

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinischer Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Etablierung der *Realtime*-PCR zur Charakterisierung der Effekte von TNF- α auf die
mRNA-Expression des mit kutanen Lupus-Manifestationen assoziierten Autoantigens
Ro/SSA52 in humanen Keratinozyten

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Bjoern Hostmann

aus Berlin

- Gutachter: 1. Prof. Dr. med. F. Hiepe
2. Prof. Dr. med. M. Meurer
3. Prof. Dr. med. Th. Dörner

Datum der Promotion: 24.10.2009

Danksagung

Mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas gilt Herrn Prof. Dr. med. Falk Hiepe. Ich danke ihm für seine unermüdliche Hilfe bei allen Fragestellungen. Weiterhin danke ich Herrn Dr. rer. nat. Rolf Klein für seine große Hilfe in Bezug auf experimentelle Sachverhalte. Beide haben mir das Rüstzeug für wissenschaftliches Arbeiten vermittelt.

Meiner Mutter gewidmet.

Abkürzungsverzeichnis

Alle nicht in die Deutsche Sprache zu übersetzenden Abkürzungen wurden aus dem englischen Original übernommen.

ACR	American College of Rheumatology
ADCC	Antibody-Dependent Cytotoxicity
AICD	Activation-Induced Cell death
ANA	Anti-Nukleäre Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
CCP	Zyklisch zitruilliniertes Peptid
cDNA	komplementäre DNA
DC	Dendritische Zelle
DD	Death Domain
DILE	Drug-Induced Lupus Erythematosus
DMARD	Disease- Modifying Antirheumatic Drug
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FADD	Fas Associated Protein with Death Domain
FAS	Apoptosis Stimulating Fragment
FCS	Fötales Kälberserum
G6-PDH	Glucose 6-Phosphat-Dehydrogenase
HaCaT	Human Adult Low Calcium and High Temperature Keratinocytes

HRPT	Hypoxanthin-Guanine- Phosphoribosyl-Transferase
hY-RNA	Human Cytoplasmic RNA
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
LT- α	Lymphotoxin- α
MHC	Major Histocompatibility Complex
m-RNA	Messenger-RNA
MTX	Methotrexat
NES	Nuclear Export Signal
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa B
NK- Zellen	Natural Killer-Zellen
NLS	Nuclear Localization Signal
NSAID	Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PLAD	Preligation Association Domain
PsA	Psoriasis-Arthritis
RF	Rheumafaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein-Komplex
SCLE	Subakut kutaner Lupus erythematodes
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
snRNP	Small Nuclear Ribonukleoprotein
SS	Sjögren-Syndrom

β 2- MG	β 2-Mikroglobulin
ssDNA	Einzelstrang-DNA
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th- Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF-RI	Tumornekrose Faktor-Rezeptor I
TNF-RII	Tumornekrose Faktor-Rezeptor II
TNF- α	Tumornekrose Faktor- α
TRADD	TNF Receptor 1-Associated Protein
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
t-RNA	Transfer-RNA
UVB	Ultraviolett-Licht B
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Autoimmunität und Toleranz.....	1
1.2	Klinische Manifestationen, Diagnose und Pathogenese des SLE.....	1
1.2.1	Autoantikörpernachweis bei SLE.....	3
1.2.1.1	Antinukleäre Antikörper (ANA).....	3
1.2.1.2	Anti-DNA-Autoantikörper.....	3
1.2.1.3	Anti-Sm-Autoantikörper.....	4
1.2.1.4	Anti-Ro/SSA-Autoantikörper.....	5
1.2.2	Die pathogenetische Bedeutung von Anti-Ro/SSA-Autoantikörpern bei LE.....	6
1.2.2.1	Bedeutung von Keratinozyten als antigenpräsentierende Zellen.....	8
1.3	Intrazelluläre Transportwege von Ro/SSA-Ribonukleoproteinen (Ro-RNP).....	9
1.4	Biochemische Eigenschaften der Ro/SSA-Autoantigene.....	11
1.5	Molekularbiologische Charakterisierung des Ro/SSA52-Autoantigens.....	13
1.6	TNF-α, TNF-α-Rezeptoren und systemische Autoimmunität.....	15
1.7	Anti-TNF-α-Therapien bei rheumatischen Autoimmunerkrankungen.....	18
1.7.1	Rheumatoide Arthritis (RA).....	19
1.7.2	Psoriasis-Arthritis (PsA).....	19
1.7.3	Ankylosierende Spondylitis (AS).....	19
2	Fragestellung.....	21
3	Material und Methoden.....	23
3.1	Material.....	23
3.1.1	Materialien für zellbiologische Arbeiten.....	23
3.1.1.1	Kulturmedien und Zusätze.....	23
3.1.1.2	Zellen.....	24
3.1.1.3	Reagenzien für den Nachweis von Apoptose.....	24
3.1.2	Materialien für molekularbiologische Arbeiten.....	24
3.1.2.1	Reagenzien für die mRNA-Extraktion.....	24
3.1.2.2	Reagenzien für die cDNA-Synthese und PCR-Amplifikation.....	25

