden nach dem Gelieren Taschen, in welche die DNA-Lösung pipettiert wird. Daraufhin wird dieser dreidimensionalen Gelmatrix eine Spannung angelegt. Durch die Ladungseigenschaften der DNA (DNA ist negativ geladen) wandert diese im elektrischen Feld vom Minus-Pol zum Plus-Pol und trennt sich der Größe nach auf, da die Gelmatrix die Moleküle je nach Größe unterschiedlich bremst. Kleine Moleküle wandern schneller durch das Gel, sehr große dagegen bewegen sich nur sehr langsam von minus nach plus. Ist die DNA ausreichend weit gewandert, so färbt man das Gel und betrachtet es unter UV-Licht. Zum Vorbereiten der Proben und Beladen des Gels werden auf einem Streifen Parafilm viermal 3 µl Proben-Puffer vorgelegt und danach die gleiche Menge der Probe zugegeben. Mit der Pipette wird nun vorsichtig vermischt (durch Auf- sowie Absaugen) und dann langsam in die Taschen pipettiert. Jeweils rechts und links von den vier Proben werden 2 µl DNA-Größenmarker mitlaufen gelassen. Mit hochauflösenden DNA-Gelen lassen sich Sequenzen voneinander trennen, die sich lediglich um nur ein Nukleotid unterscheiden. Daher läßt sich die Sequenz, ausgehend von dem kleinsten Fragment - der Bande, die am weitesten gelaufen ist - durch Vergleiche der vier parallelen Bahnen miteinander ermitteln, indem man der Reihenfolge nach die Banden von klein nach groß durchnummeriert und den Nukleotiden zuordnet. Nachfolgend eine schematische Darstellung einer Gelelektrophorese:



1. Das Agarosegel mit 3 Slots (S).
2. Einspritzen von DNA-Leiter in den ersten Slot.
3. DNA-Leiter ist aufgetragen. Proben 2 und 3 werden aufgetragen.
4. Eine Spannung wird angelegt. Die DNA wandert zur positiv geladenen Anode, weil sie negativ geladen ist (Phosphatreste im "Rückgrat" der DNA).
5. Kleine DNA-Fragmente wandern schnell, große langsam durch das Gel. Die DNA ist währenddessen normalerweise nicht sichtbar. Daher wird der Fortschritt an der Farbfront abgelesen, die sich mit einem DNA-Fragmente bestimmter Länge auf gleicher Höhe durch das Gel bewegt (je nach Farbstoff und Agarose-Konzentration unterschiedlich).
6. Anhand der Farbfront wird abgeschätzt, wann die Elektrophorese beendet und ausgewertet wird.

Abb. 15: Schematische Darstellung einer Gelelektrophorese

In einem althergebrachten Gel mit radioaktiver Markierung würden die Banden nicht sichtbar sein. Heutzutage wird die Markierungsreaktion allerdings nicht mehr radioaktiv (wie früher üblich), sondern mit Hilfe von fluoreszierenden Farben durchgeführt. Jedes dNTP erscheint dabei in einer anderen, für sich charakteristischen Farbe. Diese Methode bringt zwei große Vorteile mit sich:

1. Vermeidung einer Exposition mit radioaktiven Strahlung
2. Die vormals vier separat durchgeführten Sequenzierreaktionen mit anschließender Gelelektrophorese reduzieren sich auf ein Reagenzglas und eine Gelbahn.

Entsprechend können Sequenzierroboter zur gleichen Zeit 96 Sequenzierungsreaktionen durchführen.

2.9.4. Enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte

Nun wurde die enzymatische Aufreinigung durchgeführt, um insbesondere die noch vorhandenen Primer – welche die Sequenzierung beeinflussen könnten – aus dem PCR-Produkt zu entfernen. Dazu wurde folgender Versuchsansatz verwendet:

<u>×1</u>		
0,50 µl	10× Exo I Puffer	[Exo I/Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)]
0,05 µl	10 U / µl Exo I Enzym	
0,50 µl	1 U / µl SAP	
3,50 µl	Aqua dest.	
<u>0,45 µl</u>	Dephosphorylationspuffer	
5,00 µl		

Zu diesem Ansatz wurden nun jeweils 5 µl des PCR-Produkts gegeben und für 45 Minuten bei 37 °C sowie für weitere 15 Minuten bei 80 °C inkubiert.

2.9.5. Sequenzierung

Es wurde eine DNA-Sequenzierung nach der Methode von Sanger durchgeführt [136]. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit Big dye Terminatoren (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Die Auftrennung der Produkte der Sequenzier-Reaktion wurden mit einem Mikrokapillargerät, dem DNA-Sequenzierer ABI 3100 (Applied Biosystems, Weiterstadt), aufgetrennt.

Hier wurde folgender Reaktionsansatz (10 μ l) verwendet:

- 2,0 μ l Big dye mix
- 1,0 μ l Primer (5 μ M)
- 3,0 μ l Aqua dest
- 4,0 μ l Aufgereinigte PCR-Produkte (aus 2.9.4.)

Bei der enzymatischen Sequenzierung wird die zu sequenzierende DNA in einer Synthesereaktion vervielfältigt.

Die Methode spaltet sich in zwei Teilschritte auf:

- **Markierungsreaktion** zum Erstellen einer markierten Ausgangsprobe
- **Terminationsreaktion** in der die Synthese der aus der ersten Reaktion hervorgegangenen Teilstücke beendet wird.

Bei der Markierungsreaktion wird anhand einer DNA-Sequenz als Matrize in einem Reaktionsansatz mit einem Primer, einem Puffer, DNA-Polymerase, den drei Nucleotiden dTTP, dCTP, dGTP und einem ³⁵S-Schwefel-markierten dATP ein kurzes Stück neue (komplementäre) DNA synthetisiert. Der ³⁵S-Schwefel ist ein radioaktives Isotop und dient später als Nachweis der jeweiligen synthetisierten Fragmente über eine Autoradiographie. Der Markierungsansatz wird anschließend auf vier getrennte neue Reaktionsansätze für die Terminationsreaktion aufgeteilt, die zusätzlich zu den oben genannten Komponenten noch eine andere Art von Nucleotiden enthält. Dieser Art von Nucleotiden (Didesoxyribonucleosid-Triphosphate) fehlt eine essentielle Gruppe, dadurch kann das Verknüpfen mit anderen hinzukommenden Nucleotiden nicht stattfinden. In getrennten Reaktionsansätzen wird jeweils eine dieser Nucleotidarten (ddATP, ddGTP, ddCTP oder ddTTP, zusammen als ddNTPs bezeichnet) zusätzlich eingesetzt und konkurriert mit seinem normalen Gegenstück. Wird ein solches "modifiziertes" Nucleotid in die neue Sequenz eingebaut, kommt es hier zu einem Kettenabbruch, da es das Anfügen des nächsten Nucleotids verhindert. Die Verhältnisse der dNTPs zu ddNTPs (normalerweise 1- 4% ddNTP's) sind so gewählt, dass die markierten Stränge bis zu mehreren hundert Basen lang sind. Dabei endet jeder neue DNA-Strang an einem zufällig ausgewählten A, C, T oder G. Es entstehen unterschiedlich lange Fragmente.

Die Auswertung erfolgte über die Software Chromas Version 2.24 (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Australien). Man erhielt an der Position, an welcher der Polymorphismus vermutet wurde, entweder das Buchstabenkürzel für die jeweilige Base (homozygot) oder den Buchstaben N, wenn zwei verschiedene Basen existierten (heterozygot). Um welche Basen es sich handelte, konnte man anhand der Farbe und der Höhe der Amplitude bestimmen (siehe Abbildung 16).

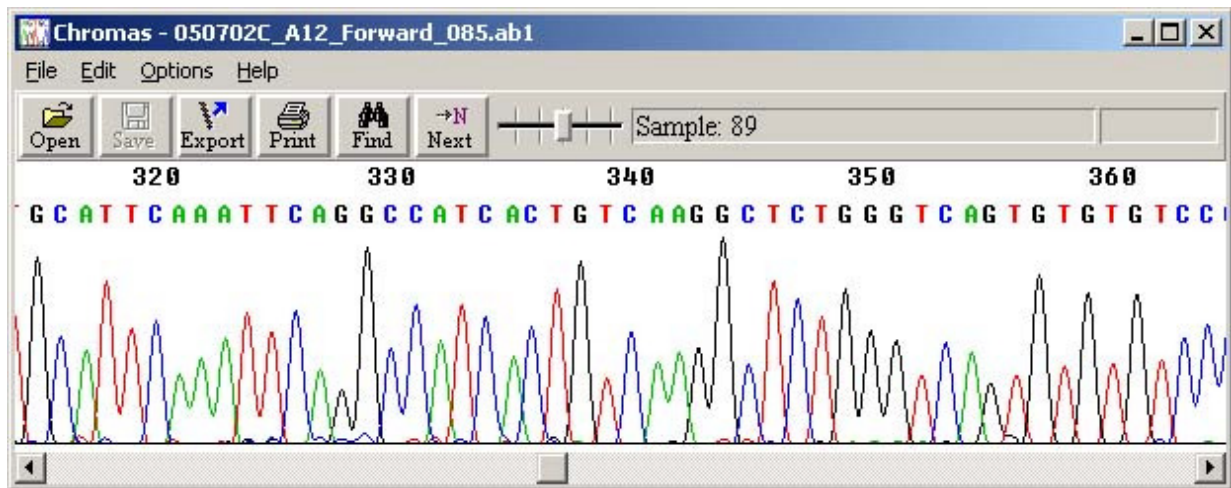


Abb. 16: Sequenzdarstellung durch die Chromas-Software (Technelysium Pty Ltd., Australien)

Nachfolgend die Sequenz für das TNF α -Gen mit Promotorregion [137]:

```

1 aaacacaggc ctcaggactc aacacagctt ttccctccaa ccccgttttc tctccctcaa
61 ggactcagct ttctgaagcc cctcccagtt ctagttctat ctttttctg catcctgtct
121 ggaagttaga aggaaacaga ccacagacct ggtccccaaa agaaatggag gcaataggtt
181 ttgaggggca tggggacggg gttcagcctc cagggccta cacacaaatc agtcagtggc
241 ccagaagacc cccctcggaa tcggagcagg gaggatgggg agtgtgaggg gtatccttga
301 tgcttgtgtg tccccactt tccaaatccc cgcccccgcg atggagaaga aaccgagaca
361 gaaggtgcag ggcccactac cgcttctctc agatgagctc atggggtttct ccaccaagga
421 agtwtccgc tggttgaatg attttttccc cgccctcctc tcgcc

```

3. Ergebnisse

3.1. Verwendbarkeit der Proben von Spendern mit primärem Sjögren-Syndrom und der Proben der Kontrollspender

Insgesamt wurden 79 Blutproben aufgearbeitet, davon 51 Proben von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom und 28 Proben von Kontrollspendern (siehe 2.1.).

Von 51 Patientenproben waren 35 Proben verwertbar zur mRNA-Präparation und weitere 29 Proben zur Weiterbearbeitung (PCR) am LightCycler®.

Weiterhin waren von 28 Kontrollproben 21 Proben verwertbar zur mRNA-Präparation und weitere 17 Proben zur Bearbeitung (PCR) am LightCycler®.

Der Einfluß von Medikamenten konnte weitgehend ausgeschaltet werden, da nur eine medikamentös beeinflusste Probe (Patient zuvor mit 5mg Prednisolon und 200mg Celebrex® behandelt) analysiert wurde. Alle anderen Patientenproben, bei denen zuvor eine Behandlung stattfand, fielen aufgrund von Problemen bei der Reinheit (erste Proben) oder anderer technischer Probleme aus der Analyse heraus.

3.2. Optimierung der Anreicherung von Monozyten

Eine große Reinheit bezüglich Monozyten wurde durch die Aufgabenstellung gefordert. Die Ergebnisse der FACS-Analyse zur Überprüfung der Reinheit der Zellen in Bezug auf Monozyten zeigte folgende Ergebnisse:

1. Die Reinheit der Proben nach Anwendung des „Monocyte Isolation Kits“ (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) nach einem Durchlauf durch die MACS® Column LS brachte nicht zufriedenstellende Werte bezüglich der Monozytenfraktion zwischen 25 und 39 %, wobei insbesondere die Fraktion der ebenfalls kernhaltigen Granulozyten mit Frequenzen zwischen 22 und 38 % deutlich zu hoch lag. Zunächst wurde überprüft, ob die Kontamination durch eine andere Handhabung in den Griff zu bekommen ist. Das Ergebnis war weiterhin eine unzureichende Reinheit (siehe Abb. 17):

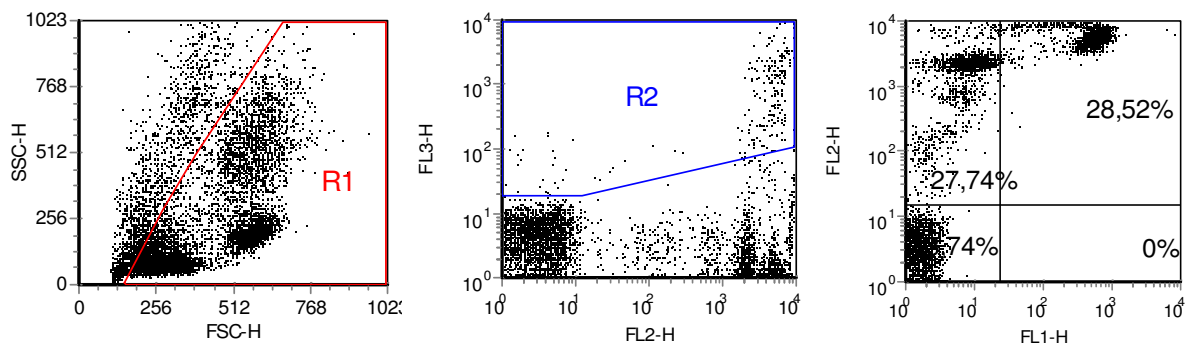


Abb. 17: Durchflußzytometrische Analyse von Monozyten am FACS® I

Apoptotische Zellen werden durch das Setzen der Regionen R1 (Streulichteigenschaft) und R2 (Propidiumiodidaufnahme) diskriminiert. Das jeweils dritte Bild zeigt die lebenden Zellen, die sich in R1 und außerdem nicht in R2 befinden. Fluoreszenz 1 zeigt die Expression von CD14 und Fluoreszenz 2 die Expression von CD45. Die Monozyten befinden sich im oberen rechten Quadranten des Punktdiagramms. *FACS-Kontrolle nach Einsatz des monocyte isolation kit (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) mit starker Granulozytenverunreinigung.*

