

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

DISSERTATION

Proteasom-Expression bei Autoimmunerkrankungen: Pathogenese und Diagnostik

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. phil. Sabine Krause
aus Rüsselsheim/M.

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. P.-M. Kloetzel

2. Prof. Dr. med. H. Schulze-Koops

3. Priv.-Doz. Dr. med. R. Voll

Datum der Promotion: 11.07.2008

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	III
Abstract	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Grundlagen	1
1.1 Struktur und Funktion des Proteasoms.....	1
1.2 Proteasomen in der Aktivierung und Regulierung der Immunantwort.....	4
1.3 Pathogenese von Autoimmunerkrankungen	7
1.4 Das Proteasom bei Autoimmunerkrankungen	12
2 Problemstellung	15
2.1 Proteasomale Genexpression bei Autoimmunerkrankungen	15
2.2 Proteasomale Proteinexpression bei Autoimmunerkrankungen	16
3 Materialien und Methoden.....	17
3.1 Klinische Daten der untersuchten Patienten mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises und einer repräsentativen Kontrollgruppe	17
3.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut	18
3.3 Interferon- γ -Stimulation von JOSK-M Kulturzellen zur Induktion von Immunoproteasom-Untereinheiten	19
3.4 Immunoblot-Analyse von Proteasomuntereinheiten in Leukozytenlysaten	19
3.4.1 Proteinisolation aus peripheren Blutmonozyten	19
3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot.....	19
3.4.3 Relative Quantifizierung der Immunoblot-Signale	20
3.4.4 Statistische Auswertung der Immunoblot-Signale	21
3.5 Etablierung eines quantitativen Real-time Polymerase-Kettenreaktion- Meßverfahren (TaqMan PCR) für die Genexpression von sieben ausgewählten Proteasomuntereinheiten.....	22
3.5.1 Auswahl der Quantifizierungsmethode.....	22
3.5.2 Prinzip der TaqMan-PCR	22
3.5.3 Auswertungsmethode der TaqMan-PCR (ΔC_T -Methode).....	23
3.5.4 Auswahlkriterien für Primer und Sonden	24
3.5.5 Sequenzen der Primer und Sonden	25
3.5.6 RNA-Präparation und cDNA Synthese.....	25
3.5.7 Primertitration	26
3.5.8 Effizienzbestimmung	26
3.5.9 Durchführung der TaqMan PCR.....	27
3.6 Variabilitätsuntersuchung der Expression der internen Referenzgene HPRT, C3 ($\alpha 2$) und C9 ($\alpha 3$) zur Bestimmung ihrer Genexpressionstabilität in peripheren Blutmakrophagen.....	28
3.7 Statistische Analyse der TaqMan-Daten.....	28
3.8 Molekulargenetische Analyse des humanen LMP2 (<i>PSMB9</i>)-Promotors	29

4	Ergebnisse	30
4.1	Etablierung eines quantitativen Real-Time Meßverfahrens für die mRNA-Expression von LMP2 (β 1i), LMP7 (β 5i), MECL1 (β 2i), PA28 α , PA28 β , C3 (α 2), C9 (α 3) und HPRT mittels TaqMan PCR aus humanen peripheren Blutmakrophagen (PBMC)	30
4.2	Relative mRNA-Expression ausgewählter Immunoproteasom- und Proteasomaktivatoruntereinheiten in Kulturzellen nach Interferon- γ -Stimulation <i>in vitro</i>	32
4.3	Werte der gemessenen Expressionsparameter in humanen PBMC	35
4.4	Die mRNA-Expression konstitutiver, Immunoproteasom- und Proteasomregulator-Untereinheiten in PBMC unterliegt bei Autoimmunerkrankungen einer differentiellen Regulation	36
4.5	Die Hochdosis-Glukokortikoidtherapie zeigte bei SLE-Patienten keinen signifikanten Einfluß auf die Genexpression in PBMC	40
4.6	Regulation der Proteasom-Proteinexpression bei Autoimmunerkrankungen ..	41
4.7	Vergleich der relativen proteasomalen mRNA- und Proteinexpression	44
4.8	Molekulargenetische Analyse des LMP2 (<i>PSMB9</i>)-Gens beim primären Sjögren-Syndrom	45
5	Diskussion	48
5.1	Auswahl der Quantifizierungsmethode zur Analyse der Genexpression im proteasomalen System	48
5.2	Identifizierung geeigneter Haushalts-Gene zur quantitativen Analyse der Genexpression im proteasomalen System	50
5.3	Genregulation von LMP2 (β 1i)	51
5.4	Genregulation von LMP7 (β 5i)	52
5.5	Genregulation von MECL1 (β 2i)	56
5.6	Genregulation des Proteasomaktivator-Komplexes	57
5.7	Genregulation der konstitutiven Untereinheiten C3 (α 2) und C9 (α 3)	60
5.8	Genregulation des Immunoproteasoms beim primären Sjögren-Syndrom	62
5.9	Expressionsmuster bei anderen Autoimmunerkrankungen	63
5.10	Einschränkende Aspekte der Expressionsanalysen	64
6	Zusammenfassung	67
	Literatur	69
	Danksagung	83
	Lebenslauf	84
	Publikationsverzeichnis	85
	Erklärung an Eides Statt	87

Abstrakt

Das proteasomale System spielt eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle der Immunantwort, so dass sich die Frage nach einer möglichen Beteiligung des Proteasoms bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen stellt. Bei einer Reihe von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises wurde das Expressionsprofil ausgewählter proteasomaler Gene in peripheren mononukleären Zellen aus menschlichem Blut (PBMC) im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen untersucht.

Mit Hilfe der quantitativen Real-time RT-PCR wurde die mRNA-Expression der Untereinheiten des Proteasomaktivators PA28 alpha und PA28 beta und der konstitutiven Proteasom- sowie der Interferon- γ -induzierbaren Immunoproteasom-Untereinheiten in PBMC analysiert. Zugleich wurde auch die Proteinexpression ausgewählter Proteasom-Untereinheiten durch Immunoblots quantifiziert.

Als wesentliches Ergebnis konnte erstmalig eine Hochregulation der Immunoproteasom-Untereinheiten LMP2 (beta1i), LMP7 (beta5i), MECL1 (beta2i) sowie auch der Proteasomaktivatoruntereinheit PA28 alpha bei dem überwiegenden Teil der untersuchten Autoimmunerkrankungen auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die parallele Quantifizierung von mRNA- und Proteinexpression zeigte ein charakteristisches proteasomales Expressionsmuster beim primären Sjögren-Syndrom. Auf Transkriptebeleg waren die Interferon- γ -induzierbaren Untereinheiten LMP2 (beta1i), MECL1 (beta2i) und die Proteasomaktivator-Untereinheit PA28 alpha deutlich hochreguliert. Auf Proteinebene fand sich jedoch eine LMP2 (beta1i)-Defizienz, die auf eine signifikante Deregulation der proteasomalen Expression beim primären Sjögren-Syndrom hindeutet. In der direkten Sequenzanalyse des LMP2 (beta1i)-Promotors konnten keine genetischen Veränderungen nachgewiesen werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt eine Beteiligung des Proteasomsystems bei den entzündlichen Prozessen bei Autoimmunerkrankungen. Beim primären Sjögren-Syndrom ergaben sich Hinweise auf einen molekularen Defekt in der Expression der proteasomalen Untereinheit LMP2 (beta1i), dem möglicherweise eine Bedeutung in der Pathogenese dieses systemischen Krankheitsbildes zukommt.

Abstract

The proteasome system plays a pivotal role in the control of the immune response which raises the question of its possible involvement in the pathogenesis of autoimmune disorders. In the present study, we have focussed on expression profiling of selected proteasomal genes in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in a variety of autoimmune diseases compared to healthy individuals.

Using real-time quantitative RT-PCR, the mRNA expression pattern of the proteasome activator subunits PA28 alpha and PA28 beta and of constitutive proteasome and interferon- γ -inducible immunoproteasome subunits was analyzed in PBMC. Simultaneously, protein expression of selected proteasome subunits was quantified by immunoblotting.

As expected, under systemic inflammatory conditions the proteasome subunits LMP2 (beta1i), LMP7 (beta5i), MECL1 (beta2i), and PA28 alpha were expressed abundantly at the protein level in the vast majority of systemic autoimmune disorders. However, simultaneous mRNA and protein quantification revealed a characteristic proteasome expression signature in primary Sjögren's syndrome. At the transcript level, the interferon- γ -responsive subunits LMP2 (beta1i), MECL1 (beta2i), and the proteasome activator subunit PA28 alpha were markedly upregulated. In contrast, LMP2 (beta1i) deficiency was evident at the protein level indicating deregulation of proteasome expression in Sjögren's syndrome. Direct sequence analysis of the LMP2 (*PSMB9*) promoter region did not confirm any genetic alterations.

The present study provides the first evidence for a regulatory, molecular defect in the proteasome system in human autoimmune disorders implicating a unique role of LMP2 (beta1i) in the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome.

Abkürzungsverzeichnis

CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
ΔC_T	Differenz der Schwellenzyklen (cycle threshold) bei der TaqMan PCR
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRiPs	<u>d</u> efective <u>r</u> ibosomal <u>p</u> roducts
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemoluminescence
FCS	fötales Kälberserum (<u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum)
FAM	6-Carboxyfluorescein
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (<u>h</u> igh <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography)
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
IFN γ	Interferon- γ
kDa	Kilodalton (Einheit der Molekularmasse)
LMP	<u>L</u> ow <u>m</u> olecular weight <u>p</u> rotein
MHC	Major histocompatibility complex
M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MECL1	Multicatalytic endopeptidase-like 1
NTC	Kontroll-PCR ohne cDNA (<u>n</u> on <u>t</u> emplate <u>c</u> ontrol)
OD	optical density
PA28	Proteasom-Aktivator, Molekularmasse 28 kDa
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (<u>p</u> eripheral <u>b</u> lood <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ells)
PBS	physiologische Salzlösung in Phosphatpuffer (<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
pSS	primäres Sjögren-Syndrom
RA	rheumatoide Arthritis
RPMI	Medium für Leukozytenkulturen (entwickelt am <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
TAMRA	6-Carboxy- <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylrhodamin
T _m	Schmelztemperatur (melting temperature)
TAP	<u>t</u> ransporter <u>a</u> ssociated with antigen <u>p</u> resentation

1 GRUNDLAGEN

1.1 Struktur und Funktion des Proteasoms

Proteasomen bilden einen zentralen Teil des proteolytischen Systems der eukaryontischen Zelle (Rock et al., 1994) und spielen eine fundamentale Rolle beim Abbau von polyubiquitinierten zytosolischen, nukleären und membrangebundenen Proteinen zu kurzen Peptiden (Seufert und Jentsch, 1992; Plemper und Wolf, 1999). Der selektive, ATP-abhängige Proteinabbau ist essentiell für die Regulation basaler zellulärer Prozesse wie z. B. DNA-Reparatur, Transkription, Zellzyklus, Zelldifferenzierung oder die Entfernung fehlerhaft synthetisierter Proteine sowie auch komplexer Zellfunktionen. Hierzu gehören Apoptose, Stressantwort, zirkadianer Rhythmus, neuronale Morphogenese, Entstehung des Langzeitgedächtnisses und die Modulation der Immunantwort (Schubert et al., 2000; Kloetzel, 2001; Glickman und Ciechanover, 2002; Rock et al., 2002).

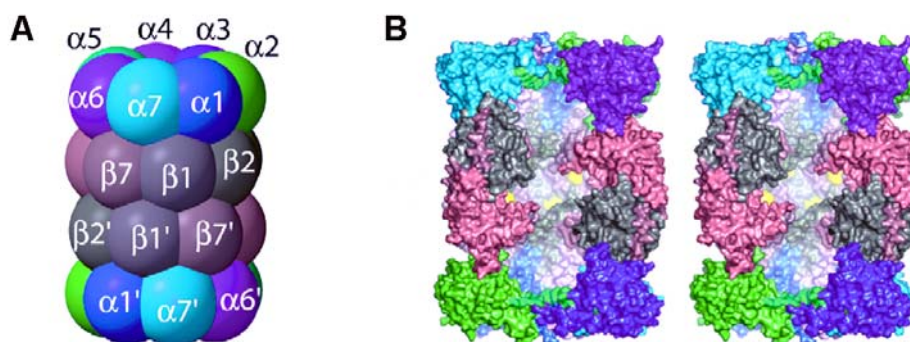


Abb. 1 Aufbau des 20S Proteasoms. A Schematische Seitenansicht. B Stereoansicht des abgeschlossenen katalytischen Innenraums (Anschnitt). Proteolytisch aktive, aminoterminalen Aminosäurereste katalytisch aktiver Untereinheiten ($\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$) sind gelb dargestellt (aus Rechsteiner und Hill, 2005)

Das 26S Proteasom, das für den selektiven intrazellulären Proteinabbau verantwortlich ist, besteht aus einem zylinderförmigen, katalytischen 20S Core-Komplex (Abb. 1), der an beiden Enden in Anwesenheit von ATP mit dem 19S Regulator-Komplex assoziiert ist (Abb. 2), der spezifisch polyubiquitinierte Proteinsubstrate bindet, zu ihrer Entfaltung beiträgt und sie in das proteolytische Kompartiment des 20S Core-Komplexes weiterleitet (Voges et al., 1999). Das 20S Proteasom besteht aus vier aufeinander gestapelten, heptameren Ringen. Die beiden äußeren Ringe setzen sich jeweils aus sieben verschiedenen, jedoch homologen α -Untereinheiten zusammen ($\alpha 1$ - $\alpha 7$), die mit

regulatorischen Faktoren und Komplexen in Wechselwirkung treten und den Zugang zum Innenraum des Proteasoms kontrollieren (Groll et al., 1997; Kohler et al., 2001). In jedem der beiden inneren Ringe, die jeweils aus sieben verschiedenen β -Untereinheiten (β 1- β 7) bestehen, befinden sich drei katalytisch aktive Untereinheiten β 1, β 2 und β 5 (Groll et al., 1997). Der 20S Proteasom-Komplex ist normalerweise in einem proteolytisch inaktiven, dem sogenannten latenten Zustand (Groll et al., 1997; Groll et al., 2000), da der Eingang in das Innere durch die Aminotermini der α -Untereinheiten versperrt wird. Hierbei spielt insbesondere α 3 (C9) eine zentrale Rolle durch Wechselwirkungen ihres Aminoterminus mit den Aminotermini der übrigen α -Untereinheiten.

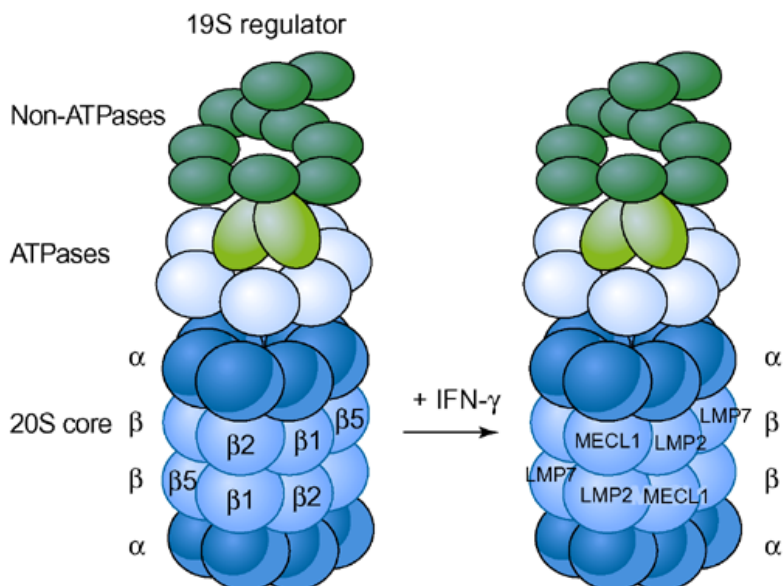


Abb. 2 Modell der 20S Kernstruktur des Proteasoms und des 19S Regulatorkomplexes. Das 20S Proteasom besteht aus insgesamt 28 einzelnen (14 verschiedenen) Untereinheiten mit einer Molekularmasse von jeweils 21-31 kDa. Der 19S Regulator kann an einer oder an beiden Seiten mit dem Proteasom assoziiert sein. Drei alternative, proteolytisch aktive Untereinheiten werden nach IFN γ -Exposition induziert. Diese sogenannten Immuno-Untereinheiten β 1i (LMP2), β 2i (MECL1) und β 5i (LMP7) werden in *de novo* synthetisierte Immunoproteasomen eingefügt und ersetzen die entsprechenden konstitutiven Untereinheiten β 1, β 2 und β 5 (aus Kloetzel und Ossendorp, 2004).

Die Biosynthese des eukaryontischen 20S Proteasom-Komplexes beginnt nach dem gegenwärtigen Modell mit der kooperativen Bildung eines heptameren α -Rings, der als Matrix für die schrittweise Anbindung der β -Untereinheiten β 2, β 3 und β 4 (13S Komplex) sowie nachfolgend β 1, β 5, β 6 und β 7 (16S Komplex) dient (Frentzel et al., 1994; Schmidtke et al., 1996; Nandi et al., 1997). Mit Ausnahme von β 3 und β 4 werden alle β -Untereinheiten als Vorläuferproteine mit aminoterminalen Propeptiden synthetisiert. Zunächst werden die Propeptide der katalytischen β -Untereinheiten *cis*-

autokatalytisch abgespalten und die aminoterminalen proteolytischen Aminosäurereste aktiviert. Die Propeptide der übrigen inaktiven Untereinheiten in *trans* von den benachbarten aktiven Untereinheiten entfernt (Chen und Hochstrasser, 1996; Schmidtke et al., 1996; Heinemeyer et al., 1997; Jager et al., 1999; Salzmann et al., 1999). Es wird angenommen, dass dieser letzte Schritt der Proteasom-Reifung während der späten Stadien der Komplexbildung innerhalb von zwei zusammengelagerten 16S Komplexen vonstatten geht, die bereits funktionale Prozessierung von Proteinen zeigen (Chen et al., 1996; Schmidtke et al., 1996; Heinemeyer et al., 1997). An der Komplexbildung und -reifung sind während der Vorstadien zusätzliche Proteinfaktoren beteiligt, darunter Chaperone-Proteine und das Proteasom-Reifungsprotein Protoassemblin/POMP (proteasome maturation protein) (Witt et al., 2000; Burri et al., 2000; Griffin et al., 2000). Für die weitere Reifung des Proteasomproteinkomplexes ist der kooperative Effekt mehrerer Chaperone-Proteine (PAC1-4) erforderlich (Hirano et al., 2006; Le Tallec et al., 2007).

Das 20S Proteasom wurde in der Vergangenheit auch als multikatalytische Protease bezeichnet (Wilk und Orłowski, 1983), da die drei aktiven Zentren innerhalb eines β -Rings verschiedene proteolytische Spezifitäten aufweisen. *In vitro*-Experimente mit kurzen Peptiden ergaben eine Chymotrypsin-ähnliche, eine Trypsin-ähnliche und eine Post-Glutamyl-Peptidyl-hydrolysierende (Caspase-ähnliche) Aktivität (Dahlmann et al., 1986; Cardozo, 1993; Orłowski et al., 1993; Kisselev et al., 2003). Die tatsächlich bevorzugten proteolytischen Spaltstellen, insbesondere innerhalb eines längeren, physiologischen Peptids, sind offenbar entscheidend von den unmittelbar benachbarten und den umgebenden Aminosäureresten abhängig (Shimbara et al., 1997; Nussbaum et al., 1998). Daher kann fast jeder Aminosäurerest – neben bestimmten bevorzugten Stellen – als proteolytische Spaltstelle dienen, so dass die Qualität des Peptidrepertoires des Proteasom-Komplexes sehr flexibel ist (Kloetzel, 2001). Die entstehenden Polypeptide und Peptide umfassen 3-22 Aminosäurereste, wobei die mittlere Länge etwa 8-9 Reste beträgt (Kisselev et al., 1998; Toes et al., 2001; Rock et al., 2002).

Das Proteasom wird durch Proteinkomplexe aktiviert, die an die endständigen heptameren Ringe binden, die aus α -Untereinheiten bestehen. Der am besten charakterisierte Proteinkomplex ist der 19S Regulator (PA700, Proteasomaktivator Molekularmasse 700 kDa), der sich aus zwei Subkomplexen, der sogenannten Basis und dem Deckel zusammensetzt. Die Basis besteht aus sechs verschiedenen ATPasen

der AAA-Familie (ATPasen assoziiert mit einer Vielzahl zellulärer Aktivitäten) und zwei weiteren Untereinheiten ohne ATPase-Aktivität. Der Basis-Subkomplex bindet an die äußeren α -Ringe, öffnet ATP-abhängig den Eingang des zylinderförmigen 20S Proteasoms, aktiviert damit die Proteolyse (Glickman et al., 2002) und unterstützt die Entfaltung von Proteinsubstraten (Braun et al., 1999; Strickland et al., 2000). Obwohl für diese Funktionen der Basis-Subkomplex ausreichend ist, spielt der Deckel-Subkomplex, der aus 10-11 Nicht-ATPase-Untereinheiten besteht, eine wichtige Rolle bei der Erkennung polyubiquitinerter Substrate und ist essentiell für ihren spezifischen Abbau. Er enthält Bindungsstellen für ubiquitinierte und nicht-ubiquitinierte Proteine sowie Enzyme für den Abbau und die Wiederverwertung von Ubiquitin-Ketten (Kloetzel, 2004a).

Der Proteasomaktivator PA28, der auch als 11S Regulator bezeichnet wird (Ma et al., 1992; Dubiel et al., 1992), ist ein heptamerer 180-200 kDa-Komplex, der aus den IFN γ -induzierbaren Untereinheiten PA28 α und PA28 β , wahrscheinlich in einer $\alpha_3\beta_4$ -Anordnung besteht (Knowlton et al., 1997). PA28 bindet ATP-unabhängig an die äußeren α -Ringe des Proteasoms und verstärkt *in vitro* die Hydrolyse kurzer Peptidsubstrate, indem es mindestens einen 19S Regulator-Komplex ersetzt und zur Bildung des sogenannten Hybrid-Proteasoms führt (Hendil et al., 1998; Kopp et al., 2001). Obwohl PA28 die proteolytische Spezifität unverändert läßt, kann es sowohl Qualität als auch Quantität des Peptidrepertoires beeinflussen (Groettrup et al., 1996; van Hall et al., 2000), wobei der Eintritt von Substraten oder der Austritt von prozessierten Peptidprodukten erleichtert wird (Stohwasser et al., 2000). Die ubiquitäre Expression von PA28 in allen Zelltypen höherer Eukaryonten läßt auf eine basale zelluläre Funktion schließen. Jedoch sind PA28 (*PSME1 und PSME2*)-Gen-defiziente Knock-out-Mäuse lebensfähig (Murata et al., 2001). Professionelle antigenpräsentierende Zellen zeigen eine hochgradige PA28-Expression in Übereinstimmung mit der beschriebenen Funktion dieses Proteinkomplexes bei der MHC Klasse I-Antigenprozessierung (Macagno et al., 1999).

1.2 Proteasomen in der Aktivierung und Regulierung der Immunantwort

Die Spezifität der adaptiven Immunantwort wird durch antigene Epitope bestimmt, die über MHC-Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert werden. Es werden zwei unterschiedliche Antigenprozessierungs- und Präsentationswege unterschieden. Zytosolische, endogen synthetisierte Proteine (auch von allen Viren, einigen Bakterien

und Autoantigene) werden nach zytosolischer proteolytischer Degradation über MHC Klasse I präsentiert. Dagegen werden exogene Epitope, die hauptsächlich aus extrazellulären Erregern stammen, über Endo- bzw. Phagozytose internalisiert, im Phagolysosomen-System inaktiviert, durch lysosomale Proteasen zu Peptiden degradiert und im Austausch gegen die invariante Kette eingelagert in MHC Klasse II-Moleküle an die Zelloberfläche transportiert. MHC Klasse II-Moleküle werden vor allem von professionellen Antigen-präsentierenden Immunzellen (APCs, antigen presenting cells) wie Makrophagen, dendritischen Zellen oder B-Lymphozyten exprimiert. Auch andere Zelltypen, insbesondere endotheliale Zellen, können nach Zytokininduktion (z. B. Interferon- γ) MHC Klasse II-Moleküle exprimieren. Ein Austausch von Antigenen zwischen beiden Prozessierungswegen wird als Kreuzpräsentation („cross presentation“) bezeichnet und stellt einen Schlüsselmechanismus in dendritischen Zellen dar, über den Fremdantigene präsentiert werden (Rock und Shen, 2005).

Das Immunsystem bedient sich der Peptidprodukte des proteasomalen Proteinabbaus, um das Vorkommen von Viren und anderen intrazellulären Parasiten zu überwachen (Rock et al., 2002; Kloetzel, 2004a). Der MHC Klasse I-Antigenpräsentationsweg ermöglicht zytotoxischen T-Zellen (CTL), den Proteingehalt einer Körperzelle qualitativ in Form von kurzen Proteinfragmenten zu überprüfen, die über MHC Klasse I-Moleküle präsentiert werden (Shastri et al., 2002). MHC Klasse I-Moleküle werden auf der Oberfläche von allen kernhaltigen Zellen exprimiert, insbesondere auch auf spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen. Die Präsentation antigener Peptide auf der Zelloberfläche durch MHC Klasse I ist die Voraussetzung für eine effiziente Induktion und Effektorfunktion zytotoxischer T-Zellen sowie für die Selektion des Repertoires zytotoxischer T-Zellen. Weniger als zehn MHC Klasse I-Peptidkomplexe an der Zelloberfläche, die durch spezifische, komplementäre T-Zell-Rezeptoren erkannt werden, können ausreichen, um eine Immunantwort der entsprechenden CTLs, die auch als CD8+ T-Zellen bezeichnet werden, zu aktivieren (Lehner, 2003).

Eine repräsentative Gesamtheit der endogenen Peptide einer Zelle, die zur effizienten Oberflächenpräsentation über den MHC Klasse I-Komplex benötigt wird, entsteht in einem mehrstufigen Prozeß, der das Zusammenwirken mehrerer proteolytischer Systeme erfordert. Das Proteasom besitzt eine Schlüsselfunktion bei der Bereitstellung einer Vielfalt von Peptiden, von denen ein wesentlicher Teil aus neu synthetisierten Proteinen stammt, die als fehlerhaft synthetisierte Proteine, sogenannte DriPs (defective ribosomal products) rasch ubiquitiniert und der Proteolyse unterworfen

werden (Schubert et al., 2000). Der Anteil der DriPs an den neu synthetisierten Proteinen einer Zelle wird zwischen 25-30% veranschlagt. Die Proteinbiosynthese ist essentiell für die Erzeugung von MHC Klasse I-Epitopen, so dass die DriP-Hypothese bestätigt werden konnte (Princiotta et al., 2003). Durch den Abbau von DriPs können nicht nur Proteine, die einem schnellen metabolischen Umsatz unterliegen, sondern auch Peptide, die aus selten vorkommenden, unterrepräsentierten oder metabolisch sehr stabilen oder kompartmentalisierten Proteinen stammen, für den MHC Klasse I-Präsentationsweg bereitgestellt werden (Kloetzel und Ossendorp, 2004). Auch regulatorische Proteine, die für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase essentiell sind, unterliegen der proteasomalen Proteolyse. Das Proteasom erzeugt in der Regel den Carboxyterminus der meisten MHC Klasse I-Liganden. Am Aminoterminal ist jedoch noch häufig eine weitere Verkürzung durch Aminopeptidasen erforderlich, die sich im Cytosol oder im Endoplasmatischen Retikulum (ER) befinden (Beninga et al., 1998; Fruci et al., 2001; Knuehl et al., 2001; Fruci et al., 2003). Diejenigen Vorläufer-Peptide, die für den MHC Klasse I-Präsentationsweg bestimmt sind, d.h. eine passende Länge und Aminosäurezusammensetzung haben, binden an den Transporterkomplex TAP (transporter associated with antigen processing) in der Membran des ER und werden effizient in das Lumen des ER transportiert. Hier sind weitere Aminopeptidasen lokalisiert, die Vorläufer-Peptide verkürzen können (Kloetzel et al., 2004; Rock et al., 2004). Im ER erfolgt die Peptid-induzierte Stabilisierung und Komplexbildung von MHC Klasse I-Trimeren. Danach wird das mit einem Peptid beladene MHC-Molekül an die Zelloberfläche transportiert. Die Assoziation des antigenen Peptids mit dem MHC Klasse I-Molekül erfolgt über die Seitenketten der Aminosäurereste in Taschen innerhalb der Peptidbindungsstelle des MHC-Proteins (Madden, 1995). Die Spezifität dieser Wechselwirkung wird über sogenannte Anker-Reste vermittelt, von denen sich einer sehr häufig am Carboxyterminus befindet, während ein oder zwei weitere Anker-Reste in der Nähe des Aminoterminal lokalisiert sind (Krüger et al., 2003).

Während die meisten Funktionen des Proteasoms Peptidspaltungsaktivität aber keine besondere proteolytische Spezifität erfordern, werden bei der Entstehung von MHC Klasse I-Liganden hochgradig spezifische Spaltstellen benutzt (Sijts et al., 2001). Unter dem Einfluß des proinflammatorischen Zytokins Interferon- γ (IFN γ) ändert sich die proteolytische Spezifität des Proteasoms entscheidend (Aki et al., 1994; Boes et al., 1994; Nandi et al., 1997; Stohwasser et al., 1997). Die eukaryontische Zelle besitzt drei

fakultative, IFN γ -induzierbare katalytische Proteasomuntereinheiten, LMP2 (β 1i), MECL1 (β 2i) und LMP7 (β 5i), die in neugebildete 20S Komplexe kooperativ integriert werden und somit die entsprechenden drei konstitutiven katalytischen Untereinheiten ersetzen (Fruh et al., 1994). Konservierte Interferon-stimulierte Aktivierungselemente (ISREs, interferon stimulated response elements) sind im Promotor aller drei induzierbaren Untereinheiten nachgewiesen worden. Antigene Peptide können sowohl von konstitutiven Proteasomen als auch von den sogenannten Immunoproteasomen produziert werden, die LMP2 (β 1i), MECL1 (β 2i) und LMP7 (β 5i) enthalten.

Allerdings scheint sich das Peptidrepertoire, das von Immunoproteasomen im Vergleich zu konstitutiven Proteasomen produziert wird, quantitativ und qualitativ zu unterscheiden, da sich proteolytische Spezifität und die Häufigkeit mit der bestimmte Spaltstellen benutzt werden nur teilweise überlappen (Cascio et al., 2001; Toes et al., 2001). Diese Prozessierungsunterschiede können eine zytotoxische T-Zellantwort gegenüber infizierten Zellen oder Tumorzellen verstärken oder abschwächen (Morel et al., 2000; Schwarz et al., 2000; van Hall et al., 2000; Sijts et al., 2000a; Sijts et al., 2000b; Chen et al., 2001).

Zusammenfassend besteht aufgrund von genetischen, molekulargenetischen und biochemischen Daten gegenwärtig der Konsens, dass das proteasomale System für den größten Teil der MHC Klasse I-Liganden verantwortlich ist (Kloetzel, 2001; Rock et al., 2002; Kloetzel, 2004b). In besonderen Fälle können jedoch auch andere Proteasen wie etwa die Tripeptidylaminopeptidase II (TPPII), die Thimet-Oligopeptidase (TOP) und andere Metallopeptidasen antigene Peptide erzeugen (Goldberg et al., 2002; Levy et al., 2002; Saveanu et al., 2002; Rock et al., 2004; Saric et al., 2004). Aufgrund ihrer selektiven proteolytischen Spezifität können sie jedoch nur einen begrenzten Anteil zur Gesamtheit der MHC Klasse I-Peptide beitragen.