3.1.2.3	Amplifikationskits für die <i>Realtime</i> -PCR	25
3.1.3	Puffer und Lösungen.....	26
3.1.3.1	elektrophoretische Trennung von DNA.....	26
3.1.3.1.1	TAE-Puffer	26
3.1.3.1.2	DNA-Ladepuffer	26
3.1.3.1.3	Ethidiumbromid.....	26
3.1.3.2	Klonierungen.....	26
3.1.4	Laborgeräte.....	27
3.2	Methoden	28
3.2.1	Zellkultivierung humaner Keratinozyten.....	28
3.2.2	Nachweis von Apoptose.....	28
3.2.2.1	Quantifizierung der Apoptose durch Annexin-V und Propidiumjodid (PJ)	29
3.2.2.2	Annexin-V-Zellsortierung	29
3.2.3	RNA-Extraktion aus Zellen.....	29
3.2.3.1	Extraktion von mRNA aus Keratinozyten.....	29
3.2.4	Umschreibung (Reverse Transkription, RT) von RNA in cDNA.....	30
3.2.4.1	DNA-Gelelektrophorese.....	30
3.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
3.2.5.1	Primerdesign.....	31
3.2.6	Klonierung und Transformation	33
3.2.6.1	Flüssigkulturen	33
3.2.6.2	Isolierung und Charakterisierung von Plasmiden.....	33
3.2.6.3	<i>Colony-PCR</i> (CPCR) zur Charakterisierung von Inserts	34
3.2.7	Durchführung der quantitativen PCR mit dem Light Cycler [®] -Instrument.....	35
3.2.7.1	Messprinzipien	35
3.2.7.2	Quantitative Einschritt-PCR (<i>Realtime</i> -RT-PCR)	36
3.2.7.3	Relative Quantifizierung über externe Standards	38
3.2.8	Zytokin-ELISA.....	39
3.2.8.1	Nachweis von TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β und IL-10.....	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Grundlage der Analyse.....	41
4.2	Ro/SSA52-mRNA-Expressionsanalyse in HaCaT-Keratinozyten mittels konventioneller PCR.....	41