- Erst nach Anwendung des Monocyte Isolation Kit *und* zusätzlicher Inkubation mit 20 µl CD15 MicroBeads / 10^7 Zellen (beide Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) wurden Reinheiten der Monozytenfraktion zwischen 87 und 96 % mit deutlich weniger Kontamination durch Granulozyten (CD15 MicroBeads depletieren u.a. Granulozyten) gesehen, die nur noch zwischen zwei und sieben Prozent lagen (siehe Abb. 18):

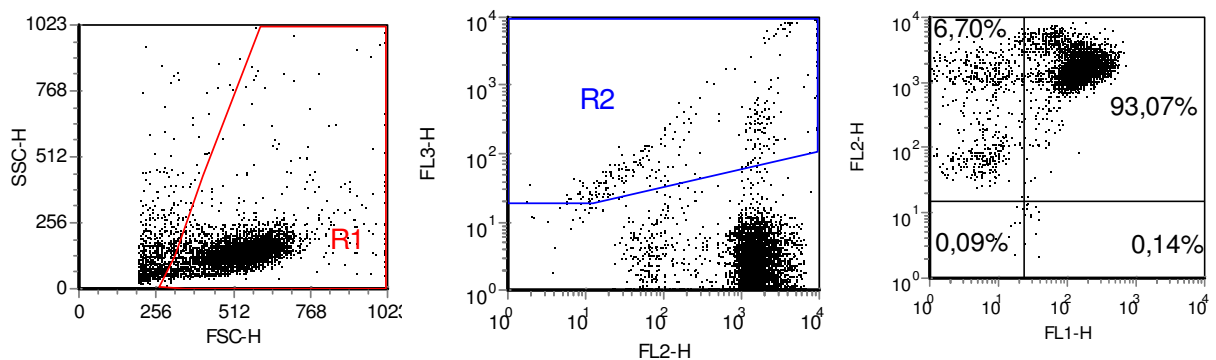


Abb. 18: Durchflußzytometrische Analyse von Monozyten am FACS® II

FACS-Kontrolle nach Einsatz des monocyte isolation kit sowie zusätzlicher Markierung mit CD15 MicroBeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) und minimierter Leukozytenverunreinigung

Diese Ergebnisse hatten zur Folge, dass für die Monozytengewinnung aus peripherem Blut zum einen nur noch die Kombination des Monocyte Isolation Kits *mit* den CD15 MicroBeads verwendet wurde. Außerdem wurden isolierte Zellen, deren Reinheit 85 % bezüglich der Monozytenfraktion unterschritten, nicht für die der mRNA-Präparation und der sich daran anschließenden PCR weiterverwendet.

3.3. Quantität und Qualität der mRNA-Präparation

Neben der Ermittlung der Konzentration der Proben an mRNA nach der Präparation, entschied die photometrische Analyse auch über die Weiterverwendung für die nachfolgende PCR am LightCycler[®].

Von 35 Sjögren-Proben, die sich zur mRNA-Präparation laut FACS-Analyse eigneten, waren 29 Proben zur Weiterbearbeitung am LightCycler[®] zu verwerten. Die Proben wiesen einen Gehalt an mRNA zwischen 1,6 und 10,4 ng/μl auf. Die mRNA lag in jeweils 72 bis 92 μl Elutionspuffer vor. Von den 21 Kontrollproben (fünf verschiedene Spender), die sich zur mRNA-Präparation laut FACS-Analyse eigneten, waren 17 Proben zur Weiterbearbeitung am LightCycler[®] zu verwerten. Die Proben wiesen einen Gehalt an mRNA zwischen 2,0 und 10,4 ng/μl auf und lagen ebenfalls in jeweils 72 bis 92 μl Elutionspuffer vor. Somit waren von anfänglich insgesamt 79 aufgearbeiteten Blutproben 46 mRNA-Proben zur Weiterbearbeitung am LightCycler[®] einsetzbar, also rund 60 Prozent. Durch Titrationen wurde die Menge der einzusetzenden mRNA festgelegt. Dabei war darauf zu achten, dass die einzusetzende Menge an mRNA möglichst gering ausfällt, da Dreifachansätze für alle Bestimmungen angestrebt wurden und im Regelfall nur recht geringe Gesamtmengen vorlagen.. Eine Menge von 20 ng mRNA erwies sich dabei als noch gut amplifizierbar und wurde deswegen standardmäßig eingesetzt.

3.4. Ergebnis der Polymerasekettenreaktion mittels LightCycler[®] -Technologie

Aufgrund von technischen Problemen bei der LightCycler[®]-Technologie – wie später in den Auswertungen ersichtlich sein wird (3.4.2. bis 3.4.6.) – konnten nicht alle Proben für jede Analyse (Haushaltsgen, Ro52 und TNFα) eingesetzt werden.

Die Probleme waren dahingehend charakterisiert, dass einerseits gerätetechnische Probleme vorlagen. Dies konnte anhand eines gezackelten Kurvenverlaufs festgestellt werden. Andererseits gab es Probleme bei der Amplifikation selbst, sodass keine verlässliche Auswertung der Daten möglich war.

Nur ein sigmoidaler Verlauf, wie er in Abbildung 19 gezeigt ist, stellte zusammen mit dem Kurvenverlauf der industriell gefertigten Standards und der Negativkontrolle in Form von destilliertem Wasser einen Garantien für eine fehlerfreie Analyse dar und zeigte damit auch eine sichere quantitative Aussage für die gemessenen Parameter.

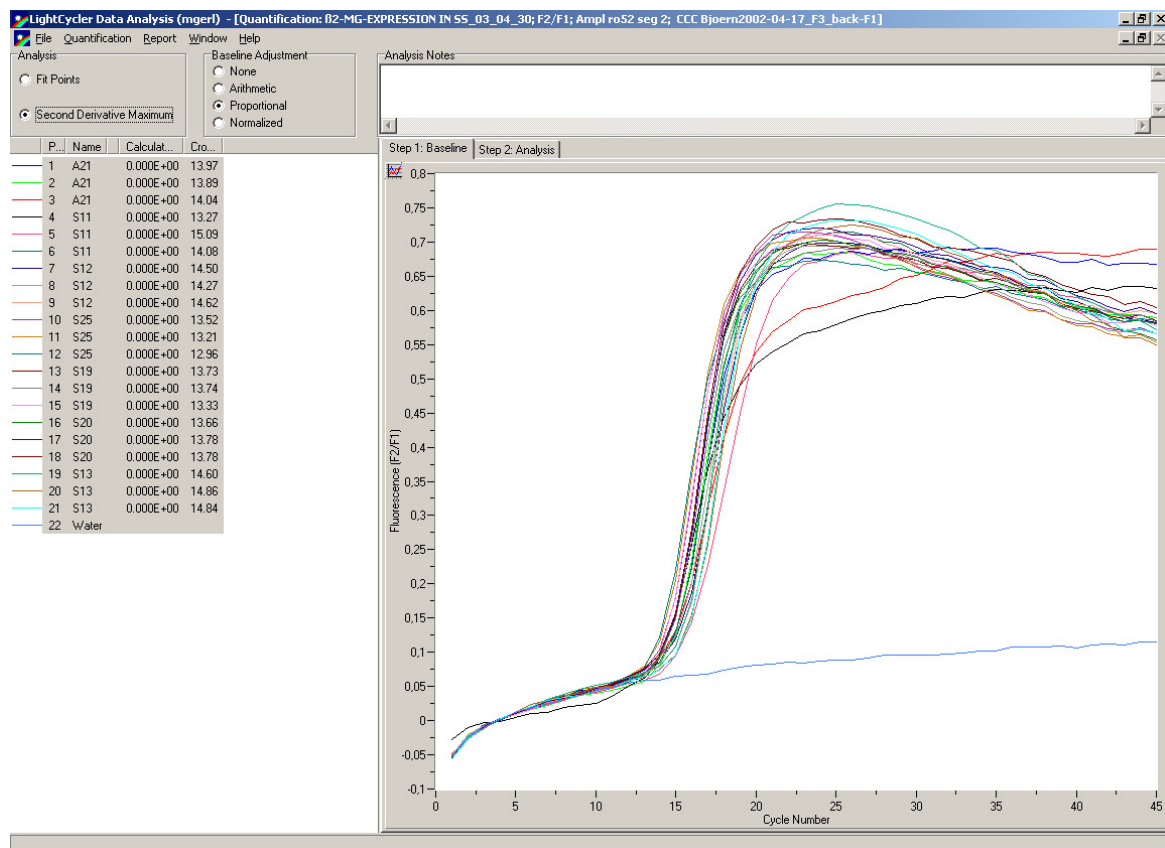


Abb. 19: Typischer sigmoidaler Kurvenverlauf, Lauf für β 2-Mikroglobulin (Haushaltsgen)

3.4.1. Analyse der Haushaltsgene

Um zu testen, ob es für alle Proben ein Haushaltsgen gibt, das nur geringste Expressionsunterschiede aufweist, wurden zunächst drei Haushaltsgene (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Beta2-Mikroglobulin) mit Hilfe der Light-Cycler[®]-Technologie an monozytärer mRNA getestet.

Dabei erwies sich einzig β 2-Mikroglobulin als geeignetes Haushaltsgen. Hier lagen die Abweichungen nur im Bereich von ca. +/- 1,5 Crossing Points. Dabei entsprechen 3,33 Crossing Points einem Faktor 10 ($\Rightarrow 2^{3,33}$, exponentielle Amplifizierung) bezüglich Gehalt bzw. Expression. Die Abweichung der Expression für das Haushaltsgen β 2-Mikroglobulin liegt also nur bei einem Faktor von ca. +/- 2,8 ($\Rightarrow 2^{1,5}$). Diese Konstanz stellt letztlich auch einen Beleg für eine saubere methodische Arbeit dar. Das bedeutet, dass immer mit einer konstant gleichbleibenden mRNA-Konzentration gearbeitet wurde.

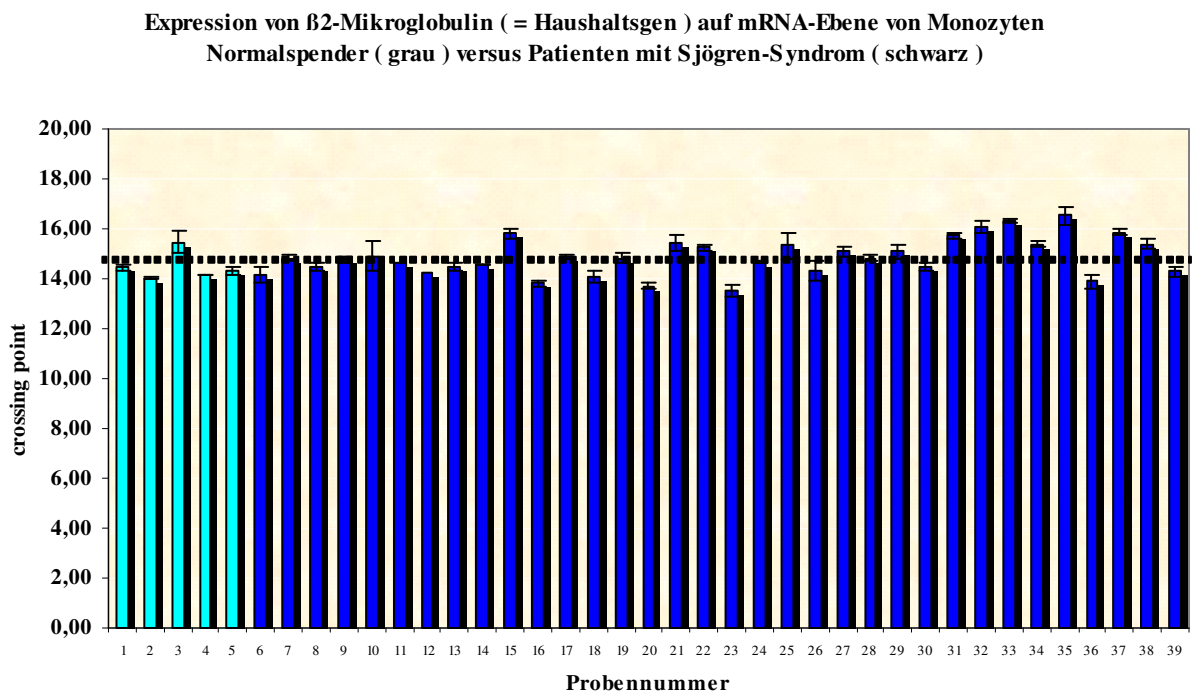


Abb. 20: Mittelwerte und Standardabweichungen der Läufe für β 2-Mikroglobulin; Normalspender grau, Spender mit primärem Sjögren-Syndrom schwarz; Mittelwert aller als gepunktete Linie

3.4.2. Auswertung der PCR für die Bestimmung der Expression von monozytärer Ro52- und TNF α -mRNA

Es kann bei jeder neuen Messung geringe Schwankungen bezüglich der Amplifikation geben, die einerseits technisch bedingt sind und andererseits auf minimale Unterschiede bei der Zusammenstellung der Reaktionsansätze zurückzuführen sind.

Zur genaueren Analyse der Expressionsniveaus für Ro52 wurden deswegen fünf Dreifachansätze von fünf unterschiedlichen Normal Spendern gemittelt. Für TNF α waren es ebenfalls fünf verschiedene Normal Spender (jeweils Dreifachansätze).

3.4.3. Expression von Ro52-mRNA in Monozyten von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom

In Monozyten von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom zeigte sich im Mittel ein höheres Expressionsniveau von Ro52-mRNA als in den Monozyten der Normal Spender. Das bedeutet, dass der sigmoidale Kurvenverlauf früher sichtbar wird und die entsprechenden Crossing Points einen kleineren Wert annehmen. Dies war bei 14 der 28 Patientenproben der Fall. Sieben dieser Proben wiesen eine bis zu zehnfach erhöhte Expression auf, weitere sechs Proben eine bis zu 47-fach erhöhte und eine Probe sogar eine 129-fach erhöhte Expression (Probe 6).