1.3 Pathogenese von Autoimmunerkrankungen

Die systematische Klassifizierung von Autoimmunerkrankungen hat sich als schwierig erwiesen, da vielfach die ätiologischen molekularen Pathomechanismen nicht abschließend geklärt sind. Dennoch werden zwei große Gruppen unterschieden, die organspezifischen und die systemischen Erkrankungen (Lipsky, 2001). Bei organspezifischen Autoimmunerkrankungen ist die Immunantwort gegen eine begrenzte Zahl gewebsspezifischer Autoantigene gerichtet, während bei systemischen Autoimmunerkrankungen eine globale Fehlregulation der Immunantwort angenommen

wird. Bei allen Autoimmunerkrankungen wird ein Zusammenbruch der immunologischen Toleranz gegen körpereigene Antigene beobachtet. Die Induktion und Aufrechterhaltung der Toleranz werden durch eine Vielzahl molekularer und zellulärer Wechselwirkungen reguliert (Marrack et al., 2001; Davidson und Diamond, 2001; Yasutomo, 2003). Die grundlegenden regulatorischen Mechanismen, die bei den einzelnen Autoimmunerkrankungen fehlgeleitet werden, sind bislang noch nicht vollständig aufgeklärt und Gegenstand intensiver Forschung (Yasutomo, 2003).

Ein Schlüsselfaktor bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen ist das verfügbare T-Zellrepertoire, das durch Interaktionen mit autologen Peptid-MHC-Komplexen im Thymus und in peripheren Geweben modifiziert wird (Ohashi, 2002). Es wird vermutet, dass Autoimmunität bei Defekten der regulatorischen T-Zellen, Störungen der peripheren T-Zell-Toleranz oder bei Antigenverwandschaft zwischen körpereigenen und bakteriellen bzw. viralen Proteinen (molekulares Mimikry) entsteht. Veränderungen der Komponenten der T-Zell-Signal-Transduktion, die inhibitorische T-Zell-Signalwege oder das Überleben von T-Zellen beeinflussen, können die Entwicklung von Autoimmunität fördern. Auch professionelle Antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen, sind an der Pathogenese der Autoimmunität beteiligt. Während reife dendritische Zellen die Entwicklung von T-Effektorzellen induzieren, scheinen unreife dendritische Zellen die periphere Immuntoleranz aufrechtzuerhalten. Auch B-Zellen können eine entscheidende Rolle in der Pathogenese systemischer Autoimmunerkrankungen spielen, nicht nur durch die Autoantikörperproduktion, sondern auch bei der Zytokinsekretion. Die B-Zellantwort wird durch regulatorische Oberflächenmoleküle in der B-Zellmembran verstärkt oder abgeschwächt. Einer der stärksten positiven Regulatoren ist CD19, der eine wichtige Funktion bei der Signaltransduktion der B-Zelle besitzt.

Der **systemische Lupus erythemathodes (SLE)** gehört zu den chronischen autoimmunen Systemerkrankungen, von der hauptsächlich junge Frauen betroffen sind. Die Erkrankung ist mit der Bildung einer Reihe von Autoantikörpern assoziiert, insbesondere mit antinukleären Antikörpern (ANA), die z. B. gegen DNA, Nukleosomen und Ribonukleoproteinkomponenten des Spleißosomenkomplexes gerichtet sind (Hochberg, 1997; Vyse und Kotzin, 1998; Wakeland et al., 2001). Komplementdefekte gehören zum größten genetischen Risikofaktor, SLE zu entwickeln, und korrelieren mit einer beeinträchtigten Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen *in vivo* (Taylor et al., 2000). Es wird angenommen, dass die Autoantigene bei SLE im

wesentlichen aus untergegangenen Zellen stammen. Eine unvollständige Komplementaktivierung gegen diese Zellen könnte auf einen ätiologischen Zusammenhang zwischen hereditärer Komplementdefizienz und der Pathogenese des SLE hindeuten. In einem Mausmodell mit fehlender c-mer Membran-Tyrosinkinase, entwickelt sich ein Phagozytosedefekt (Scott et al., 2001). Die Mäuse zeigen einen beeinträchtigten Abbau infundierter apoptotischer Zellen, der zu einem progressiven Lupus-ähnlichen Autoimmunsyndrom führt mit positivem Antikörpernachweis gegen Chromatin, DNA und IgG (Cohen et al., 2002).

Das **primäre Sjögren-Syndrom** ist eine chronisch-entzündliche autoimmune Erkrankung exokriner Drüsen, die vor allem die Speichel- und Tränendrüsen betrifft und zum funktionellen Epithelverlust, verminderter exokriner Funktion und schrittweisem Beginn von Keratokonjunktivitis sicca und Xerostomie führt (Sicca-Syndrom). Mehr als die Hälfte der Patienten entwickeln systemische Beschwerden mit Organschädigung von Lunge, Nieren, Leber, des blutbildenden Systems, der kleinen Gefäße oder der Haut (Venables, 2004). Bei etwa 5% der Patienten bilden sich Lymphome im Verlauf der Erkrankung (Voulgarelis et al., 1999). Charakteristisch ist die systemische Produktion antinukleärer Autoantikörper gegen die Ribonukleoproteinpartikel SS-A/Ro und SS-B/La (Fox et al., 2000). Zu den wichtigsten molekularen Mechanismen, die in der Ätiologie der Erkrankung diskutiert werden, gehören eine genetische Prädisposition durch HLA-Haplotypen (Reveille et al., 1991; Anaya et al., 2002), eine geschlechtsspezifisch veränderte Hormonregulation (Sullivan et al., 2002), Abweichungen im Proteinabbau über den Ubiquitin-Proteasom-Weg (Feist et al., 1999; Egerer et al., 2002; Fukuda-Kamitani und Kamitani, 2002), eine aberrante CD4+ T-Lymphozytenaktivierung (Tsunawaki et al., 2002), eine fehlerhafte B-Zelldifferenzierung (Bohnhorst et al., 2002; Dörner et al., 2002; Leadbetter et al., 2002) und eine gestörte Regulation der Apoptose in exokrinen Zellen (Bolstad et al., 2003). Es wird allgemein angenommen, dass der Entwicklung von Lymphomen beim primären Sjögren-Syndrom ein mehrstufiger Prozeß zugrunde liegt, der in lymphoepithelialen Läsionen im Rahmen der Erkrankung seinen Anfang nehmen kann (Jaffe, 2002). Hierbei könnten die antigenbedingte B-Zell-Aktivierung und eine begleitende Onkogenaktivierung zur malignen Transformation lymphatischer Zellen beitragen (Masaki und Sugai, 2004).

Die **systemische Sklerose** (SSc) oder auch Sklerodermie ist eine autoimmune rheumatische Multisystemerkrankung, die durch überschießende Kollagenablagerungen in der Haut und einer Reihe von inneren Organen, generalisierte Gefäßläsionen und

eine abnorme Lymphozytenaktivierung gekennzeichnet ist, die zur Autoantikörperproduktion und Zytokinsekretion führt (Furst und Clements, 1997). Im Tiermodell führt die konstitutive Aktivierung des CD19-Signalwegs bei Mäusen neben einer Hautfibrose zum Zusammenbruch der peripheren B-Zelltoleranz und zur spontanen Autoantikörperproduktion (Sato et al., 1996; Inaoki et al., 1997). Bei mehr als 90% der SSc-Patienten finden sich antinukleäre Autoantikörper, z. B. gegen DNA-Topoisomerase I, RNA-Polymerasen, U1 RNP, U3 RNP, Th/To und Histone (Okano, 1996). Es wird angenommen, dass die Autoantikörper in engem Zusammenhang mit der Pathogenese der SSc stehen, da sie regelmäßig auftreten und klinisch spezifisch mit Untergruppen der Erkrankung sowie der Krankheitsaktivität korrelieren (Sato et al., 2004).

Die idiopathischen inflammatorischen Myopathien, zu denen die **Dermatomyositis** und die **Polymyositis** gehören, sind autoimmune, entzündliche Muskelerkrankungen. Typischerweise entwickelt sich über Wochen oder Monate eine proximale, oft symmetrische Muskelschwäche. Histologisch sind für die Dermatomyositis perivaskuläre bzw. perifaszikuläre entzündliche Infiltrate pathognomonisch (Dalakas, 2004). Die Aktivierung der Komplementkaskade führt zur Bildung des Membranangriffskomplexes in endomysialen Kapillaren mit nachfolgender osmotischer Lyse der Endothelzellen, Kapillarnekrone, Ischämie, Mikroinfarkten, Entzündung, endofaszikulärer Hypoperfusion und schließlich perifaszikulärer Atrophie der Muskelfasern (Dalakas und Hohlfeld, 2003). Bei der Polymyositis finden sich zytotoxische, endomysiale T-Zellen, die gegen autologe Myotuben *in vitro* reaktiv sind (Hohlfeld und Engel, 1994), die klonale Vermehrung autoinvasiver T-Zellen sowie eine Einschränkung der benutzten T-Zellrezeptorgene (Nishio et al., 2001; Hofbauer et al., 2003), eine Erhöhung kostimulatorischer Moleküle (Behrens et al., 1998; Murata und Dalakas, 1999) und die Sekretion von Perforin-Granula durch autoinvasive CD8+ T-Zellen, die die Lyse von Muskelfasern zur Folge haben (Goebels et al., 1996). Die Erhöhung von Cytokinen, Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen steigert die Transmigration von T-Zellen aus der Blutzirkulation in den Muskel (Figarella-Branger et al., 2003). Zusammenfassend wird die Polymyositis als eine MHC Klasse I-restringierte, T-Zell-vermittelte und durch ein Antigen oder mehrere Antigene aktivierte Erkrankung gesehen, bei der Muskelzellen zu antigenpräsentierenden Zellen werden (Wiendl et al., 2003). Es ist jedoch nach dem gegenwärtigen Wissensstand noch unklar, welche Faktoren die Aktivierung der Komplementkaskade bei der Dermatomyositis auslösen

oder die T-Zellaktivierung bei der Polymyositis induzieren. Bei etwa 20% der Dermatomyositis oder Polymyositis-Patienten werden Autoantikörper gegen Ribonukleoproteine (tRNA-Synthetasen und Signal recognition particle) nachgewiesen. Obwohl diese Autoantikörper als myositisspezifisch gelten, sind sie weder pathogen noch gewebsspezifisch (Dalakas et al., 2003). Ein relevantes Autoantigen konnte bislang bei Myositiden nicht identifiziert werden, so dass auch verschiedene Tiermodelle keine schlüssigen Hinweise auf die molekulare Pathogenese der Erkrankung gaben. Eine experimentelle Myositis wurde in Mäusen durch die Immunisierung mit Myosin erzeugt. Histopathologisch fanden sich sehr ähnliche inflammatorische Zeichen wie bei der humanen Erkrankung. Die Tiere entwickelten zwar Myosin-spezifische T-Zellen, jedoch konnte auch im Verlauf der Erkrankung keine funktionelle Einschränkung der Muskelkraft nachgewiesen werden, die ein essentielles diagnostisches Kriterium der Myositiden beim Menschen darstellt (Nemoto et al., 2003).

Die **primären Vasculitiden** umfassen eine große, heterogene Gruppe von Syndromen, denen immunreaktiv ausgelöste Gefäßentzündungen zugrunde liegen, die zur Schädigung der betroffenen Organe führen. Die Lokalisation und das Ausmaß der betroffenen Gefäße und Organe bestimmen das Spektrum der klinischen Symptome. Die Konstellation der klinischen Befunde, der Labordiagnostik, der Biopsie und der Angiographie – falls indiziert – erlauben meist die Diagnose eines spezifischen Syndroms. Nach der Klassifikation von 1994, Chapel Hill Consensus Conference (Jennette et al., 1994), werden die primären Vasculitis-Syndrome entsprechend der Größe der betroffenen Gefäße eingeteilt. Zu den Vasculitiden kleiner Gefäße gehören die Wegenersche Granulomatose, das Churg-Strauss-Syndrom, die mikroskopische Panarteriitis, die Purpura Schönlein-Henoch, die Vasculitis bei essentieller Kryoglobulinämie und die kutane leukozytoklastische Angiitis. Die Vasculitiden mittelgroßer Gefäße schließen die klassische Panarteriitis und den M. Kawasaki ein. Die Vasculitis großer Gefäße umfaßt die Riesenzell-Arteriitis (Arteriitis temporalis) und die Takayasu-Arteriitis. Bei den primären Vasculitiden wird eine multifaktorielle Autoimmunpathogenese angenommen, wobei die genetische Prädisposition, Umweltfaktoren und immunregulatorische Mechanismen im Zusammenhang mit der Immunantwort gegenüber bestimmten Antigenen eine wichtige Rolle spielen. Drei wesentliche pathogenetische Mechanismen werden diskutiert: Pathogene Immunkomplexbildung, antineutrophile cytoplasmatische Antikörper (ANCA) und eine aberrante CD4+ T-Zellantwort.

Die **Rheumatoide Arthritis** ist eine häufige chronisch-entzündliche Multisystemerkrankung mit einer Prävalenz von ca. 0,5 bis 1% in Mitteleuropa. Charakteristisch ist eine chronische Synovialitis, die zu Arthritis, Bursitis und Tendovaginitis führt, Knorpelschädigung und Knochenerosionen verursacht und meistens in einem symmetrischen Verteilungsmuster mehrere kleine, aber auch große Gelenke betrifft (Tran et al., 2005). In Familienuntersuchungen fanden sich Hinweise auf eine genetische Prädisposition im Zusammenhang mit bestimmten HLA-D Allelen des MHC Klasse II-Komplexes. Die Ätiologie der Erkrankung ist unbekannt. Die Rolle infektiöser Mikroorganismen wird zur Zeit kontrovers diskutiert. Die entzündlichen Infiltrate in der Synovia bestehen vor allem aus T-Lymphozyten, wobei die CD4+ T-Zellen gegenüber den CD8+ T-Zellen überwiegen, die sich oft in der unmittelbaren Nähe von HLA-DR+ Makrophagen und dendritischen Zellen finden (Lundy et al., 2007). B-Zellen und Antikörper-produzierende Plasmazellen finden sich ebenfalls in den Infiltraten, die polyklonale Immunglobuline und Autoantikörper sezernieren und zur lokalen Bildung von Immunkomplexen führen. Auch aktivierte Mastzellen, die bei RA in die Synovia einwandern, tragen zur Entzündungsreaktion bei. Aktivierte synoviale Fibroblasten unterstützen die Zerstörung der Gelenkssubstanz durch die Produktion von Proteasen, wie z. B. Collagenase und Cathepsine. Untersuchungen bei RA-Patienten und verschiedenen Tiermodellen, wie der Collagen-induzierten Arthritis (CIA) oder Mäusen, die ein humanes Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α -Transgen exprimieren, haben gezeigt, dass die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und Interleukin (IL)-1 eine Schlüsselrolle einnehmen (Keffer et al., 1991; Feldmann et al., 1996; Mori et al., 1996). Entscheidende Fortschritte in der Therapie der RA wurden in den vergangenen 10 Jahren durch den aggressiveren Einsatz von Basistherapeutika (DMARDS, disease modifying anti-rheumatic drugs) und neu entwickelten Immuntherapien (Biologika) erreicht (Edwards, 2005). Zu den bereits zugelassenen Biologika gehören TNF α -Blocker, IL-1-Rezeptorantagonisten, anti-CD20-Antikörper und ein CTLA4-Ig-Co-Stimulationsblocker.

1.4 Das Proteasom bei Autoimmunerkrankungen

Das proteasomale System spielt eine zentrale Rolle bei der Aktivierung und Regulierung der Immunantwort. Daher kann eine Rolle in der Ätiologie oder der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, denen eine Fehlregulation des Immunsystems zugrunde liegt, angenommen werden. Nach derzeitigem Wissensstand

gibt es nur wenige, gesicherte Erkenntnisse über veränderte strukturelle und funktionelle Eigenschaften des Proteasoms bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. Untersuchungen von Arribas et al. (1991) ergaben erste Hinweise auf eine humorale anti-proteasomale Autoimmunantwort bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes (SLE). In neueren Studien konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (Feist et al., 1996; Feist et al., 1999; Feist et al., 2000; Feist et al., 2003). Darüber hinaus fand sich bei Patienten mit SLE, primärem Sjögren-Syndrom und idiopathischer inflammatorischer Myopathie häufig eine humorale Autoimmunantwort (IgG) gegen bestimmte Proteasom-Untereinheiten. Bei diesen Erkrankungen war C9 (α_3), eine konstitutive α -Typ-Untereinheit, als Zielantigen von größter Bedeutung. Zusätzlich fanden sich beim primären Sjögren-Syndrom noch Autoantikörper gegen weitere α - und auch proteolytisch aktive β -Typ Untereinheiten (Feist et al., 2000). Verlaufsuntersuchungen der anti-proteasomalen Antikörpertiter zeigten bei SLE und autoimmun bedingter Myositis sogar eine positive Korrelation mit der Krankheitsaktivität (Feist et al., 2000). Autoantikörper gegen die Proteasom-Aktivatoruntereinheit PA28 α fanden sich sowohl beim systemischen Lupus erythematodes als auch beim primären Sjögren-Syndrom (Matsushita et al., 2004). Beim Typ I Diabetes mellitus finden sich bei Erkrankungsbeginn nicht nur β -Zell-Antikörper, sondern auch Autoantikörper gegen das 20S-Proteasom (Kordonouri et al., 2004). Zusammenfassend zeigte sich, dass das Proteasom ein häufig vorkommendes autoimmunes Zielantigen bei systemischen wie auch gewebsspezifischen Autoimmunerkrankungen darstellt. Die molekularen Mechanismen der Autoantikörperinduktion sind nicht vollständig geklärt. Es fanden sich jedoch Hinweise, dass die immunologische Toleranz durchbrochen werden kann durch Exposition gegenüber pathologisch freigesetztem Antigen, z. B. im Rahmen von Apoptose.

Die Produktion von Autoantikörpern läßt nicht unmittelbar darauf schließen, dass das Zielantigen eine ätiologische Rolle in der Pathogenese oder im Krankheitsverlauf spielt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Autoantikörperbildung ein Epiphänomen (bystander phenomenon) darstellt.

Bei einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen wurden im Serum der Patienten erhöhte Spiegel von zirkulierenden Proteasomen nachgewiesen (Egerer et al., 2002), die sensitive Marker des autoimmunen Entzündungsprozesses sind und das Ausmaß der Gewebsschädigung reflektieren. Signifikant erhöht waren zirkulierende Proteasomen bei systemischen Autoimmunprozessen, insbesondere bei idiopathischer

inflammatorischer Myopathie, primärem Sjögren-Syndrom und Rheumatoider Arthritis, im Vergleich zu organspezifischen Autoimmunerkrankungen wie der Myasthenia gravis oder dem CREST-Syndrom.

Bei der Pathogenese der Autoimmunthyreoiditis Hashimoto wird der mögliche Einfluß einer allelischen R60H Variante des LMP2 (*PSMB9*)-Gens diskutiert (Ding et al., 2002; Mishto et al., 2006).

Immunhistochemische Analysen von Schilddrüsengewebe bei der Autoimmunthyreoiditis Hashimoto ergaben erste Hinweise auf eine verstärkte Expression von LMP2 (β 1i) und LMP7 (β 5i) (Vives-Pi et al., 1997). *In vitro* fand sich in humanen Endothelzellen eine Zytokin-abhängige Genregulation der Immunproteasom-Untereinheit LMP7 (β 5i) (Loukissa et al., 2000). Bei Patienten mit unbehandelter juveniler Dermatomyositis fand sich - neben anderen IFN γ -induzierbaren Genen - eine signifikant erhöhte Genexpression der Immunproteasom-Untereinheit LMP2 (β 1i) (Tezak et al., 2002). In der NOD (non obese diabetic)-Maus, einem Tiermodell für das Sjögren-Syndrom und den Diabetes mellitus Typ I, unterliegen lymphoide Zellen vermehrt dem programmierten Zelltod, der Apoptose. Ein genetischer Defekt in der Promotorregion des LMP2 (*PSMB9*)-Gens wurde für eine verringerte Expression von LMP2 (β 1i) verantwortlich gemacht, die zu einer beeinträchtigten Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) führt, der die Zelle vor Apoptose schützt, die durch den Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α) vermittelt wird (Hayashi und Faustman, 2003; Kuhlreiber et al., 2003).

Angesichts der Ergebnisse dieser Vorarbeiten kann angenommen werden, dass das Proteasom eine unter pathologischen Bedingungen veränderte katalytische Spezifität zeigt, die aberrante, zelleigene Antigene erzeugen kann, die möglicherweise eine autoimmun-vermittelte, zytotoxische T-Zellantwort einleiten. Des weiteren kann gegenüber dem Proteasom selbst in bislang unbekannter Weise ein Toleranzverlust der systemischen, humoralen B-Zell-vermittelten Immunität ausgelöst werden, der sich in der Autoantikörperproduktion gegen Proteasom-Untereinheiten manifestiert.

2 PROBLEMSTELLUNG

In der klinischen Praxis stellt die langfristige Therapie von Autoimmunerkrankungen, insbesondere von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, oft eine schwierige Herausforderung dar. Autoimmunerkrankungen verlaufen fast immer chronisch-progredient, führen zu einer oft irreversiblen Zerstörung der betroffenen Organe und sind im Fall einer systemischen Beteiligung häufig mit einem schwerwiegenden und lebensbedrohlichen Krankheitsverlauf verbunden. Während die akute Krankheitsmanifestation durch eine Kombination von immunsuppressiven und immunmodulatorischen Therapiestrategien ausreichend gut behandelt werden kann, bleibt der Therapieerfolg im mittelfristigen und langfristigen Verlauf unbefriedigend.

Im Hinblick auf die klinische Relevanz von Autoimmunerkrankungen und ihre große gesundheitsökonomische Bedeutung ist ein tiefergehendes Verständnis der komplexen, molekularen Mechanismen essentiell, um neue, effiziente, krankheitsspezifische und zugleich nebenwirkungsarme Therapiestrategien zu entwickeln. Einen zentralen pathogenetischen und therapeutischen Ansatzpunkt bietet das Ubiquitin-Proteasom-System.

Das Proteasom erzeugt den überwiegenden Teil der immunogenen Peptide, die über den MHC Klasse I-Weg zirkulierenden T-Zellen präsentiert werden, die direkt oder indirekt eine Immunreaktion oder Immuntoleranz regulieren. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei Autoimmunerkrankungen relevante Autoantigene überwiegend durch das Proteasom über den proteolytischen Abbau von endogenen, intrazellulären Proteinen generiert werden. Angesichts der bekannten Hochregulation proinflammatorischer Zytokine im Rahmen pathologischer Autoimmunität kann eine Induktion von Immunoproteasomen angenommen werden.

2.1 Proteasomale Genexpression bei Autoimmunerkrankungen

Systematische, experimentelle proteasomale Genexpressionsanalysen beim Menschen und insbesondere bei Autoimmunerkrankungen fehlen bislang. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Screeningverfahren entwickelt, das die Patienten kaum belastet, um die Expression ausgewählter Interferon-induzierbarer und konstitutiver Proteasom-Untereinheiten in PBMC aus peripherem Blut zu quantifizieren. Die Genexpression von LMP2 ($\beta 1i$), LMP7 ($\beta 5i$), MECL1 ($\beta 2i$), PA28 α , PA28 β , C3 ($\alpha 2$) und C9 ($\alpha 3$) wurde auf mRNA-Ebene bei Autoimmunpatienten und gesunden Kontrollspendern gemessen.

Nach statistischer Auswertung der Meßergebnisse soll folgenden Fragen nachgegangen werden:

1. Läßt sich die Hypothese der „Hochregulation des Immunoproteasoms bei klinisch aktiver Autoimmunerkrankung“ bestätigen?
2. Lassen sich differentielle, krankheitsspezifische Genexpressionsmuster erkennen?
3. Gibt es Hinweise auf Regulationsdefekte der proteasomalen Genexpression bei Autoimmunerkrankungen?

Die Untersuchung von Normalspendern soll zunächst Vergleichswerte zur (Immuno-) Proteasomexpression in PBMC bei Gesunden liefern, über die bislang keine systematischen Daten vorliegen. Falls sich Hinweise auf eine differentielle proteasomale Genregulation finden, können krankheitsspezifische Expressionsprofile erkannt werden, die bedeutsam für die Pathogenese sein könnten.

2.2 Proteasomale Proteinexpression bei Autoimmunerkrankungen

Die mRNA-Expressionsanalyse erlaubt keine sicheren Rückschlüsse auf das proteasomale Proteinexpressionsprofil. Deshalb soll parallel zur mRNA-Analyse eine Quantifizierung der gleichen Proteasomuntereinheiten wie in 2.1 auf Proteinebene bei Patienten und gesunden Kontrollspendern durchgeführt werden, um die folgenden Fragestellungen zu bearbeiten:

1. Findet sich eine krankheitsspezifisch veränderte proteasomale Proteinexpression?
2. Lassen sich bedeutsame Zusammenhänge oder Defekte bei der vergleichenden Beurteilung von Transkription und Translation erkennen?
3. Gibt es Hinweise auf Überexpression von bestimmten Proteasomuntereinheiten?

Mit Hilfe von Western Blot-Analysen soll geklärt werden, ob Immunoproteasom-Untereinheiten bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises in PBMC exprimiert werden. Des weiteren sollen qualitative und quantitative Veränderungen in der Zusammensetzung der Proteasompopulation, insbesondere auch im Hinblick auf den Proteasomaktivator-Subkomplex PA28 in PBMC untersucht werden.

Diese bislang neue Zusammenschau der relativen mRNA- und Proteinexpressionsprofile läßt interessante Erkenntnisse über die Regulation der Proteasom-Expression, insbesondere über einen möglichen Zusammenhang von Transkription und Translation der (Immuno-)Proteasom-Untereinheiten erwarten.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Klinische Daten der untersuchten Patienten mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises und einer repräsentativen Kontrollgruppe

Die klinischen Untersuchungen der Patienten erfolgten in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin. Die vorliegende Studie wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt. Die erforderlichen Blutentnahmen wurden im Rahmen der Routineblutentnahmen durchgeführt. Eine Einverständniserklärung wurde von allen Patienten eingeholt, die in die Untersuchungen eingeschlossen wurden: 26 Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (23 weiblich, 3 männlich; Alter 25-70 Jahre, Durchschnitt 45,5 Jahre), 6 Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom (alle weiblich; Alter 31-64 Jahre, Durchschnitt 56,3 Jahre), 4 Patienten mit Sklerodermie (3 weiblich, 1 männlich; Alter 36-72 Jahre, Durchschnitt 57,5 Jahre), 4 Patienten mit Polymyositis, 1 davon mit einem Antisynthetase-Syndrom (2 weiblich, 2 männlich; Alter 41-53 Jahre, Durchschnitt 46,0 Jahre), 2 Patienten mit ANCA-assoziiertes primäres Vasculitis (beide weiblich; Alter 42 und 56 Jahre, Durchschnitt 49 Jahre), 3 Patienten mit Rheumatoider Arthritis (1 weiblich, 2 männlich; Alter 45 und 69 Jahre, Durchschnitt 61,0 Jahre). Die Diagnosestellung erfolgte nach den neuesten, gültigen Klassifizierungskriterien bei SLE (Tan et al., 1982; Hochberg, 1997), bei pSS (Vitali et al., 1996), bei SSc (Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee, 1980), bei Polymyositis (Bohan und Peter, 1975a; Bohan und Peter, 1975b), bei RA (Arnett et al., 1988) und bei primärem Vasculitis (Jennette et al., 1994). Zum Zeitpunkt der Blutentnahme erhielten 15 SLE-Patienten eine immunsuppressive Therapie mit Azathioprin (n=10), Cyclophosphamid (n=1), Mycophenolatmofetil (n=1) bzw. Hydrochloroquin (n=3) zusätzlich zu Glukokortikoiden (12 Patienten mit niedrig dosiertem Prednisolon <10 mg/die, 2 Patienten mit Prednisolon <50 mg/die und ein Patient mit Methylprednisolon 750 mg/die). Die verbleibenden 11 SLE-Patienten und alle Sjögren-Patienten wurden mit niedrig dosierten Glukokortikoiden behandelt. Drei Sklerodermie-Patienten erhielten niedrig dosierte Glukokortikoide, einer davon in Kombination mit Azathioprin. Ein Sklerodermie-Patient hatte keine Immunsuppressiva. Zwei Polymyositis-Patienten erhielten zusätzlich zu niedrig dosiertem Prednisolon Azathioprin bzw. Cyclophosphamid. Alle RA-Patienten

erhielten niedrig dosierte Glukokortikoide. Patienten mit Vasculitis wurden mit einer Kombinationstherapie (Glukokortikoide und Cyclophosphamid) behandelt.

Als gesunde Kontrollpersonen dienten 22 gesunde Blutspender aus der Blutbank, Institut für Transfusionsmedizin, Campus Virchow-Klinikum, Charité – Universitätsmedizin Berlin, von denen Buffy Coat verwendet wurde. Buffy Coat ist ein Lymphozytenkonzentrat, das man nach dem Abzentrifugieren von Vollblut erhält.

3.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Eine einfache und schnelle Methode, um mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) zu isolieren, ist die Ficoll-Hypaque Dichtegradienten-Zentrifugation, die die Dichteunterschiede zwischen mononukleären Zellen und anderen Blutbestandteilen ausnutzt (Kanof et al., 1996). Mononukleäre Zellen und Thrombozyten sammeln sich auf der Ficoll-Schicht während Erythrozyten und Granulozyten auf den Boden des Zentrifugenröhrchens sinken. Die Thrombozyten werden anschließend durch Waschschrte entfernt.

Frisches Heparinblut wurde bei Raumtemperatur mit dem zweifachen Volumen an PBS verdünnt. In einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen wurden 15 ml Ficoll-Lösung (Ficoll Separating Solution, isoton, Dichte 1.077g/l, Biochrom KG, Cat. No. L6115) mit 35 ml des verdünnten Bluts langsam überschichtet und 25 min bei 2,1 K rpm (Umdrehungen pro Minute, ca. 900 x g) mit ausgeschalteter Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere Schicht, die Plasma und einen Großteil der Thrombozyten enthält, wurde entfernt und verworfen. Mit einer frischen Pipette wurde die Bande mit den mononukleären Zellen in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt und das dreifache Volumen an PBS ohne Calcium oder Magnesium hinzugefügt. Nach Zentrifugation (25 min bei 1,8 K, ca. 600 x g) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 40 ml PBS aufgenommen. Vor der Zentrifugation (25 min bei 1,8 K, ca. 600 x g) wurde ein 100 µl-Aliquot zur Bestimmung der Zellzahl entnommen, mit dem gleichen Volumen 0,1% Trypanblau-Lösung versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Der Überstand wurde wieder entfernt und das Pellet in 600-800 µl Einfriermedium (RPMI 1640, 20% FCS, 10% DMSO) aufgenommen. Es wurden 3-4 200 µl-Aliquots schrittweise bei -80°C in einem isolierten Behältnis über Nacht gefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Die Gesamtausbeute betrug 1-6 x 10⁷ Zellen bei ca. 30 ml Heparinblut.

3.3 Interferon- γ -Stimulation von JOSK-M Kulturzellen zur Induktion von Immunoproteasom-Untereinheiten

JOSK-M Zellen sind humane Zellen eines Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie aus peripherem Blut [Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, DSMZ-Nummer ACC 30; (Ohta et al., 1986)]. Sie wurden in Suspension in RPMI 1640 mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum kultiviert. Die Stimulation mit 20 bzw. 600 U/ml IFN γ erfolgte über 72 h. Die Zellen wurden als Pellets bis zur weiteren Verwendung zur RNA-Extraktion bei -80°C aufbewahrt. Sie dienten als Kontrollen bei der TaqMan PCR (s. 3.5.6).