4.2.1	Untersuchungen der konstitutiven Expression von Ro/SSA52.....	41
4.2.2	Untersuchungen der TNF α -induzierten Expression von Ro/SSA52.....	43
4.3	Etablierung der quantitativen <i>Realtime</i>-PCR (qPCR)	44
4.3.1	Plasmid-DNA wird als Referenzsystem für der qPCR verwendet.....	44
4.3.2	Expressionsprofile von Haushaltsgenen nach TNF- α -Stimulation.....	46
4.3.3	Durchführung einer Multiplex-qPCR mit dem Light Cycler [®]	48
4.3.3.1	Die Multiplex- Amplifizierung von Genfragmenten kleinerer Größe läuft stabil ab ...	48
4.3.3.2	Die Multiplex-Amplifizierung von größeren Genfragmenten läuft verzögert ab	49
4.3.3.3	Zusammenfassung der <i>Realtime</i> -PCR-Evaluierung	51
4.3.4	Molekülzahlen von Ro/SSA52 in Keratinozyten	51
4.3.4.1	Molekülzahlen nach Amplifizierung von Ro/SSA52-cDNA	51
4.3.4.2	Molekülzahlen nach Amplifizierung von Ro/SSA52-Plasmid-DNA	52
4.4	qPCR zur Bestimmung der Ro/SSA52-mRNA-Expression in Keratinozyten.....	53
4.4.1	TNF- α -induzierte mRNA-Expression von Ro/SSA52 in HaCaT-Keratinozyten	53
4.4.2	TNF- α -induzierte mRNA-Expression von Ro/SSA52 in primären Keratinozyten ...	55
4.4.3	TNF-RI-und RII-Rezeptoren sind an der Ro/SSA52-mRNA-Expression beteiligt ...	58
4.4.4	Die mRNA-Induktion von Ro/SSA52 erfolgt unabhängig von Apoptose.....	59
4.4.5	TNF- α -Effekt auf die mRNA-Expression von Sm-D1 in primären Keratinozyten ...	61
4.4.6	TNF- α induziert die eigene mRNA-Freisetzung nach 1h	62
4.4.7	Nach 24h induziert TNF- α die eigene Proteinfreisetzung und die von IL6, IL-8 und IL-10.....	62
4.5	FACS-Analysen.....	65
4.5.1	TNF- α vermittelte Effekte auf die Apoptoserate in primären Keratinozyten.....	65
5	Diskussion	67
5.1	Immunologisches Konzept von Anti- Ro/SSA52-Autoantikörper-vermittelten Hautmanifestationen	68
5.2	Die konventionelle PCR im Vergleich zur <i>Realtime</i>-PCR-Technologie, um Ro/SSA52-mRNA zu quantifizieren.....	70
5.3	Die Effekte von TNF-α auf Ro/SSA52-mRNA in humanen Keratinozyten.....	73
5.3.1	TNF- α -Rezeptoren sind an der Ro/SSA52-mRNA-Regulation beteiligt.....	75

5.3.2	Ro/SSA52-mRNA wird durch TNF- α unabhängig von Apoptose induziert	76
5.4	Auswirkungen von Störungen der TNF-α-Funktion.....	77
5.5	TNF-α induziert in Keratinozyten die Freisetzung der sekundären proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8.....	78
5.6	Zusammenfassung	80
5.7	Ausblick	81
6	Literaturverzeichnis	83

1 Einleitung

1.1 Autoimmunität und Toleranz

Autoimmun bedingten Erkrankungen liegt eine komplexe Störung der Immunregulation zu Grunde, bei der genetische, immunologische und exogene Faktoren zusammenwirken. Große Bedeutung kommt hierbei der Fähigkeit des Immunsystems zu, gegen körpereigene Strukturen tolerant zu sein. Eine Abnahme von Toleranz kann die Bildung von Autoantikörpern zur Folge haben. Autoantikörper sind bei rheumatischen Autoimmunerkrankungen wie z.B. dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) oder Sjögren-Syndrom (SS) nachweisbar und gelten als Parameter, mit denen Aussagen über den Verlauf und die Prognose dieser Erkrankungen getroffen werden können. Autoantikörper können gegen Proteine (intrazelluläre Enzyme, Rezeptoren, Strukturproteine), Glykoproteine (beta-2 Glykoprotein I), Nukleinsäuren (DNA, RNA), Phospholipide (Cardiolipin) oder Glykosphingolipide (Ganglioside) gerichtet sein. Darüber hinaus lassen sich Autoantikörper abhängig von der zellulären Lokalisation gegen nukleäre Antigene (Ro/SSA, La/SSB, Doppelstrang-DNA [dsDNA], Sm, Scl-70, Fibrillarin), zytoplasmatische Antigene (Jo-1, Keratin, Proteinase3) sowie spezielle Zellorganellen (Mitochondrien, Spindel-Apparat, Enolase) nachweisen. Von besonderer Bedeutung ist das Verständnis der Mechanismen, die zur Induktion von Autoantikörpern führen. Erkenntnisse, wie und warum Autoantigene wie z.B. Ro/SSA bevorzugt von Autoantikörpern erkannt werden, können zur Klärung der bisher ungeklärten Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beitragen. Ro/SSA ist ein intrazellulär lokalisierter Nukleinsäuren-Proteinkomplex, der sich in fast allen menschlichen Zellen nachweisen lässt. In dieser Arbeit wird ein Konzept zur quantitativen Bestimmung der mRNA-Expression von Ro/SSA52 in Hautzellen vorgestellt. Hieraus ergeben sich neue Ansätze zur Entwicklung von Diagnostik- und Therapieverfahren für Anti-Ro/SSA52-vermittelte photosensitive Hautmanifestationen bei Lupus erythematoses.