Darüberhinaus gibt es 14 Proben von Patienten mit Sjögren-Syndrom, die im gleichen Niveau wie die Normal Spender lagen (gepunkteter Bereich, Standardabweichung von fünf Dreifachansätzen unterschiedlicher Normal Spender).

Im Mittel zeigten die Proben von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom eine ca. 11-fach höhere Expression für Ro52-mRNA gegenüber dem Mittel der Normal Spender (siehe Abb.21).

Die Unterschiede sind jedoch nicht von statistischer Signifikanz (Mann-Whitney-nichtparametrischer Test: $p = 0,078$; $n = 29$ [24 Sjögren-Patienten, 5 Normal Spender]).

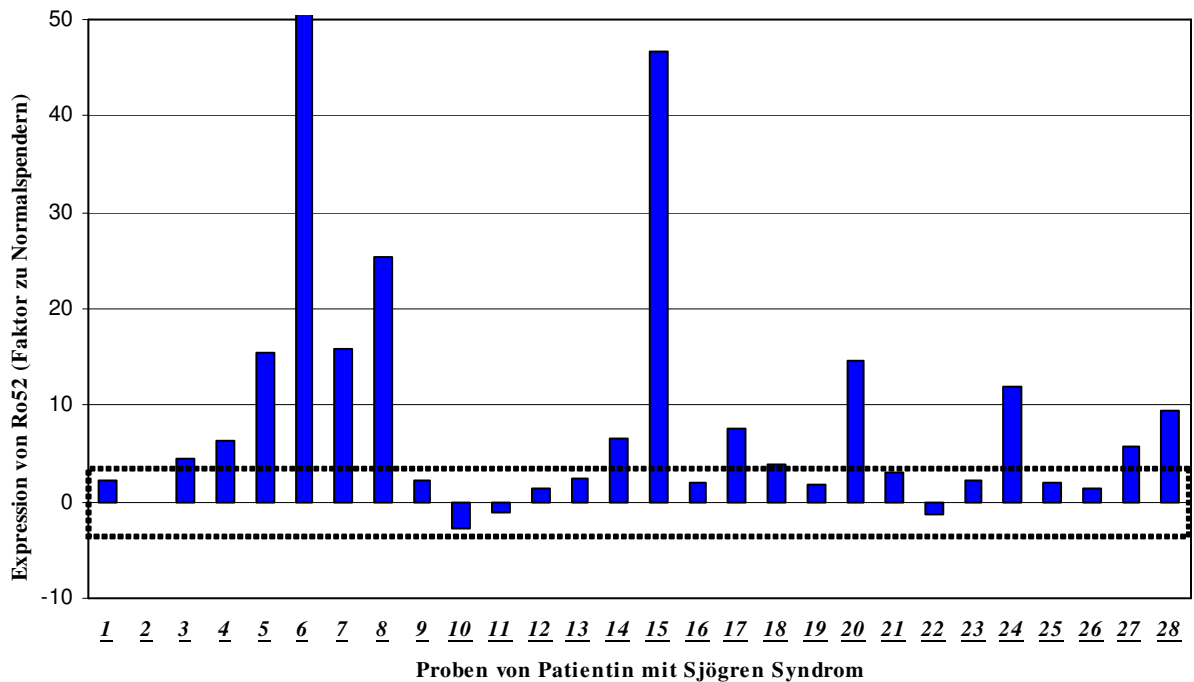


Abb. 21: Ro52-Expression auf mRNA-Ebene von Monozyten von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom; dargestellt ist der Faktor im Verhältnis zum Mittelwert der Normalspender; der gepunktete Bereich kennzeichnet die zweifache Standardabweichung zum Mittelwert der Normalspender

3.4.4. Expression von Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α) in Monozyten von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom

In Monozyten von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom zeigte sich im Mittel ein niedrigeres Expressionsniveau von TNF α -mRNA als in den Monozyten der Normalspender. Hier wurde der sigmoidale Kurvenverlauf entsprechend später sichtbar und die Crossing Points nahmen im Mittel einen größeren Wert. Dies betrifft mit 11 der 32 Patientenproben etwa 34 %. Fünf Proben (siehe Abb. 22) wiesen eine bis zu siebenfach erniedrigte Expression auf; weitere sechs Proben eine bis zu 36-fach erniedrigte und eine Probe eine etwa 64-fach erniedrigte TNF α -mRNA-Expression. Darüberhinaus gibt es 16 Proben (50%) von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom, die im gleichen Niveau wie die Normalspender liegen (gepunkteter Bereich, zweifache Standardabweichung von fünf Dreifachansätzen der

Normalspender). Bei nur einer Patientenprobe war die Expression von TNF α leicht erhöht gegenüber dem Mittel der Normalspender (3%).

Damit zeigten die Proben von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom im Mittel eine ca. achtfach niedrigere Expression von TNF α -mRNA gegenüber dem Mittel der Normalspender. Die Unterschiede sind jedoch nicht von statistischer Signifikanz (Mann-Whitney-nichtparametrischer Test: $p = 0,078$; $n = 29$ [24 Sjögren-Patienten, 5 Normalspender]).

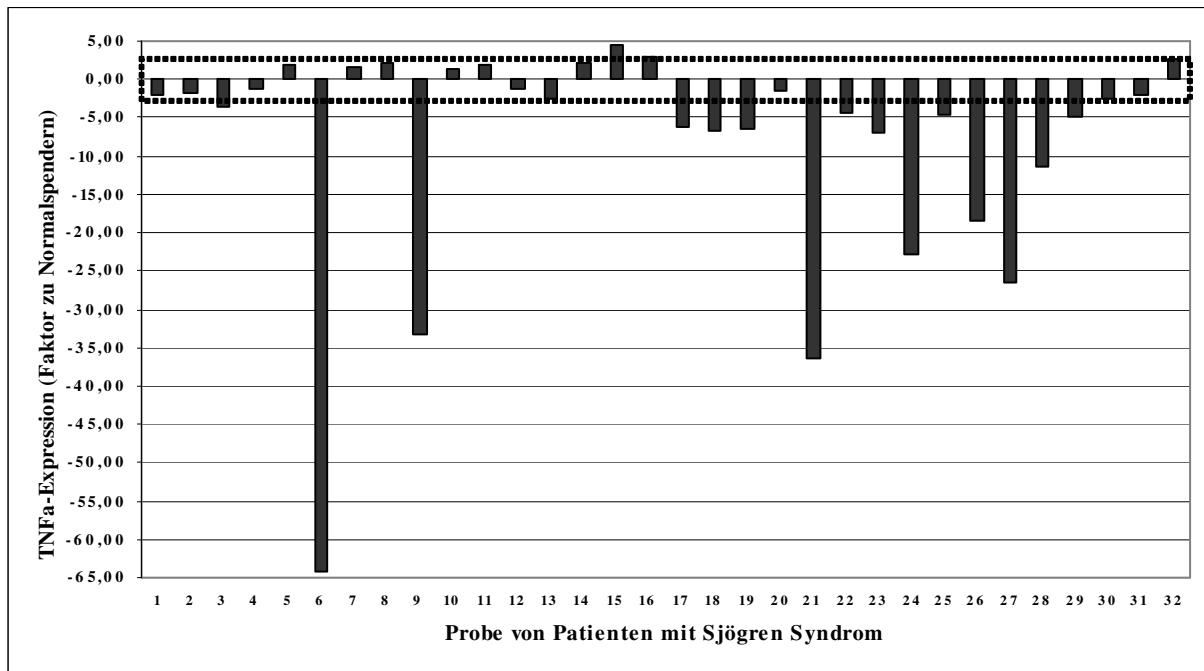


Abb. 22: TNF α -Expression auf mRNA-Ebene von Monozyten von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom; dargestellt ist der Faktor im Verhältnis zum Mittelwert der Normalspender der gepunktete Bereich kennzeichnet die zweifache Standardabweichung zum Mittelwert der Normalspender

3.4.5. Vergleich des Expressionsverhaltens von Ro52 zu TNF α

Die Gegenüberstellung der Expressionsniveaus von Ro52- und TNF α -mRNA von Monozyten von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom zeigt Tabelle 10:

Tab. 10: Gegenüberstellung der Expressionsniveaus von Ro52- und TNF α -mRNA von Monozyten von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom

^a Veränderung vorliegend, wenn sich der Faktor zum Mittelwert der Normalspender um mehr als 2 Standardabweichungen unterscheidet

Probe	Ro52-mRNA (Faktor zu Mittelwert der Normalspender)	Veränderung ^a zum Mittelwert der Normalspender	TNF α -mRNA (Faktor zu Mittelwert der Normalspender)	Veränderung ^a zum Mittelwert der Normalspender
S17	6,3	↑	2,0	→
S21	15,3	↑	-33,1	↓
S22	129,3	↑	1,4	→
S24	15,8	↑	-1,2	→
S25	25,5	↑	-2,6	→
S30	2,3	→	2,1	→
S31	-2,7	→	4,4	↑
S32	-1,2	→	2,9	→
S33	1,4	→	-6,2	↓
S34	2,5	→	-6,8	↓
S35	6,6	↑	-6,4	↓
S36	46,6	↑	-1,4	→
S37	1,9	→	-36,4	↓
S38	7,6	↑	-4,4	↓
S39	3,9	↑	-7,0	↓
S40	1,7	→	-22,8	↓
S41	14,7	↑	-4,6	↓
S42	3,2	→	-18,4	↓
S43	-1,3	→	-26,4	↓
S44	2,3	→	-11,4	↓
S46	11,9	↑	-4,8	↓
S47	2,1	→	-2,6	→
S48	1,4	→	-1,9	→
S49	5,7	↑	2,7	→

- Ist Ro52 erhöht (12 von 24), dann ist in keiner der Proben parallel auch TNF α erhöht. Dieses liegt entweder im Niveau der Normalspender (6 von 24) oder ist geringer exprimiert (6 von 24).
- Liegt Ro52 im Bereich der Normalspender (12 von 24), dann ist TNF α in nur einer der Proben parallel erhöht und zumeist erniedrigt (7 von 24) oder liegt im Niveau der Normalspender (4 von 24).

Es besteht keine signifikante Korrelation zwischen der Expression der Ro52-mRNA und TNF α -mRNA in Monozyten (Spearman-Regressionsanalyse: $r_s=0,04$; $p=0,08$; $n=28$).

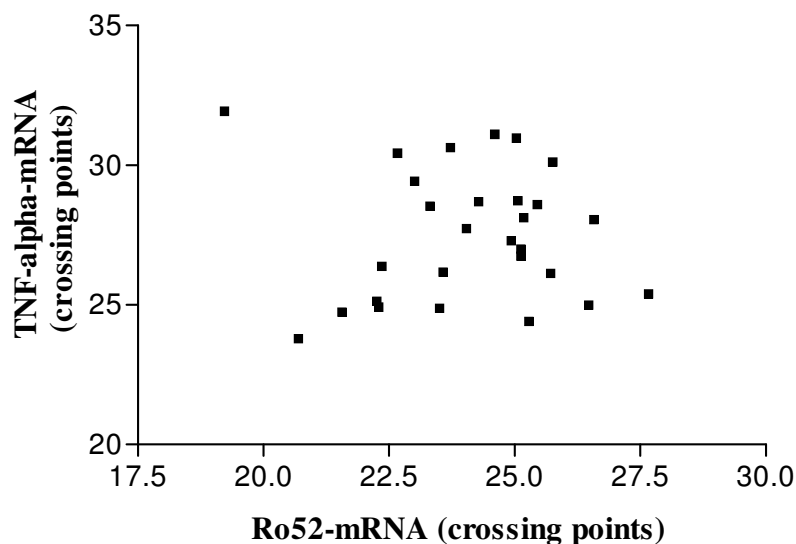


Abb. 23: Crossing points Ro52-mRNA versus TNF α -mRNA

3.5. Ergebnis der immunometrischen Assays – Blutplasmaanalyse der Zytokine

Zur Analyse der Plasmakonzentrationen von Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α) sowie der Interleukine IL-1 beta, IL-6, IL-8 und IL-10 von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom, wurden 16 Plasmaproben eingesetzt. Zwei der Proben waren Kontrollspendern aus der Arbeitsgruppe (Proben 1 und 2) zuzuordnen; 14 Proben Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom. Zu beachten war, dass alle Proben – aufgrund der Gewinnung im Rahmen der Ficollaufreinigung - 1:2 mit PBS verdünnt zur Analyse vorlagen.

Tab. 11: TNF α -Konzentration im Plasma von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom und Normalspendern (Proben 1 und 2); Werte in pg/ml, Seren 1:2 mit PBS verdünnt

Probe	TNF α	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-10
1	258	< 5	< 2	< 5	< 5
2	659	< 5	< 2	< 5	< 5
3	> 1000	< 5	< 2	< 5	< 5
4	> 1000	< 5	2,5	< 5	< 5
5	> 1000	< 5	< 2	< 5	< 5
6	> 1000	< 5	< 2	< 5	< 5
7	> 1000	< 5	3,2	< 5	< 5
8	> 1000	< 5	< 2	< 5	< 5
9	4,5	< 5	< 2	< 5	< 5
10	> 1000	< 5	< 2	< 5	< 5
11	4,3	< 5	< 2	< 5	< 5
12	524	< 5	< 2	< 5	< 5
13	889	< 5	< 2	< 5	< 5
14	4,7	< 5	< 2	< 5	< 5
15	754	< 5	< 2	< 5	< 5
16	> 1000	< 5	< 2	< 5	< 5

Die Analyse für die Plasmakonzentration von TNF α zeigte in rund 2/3 der Fälle (9 von 14) Werte zwischen 889 pg/ml und mehr als 1000 pg/ml (> 2x Standardfehler). Drei der 14 Patientenproben (21%) wiesen dagegen nur sehr geringe Konzentrationen zwischen 4,3 und 4,7 pg/ml für TNF α auf (< 2x Standardfehler). Die restlichen vier Proben, darunter beide Proben aus der Kontrollgruppe, lagen mit Konzentrationen zwischen 258 und 754 pg/ml für TNF α in einem mittleren Konzentrationsbereich (innerhalb des zweifachen Standardfehlers). Die Plasmakonzentrationen der Interleukine lagen zumeist unterhalb des jeweiligen Detektionsniveaus. Nur in zwei Proben (Proben 4 und 7) waren geringste Konzentrationen von IL-6 nachzuweisen (siehe Tab.11).