3.4 Immunoblot-Analyse von Proteasomuntereinheiten in Leukozytenlysaten

3.4.1 Proteinisolation aus peripheren Blutmonozyten

Die Proteinextraktion aus PBMC erfolgte parallel zur RNA-Extraktion mit dem peqGOLD TriFastTMFL-Kits (peQLab, s. 3.5.6) aus der Interphase nach den Angaben des Herstellers. Die Proteinpellets, die bis zur Verwendung in 100% Ethanol bei -20°C aufbewahrt worden waren, wurden nach Entfernung des Ethanol luftgetrocknet, in 200 μl 1% SDS gelöst und 10 min unter Schütteln auf 95°C erhitzt.

Die Proteinkonzentration wurde durch OD-Messung bei 280 nm bestimmt (Harlow und Lane, 1988). Eine Absorptionseinheit wurde mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml gleichgesetzt.

3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

Die elektrophoretische Auftrennung von jeweils 30 μg PBMC-Gesamtprotein erfolgte in 15% SDS-Polyacrylamidgelen (Minigele mit 7 cm Trennstrecke, MIDGET-System, Pharmacia). Die Proteine wurden anschließend im kontinuierlichen Semi-Dry-Blot-Verfahren auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Die Blockierung der Membran erfolgte in PBS pH 7,4 mit 0,1% Tween 20 und 10% (v/v) Pferdeserum oder 5% (w/v) Magermilchpulver 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C . Das entsprechende primäre polyklonale Kaninchen-Antiserum wurde in den folgenden Verdünnungen 1 h bei Raumtemperatur mit den Nitrozellulose-Membranen inkubiert: anti-LMP2 ($\beta 1i$), K864/A 1:1000, anti-LMP7 ($\beta 5i$), K63 1:1000, anti-MECL1 ($\beta 2i$), K65 1:1000, anti-PA28 α , K39/2 1:5000, anti-C3 ($\alpha 2$), #64569 1:500 und anti-C9 ($\alpha 3$), K20 1:1000 jeweils in PBS mit 0,1% Tween 20 und 10% (v/v) Pferdeserum oder 5% (w/v)

Magermilchpulver. Anschließend wurde über 25 min gewaschen in PBS mit 0,1% (v/v) Tween 20 bei fünfmaligem Pufferwechsel. Der sekundäre Antikörper (Meerrettich-Peroxidase-konjugiertes affinitätsgereinigtes Ziegen-anti-Kaninchen IgG Fc-Fragment, Dianova) wurde in der gleichen Lösung wie der primäre Antikörper 1:20 000 verdünnt, 30 min inkubiert und die Membran wie oben gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden mit ECL (ECL Western Blotting Detection Kit, Amersham) detektiert nach den Angaben des Herstellers und eine Autoradiographie durchgeführt (Kodak X-OMAT AR Röntgenfilm).

Als Standardprotein für eine spätere relative quantitative Analyse der Immunoblotssignale wurde in einer Versuchsreihe in jeder Gelspur auf jedem Blot die konstitutive Proteasomuntereinheit C3 ($\alpha 2$) gefärbt. Dazu wurden die Antikörper der vorherigen Färbung mit anti-LMP2 ($\beta 1i$), -LMP7 ($\beta 5i$), -MECL1 ($\beta 2i$) oder -PA28 α entfernt durch Inkubation in 6,25 mM Tris·Cl pH 6,7, 2% (w/v) SDS, 100 mM β -Mercaptoethanol bei 55°C für 30 min und anschließendes Waschen mit großen Volumina PBS, 0,1% (v/v) Tween 20 bei Raumtemperatur für 60 min. Nach Blockierung wurde mit anti-C3 ($\alpha 2$)-Antikörper gefärbt wie oben beschrieben.

3.4.3 Relative Quantifizierung der Immunoblot-Signale

Die Röntgenfilme der ECL-detektierten Western-Blots wurden eingescannt (Hewlett Packard Flachbett-Scanner ScanJet II cx) mit dem Programm DeskScan II Version 2.1 (Hewlett Packard 1991-94), Einstellungen: 300 dpi, Schwarz-Weiß-Photo. Die eingescannten Bilder wurden mit Adobe Photoshop D1-2.5.1 geöffnet und ohne Bildbearbeitung als TIFF-File (Macintosh) gespeichert.

Die Quantifizierung erfolgte ebenfalls ohne Bildbearbeitung mit Hilfe des Freeware-Programms NIH Image 1.61 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). In einem ausgewählten Rechteck (0,3x0,15 inch entsprechend 0,76x0,38 cm) wurde über jeder zu quantifizierenden Protein-Bande einschließlich Hintergrund die integrierte Dichte (integrated density) gemessen. Die integrierte Dichte wurde durch das Programm nach der folgenden Formel berechnet: Integrierte Dichte = Anzahl der Pixel in der Auswahl * (durchschnittlicher Grauwert in der Auswahl – Hintergrund), wobei der Hintergrund der modale Grauwert in der Auswahl ist (häufigster Pixel-Grauwert).

Zur Auswertung wurde jeder Meßwert in Bezug gesetzt zu der parallel in jeder Gelspur gemessenen Signalstärke der konstitutiven Proteasom-Untereinheit C3 ($\alpha 2$).

3.4.4 Statistische Auswertung der Immunoblot-Signale

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des WinSTAT 3.1 Statistikprogramms (Kalmia Company, Cambridge, MA, U.S.A.). Das Signifikanzniveau wurde für alle statistischen Tests bei $\alpha=0.05$ festgelegt. Die Annahme der Normalverteilung der Daten wurde durch den Kolmogorov-Smirnov-Einstichprobentest überprüft. Bei normalverteilten Meßwerten wurde der parametrische, unabhängige t -Test eingesetzt, insbesondere der homogene t -Test bei homogenen Varianzen und der heterogene t -Test im inhomogenen Fall. Für nicht-normalverteilte Meßwerte wurde der U -Test nach Mann-Whitney angewandt, ein nicht-parametrisches Testverfahren, das keine bestimmte Verteilungsform der Variablen voraussetzt.

3.5 Etablierung eines quantitativen Real-time Polymerase-Kettenreaktion-Meßverfahren (TaqMan PCR) für die Genexpression von sieben ausgewählten Proteasomuntereinheiten

3.5.1 Auswahl der Quantifizierungsmethode

Zur relativen Quantifizierung von mRNA wurde das Prinzip der TaqMan Real-time PCR gewählt. Dies ist eine dynamische Meßmethode, die während jedes PCR-Zyklus die neu entstehenden Amplifikate durch den Anstieg eines Fluoreszenzsignals mißt. Die Messung im linearen Bereich der Reaktion erlaubt die quantitative Bestimmung der mRNA bzw. der cDNA im Ausgangsmaterial.

3.5.2 Prinzip der TaqMan-PCR

Die TaqMan-PCR beruht neben der Polymerase-Aktivität auf der 5'-Nuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase. Die Reaktion erfordert eine fluorogene Sonde. Diese besteht aus einem Oligonukleotid, an das am 5'-Ende ein Reporter- und am 3'-Ende ein Quencher-Farbstoff gekoppelt ist. Durch die sterische Nähe des Quencher-Farbstoffs zum Reporter-Farbstoff kann die intakte Sonde aufgrund eines Fluoreszenz-Energietransfers kein signifikantes Fluoreszenzsignal entsenden. Als Reporter-Farbstoff wurde FAM (nach Anregung Lichtemission bei 518 nm), als Quencher-Farbstoff wurde TAMRA verwendet, der nach Anregung Licht mit einer Wellenlänge von 582 nm emittiert.

Während der PCR hybridisiert die Sonde an die Zielsequenz zwischen Vorwärts- und Rückwärts-Primer. Durch die voranschreitende DNA-Synthese während der PCR wird die hybridisierte Sonde durch die 5'-Nuklease-Aktivität der Taq Polymerase hydrolysiert und in einzelne Nukleotide gespalten, so dass der Reporter-Farbstoff vom Quencher-Farbstoff getrennt wird und das Fluoreszenzsignal des Reporter-Farbstoffs nach Anregung mit einem Argonlaser (488 nm) nicht mehr vom Quencherfarbstoff unterdrückt werden kann. Deshalb steigt die Fluoreszenz-Intensität des Reporter-Farbstoffs mit jedem weiteren PCR-Zyklus proportional zur Menge der amplifizierten DNA an und verdoppelt sich im Idealfall in jedem PCR-Zyklus. Die Signalstärke ist auch proportional zur Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA bzw. mRNA. Mit Hilfe eines bekannten, stabil und konstant exprimierten Gens (Haushalts-Gens), das jeweils in

einem Parallelansatz amplifiziert wird, kann die relative Genexpression eines neu untersuchten Gens berechnet werden.

3.5.3 Auswertungsmethode der TaqMan-PCR (ΔC_T -Methode)

Da sich die experimentelle Konzeption und Durchführung der PCR-Analyse nach dem Auswertungsverfahren richtet, wurde dieses zunächst festgelegt. Der Vergleich von vier verschiedenen Auswertungsmethoden der TaqMan Real-time PCR ergab keine signifikanten Unterschiede der Endergebnisse, da gezeigt werden konnte, dass die Resultate der PCR-Analyse von Referenz- und Zielgen (1) in einem gemeinsamen oder (2) in zwei getrennten Reaktionsgefäßen oder (3) die Auswertung mit Standardkurven oder (4) mit der komparativen C_T -Methode als gleichwertig betrachtet werden können (Livak und Schmittgen, 2001).

Zur Auswertung wurde in dieser Arbeit die komparative C_T -Methode (ΔC_T -Methode) angewandt. ΔC_T entspricht der Differenz der Schwellenzyklen bei Zielgen und Referenz. Es ist möglich, diese Methode zu wählen, um auf Standardkurven während jeder einzelnen PCR-Analyse zu verzichten, wenn zuvor gezeigt werden kann, dass die Effizienz der Amplifikation von Referenzgen und Zielgenen näherungsweise gleich ist. Die Vorteile der ΔC_T -Methode sind die Vermeidung des Einflusses von Pipettierfehlern bei den Standards sowie ein höherer Probendurchsatz in jedem PCR-Lauf, da keine zusätzlichen Proben für Standardkurven benötigt werden.

Ein Nachteil der ΔC_T -Methode ist die o. g. Optimierung der Effizienz (s. 3.5.8) im Vorfeld der PCR-Analyse, die v. a. durch die Länge des Amplicons und die Auswahl der Primer- bzw Sondenlänge und deren Basenzusammensetzung erreicht wird (s. 3.5.4). Des weiteren muß die optimale Primerkonzentration für jedes Amplicon zunächst experimentell ermittelt werden (3.5.7).

Eine sensitive Methode zur Überprüfung, ob zwei Amplicons die gleiche Effizienz haben, ist die Untersuchung, ob ΔC_T bei Template-Verdünnung konstant bleibt. Es konnte gezeigt werden, dass bei allen sieben Zielgenen [LMP2 ($\beta 1i$), LMP7 ($\beta 5i$), MECL1 ($\beta 2i$), C3 ($\alpha 2$), C9 ($\alpha 3$), PA28 α und PA28 β] sowie dem Referenzgen HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase) die Effizienz zwischen 0,884 und 0,998 lag (Tabelle 4). Eine Effizienz von 1,0 bedeutet, dass die DNA in jedem PCR-Zyklus exakt verdoppelt wird.

Als Referenzgen wurde das Haushalts-Gen HPRT gemessen, das auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, konstitutiv in geringen Mengen exprimiert wird (Patel et al.,

1986) und eine wichtige Rolle im Stoffwechselweg zur Wiederverwertung von Purinen (Salvage Pathway) in Säugerzellen spielt. Die Sequenzen von Primern und Sonde für das HPRT-System wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. H.-D. Volk (Institut für klinische Immunologie, Charité, Humboldt-Universität, Berlin) zur Verfügung gestellt.

3.5.4 Auswahlkriterien für Primer und Sonden

Das Amplicon soll 50-100 Basenpaare umfassen. Die Aufeinanderfolge identischer Basen wurde bei den Primern vermieden, insbesondere von vier oder mehr Guanosinresten. Die Schmelztemperatur der Primer liegt zwischen 58 und 60°C. Die letzten fünf Nukleotide am 3'-Ende sollten nicht mehr als zwei Guanosin- oder vier Cytidinreste enthalten. Der Vorwärts- und der Rückwärts-Primer wurden möglichst nah der Sonde positioniert, jedoch ohne sie zu überlappen.

Bei den Sonden wurde ebenfalls die Aufeinanderfolge identischer Basen, insbesondere von 4 oder mehr Guanosinresten vermieden. Am 5'-Ende wurde Guanosin wegen zusätzlicher Stabilisierung des Primer-Template-Hybrids vermieden. Die Schmelztemperatur lag mit 68-70°C über der der Primer. Da die Sonde mehr Cytidin- als Guanosinreste enthalten soll, wurde für LMP2 ($\beta 1i$) und HPRT der nicht-codierende, für alle übrigen Sonden der codierende mRNA-Strang ausgewählt.

Um die Amplifikation von genomischer DNA oder Pseudogenen auszuschließen, überbrückte die Sonde stets eine Exon-Exon-Grenze (s. Tabelle 1). Die humane genomische DNA von PA28 β , C3 ($\alpha 2$) und C9 ($\alpha 3$) war jedoch nicht in Datenbanken verfügbar. Deshalb wurden bei PA28 β die Exon1/Exon2-Grenze und bei C9 ($\alpha 3$) die Exon2/Exon3-Grenze in Analogie zu den entsprechenden murinen Genen (GenBank Acc. Nr. AB053120 und AF060093) festgelegt. Dieser Bereich ist in der cDNA bei Maus und *Homo sapiens* hochkonserviert. Die Exon2/Exon3-Grenze bei C3 ($\alpha 2$) wurde analog zum entsprechenden *C. elegans*-Gen angenommen (GenBank Acc. Nr. Z74030), das ebenfalls in der cDNA bei Mensch und *C. elegans* hochkonserviert ist. Bei MECL1 ($\beta 2i$) wurde das Exon 1 bei der Auswahl von Primern vermieden, da alternatives Splicing dieses Exons beschrieben wurde (Le Texier et al., 2006).

Bei der Auswahl und Überprüfung von Primern und Sonden wurde die PrimerExpress Software von Perkin Elmer Applied Biosystems verwendet.

3.5.5 Sequenzen der Primer und Sonden

Protein/ GenBank Acc. Nr.	Name	Länge (bp)	T _m (°C)	%GC	Exon- Grenze	Sequenz
LMP2 (β1i) U01025	2F	22	60	50		5'-CGTTGTGATGGGTTCTGATTCC-3'
	2R	23	59	48		5'-GACAGCTTGTCAAACACTCGGTT-3'
	2P	22	70	68	Ex2/Ex3	5'-FAM-CACCCGCTC GCCTGCAGACACT-TAMRA-3'
LMP7 (β5i) U17496	7F	18	60	67		5'-GCAGTGGATTCTCGGGCC-3'
	7R	24	60	50		5'-GCCAAGCAGGTAAGGGTTAATCTC-3'
	7P	30	69	53	Ex2/Ex3	5'-FAM-AGCTGGGTCTACATTA GTGCCTTACGGGT-TAMRA-3'
MECL1 (β2i) NM_002801	MF	19	60	63		5'-GCTGCGGACACTGAGCTCA-3'
	MR	20	60	55		5'-TGGTTCCAGGCACAAAGTGG-3'
	MP	25	70	64	Ex7/Ex8	5'-FAM-CCACAGAGCCCGTGAAGAG GTCTGG-TAMRA-3'
PA28α U10360	ALPHA-F	19	59	53		5'-TCCTTCTGCAGCGCTTGA-3'
	ALPHA-R	22	60	55		5'-CTCAATCCGAGGTATCTGCAGC-3'
	ALPHA-P	26	69	58	Ex6/Ex7	5'-FAM-CAGCTCAACCTG GTCACCACCTGGTT-TAMRA-3'
PA28β D45248	BETA-F	15	60	80		5'-GTGCGCCTGAGCGGG-3'
	BETA-R	23	61	48		5'-TCAGCCTCCTGGAAAAGATTCTG-3'
	BETA-P	26	70	58	Ex1/Ex2	5'-FAM-AAGCCCGCAAACAG GTGGAGGTCTTC-TAMRA-3'
C3 (α2) D00760	3F	25	60	40		5'-GATTGAATATGCTTTGGCTGCTGTA-3'
	3R	29	60	31		5'-GGATTTCTGTTTTTCTCAGTTGCTAATA-3'
	3P	28	70	46	Ex2/Ex3	5'-FAM-TCCGTGGGAATTAAG CTGCAATGGTG-TAMRA-3'
C9 (α3) D00763	9F	23	59	52		5'-GTGAGCAGTTGGTTACAGCACTG-3'
	9R	24	61	42		5'-CAGCCAATGTACAGCAATGAAACA-3'
	9P	33	69	42	Ex1/Ex2	5'-FAM-CAAGCTTATACACAATTTGG AGGAAAACGTCCC-TAMRA-3'
HPRT NM_000194	HPRT-F	22	59	50		5'-GACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG-3'
	HPRT-R	25	59	44		5'-AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG-3'
	HPRT-P	26	70	50	Ex6/Ex7	5'-FAM-TTTCACCAGCAAG CTTGCACCTTGA-TAMRA-3'

Tabelle 1 Primer- und Sondensequenzen für die quantitative Real-time RT-PCR. Die Grenzen zwischen zwei aufeinanderfolgenden Exons sind mit einem vertikalen Strich markiert (|). Vorwärts-Primer (F), Rückwärts-Primer (R), Sonde (P).

Die Primer wurden entsalzt über Metabion (Planegg-Martinsried, Deutschland) und die TaqMan Sonden HPLC- und Polyacrylamidgelelektrophorese-gereinigt über BioSource Europe (Nivelles, Belgien) bezogen.

3.5.6 RNA-Präparation und cDNA Synthese

Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des peqGOLD TriFast™FL-Kits (peQLab, Erlangen) nach dem Protokoll des Herstellers aus peripheren Blutmonozyten (PBMC) isoliert, die über Ficoll-Gradienten gereinigt wurden (s. 3.2) oder aus Kulturzellen (s. 3.3). Die Integrität der RNA wurde elektrophoretisch durch Ethidiumbromidfärbung bestätigt. Die Konzentration der gereinigten Gesamt-RNA wurde spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt. Die RNA (4 µg) wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit 10 U RNase-freier DNase I (Roche, Basel, Schweiz; 10 U µl), 7,5 U RNAGuard RNase-Inhibitor (25 U/µl, Amersham Biotech, Freiburg, Deutschland), 5 mM DTT und 4 µl 5x First Strand Buffer (GibcoBRL) für 30 min bei 37°C behandelt, um die die RNA-Präparation kontaminierende genomische DNA zu verdauen. Es erfolgte eine

Inaktivierung der DNase I für 5 min bei 85°C mit anschließender unmittelbarer Eiskühlung der Probe. Es wurden jeweils 20 µl eines Enzym-Mixes hinzugegeben (4 µl 5x First Strand Buffer, 4 µl 0,1 M DTT, 4 µl dNTPs, je 10 mM, 1 µl RNAGuard, 1 µg oligo(dT), 400 U M-MuLV Reverse-Transkriptase (GibcoBRL, 200 U/µl) und dH₂O ad 20 µl) und der Ansatz (Gesamtvolumen 40 µl) zum Primerannealing 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die reverse Transkription für 60 min bei 42°C und eine Enzyminaktivierung für 5 min bei 95°C. Die cDNA wurde bei –20°C gelagert.

3.5.7 Primertitration

Zur Effizienzmaximierung der PCR ist die experimentelle Ermittlung der optimalen Primerkonzentrationen für jedes Amplicon erforderlich, damit die Primermenge während der Amplifikation nicht limitierend ist. Für jedes Primerpaar wurden jeweils 9 PCRs mit den Konzentrationen 50, 300 und 900 nM durchgeführt in den Verhältnissen 50/50, 50/300, 50/900, 300/50, 300/300, 300/900, 900/50, 900/300 und 900/900 nM. Als Template diente 2 µl Normalspender-cDNA (Oligo(dT)-Priming, s. 3.5.6). Es fanden sich die folgenden optimalen Konzentrationsverhältnisse:

Protein	Name	Primerkonzentration (nM)
LMP2 (β1i)	2F	300
	2R	50
LMP7 (β5i)	7F	50
	7R	900
MECL1 (β2i)	MF	50
	MR	300
PA28α	ALPHA-F	300
	ALPHA-R	300
PA28β	BETA-F	300
	BETA-R	900
C3 (α2)	3F	900
	3R	900
C9 (α3)	9F	300
	9R	900
HPRT	HPRT-F	300
	HPRT-R	300

Tabelle 2 Ergebnisse der Primertitration. Die optimale Kombination der Primerkonzentrationen wurde zur Effizienzmaximierung der TaqMan PCR experimentell ermittelt.

3.5.8 Effizienzbestimmung

Die Amplifikations-Effizienzen der acht Amplicons wurden mit Hilfe einer Verdünnungsreihe der Template-cDNA in einer Standardkurve experimentell ermittelt (Verdünnungsstufen: unverdünnt, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256 entsprechend 100 ng, 25 ng, 6,25 ng, 1,56 ng bzw. 0,39 ng transkribierter Gesamt-RNA).

Zur Bestimmung der relativen Effizienz von Referenzgen- und Zielgen-Amplifizierung wurde die Kopienzahl gegen die entsprechenden ΔC_T -Werte, also die Differenzen der C_T -Werte von HPRT und dem jeweiligen Zielgen aufgetragen. Dabei sollte der Betrag der Steigung der sich ergebenden Trendlinie $<0,1$ sein, damit die ΔC_T Methode zur Auswertung der TaqMan-Meßdaten angewandt werden konnte (s. 3.5.3).

3.5.9 Durchführung der TaqMan PCR

Für die TaqMan PCR wurden die folgenden Komponenten in der angegebenen Endkonzentration vorbereitet: 4,5 μ l dH₂O, 12,5 μ l TaqMan Universal PCR Master Mix (P/N 4304437, Perkin Elmer Applied Biosystems), 1 μ l FAM-TAMRA-Sonde (200 nM), 5 μ l Primerpaarmix in optimaler Endkonzentration (s. 3.5.7) und 2 μ l cDNA (entsprechend 250 ng transkribierter RNA) in einem Reaktionsvolumen von 25 μ l. Die PCR-Bedingungen waren 2 min bei 50°C, 10 min bei 95°C, 40 Zyklen bei 95°C für 15 sec und 60°C für 1 min.

Bei jedem PCR-Lauf im ABI Prism 7700 SDS (Applied Biosystems) wurde die cDNA von jeweils fünf Patienten mit einer Kontrolle ohne cDNA (NTC, non template control) pro Primer gleichzeitig inkubiert. Die Amplifikation erfolgte stets in Doppelwerten. Somit ergaben sich 96 Proben bei jeder TaqMan PCR: (5 Patienten+1 NTC) x 8 Primerpaare x 2. Die gleichzeitige TaqMan Analyse aller Proteasomuntereinheiten zusammen mit dem Haushalts-Gen HPRT bei jedem Patienten sollte die größtmögliche Konsistenz der Ergebnisse gewährleisten. Daher wurde die Expression des Haushalts-Gens HPRT stets bei jedem einzelnen PCR-Lauf mitbestimmt.

Doppelwerte wurden nur dann für die spätere Auswertung akzeptiert, wenn sie nicht um mehr als 0,5 Zyklen differierten, entsprechend einem Faktor von $2^{0,5} = 1,41$. Andernfalls wurde die Messung wiederholt. Von insgesamt 680 gemessenen Doppelwerten lagen der überwiegende Teil von 635 (93,4%) innerhalb der festgelegten Toleranzgrenze von $\leq 0,5$ Zyklen. Wenige Werte (6,6%) lagen außerhalb dieses Bereichs und wurden nur bei Mangel an Patientenmaterial in die Auswertung einbezogen. Die Differenzen der C_T -Meßwerte ergaben sich wie folgt und zeigen die hohe Pipettiergenauigkeit bei den Doppelbestimmungen:

Differenz Doppelwerte	0-0,5	>0,5	>0,6	>0,7	>0,8	>0,9	>1,0	>1,1	>1,3	>1,5	>1,8
Anzahl	635	16	9	5	5	2	3	2	1	1	1

Tabelle 3 Differenzen der C_T -Werte. Die meisten Doppelwerte (635 von 680 entsprechend 93,4%) differierten um nicht mehr als 0,5 Zyklen voneinander und lagen innerhalb der festgelegten Toleranzgrenze von 0 - 0,5 Zyklen bei der TaqMan-PCR.

Zur Auswertung der TaqMan-Daten wurde das arithmetische Mittel aus den gemessenen Doppelwerten gebildet.

3.6 Variabilitätsuntersuchung der Expression der internen Referenzgene HPRT, C3 ($\alpha 2$) und C9 ($\alpha 3$) zur Bestimmung ihrer Genexpressionstabilität in peripheren Blutmakrophagen

Die Bestimmung des Haushalts-Gens bzw. der konstitutiv exprimierten Proteasomuntereinheiten mit der größten Expressionsstabilität erfolgte mit Hilfe der Shareware-Anwendung geNorm (Vandesompele et al., 2002). Dieses Programm berechnet das Genexpressionsstabilitätsmaß M für ein internes Kontrollgen als die durchschnittliche paarweise Variation V für dieses Gen im Vergleich zu allen anderen Kontrollgenen. Schrittweiser Ausschluß desjenigen Gens mit dem höchsten M -Wert ermöglicht die Aufstellung einer Rangfolge nach der Expressionsstabilität. Ein niedriger M -Wert, d.h. eine niedrige Variabilität, bedeutet bei der Berechnung mit geNorm größere Stabilität. Das Programm geNorm erlaubt jedoch keine Aussage über die Stabilität einer individuellen mRNA in der Zelle, sondern ermöglicht lediglich die vergleichbare Einschätzung der Variabilität der mRNA-Expression mehrerer Gene in einem untersuchten Normal- oder Patientenkollektiv.

3.7 Statistische Analyse der TaqMan-Daten

Für das Interferon- γ -Stimulationsexperiment in JOSK-M-Zellen wurde die Normalverteilung der Expressionsdaten mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Einstichproben-tests bestätigt (WinSTAT 3.1, Kalmia Company, Cambridge, MA, U.S.A.), so dass der t -Test, ein parametrischer Test, der normalverteilte Meßparameter voraussetzt, zur statistischen Auswertung angewendet wurde.

Bei den TaqMan-Analysen in PBMC konnte eine Normalverteilung der gemessenen Parameter im Kolmogorov-Smirnov-Einstichproben-test nicht bestätigt werden, so dass nicht-parametrische Tests für nicht-normalverteilte Stichproben verwendet wurden. Permutations- oder Randomisierungstests sind eine hilfreiche Alternative zu den parametrischen Standardverfahren, da sie keinerlei Annahmen über eine bestimmte Verteilungsform (z. B. Normalverteilung) der Meßdaten erfordern, dabei jedoch die gleiche statistische Teststärke aufweisen (Horgan und Rouault, 2000). Ein Randomisierungstest beruht auf der vielfach wiederholten und zufälligen Zuweisung der Meßwerte zu zwei Gruppen (Patienten- und Kontrollgruppe) und berechnet jedes Mal

einen offensichtlichen Effekt, d. h. in diesem Fall die Expressionsraten. Das Verhältnis dieser Expressionsraten ergibt den p -Wert des Tests.

Das verwendete Randomisierungsverfahren, das Relative Expressions Software Tool REST[®] (Pfaffl et al., 2002), erlaubt den gleichzeitigen Vergleich der Genexpression zweier Gruppen mit bis zu 16 Doppelwerten für ein Referenzgen mit bis zu vier Zielgenen. Das mathematische Modell des REST-Programms zur Berechnung der relativen Expressionsraten beruht auf den PCR-Effizienzen (E), die zuvor ermittelt werden, und der Abweichung (Δ) des mittleren C_T -Wertes zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe (Pfaffl, 2001).

$$\text{Expressionsrate} = (E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_T \text{Zielgen(Kontrolle-Probe)}} / (E_{\text{Referenz}})^{\Delta C_T \text{Referenz(Kontrolle-Probe)}}$$

Die Ergebnisse der effizienzkorrigierten Expressionsraten von maximal vier Transkripten pro Rechensequenz werden durch einen Randomisierungstest (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test) auf Signifikanz getestet. Für jede Probe werden die ΔC_T -Werte des Referenz- und Zielgens gemeinsam Kontroll- und Patientengruppe zugewiesen. Da insgesamt sieben Transkripte untersucht wurden, erfolgte zunächst die Auswertung von LMP2 ($\beta 1i$), LMP7 ($\beta 5i$), MECL1 ($\beta 2i$) und PA28 α . Danach wurden die verbleibenden drei Transkripte von PA28 β , C3 ($\alpha 2$) und C9 ($\alpha 3$) in einem zweiten Durchgang analysiert.

3.8 Molekulargenetische Analyse des humanen LMP2 (*PSMB9*)-Promotors

Genomische DNA wurde mit Hilfe von Standardmethoden aus humanen PBMC isoliert. Die LMP2 (*PSMB9*)-Promotorregion (GenBank Acc. Nr. X66401) wurde mit Hilfe der folgenden Primer mittels PCR amplifiziert (L1s-5'-TAGCCATTGGCACTCGGACG-3' und L1a-5'-GGTCTCTGCATTCACTTCTCCGC-3'), Annealingtemperatur 58°C. Das spezifische Produkt (751 bp) wurde auf einem 1% Agarose/TAE-Gel fraktioniert, aus dem Gel ausgeschnitten, extrahiert und der direkten Sequenzanalyse unterworfen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Etablierung eines quantitativen Real-Time Meßverfahrens für die mRNA-Expression von LMP2 ($\beta 1i$), LMP7 ($\beta 5i$), MECL1 ($\beta 2i$), PA28 α , PA28 β , C3 ($\alpha 2$), C9 ($\alpha 3$) und HPRT mittels TaqMan PCR aus humanen peripheren Blutmakrophagen (PBMC)

Die lineare Amplifikation ist die Voraussetzung für die relative quantitative Messung von Patienten-cDNA mit variabler Ausgangskonzentration. Durch Titration von Kontroll-cDNA (s. 3.5.8) wurde experimentell nachgewiesen, dass die TaqMan PCR-Amplifikation bei jedem der acht Amplicons über einen Bereich von drei Größenordnungen (0,39–100 ng cDNA) linear erfolgt (s. Abb. 3). Der Pearsonsche Korrelationskoeffizient ist ein empirischer, dimensionsloser Index mit dem Wertebereich $-1,0 \leq r \leq 1,0$. Unter der Voraussetzung annähernd linearer Korrelation, ist r ein Maß für die Stärke des Zusammenhangs zwischen x und y . $|r|$ nahe 1 bedeutet einen sehr engen Zusammenhang.

Im Titrationsexperiment wurden gleichzeitig mit der Erstellung von Standardkurven die Effizienzen der einzelnen Amplicons bestimmt (s. Abschnitt 3.5.8 und Abb. 3). Die Effizienz E errechnet sich aus der Steigung der Standardkurve wie folgt:

$$E = 10 \exp -(1/\text{Steigung})$$

Bei den sieben Zielgenen [LMP2 ($\beta 1i$), LMP7 ($\beta 5i$), MECL1 ($\beta 2i$), C3 ($\alpha 2$), C9 ($\alpha 3$), PA28 α und PA28 β] sowie dem Referenzgen HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase) ergaben sich Effizienzen zwischen 0,816 und 0,998.