1.2 Klinische Manifestationen, Diagnose und Pathogenese des SLE

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) wird als eine Erkrankung aufgefasst, bei der viele klinische Symptome in einem Krankheitsbild vereinigt sind. Es ist eine nicht ansteckende, nicht bösartige, nicht infektiöse Erkrankung, welche vorrangig Frauen (10:1) im gebärfähigen Alter

betrifft und die durch eine gesteigerte Synthese von Autoantikörpern, zirkulierenden Immunkomplexen und Entzündungen in verschiedenen Organen gekennzeichnet ist. Das Auftreten der Autoantikörper kann den klinischen Manifestationen um Monate bis Jahre vorausgehen. Besonders auffällig sind Unterschiede in der Reaktivität von Lymphozyten und dendritischen Zellen (DC), die mit genetischen Veränderungen verbunden sind. Zusätzlich treten Abweichungen in der Synthese und Freisetzung von Zytokinen auf¹⁻³. Neben genetischen Veränderungen sind epigenetische Faktoren wie die Methylierung von DNA sowie die Modifizierung von Histonen von Bedeutung⁴.

Der Lupus erythematoses lässt sich in verschiedene Formen klassifizieren. Die systemische Form (SLE) wird von der hautassoziierten Form unterschieden. Zur letzteren werden der diskoide Lupus (DLE), der durch Entzündungsreaktionen und narbig abheilende Hautmanifestationen gekennzeichnet ist, sowie der subakut kutane Lupus gezählt (SCLE). Bei dem SCLE ist eine photosensitive chronische Hautentzündung charakteristisch, die meistens ohne Narbenbildung abheilt. Zusätzlich treten Sonderformen auf, zu denen der Medikamenten-induzierte LE und der neonatale LE gezählt wird. Die weltweite Erkrankungshäufigkeit für den SLE liegt bei 17-48/100.000 Personen, die Häufigkeit in Europa beträgt zwischen 12-64/100.000 Personen. Nach Schätzungen der Deutschen Rheumaliga liegt die Prävalenz des SLE in Deutschland bei etwa 40.000 Personen. Afroamerikaner und Asiaten sind häufiger (3:1) betroffen als Personen kaukasischer Abstammung⁵. Der SLE kann sehr viele Organe betreffen, so dass das klinische Bild variiert. Typisch ist das schmetterlingsförmige Erythem im Gesicht, welches sich durch Exposition von UV-Licht verstärkt manifestieren kann⁶. Darüber hinaus treten Symptome wie Alopezie, Vaskulitiden der kleinen Gefäße der Haut, Mundschleimhautentzündung oder das Raynaud-Syndrom auf. Eine chronische Pleuritis, morgendliche Arthralgien der großen und kleinen Gelenke mit Schwellungen und Luxationsarthropathien sowie Tenosynovitiden sind bei SLE-Patienten häufig vorhanden.

Im Röntgenbild lassen sich auch nach jahrelangem Verlauf keine (oder sehr geringe) Veränderungen der angrenzenden Knochen, wie etwa bei der rheumatoiden Arthritis, nachweisen. Ein wesentliches Kriterium bei der Diagnose des SLE ist der Nachweis antinukleärer Antikörper (ANA) im Serum. Hierzu zählen Anti-Doppelstrang DNA-Antikörper (Anti-dsDNA), Anti-Sm-Antikörper (Anti-Sm), Anti-Phospholipid-Antikörper, Anti-Cardiolipin-Antikörper, Anti-Histon-Antikörper sowie Antikörper gegen Ro/SSA und La/SSB. Desweiteren

finden sich häufig eine erhöhte Blutsenkung und im Blutbild Anämie, Leukozytopenie, Thrombozytopenie sowie Erythrozyten- und Leukozytenzylinder. Die Komplementfaktoren C3 und C4 sind beim aktiven SLE vermindert. Der Nachweis von roten Blutkörperchen und/oder von Eiweiß im Urin spricht für eine Lupusnephritis. Bei Hautmanifestationen des SLE können mittels Immunhistologie typische Ablagerungen von Immunkomplexen und Komplement in der Grenzschicht der Epidermis, das Lupus-Band, nachgewiesen werden.