3.6. Vergleich des Expressionsverhaltens von TNF α auf mRNA-Ebene von Monozyten zur TNF α -Konzentration im Blutplasma

Da zwei der Proben nicht zur LightCycler-Auswertung zur Verfügung standen (siehe Auswahlkriterien unter Material und Methoden), kann nur zu 14 Proben - darunter zwei Normal Spendern – eine Aussage getroffen werden (Tabelle 12):

- Beide *Normalspender* zeigten eine durchschnittliche Konzentration von TNF α im Plasma und eine mittlere Expression von TNF α -mRNA auf Monozytenebene.
- 3 der 12 *Patientenproben* zeigten eine verminderte Konzentration von TNF α im Plasma und gleichzeitig eine verminderte Expression von monozytärer TNF α -mRNA.
- Zwei der 12 *Patientenproben* zeigten eine mittlere Konzentration von TNF α im Plasma und dazu eine verminderte Expression von monozytärer TNF α -mRNA.
- 7 der 12 *Patientenproben* zeigten eine erhöhte Konzentration von TNF α im Plasma. Dabei zeigte eine dieser sechs Proben eine erhöhte Expression von TNF α -mRNA, drei eine verminderte und zwei eine mittlere Expression von TNF α -mRNA.

Tab. 12: Gegenüberstellung der Plasmakonzentrationen von TNF α und der Expression von TNF α auf mRNA-Ebene von Monozyten bei Patienten mit Sjögren S. (n=12) und zwei Normal Spendern

^a Veränderung vorliegend, wenn sich die Konzentration zum Mittelwert der Normalspender um mehr als 2x Standardfehler unterscheidet

^b Veränderung vorliegend, wenn sich der Faktor zum Mittelwert der Normalspender um mehr als 2 Standardabweichungen unterscheidet

Probe	TNF α im Plasma (pg/ ml)	TNF α im Plasma (Veränderung ^a zum Mittelwert der Normalspender)	TNF α -mRNA in Monozyten (Faktor zum Mittelwert der Normalspender)	Veränderung ^b zum Mittelwert der Normalspender
Normalspender 1	258	→	1,45	→
Normalspender 2	659	→	-2,1	→
S30	> 1000	↑	2,1	→
S31	> 1000	↑	4,4	↑

Probe	TNF α im Plasma (pg/ ml)	TNF α im Plasma (Veränderung ^a zum Mittelwert der Normalspender)	TNF α -mRNA in Monozyten (Faktor zum Mittelwert der Normalspender)	Veränderung ^b zum Mittelwert der Normalspender
S32	> 1000	↑	2,9	→
S33	> 1000	↑	-6,2	↓
S34	4,3	↓	-6,8	↓
S35	> 1000	↑	-6,4	↓
S36	4,3	↓	-1,4	→
S37	524	→	-36,4	↓
S38	889	↑	-4,4	↓
S39	4,7	↓	-7,0	↓
S40	754	→	-22,8	↓
S41	> 1000	↑	-4,6	↓

3.7. Ergebnis der Polymorphismusanalyse im TNF α -Promotor-Bereich auf DNA-Ebene

Zur Analyse, ob im TNF α -Promotor-Bereich von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom Polymorphismen vorliegen (siehe Material und Methoden 2.9.), wurden insgesamt 14 DNA-Proben getestet.

Zwei der DNA-Proben (siehe Tab. 13, Probe 1 und Probe 3, blaue Schrift) waren dabei Spendern aus der Kontrollgruppe zuzuordnen und 12 DNA-Proben Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom.

Die Proben 13 und 14 stammten vom gleichen Spender mit primärem Sjögren-Syndrom, jedoch aus zwei verschiedenen DNA-Aufreinigungen. Hier handelte es sich um eine Positivkontrolle (Tab. 13).

Tab. 13: Ergebnis der Polymorphismusanalyse im TNF α -Promotor-Bereich auf DNA-Ebene bei Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom (n= 11) und zwei gesunden Probanden

Probennummer	Position - 238	Position- 308
<i>1 = NS</i>	<i>G/A</i>	<i>G/G</i>
<i>2 = NS</i>	<i>G/G</i>	<i>G/G</i>
3	G/G	G/A
4	G/G	G/A
5	G/G	G/G
6	G/G	G/A
7	G/G	G/A
8	G/G	G/A
9	G/G	G/G
10	G/G	A/A
11	G/G	G/A
12	G/G	G/A
13 = 14	G/G	G/A

Abbildung 24 zeigt das typische Bild bei Vorliegen eines Polymorphismus an Position 126 (im Chromatogramm), der Position –308 der Promotorregion im TNF α -Gen entsprechend und trägt die Bezeichnung N für nicht eindeutig zuordnungsfähige Basen. Anhand der Farben und anhand der Amplitude ist ablesbar, dass hier anstatt Guanin/ Guanin die heterozygote Kombination Guanin/ Adenin vorliegt – also der gesuchte Polymorphismus (exemplarisch für Probe 6 aus Tabelle 13, markiert durch Pfeil von unten in der Abbildung).

Dabei zeigte sich, dass an Position –238 keine der Proben aus der Patientengruppe eine Abweichung von der homozygoten Basenkonfiguration Guanin/Guanin aufwies. Dagegen zeigte die Probe von Spender 1, welcher der Kontrollgruppe angehörte, das Vorliegen eines Polymorphismus mit der heterozygoten Konfiguration Guanin/Adenin.

Anders sah dagegen die Situation an Position –308 aus. Hier gab es bei neun von elf Spendern eine Abweichung von der Basenkonfiguration Guanin/Guanin: Acht Spender zeigten an dieser Position die heterozygote Variante Guanin/Adenin und ein Spender die homozygote

Variante Adenin/Adenin. Die beiden Spender aus der Kontrollgruppe und zwei der elf Spender aus der Patientengruppe wiesen dagegen die homozygote Form Guanin/Guanin auf. Probe 14 zeigte sich identisch in Bezug auf das Ergebnis der Basenanalyse für Probe 13. Damit wurde die korrekte Ergebnisfindung der Polymorphismusanalyse gestützt (siehe Tabelle 13).

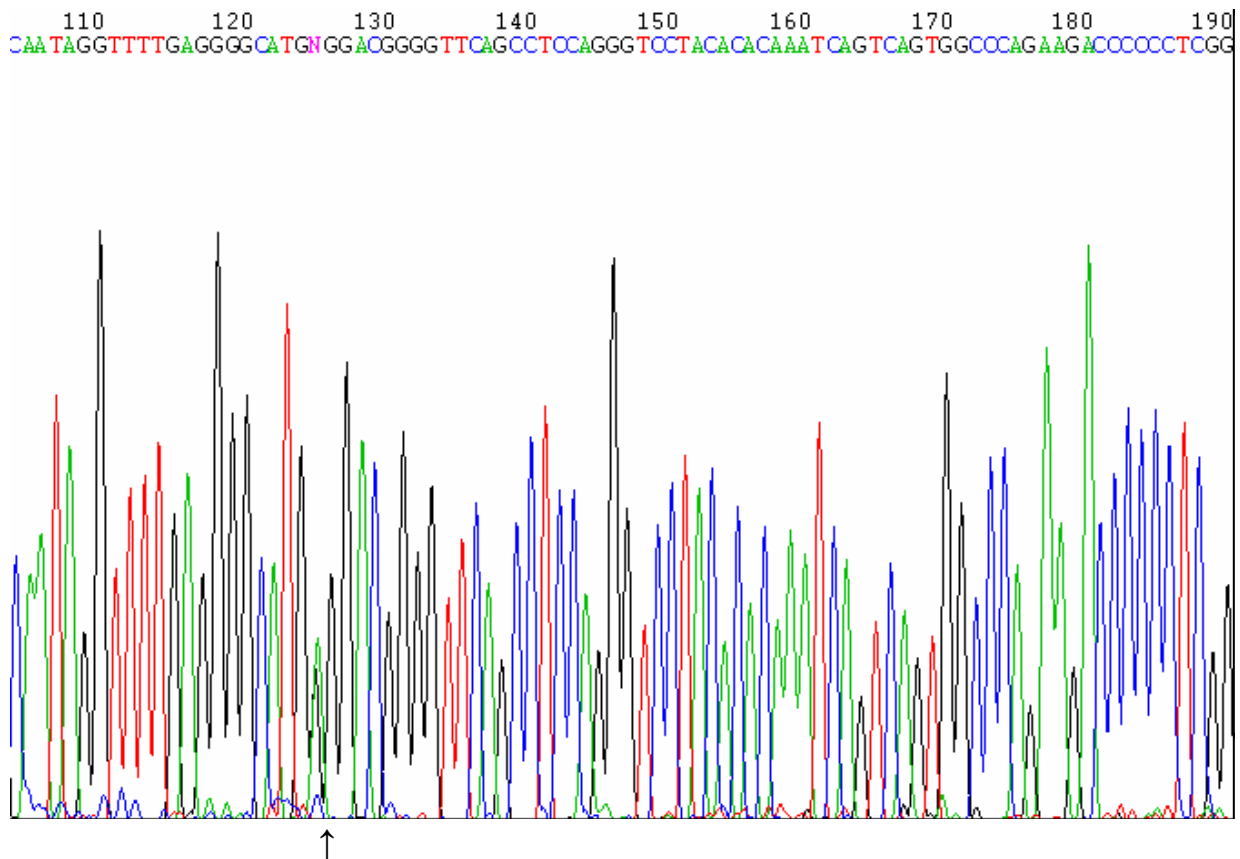


Abb. 24: Typisches Chromatogramm bei Vorliegen eines Polymorphismus (Chromas 2,24)

3.8. Vergleich des Expressionsverhaltens monozytärer TNF α -mRNA und dem Vorliegen eines Polymorphismus im TNF α -Promotorbereich der DNA

Zu dieser Betrachtung konnten insgesamt 10 der 14 Proben – darunter zwei Normalspender - der Polymorphismusanalyse (siehe 3.7.) herangezogen werden (Tab 14).

Tab. 14: Expressionsverhalten monozytärer TNF α -mRNA versus Vorliegen eines Polymorphismus im TNF α -Promotorbereich der DNA

^a Veränderung vorliegend, wenn sich der Faktor zum Mittelwert der Normalspender um mehr als 2 Standardabweichungen unterscheidet

Probe	TNF α -Expression (Faktor zum Mittelwert der Normalspender)	Veränderung ^a zum Mittelwert der Normalspender	Polymorphismus (-308)
Normalspender 1	1,45	→	Nein
Normalspender 2	-2,1	→	Nein
S42	-18,4	↓	Ja
S43	-26,4	↓	Ja
S44	-11,4	↓	Nein
S45	-4,8	↓	Ja
S46	-4,5	↓	Ja
S47	-2,6	→	Ja
S48	-1,9	→	Nein
S49	2,6	→	Ja

Für die Daten der Tabelle 14 können zusammenfassend folgende Aussagen getroffen werden:

- Beide Normalspender weisen keinen Polymorphismus an Position –308 auf und haben eine mittlere Expression von monozytärer TNF α -mRNA.
- Von sechs Patientenproben, die den Polymorphismus an Position –308 besitzen, zeigen vier Proben eine erniedrigte und zwei Proben eine mittlere Expression monozytärer TNF α -mRNA.
- Zwei Patienten, die den Polymorphismus nicht besitzen, weisen je eine mittlere und eine erniedrigte Expression monozytärer TNF α -mRNA auf.

4. Diskussion

Das Sjögren Syndrom ist eine Autoimmunerkrankung mit Manifestationen, die vor allem die Speichel- und Tränendrüsen betreffen und durch Mund- und Augentrockenheit charakterisiert ist. Bei 50 bis 90% der Patienten mit Sjögren-Syndrom können Autoantikörper gegen Ro/SSA-Proteine im Serum nachgewiesen werden. Die Rolle der Autoantikörper für die Pathogenese des Sjögren-Syndroms ist noch nicht eindeutig bewiesen. Allerdings kann man beobachten, dass das Auftreten dieser Autoantikörper mit der Häufigkeit der extraglandulären Manifestationen beim Sjögren-Syndrom korreliert [138]. Als Teil der histopathologischen Entwicklung des Sjögren-Syndroms kann die Bildung von Lymphozyten-Ansammlungen um die intralobulären Ducti und in den umgebenden Drüsenepithelien der kleinen Speicheldrüsen angesehen werden, die oft bereits auftritt, bevor eine Involvierung der großen Speicheldrüsen beobachtet werden kann [139]. Bei den infiltrierenden Lymphozyten handelt es sich hauptsächlich um T-Zellen. Es treten aber auch B-Zellen sowie IgG- und IgM- produzierende Plasmazellen gehäuft auf. Im entzündeten Speicheldrüsengewebe von Sjögren-Patienten konnten Zellen nachgewiesen werden, die Autoantikörper gegen 52 kDa-, 60 kDa-Ro/SSA und gegen La/ SSB-Antigen produzieren [140], wodurch ihnen eine potentielle Beteiligung in der autoimmunen Exokrinopathie zugeschrieben wird.

Monozyten sind Antigen-präsentierende Zellen, deren Funktion in der Aufnahme von Antigen, dessen Prozessierung und schließlich dessen Präsentation gegenüber T- und B-Zellen besteht. Damit stellen sie potentielle Mediatoren in der Aktivierung von Autoantikörper-produzierenden Zellen und damit der Produktion von Autoantikörpern dar. Zur Beteiligung von Monozyten oder Makrophagen als primäre Antigen-präsentierende Zellen in der Pathogenese des Sjögren-Syndroms gibt es bisher jedoch noch keine Studien. Daher befasste sich die vorliegende Arbeit mit der Untersuchung von Monozyten aus dem peripheren Blut von Sjögren-Patienten hinsichtlich deren möglicher Rolle für die Pathogenese des Sjögren-Syndroms.