Amplicon	LMP2 ($\beta 1i$)	LMP7 ($\beta 5i$)	MECL1 ($\beta 2i$)	PA28 α	PA28 β	C3 ($\alpha 2$)	C9 ($\alpha 3$)	HPRT
Effizienz E	0,816	0,986	0,845	0,938	0,995	0,934	0,936	0,998
Korrelationskoeffizient r	0,9979	0,9877	0,9992	0,9989	0,9985	0,9974	0,9803	0,9927

Tabelle 4 Effizienzen und Pearsonsche Korrelationskoeffizienten der TaqMan PCR

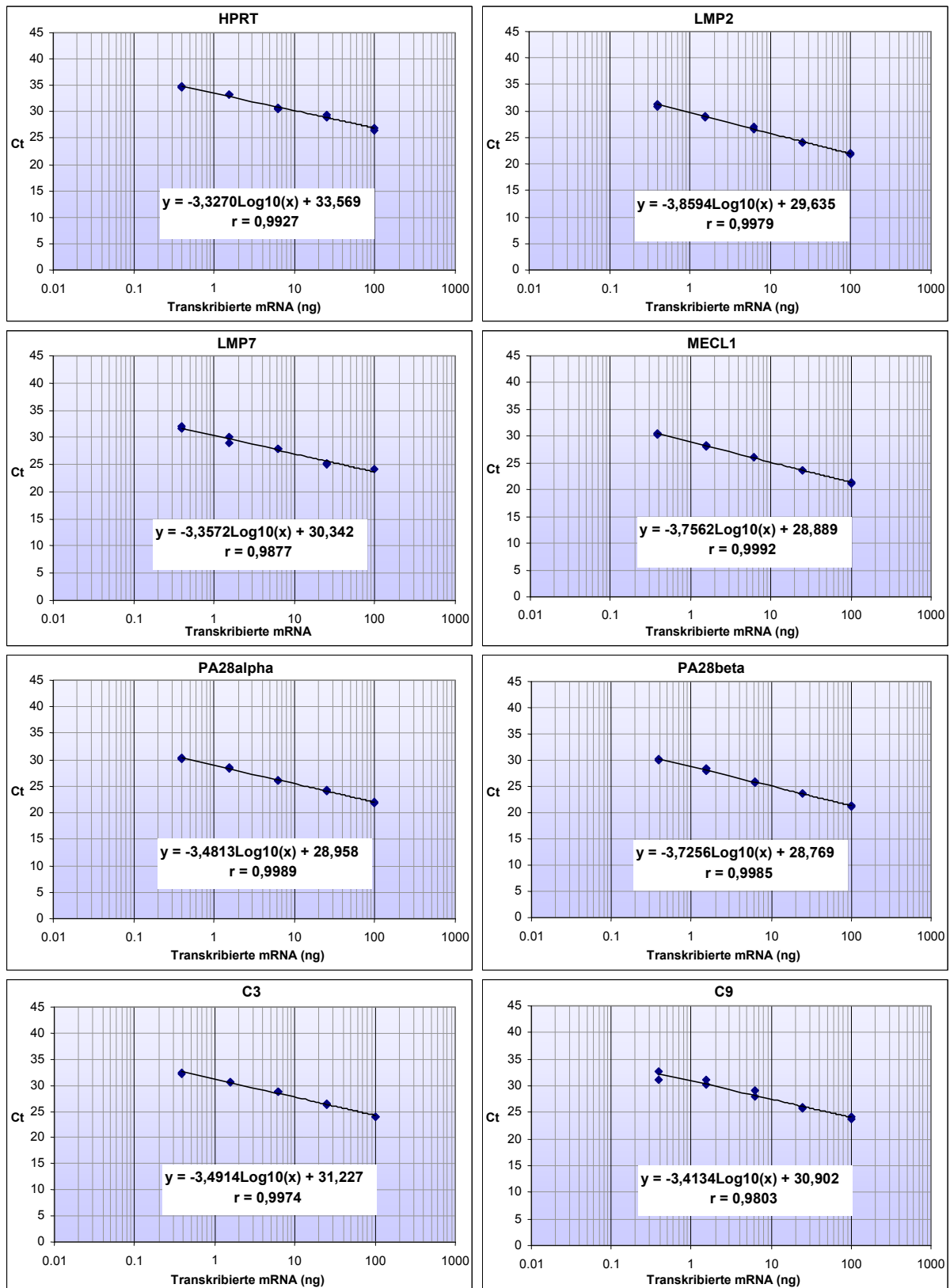


Abb. 3 Standardkurven zum Nachweis der Linearität der TaqManPCR-Amplifikationssysteme und zur Effizienzbestimmung der acht Amplicons. 0.39-100 ng cDNA wurden jeweils amplifiziert. Die Effizienz E errechnet sich aus der Steigung der Standardgeraden [$E = 10 \exp -(1/\text{Steigung})$], r Pearsonscher Korrelationskoeffizient.

Idealerweise entspricht die Effizienz $E = 2$ einer exakten Verdopplung eines Templates in jedem PCR-Zyklus. Die experimentell bestimmten PCR-Effizienzen zeigten, dass näherungsweise eine Verdopplung pro Zyklus stattfindet und alle neu etablierten und durch Primertitration (s. Abschnitt 3.5.7) optimierten TaqMan-Amplifikationssysteme linear sind und für die exakte und verlässliche Quantifizierung von Transkripten eingesetzt werden können. Für die anschließende statistische Auswertung werden die einzelnen Effizienzen der Amplifikation berücksichtigt, um größtmögliche Genauigkeit und Vergleichbarkeit der Messungen zu gewährleisten.

4.2 Relative mRNA-Expression ausgewählter Immunoproteasom- und Proteasomaktivatoruntereinheiten in Kulturzellen nach Interferon- γ -Stimulation *in vitro*

IFN γ kann in Kulturzellen die Expression der Immunoproteasom-Untereinheiten LMP2 ($\beta 1i$), LMP7 ($\beta 5i$), MECL1 ($\beta 2i$) induzieren (Fruh et al., 1994; Groettrup et al., 1997). Die neu etablierte mRNA-Quantifizierung mittels TaqMan PCR wurde für alle o. g. Proteasomuntereinheiten in einem konventionellen Zellkultursystem getestet, das mit ansteigenden IFN γ -Konzentrationen stimuliert wurde, um die Linearität der Quantifizierungsmethode für ein Leukozyten-Zellsystem zu bestätigen, um eine unerwartete Variabilität der erhaltenen PCR-Amplifikationsdaten auszuschließen und um die Ergebnisse der Quantifizierung in humanen peripheren Blutmakrophagen von Kontrollspendern und Autoimmunpatienten zu verifizieren.

In JOSK-M Zellen, einer humanen chronisch myeloischen Leukämie-Zelllinie, wurde die mRNA-Expression im proteasomalen System nach IFN γ -Stimulation gemessen, die für 72 h mit 20 bzw. 600 U/ml IFN γ erfolgte (Abb. 4). Als Kontrollen dienten unbehandelte JOSK-M-Zellen, in denen die basalen Expressionsspiegel der untersuchten Proteasom-Untereinheiten gemessen wurden. Die mRNA-Expression von LMP2 ($\beta 1i$), LMP7 ($\beta 5i$), MECL1 ($\beta 2i$), C3 ($\alpha 2$), C9 ($\alpha 3$), PA28 α , und PA28 β wurden bestimmt. Die Expression der Hypoxanthinphosphoribosyltransferase (HPRT) wurde als Kontrollgen gemessen, das in keinem regulatorischen Zusammenhang mit dem proteasomalen System steht (Fruh et al., 1994). Die Daten (Δ Ct-Werte) wurden nach Normalisierung auf das entsprechende Haushalts-Gen in eine lineare Form konvertiert unter Berücksichtigung der PCR-Amplifikationseffizienz jedes einzelnen Amplicons.

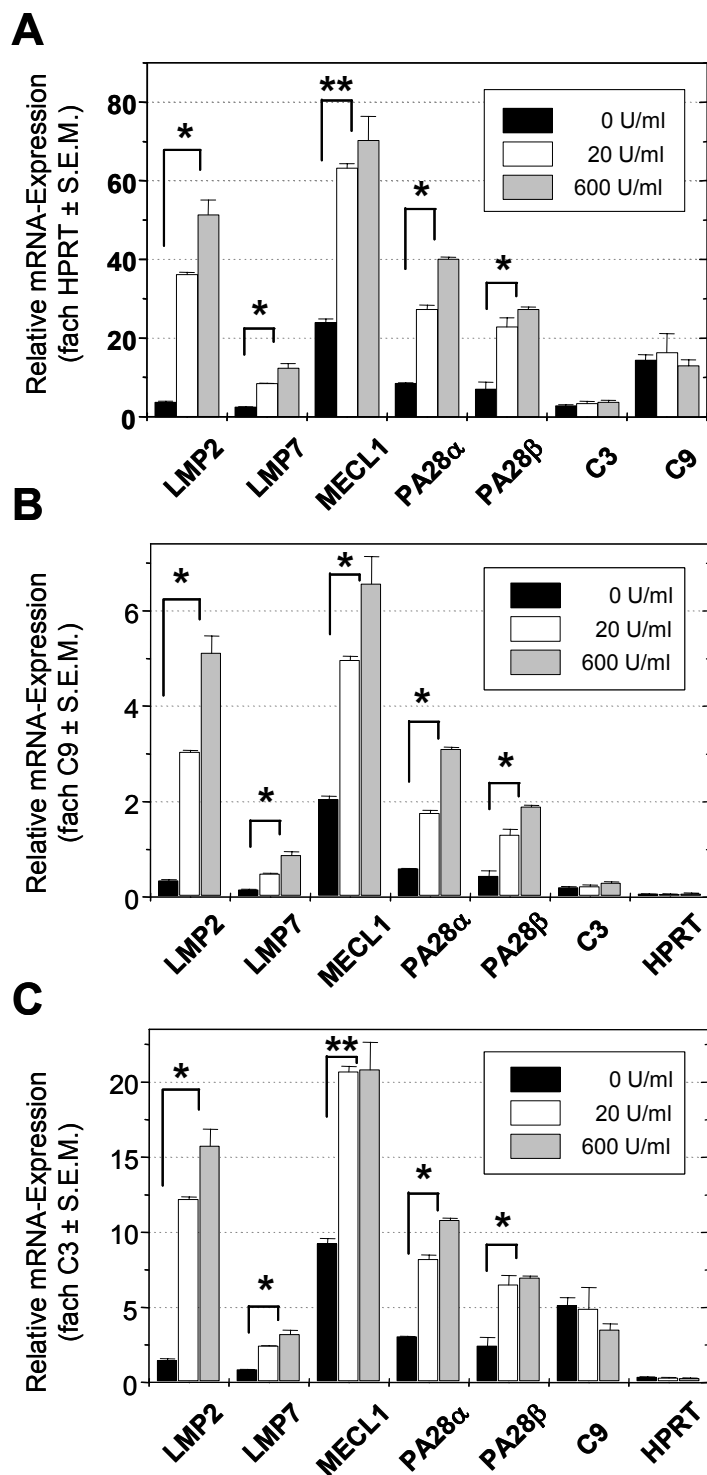


Abb. 4 Real-time RT-PCR-Analyse von Proteasom und Proteasom-Aktivatoruntereinheiten nach IFN γ -Induktion in JOSK-M Zellen *in vitro*. JOSK-M Zellen wurden mit IFN γ über 72 h behandelt (20 U/ml, weiße Säulen, 600 U/ml graue Säulen). Unbehandelte JOSK-M Zellen dienen als Kontrolle (schwarze Säulen). Das nicht-proteasomale Haushalts-Gen HPRT (**A**) sowie die konstitutiven Proteasomuntereinheiten C9 (α 3) (**B**) und C3 (α 2) (**C**) wurden als Referenz verwendet. Die relativen Expressionswerte wurden mit Hilfe der Amplifikationseffizienz E der einzelnen Amplicons berechnet. Die Meßwerte ($E^{\Delta Ct}$) sind als Mittelwerte der relativen mRNA-Expression \pm Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M.) dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student t -Test berechnet (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$).

In guter Übereinstimmung mit zuvor publizierten Daten (Fruh et al., 1994) fand sich nach IFN γ -Stimulation ein signifikanter Anstieg der induzierbaren Immunoproteasom-Untereinheiten LMP2 (β 1i), LMP7 (β 5i) und MECL1 (β 2i) im Vergleich zu unbehandelten Zellen, während die Expression der konstitutiven Untereinheiten im wesentlichen konstant blieb. Es zeigte sich, dass 20 U/ml IFN γ bereits ausreichen, um einen signifikanten Anstieg der mRNA-Expression für die Immunoproteasom-Untereinheiten und die beiden Proteasom-Aktivatoruntereinheiten zu bewirken.

Die mRNA-Expression dieser Untereinheiten konnte durch Zugabe von 600 U/ml im Vergleich zu 20 U/ml nur noch gering gesteigert werden. Die untersuchten konstitutiven Untereinheiten C3 (α 2) und C9 (α 3) blieben im wesentlichen konstant. Frühere Untersuchungen zum Einfluß von IFN γ auf die Expression des proteasomalen Systems (Fruh et al., 1994) konnten somit durch die Quantifizierung der entsprechenden mRNAs in der Real-time TaqMan PCR bestätigt werden.

Durch die Auswahl der Primer und der Sonde wurde sichergestellt, dass die beiden alternativen Transkripte, die verschiedene Isoformen der LMP2 (β 1i)-Untereinheit kodieren, quantifiziert werden konnten. Im Vergleich zu Variante 1 wird bei Variante 2 eine alternative, im Leseraster liegende Spleißstelle in der 5'-kodierenden Region benutzt (Martinez und Monaco, 1993). Dies führt zu einem kürzeren, veränderten N-Terminus der Variante 2. Die zusätzlichen Aminosäurereste in Variante 1 entsprechen exakt dem Exon 1 des LMP2 (*PSMB9*)-Gens. Aus beiden Isoformen entsteht nach der posttranslationalen proteolytischen Prozessierung die gleiche reife Immunoproteasom-untereinheit LMP2 (β 1i).

Das humane LMP7 (*PSMB8*)-Gen kodiert ebenfalls zwei alternativ gespleißte mRNA-Varianten, die sich nur in ihrer N-terminalen Prosequenz unterscheiden (Fruh et al., 1992). Bei der relativen mRNA-Quantifizierung wurden die Primer und die Sonde so gewählt, dass beide alternativen LMP7 (β 5i)-Transkripte amplifiziert und gemessen werden konnten.

Als Haushalts-Gene wurden HPRT und die beiden konstitutiven Proteasom-Untereinheiten C3 (α 2) und C9 (α 3) ausgewählt und in jedem Real-time PCR-Ansatz parallel gemessen. Die relativen Expressionsdaten wurden in Bezug auf alle drei Haushalts-Gene berechnet, die im wesentlichen gleiche relative Genregulation zeigten. Alle drei Haushalts-Gene zeigten in JOSK-M Zellen *in vitro* stabile Expression nach

IFN γ -Stimulation und erwiesen sich bei der Auswertung der TaqMan-Daten als gleichwertige Referenzgene.

4.3 Werte der gemessenen Expressionsparameter in humanen PBMC

Die mRNA-Expression von (Immuno-) Proteasomuntereinheiten in humanen PBMC war bislang nicht quantitativ untersucht worden, so dass keine Normalwerte bekannt waren. Daher wurden zunächst Referenzbereiche für PBMC von 22 gesunden Kontrollpersonen ermittelt. Tabelle 5 gibt die Mediane und die 25%- und 75%-Perzentilen aller gemessenen Parameter in der Kontrollgruppe und den sechs Patientengruppen wieder.

	Kontrolle (n=22)	SLE (n=26)	pSS (n=6)	PM (n=4)	SSc (n=4)	Vasc (n=2)	RA (n=3)
LMP2 (β1i)	5,52 (5,42- 6,13)	6,10 (5,70-6,72)	6,27 (6,06-6,70)	5,44 (5,30-5,59)	5,93 (5,57-6,21)	5,41 (5,28-5,54)	5,48 (5,05-5,66)
LMP7 (β5i)	2,86 (2,46-3,27)	2,94 (2,37-3,22)	3,09 (2,88-3,55)	2,99 (2,80-3,22)	3,15 (2,84-3,29)	2,72 (2,48-2,97)	2,52 (2,39-2,78)
MECL1 (β2i)	8,46 (7,80-9,12)	8,93 (7,67-9,61)	10,13 (9,38-10,46)	7,26 (6,95-7,61)	8,76 (8,53-8,89)	7,52 (7,47-7,57)	9,77 (8,84-9,97)
PA28α	7,02 (6,76-7,45)	6,68 (6,40-7,06)	7,53 (6,68-7,98)	6,35 (6,11-6,63)	6,43 (6,13-6,62)	6,41 (6,25-6,56)	7,24 (6,50-7,28)
PA28β	5,70 (5,09-5,88)	6,50 (5,88-7,15)	5,94 (5,62-6,85)	6,09 (5,81-6,74)	6,63 (6,39-7,14)	6,12 (5,57-6,67)	5,60 (4,89-7,16)
C3 (α2)	2,24 (1,52-2,73)	2,09 (1,70-2,57)	1,97 (1,71-3,89)	2,35 (1,56-3,22)	2,04 (1,87-2,28)	2,79 (2,36-3,22)	2,17 (1,87-3,55)
C9 (α3)	3,98 (3,72-4,23)	3,06 (2,51-3,68)	3,85 (3,24-4,89)	2,64 (2,41-3,06)	3,17 (3,10-3,31)	2,80 (2,75-2,84)	3,86 (3,06-3,95)

Tabelle 5 Mediane sowie 25%- und 75%-Perzentile der relativen mRNA-Expression in PBMC in den sechs Patientengruppen und der Kontrollgruppe normalisiert auf HPRT (ΔC_T -Werte).

4.4 Die mRNA-Expression konstitutiver, Immunoproteasom- und Proteasom-regulator-Untereinheiten in PBMC unterliegt bei Autoimmunerkrankungen einer differentiellen Regulation

Die relative Genexpression wurde in PBMC gemessen, die von Patienten mit systemischen Autoimmunerkrankungen in einer Phase hoher Krankheitsaktivität stammten:

Systemischer Lupus erythematoses (n=26), primäres Sjögren-Syndrom (n=6), Polymyositis (n=4), Rheumatoide Arthritis (n=3), systemische Sklerose (n=4) und primäre Vasculitis (n=2). PBMC von gesunden Blutspendern dienten als Kontrollen (n=22).

Die relative mRNA-Expression wurde bestimmt für die konstitutiven Proteasom-Untereinheiten C3 ($\alpha 2$) und C9 ($\alpha 3$), die Immunoproteasom-Untereinheiten LMP2 ($\beta 1i$), LMP7 ($\beta 5i$) und MECL1 ($\beta 2i$), die Aktivator-Untereinheiten PA28 α und PA28 β und das Haushalts-Gen HPRT. Die mittlere relative mRNA-Expression jeder Patientengruppe ist in Abb. 5 - Abb. 7 dargestellt.

Beim primären Sjögren-Syndrom fand sich auf mRNA-Ebene gleichzeitig eine deutliche, signifikante Hochregulation der IFN γ -induzierbaren Untereinheiten LMP2 ($\beta 1i$) (Abb. 5A) und MECL1 ($\beta 2i$) (Abb. 5C). Auch bei Sklerodermie wurde MECL1 ($\beta 2i$) leicht erhöht gemessen.

Die Genexpression von LMP2 ($\beta 1i$) war in PBMC von Patienten mit SLE, Polymyositis, Sklerodermie, Vasculitis und Rheumatoider Arthritis im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nicht signifikant verändert.

Interessanterweise zeigte sich bei allen untersuchten Diagnosegruppen keine signifikante Regulation der Immunoproteasom-Untereinheit LMP7 ($\beta 5i$) auf Transkriptebene (Abb. 5B). Die MECL1 ($\beta 2i$)-Expression war bei SLE-, Polymyositis- und Vasculitis-Patienten nicht signifikant verändert (Abb. 5). MECL1 ($\beta 2i$) war das einzige IFN γ -induzierbare Transkript, das bei Rheumatoider Arthritis erhöht beobachtet wurde (Abb. 5C und Tabelle 6).

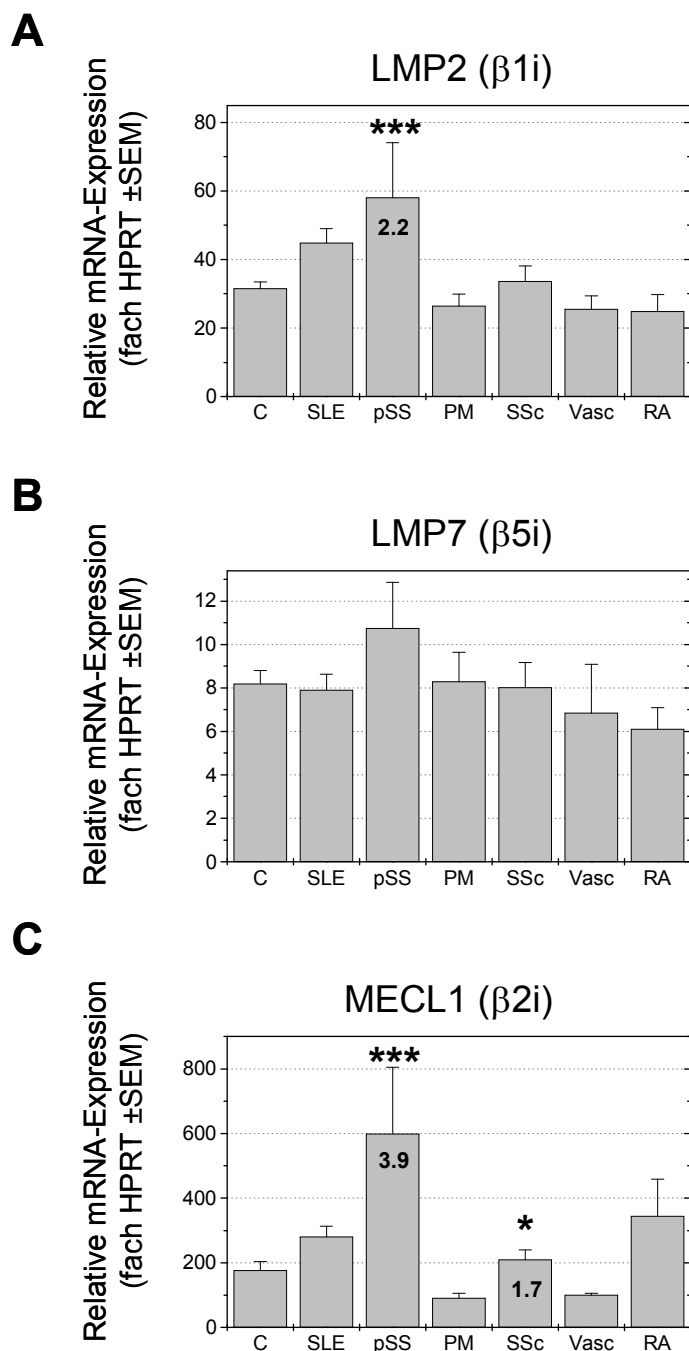


Abb. 5 Das Genexpressionsprofil der IFN γ -induzierbaren Proteasomuntereinheiten in PBMC bei Autoimmunpatienten. Mit Hilfe der Real-time RT-PCR wurde die mRNA-Expression von LMP2 ($\beta 1i$) (A), LMP7 ($\beta 5i$) (B) und MECL1 ($\beta 2i$) (C) quantifiziert, die an SLE (n=26), pSS (n=6), PM (n=4), SSc (n=4), RA (n=3) und primärer Vasculitis (n=2) erkrankt waren. Gesunde Blutspender passenden Alters und Geschlechts dienten als Kontrollen (C; n=22). Ausschließlich signifikante Hochregulation $\geq 1,6$ fach wurde bei der Auswertung und der Diskussion berücksichtigt. Wegen kleiner Fallzahlen wurden die Vasculitis- und RA-Patienten nicht in die statistische Auswertung einbezogen. Die Meßwerte sind als Mittelwerte der relativen mRNA-Expression \pm Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M.) dargestellt. Bei ausreichend großen Fallzahlen wurde der zweiseitige *U*-Test nach Mann-Whitney zur Überprüfung der statistischen Signifikanz eingesetzt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Die Genexpression der Proteasomaktivatoruntereinheit PA28 α fand sich nur bei Sjögren-Patienten hochsignifikant erhöht (Abb. 6A). Alle anderen untersuchten Patientengruppen (SLE, Polymyositis, Vasculitis und Rheumatoide Arthritis) zeigten keine signifikant veränderte Genregulation von PA28 α in PBMC. Dagegen war die relative mRNA-Expression von PA28 β insbesondere bei Patienten mit SLE, primärem Sjögren-Syndrom, Polymyositis und Sklerodermie signifikant erhöht (Abb. 6B). Bei Vasculitis- und RA-Patienten fanden sich auch Hinweise auf eine Hochregulation des PA28 β -Transkripts, die jedoch wegen der geringen Fallzahlen nur eingeschränkt bewertet werden können.

Die mittlere relative Genexpression normalisiert auf HPRT wurde bei PA28 α zwischen 75-170fach und bei PA28 β zwischen 50-160fach gemessen und lag damit bei den beiden Proteasomaktivatoruntereinheiten in der gleichen Größenordnung (Abb. 6).

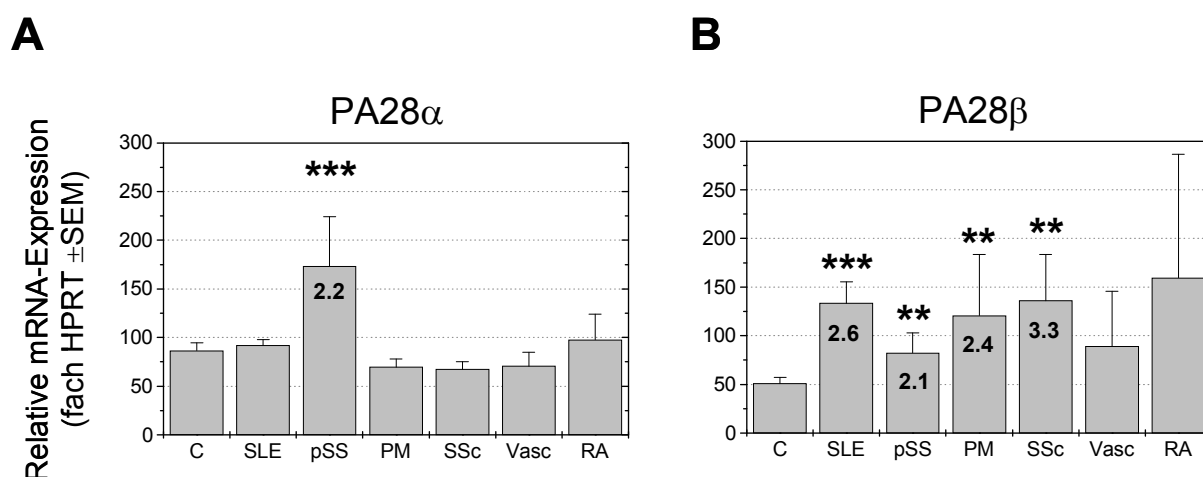


Abb. 6 Das Genexpressionsprofil der Proteasomaktivatoruntereinheiten PA28 α und PA28 β in PBMC bei Autoimmunpatienten (s. a. Legende zu Abb. 5).

Die konstitutive Proteasom-Untereinheit C3 (α 2) war auf mRNA-Ebene bei SLE, primärem Sjögren-Syndrom, Polymyositis und Sklerodermie signifikant erhöht (Abb. 7A). Auch bei Vasculitis- und RA-Patienten fanden sich Hinweise für eine Hochregulation der C3 (α 2)-Transkripte (Abb. 7A und Tabelle 6). Die andere untersuchte konstitutive Untereinheit C9 (α 3), wurde bei SLE, primärem Sjögren-Syndrom, Vasculitis und Rheumatoider Arthritis im Vergleich zu den Kontrollen nicht signifikant verändert gemessen.

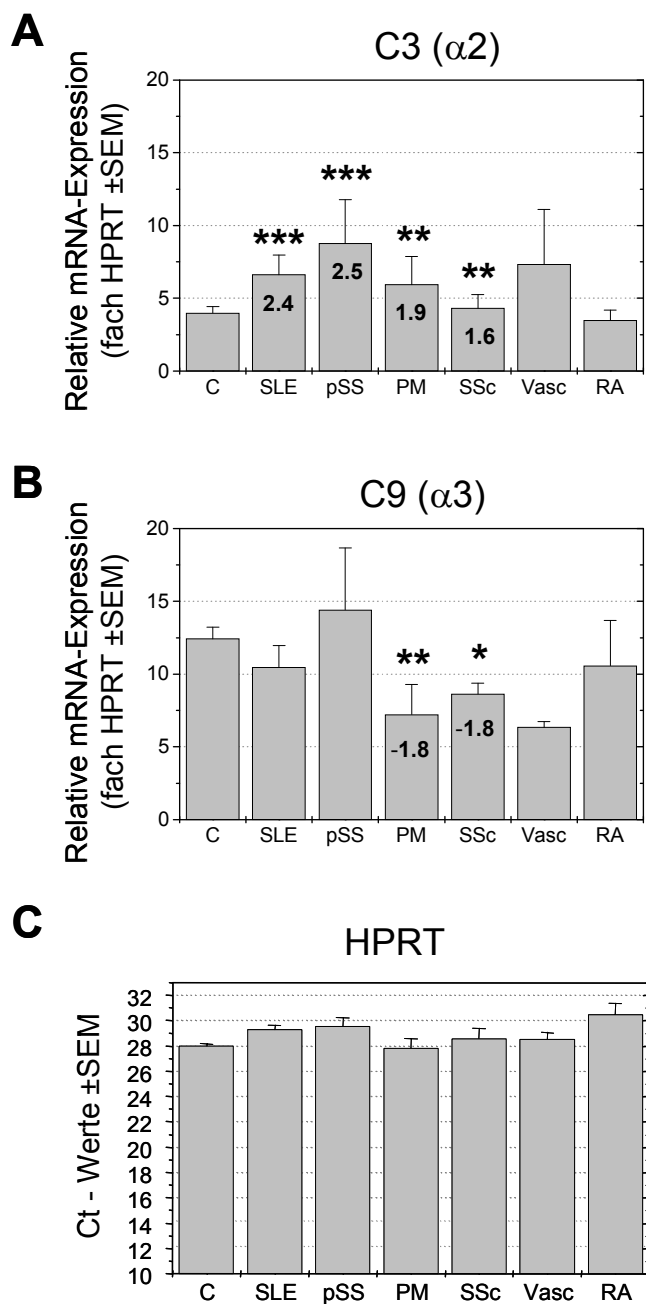


Abb. 7 Das Genexpressionsprofil der konstitutiven Proteasomuntereinheiten C3 ($\alpha 2$) und C9 ($\alpha 3$) und des Kontrollgens (Haushalts-Gens) HPRT in PBMC bei Autoimmunpatienten (s. a. Legende zu Abb. 5).

Bei Polymyositis und Sklerodermie zeigte C9 ($\alpha 3$) eine signifikante leichte Reduktion der Genexpression (Abb. 7B). Die C3 ($\alpha 2$)- und C9 ($\alpha 3$)-Transkripte waren - normalisiert auf die HPRT-Expression - in der gleichen Größenordnung reguliert.

Mit Ausnahme der Rheumatoiden Arthritis (n=3) zeigte sich bei dem Referenzgen HPRT in PBMC stabile Expression, wenn die Rohdaten der quantitativen RT-PCR

(Mittelwerte der Ct-Werte) der einzelnen Patientengruppen mit den gesunden Kontrollpersonen verglichen wurden (Abb. 7C).

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der Genregulationsanalysen zusammengefaßt. Bei der Darstellung wurden nur Expressionsunterschiede $\geq 1,6$ fach berücksichtigt. Das Signifikanzniveau ist jeweils angegeben.