1.2.1 Autoantikörpernachweis bei SLE

1.2.1.1 Antinukleäre Antikörper (ANA)

Bei Autoimmunerkrankungen wird auf Grund einer fehlgeleiteten Ausrichtung des humanen Abwehrsystems körpereigenes Gewebe als *fremd* angesehen und bekämpft. Dieser Prozess besteht lebenslang und kann bis zur vollständigen Zerstörung der betroffenen Organe führen. Manche Autoantikörper richten sich gegen bestimmte Organe, andere wiederum sind nicht organspezifisch und richten sich gegen bestimmte Zellbestandteile. Zu diesen gehören die ANA, die gegen Bestandteile des Zellkernes gerichtet sind und unter Verwendung von Hep-2-Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Die weitere Differenzierung erfolgt mittels ELISA-Verfahren, Line-Assays, Autoantikörper-Mikroarrays, Gelpräzipitation oder mittels Western-Blot. ANA sind bei mehr als 95% der SLE-Patienten positiv. Extrem selten sind ANA negativ, bei positivem Befund für Anti-Ro/SSA60-Autoantikörper. Der Nachweis von ANA deutet nicht zwangsläufig auf eine Autoimmunerkrankung hin, da diese auch bei Gesunden und bei Patienten mit nicht-rheumatischen Erkrankungen wie chronischen Hepatitiden, Tumorerkrankungen und akuten Infektionskrankheiten (TBC, Malaria) vorhanden sein können⁷. Die klinischen Symptome müssen immer in die Diagnosestellung mit einbezogen werden. Es gilt, dass die Diagnose SLE gestellt werden darf, wenn bei positiven ANA drei weitere Kriterien nach Klassifikation der ACR zutreffend sind⁸.

1.2.1.2 Anti-DNA-Autoantikörper

Anti-DNA-Autoantikörper gelten als wichtiger Parameter (Marker- Antikörper) für die Diagnose des SLE da sind mit einer Nephritis assoziiert^{5,9}. Anti-DNA-Autoantikörper lassen sich in zwei

Hauptgruppen, Doppelstrang (dsDNA)-und Einzelstrang (ssDNA)-Autoantikörper unterteilen. SsDNA-Autoantikörper gelten als nicht spezifisch für SLE, da diese in Patienten mit verschiedenen rheumatischen Erkrankungen nachweisbar sind. DsDNA-Autoantikörper werden abhängig von der Aktivität der Erkrankung in über 70% der Patienten mit SLE detektiert. Die Spezifität eines positiven Befundes in Chritidia-Immunfluoreszenz-Tests beträgt 95%, das diesen Autoantikörper zu einem Hauptparameter für die Diagnosestellung macht. Die Bedeutung von Anti-dsDNA-Autoantikörpern zeigt sich darin, dass extrazelluläre DNA die Entstehung von Immunkomplexen begünstigt, welche im weiteren Krankheitsverlauf zu ausgeprägten Organschäden führen. Das Auftreten von Anti-dsDNA-Autoantikörpern wird durch immunstimulatorische Eigenschaften von genomischer DNA von Bakterien erklärt. Diese beruhen auf immunstimulatorischen Oligonukleotiden, *cpg*-Oligonukleotiden (*cpg*-DNA)¹⁰, die u.a. die Proliferation von B-Lymphozyten induzieren. Genomische DNA von Säugetieren weist keine *cpg*-Nukleotide auf und besitzt daher auch keine immunstimulatorische Aktivität¹¹.

1.2.1.3 Anti-Sm-Autoantikörper

Anti-Sm-Autoantikörper werden als krankheitsspezifisch für den SLE angesehen. Zwischen einem positiven Test und der Ausprägung von klinischen Symptomen des SLE besteht oftmals ein Zeitintervall von ca. 1,5 Jahren¹². Autoantikörper gegen Sm-Proteine weisen mit 99% eine hohe Spezifität, aber eine geringe Sensitivität auf. Serumtiter werden auch bei Patienten mit anderen Erkrankungen detektiert. Die Autoantikörper sind gegen mehrere Proteine gerichtet (B/B', D1, D2, D3, E, F, G), welche ein Teil kleiner, im Zellkern lokalisierter Proteinkomplexe (U-snRNP's) sind. Unter diesen werden B/B', D1, D3 am häufigsten detektiert¹³. Klinisch sind Sm-Autoantikörper mit Nierenentzündung, Lungenfibrose, Perikarditis assoziiert und weisen unabhängig vom Titer der dsDNA-Antikörper eine hohe Korrelation zur Aktivität der Erkrankung auf. Das zusätzliche Auftreten von Antikörpern gegen snRNP kann mit einer Nephritis, Raynaud-Phänomen bzw. Myositiden verbunden sein¹⁴.