Die vorliegenden Daten aus den durchgeführten Experimenten unterlagen einer kritischen Auswahl. Besonders die Optimierung von - teils bestehenden - Methoden führte zu einer sicheren Ergebnislage. In erster Linie sollte mit Monozyten gearbeitet werden, die aus Vollblut zu isolieren waren. Deswegen stand deren Reinheit im Mittelpunkt. Bereits leichte Verunreinigungen hätten die Ergebnisse stark verfälschen können und in ihrer Aussagekraft geschmälert. Nur minimale Reinheitsdefizite wurden geduldet.

4.1. Bedeutung der Ro52-Expression in Monozyten beim Sjögren-Syndrom

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Monozyten von Normalspendern sowie Patienten mit Sjögren-Syndrom Ro52-mRNA exprimieren. Die bei Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom im Mittel um Faktor 11 erhöhte und nur bei einem einzigen Spender leicht verminderte Ro52-mRNA-Expression der Monozyten deuten darauf hin, dass die Expression von Ro52 und die entsprechende Antikörperantwort beim primären Sjögren-Syndrom in Verbindung zum Monozyten-Makrophagen-System stehen könnte. Es kann zusätzlich angenommen werden, dass diese ohnehin stark erhöhte Expression (jeweils Einsatz von 20ng mRNA zur Analyse) bei Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom in vivo aufgrund einer veränderten Monozytenzahl noch größere Gesamtmengen zur Folge hat, als dies durch die stark erhöhte Expression angezeigt wird. Derartig verändert exprimierende Monozyten im Blut von Patienten mit rheumatischen Erkrankungen werden durch die Literatur beschrieben [16, 141] und konnten auch während der Isolierung dieser Zellen beobachtet werden. Ferner ließ die erfolgreiche Behandlung der rheumatoiden Arthritis (RA) mit TNF-Blockern eine Änderung des pathologischen Expressionsmusters der Blutmonozyten hin zum Muster von Normalspendern erkennen [141].

Obwohl in Monozyten von Sjögren-Patienten eine tendenziell höhere Expression von Ro52-mRNA beobachtet werden konnte als in Normalspendern, bestand für diesen Zusammenhang keine statistische Signifikanz ($p=0.07$). Dies ist durch eine zu kleine Gruppe von getesteten Normalspendern ($n=5$) zu erklären. Die erhöhte Expression der Ro52-mRNA in Monozyten von Sjögren-Patienten könnte eine erhöhte Expression des 52 kDa Ro/SSA-Proteins sowie eine intrazelluläre Lokalisationsänderung des Proteins zur Folge haben. So könnte das Ro52-Autoantigen auf die Oberfläche der Monozyten gelangen und dort für das Immunsystem sichtbar werden. Als Konsequenz einer Oberflächenexpression des Ro/SS-A-Antigens würde eine Immunreaktion ausgelöst werden, die eine Produktion von krankheitsassoziierten Autoantikörpern gegen Ro52 zur Folge haben könnte. Monozyten würden demnach durch die verstärkte Expression und Präsentation von nukleärem Ro52- Autoantigen zur Entstehung der Autoimmunität beim Sjögren-Syndrom beitragen. Unabhängig von der Lokalisation – ob im Kern oder zytoplasmatisch – spielt das Ro/SS-A-Antigen wahrscheinlich eine Rolle in der Regulation der Genexpression [42]. Desweiteren geht man von einer lokalen Produktion der entsprechenden Autoantikörper sowie einer Beziehung zwischen lokaler und systemischer Antikörperantwort aus [71]. Diese Annahme ist zunächst rein spekulativ und muß durch entsprechende weiterführende Experimente gestützt werden. In Speicheldrüsenzellen von

Sjögren-Patienten konnte in Abhängigkeit von Apoptose eine Relokalisation verschiedener nukleärer Autoantigene, darunter Ro/SSA aber auch La/SSB, vom Zellkern zur Plasmamembran hin beobachtet werden. Man vermutet, dass dies einen Mechanismus für die Induktion von Autoantikörpern darstellt [91]. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Epithelzellen des Speicheldrüsengewebes von Sjögren-Patienten als potentielle sogenannte „nicht-professionelle“ Antigen-präsentierende Zellen fungieren können, da sie neben HLA-DR verschiedene kostimulatorische Moleküle exprimieren, wie z.B. CD80 und CD86, und auch die Fähigkeit zur Aktivierung von allogenen Lymphozyten *in vitro* besitzen [142]. Eine Hochregulation und Relokalisation von nukleären Autoantigenen auf der Ebene der Monozyten im peripheren Blut könnte einen systemischen Mechanismus zur Autoantikörper-Produktion repräsentieren, der unabhängig vom beteiligten Gewebe beim Sjögren-Syndrom abläuft. Da eine Autoantigen-Relokalisation im Speicheldrüsengewebe von Sjögren-Patienten mit dem Prozeß der in diesem Gewebe auftretenden Apoptose der Zellen auftritt, könnte eine Präsentation von Autoantigenen im Gewebe als sekundäre Reaktion angesehen werden. Dies könnte bei einer Anwesenheit von bereits vorhandenen Autoantikörpern (die durch Autoantigen-Präsentation durch Monozyten im peripheren Blut induziert wurden) zum Zelltod z.B. durch die Induktion von ADCC (antibody-dependent-cell-cytotoxicity) im Gewebe führen.

Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wie dem photosensitiven SLE konnten Erhöhungen der Transkription von Ro52-mRNA sowie eine Erhöhung der Proteinexpression und eine Translokation des Autoantigens auf die Plasmamembran von UVB bestrahlten Keratinocyten und dadurch der Zelltod durch ADCC induziert werden. Dies wird als möglicher Pathomechanismus der bei SLE-Patienten beobachteten Hautmanifestationen, die mit Anti-Ro/SSA-Antikörpern assoziiert sind, diskutiert [143]. Desweiteren zeigte eine Arbeit unserer Gruppe, dass eine *in vitro* Behandlung mit TNF α eine zeitabhängige transiente Hochregulation der Ro52-mRNA-Expression in Keratinocyten von gesunden Spendern bewirkt. [130].

Ob eine Erhöhung von Ro52 auf mRNA-Ebene in Monozyten von Sjögren-Patienten eine erhöhte intrazelluläre Proteinexpression sowie die Expression des Ro52-Antigens auf der Zelloberfläche der Monozyten zur Folge hat, und damit einen pathogenetischen Wert für die Entwicklung des Sjögren-Syndroms besitzt, müsste jedoch noch untersucht werden. Durch *in vitro* Kulturen könnte außerdem geklärt werden, ob Monozyten von Sjögren-Patienten und Normalspendern eine Ro52-abhängige T- oder B-Zell aktivierende Fähigkeit besitzen.

4.2. Relevanz der TNF α -Expression beim Sjögren-Syndrom

Obwohl die Mechanismen, die der Pathophysiologie des primären Sjögren-Syndroms zugrunde liegen, noch nicht vollständig bekannt sind, gibt es Hinweise darauf, dass das Zytokin TNF- α einen wichtigen Mediator in der Autoimmunantwort darstellt und auch wesentlich für die Zerstörung von Speicheldrüsen- und Tränendrüsen Gewebe verantwortlich ist [144, 145]. Verschiedene Studien zeigten, dass Speicheldrüsenzellen von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom eine erhöhte Expression von TNF α -mRNA aufweisen [144, 146]. Aber auch im peripheren Blut von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom ist ein vermehrtes Auftreten von TNF α produzierenden Zellen beobachtet worden [147]. Ergebnisse einer Studie aus dem Jahre 2001 zeigen außerdem, dass sich TNF α -Inhibitoren positiv auf die Symptomatik des Sjögren-Syndroms auswirken können [8]. Da bekannt ist, dass Monozyten bzw. Makrophagen die wichtigsten TNF α -Produzenten sind [99, 100], kam der Expressionsuntersuchung der TNF- α -mRNA von Monozyten eine besondere Bedeutung bei. Als Ergebnis der PCR mittels LightCycler[®]-Technologie zeigte sich, dass die TNF α -mRNA von Monozyten im Vergleich zu der Gruppe der Normalspender geringer exprimiert ist (durchschnittlicher Faktor im Vergleich zum Mittelwert der Normalspender: -8). Dennoch ist anzunehmen, dass TNF α eine besondere Bedeutung in der Pathogenese des Sjögren-Syndroms zukommt, da die Proben der Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom eine mehrheitlich erhöhte Plasmakonzentration dieses Zytokins aufweisen als es bei den Normalspendern der Fall ist. Es konnte jedoch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der monozytären TNF α -mRNA-Expression und der TNF α -Konzentration im Blutplasma von Sjögren-Patienten festgestellt werden. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der TNF α Proteinexpression in den Monozyten von Sjögren-Patienten und erhöhten Zytokin-Plasmaspiegeln müsste noch untersucht werden. Hier könnte man spekulieren, dass eventuell nicht die Monozyten für die hohen TNF α -Plasmaspiegel bei Sjögren-Patienten verantwortlich sind, sondern vielmehr andere Zellen als TNF α -Produzenten in Frage kommen und so zur erhöhten Plasmakonzentration führen. Entsprechende TNF α -Produzenten könnten Lymphozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Neutrophile oder Mastzellen sein [99, 100]. Diese Zellen sind im Normalfall auch als Produzenten von TNF α bekannt, wenn auch nicht in der Dimension wie es für Monozyten typisch ist. Monozyten von SLE-Patienten zeigen in vivo nach entsprechender Stimulation eine geringere Sekretion von TNF α als

normale Monozyten [148]. Sie zeigen eine immunregulatorische Störung. Dies könnte auch beim Sjögren-Syndrom der Fall sein.

Als weitere Erklärung für einen fehlenden Zusammenhang zwischen der TNF α -mRNA-Expression in Monozyten und erhöhten TNF α -Plasmaspiegeln könnte man anführen, dass hier verschiedene Patientenproben zum beliebigen Zeitpunkt ihrer Erkrankung untersucht wurden. In diesen unterschiedlichen Stadien der Erkrankung könnten Feedback-Reaktionen eine Rolle spielen, die sowohl eine Hoch- als auch eine Downregulation der TNF α -Expression erklären würden. So wäre es z.B. möglich, dass erhöhte Zytokin-Plasmaspiegel zu einem negativen Feedback der TNF α -mRNA-Expression auf monozytärer Ebene führen.

Die in dieser Arbeit erbrachten Beobachtungen im Blut von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom stehen im Einklang mit Ergebnissen, die in SLE-Mausmodellen gefunden wurden. Dort wurde gezeigt, dass die Makrophagen dieser Mäuse einen Defekt in der Zytokinproduktion besitzen. Dieser Defekt wird durch apoptotische Zellen getriggert. Antigene von apoptotischen Zellen werden allgemein als Angriffsziel für Autoantikörper angesehen. Dadurch könnten apoptotische Zellen einen Defekt der Zytokinexpression induzieren und damit das Gleichgewicht zwischen Toleranz und Immunität beeinflussen [149]. Man könnte deswegen annehmen, dass die Monozyten von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom mit Autoantigen-haltigem apoptotischen Material in Kontakt gekommen sind und deswegen eine verringerte Expression von TNF α -mRNA zeigen.

Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass beim primären Sjögren-Syndrom die Monozyten selbst die entscheidenden TNF α -Produzenten sein könnten. Eine verminderte mRNA-Expression deutet nicht unbedingt auf eine verminderte Proteinexpression hin. Die Proteinexpression von TNF α könnte in Monozyten von Sjögren-Patienten auf translationaler Ebene so reguliert werden, dass eine hohe Produktion und Freisetzung des Zytokins möglich ist. Eine genauere Untersuchung der Monozyten in Hinblick auf die intrazelluläre TNF α -Proteinexpression in Normalspendern und Sjögren-Patienten sollte in weiterführenden Experimenten angestrebt werden. Damit könnte eine Aussage über die Monozyten als verantwortliche TNF α -sezernierende Zellen beim Sjögren-Syndrom und damit die Rolle dieser Zellen für die Pathogenese getroffen werden.

4.3. Möglicher Einfluß von TNF α auf die Expression von Ro52 in Monozyten

Der Vergleich des Expressionsverhaltens von Ro52-mRNA gegenüber dem von TNF α -mRNA zeigt ein interessantes Ergebnis: Die Expressionsniveaus von TNF α sind - außer im Falle einer Probe - in ihrer mRNA-Expression erniedrigt oder liegen im Bereich der Normalspender. Die monozytäre Ro52-mRNA ist bei Sjögren-Patienten im Durchschnitt um Faktor 11 höher exprimiert und die TNF α -Spiegel im Serum sind erhöht. TNF α , das im Plasma von Sjögren-Patienten vermehrt vorliegt, könnte zu den in dieser Arbeit beobachteten erhöhten Ro52-Expressionen auf mRNA-Ebene von Monozyten führen. In diesem Zusammenhang wäre es also möglich, dass die hohen Ro52-Titer bei Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom [150, 151] als Folge einer Stimulation der Ro52-Produktion durch TNF α anzusehen sind. Obwohl die TNF α -Plasmaspiegel von Sjögren-Patienten im Mittel höher lagen als die der Normalspender, konnte bei der Gegenüberstellung der Ro52-mRNA-Expression und der TNF α -Plasmaspiegel für die einzelnen Patienten kein eindeutiger Zusammenhang dieser beiden Parameter in den Monozyten gefunden werden. Die in den Monozyten von Patienten beobachtete erhöhte Expression der Ro52-mRNA kann also nicht durch die erhöhten TNF α -Plasmaspiegel erklärt werden, obwohl in anderen Zellsystemen bereits beschrieben wurde, dass TNF α einen Einfluß auf die Expression sowie die intrazelluläre Lokalisation des nukleären Autoantigens haben kann. So ist z.B. bekannt, dass TNF α eine Translokation von Ro/SSA-Protein mit Expression auf der Zellmembran von primären, humanen Keratinozyten induziert [87]. Außerdem ergaben Untersuchungen in unserem Labor, dass TNF α zur Hochregulation der intrazellulären Expression von Ro52 in humanen Keratinozyten führt. Dieses Ergebnis wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gefunden [130]. Aber auch Zellen des Speicheldrüsengewebes können als Antwort auf eine Behandlung mit TNF α eine Relokalisation von nukleären Autoantigenen wie Ro/SSA und La/SSB zur Zelloberfläche hin zeigen [91]. Es wird diskutiert, dass dies die Basis für eine Präsentation und Prozessierung von Autoantigenen sowie für die Produktion von Autoantikörpern bilden könnte. Auch hier muß jedoch beachtet werden, dass eine Untersuchung der mRNA Expression nicht ausreichend ist, um eine Aussage über den Effekt von TNF α auf die Ro52 Expression in Monozyten zu treffen. Es könnte in in vitro Kulturen mit Monozyten gezeigt werden, ob eine TNF α -Stimulation zur höheren Expression von Ro52-mRNA bzw. Ro52-Protein führt.