	LMP2 ($\beta 1i$) Quotient/ p-Wert	LMP7 ($\beta 5i$) Quotient/ p-Wert	MECL1 ($\beta 2i$) Quotient/ p-Wert	PA28 α Quotient/ p-Wert	PA28 β Quotient/ p-Wert	C3 ($\alpha 2$) Quotient/ p-Wert	C9 ($\alpha 3$) Quotient/ p-Wert
SLE n=26	—	—	—	—	2,6 ↑ 0,0010	2,4 ↑ 0,0010	—
pSS n=6	2,2 ↑ 0,0010	—	3,9 ↑ 0,001	2,2 ↑ 0,0075	2,1 ↑ 0,0030	2,5 ↑ 0,0010	—
SSc n=4	—	—	1,7 ↑ 0,016	—	3,3 ↑ 0,0025	1,6 ↑ 0,0035	1,8 ↓ 0,0035
PM n=4	—	—	—	—	2,4 ↑ 0,0075	1,9 ↑ 0,0095	1,8 ↓ 0,0010
Vasc n=2	—	—	—	—	—	2,5 ↑ 0,0060	—
RA n=3	—	—	2,9 ↑ 0,0025	—	—	2,9 ↑ 0,0035	—

Tabelle 6 Zusammenfassung der Ergebnisse der quantitativen Real-time RT-PCR-Analysen.

Die relative mRNA-Expression proteasomaler Gene ist als Quotient der Expression in der jeweiligen Patientengruppe *versus* Normalkontrollgruppe angegeben. Als Referenzgen diente Hypoxanthinphosphoribosyltransferase (HPRT). Die Auswertung erfolgte nach Pfaffl et al, 2002. Es wurden nur Änderungen der relativen mRNA-Expression $\geq 1,6$ in der Auswertung berücksichtigt.

4.5 Die Hochdosis-Glukokortikoidtherapie zeigte bei SLE-Patienten keinen signifikanten Einfluß auf die Genexpression in PBMC

Glukokortikoide beeinflussen die Genexpression von Proteasom-Untereinheiten (Du et al., 2000). Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Genexpression im Proteasom-System in PBMC bei den untersuchten Autoimmunpatienten durch die individuelle immunsuppressive Therapie, insbesondere durch eine additive Immunsuppression zusätzlich zur Corticoidtherapie, verändert ist. Deshalb wurden die Real-time RT-PCR-Daten im Hinblick auf einen möglichen Therapieeinfluß untersucht. Innerhalb der Diagnosegruppe mit der größten Fallzahl, den SLE-Patienten (n=26), wurden 11 Patienten mit einer niedrig-dosierten Kortikoid-Therapie mit Patienten

verglichen, die eine additive immunsuppressive Therapie erhielten. Es fanden sich bei keiner der untersuchten Proteasom-Untereinheiten signifikante Expressionsunterschiede im Vergleich zwischen den beiden Therapiegruppen (Abb. 8).

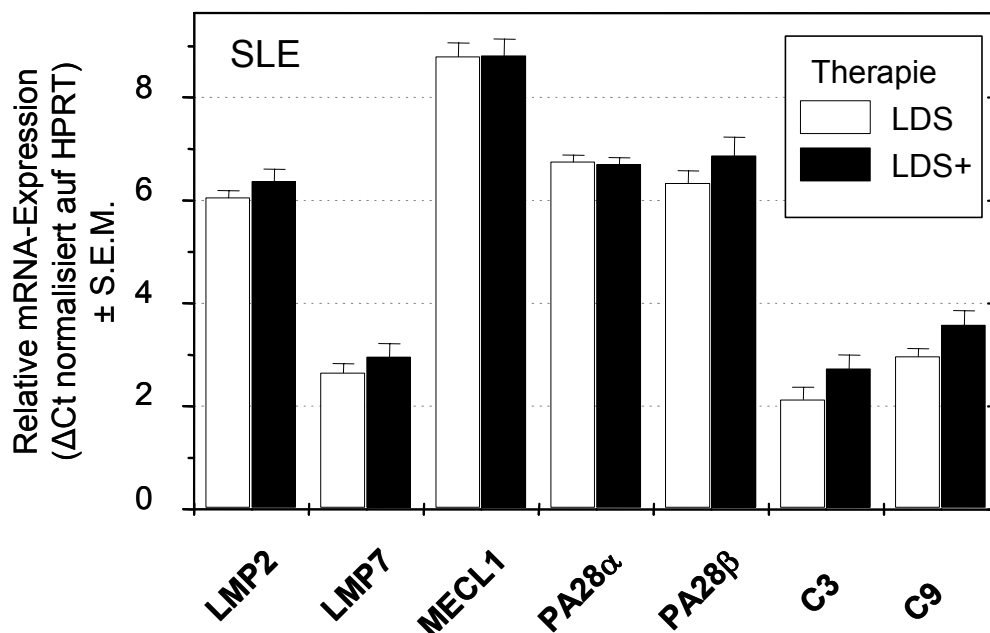


Abb. 8 Die Genexpression von Proteasomuntereinheiten in PBMC bei SLE-Patienten (n=26) wird nicht signifikant von additiver immunsuppressiver Therapie beeinflusst. 11 Patienten mit niedrig-dosierter Kortikosteroidtherapie (LDS) wurden mit 15 Patienten mit additiver immunsuppressiver Therapie verglichen (LDS+). Die Meßwerte sind als Mittelwerte der relativen mRNA-Expression \pm Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M.) dargestellt. Um die statistische Signifikanz zu überprüfen, wurde der zweiseitige U-Test nach Mann-Whitney eingesetzt.

4.6 Regulation der Proteasom-Proteinexpression bei Autoimmunerkrankungen

In einer weiterführenden Reihe von Experimenten wurde untersucht, ob sich in PBMC bei Autoimmunerkrankungen die nachgewiesene differentielle Regulation auf Transkriptebene (vgl. 4.4) in der Expression der konstitutiven oder der Immunoproteasom-Untereinheiten auf der Proteinebene widerspiegelt. Die Proteinexpression wurde in unfraktionierten PBMC-Gesamtlysaten (30 μ g Gesamtprotein) von allen Autoimmunpatienten analysiert, deren mRNA-Expression zuvor untersucht und quantifiziert worden war (s. 4.4). C3 (α 2), C9 (α 3), LMP2 (β 1i), LMP7 (β 5i), MECL1 (β 2i) und PA28 α wurden mit Hilfe der Western-Blot-Technik analysiert. Repräsentative Immunoblots zeigen die LMP2 (β 1i)-Proteinexpression (Abb. 9). Das LMP2 (β 1i)-Signal war - mit Ausnahme der Mehrzahl der Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom - bei allen 22 gesunden Kontrollpersonen und den

untersuchten Autoimmunpatienten ähnlich. (Abb. 9 und Daten nicht dargestellt). Der Immunoblot wurde bei den pSS-Patienten gezielt überexponiert (Gelspur 8-13), um die relative Reduktion der LMP2 (β 1i)-Expression zu verdeutlichen.

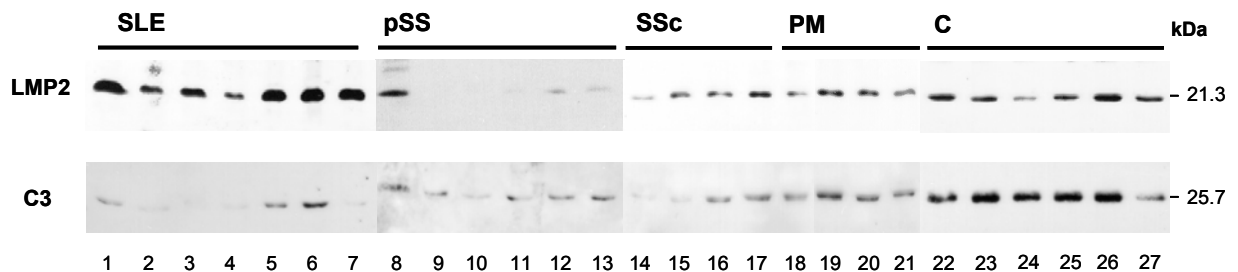


Abb. 9 Immunoblot-Analyse des Proteinexpressionsprofils von LMP2 (β 1i) in PBMC-Gesamtprotein-Lysaten bei Autoimmunerkrankungen. Repräsentative Daten sind für SLE (n=7, Spuren 1-7), pSS (n=6, Spuren 8-13), SSc (n=4, Spuren 14-17), PM (n=4, Spuren 18-21), und gesunde Kontrollpersonen (n=6, Spuren 22-27) gezeigt. Die PBMC-Lysate wurden auf 30 μ g Gesamtprotein normalisiert, mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese fraktioniert, und im Westernblot mit Antikörpern gegen LMP2 (β 1i) und die konstitutive humane Proteasomuntereinheit C3 (α 2) analysiert. Die Spuren 8-13 wurden gezielt überexponiert, um zu verdeutlichen, dass das LMP2 (β 1i)-spezifische Signal bei der Mehrzahl der pSS-Patienten reduziert ist.

Die spezifischen Proteinbanden wurden densitometrisch quantifiziert und auf die C3 (α 2)-Protein-Expression unter der Annahme normalisiert, dass die Spiegel der konstitutiven Untereinheit C3 (α 2) eine gute Einschätzung der Menge an funktionellen Gesamtproteasomen in einer Zelle erlauben. Für die einzelnen Patientengruppen wurden die Mittelwerte der Proteinexpression in PBMC für LMP2 (β 1i) (Abb. 10A), LMP7 (β 5i) (Abb. 10B), MECL1 (β 2i) (Abb. 10C) und PA28 α (Abb. 10D) auf C3 (α 2) normalisiert dargestellt. Die densitometrische Quantifizierung bestätigte, dass die LMP2 (β 1i)-Proteinspiegel bei 5 von 6, d. h. der überwiegenden Mehrzahl der Sjögren-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollspendern signifikant reduziert waren, jedoch nicht bei den anderen 39 untersuchten Autoimmunpatienten (Abb. 9, Abb. 10A und Daten nicht dargestellt). Bei SLE-, PM- und SSc-Patienten fand sich eine signifikant erhöhte LMP2 (β 1i)-Proteinexpression (Abb. 10A). LMP7 (β 5i) war bei SLE-, pSS, PM- und SSc-Patienten ebenfalls signifikant erhöht (Abb. 10B).

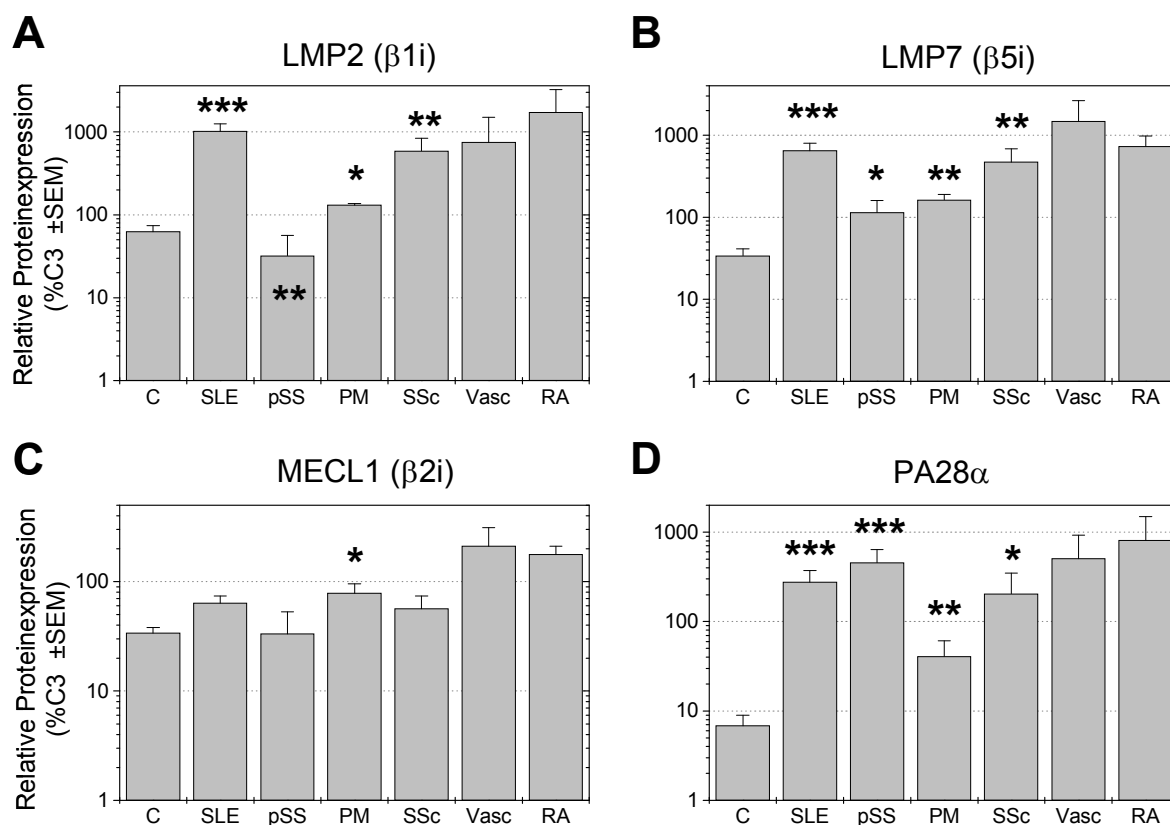


Abb. 10 Quantifizierung der relativen proteasomalen Proteinexpression bei Autoimmunerkrankungen. PBMC-Lysate aller untersuchten Autoimmunpatienten (n=45, Aufschlüsselung der Fallzahlen s. Abb. 5) und Normalkontrollen (n=22). Die mittlere Expression wurde normalisiert auf C3 ($\alpha 2$) und logarithmisch dargestellt \pm Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M.) dargestellt. Das C3 ($\alpha 2$)-Expressionsniveau entspricht dem Wert 0 auf der Ordinate. Wegen sehr kleiner Fallzahlen wurden die Vasculitis- und die RA-Patienten nicht in die statistische Auswertung einbezogen. Signifikante Änderungen (zweiseitiger Mann-Whitney *U*-Test) sind im Vergleich zur Normalkontroll-Gruppe angegeben (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Die MECL1 ($\beta 2i$)-Proteinexpression zeigte nur bei Polymyositis-Patienten eine leichte signifikante Hochregulation (Abb. 10C). PA28 α war bei SLE, primärem Sjögren-Syndrom, Polymyositis und Sklerodermie signifikant erhöht (Abb. 10D). Alle drei IFN γ -induzierbaren Proteasomuntereinheiten und PA28 α waren auch bei Vasculitis- und RA-Patienten vermehrt exprimiert. Aufgrund sehr kleiner Fallzahlen wurden diese Patienten jedoch nicht in die statistische Auswertung einbezogen. Die Proteinexpression von LMP2 ($\beta 1i$), LMP7 ($\beta 5i$) und PA28 α war in humanen PBMC normalisiert auf C3 ($\alpha 2$) in einer vergleichbaren Größenordnung reguliert. Bei den gesunden Kontrollpersonen fanden sich Mittelwerte zwischen ca. 7-60% C3 ($\alpha 2$), bei den Autoimmunpatienten wurden Mittelwerte zwischen ca. 40-2000 gemessen (Abb. 10A, B und D). Dagegen

war die MECL1 (β 2i)-Expression in PBMC auf wesentlich niedrigerem Niveau reguliert (Abb. 10C). Bei Kontrollspendern lag die mittlere MECL1 (β 2i)-Proteinexpression in der gleichen Größenordnung wie die Expression von LMP2 (β 1i), LMP7 (β 5i) und PA28 α (ca. 35 %C3). Außer bei Polymyositis-Patienten zeigte sich keine signifikante Regulation (Mittelwerte 35-110% C3).

4.7 Vergleich der relativen proteasomalen mRNA- und Proteinexpression

Die proteasomale Genexpression und Proteinexpression zeigten sich in PBMC nicht gleichsinnig reguliert. Die **LMP2 (β 1i)**-Untereinheit wird auf Proteinebene beim systemischen Lupus erythematodes, Polymyositis und Sklerodermie signifikant hochreguliert, was sich nicht auf Transkriptebene nachweisen lässt. Interessanterweise zeigt sich bei Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom eine signifikante Erhöhung der LMP2 (β 1i)-mRNA, wohingegen LMP2 (β 1i) auf Proteinebene signifikant vermindert nachgewiesen wird.

Bei **LMP7 (β 5i)** zeigt sich auf mRNA-Ebene bei keiner der Patientengruppen eine signifikante Veränderung. Dagegen findet sich eine LMP7 (β 5i)-Proteinerhöhung bei allen untersuchten Patientengruppen in PBMC.

Auf Transkriptebene findet sich bei **MECL1 (β 2i)** ein hochsignifikanter Anstieg beim primären Sjögren-Syndrom, und eine geringerer signifikante Erhöhung bei Sklerodermie während MECL1 (β 2i)-Protein nur bei Polymyositis-Patienten geringfügig signifikant erhöht ist.

Allein beim primären Sjögren-Syndrom ist die **PA28 α -mRNA**-Expression hochsignifikant um den Faktor 2,2 erhöht, was sich auch in hochsignifikant erhöhter PA28 α -Proteinexpression widerspiegelt. Bei allen andern untersuchten Patientengruppen bleibt die PA28 α -mRNA-Expression in der gleichen Größenordnung wie bei der Kontrollgruppe. Dagegen findet sich bei allen untersuchten Patientengruppen eine erhöhte PA28 α -Proteinexpression.

4.8 Molekulargenetische Analyse des LMP2 (*PSMB9*)-Gens beim primären Sjögren-Syndrom

In einem bekannten Tiermodell für eine autoimmune Exokrinopathie ähnlich dem Sjögren-Syndrom beim Menschen, der NOD (non obese diabetic)-Maus, unterliegen lymphoide Zellen vermehrt dem programmierten Zelltod, der Apoptose (s. 1.4). Bei diesem Mausmodell fand sich eine verminderte LMP2 (β 1i)-Genexpression.

Ein molekulargenetischer Defekt in der Promotorregion des LMP2 (*PSMB9*)-Gens wurde ursächlich im Zusammenhang mit der verringerten Expression von LMP2 (β 1i) gesehen (Hayashi et al., 2003; Kuhlreiber et al., 2003).

Da sich in der vorliegenden Studie ebenfalls eine verminderte Genexpression der LMP2 (β 1i)-mRNA bei Sjögren-Patienten zeigte, wurde unter der Arbeitshypothese einer analogen genetischen Veränderung der gesamte 5'-untranslatierte Bereich des LMP2 (*PSMB9*)-Gens einschließlich der Promotor-Region sowie des ersten Exons inklusive der flankierenden Intron-1-Sequenz mittels PCR amplifiziert und durch direkte Sequenzierung auf genomischer Ebene untersucht.

In Abb. 11 ist die Lokalisation des Exon 1 des LMP2 (*PSMB9*)-Gens und des Exon 1 des unmittelbar benachbarten *TAP1*-Gens dargestellt. Die Genregulation von LMP2 (*PSMB9*) und *TAP1* erfolgt über einen gemeinsamen bidirektionalen Promotor.

Die zur PCR-Amplifikation verwendeten Primer L1a und L1s sind in der entsprechenden Richtung eingezeichnet. Regulatorische Elemente wie GC-Boxen und eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF- κ B sind nach Wright et al. (1995) bezeichnet. Die doppelte Linie markiert ein potentielles Initiationselement, der gepunktete Rahmen zwei zusätzliche GC-Boxen und der gestrichelte Rahmen eine Homologie zum Interferon-stimulated response element (ISRE).

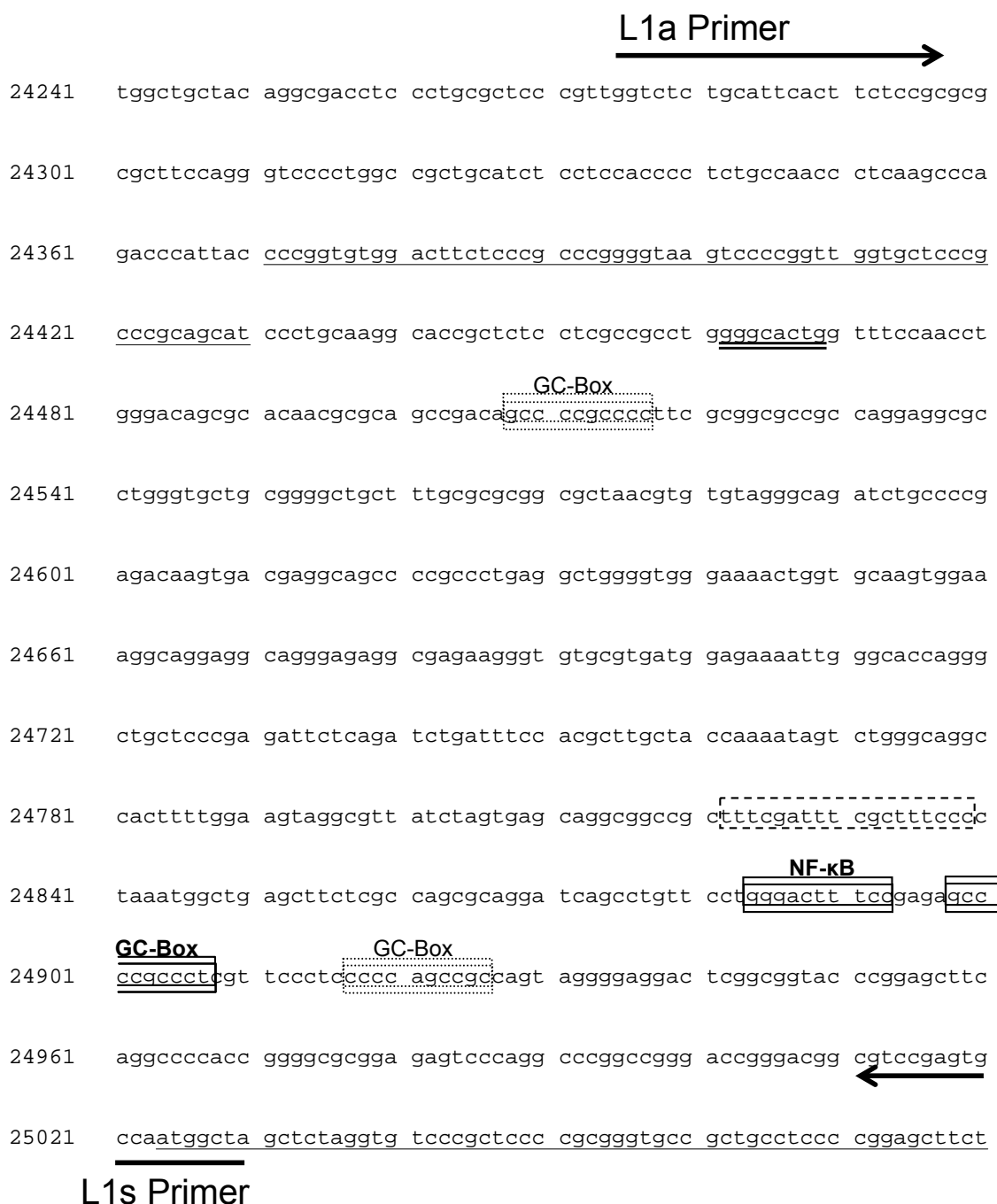


Abb. 11 Auszug aus der genomischen Sequenz der 5'-untranslatierten Region (UTR) des humanen LMP2 (*PSMB9*)-Gens (GenBank Acc. Nr. X664101) einschließlich Exon 1 und flankierender Intronsequenz. Das Exon 1 des LMP2 (*PSMB9*)-Gens und des unmittelbar benachbarten *TAP1*-Gens sind unterstrichen. Das Start-Codon des LMP2 (*PSMB9*)-Gens befindet sich an der Nukleotid-Position 24430-24428 und des *TAP1*-Gens an Position 25024-25026. Die verwendeten Primer sind in der entsprechenden Richtung eingezeichnet. Die Genregulation von LMP2 (*PSMB9*) und *TAP1* erfolgt über einen gemeinsamen bidirektionalen Promotor. Die entsprechenden regulatorischen Elemente sind nach Wright et al. (1995) bezeichnet. Die doppelte Linie markiert ein potentielles Initiationselement, der gepunktete Rahmen zwei zusätzliche GC-Boxen und der gestrichelte Rahmen eine Homologie zum Interferon-stimulated response element (ISRE).

Die genomische DNA wurde aus PBMC von Patienten und gesunden Kontrollpersonen isoliert und der entsprechende Genabschnitt mittels PCR amplifiziert. In der Gelelektrophorese fand sich ein spezifisches PCR-Produkt mit der korrekten errechneten Länge von 758 bp, so dass die Effizienz und die Spezifität der PCR bestätigt werden konnte (Abb. 12).

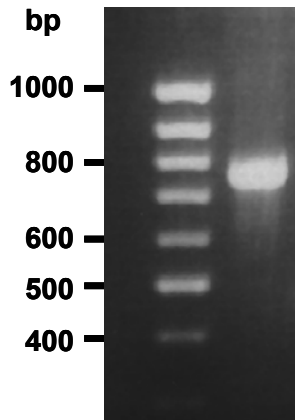


Abb. 12 PCR-Amplifikation der 5'-untranslatierten Region (UTR) des humanen LMP2 (*PSMB9*)-Gens einschließlich Exon 1 und flankierender Intronsequenz (IVS1). Das PCR-Produkt mit einer erwarteten Länge von 758 bp wurde auf einem 1%-Agarose/TAE-Gel aufgetrennt.

In der direkten Sequenzanalyse fand sich bei allen untersuchten Sjögren-Patienten kein Hinweis auf molekulargenetische Veränderungen in der Promotor-Region des LMP2 (*PSMB9*)-Gens.

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Studie wurde die Expression ausgewählter Proteasom-Untereinheiten bei Autoimmunpatienten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene untersucht. Die Untersuchungen wurden in Makrophagen aus peripherem Blut durchgeführt, das nach Einverständniserklärung durch die Patienten im Rahmen von Routineblutanalysen entnommen wurde, um die Belastung und den Aufwand für die Patienten so gering wie möglich zu halten. Es wurden quantitative Verfahren zur Gen- und Proteinexpressionsanalyse etabliert. In einem Zellkultursystem mit lymphoiden Zellen wurde die Sensitivität und Spezifität der neu entwickelten relativen mRNA-Quantifizierungsmethode erfolgreich bestätigt. Da IFN γ die Expression von Immunproteasomuntereinheiten induziert, wurden Analysen vor und nach IFN γ -Stimulation durchgeführt. Erwartungsgemäß konnte ein Anstieg der Immunproteasomuntereinheiten LMP2 (β 1i), LMP7 (β 5i) und MECL1 (β 2i) sowie der Proteasomaktivatoruntereinheiten PA28 α und PA28 β nach IFN γ -Induktion in der Zellkultur nachgewiesen werden. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass die relative mRNA-Quantifizierung auch für die Genexpressionsstudien in humanen Blutmakrophagen geeignet ist.

Um die Ergebnisse der Genregulationsanalysen gleichzeitig mit einer zweiten unabhängigen Methode zu verifizieren, wurde eine semiquantitative Proteinanalyse in humanen PBMC basierend auf der Immunoblot-Technik durchgeführt.

Bei Autoimmunpatienten fanden sich eine Reihe von Hinweisen auf eine veränderte Expression im proteasomalen System, teilweise sogar charakteristische Expressionsprofile wie etwa bei SLE, primärem Sjögren-Syndrom, Sklerodermie und Polymyositis, was gegen eine unspezifische Induktion der untersuchten Untereinheiten im Rahmen einer systemischen Inflammation bei Erkrankungen des Rheumatischen Formenkreises spricht.

5.1 Auswahl der Quantifizierungsmethode zur Analyse der Genexpression im proteasomalen System

Die Real-time RT-PCR wird zur quantitativen Analyse der Genexpression zunehmend angewandt wegen ihrer hohen Sensitivität, der guten Reproduzierbarkeit und des breiten linearen Meßbereichs. Darüber hinaus ist sie die sensitivste Methode, um auch

gering exprimierte Transkripte messen zu können (Pfaffl und Hageleit, 2001; Pfaffl et al., 2002), insbesondere in Geweben mit niedriger mRNA-Konzentration (z. B. Knochenmark bzw. Fettgewebe) oder bei sehr kleinen Gewebeproben, z. B. Biopsien bzw. Einzelzellen (Lockey et al., 1998; Steuerwald et al., 1999), oder um sehr geringe Veränderungen der mRNA-Expressionsrate zu erfassen (Wittwer et al., 1997; Pfaffl et al., 2001; Pfaffl et al., 2002). Nachteile des Verfahrens, das mehrere konsekutive Schritte umfaßt, sind die relativ komplexe Technik mit möglichen Fehlerquellen bei der RNA-Präparation, der reversen Transkription und der TaqMan PCR, die eine hohe Pipettiergenauigkeit erfordert.

Bei der Real-time RT-PCR können zwei verschiedene Quantifizierungsmethoden angewendet werden, die absolute und die relative Quantifizierung. Bei der absoluten Quantifizierung wird die absolute Kopienzahl der mRNA durch Vergleich mit externen Kalibrierungskurven bestimmt. Der Vorteil der absoluten Quantifizierung ist die Möglichkeit des direkten Vergleichs der Expressionsdaten zwischen verschiedenen Labors oder an verschiedenen Tagen, da eine Kalibrationskurve eine unveränderliche, verlässliche Datenbasis bietet.

Die relative Expression errechnet sich aus der Expressionsrate eines Zielgens gegenüber einem nicht-regulierten Referenzgen und ist für die meisten Analysen geeignet, bei denen physiologische Veränderungen der Expressionsrate untersucht werden. Daher wurde die relative Quantifizierung in dieser Arbeit zur Analyse der Genexpression im proteasomalen System verwendet. Ein Vorteil der relativen Quantifizierung ist sogar die Tatsache, dass Trendvorausagen besser erklärt werden können, wobei die Ergebnisse sehr stark von der verwendeten Normalisierungsmethode und dem ausgewählten Referenzgen abhängen (Pfaffl et al., 2002).

Das REST[®]-Programm, das zur statistischen Analyse verwendet wurde, bietet eine Reihe von Vorteilen wie die integrierte Real-time PCR-Effizienzkorrektur und die Normalisierung auf einen endogenen Standard. Damit werden Variationen von Probe zu Probe in der Qualität der RNA-Präparation, Variationen der Effizienz der reversen Transkriptions-Reaktion oder Variationen in der Menge der in die PCR eingesetzten cDNA kompensiert. Deshalb sind die Reproduzierbarkeit und die Effizienz der reversen Transkription ebenso wie die RNA-Präparationsmethode oder die verwendete reverse Transkriptase nicht von Bedeutung. Pfaffl et al. (2002) konnten zeigen, dass Variationen der eingesetzten cDNA-Menge keinerlei signifikante Änderungen der relativen Expressionsraten ergaben, die durch das REST[®]-Programm errechnet wurden.

REST[®] verwendet für die statistische Signifikanzanalyse ein Randomisierungsverfahren (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test[®]), das keinerlei Annahme über die Verteilung der gemessenen Daten voraussetzt, die ohnehin bei relativen Genexpressionsraten fragwürdig wäre. Zudem sind Randomisierungsverfahren anpassungsfähiger als nicht-parametrische Rangtests (z. B. *U*-Test nach Mann-Whitney) und sinken im Vergleich zu parametrischen Tests (z. B. *t*-Test) nicht in ihrer Teststärke (Horgan et al., 2000; Pfaffl et al., 2002).

5.2 Identifizierung geeigneter Haushalts-Gene zur quantitativen Analyse der Genexpression im proteasomalen System

Die korrekte Normalisierung der Genexpression ist eine entscheidende Voraussetzung für die Validität der Ergebnisse, die Schlußfolgerungen auf pathophysiologische Mechanismen erlauben, insbesondere wenn nicht ausgeschlossen ist, dass die Expression in engen Grenzen reguliert sein kann und mögliche Unterschiede bei Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen gering sein können. Zur Normalisierung der mRNA-Expressionsdaten wurde HPRT als internes Kontrollgen ausgewählt, da es die größte Expressionsstabilität aufwies. Dieses Resultat stimmt mit einer früheren Untersuchung an zehn Haushalts-Genen überein, in der HPRT unter den stabilsten exprimierten humanen Haushalts-Genen in primären Fibroblasten, im Knochenmark, in Neuroblastomzellen und einem Normal-Gewebepool rangiert (Vandesompele et al., 2002). Die konstitutiv exprimierte Proteasomuntereinheit C3 ($\alpha 2$) erwies sich als ungeeignet zur Normalisierung der TaqMan-Daten, da die C3 ($\alpha 2$)-mRNA-Expression sowohl bei gesunden Kontrollpersonen als auch bei den untersuchten Patientengruppen eine im Vergleich zu HPRT und C9 ($\alpha 3$) wesentlich größere Streubreite zeigte (s. a. Abb. 7).