1.2.1.4 Anti-Ro/SSA-Autoantikörper

Anti-Ro/SSA-Autoantikörper werden in 25-60% (Tabelle 1) der Patienten mit SLE nachgewiesen, bei Patienten mit der subakut kutanen Form des SLE, dem neonatalen Lupus, bei Lupus mit einem Mangel an Komplementfaktoren (C2, C4) sowie dem SS treten diese in über 90% der Fälle auf ¹⁵. Bei Letzterem ist eine Entzündung von Speicheldrüsen typisch, bei dem Anti-Ro/SSA-Autoantikörper im Drüsengewebe und den Ausführungsgängen der Drüsen nachgewiesen werden. Manifestationen außerhalb der Drüsen führen zu Lymphadenopathie, Splenomegalie und Vaskulitis. Anti-Ro/SSA-Autoantikörper können mit typischen SLE-Markern wie dsDNA- und Sm-Autoantikörpern gemeinsam auftreten oder dienen als Marker für eine gutartige Form des SLE (Ro/SSA-positiver SLE). Anti-Ro/SSA60-Autoantikörper gelten als spezifischer als Anti-Ro/SSA52-Autoantikörper, da erstere separat bei elf Prozent der Patienten mit SLE nachgewiesen werden. Als Nachweismethoden von Autoantikörpern gegen Ro/SSA haben sich die indirekte Immunfluoreszenz, die Immundiffusion, Western-Blot (MOLT-4-Extrakt) und ELISA-Verfahren etabliert. Anti-Ro/SSA-Autoantikörper sind mit Photosensitivität, interstitieller Pneumonie, Zytopenie sowie Hypergammaglobulinämie assoziiert und korrelieren mit einer guten Prognose. Das Auftreten von Anti-Ro/SSA-Autoantikörpern zusammen mit Anti-dsDNA-Antikörpern macht dagegen eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion wahrscheinlich. Der Nachweis von Symptomen des SS und des SLE wird als *Overlap-Syndrom* bezeichnet. Diese Patienten weisen Anti-Ro/SSA- und La/SSB-Autoantikörper, ein signifikant erhöhten HLA-DR3-Genotyp, Trombozytopenie, Haut- und ZNS-Erscheinungen auf ⁵.

Autoantikörper gegen	klinische Assoziation	Immunfluoreszenzbild
dsDNA	40-70% bei aktiven Fällen, Nephropathie, ZNS- beteiligung,	homogen, nukleär
Sm	15-30% der Fälle, ZNS- Beteiligung, Nephropathie	gepunktet, nukleär
U1-RNP	30-40% der Fälle, Raynaud- Symptome, MCTD	gepunktet, nukleär
Ro (SS-A)	25-60% der Fälle SCLE,NLE, C2/C4-Defizienz bis 90%	fein gepunktet, nukleär, auch ANA- negativ möglich
La (SS-B)	10-30% der Fälle, 75% bei NLE	fein gepunktet, nukleär
Histone	95% medikamentös induziert, bei SLE 70%, pulmonale Fibrose bei Sklerodermie	homogen, nukleär
Phospholipide	25% bei unselektierten SLE- Patienten, Thrombose, Aborte, Thrombozytopenie, hämolytische Anämie	negativ
Ku	bei Polymyositis,Sklerodermie	homogen, nukleär und nukleolär
ssDNA	70% der aktiven Fälle	negativ
HSP 90	5-50% der Fälle	nicht beschrieben

Tabelle 1 Übersicht der mit SLE-assozierten Autoantikörper, siehe auch ¹⁵.

1.2.2 Die pathogenetische Bedeutung von Anti-Ro/SSA-Autoantikörpern bei LE

Das Ro/SSA52-Autoantigen wird 1969 als ein lösliches zytoplasmatisches Antigen beschrieben, welches mit Seren von SLE-Patienten reagiert ^{16,17}. Clark et al. definiert es als *Ro-Partikel*, abgeleitet vom Namen des Patienten, dessen Serum positiv auf dieses Antigen reagiert.