Dies würde die Frage klären, ob die bei Sjögren-Patienten beobachteten erhöhten TNF α -Plasmaspiegel einen Effekt auf die Autoantigenexpression in den Monozyten haben und die Monozyten damit eine potentielle Rolle in der Pathogenese des Sjögren-Syndroms spielen.

Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse zur Expression der TNF α -mRNA zur Expression der Ro52-mRNA zeigte, dass die TNF α -mRNA in 54% aller Fälle geringer exprimiert wird, wenn die Ro52-mRNA normal bis stark exprimiert ist. Das könnte bedeuten, dass eine erhöhte Ro52-mRNA-Expression keine erhöhte TNF α -mRNA-Expression der Monozyten zulässt oder diese beiden Expressionsrichtungen zumindest nicht kombinierbar sind.

4.4. Nachweis eines DNA-Polymorphismus im TNF α Promotorbereich - 308 beim Sjögren Syndrom

Von den elf untersuchten Sjögren-Patienten wiesen neun (81,8 %) einen Polymorphismus im TNF α Promotorbereich -308 auf. Die zwei von uns getesteten Normalspender zeigten diesen Polymorphismus nicht. Da in einer Metaanalyse dieser Polymorphismus im TNF α Promotorbereich -308 bei nur 17,3 % beschrieben wurde (10 Studien, n = 1407), ist von einem gehäuften Auftreten dieses Polymorphismus beim Sjögren Syndrom auszugehen. Es handelt sich um eine Erstbeschreibung. Dagegen zeigte die Analyse an der Position -238 des TNF α -Promotors keinen sichtbaren Zusammenhang mit dem Krankheitsbild des Sjögren-Syndroms. Ein Polymorphismus an der Position -308, wie er bei den meisten Sjögren-Patienten nachgewiesen wurde, könnte zu einer vermehrten Expression des Zytokins TNF α bei den Patienten führen. Der Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines TNF α -Polymorphismus auf der Position -308 mit einer verstärkten Freisetzung von TNF α wurde bereits beschrieben [123]. Allerdings zeigte sich in den durchgeführten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit in keinem Fall eine erhöhte TNF α -mRNA-Expression bei Vorliegen des TNF α -Polymorphismus in Position -308 verglichen mit den Normalspendern. Trotzdem könnte eine Korrelation zwischen dem Vorliegen des Polymorphismus und der Expression von TNF α auf Proteinebene möglich sein. Dieser Zusammenhang wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht. Es wäre auch interessant zu sehen, ob Patienten, die einen TNF α -Polymorphismus tragen, erhöhte TNF α -Spiegel im Plasma aufweisen. Tatsächlich wurden im Plasma der meisten der in dieser Arbeit untersuchten Patienten extrem hohe TNF α -Konzentrationen gefunden (>1000 pg/ml in 6 von 12 Proben).

Da die TNF α -Serumspiegel und die TNF α -Polymorphismenanalyse aus materialtechnischen Gründen an unterschiedlichen Proben untersucht werden mußten, kann hier keine Gegenüberstellung erfolgen. Auch aus der Literatur ist bekannt, dass das Sjögren-Syndrom mit erhöhten TNF α Serumspiegeln assoziiert ist [117]. Ob dabei Monozyten als TNF α -Produzenten die zentrale Rolle spielen und eine Assoziation mit dem Krankheitsbild des Sjögren-Syndrom besteht, ist bisher jedoch noch unklar.

4.5. Ausblick

Zusammenfassend kann man aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit schlussfolgern, dass die beobachteten erhöhten Werte bezüglich der Ro52-mRNA Expression und der verringerten TNF α -mRNA-Expression in Monozyten von Sjögren-Patienten Hinweise darauf liefern, dass Monozyten eine Rolle in der Pathogenese des (primären) Sjögren-Syndroms spielen könnten. Die fehlenden statistischen Zusammenhänge deuten jedoch - unter dem Gesichtspunkt einer beschränkten Probenanzahl - darauf hin, dass eine Untersuchung auf mRNA-Ebene nicht ausreichend ist, um zuverlässige Angaben über derartige Zusammenhänge zu machen. Da auf translationaler Ebene noch regulative Prozesse stattfinden können, die die tatsächliche Expression eines Proteins beeinflussen, sollten die Untersuchungen vielmehr auf die Proteinexpression von Ro52 sowie TNF α ausgeweitet werden. Dabei wäre es interessant, sowohl die intrazelluläre Expression als auch die Menge sezernierten Zytokins und die mögliche Relokalisation des Ro52-Autoantigens zu untersuchen. Dies könnte Hinweise auf die pathogenetischen Mechanismen geben, die zur Autoimmunität beim Sjögren-Syndrom führen. Funktionelle in vitro Untersuchungen zur Aktivierbarkeit von Immunzellen durch Monozyten von Sjögren Patienten im Vergleich zu Normalspendern würden zur Klärung dieser Fragestellung beitragen.

In diesem Zusammenhang könnte es auch von Belang sein, vor dem Einleiten einer Therapie mittels TNF α -Blockern, den TNF α -Serumspiegel der jeweiligen Patienten zu bestimmen. Später könnte dann in einem „follow up“ kontrolliert werden, ob das Ausmaß des Therapieerfolges zum einen von der initialen TNF α -Serumkonzentration abhängig ist und ob es andererseits zu einer Beeinflussung der Expression von monozytärer TNF α - sowie Ro52-mRNA kommt. Da in Transfektionsexperimenten an kultivierten PBMCs gezeigt werden konnte, dass Y1-RNA vor allem in Monozyten die Expression von IFN α induzieren kann [51] und diskutiert wird, dass Immunkomplexe, die Y1-RNA enthalten, mitverantwortlich für die beim systemischen Lupus erythematodes (SLE) häufig beobachtete erhöhte IFN α -Produktion

sein kann [51], könnte die Expression von Ro52 und eine eventuell daraus resultierende Induktion von $\text{INF}\alpha$ in Monozyten für die Pathogenese rheumatischer Erkrankungen wie dem Sjögren Syndroms oder SLE von Bedeutung sein. Somit erscheint eine Untersuchung im Hinblick auf $\text{INF}\alpha$ bei Patienten mit primärem Sjögren Syndrom sinnvoll.

4.6. $\text{TNF}\alpha$ als mögliches therapeutisches Target beim Sjögren-Syndrom

Bisher existieren nur wenige Studien, die effektive Medikationen zur Behandlung des primären Sjögren-Syndroms ausweisen. Dabei standen besonders Medikamente auf dem Prüfstand, die auch bei anderen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises mehr oder minder erfolgreich eingesetzt werden. Dies waren u.a. Interferon-alpha, Methotrexat (MTX) und $\text{TNF}\alpha$ -Blocker. Während mit Hilfe von Interferon-alpha und Methotrexat (MTX) nur jeweils eine – dennoch für den Patienten sehr entlastende – Teilverbesserung im Rahmen des gesamten Krankheitsbildes erreicht werden konnte [152, 153], zeigte einzig der Einsatz von $\text{TNF}\alpha$ -Blockern eine Verbesserung in mehreren, wesentlichen Teilbereichen der Symptomatik des primären Sjögren-Syndroms. $\text{TNF}\alpha$ -Blocker sind sehr wirksame Biologika zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis [152]. Eine erste Studie an 16 Patienten mit Sjögren-Syndrom wurde im Jahre 2001 veröffentlicht [154]. Es wurde hierbei die gleiche Dosis wie bei der rheumatoiden Arthritis gewählt. Die Behandlung erfolgte über 6 Wochen. Hierbei konnte eine Zunahme der Speichel- und Tränenproduktion, ein Rückgang der Schmerzen und Müdigkeit sowie der BSG gezeigt werden. Die in der Rheumatologie derzeit verwendeten Substanzen umfassen einerseits Produkte, die im Sinne einer $\text{TNF}\alpha$ -Blockade wirken, nämlich einen chimärischen (Mensch/Maus) monoklonalen Anti- $\text{TNF}\alpha$ -Antikörper (Infliximab®), ein rekombinantes lösliches TNF-Rezeptor-p75-Fusionsprotein (Etanercept®), und einen vollständig humanisierten monoklonalen Anti- $\text{TNF}\alpha$ -Antikörper (Adalimumab®). Es muß jedoch in Betracht gezogen werden, dass beim Sjögren-Syndrom das Malignitätsrisiko unter einer derartigen Therapie erhöht sein könnte, da beim Sjögren-Syndrom ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Lymphomen bekannt ist. In den meisten anderen Studien konnte kein eindeutiger Benefit gezeigt werden [155-157], wobei eine im Vorfeld stattfindende Bestimmung von $\text{TNF}\alpha$ -Spiegeln möglicherweise die Wirksamkeit, wie in der o.g. Studie aus dem Jahr 2001, erklären könnte. Sollte sich herausstellen, dass Monozyten eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Sjögren-Syndroms spielen - sei es durch ein vermehrtes Ausschütten von proinflammatorisch wirkendem $\text{TNF}\alpha$ oder durch eine

vermehrte Präsentation von intrazellulärem Autoantigen wie Ro52 - so könnte diese Zellpopulation als zukünftiges therapeutisches Angriffsziel in Frage kommen.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Rolle der Monozyten beim Sjögren-Syndrom untersucht, wobei die Schwerpunkte auf die Expression des Autoantigens Ro52 und des proinflammatorischen Zytokins TNF α gelegt wurden. Für diese Untersuchungen wurde die Isolierung der Monozyten aus dem peripheren Blut mittels MACS-Technologie optimiert. Erst durch die Kombination des „Monocyte Isolation Kit“ mit nachfolgender weiterer Entfernung von Granulozyten durch „CD15 Microbeads“ konnte eine Reinheit von über 85% für die Monozytenpräparationen erreicht werden. Weiterhin wurde die „realtime PCR“ für die quantitative Bestimmung der mRNA-Expression des Autoantigens Ro52 und von TNF α in Monozyten aufgebaut. So konnte mit Hilfe der „realtime PCR“ gezeigt werden, dass tendenziell die mRNA des Autoantigens Ro52 in Monozyten von Patienten mit Sjögren-Syndrom im Vergleich zu Gesunden vermehrt exprimiert ist. Die Mehrzahl der Sjögren-Syndrom-Patienten (9 von 14) wiesen deutlich erhöhte TNF α -Plasmaspiegel auf, während die mRNA-Expression von TNF α in Monozyten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe vermindert war. 9 von 11 untersuchten Sjögren-Syndrom-Patienten offenbarten einen Polymorphismus im TNF α -Promotorbereich an Position -308, während in einer Normalpopulation dieser Polymorphismus mit einer deutlich geringeren Häufigkeit von 17,3 % beschrieben wurde. Keine der Patientenproben zeigte an der Position -238 des TNF α -Promotors einen Polymorphismus. Die Ergebnisse lassen auf eine wichtige Rolle von TNF α in der Pathogenese des Sjögren-Syndroms schließen. Möglicherweise profitieren Patienten mit hohen TNF α -Spiegeln und hoher Entzündungsaktivität von einer Therapie mit TNF-Inhibitoren, wie es in der Pilotstudie aus dem Jahre 2001 gezeigt wurde [154]. Dies könnte unter Umständen auch für partielle Symptomreduktionen gelten [152]. Die vorliegende Arbeit bildet die methodische Basis, um an einer größeren Zahl von Patienten mit einem Sjögren-Syndrom die Bedeutung der Ro52-Autoantigenexpression in Monozyten, des proinflammatorischen Zytokins TNF α sowie des -308-TNF-Promoter-Polymorphismus untersuchen zu können.

6. Literatur

1. Blank, I., *Angriff aufs eigene Immunsystem*. Der Hausarzt, 2002. **01/02**: p. 39-44.
2. Fox, R.I., *Clinical features, pathogenesis, and treatment of Sjögren's syndrome*. Curr Opin Rheumatol 1996. **8**: p. 438-445
3. Sjögren, H., *Zur Kenntnis der Keratokonjunktivitis sicca*. Acta Ophthalmol., 1933. **2**: p. 1-151.
4. Dörner, T., *Ätiologische und immunpathogenetische Aspekte des Sjögren-Syndroms*. Akt. Rheumatol., 1998. **23**: p. 69-77.
5. Dörner, T., *Sjögren-Syndrom*. Pschyrembel Therapeutisches Wörterbuch, 2000. **2. Auflage**(Walter de Gruyter Verlag Berlin).
6. Fox, R.I., *Clinical features, pathogenesis, and treatment of Sjogren's syndrome*. Curr Opin Rheumatol, 1996. **8**(5): p. 438-45.
7. Fox, R.I. and T. Maruyama, *Pathogenesis and treatment of Sjogren's syndrome*. Curr Opin Rheumatol, 1997. **9**(5): p. 393-9.
8. Willeke, P., *Das Sjögren Syndrom - Welche Therapiemöglichkeiten gibt es ?* Deutscher Sjögren-Tag, 2002.
9. Tonami, H., et al., *Clinical and imaging findings of lymphoma in patients with Sjogren syndrome*. J Comput Assist Tomogr, 2003. **27**(4): p. 517-24.
10. Vitali, C., et al., *Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group*. Ann Rheum Dis, 2002. **61**(6): p. 554-8.
11. Grehn, L., *Augenheilkunde*. Springer-Verlag, 1995.
12. Vitali, C., et al., *Assessment of the European classification criteria for Sjogren's syndrome in a series of clinically defined cases: results of a prospective multicentre study. The European Study Group on Diagnostic Criteria for Sjogren's Syndrome*. Ann Rheum Dis, 1996. **55**(2): p. 116-21.
13. Conrad, K., W. Schössler, and F. Hiepe, *Autoantikörper bei systemischen Autoimmunerkrankungen*. 2006: p. 224.
14. Stein, R., et al., *Characterization of a new humanized anti-CD20 monoclonal antibody, IMMU-106, and Its use in combination with the humanized anti-CD22 antibody, epratuzumab, for the therapy of non-Hodgkin's lymphoma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(8): p. 2868-78.