Die Induktion der konstitutiven Untereinheit C3 ($\alpha 2$) wurde im humanen Skelettmuskelgewebe bei septischen Patienten beschrieben (Tiao et al., 1997). Übereinstimmend mit diesen Daten wird C3 ($\alpha 2$) mRNA auch bei anderen Autoimmunerkrankungen einschließlich Bindegewebserkrankungen und systemischer Vasculitis hochreguliert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine differentielle Regulation von C3 ($\alpha 2$) nicht ausgeschlossen werden kann. Auch nach Glukokortikoidexposition konnte eine erhöhte C3 ($\alpha 2$)-mRNA-Expression festgestellt

werden, die wahrscheinlich durch eine Störung der Genregulation durch NF- κ B (nuclear factor kappaB) zu erklären ist (Du et al., 2000). Ein alternativer Induktionsmechanismus der C3 (α 2)-Genexpression ist zu vermuten, da die große Mehrheit der in dieser Studie untersuchten Patienten eine Immunsuppression mit Steroiden erhielt. In der größten untersuchten Diagnosegruppe, den SLE-Patienten, konnte auf mRNA-Ebene keine immunsuppressive Therapie mit der Expression einer der untersuchten Proteasomuntereinheiten korreliert werden (Abb. 8).

5.3 Genregulation von LMP2 (β 1i)

Es wurde eine alternative Variante der LMP2 (β 1i)-Untereinheit beschrieben, die durch alternatives Spleißen erzeugt wird und deren Funktion bislang noch unbekannt ist (Singal et al., 1995). Die Varianten unterscheiden sich nur in der Sequenz des Propeptids (GenBank Acc. Nr. NM_148954), so dass die reife Form des Proteins identisch ist. In der vorliegenden Studie wurden die Amplifikationsbedingungen bei der relativen mRNA-Quantifizierung so gewählt, dass beide alternativen Transkripte gemessen werden konnten. Um die Relation beider Transkripte zu bestimmen und eine Aussage zu treffen, ob eines der alternativen Transkripte bevorzugt gespleißt wird, wäre eine sequenzspezifische mRNA-Quantifizierung erforderlich. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich hinter alternativ gespleißten Propeptidsequenzen ein regulatorisches Prinzip für die Bildung und Reifung des Proteasoms verbirgt. Die LMP2 (β 1i)-mRNA war nur in PBMC beim primären Sjögren-Syndrom signifikant hochreguliert (Abb. 5). Die Genexpression von LMP2 (β 1i) wird zusammen mit TAP1 (Transporter assoziiert mit Antigenprozessierung) von einem gemeinsamen, bidirektionalen Promotor reguliert (Abb. 11), in dem sich eine Bindungsstelle für NF- κ B, mehrere GC-Boxen und eine homologe Sequenz des Interferon-stimulated response element (ISRE) befinden. Die koordinierte basale und induzierte Genregulation von LMP2 (β 1i) und TAP1 konnte experimentell bestätigt werden und weist auf eine essentielle Funktion der beiden Gene in der MHC Klasse I-Antigenpräsentation hin (Wright et al., 1995). Es fanden sich Hinweise für eine differentielle Regulation durch genspezifische, *cis*-aktive regulatorische Sequenzelemente (Schmidt et al., 1993). Es ist denkbar, dass bekannte *cis*-aktive Regulatorelemente in PBMC beim primären Sjögren-Syndrom für die Hochregulation der LMP2 (β 1i)-mRNA verantwortlich sind.

Allerdings fanden sich in der direkten Sequenzanalyse keine genetischen Veränderungen bei Patienten (s. 3.8). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben NF- κ B und IFN γ bislang noch unbekannte Transkriptionsfaktoren die LMP2 (β 1i)-mRNA-Expression beim primären Sjögren-Syndrom verstärken. In Zellen neuronalen Ursprungs ist die LMP2 (β 1i)-mRNA durch den Transkriptionsfaktor Zif268 hochreguliert (James et al., 2006).

Zusätzlich ist auch die Rolle bislang noch unbekannter *trans*-aktiver regulatorischer Sequenzelemente zu diskutieren, die eine verstärkte Transkription bewirken und auch in sehr weit entfernten Sequenzabschnitten liegen können.

Der erhöht gemessene LMP2 (β 1i)-mRNA-Spiegel kann möglicherweise auch durch einen verminderten Abbau des Transkripts zustande kommen. In Analogie zur Regulation der mRNA-Stabilität bei Zytokinen ist in diesem Zusammenhang eine veränderte Stabilität des LMP2 (β 1i)-Transkripts zu diskutieren. Der mRNA-Abbau kann nicht nur von *cis*-aktiven Sequenzelementen abhängig sein, die oft in der 3'-untranslatierten Region des Transkripts vorkommen, sondern auch von einer Reihe von *trans*-aktiven Faktoren wie z. B. RNA-bindenden Proteinen (Seko et al., 2006). Auch Mechanismen der posttranskriptionellen Regulation von mRNA sind denkbar, wie etwa die Optimierung des Spleißvorgangs durch Spleißenhancer. Weiterführende molekulargenetische und biochemisch-funktionelle Studien sind erforderlich, um die Ursache des erhöhten LMP2 (β 1i)-Transkriptspiegels beim primären Sjögren-Syndrom zu klären.

5.4 Genregulation von LMP7 (β 5i)

Das humane LMP7 (*PSMB8*)-Gen kodiert zwei alternativ gespleißte mRNA-Varianten, die sich nur in ihrer aminoterminalen Prosequenz unterscheiden (Fruh et al., 1992): Die nicht funktionsfähige LMP7-E1-Isoform und LMP7-E2, das in neu entstehende Immunoproteasomen integriert wird (Glynne et al., 1993; Yang et al., 1995). Es zeigte sich, dass die nicht funktionsfähige Isoform LMP7-E1 insbesondere bei bestimmten Tumor-Zelllinien exprimiert wird, wohingegen das LMP7-E1-Transkript in primären Zellen nicht nachgewiesen werden konnte (Heink et al., 2006). In der vorliegenden Studie wurden die Amplifikationsbedingungen bei der relativen mRNA-Quantifizierung so gewählt, dass theoretisch beide alternativen LMP7 (β 5i)-Transkripte gemessen

werden konnten. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die LMP7-E1-mRNA in PBMC eine wesentliche Rolle spielt, da es sich um primäre Zellen handelt. Gegen die Expression einer nicht-funktionellen LMP7 ($\beta 5i$)-Isoform spricht auch die Beobachtung, dass LMP7 ($\beta 5i$) auf Proteinebene in PBMC bei allen untersuchten Patientengruppen hochreguliert war (Abb. 10B).

Die LMP7 ($\beta 5i$)-mRNA zeigte in PBMC bei Normalkontrollen und allen Patientengruppen eine im wesentlichen stabile, vergleichbare Expression im Bereich einer ähnlichen Größenordnung. Es fand sich ein deutlich niedrigeres Expressionsniveau im Vergleich zu LMP2 ($\beta 1i$) und MECL1 ($\beta 2i$) nach Normalisierung auf das Referenzgen HPRT. Im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen fanden sich keine signifikanten Genexpressionsunterschiede. Bei der Real-time RT-PCR-Analyse von JOSK-M Zellen, einer humanen histiozytären Lymphomzelllinie, wurde vor IFN γ -Stimulation in der Zellkultur *in vitro* ebenfalls ein niedriges Expressionsniveau von LMP7 ($\beta 5i$) nachgewiesen (Abb. 4A). Allerdings zeigte sich nach IFN γ -Stimulation eine signifikante, dosisabhängige Hochregulation der LMP7 ($\beta 5i$)-mRNA, die im Vergleich zum Anstieg der LMP2 ($\beta 1i$)- und MECL1 ($\beta 2i$)-mRNA deutlich geringer ausfiel. Die unterschiedlichen Resultate der LMP7 ($\beta 5i$)-Genregulation in humanen PBMC und dem JOSK-M-Zellkultursystem erklären sich möglicherweise durch Unterschiede der untersuchten Zellpopulationen oder des humoralen Milieus. Die JOSK-M-Zellen bilden eine homogene Zellpopulation, die der Monozytopoese entstammt. Dagegen findet sich im peripheren Blut eine Mischpopulation, in der die Differentialzytologie näherungsweise im Bereich der folgenden Referenzwerte liegt: Lymphozyten 25-40%, Monozyten 4-10%, Eosinophile 2-4%, Basophile 0-2% und Segmentierte 40-70%. Da davon ausgegangen werden kann, dass der Anteil der Zellen, die der monozytopoetischen Reihe entstammen, in humanen PBMC bei ungefähr maximal 10% liegt, lassen sich die Resultate aus den JOSK-M-Zellen nicht unmittelbar korrelieren. Zudem sind JOSK-M-Zellen maligne transformiert. Daher können auch Unterschiede in der Genexpression im Vergleich zu ausdifferenzierten PBMC vermutet werden. Des Weiteren stellt die JOSK-M-Zellkultur ein vereinfachtes *in vitro*-System dar, das nach IFN γ -Stimulation nur einen einzelnen Aspekt der komplexen humoralen Zytokin-Regulation im peripheren Blut zu simulieren vermag. Es ist denkbar, dass die Genexpression von LMP7 ($\beta 5i$) in PBMC durch andere Zytokine differentiell reguliert wird. Möglicherweise ist auch die IFN γ -Stimulation im Zellkultursystem vergleichsweise

unphysiologisch hoch und über einen zu langen Zeitraum bei Konzentrationen von 20 U/ml und 600 U/ml über 72 h, so dass die beobachtete Hochregulation der LMP7 ($\beta 5i$)-mRNA *in vitro* nicht die Situation im menschlichen Blut bei chronisch erkrankten Autoimmunpatienten widerspiegelt. Bei IFN γ -Exposition im Bereich von 600 U/l unterliegen nach 72 h die meisten Zellen der Apoptose.

Interessanterweise zeigte sich - ähnlich wie in der vorliegenden Studie - in reifen dendritischen Zellen, die ausschließlich Immunoproteasomen exprimieren, nur eine sehr begrenzte Induktion der LMP7 ($\beta 5i$)- und MECL1 ($\beta 2i$)-mRNA während die Transkripte für LMP2 ($\beta 1i$) sowie PA28 α und PA28 β mäßig erhöht waren (Macagno et al., 2001).

Es gibt neben IFN γ alternative Induktionsmechanismen für Immunoproteasom-untereinheiten. Endogenes Stickstoffmonoxid (*NO) ist ein wichtiger zytotoxischer Mediator, der Endothelzellen vor Oxidanzien-induzierter Apoptose schützt. Über den *NO/cGMP/cAMP-Signalweg wird der Transkriptionsfaktor cAMP-response element-binding protein (CREB) phosphoryliert, die cAMP-response element-Promotoraktivität erhöht und die Genexpression von LMP2 ($\beta 1i$) und LMP7 ($\beta 5i$) induziert (Kotamraju et al., 2006). LMP7 ($\beta 5i$) wurde auch bei langanhaltender renaler Ischämie und Inflammation in einem Tiermodell der Ratte im betroffenen Gewebe immunhistochemisch vermehrt gefunden, wobei LMP2 ($\beta 1i$) kaum exprimiert war (Ostrowska et al., 2006).

Die durch proinflammatorische Zytokine, wie z. B. IFN γ , induzierte Anpassung des Proteasomsystems ist eine dynamische, stringent regulierte und vorübergehende zelluläre Antwort. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim *de novo* Aufbau des Immunoproteasoms wird u.a. durch LMP7 ($\beta 5i$) entscheidend beeinflusst (Heink et al., 2005). Es ist sehr gut mit diesen Daten vereinbar, insbesondere im Hinblick auf die Schlüsselfunktion von LMP7 ($\beta 5i$), dass diese Untereinheit auf Transkriptebene in humanen PBMC auf sehr niedrigem relativen Niveau und in sehr engen Grenzen reguliert wird (Abb. 5 B). Dieses Regulationsmuster fand sich ebenso bei gesunden Kontrollpersonen wie auch bei allen untersuchten Kollektiven von Autoimmunpatienten. Interessanterweise ergibt die Expressionsanalyse auf Proteinebene ein anderes Bild. Die Proteinexpression von LMP7 ($\beta 5i$) in PBMC war bei SLE-, pSS-, Polymyositis- und Sklerodermie-Patienten signifikant hochreguliert (Abb. 10B). Auch bei Vasculitis- und RA-Patienten zeigte sich diese Tendenz. Möglicherweise spielen bei

Autoimmunpatienten posttranskriptionelle Mechanismen eine wichtige Rolle. Es sind eine erhöhte Translationsrate, eine erhöhte Stabilisierung oder eine verminderte Degradationsrate von LMP7 ($\beta 5i$) zu diskutieren. Dieses Regulationsmuster wurde in einer anderen Studie bestätigt, bei der sich eine vergleichbare, konstitutive Erhöhung der LMP7 ($\beta 5i$)-Proteinexpression in dendritischen Zellen und einer T-Zell-Lymphomlinie zeigte (Ossendorp et al., 2005).

Einschränkend ist zu berücksichtigen, dass erhöhte LMP7 ($\beta 5i$)-Proteinspiegel nicht notwendigerweise mit einem erhöhten Vorkommen von Immunproteasomen gleichzusetzen sind. Die *de novo* Synthese von Immunproteasomen erfordert als Kofaktor das Proteasom-Maturationsprotein (POMP), das zusammen mit LMP7 ($\beta 5i$) entscheidend an der Reifung des Proteinkomplexes beteiligt ist (Heink et al., 2005). Bei der Proteinexpressionsanalyse fiel auf, dass LMP7 ($\beta 5i$) in PBMC bei allen untersuchten Autoimmunpatienten-Gruppen erhöht war. Daher kann angenommen werden, dass LMP7 ($\beta 5i$) in PBMC dieser Patienten kein limitierender Faktor bei der Biosynthese des Immunproteasom-Komplexes ist.

Nach IFN γ -Stimulation fand sich auch POMP hochreguliert (Witt et al., 2000). Falls nun POMP zusammen mit LMP7 ($\beta 5i$) in PBMC vermehrt exprimiert würde, wäre eine erhöhte Immunproteasom-Biosynthese möglich. Diese Hypothese könnte durch eine quantitative und qualitative Analyse der Proteasomen, z. B. nach Immunopräzipitation oder durch Isolation der Proteasomen untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass Defekte der Untereinheiten LMP7 ($\beta 5i$) und auch LMP2 ($\beta 1i$) das zytotoxische T-Zell-Repertoire reduzieren und damit die Effizienz der Immunantwort schwächen (Chen et al., 2001; Toes et al., 2001).

Es ist denkbar, dass eine Hochregulation von LMP7 ($\beta 5i$) zu einer vermehrten Immunproteasom-Biosynthese führt. Über MHC Klasse I würde ein modifiziertes Peptidrepertoire an der Zelloberfläche präsentiert werden. Zudem erhöht die Verfügbarkeit von Peptiden die MHC Klasse I-Expression (Benham und Neefjes, 1997). Es bleibt zu klären, ob die Deregulation des Proteasom-Systems möglicherweise das T-Zellrepertoire so weit verändert, dass autoreaktive zytotoxische T-Zellen entstehen.

5.5 Genregulation von MECL1 ($\beta 2i$)

Der Promotor des humanen MECL1 (*PSMB10*)-Gens enthält zwei Interferon-stimulated response Elemente (Foss und Prydz, 1999). In Zellen außerhalb des Immunsystems zeigt sich oft eine sehr niedrige Expressionsrate von MECL1 ($\beta 2i$), die durch IFN γ wesentlich gesteigert werden kann, während in bestimmten Zellen des Immunsystems (B-Zellen und Monozyten) MECL1 ($\beta 2i$) hochgradig konstitutiv exprimiert wird und durch IFN γ nur wenig stimulierbar ist (Foss et al., 1998). Ähnlich wie die Immunoproteasom-untereinheiten LMP2 ($\beta 1i$) und LMP7 ($\beta 5i$) wird MECL1 ($\beta 2i$) in unreifen dendritischen Zellen hochreguliert (Li et al., 2001). In der vorliegenden Studie fand sich ebenfalls in PBMC von Sjögren-Patienten eine signifikante, deutlich erhöhte Genexpression von MECL1 ($\beta 2i$) sowie etwas geringer bei Sklerodermie und Rheumatoider Arthritis. Bei den letztgenannten Erkrankungen ist auch die Proteinexpression entsprechend erhöht. Dagegen ist MECL1 ($\beta 2i$) auf Proteinebene in PBMC bei Sjögren-Patienten im Bereich des gesunden Kontrollkollektivs reguliert. Diese Meßergebnisse sprechen für multimodale Regulationsmechanismen der MECL1 ($\beta 2i$)-Expression und unterstreichen die Notwendigkeit der simultanen quantitativen Bestimmung und Auswertung von mRNA- und Proteinexpressionsdaten zur Einschätzung der differentiellen Regulation der Expression im proteasomalen System.

Bei Polymyositis zeigte sich eine im Vergleich zum primären Sjögren-Syndrom gegensinnige Regulation von MECL1 ($\beta 2i$) auf Transkript- und Proteinebene (Abb. 5C und Abb. 10C). Interessanterweise war die MECL1 ($\beta 2i$)-Proteinexpression in PBMC von Polymyositis-Patienten (n=4) signifikant erhöht, tendenziell auch bei primärer Vasculitis und Rheumatoider Arthritis, nicht aber bei SLE- oder Sjögren-Patienten.

Da die MECL1 ($\beta 2i$)-mRNA in PBMC bei Polymyositis auf sehr niedrigem Niveau im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen exprimiert ist, stehen möglicherweise bei der beobachteten erhöhten Proteinexpression posttranskriptionelle Mechanismen im Vordergrund. Hierzu zählen eine Stabilisierung der mRNA, eine verminderte mRNA-Degradation, eine erhöhte Translationsrate oder eine reduzierte Proteinabbaurate. Untersuchungen an MECL1 ($\beta 2i$)-Knock-Out-Mäusen zeigten, dass MECL1 ($\beta 2i$) entscheidend an der Bildung des T-Zell-Repertoires beteiligt ist (Basler et al., 2006). Polymyositis, primäre Vasculitis und Rheumatoide Arthritis werden zu den systemischen, T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen gezählt. Es wäre also

denkbar, dass durch eine Deregulation der MECL1 ($\beta 2i$)-Proteinexpression die katalytische Aktivität und Spezifität neu entstehender Immunoproteasomen in professionellen Antigen-präsentierenden Zellen verändert wird, so dass autoreaktive T-Zellen verstärkt aktiviert werden könnten.

Bei Polymyositis fanden sich neben MECL1 ($\beta 2i$) auch die anderen beiden Immunoproteasom-Untereinheiten (und PA28) auf Proteinebene signifikant erhöht. In dendritischen Zellen ist auch die Hochregulation aller drei induzierbaren Untereinheiten über die Bindung eines Makrophagen-aktivierenden Lipoproteins (MALP-2) an den Toll-like-Rezeptor beschrieben worden, das aus Mycoplasmen stammt, seine Funktion als Adjuvans entfaltet und die Antigenpräsentation verbessert (Link et al., 2004). In diesem Zusammenhang ist ein möglicher auslösender Einfluß von Infektionserkrankungen im Intervall vor dem Ausbruch einer Autoimmunerkrankung zu diskutieren.

Die signifikant erhöhte MECL1 ($\beta 2i$)-Proteinexpression bei der Polymyositis kann eventuell einen interessanten neuen Aspekt für die Labordiagnostik bieten und sollte in einem größeren Patientenkollektiv verifiziert werden. MECL1 ($\beta 2i$) könnte einen spezifischen (Surrogat-) Marker in der Polymyositis-Diagnostik darstellen und wäre ein guter Parameter zur Verlaufsbeurteilung und Therapiekontrolle. Dies ist von besonderer diagnostischer Bedeutung, da bisher bei der Polymyositis zur Verlaufskontrolle der Krankheitsaktivität nur das Myoglobin sowie die Kreatinphosphokinase- und Aldolase-Aktivität im Serum als spezifische Parameter zur Verfügung stehen.

5.6 Genregulation des Proteasomaktivator-Komplexes

Die beiden Untereinheiten des Proteasomaktivator-Komplexes werden zusammen mit den anderen Immunoproteasom-Untereinheiten durch das immunmodulatorische Zytokin IFN γ induziert, das im Rahmen der Immunantwort von aktivierten Th1-Lymphozyten, CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen gebildet wird. Es bestätigte sich in den Vorversuchen mit JOSK-M Zellen, einer humanen myeloischen Zelllinie, dass die PA28 α -mRNA mehr noch als die PA28 β -mRNA nach IFN γ -Exposition *in vitro* erhöht gemessen wurde (Abb. 4).

Dagegen war die Proteasomaktivator-Untereinheit PA28 α auf Transkriptebene nur in PBMC beim primären Sjögren-Syndrom hochreguliert (Abb. 6A). Alle anderen Patienten zeigten eine ähnliche basale Genexpressionsrate wie das Kontrollkollektiv.

Dagegen war die Proteinexpression von PA28 α in PBMC bei allen untersuchten Autoimmunerkrankungen deutlich erhöht (Abb. 10D).

Ebenfalls signifikant erhöht fand sich die PA28 β -mRNA bei allen Autoimmunpatienten (Abb. 6B). Unter der Annahme einer analogen Regulation in den hier untersuchten Zellen (JOSK-M und PBMC), liegt ein möglicher Erklärungsansatz für die beobachtete differentielle Regulation der α - und β -Untereinheiten des Proteasomaktivator-komplexes. Sowohl in unreifen als auch in reifen dendritischen Zellen findet sich eine hohe basale PA28 α -Proteinexpression (Macagno et al., 2001; Ossendorp et al., 2005). Dagegen ist die PA28 β -Expression in unreifen dendritischen Zellen niedrig und in reifen dendritischen Zellen stark erhöht. Eine funktionelle NF- κ B-Bindungsstelle konnte im Promotor des PA28 β (*PSME2*)-Gens nachgewiesen werden, die im PA28 α (*PSME1*)-Promotor fehlt, so dass die PA28 β -Expression zusätzlich von Transkriptionsfaktoren der NF- κ B-Familie gesteuert werden kann (Ossendorp et al., 2005).

Dieser Regulationsmechanismus könnte die erhöhten Transkriptspiegel von PA28 β bei allen untersuchten Patientengruppen erklären und die vergleichsweise niedrigere mRNA-Expression von PA28 α bei fast allen untersuchten Autoimmunerkrankungen mit Ausnahme des primären Sjögren-Syndroms (Abb. 6A und B). Hier könnten bislang unbekannte regulatorische Elemente auf DNA-Ebene oder nicht vorbeschriebene Transkriptionsfaktoren oder eine Stabilisierung des PA28 α -Transkripts eine Rolle spielen. Es ist zu bedenken, dass die jeweils aktuell gemessene mRNA-Konzentration immer die Differenz aus mRNA-Synthese und -Degradation widerspiegelt. Die Bestimmung der Transkripte sagt noch nichts aus über die Geschwindigkeit der Transkription, die Halbwertszeit des Transkripts sowie mögliche posttranslationale Prozesse und Transportvorgänge.

Eine Überexpression von PA28 α allein war *in vitro* ausreichend, um die proteolytische Aktivität des Proteasoms zu steigern und ein bestimmtes virales Epitop zu erzeugen (Groettrup et al., 1996). Eine vermehrte Expression von PA28 α induzierte die Oberflächenexpression von MHC Klasse I in einer Colonkarzinomzelllinie nach IFN γ -Behandlung (Miyagi et al., 2003).

Weitere Hinweise für eine differentielle, Zelltyp-spezifische Regulation des Proteasomaktivator-komplexes liefert der Nachweis von PA28 α , nicht aber PA28 β im Hirngewebe, wobei über eine nicht-immunologische Funktion spekuliert wird (Rechsteiner und Hill, 2005). Es zeigte sich ein Zelltyp-abhängiges Proteinexpressions-

niveau für PA28 α und PA28 β (Ossendorp et al., 2005), was auch die Unterschiede bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen in den untersuchten PBMC erklären kann, die ja eine Mischpopulation darstellen. In murinen Thymusstroma-Zellen war der Proteasomaktivator-Komplex in allen untersuchten Subpopulationen unabhängig von der IFN γ -Stimulation konstitutiv exprimiert (Nil et al., 2004), womit diese Studie alternative Genregulationsmechanismen für PA28 bestätigt. Alternative Induktions- und Regulationsmechanismen können auch für die induzierbaren Immunoproteasom-untereinheiten angenommen werden.

Interessanterweise wurde die α -Untereinheit des Proteasomaktivator-Komplexes als Autoantigen beim SLE und primären Sjögren-Syndrom charakterisiert (Matsushita et al., 2004). Eine B-Zell-vermittelte humorale Autoimmunität kann durch Überexpression eines Autoantigens gefördert werden (Kishimoto et al., 1996). Auch andere Autoantikörper gegen das 20S-Proteasom wurden bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises nachgewiesen (Arribas et al., 1991; Feist et al., 1996). Bei Patienten mit SLE oder Myositis fanden sich vor allem Autoantikörper gegen die konstitutive Untereinheit C9 (α 3) während sich beim primären Sjögren-Syndrom eine eher polyspezifische humorale Autoimmunantwort gegen das Proteasom zeigte (Feist et al., 1999). *In vitro* binden die humanen Autoantikörper an das Proteasom und blockieren die Proteasomaktivierung über den PA28 $\alpha\beta$ -Komplex, wobei die Bedeutung für die Zytopathogenese bei Autoimmunerkrankungen derzeit noch ungeklärt bleibt (Brychcy et al., 2006).

Der PA28-Komplex interagiert direkt mit bestimmten Proteinabschnitten des Substrats und ist insbesondere nach verstärkter Expression unter proinflammatorischen Bedingungen (z. B. durch IFN γ) an der Prozessierung bestimmter Epitope beteiligt, so dass sich die Quantität und die Qualität der Antigene, die über den MHC Klasse I-Weg präsentiert werden, entscheidend ändern kann (Murata et al., 2001). Der Proteasomaktivator-Komplex PA28 spielt eine wesentliche Rolle in der optimierten, effizienten Prozessierung von MHC Klasse I-Epitopen (van Hall et al., 2000; Sijts et al., 2002). PA28 scheint die proteolytische Aktivität des (Immuno-) Proteasoms nicht direkt zu beeinflussen, sondern bewirkt durch Bindung an die α -Untereinheiten des äußeren Rings des 20S-Proteasoms eine Konformationsänderung, die die Prozessierung bestimmter Substrate sowohl qualitativ als auch quantitativ begünstigt (Strehl et al., 2005).

Unter Berücksichtigung der bekannten experimentellen Daten über den PA28 $\alpha\beta$ -Komplex könnte eine deregulierte, langandauernde Expression - wie in der vorliegenden Studie gezeigt wurde - z. B. unter dem prolongierten Einfluß proinflammatorischer Zytokine, zur Prozessierung und Präsentation von endogenen MHC Klasse I-Epitopen führen, die beim Gesunden aufgrund der selbstlimitierenden, nur kurzzeitigen Induktion des Immunproteasoms und des Proteasomaktivators nicht an die Zelloberfläche gelangen und keine autoreaktive Immunantwort auslösen können.

5.7 Genregulation der konstitutiven Untereinheiten C3 ($\alpha 2$) und C9 ($\alpha 3$)

Die relative mRNA-Expression der konstitutiven Proteasomuntereinheiten wurde gemessen, um eine Aussage über die basale Genexpression des proteasomalen Systems treffen zu können. In den Vorversuchen mit JOSK-M-Zellen bestätigte sich eine fehlende Induzierbarkeit von C3 ($\alpha 2$) und C9 ($\alpha 3$) nach IFN γ -Exposition (Abb. 4). Damit wäre sowohl C3 ($\alpha 2$) als auch C9 ($\alpha 3$) ein geeignetes Haushalts- oder Referenzgen zu betrachten. In JOSK-M-Zellen zeigten sich tatsächlich nach Normalisierung der Daten auf C3 ($\alpha 2$) oder C9 ($\alpha 3$) (Abb. 4B und C) keine wesentlichen Änderungen im Vergleich zu dem unabhängigen Haushaltsgen HPRT (Abb. 4A). Dagegen fand sich in humanen PBMC bei C3 ($\alpha 2$) mehr noch als bei C9 ($\alpha 3$) eine signifikant veränderte Genregulation nach Normalisierung der Daten auf HPRT (Abb. 7A und B), die nicht durch eine relative Variation der HPRT-Expression zu erklären war (Abb. 7C). Im Vergleich zu C3 ($\alpha 2$) oder C9 ($\alpha 3$) zeigte sich das Expressionsniveau von HPRT sehr stabil und war bei allen untersuchten Autoimmunerkrankungen in der Größenordnung des gesunden Kontrollkollektivs (Abb. 7C). Damit erwiesen sich C3 ($\alpha 2$) und C9 ($\alpha 3$) in PBMC als ungeeignete intrinsische Referenzgene des proteasomalen Systems zur Normalisierung der Genexpression.

In der 5'-regulatorischen Sequenz des humanen C3 (*PSMA2*)-Gens wurden einige GC-Boxen nachgewiesen und zusätzlich ein Silencer-Element, das die Transkriptionsaktivität des Promotors um das 5-10fache im Vergleich zum unmittelbar benachbarten Promotor des C5 (*PSMB1*)-Gens senkt (Tamura et al., 1994). Möglicherweise erklären sich die beobachteten Expressionsunterschiede der C3 ($\alpha 2$)-mRNA durch den Effekt dieses Silencer-Elementes.

Auch im nicht-lymphatischen Gewebe ist eine Genregulation von konstitutiven Proteasomuntereinheiten beschrieben. Im Skelettmuskel war die Transkription von C3 ($\alpha 2$) erhöht im Rahmen einer Sepsis (Tiao et al., 1997) sowie von C3 ($\alpha 2$) und C9 ($\alpha 3$) bei metabolischer Azidose (Bailey et al., 1996). Bei nicht-azidotischer Stoffwechsellage zeigte sich kein Einfluß auf die Expression konstitutiver Proteasomuntereinheiten einschließlich C3 ($\alpha 2$) (Cheung et al., 2005). Es fanden sich um das 2-4fache erhöhte mRNA-Spiegel für C3 ($\alpha 2$) und C9 ($\alpha 3$) sowie andere konstitutive Proteasomuntereinheiten im Skelettmuskel von Krebspatienten (Williams et al., 1999). Im Tiermodell der Ratte zeigte sich unter Sepsis eine vermehrte mRNA-Expression für C3 ($\alpha 2$) und C9 ($\alpha 3$) sowie eine gesteigerte Aktivität des 20S Proteasoms, jedoch keine erhöhte Proteinexpression von C9 ($\alpha 3$) (Hobler et al., 1999).