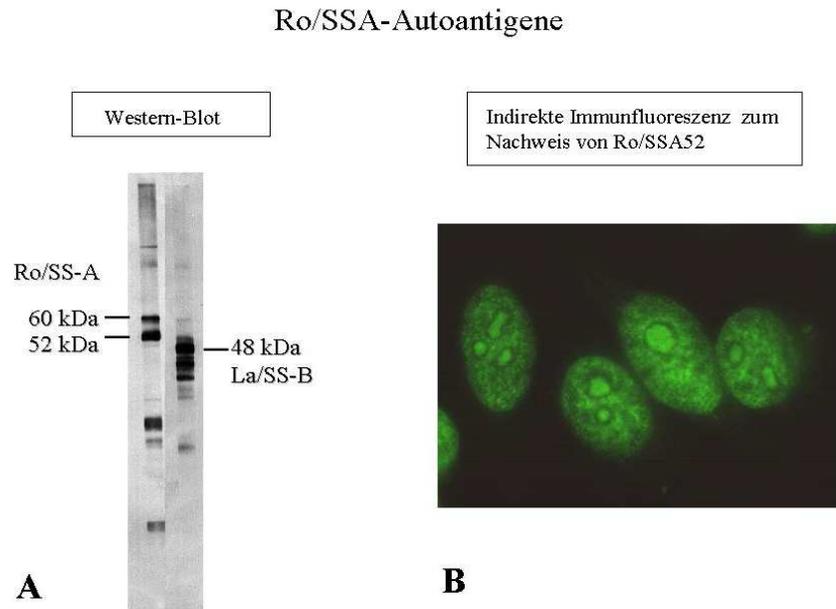


Abbildung 1 Die Detektion von Ro/SSA52 durch Anti-Ro/SSA-Autoantikörper ist in Abbildung 1A durch Western-Blot-Analyse, in Abbildung 1B durch indirekte Immunfluoreszenz erfolgt. Die intrazelluläre Lokalisation von Ro/SSA52 (rechtes Bild) ist durch ein feinkörniges, granuläres Muster gekennzeichnet.

Bei Lupuspatienten ist das Auftreten von Autoantikörpern gegen Ro/SSA ungewöhnlich häufig mit photosensitiven Hauterscheinungen assoziiert¹⁸⁻²¹. Diese können durch das Einwirken von Sonnenlicht noch verstärkt auftreten, da epidermale Keratinozyten Hauptzielzellen bei immunologisch bedingten Schäden in der Haut sind. Ursache des verstärkten Vorkommens von Autoantikörpern ist eine UVB-abhängige verstärkte Bindung von Anti-Ro/SSA,-Anti-La/SSB,-Anti-(RNP)-oder Anti-SmD-Autoantikörpern an Zellmembranen von Keratinozyten. Diese lässt sich sowohl bei Lupuspatienten wie auch bei gesunden Personen nachweisen²²⁻²⁵. Die Bindung von Autoantikörpern erfolgt auf Grund einer Translokation von intrazellulären Autoantigenen auf die Zelloberfläche sowie einer erhöhten Genexpression²⁶.

Eine Vielzahl von Einflüssen wie das weibliche Sexualhormon Östrogen, virale Proteine und proinflammatorische Zytokine sind an der Induktion der Genexpression von Ro/SSA in Hautzellen beteiligt²⁷⁻³¹. Morphologische Veränderungen von Zellen sind dabei häufig nachweisbar. Charakteristisch ist die Akkumulation von Ro/SSA-Autoantigenen in apoptotischen Blebs. Diese Anreicherung führt durch posttranslationelle Modifizierung (Phosphorylierung, Methylierung oder Glykosylierung) zu strukturellen Modifikationen der Proteine³².

Autoantikörper können dadurch an Epitope binden, die posttranslational unveränderte Ro/SSA52- und Ro/SSA60-Proteine nicht aufweisen. Phagozytierte Proteine aus apoptotischen Zellen haben darüber hinaus eine 1000- bis 10000-fach höhere Potenz zur Generierung von MHC-Komplexen, die in eine Aktivierung weiterer Signalwege resultiert^{33,34}. Die Erkenntnisse führen zu der Hypothese, dass die immunologische Empfänglichkeit von Hautzellen mit Antikörpern zu reagieren, durch exogene Faktoren beeinflusst werden kann. Die Translokation und/oder Induktion von Autoantigenen auf Zellmembranen wird als eine Möglichkeit angesehen, Immunzellen zu aktivieren und unterschiedliche immunologische Reaktionen hervorzurufen^{31,35}. Die auftretenden Autoantikörper lagern sich in Immunkomplexen zwischen Epidermis und Dermis ab^{36,37}.