15. Zeilberger, K., *Monozyten*. Laborwerte - Zahlen und Fakten, 2004(Facharzt für Innere Medizin und Sportmedizin an der Poliklinik für Sportmedizin der Technischen Universität München).
16. Hübl, W., *Informationen über Laborbefunde, Monozyten*. Laborbefunde, 2003(Facharzt für Medizinische und Chemische Labordiagnostik, Wien).
17. Harris, H., *Chemotaxis of monocytes*. Br J Exp Pathol, 1953. **34**(3): p. 276-9.
18. Simmons, K.M., et al., *Enhanced chemotaxis of monocytes in rheumatoid arthritis*. Br J Rheumatol, 1987. **26**(4): p. 245-50.
19. Neubert, R., *Die Effektorsysteme - Das Monozyten-Makrophagen-System*. Immunkursus, 2001(Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Benjamin Franklin, FU Berlin).
20. Maini, R.N., et al., *Monoclonal anti-TNF alpha antibody as a probe of pathogenesis and therapy of rheumatoid disease*. Immunol Rev, 1995. **144**: p. 195-223.
21. Vescovi, P., M. Manfredi, and S. Cimarosti, [*Sjogren's syndrome: clinical and therapeutic features. A review of the literature*]. Minerva Stomatol, 2004. **53**(1-2): p. 1-19.
22. Matsumura, R., et al., *Immunohistochemical identification of infiltrating mononuclear cells in tubulointerstitial nephritis associated with Sjogren's syndrome*. Clin Nephrol, 1988. **30**(6): p. 335-40.
23. Szodoray, P., et al., *Attenuated apoptosis of B cell activating factor-expressing cells in primary Sjogren's syndrome*. Lab Invest, 2003. **83**(3): p. 357-65.
24. Lavie, F., et al., *Expression of BAFF (BLyS) in T cells infiltrating labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome*. J Pathol, 2004. **202**(4): p. 496-502.
25. Cuello, C., et al., *Chemokine expression and leucocyte infiltration in Sjogren's syndrome*. Br J Rheumatol, 1998. **37**(7): p. 779-83.
26. Mulherin, D., O. Fitzgerald, and B. Bresnihan, *Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1996. **39**(1): p. 115-24.
27. Kalden, J.R., *Defective phagocytosis of apoptotic cells: possible explanation for the induction of autoantibodies in SLE*. Lupus, 1997. **6**(3): p. 326-7.
28. Ren, Y., et al., *Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(10): p. 2888-97.
29. Herrmann, M., et al., *Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(7): p. 1241-50.

30. Baumann, I., et al., *Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(1): p. 191-201.
31. Ehrental, *Autoantikörper und spezielle Antikörper*. Autoantikörper, 2004.
32. Fox, R.I., *Sjögren's Syndrome*. <http://www.almark.net/index.htm>, 2000.
33. Pruijn, G.J., F.H. Simons, and W.J. van Venrooij, *Intracellular localization and nucleocytoplasmic transport of Ro RNP components*. *Eur J Cell Biol*, 1997. **74**(2): p. 123-32.
34. Ben-Chetrit, E., *The molecular basis of the SSA/Ro antigens and the clinical significance of their autoantibodies*. *Br J Rheumatol*, 1993. **32**(5): p. 396-402.
35. Ben-Chetrit, E., et al., *A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle*. *J Exp Med*, 1988. **167**(5): p. 1560-71.
36. Slobbe, R.L., et al., *Ro ribonucleoprotein assembly in vitro. Identification of RNA-protein and protein-protein interactions*. *J Mol Biol*, 1992. **227**(2): p. 361-6.
37. Kelekar, A., M.R. Saitta, and J.D. Keene, *Molecular composition of Ro small ribonucleoprotein complexes in human cells. Intracellular localization of the 60- and 52-kD proteins*. *J Clin Invest*, 1994. **93**(4): p. 1637-44.
38. Boire, G., et al., *Purification of antigenically intact Ro ribonucleoproteins; biochemical and immunological evidence that the 52-kD protein is not a Ro protein*. *Clin Exp Immunol*, 1995. **100**(3): p. 489-98.
39. Rutjes, S.A., et al., *Anti-Ro52 antibodies frequently co-occur with anti-Jo-1 antibodies in sera from patients with idiopathic inflammatory myopathy*. *Clin Exp Immunol*, 1997. **109**(1): p. 32-40.
40. Ricchiuti, V., et al., *Accessibility of epitopes on the 52-kD Ro/SSA protein (Ro52) and on the RoRNP associated Ro52 protein as determined by anti-peptide antibodies*. *J Autoimmun*, 1997. **10**(2): p. 181-91.
41. Saurin, A.J., et al., *Does this have a familiar RING?* *Trends Biochem Sci*, 1996. **21**(6): p. 208-14.
42. McCauliffe, D.P. and R.D. Sontheimer, *Molecular characterization of the Ro/SS-A autoantigens*. *J Invest Dermatol*, 1993. **100**(1): p. 73S-79S.
43. Gottlieb, E. and J.A. Steitz, *Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III*. *Embo J*, 1989. **8**(3): p. 851-61.
44. Maraia, R.J., *Transcription termination factor La is also an initiation factor for RNA polymerase III*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(8): p. 3383-7.

45. Yoo, C.J. and S.L. Wolin, *The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors*. Cell, 1997. **89**(3): p. 393-402.
46. Bachmann, M., et al., *Characterization of the autoantigen La as a nucleic acid-dependent ATPase/dATPase with melting properties*. Cell, 1990. **60**(1): p. 85-93.
47. Huhn, P., et al., *Characterization of the autoantigen La (SS-B) as a dsRNA unwinding enzyme*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(2): p. 410-6.
48. Meerovitch, K., et al., *La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate*. J Virol, 1993. **67**(7): p. 3798-807.
49. Svitkin, Y.V., A. Pause, and N. Sonenberg, *La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA*. J Virol, 1994. **68**(11): p. 7001-7.
50. Craig, A.W., et al., *The La autoantigen contains a dimerization domain that is essential for enhancing translation*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(1): p. 163-9.
51. Lovgren, T., et al., *Induction of interferon-alpha by immune complexes or liposomes containing systemic lupus erythematosus autoantigen- and Sjogren's syndrome autoantigen-associated RNA*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(6): p. 1917-27.
52. Theofilopoulos, A.N., et al., *Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 307-36.
53. Tough, D.F., *Type I interferon as a link between innate and adaptive immunity through dendritic cell stimulation*. Leuk Lymphoma, 2004. **45**(2): p. 257-64.
54. Hueber, A.O., S. Bosser, and M. Zornig, *Transgenic overexpression of a dominant negative mutant of FADD that, although counterselected during tumor progression, cooperates in L-myc-induced tumorigenesis*. Int J Cancer, 2004. **112**(3): p. 536-40.
55. Bave, U., et al., *Activation of the type I interferon system in primary Sjogren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(4): p. 1185-95.
56. Hjelmervik, T.O., et al., *Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguishes primary Sjogren's syndrome patients from healthy control subjects*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(5): p. 1534-44.
57. Peek, R., et al., *Subcellular distribution of Ro ribonucleoprotein complexes and their constituents*. J Cell Sci, 1993. **106** (Pt 3): p. 929-35.
58. Simons, F.H., et al., *The interactions with Ro60 and La differentially affect nuclear export of hY1 RNA*. Rna, 1996. **2**(3): p. 264-73.
59. Simons, F.H., G.J. Pruijn, and W.J. van Venrooij, *Analysis of the intracellular localization and assembly of Ro ribonucleoprotein particles by microinjection into Xenopus laevis oocytes*. J Cell Biol, 1994. **125**(5): p. 981-8.

60. Itoh, K., Y. Itoh, and M.B. Frank, *Protein heterogeneity in the human Ro/SSA ribonucleoproteins. The 52- and 60-kD Ro/SSA autoantigens are encoded by separate genes.* J Clin Invest, 1991. **87**(1): p. 177-86.
61. Chan, E.K., et al., *Molecular definition and sequence motifs of the 52-kD component of human SS-A/Ro autoantigen.* J Clin Invest, 1991. **87**(1): p. 68-76.
62. Reddy, B.A. and L.D. Etkin, *A unique bipartite cysteine-histidine motif defines a subfamily of potential zinc-finger proteins.* Nucleic Acids Res, 1991. **19**(22): p. 6330.
63. Frank, M.B., *Characterization of DNA binding properties and sequence specificity of the human 52 kDa Ro/SS-A (Ro52) zinc finger protein.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **259**(3): p. 665-70.
64. Yeh, E.T., L. Gong, and T. Kamitani, *Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles.* Gene, 2000. **248**(1-2): p. 1-14.
65. Jackson, P.K., et al., *The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases.* Trends Cell Biol, 2000. **10**(10): p. 429-39.
66. Wada, K. and T. Kamitani, *Autoantigen Ro52 is an E3 ubiquitin ligase.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(1): p. 415-21.
67. Fukuda-Kamitani, T. and T. Kamitani, *Ubiquitination of Ro52 autoantigen.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **295**(4): p. 774-8.
68. Espinosa, A., et al., *The Sjogren's syndrome-associated autoantigen Ro52 is an E3 ligase that regulates proliferation and cell death.* J Immunol, 2006. **176**(10): p. 6277-85.
69. Hicke, L., *Protein regulation by monoubiquitin.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(3): p. 195-201.
70. Chan, E.K., A.M. Francoeur, and E.M. Tan, *Epitopes, structural domains, and asymmetry of amino acid residues in SS-B/La nuclear protein.* J Immunol, 1986. **136**(10): p. 3744-9.
71. Iwasaki, K., et al., *Detection of anti-SS-A/Ro and anti-SS-B/La antibodies of IgA and IgG isotypes in saliva and sera of patients with Sjogren's syndrome.* Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi, 2003. **26**(6): p. 346-54.
72. Harley, J.B., et al., *Anti-Ro (SS-A) and anti-La (SS-B) in patients with Sjogren's syndrome.* Arthritis Rheum, 1986. **29**(2): p. 196-206.
73. Loiseau, P., et al., *HLA class I and class II are both associated with the genetic predisposition to primary Sjogren syndrome.* Hum Immunol, 2001. **62**(7): p. 725-31.
74. Yoshimasu, T., et al., *Comparison of anti 60 and 52 kDa SS-A/Ro antibodies in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus.* J Dermatol Sci, 2002. **29**(1): p. 35-41.

75. Hedgpeth, M.T. and D.W. Boulware, *Interstitial pneumonitis in antinuclear antibody-negative systemic lupus erythematosus: a new clinical manifestation and possible association with anti-Ro (SS-A) antibodies*. *Arthritis Rheum*, 1988. **31**(4): p. 545-8.
76. Harley, J.B., et al., *A model for disease heterogeneity in systemic lupus erythematosus. Relationships between histocompatibility antigens, autoantibodies, and lymphopenia or renal disease*. *Arthritis Rheum*, 1989. **32**(7): p. 826-36.
77. Ioannides, D., et al., *Expression of SS-A/Ro and SS-B/La antigens in skin biopsy specimens of patients with photosensitive forms of lupus erythematosus*. *Arch Dermatol*, 2000. **136**(3): p. 340-6.
78. Borrego, L., et al., *Neonatal lupus erythematosus related to maternal leukocytoclastic vasculitis*. *Pediatr Dermatol*, 1997. **14**(3): p. 221-5.
79. Maraina, C.H., M.D. Kamaliah, and M. Ishak, *ANA negative (Ro) lupus erythematosus with multiple major organ involvement: a case report*. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2002. **20**(4): p. 279-82.
80. Breur, J.M., et al., *Treatment of fetal heart block with maternal steroid therapy: case report and review of the literature*. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2004. **24**(4): p. 467-72.
81. Friedman, D.M., et al., *Congenital heart block in neonatal lupus: the pediatric cardiologist's perspective*. *Indian J Pediatr*, 2002. **69**(6): p. 517-22.
82. Tollens, M., et al., *[Prenatal diagnosis and outcome of fetal bradyarrhythmias]*. *Z Geburtshilfe Neonatol*, 2004. **208**(2): p. 57-62.
83. Boh, E.E., *Neonatal lupus erythematosus*. *Clin Dermatol*, 2004. **22**(2): p. 125-8.
84. Meyer, O., *[Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibodies. What's new?]*. *Ann Med Interne (Paris)*, 2002. **153**(8): p. 520-9.
85. Moore, T.L., et al., *Parvovirus infection mimicking systemic lupus erythematosus in a pediatric population*. *Semin Arthritis Rheum*, 1999. **28**(5): p. 314-8.
86. Wang, L.J., et al., *Neonatal lupus erythematosus with recurrent pancytopenia: a case report*. *J Microbiol Immunol Infect*, 2002. **35**(4): p. 262-4.
87. Dorner, T., et al., *Enhanced membrane expression of the 52 kDa Ro(SS-A) and La(SS-B) antigens by human keratinocytes induced by TNF alpha*. *Ann Rheum Dis*, 1995. **54**(11): p. 904-9.
88. Hayashi, Y., R. Arakaki, and N. Ishimaru, *Apoptosis and estrogen deficiency in primary Sjogren syndrome*. *Curr Opin Rheumatol*, 2004. **16**(5): p. 522-6.
89. Casciola-Rosen, L., et al., *Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity*. *J Exp Med*, 1999. **190**(6): p. 815-26.