Beim primären Sjögren-Syndrom stellt C9 ($\alpha 3$) eine wesentliche immunogene Komponente dar, die eine humorale Immunantwort hervorruft (Feist et al., 1996). In PBMC von Sjögren-Patienten fanden sich jedoch keine Hinweise auf eine signifikant erhöhte mRNA-Expression (Abb. 7). Ähnliche Resultate ergab eine Studie in dendritischen Zellen, die aus humanen PBMC isoliert wurden. In unreifen Zellen waren C9 ($\alpha 3$)-Transkripte sehr gering exprimiert. Allerdings erhöhte sich die C9 ($\alpha 3$)-mRNA-Expression signifikant nach Reifung der dendritischen Zellen durch Lipopolysacharid- oder $\text{TNF}\alpha$ -Exposition, nicht aber nach $\text{TGF}\beta$ -Stimulation (Matsunaga et al., 2002). In den immunohistochemischen Untersuchungen von Speicheldrüsengewebe zeigte sich beim primären Sjögren-Syndrom in PBMC keine auffällige Erhöhung der C9 ($\alpha 3$)-Proteinexpression (Egerer et al., 2006). Mögliche Ursachen, die C9 ($\alpha 3$) als Autoantigen im Sinne einer endogenen Immunisierung prädestinieren, können an einer erleichterten Präsentation eines immunogenen C9 ($\alpha 3$)-Peptids liegen, an einer Überexpression bzw. Freisetzung nach Apoptose aus einem noch unbekanntem Herkunftsgewebe oder an einer posttranskriptionellen Regulation bzw. Stabilisierung des Genprodukts.

Die C9 ($\alpha 3$)-mRNA-Expression war bei den meisten untersuchten Autoimmunerkrankungen in PBMC im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv nicht signifikant verändert. Bei Polymyositis und Sklerodermie wurde jedoch eine signifikante Verringerung der C9 ($\alpha 3$)-Transkripte um den Faktor 1,8 relativ zur HPRT-mRNA-Expression gemessen (Abb. 7). In humanen Endothelzellen zeigte sich eine Inhibition der C9 ($\alpha 3$)-Transkription im Zusammenhang mit der Exposition gegenüber

phenolischen Antioxidantien (Takabe et al., 2001). Diese und weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die Genexpression von konstitutiven Proteasom-untereinheiten - im Fall von C9 ($\alpha 3$) über ein Antioxidanzien-responsives Element im Promotor - durch Pharmaka moduliert werden kann (Takabe et al., 2006). In der hier vorliegenden Studie ist ein Einfluß der oben verwendeten Antioxidantien unwahrscheinlich.

Es bleibt zu klären, ob sich die Proteinexpression von C9 ($\alpha 3$) ebenfalls ändert und ob sich funktionelle Konsequenzen für die Proteasom-Komplexbildung oder die katalytische Aktivität des Proteasomsystems in PBMC ergeben. C3 ($\alpha 2$) zeigte auf Proteinexpressionsebene im Vergleich zu C9 ($\alpha 3$) keine wesentliche Regulation, so dass C3 ($\alpha 2$) als internes Referenzprotein zur Normalisierung der Proteinexpressionsdaten herangezogen wurde (Abb. 9).

5.8 Genregulation des Immunoproteasoms beim primären Sjögren-Syndrom

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Autoimmunerkrankungen fand sich beim primären Sjögren-Syndrom auf mRNA-Ebene in peripheren Blutmakrophagen eine signifikant erhöhte Expression der IFN γ -induzierbaren Untereinheiten LMP2 ($\beta 1i$), MECL1 ($\beta 2i$) und PA28 α . Die Proteinexpression von LMP2 ($\beta 1i$) fand sich allerdings bei fast allen untersuchten pSS-Patienten stark abgeschwächt im Vergleich zu gesunden Kontrollen und anderen Autoimmunerkrankungen. Ursächlich ist zum einen ein erhöhtes stabiles Niveau zu diskutieren, zum anderen eine erhöhte mRNA-Stabilität oder auch eine erhöhte Transkriptionsrate. Während bei den anderen untersuchten Autoimmunpatientengruppen eine erhöhte mRNA-Expression mit einer erhöhten Proteinexpression korreliert, ist die Regulation bei pSS umgekehrt. Als Referenzprotein bei den quantitativen Proteinanalysen wurde C3 ($\alpha 2$) aufgrund seiner sehr stabilen Expressionseigenschaften verwendet. Ein relativer Mangel der Untereinheit LMP2 ($\beta 1i$) erklärt sich möglicherweise durch einen relativ erhöhten C3 ($\alpha 2$)-Spiegel. Dagegen spricht jedoch, dass die C3 ($\alpha 2$)-Proteinexpression bei pSS-Patienten nicht signifikant erhöht gemessen wurde. Ein verminderter LMP2 ($\beta 1i$)-Proteinspiegel kann verursacht sein durch einen posttranskriptionellen Defekt der LMP2 ($\beta 1i$)-mRNA, eine Störung der Translation oder eine reduzierte Proteinstabilität der LMP2 ($\beta 1i$)-Untereinheit.

Die funktionellen Konsequenzen einer verminderten Expression von LMP2 ($\beta 1i$) wurden in einer T-Zell-Lymphomlinie untersucht. Spezifische Influenza-Virus-Antigene konnten nicht mehr über den MHC Klasse I-Weg präsentiert werden (Sibille et al., 1995). Damit zeigte sich, dass ein Fehlen der LMP2 ($\beta 1i$)-Untereinheit sowohl die MHC Klasse I-restringierte Antigenpräsentation als auch die MHC Klasse I-Oberflächenexpression direkt beeinflusst.

5.9 Expressionsmuster bei anderen Autoimmunerkrankungen

Die quantitative mRNA-Analyse der Immunoproteasomuntereinheiten lieferte bei SLE, Polymyositis, Sklerodermie, primärer Vasculitis und Rheumatoider Arthritis kaum richtungsweisende Resultate zur Regulation der Genexpression in PBMC. Hier ist die Proteinexpressionsanalyse überlegen und liefert Rückschlüsse auf den Pool an Proteasom-Untereinheiten, die in der Zelle zur Verfügung stehen. Interessanterweise ist LMP7 ($\beta 5i$) auf Proteinebene bei allen untersuchten Patientengruppen hochreguliert und stellt im Rahmen seiner bekannten Schlüsselfunktion in der Biogenese von Immunoproteasomen keinen limitierenden Faktor dar (Heink et al., 2005). Eine Hochregulation von LMP2 ($\beta 1i$) und MECL1 ($\beta 2i$) auf Proteinebene in PBMC zeigte sich dagegen nicht bei allen untersuchten Patientengruppen. Es kann angenommen werden, dass in PBMC über die Biosynthese von Proteasom-Subtypen, die konstitutive Untereinheiten sowie Immunoproteasom-Untereinheiten in unterschiedlicher Stöchiometrie enthalten, eine Feinregulation der proteasomalen Spezifität und Aktivität erfolgen kann (Dahlmann et al., 2000), die möglicherweise die Generierung autoantigener MHC Klasse I-Liganden fördert.

Bei Sklerodermie fand sich in dendritischen Zellen aus peripherem Patientenblut nach Stimulation mit einem Zytostatikum eine Umverteilung des SSc-Autoantigens Topoisomerase I (Scl-70) in nukleoplasmische Aggregate, die in der Immunfluoreszenzanalyse eine direkte Kollokalisierung mit Proteasomen zeigten und einen funktionellen Zusammenhang mit einer veränderten proteasomalen Antigenprozessierung nahe legen (Chen und von Mikecz, 2005).

5.10 Einschränkende Aspekte der Expressionsanalysen

Die quantitative mRNA-Analyse von PBMC ist eine leicht und schnell durchzuführende Screeninguntersuchung, die den Patienten nicht belastet. Es ist kritisch zu betrachten, dass in der vorliegenden Studie eine Mischpopulation von Blutzellen untersucht wurde. In diesem Zusammenhang ist beispielsweise zu berücksichtigen, dass in reifen dendritischen Zellen, die auch im peripheren Blut vorkommen, das Immunproteasom konstitutiv hochreguliert ist (Macagno et al., 1999).

Da keine Untersuchungen zum möglichen Einfluß der Zellpräparationsmethode auf die Gen- und Proteinexpression im proteasomalen System vorlagen, wurden die PBMC möglichst rasch verarbeitet und eingefroren, um die Einflüsse während der Zellpräparation zu minimieren und ein möglichst authentisches Bild der Genregulation in humanen peripheren Blutzellen zu erhalten.

Eine Verifizierung der neuen Erkenntnisse aus der PBMC-Analyse wird in denjenigen Zielgeweben erforderlich sein, die im Rahmen des jeweiligen Autoimmunsyndroms beteiligt sind und die der Biopsie im Rahmen der Routinediagnostik zugänglich sind, wie z. B. der Skelettmuskel bei der Myositis oder die Lippendrüsen beim primären Sjögren-Syndrom, um die pathogenetische Relevanz der im peripheren Blut gemessenen Expressionsunterschiede auszuschließen oder zu bestätigen.

Interessanterweise konnte die Dysregulation der LMP2 (β 1i)-Expression, die beim primären Sjögren-Syndrom erstmals in der vorliegenden Studie entdeckt wurde (Krause et al., 2006), in einer prospektiven Untersuchung von Lippendrüsenbiopsien von Patienten mit Sjögren-Syndrom bestätigt werden (Scheffler S., Feist E., nicht publiziert). Weiterhin fand sich eine Hochregulation der LMP7 (β 5i)-Untereinheit als gewebespezifische Veränderung in Lippendrüsenbiopsaten beim Sjögren-Syndrom (Egerer et al., 2006).

Bei einem der insgesamt 6 Sjögren-Patienten fand sich auf Proteinebene nicht die oben diskutierte Abschwächung der LMP2 (β 1i)-Expression (Abb. 9, Gelspur 8). Es bleibt in größeren Patientenkollektiven zu klären, ob dieser Fall eine Ausnahme ist, ob es eine Assoziation mit dem zeitlichen Verlauf der Erkrankung gibt oder ob es innerhalb des Sjögren-Syndroms seltenere Subtypen gibt, denen möglicherweise andere Deregulations- und Pathogenesemechanismen zugrunde liegen.

Es wäre eine Bestätigung der quantitativen RNA-Analysen durch unabhängige Methoden zu fordern, wie z. B. den Northern Blot oder die Dot Blot-Technik. Diese

Untersuchungen erschienen in der vorliegenden Studie nicht sinnvoll, da die teils geringen Expressionsunterschiede in der untersuchten Größenordnung technisch-methodenbedingt schwer zu erfassen gewesen wären (Tabelle 6).

Die molekulargenetischen Untersuchungen mit direkter Sequenzanalyse der Promotorregion des LMP2 ($\beta 1i$)-Gens erbrachten keinerlei Hinweise auf genetische Veränderungen (s. 4.8), die möglicherweise die Funktion regulatorisch wichtiger Sequenzelemente stören könnten. Dennoch sind molekulargenetische Ursachen nicht vollkommen ausgeschlossen. Es ist denkbar, dass es andere regulatorische Sequenzelemente gibt, die das Expressionsmuster von Immunoproteasom-untereinheiten differentiell beeinflussen können und möglicherweise auch weit außerhalb des untersuchten Sequenzbereichs liegen. In diesem Zusammenhang sind auch z. B. Enhancer-Elemente zu diskutieren, die die Transkriptionseffizienz unabhängig von ihrer Orientierung, ihrem Abstand oder ihrer Position zum Promotor regulieren (Hallikas et al., 2006).

Als zusätzlicher pathogener Mechanismus wären auch Veränderungen der kodierenden Abschnitte von (Immuno-) Proteasomuntereinheiten und Proteasomaktivator-untereinheiten zu berücksichtigen. Ein bekannter Polymorphismus im Codon 60 des LMP2 (*PSMB9*)-Gens ist bei Autoimmunerkrankungen wie der ankylosierenden Spondylitis, der juvenilen Rheumatoiden Arthritis, der Hashimoto-Thyreoiditis und dem insulinabhängigen Diabetes mellitus im Zusammenhang mit Veränderungen der Expression, der katalytischen Aktivität des Proteasoms und der intrazellulären Lokalisation beschrieben worden (Mishto et al., 2006).

Bei der Biosynthese und Reifung des Immunoproteasomkomplexes spielen das Proteasom-Maturationsprotein (POMP) und LMP7 ($\beta 5i$) eine Schlüsselrolle (Heink et al., 2005). Um Rückschlüsse auf eine gesteigerte Immunoproteasom-Synthese zu ziehen, wäre die simultane Messung der Expression von POMP und LMP7 ($\beta 5i$) auf mRNA- und Proteinebene erforderlich. Weiterhin sollten biochemisch-funktionelle Untersuchungen angeschlossen werden, um eine mögliche veränderte, spezifische katalytische Aktivität des Proteinkomplexes festzustellen.

Die meisten signifikanten Ergebnisse zum Expressionsprofil der Immunoproteasom-Untereinheiten und der Proteasom-Aktivatoruntereinheiten fanden sich bei größeren Patientenkollektiven. Die anderen Patientengruppen mit wesentlich kleinerer Fallzahl zeigten ebenfalls die Tendenz zur Regulation auf mRNA- oder Proteinebene. Diese Meßwerte lieferten wegen der relativ geringen Patientenzahlen keine statistisch

signifikanten Ergebnisse. Die Diagramme in Abb. 5 - Abb. 7 zeigen jedoch auch neben den signifikanten Daten den Median und den Streubereich der Meßwerte dieser Patienten, die den direkten Vergleich mit den Normalkontrollen erlauben, die jedoch insbesondere bei Sklerodermie, Polymyositis, primärer Vasculitis und Rheumatoider Arthritis an größeren Fallzahlen bestätigt werden sollten.

Die Verlaufsuntersuchungen bei einigen Patienten deuten darauf hin, dass das Proteinexpressionsprofil im proteasomalen System eine komplexe Regulation zeigt, die in den meisten Fällen nicht durch eine einfache gleichsinnige Erhöhung oder Verminderung einer bestimmten mRNA und ihrem zugehörigen Translationsprodukt erklärt werden kann. Insbesondere kann die mRNA normwertig sein und das entsprechende Protein über die Norm reguliert sein und umgekehrt. Außerdem können Transkript und Protein einer bestimmten Proteasomuntereinheit, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf gemessen werden, nicht gleichsinnig reguliert sein. Auch der Untersuchungszeitpunkt im Krankheitsverlauf kann die Meßergebnisse beeinflussen. Zusätzliche proteolytische Faktoren, die außerhalb des proteasomalen Systems eine wesentliche Rolle bei der Erzeugung antigener Epitope spielen wie z. B. die Tripeptidylaminopeptidase II (Kloetzel, 2004b), sollten in künftigen Expressionsstudien nicht vernachlässigt werden.

Weiterführende funktionelle Genanalysen sowie Transkriptom-Proteom-Vergleiche an größeren Patientenkollektiven sind erforderlich, um die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen besser zu verstehen und innovative, spezifische und nebenwirkungsarme Therapiestrategien zu entwickeln.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das proteasomale System spielt eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung und Regulierung der Immunantwort und scheint auch in die Pathogenese von Autoimmunprozessen einbezogen zu sein. Bei einer Reihe von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises wurde das Genexpressionsprofil ausgewählter proteasomaler Untereinheiten in peripheren mononukleären Zellen aus menschlichem Blut (PBMC) im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen untersucht.

Mit Hilfe der quantitativen Real-time RT-PCR wurde die mRNA-Expression der Interferon- γ -induzierbaren Immunoproteasomuntereinheiten, der Proteasomaktivatoruntereinheiten PA28 α und PA28 β sowie zweier konstitutiver Untereinheiten in PBMC analysiert. Gleichzeitig wurde auch die Proteinexpression ausgewählter proteasomaler Untereinheiten durch quantitative Immunoblot-Analyse gemessen, um die Regulation auf Transkriptom- und Proteom-Ebene eingehender zu verstehen.

Die untersuchten Erkrankungen SLE, primäres Sjögren-Syndrom, idiopathische inflammatorische Myopathie, Sclerodermie, Vasculitis und Rheumatoide Arthritis gelten als systemische Autoimmunopathien.

Erwartungsgemäß waren unter systemischer Inflammation die Proteasom-Untereinheiten LMP2 (β 1i), LMP7 (β 5i), MECL1 (β 2i) und PA28 α bei dem überwiegenden Teil der untersuchten Autoimmunerkrankungen auf Proteinebene verstärkt exprimiert. Die parallele Quantifizierung von mRNA- und Proteinexpression zeigte ein charakteristisches proteasomales Expressionsmuster beim primären Sjögren-Syndrom. Auf Transkriptebene waren die Interferon- γ -induzierbaren Untereinheiten LMP2 (β 1i), MECL1 (β 2i) und die Proteasomaktivator-Untereinheit PA28 α deutlich hochreguliert. Auf Proteinebene zeigte sich jedoch eine LMP2 (β 1i)-Defizienz, die auf eine signifikante Deregulation der proteasomalen Expression beim primären Sjögren-Syndrom hindeutet. Hinweise auf genetische Veränderungen des LMP2 (*PSMB9*)-Promotors fanden sich nicht.

Bei SLE, Polymyositis, Sklerodermie, primärer Vasculitis und Rheumatoider Arthritis zeigte sich auf Transkriptebene keine wesentlich veränderte Regulation der Genexpression in PBMC. Dagegen sprechen die experimentellen Daten für signifikante Veränderungen der proteasomalen Proteinexpression.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass das proteasomale System bei systemischen Autoimmunerkrankungen in seiner Expression signifikant beeinflusst ist.

Dies kann im Wesentlichen durch die Induktion verschiedener (Immuno-) Untereinheiten unter den Einfluss von pro-inflammatorischen Zytokine erklärt werden. Auf Grund der zentralen Funktion des Proteasoms in der Regulation von Immunantwort, Apoptose, Zellzyklus und –homöostase ergibt sich daraus die begründete Annahme einer direkten Rolle in der Pathogenese dieser Krankheitsbilder. Von besonderem Interesse ist der Nachweis einer Deregulation der Immunoproteasomuntereinheit LMP2 ($\beta 2i$) beim primären Sjögren-Syndrom. Diese Arbeit bereitet somit die Grundlage für weiterführende Untersuchungen zu regulatorischen, molekularen Defekten im proteasomalen System bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises.

LITERATUR

Aki M, Shimbara N, Takashina M, Akiyama K, Kagawa S, Tamura T, Tanahashi N, Yoshimura T, Tanaka K, and Ichihara A (1994) Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem*, **115**, 257-269.

Anaya JM, Correa PA, Mantilla RD, and Arcos-Burgos M (2002) TAP, HLA-DQB1, and HLA-DRB1 polymorphism in Colombian patients with primary Sjögren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum*, **31**, 396-405.

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, and Luthra HS (1988) The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, **31**, 315-324.

Arribas J, Luz Rodriguez M, Alvarez-Do Forno R, and Castano JG (1991) Autoantibodies against the multicatalytic proteinase in patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*, **173**, 423-427.

Bailey JL, Wang X, England BK, Price SR, Ding X, and Mitch WE (1996) The acidosis of chronic renal failure activates muscle proteolysis in rats by augmenting transcription of genes encoding proteins of the ATP-dependent ubiquitin-proteasome pathway. *J Clin Invest*, **97**, 1447-1453.

Basler M, Moebius J, Elenich L, Groettrup M, and Monaco JJ (2006) An altered T cell repertoire in MECL-1-deficient mice. *J Immunol*, **176**, 6665-6672.

Behrens L, Kerschensteiner M, Misgeld T, Goebels N, Wekerle H, and Hohlfeld R (1998) Human muscle cells express a functional costimulatory molecule distinct from B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) in vitro and in inflammatory lesions. *J Immunol*, **161**, 5943-5951.

Benham AM and Neefjes JJ (1997) Proteasome activity limits the assembly of MHC class I molecules after IFN-gamma stimulation. *J Immunol*, **159**, 5896-5904.

Beninga J, Rock KL, and Goldberg AL (1998) Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J Biol Chem*, **273**, 18734-18742.

Boes B, Hengel H, Ruppert T, Multhaup G, Koszinowski UH, and Kloetzel PM (1994) Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J Exp Med*, **179**, 901-909.

Bohan A and Peter JB (1975a) Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med*, **292**, 344-347.

Bohan A and Peter JB (1975b) Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N Engl J Med*, **292**, 403-407.

Bohnhorst JO, Bjorgan MB, Thoen JE, Jonsson R, Natvig JB, and Thompson KM (2002) Abnormal B cell differentiation in primary Sjögren's syndrome results in a depressed percentage of circulating memory B cells and elevated levels of soluble CD27 that correlate with Serum IgG concentration. *Clin Immunol*, **103**, 79-88.

- Bolstad AI, Eiken HG, Rosenlund B, Alarcon-Riquelme ME, and Jonsson R (2003) Increased salivary gland tissue expression of Fas, Fas ligand, cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, and programmed cell death 1 in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*, **48**, 174-185.
- Braun BC, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, and Schmidt M (1999) The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol*, **1**, 221-226.
- Brychcy M, Kuckelkorn U, Hausdorf G, Egerer K, Kloetzel PM, Burmester GR, and Feist E (2006) Anti-20S proteasome autoantibodies inhibit proteasome stimulation by proteasome activator PA28. *Arthritis Rheum*, **54**, 2175-2183.
- Burri L, Hockendorff J, Boehm U, Klamp T, Dohmen RJ, and Levy F (2000) Identification and characterization of a mammalian protein interacting with 20S proteasome precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10348-10353.
- Cardozo C (1993) Catalytic components of the bovine pituitary multicatalytic proteinase complex (proteasome). *Enzyme Protein*, **47**, 296-305.
- Cascio P, Hilton C, Kisselev AF, Rock KL, and Goldberg AL (2001) 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *Embo J*, **20**, 2357-2366.
- Chen M and von Mikecz A (2005) Xenobiotic-induced recruitment of autoantigens to nuclear proteasomes suggests a role for altered antigen processing in scleroderma. *Ann N Y Acad Sci*, **1051**, 382-389.
- Chen P and Hochstrasser M (1996) Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell*, **86**, 961-972.
- Chen W, Norbury CC, Cho Y, Yewdell JW, and Bennink JR (2001) Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J Exp Med*, **193**, 1319-1326.
- Cheung W, Yu PX, Little BM, Cone RD, Marks DL, and Mak RH (2005) Role of leptin and melanocortin signaling in uremia-associated cachexia. *J Clin Invest*, **115**, 1659-1665.
- Cohen PL, Caricchio R, Abraham V, Camenisch TD, Jennette JC, Roubey RA, Earp HS, Matsushima G, and Reap EA (2002) Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. *J Exp Med*, **196**, 135-140.
- Dahlmann B, Kopp F, Kuehn L, Reinauer H, and Schwenen M (1986) Studies on the multicatalytic proteinase from rat skeletal muscle. *Biomed Biochim Acta*, **45**, 1493-1501.
- Dahlmann B, Ruppert T, Kuehn L, Merforth S, and Kloetzel PM (2000) Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. *J Mol Biol*, **303**, 643-653.
- Dalakas MC (2004) The molecular pathophysiology in inflammatory myopathies. *Rev Med Interne*, **25 Suppl 1**, S14-S16.
- Dalakas MC and Hohlfeld R (2003) Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet*, **362**, 971-982.
- Davidson A and Diamond B (2001) Autoimmune diseases. *N Engl J Med*, **345**, 340-350.
- Ding H, Shi Y, and Xiang K (2002) Large multifunctional proteasome 2 gene Arg60His variant in autoimmune thyroid disease in Shanghai Chinese. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, **41**, 465-467.

-
- Dörner T, Hansen A, Jacobi A, and Lipsky PE (2002) Immunglobulin repertoire analysis provides new insights into the immunopathogenesis of Sjogren's syndrome. *Autoimmun Rev*, **1**, 119-124.
- Du J, Mitch WE, Wang X, and Price SR (2000) Glucocorticoids induce proteasome C3 subunit expression in L6 muscle cells by opposing the suppression of its transcription by NF-kappa B. *J Biol Chem*, **275**, 19661-19666.
- Dubiel W, Pratt G, Ferrell K, and Rechsteiner M (1992) Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem*, **267**, 22369-22377.
- Edwards CJ (2005) Immunological therapies for rheumatoid arthritis. *Br Med Bull*, **73-74**, 71-82.
- Egerer K, Kuckelkorn U, Rudolph PE, Ruckert JC, Dörner T, Burmester GR, Kloetzel PM, and Feist E (2002) Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases. *J Rheumatol*, **29**, 2045-2052.
- Egerer T, Martinez-Gamboa L, Dankof A, Stuhlmüller B, Dörner T, Krenn V, Egerer K, Rudolph PE, Burmester GR, and Feist E (2006) Tissue-specific up-regulation of the proteasome subunit beta5i (LMP7) in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, **54**, 1501-1508.
- Feist E, Dörner T, Kuckelkorn U, Scheffler S, Burmester G, and Kloetzel P (2000) Diagnostic importance of anti-proteasome antibodies. *Int Arch Allergy Immunol*, **123**, 92-97.
- Feist E, Dörner T, Kuckelkorn U, Schmidtke G, Micheel B, Hiepe F, Burmester GR, and Kloetzel PM (1996) Proteasome alpha-type subunit C9 is a primary target of autoantibodies in sera of patients with myositis and systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*, **184**, 1313-1318.
- Feist E, Kuckelkorn U, Dörner T, Dönitz H, Scheffler S, Hiepe F, Kloetzel PM, and Burmester GR (1999) Autoantibodies in primary Sjogren's syndrome are directed against proteasomal subunits of the alpha and beta type. *Arthritis Rheum*, **42**, 697-702.
- Feist E, Schneider ML, Brychcy M, Dörner T, Burmester GR, and Hiepe F (2003) A unique autoantibody pattern of positive anti-Jo-1, anti-U1RNP, and anti-proteasome antibodies in autoimmune myositis as a diagnostic challenge. *Ann Rheum Dis*, **62**, 370-371.
- Feldmann M, Brennan FM, and Maini RN (1996) Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*, **14**, 397-440.
- Figarella-Branger D, Civatte M, Bartoli C, and Pellissier JF (2003) Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. *Muscle Nerve*, **28**, 659-682.
- Foss GS, Larsen F, Solheim J, and Prydz H (1998) Constitutive and interferon-gamma-induced expression of the human proteasome subunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1. *Biochim Biophys Acta*, **1402**, 17-28.
- Foss GS and Prydz H (1999) Interferon regulatory factor 1 mediates the interferon-gamma induction of the human immunoproteasome subunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1. *J Biol Chem*, **274**, 35196-35202.
- Fox RI, Stern M, and Michelson P (2000) Update in Sjögren syndrome. *Curr Opin Rheumatol*, **12**, 391-398.
- Frentzel S, Pesold-Hurt B, Seelig A, and Kloetzel PM (1994) 20 S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13-16 S preproteasome complexes. *J Mol Biol*, **236**, 975-981.

Fruci D, Lauvau G, Saveanu L, Amicosante M, Butler RH, Polack A, Ginhoux F, Lemonnier F, Firat H, and van Endert PM (2003) Quantifying recruitment of cytosolic peptides for HLA class I presentation: impact of TAP transport. *J Immunol*, **170**, 2977-2984.

Fruci D, Niedermann G, Butler RH, and van Endert PM (2001) Efficient MHC class I-independent amino-terminal trimming of epitope precursor peptides in the endoplasmic reticulum. *Immunity*, **15**, 467-476.

Fruh K, Gossen M, Wang K, Bujard H, Peterson PA, and Yang Y (1994) Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: a newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex. *Embo J*, **13**, 3236-3244.

Fruh K, Yang Y, Arnold D, Chambers J, Wu L, Waters JB, Spies T, and Peterson PA (1992) Alternative exon usage and processing of the major histocompatibility complex-encoded proteasome subunits. *J Biol Chem*, **267**, 22131-22140.

Fukuda-Kamitani T and Kamitani T (2002) Ubiquitination of Ro52 autoantigen. *Biochem Biophys Res Commun*, **295**, 774-778.

Furst DE and Clements PJ (1997) Hypothesis for the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Rheumatol Suppl*, **48**, 53-57.

Glickman MH and Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, **82**, 373-428.

Glynne R, Kerr LA, Mockridge I, Beck S, Kelly A, and Trowsdale J (1993) The major histocompatibility complex-encoded proteasome component LMP7: alternative first exons and post-translational processing. *Eur J Immunol*, **23**, 860-866.

Goebels N, Michaelis D, Engelhardt M, Huber S, Bender A, Pongratz D, Johnson MA, Wekerle H, Tschopp J, Jenne D, and Hohlfeld R (1996) Differential expression of perforin in muscle-infiltrating T cells in polymyositis and dermatomyositis. *J Clin Invest*, **97**, 2905-2910.

Goldberg AL, Cascio P, Saric T, and Rock KL (2002) The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol*, **39**, 147-164.

Griffin TA, Slack JP, McCluskey TS, Monaco JJ, and Colbert RA (2000) Identification of proteasomalin, a mammalian homologue of the yeast protein, Ump1p, that is required for normal proteasome assembly. *Mol Cell Biol Res Commun*, **3**, 212-217.

Groettrup M, Soza A, Eggers M, Kuehn L, Dick TP, Schild H, Rammensee HG, Koszinowski UH, and Kloetzel PM (1996) A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature*, **381**, 166-168.

Groettrup M, Standera S, Stohwasser R, and Kloetzel PM (1997) The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8970-8975.

Groll M, Bajorek M, Kohler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, Glickman MH, and Finley D (2000) A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol*, **7**, 1062-1067.

Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, and Huber R (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, **386**, 463-471.

-
- Hallikas O, Palin K, Sinjushina N, Rautiainen R, Partanen J, Ukkonen E, and Taipale J (2006) Genome-wide prediction of mammalian enhancers based on analysis of transcription-factor binding affinity. *Cell*, **124**, 47-59.
- Harlow E and Lane D (1988). *Antibodies - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Hayashi T and Faustman DL (2003) Role of defective apoptosis in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. *Recent Prog Horm Res*, **58**, 131-153.
- Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, Stachon U, and Wolf DH (1997) The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem*, **272**, 25200-25209.
- Heink S, Fricke B, Ludwig D, Kloetzel PM, and Kruger E (2006) Tumor cell lines expressing the proteasome subunit isoform LMP7E1 exhibit immunoproteasome deficiency. *Cancer Res*, **66**, 649-652.
- Heink S, Ludwig D, Kloetzel PM, and Kruger E (2005) IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9241-9246.
- Hendil KB, Khan S, and Tanaka K (1998) Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes. *Biochem J*, **332**, 749-754.
- Hirano Y, Hayashi H, Iemura S, Hendil KB, Niwa S, Kishimoto T, Kasahara M, Natsume T, Tanaka K, and Murata S (2006) Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Mol Cell*, **24**, 977-984.
- Hobler SC, Williams A, Fischer D, Wang JJ, Sun X, Fischer JE, Monaco JJ, and Hasselgren PO (1999) Activity and expression of the 20S proteasome are increased in skeletal muscle during sepsis. *Am J Physiol*, **277**, R434-R440.
- Hochberg MC (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, **40**, 1725.
- Hofbauer M, Wiesener S, Babbe H, Roers A, Wekerle H, Dornmair K, Hohlfeld R, and Goebels N (2003) Clonal tracking of autoaggressive T cells in polymyositis by combining laser microdissection, single-cell PCR, and CDR3-spectratype analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 4090-4095.
- Hohlfeld R and Engel AG (1994) The immunobiology of muscle. *Immunol Today*, **15**, 269-274.
- Horgan GW and Rouault J (2000). *Introduction to Randomisation Tests*. Biomathematics and Statistics Scotland.
- Inaoki M, Sato S, Weintraub BC, Goodnow CC, and Tedder TF (1997) CD19-regulated signaling thresholds control peripheral tolerance and autoantibody production in B lymphocytes. *J Exp Med*, **186**, 1923-1931.
- Jaffe ES (2002) Lymphoid lesions of the head and neck: a model of lymphocyte homing and lymphomagenesis. *Mod Pathol*, **15**, 255-263.
- Jager S, Groll M, Huber R, Wolf DH, and Heinemeyer W (1999) Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function. *J Mol Biol*, **291**, 997-1013.

James AB, Conway AM, and Morris BJ (2006) Regulation of the neuronal proteasome by Zif268 (Egr1). *J Neurosci*, **26**, 1624-1634.

Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, Hagen EC, Hoffman GS, Hunder GG, and Kallenberg CG (1994) Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum*, **37**, 187-192.

Kanof ME, Smith PD, and Zola H (1996). Preparation of human cell populations. *Current Protocols in Immunology*, . John Wiley & Sons, New York, pp. 7-12.

Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, and Kollias G (1991) Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *Embo J*, **10**, 4025-4031.

Kishimoto T, Kokura K, Nakadai T, Miyazawa Y, Wakamatsu T, Makino Y, Nakamura T, Hara E, Oda K, Muramatsu M, and Tamura T (1996) Overexpression of cysteine sulfinic acid decarboxylase stimulated by hepatocarcinogenesis results in autoantibody production in rats. *Cancer Res*, **56**, 5230-5237.

Kisselev AF, Akopian TN, and Goldberg AL (1998) Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J Biol Chem*, **273**, 1982-1989.

Kisselev AF, Garcia-Calvo M, Overkleeft HS, Peterson E, Pennington MW, Ploegh HL, Thornberry NA, and Goldberg AL (2003) The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites. *J Biol Chem*, **278**, 35869-35877.

Kloetzel PM (2001) Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 179-187.

Kloetzel PM (2004b) Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol*, **5**, 661-669.

Kloetzel PM (2004a) The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim Biophys Acta*, **1695**, 225-233.

Kloetzel PM and Ossendorp F (2004) Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol*, **16**, 76-81.

Knowlton JR, Johnston SC, Whitby FG, Realini C, Zhang Z, Rechsteiner M, and Hill CP (1997) Structure of the proteasome activator REGalpha (PA28alpha). *Nature*, **390**, 639-643.

Knuehl C, Spee P, Ruppert T, Kuckelkorn U, Henklein P, Neefjes J, and Kloetzel PM (2001) The murine cytomegalovirus pp89 immunodominant H-2Ld epitope is generated and translocated into the endoplasmic reticulum as an 11-mer precursor peptide. *J Immunol*, **167**, 1515-1521.

Kohler A, Cascio P, Leggett DS, Woo KM, Goldberg AL, and Finley D (2001) The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell*, **7**, 1143-1152.

Kopp F, Dahlmann B, and Kuehn L (2001) Reconstitution of hybrid proteasomes from purified PA700-20 S complexes and PA28alphabeta activator: ultrastructure and peptidase activities. *J Mol Biol*, **313**, 465-471.

-
- Kordonouri O, Meyer K, Egerer K, Hartmann R, Scheffler S, Burmester GR, Kuckelkorn U, Danne T, and Feist E (2004) Prevalence of 20S proteasome, anti-nuclear and thyroid antibodies in young patients at onset of type 1 diabetes mellitus and the risk of autoimmune thyroiditis. *J Pediatr Endocrinol Metab*, **17**, 975-981.
- Kotamraju S, Matalon S, Matsunaga T, Shang T, Hickman-Davis JM, and Kalyanaraman B (2006) Upregulation of immunoproteasomes by nitric oxide: potential antioxidative mechanism in endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, **40**, 1034-1044.
- Krause S, Kuckelkorn U, Dorner T, Burmester GR, Feist E, and Kloetzel PM (2006) Immunoproteasome subunit LMP2 expression is deregulated in Sjogren's syndrome but not in other autoimmune disorders. *Ann Rheum Dis*, **65**, 1021-1027.
- Krüger E, Kuckelkorn U, Sijts A, and Kloetzel PM (2003) The components of the proteasome system and their role in MHC class I antigen processing. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **148**, 81-104.
- Kuhtreiber WM, Hayashi T, Dale EA, and Faustman DL (2003) Central role of defective apoptosis in autoimmunity. *J Mol Endocrinol*, **31**, 373-399.
- Le Tallec B, Barrault MB, Courbeyrette R, Guerois R, Marsolier-Kergoat MC, and Peyroche A (2007) 20S proteasome assembly is orchestrated by two distinct pairs of chaperones in yeast and in mammals. *Mol Cell*, **27**, 660-674.
- Le Texier V, Riethoven JJ, Kumanduri V, Gopalakrishnan C, Lopez F, Gautheret D, and Thanaraj TA (2006) AltTrans: transcript pattern variants annotated for both alternative splicing and alternative polyadenylation. *BMC Bioinformatics*, **7**, 169.
- Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, and Marshak-Rothstein A (2002) Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*, **416**, 603-607.
- Lehner PJ (2003) The calculus of immunity: quantitating antigen processing. *Immunity*, **18**, 315-317.
- Levy F, Burri L, Morel S, Peitrequin AL, Levy N, Bachi A, Hellman U, Van den Eynde BJ, and Servis C (2002) The final N-terminal trimming of a subamino-terminal proline-containing HLA class I-restricted antigenic peptide in the cytosol is mediated by two peptidases. *J Immunol*, **169**, 4161-4171.
- Li J, Schuler-Thurner B, Schuler G, Huber C, and Seliger B (2001) Bipartite regulation of different components of the MHC class I antigen-processing machinery during dendritic cell maturation. *Int Immunol*, **13**, 1515-1523.
- Link C, Gavioli R, Ebensen T, Canella A, Reinhard E, and Guzman CA (2004) The Toll-like receptor ligand MALP-2 stimulates dendritic cell maturation and modulates proteasome composition and activity. *Eur J Immunol*, **34**, 899-907.
- Lipsky PE (2001) Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat Immunol*, **2**, 764-766.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Lockey C, Otto E, and Long Z (1998) Real-time fluorescence detection of a single DNA molecule. *Biotechniques*, **24**, 744-746.

-
- Loukissa A, Cardozo C, Tschuller-Felberg C, and Nelson JE (2000) Control of LMP7 expression in human endothelial cells by cytokines regulating cellular and humoral immunity. *Cytokine*, **12**, 1326-1330.
- Lundy SK, Sarkar S, Tesmer LA, and Fox DA (2007) Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res Ther*, **9**, 202.
- Ma CP, Slaughter CA, and DeMartino GN (1992) Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain). *J Biol Chem*, **267**, 10515-10523.
- Macagno A, Gilliet M, Sallusto F, Lanzavecchia A, Nestle FO, and Groettrup M (1999) Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation. *Eur J Immunol*, **29**, 4037-4042.
- Macagno A, Kuehn L, de Giuli R, and Groettrup M (2001) Pronounced up-regulation of the PA28alpha/beta proteasome regulator but little increase in the steady-state content of immunoproteasome during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol*, **31**, 3271-3280.
- Madden DR (1995) The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol*, **13**, 587-622.
- Marrack P, Kappler J, and Kotzin BL (2001) Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med*, **7**, 899-905.
- Martinez CK and Monaco JJ (1993) Post-translational processing of a major histocompatibility complex-encoded proteasome subunit, LMP-2. *Mol Immunol*, **30**, 1177-1183.
- Masaki Y and Sugai S (2004) Lymphoproliferative disorders in Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev*, **3**, 175-182.
- Matsunaga T, Ishida T, Takekawa M, Nishimura S, Adachi M, and Imai K (2002) Analysis of gene expression during maturation of immature dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Scand J Immunol*, **56**, 593-601.
- Matsushita M, Takasaki Y, Takeuchi K, Yamada H, Matsudaira R, and Hashimoto H (2004) Autoimmune response to proteasome activator 28alpha in patients with connective tissue diseases. *J Rheumatol*, **31**, 252-259.
- Mishto M, Santoro A, Bellavista E, Sessions R, Textoris-Taube K, Piaz FD, Carrard G, Forti K, Salvioli S, Friguet B, Kloetzel PM, Rivett AJ, and Franceschi C (2006) A structural model of 20S immunoproteasomes: effect of LMP2 codon 60 polymorphism on expression, activity, intracellular localisation and insight into the regulatory mechanisms. *Biol Chem*, **387**, 417-429.
- Miyagi T, Tatsumi T, Takehara T, Kanto T, Kuzushita N, Sugimoto Y, Jinushi M, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, and Hayashi N (2003) Impaired expression of proteasome subunits and human leukocyte antigens class I in human colon cancer cells. *J Gastroenterol Hepatol*, **18**, 32-40.
- Morel S, Levy F, Bulet-Schiltz O, Bresseur F, Probst-Kepper M, Peitrequin AL, Monsarrat B, Van Velthoven R, Cerottini JC, Boon T, Gairin JE, and Van den Eynde BJ (2000) Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity*, **12**, 107-117.

Mori L, Iselin S, De Libero G, and Lesslauer W (1996) Attenuation of collagen-induced arthritis in 55-kDa TNF receptor type 1 (TNFR1)-IgG1-treated and TNFR1-deficient mice. *J Immunol*, **157**, 3178-3182.

Murata K and Dalakas MC (1999) Expression of the costimulatory molecule BB-1, the ligands CTLA-4 and CD28, and their mRNA in inflammatory myopathies. *Am J Pathol*, **155**, 453-460.

Murata S, Udono H, Tanahashi N, Hamada N, Watanabe K, Adachi K, Yamano T, Yui K, Kobayashi N, Kasahara M, Tanaka K, and Chiba T (2001) Immunoproteasome assembly and antigen presentation in mice lacking both PA28alpha and PA28beta. *Embo J*, **20**, 5898-5907.

Nandi D, Woodward E, Ginsburg DB, and Monaco JJ (1997) Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. *Embo J*, **16**, 5363-5375.

Nemoto H, Bhopale MK, Constantinescu CS, Schotland D, and Rostami A (2003) Skeletal muscle myosin is the autoantigen for experimental autoimmune myositis. *Exp Mol Pathol*, **74**, 238-243.

Nil A, Firat E, Sobek V, Eichmann K, and Niedermann G (2004) Expression of housekeeping and immunoproteasome subunit genes is differentially regulated in positively and negatively selecting thymic stroma subsets. *Eur J Immunol*, **34**, 2681-2689.

Nishio J, Suzuki M, Miyasaka N, and Kohsaka H (2001) Clonal biases of peripheral CD8 T cell repertoire directly reflect local inflammation in polymyositis. *J Immunol*, **167**, 4051-4058.

Nussbaum AK, Dick TP, Keilholz W, Schirle M, Stevanovic S, Dietz K, Heinemeyer W, Groll M, Wolf DH, Huber R, Rammensee HG, and Schild H (1998) Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12504-12509.

Ohashi PS (2002) T-cell signalling and autoimmunity: molecular mechanisms of disease. *Nat Rev Immunol*, **2**, 427-438.

Ohta M, Furukawa Y, Ide C, Akiyama N, Utakoji T, Miura Y, and Saito M (1986) Establishment and characterization of four human monocytoid leukemia cell lines (JOSK-I, -S, -M and -K) with capabilities of monocyte-macrophage lineage differentiation and constitutive production of interleukin 1. *Cancer Res*, **46**, 3067-3074.

Okano Y (1996) Antinuclear antibody in systemic sclerosis (scleroderma). *Rheum Dis Clin North Am*, **22**, 709-735.

Orlowski M, Cardozo C, and Michaud C (1993) Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry*, **32**, 1563-1572.

Ossendorp F, Fu N, Camps M, Granucci F, Gobin SJ, van den Elsen PJ, Schuurhuis D, Adema GJ, Lipford GB, Chiba T, Sijts A, Kloetzel PM, Ricciardi-Castagnoli P, and Melief CJ (2005) Differential expression regulation of the alpha and beta subunits of the PA28 proteasome activator in mature dendritic cells. *J Immunol*, **174**, 7815-7822.

Ostrowska H, Kruszewski K, and Kasacka I (2006) Immuno-proteasome subunit LMP7 is up-regulated in the ischemic kidney in an experimental model of renovascular hypertension. *Int J Biochem Cell Biol*, **38**, 1778-1785.

Patel PI, Framson PE, Caskey CT, and Chinault AC (1986) Fine structure of the human hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene. *Mol Cell Biol*, **6**, 393-403.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.

Pfaffl MW and Hageleit M (2001) Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters*, **23**, 275-282.

Pfaffl MW, Horgan GW, and Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, **30**, e36.

Plempner RK and Wolf DH (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem Sci*, **24**, 266-270.

Princiotta MF, Finzi D, Qian SB, Gibbs J, Schuchmann S, Buttgerit F, Bennink JR, and Yewdell JW (2003) Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity*, **18**, 343-354.

Rechsteiner M and Hill CP (2005) Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol*, **15**, 27-33.

Reveille JD, Macleod MJ, Whittington K, and Arnett FC (1991) Specific amino acid residues in the second hypervariable region of HLA-DQA1 and DQB1 chain genes promote the Ro (SS-A)/La (SS-B) autoantibody responses. *J Immunol*, **146**, 3871-3876.

Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, and Goldberg AL (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, **78**, 761-771.

Rock KL and Shen L (2005) Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev*, **207**, 166-183.

Rock KL, York IA, and Goldberg AL (2004) Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat Immunol*, **5**, 670-677.

Rock KL, York IA, Saric T, and Goldberg AL (2002) Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv Immunol*, **80**, 1-70.

Salzmann U, Kral S, Braun B, Standera S, Schmidt M, Kloetzel PM, and Sijts A (1999) Mutational analysis of subunit i beta2 (MECL-1) demonstrates conservation of cleavage specificity between yeast and mammalian proteasomes. *FEBS Lett*, **454**, 11-15.

Saric T, Graef CI, and Goldberg AL (2004) Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. *J Biol Chem*, **279**, 46723-46732.

Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K, and Tedder TF (2004) Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. *Mol Immunol*, **41**, 1123-1133.

Sato S, Ono N, Steeber DA, Pisetsky DS, and Tedder TF (1996) CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. *J Immunol*, **157**, 4371-4378.

-
- Saveanu L, Fruci D, and van Endert P (2002) Beyond the proteasome: trimming, degradation and generation of MHC class I ligands by auxiliary proteases. *Mol Immunol*, **39**, 203-215.
- Schmidt C, Fischer G, Kadner H, Genersch E, Kuhn K, and Poschl E (1993) Differential effects of DNA-binding proteins on bidirectional transcription from the common promoter region of human collagen type IV genes COL4A1 and COL4A2. *Biochim Biophys Acta*, **1174**, 1-10.
- Schmidtke G, Kraft R, Kostka S, Henklein P, Frommel C, Lowe J, Huber R, Kloetzel PM, and Schmidt M (1996) Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *Embo J*, **15**, 6887-6898.
- Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, and Bennink JR (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, **404**, 770-774.
- Schwarz K, Eggers M, Soza A, Koszinowski UH, Kloetzel PM, and Groettrup M (2000) The proteasome regulator PA28alpha/beta can enhance antigen presentation without affecting 20S proteasome subunit composition. *Eur J Immunol*, **30**, 3672-3679.
- Scott RS, McMahon EJ, Pop SM, Reap EA, Caricchio R, Cohen PL, Earp HS, and Matsushima GK (2001) Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature*, **411**, 207-211.
- Seko Y, Cole S, Kasprzak W, Shapiro BA, and Ragheb JA (2006) The role of cytokine mRNA stability in the pathogenesis of autoimmune disease. *Autoimmun Rev*, **5**, 299-305.
- Seufert W and Jentsch S (1992) In vivo function of the proteasome in the ubiquitin pathway. *Embo J*, **11**, 3077-3080.
- Shastri N, Schwab S, and Serwold T (2002) Producing nature's gene-chips: the generation of peptides for display by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol*, **20**, 463-493.
- Shimbara N, Nakajima H, Tanahashi N, Ogawa K, Niwa S, Uenaka A, Nakayama E, and Tanaka K (1997) Double-cleavage production of the CTL epitope by proteasomes and PA28: role of the flanking region. *Genes Cells*, **2**, 785-800.
- Sibille C, Gould KG, Willard-Gallo K, Thomson S, Rivett AJ, Powis S, Butcher GW, and De Baetselier P (1995) LMP2+ proteasomes are required for the presentation of specific antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Curr Biol*, **5**, 923-930.
- Sijts A, Sun Y, Janek K, Kral S, Paschen A, Schadendorf D, and Kloetzel PM (2002) The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing. *Mol Immunol*, **39**, 165-169.
- Sijts A, Zaiss D, and Kloetzel PM (2001) The role of the ubiquitin-proteasome pathway in MHC class I antigen processing: implications for vaccine design. *Curr Mol Med*, **1**, 665-676.
- Sijts AJ, Ruppert T, Rehmann B, Schmidt M, Koszinowski U, and Kloetzel PM (2000a) Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J Exp Med*, **191**, 503-514.
- Sijts AJ, Standera S, Toes RE, Ruppert T, Beekman NJ, van Veelen PA, Ossendorp FA, Melief CJ, and Kloetzel PM (2000b) MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells. *J Immunol*, **164**, 4500-4506.
- Singal DP, Ye M, and Quadri SA (1995) Major histocompatibility-encoded human proteasome LMP2. Genomic organization and a new form of mRNA. *J Biol Chem*, **270**, 1966-1970.

-
- Steuerwald N, Cohen J, Herrera RJ, and Brenner CA (1999) Analysis of gene expression in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RT-PCR. *Mol Hum Reprod*, **5**, 1034-1039.
- Stohwasser R, Salzmann U, Giesebrecht J, Kloetzel PM, and Holzhutter HG (2000) Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28. *Eur J Biochem*, **267**, 6221-6230.
- Stohwasser R, Standera S, Peters I, Kloetzel PM, and Groettrup M (1997) Molecular cloning of the mouse proteasome subunits MC14 and MECL-1: reciprocally regulated tissue expression of interferon-gamma-modulated proteasome subunits. *Eur J Immunol*, **27**, 1182-1187.
- Strehl B, Seifert U, Kruger E, Heink S, Kuckelkorn U, and Kloetzel PM (2005) Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev*, **207**, 19-30.
- Strickland E, Hakala K, Thomas PJ, and DeMartino GN (2000) Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26 S proteasome. *J Biol Chem*, **275**, 5565-5572.
- Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee (1980) Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum*, **23**, 581-590.
- Sullivan DA, Sullivan BD, Evans JE, Schirra F, Yamagami H, Liu M, Richards SM, Suzuki T, Schaumberg DA, Sullivan RM, and Dana MR (2002) Androgen deficiency, Meibomian gland dysfunction, and evaporative dry eye. *Ann N Y Acad Sci*, **966**, 211-222.
- Takabe W, Kodama T, Hamakubo T, Tanaka K, Suzuki T, Aburatani H, Matsukawa N, and Noguchi N (2001) Anti-atherogenic antioxidants regulate the expression and function of proteasome alpha-type subunits in human endothelial cells. *J Biol Chem*, **276**, 40497-40501.
- Takabe W, Matsukawa N, Kodama T, Tanaka K, and Noguchi N (2006) Chemical structure-dependent gene expression of proteasome subunits via regulation of the antioxidant response element. *Free Radic Res*, **40**, 21-30.
- Tamura T, Osaka F, Kawamura Y, Higuti T, Ishida N, Nothwang HG, Tsurumi C, Tanaka K, and Ichihara A (1994) Isolation and characterization of alpha-type HC3 and beta-type HC5 subunit genes of human proteasomes. *J Mol Biol*, **244**, 117-124.
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, and Winchester RJ (1982) The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, **25**, 1271-1277.
- Taylor PR, Carugati A, Fadok VA, Cook HT, Andrews M, Carroll MC, Savill JS, Henson PM, Botto M, and Walport MJ (2000) A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J Exp Med*, **192**, 359-366.
- Tezak Z, Hoffman EP, Lutz JL, Fedczyna TO, Stephan D, Bremer EG, Krasnoselska-Riz I, Kumar A, and Pachman LM (2002) Gene expression profiling in DQA1*0501+ children with untreated dermatomyositis: a novel model of pathogenesis. *J Immunol*, **168**, 4154-4163.
- Tiao G, Hobler S, Wang JJ, Meyer TA, Luchette FA, Fischer JE, and Hasselgren PO (1997) Sepsis is associated with increased mRNAs of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in human skeletal muscle. *J Clin Invest*, **99**, 163-168.

-
- Toes RE, Nussbaum AK, Degermann S, Schirle M, Emmerich NP, Kraft M, Laplace C, Zwinderman A, Dick TP, Muller J, Schonfisch B, Schmid C, Fehling HJ, Stevanovic S, Rammensee HG, and Schild H (2001) Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med*, **194**, 1-12.
- Tran CN, Lundy SK, and Fox DA (2005) Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*, **12**, 183-189.
- Tsunawaki S, Nakamura S, Ohyama Y, Sasaki M, Ikebe-Hiroki A, Hiraki A, Kadena T, Kawamura E, Kumamaru W, Shinohara M, and Shirasuna K (2002) Possible function of salivary gland epithelial cells as nonprofessional antigen-presenting cells in the development of Sjögren's syndrome. *J Rheumatol*, **29**, 1884-1896.
- van Hall T, Sijts A, Camps M, Offringa R, Melief C, Kloetzel PM, and Ossendorp F (2000) Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. *J Exp Med*, **192**, 483-494.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, and Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, **3**, 1-10.
- Venables PJ (2004) Sjögren's syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, **18**, 313-329.
- Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Coll J, Gerli R, Hatron PY, Kater L, Konttinen YT, Manthorpe R, Meyer O, Mosca M, Ostuni P, Pellerito RA, Pennec Y, Porter SR, Richards A, Sauvezie B, Schiodt M, Sciuto M, Shoenfeld Y, Skopouli FN, Smolen JS, Soromenho F, Tishler M, and Wattiaux MJ (1996) 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*, **55**, 116-121.
- Vives-Pi M, Vargas F, James RF, Trowsdale J, Costa M, Sospedra M, Somoza N, Obiols G, Tampe R, and Pujol-Borrell R (1997) Proteasome subunits, low-molecular-mass polypeptides 2 and 7 are hyperexpressed by target cells in autoimmune thyroid disease but not in insulin-dependent diabetes mellitus: implications for autoimmunity. *Tissue Antigens*, **50**, 153-163.
- Voges D, Zwickl P, and Baumeister W (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem*, **68**, 1015-1068.
- Voulgarelis M, Dafni UG, Isenberg DA, and Moutsopoulos HM (1999) Malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome: a multicenter, retrospective, clinical study by the European Concerted Action on Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum*, **42**, 1765-1772.
- Vyse TJ and Kotzin BL (1998) Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol*, **16**, 261-292.
- Wakeland EK, Liu K, Graham RR, and Behrens TW (2001) Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity*, **15**, 397-408.
- Wiendl H, Mitsdoerffer M, Schneider D, Melms A, Lochmüller H, Hohlfeld R, and Weller M (2003) Muscle fibres and cultured muscle cells express the B7.1/2-related inducible co-stimulatory molecule, ICOSL: implications for the pathogenesis of inflammatory myopathies. *Brain*, **126**, 1026-1035.

-
- Wilk S and Orłowski M (1983) Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *J Neurochem*, **40**, 842-849.
- Williams A, Sun X, Fischer JE, and Hasselgren PO (1999) The expression of genes in the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway is increased in skeletal muscle from patients with cancer. *Surgery*, **126**, 744-749.
- Witt E, Zantopf D, Schmidt M, Kraft R, Kloetzel PM, and Krüger E (2000) Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(beta 5i) incorporation into 20 S proteasomes. *J Mol Biol*, **301**, 1-9.
- Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, and Balis UJ (1997) The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*, **22**, 176-181.
- Wright KL, White LC, Kelly A, Beck S, Trowsdale J, and Ting JP (1995) Coordinate regulation of the human TAP1 and LMP2 genes from a shared bidirectional promoter. *J Exp Med*, **181**, 1459-1471.
- Yang Y, Fruh K, Ahn K, and Peterson PA (1995) In vivo assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *J Biol Chem*, **270**, 27687-27694.
- Yasutomo K (2003) Pathological lymphocyte activation by defective clearance of self-ligands in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*, **42**, 214-222.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. P.-M. Kloetzel und Herrn Prof. Dr. med. G.-R. Burmester für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit, ihre umfassende Betreuung sowie ihre engagierte fachliche und persönliche Unterstützung. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. T. Dörner und Herrn Dr. med. E. Feist für die jederzeit erwiesene, hervorragende Unterstützung in methodischen und klinischen Fragestellungen, insbesondere für die Bereitstellung zahlreicher Blutproben von Patienten vielen Dank an Herrn Dr. med. E. Feist.

Ganz herzlich sei auch Frau Dr. rer. nat. U. Kuckelkorn gedankt, die mir stets im Labor mit wertvollen Ideen und viel Engagement hilfreich zur Seite stand.

Die freundliche Unterstützung von Herrn Prof. Dr. med. H.-D. Volk und Frau Katrin Vogt ermöglichte die Analysen mittels TaqMan PCR im Institut für Medizinische Immunologie, Charité, Universitätsmedizin Berlin.

Ein herzlicher Dank geht auch an alle Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. rer. nat. P.-M. Kloetzel und Herrn Prof. Dr. med. G.-R. Burmester für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme, freundliche Arbeitsatmosphäre.

Meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben, gilt mein ganz besonders herzlicher Dank.

LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Krause S, Fakan S, Weis K, Wahle E. Immunodetection of poly(A) binding protein II in the cell nucleus. *Exp. Cell Res* 1994, 214:75-82

Nemeth A, Krause S, Blank D, Jenny A, Jenö P, Lustig A, Wahle E. Isolation of genomic and cDNA clones encoding bovine poly(A) binding protein II. *Nucl. Acids Res* 1995, 23:4043-4041

O'Connell MA, Krause S, Higuchi M, Hsuan JJ, Totty NF, Jenny A, Keller W. Cloning of cDNAs encoding mammalian double-stranded RNA-specific adenosine deaminase. *Mol Cell Biology* 1995, 15:1389-1397

Maas S, Melcher R, Herb A, Seeburg PH, Keller W, Krause S, Higuchi M, O'Connell M A Structural requirements for RNA editing in glutamate receptor pre-mRNAs by recombinant double-stranded RNA adenosine deaminase. *J Biol Chem* 1996, 271:12221-12226

Cunha C, Monjardino J, Krause S, Keller W, Carmo-Fonseca, M. Localization of hepatitis delta virus RNA in the nucleus of human cells. *RNA* 1998, 4:680-693

Cmarko, D, Verschure PJ, Martin TE, Dahmus ME, Krause S, Fu XD, van Driel R, Fakan S. Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection. *Mol Biol Cell* 1999, 10:211-223

Lampe JB, Gossrau G, Kempe A, Füssel M, Schwurack K, Schröder R, Krause S, Walter MC, Reichmann H, Lochmüller, H. Analysis of HLA class I and II alleles in sporadic inclusion body myositis. *J Neurol* 2003, 250:1313-1317

Krause S, Schlotter-Weigel B, Walter MC, Najmabadi H, Wiendl H, Müller-Höcker J, Müller-Felber W, Pongratz D, Lochmüller H. A novel homozygous missense mutation in the GNE gene of a patient with quadriceps-sparing hereditary inclusion body myopathy associated with muscle inflammation. *Neuromuscul Disord* 2003;13:830-834

Wiendl H, Lautwein A, Mitsdörffer M, Krause S, Erfurth S, Wienhold W, Morgalla M, Weber E, Overkleeft HS, Lochmüller H, Melms A, Tolosa E, Driessen C. Antigen processing and presentation in human muscle: cathepsin S is critical for MHC class II expression and upregulated in inflammatory myopathies. *J Neuroimmunol* 2003, 138:132-143

Kaindl AM, Rüschemdorf F, Krause S, Goebel HH, Köhler K, Becker C, Pongratz D, Müller-Höcker J, Nürnberg P, Stoltenburg-Didinger G, Lochmüller H, Hübner A. Missense mutations of ACTA1 cause dominant congenital myopathy with cores. *J Med Genet*, 2004, 41:842-848

Salama I, Hinderlich S, Shlomai Z, Eisenberg I, Krause S, Yarema K, Argov Z, Lochmüller H, Reutter W, Dabby R, Sadeh M, Ben-Bassat H, Mitrani-Rosenbaum S. No overall hyposialylation in hereditary inclusion body myopathy myoblasts carrying the homozygous M712T GNE mutation. *Biochem Biophys Res Comm* 2005, 328:221-226

Krause S, Hinderlich S, Amsili S, Horstkorte R, Wiendl H, Argov Z, Mitrani-Rosenbaum S, Lochmüller H. Localization of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManAc kinase (GNE) in the Golgi complex and the nucleus of mammalian cells. *Exp Cell Res*. 2005;304:365-379

Krause S, Kuckelkorn U, Dorner T, Burmester GR, Feist E, Kloetzel PM. Immunoproteasome subunit LMP2 expression is deregulated in Sjogren's syndrome but not in other autoimmune disorders. *Ann Rheum Dis* 2006, 65:102 -1027

Penner J, Mantey LR, Elgavish S, Ghaderi D, Cirak S, Berger M, Krause S, Lucka L, Voit T, Mitrani-Rosenbaum S, Hinderlich S. Influence of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase mutant proteins on hereditary inclusion body myopathy. *Biochemistry*. 2006;45(9):2968-77

Muller JS, Baumeister SK, Schara U, Cossins J, Krause S, von der Hagen M, Huebner A, Webster R, Beeson D, Lochmuller H, Abicht A. CHRND mutation causes a congenital myasthenic syndrome by impairing co-clustering of the acetylcholine receptor with rapsyn. *Brain* 2006, 129:2784-93.

Muller JS, Baumeister SK, Rasic VM, Krause S, Todorovic S, Kugler K, Muller-Felber W, Abicht A, Lochmuller H. Impaired receptor clustering in congenital myasthenic syndrome with novel RAPSN mutations. *Neurology* 2006, 67:1159-64

Krause S, Wallefeld W, Nowak KJ, Dye D, Horvath R, Molnar Z, Szabo M, Hashimoto K, Reina C, Carlos JD, Rosell J, Cabello A, Navarro C, Nishino I, Lochmuller H, Laing NG. Severe nemaline myopathy caused by mutations of the stop codon of the skeletal muscle alpha actin gene (ACTA1). *Neuromuscul Disord* 2006, 16(9-10):541-7

Hübbers CU, Clemen CS, Kesper K, Boddrich A, Hofmann A, Kamarainen O, Tolksdorf K, Stumpf M, Reichelt J, Roth U, Krause S, Watts G, Kimonis V, Wattjes MP, Reimann J, Thal DR, Biermann K, Evert BO, Lochmuller H, Wanker EE, Schoser BG, Noegel AA, Schroder R. Pathological consequences of VCP mutations on human striated muscle. *Brain* 2007, 130:381-93

Janiesch PC, Kim J, Mouysset J, Barikbin R, Lochmuller H, Cassata G, Krause S, Hoppe T. The ubiquitin-selective chaperone CDC-48/p97/VCP links myosin assembly to inclusion body myopathy. *Nat Cell Biol*, 2007, 9:379-90

Amsili S, Shlomai Z, Levitzki R, Krause S, Lochmuller H, Ben-Bassat H, Mitrani-Rosenbaum S. Characterization of Hereditary Inclusion Body Myopathy myoblasts: primary impairment of apoptotic events. *Cell Death Differ*, 2007, 14:1916-24

Krause S, Aleo A, Hinderlich S, Merlini L, Tournev I, Walter MC, Argov Z, Mitrani-Rosenbaum S, Lochmuller H. GNE protein expression and subcellular distribution are unaltered in HIBM. *Neurology*, 2007, 69:655-9

Krause S, Göhringer T, Walter MC, Schoser BGH, Reilich P, Linn J, Pöpperl G, Frölich L, Hentschel F, Lochmuller H, Danek A. Brain imaging and neuropsychology in late-onset dementia due to a novel mutation (R93C) of valosin-containing protein. *Clin Neuropathol*, 2007, 26:232-240

Wally V, Klausegger A, Koller V, Lochmuller H, Krause S, Wiche G, Mitchell LG, Hintner H, Bauer JW. 5' *Trans*-splicing repair of the *PLEC1* gene, *J Invest Dermatol*, 2008;128:568-74

ERKLÄRUNG AN EIDES STATT

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne die Hilfe Dritter angefertigt habe. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 06.12.2007

Dr. phil. Sabine Krause