90. Rosen, A., L. Casciola-Rosen, and J. Ahearn, *Novel packages of viral and self-antigens are generated during apoptosis*. J Exp Med, 1995. **181**(4): p. 1557-61.
91. McArthur, C., et al., *Intracellular trafficking and surface expression of SS-A (Ro), SS-B (La), poly(ADP-ribose) polymerase and alpha-fodrin autoantigens during apoptosis in human salivary gland cells induced by tumour necrosis factor-alpha*. Arch Oral Biol, 2002. **47**(6): p. 443-8.
92. Rosen, A. and L. Casciola-Rosen, *Altered autoantigen structure in Sjogren's syndrome: implications for the pathogenesis of autoimmune tissue damage*. Crit Rev Oral Biol Med, 2004. **15**(3): p. 156-64.
93. Kim, S., E.Y. Chung, and X. Ma, *Immunological consequences of macrophage-mediated clearance of apoptotic cells*. Cell Cycle, 2005. **4**(2): p. 231-4.
94. Gaipal, U.S., et al., *Clearance of apoptotic cells in human SLE*. Curr Dir Autoimmun, 2006. **9**: p. 173-87.
95. Tortorella, D., et al., *Viral subversion of the immune system*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 861-926.
96. Casciola-Rosen, L., et al., *Apoptain/ CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death*. J Exp Med, 1996. **183**(5): p. 1957-64.
97. Vlad, J., *Zytokine*. Immunsystem - Zytokine, 2003.
98. Schmitz, J., et al., *IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines*. Immunity, 2005. **23**(5): p. 479-90.
99. Beutler, B. and A. Cerami, *The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 625-55.
100. Ware, C.F., et al., *Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells*. J Immunol, 1992. **149**(12): p. 3881-8.
101. Meisel, C., et al., *Differential regulation of monocytic tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 expression*. Eur J Immunol, 1996. **26**(7): p. 1580-6.
102. Marino, M., et al., *Mild clinical expression of myasthenia gravis associated with autoimmune thyroid diseases*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(2): p. 438-43.
103. Burchett, S.K., et al., *Regulation of tumor necrosis factor/cachectin and IL-1 secretion in human mononuclear phagocytes*. J Immunol, 1988. **140**(10): p. 3473-81.
104. Camussi, G. and E. Lupia, *The future role of anti-tumour necrosis factor (TNF) products in the treatment of rheumatoid arthritis*. Drugs, 1998. **55**(5): p. 613-20.

105. Maini, R.N., et al., *Targeting TNF alpha for the therapy of rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 1994. **12 Suppl 11**: p. S63-6.
106. Walsh, L.J., *Ultraviolet B irradiation of skin induces mast cell degranulation and release of tumour necrosis factor-alpha*. Immunol Cell Biol, 1995. **73**(3): p. 226-33.
107. Yarosh, D., et al., *Regulation of TNFalpha production and release in human and mouse keratinocytes and mouse skin after UV-B irradiation*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2000. **16**(6): p. 263-70.
108. Middleton, M.H. and D.A. Norris, *Cytokine-induced ICAM-1 expression in human keratinocytes is highly variable in keratinocyte strains from different donors*. J Invest Dermatol, 1995. **104**(4): p. 489-96.
109. Kock, A., et al., *Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light*. J Exp Med, 1990. **172**(6): p. 1609-14.
110. Clingen, P.H., et al., *Contrasting effects of an ultraviolet B and an ultraviolet A tanning lamp on interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and intercellular adhesion molecule-1 expression*. Br J Dermatol, 2001. **145**(1): p. 54-62.
111. Avalos-Diaz, E., E. Alvarado-Flores, and R. Herrera-Esparza, *UV-A irradiation induces transcription of IL-6 and TNF alpha genes in human keratinocytes and dermal fibroblasts*. Rev Rhum Engl Ed, 1999. **66**(1): p. 13-9.
112. Gomez, D., et al., *Th1/Th2 cytokines in patients with systemic lupus erythematosus: is tumor necrosis factor alpha protective?* Semin Arthritis Rheum, 2004. **33**(6): p. 404-13.
113. Davas, E.M., et al., *Serum IL-6, TNFalpha, p55 srTNFalpha, p75srTNFalpha, srIL-2alpha levels and disease activity in systemic lupus erythematosus*. Clin Rheumatol, 1999. **18**(1): p. 17-22.
114. Studnicka-Benke, A., et al., *Tumour necrosis factor alpha and its soluble receptors parallel clinical disease and autoimmune activity in systemic lupus erythematosus*. Br J Rheumatol, 1996. **35**(11): p. 1067-74.
115. Chosa, N., et al., *Mechanism of Fas-mediated cell death and its enhancement by TNF-alpha in human salivary gland adenocarcinoma cell line HSG*. Eur J Oral Sci, 2004. **112**(4): p. 338-46.
116. Matsumura, R., et al., *Interferon gamma and tumor necrosis factor alpha induce Fas expression and anti-Fas mediated apoptosis in a salivary ductal cell line*. Clin Exp Rheumatol, 2000. **18**(3): p. 311-8.
117. Badillo-Almaraz, I., et al., *FasL and Bax genes are differentially expressed in acinar epithelium and inflammatory cells of primary Sjogren salivary glands*. Minerva Med, 2003. **94**(5): p. 341-5.

118. Oshida, T., et al., [*Tumor necrosis factor-alpha in tears of patients with Sjogren syndrome*]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 2004. **108**(5): p. 297-301.
119. Lawall H, D., C, *Diagnostik und Therapie von Vaskulitiden. Klinik, Histologie und Immunserologie im Blick*. Cardiovasc, 2002. **05/2002**.
120. Marquardt, R., *Tumornekrosefaktor alpha-1a, TNFalpha-1a*. InformationsSekretariat Biotechnologie, 2001.
121. Cichon, S., *Variabilität im menschlichen Genom: Bedeutung für die Krankheitsforschung*. Deutsches Ärzteblatt, 2002. **Ausgabe 46**: p. A-3091 / B-2615 / C-2442.
122. Schmeling, H., S. Burdach, and G. Horneff, *TNF-a Promotorpolymorphismen bei juveniler idiopathischer Arthritis*. Jahrestagung der Sächsisch-Thüringischen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, 2003. **Jahrestagung 2003**.
123. Fargion, S., et al., *TNFalpha promoter polymorphisms*. Methods Mol Med, 2004. **98**: p. 47-58.
124. Parks, C.G., et al., *Genetic polymorphisms in tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF-beta in a population-based study of systemic lupus erythematosus: associations and interaction with the interleukin-1alpha-889 C/T polymorphism*. Hum Immunol, 2004. **65**(6): p. 622-31.
125. Llanos, C., et al., [*The influence of -238 and -308 TNF alpha polymorphisms on the pathogenesis and response to treatment in rheumatoid arthritis*]. Rev Med Chil, 2005. **133**(9): p. 1089-95.
126. Cuida, M., et al., *Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrates in Sjogren's syndrome, rheumatoid arthritis and osteoarthritis with special reference to calprotectin-producing cells*. Apmis, 1996. **104**(12): p. 881-90.
127. Tominaga, M., et al., *Expression of cyclooxygenase-1 (COX-1) in labial salivary glands of Sjogren's syndrome*. Clin Exp Immunol, 2000. **122**(3): p. 459-63.
128. van Blokland, S.C., et al., *Professional antigen presenting cells in minor salivary glands in Sjogren's syndrome: potential contribution to the histopathological diagnosis?* Lab Invest, 2000. **80**(12): p. 1935-41.
129. Zeher, M., et al., *Macrophage containing factor XIII subunit a in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome*. J Investig Allergol Clin Immunol, 1991. **1**(4): p. 261-5.
130. Gerl, V., et al., *The intracellular 52-kd Ro/SSA autoantigen in keratinocytes is up-regulated by tumor necrosis factor alpha via tumor necrosis factor receptor I*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(2): p. 531-8.
131. Noble, P.B. and J.H. Cutts, *Separation of blood leukocytes by Ficoll gradient*. Can Vet J, 1967. **8**(5): p. 110-1.

132. Miltenyi, S., et al., *High gradient magnetic cell separation with MACS*. Cytometry, 1990. **11**(2): p. 231-8.
133. Ziebolz, B., *LightCycler*. Roche Molecular Biochemicals, 1999. **2/1999**: p. I - III.
134. Pennica, D., et al., *Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin*. Nature, 1984. **312**(5996): p. 724-9.
135. Rhonwy, G., *TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10*. Immulite, 2002.
136. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
137. Zein, N.N., et al., *Ethnic differences in polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and transforming growth factor-beta1 genes in patients with chronic hepatitis C virus infection*. Am J Trop Med Hyg, 2004. **70**(4): p. 434-7.
138. Price, E.J. and P.J. Venables, *The etiopathogenesis of Sjogren's syndrome*. Semin Arthritis Rheum, 1995. **25**(2): p. 117-33.
139. Fox, R.I., et al., *Primary Sjogren syndrome: clinical and immunopathologic features*. Semin Arthritis Rheum, 1984. **14**(2): p. 77-105.
140. Tengner, P., et al., *Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjogren's syndrome*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(12): p. 2238-48.
141. Burmester GR, G.J., Häupl Th, Radbruch A, *Genomik in der Rheumatologie - Molekulare Mechanismen bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen*. Humboldt-Spektrum, 2005. **01/2005**: p. 34-40.
142. Tsunawaki, S., et al., *Possible function of salivary gland epithelial cells as nonprofessional antigen-presenting cells in the development of Sjogren's syndrome*. J Rheumatol, 2002. **29**(9): p. 1884-96.
143. Furukawa, F., et al., *Keratinocytes from patients with lupus erythematosus show enhanced cytotoxicity to ultraviolet radiation and to antibody-mediated cytotoxicity*. Clin Exp Immunol, 1999. **118**(1): p. 164-70.
144. Azuma, M., et al., *Role of cytokines in the destruction of acinar structure in Sjogren's syndrome salivary glands*. Lab Invest, 1997. **77**(3): p. 269-80.
145. Garcic-Carrasco, M., et al., *Circulating levels of Th1/Th2 cytokines in patients with primary Sjogren's syndrome: correlation with clinical and immunological features*. Clin Exp Rheumatol, 2001. **19**(4): p. 411-5.
146. Fox, R.I., et al., *Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjogren's syndrome*. J Immunol, 1994. **152**(11): p. 5532-9.

147. Willeke, P., et al., *Interleukin 1beta and tumour necrosis factor alpha secreting cells are increased in the peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome*. *Ann Rheum Dis*, 2003. **62**(4): p. 359-62.
148. Mitamura, K., et al., *Impaired tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production and abnormal B cell response to TNF-alpha in patients with systemic lupus erythematosus (SLE)*. *Clin Exp Immunol*, 1991. **85**(3): p. 386-91.
149. Koh, J.S., Z. Wang, and J.S. Levine, *Cytokine dysregulation induced by apoptotic cells is a shared characteristic of murine lupus*. *J Immunol*, 2000. **165**(8): p. 4190-201.
150. Venables, P.J., P.R. Smith, and R.N. Maini, *Purification and characterization of the Sjogren's syndrome A and B antigens*. *Clin Exp Immunol*, 1983. **54**(3): p. 731-8.
151. Ben-Chetrit, E., R.I. Fox, and E.M. Tan, *Dissociation of immune responses to the SS-A (Ro) 52-kd and 60-kd polypeptides in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome*. *Arthritis Rheum*, 1990. **33**(3): p. 349-55.
152. Pessler, F., et al., *Sjogren syndrome in a child: favorable response of the arthritis to TNFalpha blockade*. *Clin Rheumatol*, 2006. **25**(5): p. 746-8.
153. Skopouli, F.N., et al., *Methotrexate in primary Sjogren's syndrome*. *Clin Exp Rheumatol*, 1996. **14**(5): p. 555-8.
154. Steinfeld, S.D., et al., *Infliximab in patients with primary Sjogren's syndrome: a pilot study*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(10): p. 2371-5.
155. Mariette, X., et al., *Inefficacy of infliximab in primary Sjogren's syndrome: results of the randomized, controlled Trial of Remicade in Primary Sjogren's Syndrome (TRIPSS)*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(4): p. 1270-6.
156. Sankar, V., et al., *Etanercept in Sjogren's syndrome: a twelve-week randomized, double-blind, placebo-controlled pilot clinical trial*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(7): p. 2240-5.
157. Atzeni, F., et al., *Potential target of infliximab in autoimmune and inflammatory diseases*. *Autoimmun Rev*, 2007. **6**(8): p. 529-36.

Danksagung

Für die Überlassung des Themas sowie die ausführliche Beratung hinsichtlich der Probleme, die bei der Anfertigung dieser Arbeit auftraten, möchte ich Herrn Prof. Dr. Falk Hiepe herzlich danken.

Ich danke Frau Dr. rer. nat. Velia Gerl, Frau Karin Reiter sowie Herrn Björn Hostmann für die umfangreiche und stetige Hilfestellung bei experimentellen und fachlichen Fragen, insbesondere im Zusammenhang mit den Arbeiten an FACS[®]-, MACS[®] und LightCycler[®]-Systemen.

Herrn Prof. Dr. D. Volk möchte ich für die Zusammenarbeit bei der Zytokinbestimmung herzlich danken, wobei mein besonderer Dank der Mitarbeiterin Frau Liebenthal für Ihre Hilfe in der Detailarbeit gilt.

Den Mitarbeitern der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und klinische Immunologie einschließlich Tagesklinik sowie den Mitarbeitern der Blutspendeabteilung und des Archivs der Charité möchte ich für alle Bemühungen danken, die mir die Erfassung, Auswahl und Rohmaterialgewinnung von Patienten ermöglichten.

Mein abschließender Dank gilt den jeweiligen Mitarbeitern des zugehörigen Labors im Deutschen Rheumaforschungszentrum, die mich bei der Durchführung der Untersuchungen unterstützt und sich als gesunde Probanden mit ihrer Blutspende zur Verfügung gestellt haben sowie Herrn Hilmar Frank, der als unermüdlicher EDV-Betreuer in allen Notlagen an meiner Seite stand.

Lebenslauf

von

Markus Gerl

Ein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Markus Gerl, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Untersuchungen über das Expressionsverhalten von Ro52 und TNF α in Monozyten beim Sjögren-Syndrom“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 28.05.2008