Die Bindung von Anti-Ro/SSA52- oder Anti-Ro/SSA60-Autoantikörpern kann eine Mediatorfunktion in immunologisch sensibilisierter Haut ausüben, da Antikörper in Anwesenheit von Effektorzellen zu einer zytotoxischen Lyse (ADCC) sowie zu einer gesteigerten Opsonierung eingedrungener Mikroorganismen, Fremdzellen etc. befähigt sind. Die Aktivierung der ADCC in Keratinozyten wird durch PBMC, neutrophile Granulozyten oder *Natural Killer* (NK)-Zellen vermittelt. Anti-Ro/SSA-Autoantikörper können Ro/SSA-Proteine auf der Oberfläche lebender und apoptotischer Keratinozyten binden, PBMC hingegen binden den Fc-Teil von Immunglobulinen. Zellkulturexperimente zeigen, dass Zielzellen, die mit Antigenen beschichtet waren, durch PBMC aus Anti-Ro/SSA-positiven Seren zerstört werden. Die experimentell ausgelöste zytotoxische Reaktion hat große Ähnlichkeit mit Gewebeschäden, die in Hautläsionen von Lupuspatienten festgestellt werden³⁸. In Zellen von SLE-Patienten tritt eine stärkere Zytotoxizität sowie stärkere Bindung von Anti-Ro/SSA-Autoantikörpern auf als in normalen Zellen²⁵. Keratinozyten können durch komplementvermittelte Lyse und ADCC zerstört werden, wobei die komplementvermittelten Gewebeschäden reversibel sind. Gewebeerstörungen durch ADCC werden daher eine größere Bedeutung an der Immunpathologie des photosensitiven Lupus erythematodes zugeschrieben^{39,40}.

1.2.2.1 Bedeutung von Keratinozyten als antigenpräsentierende Zellen

Keratinozyten werden als semiprofessionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) angesehen, da sie durch Expression von Proteinen für die Immunerkennung, MHC-II-Proteinen, Antigene bzw. Autoantigene präsentieren. MHC-Proteine sind körpereigene Antigene auf der Zelloberfläche

von Körperzellen. Semiprofessionelle APC stehen den professionellen APC wie dendritischen Zellen und Makrophagen gegenüber, die ihren Ursprung ausschließlich im Knochenmark haben. Professionelle APC können T-Lymphozyten ein prozessiertes Antigen mittels MHC-II-Proteinen präsentieren. T-Zellen benötigen für die Aktivierung die Bindung von MHC-II-Proteinen zum T-Zellrezeptor (TCR/CD3-Komplex) sowie kostimulatorische Moleküle (B7-1 und B7-2) durch Interaktion mit CD28 ⁴¹. In Keratinozyten von gesunden Spendern werden MHC-II-Moleküle auf der Zellmembran exprimiert, die durch Stimulation mit Zytokinen wie IFN- γ ⁴² oder UVB ⁴³ hochreguliert werden. Erst die durch Stimulation exprimierten MHC-II-Proteine machen die Aussendung kostimulatorischer Signale für T-Zellen möglich.

An transgenen Mäusen wurde die B7-1-Expression auf Keratinozyten bestätigt. Nach Kontakt mit exogenen Antigen ist B7-1 an einer Verstärkung der Immunantwort beteiligt ⁴⁴. Die spezifische Bindung von Anti-Ro/SSA-Autoantikörpern an Ro/SSA-Proteine lässt sich in SCID-Mäusen zeigen, denen menschliche Haut transplantiert wurde. Die Injektion von Anti-Ro/SSA-positivem Serum führte nicht zu einer bevorzugten Ausbildung von Ro/SSA-Immunkomplexen im Blutkreislauf der Maus, sondern in der transplantierten humanen Haut. Die Entstehung der Immunkomplexe wird mit einer höheren Verfügbarkeit von Ro/SSA in der Epidermis gegenüber dem Blutkreislauf angesehen. Dieses Modell erklärt die spezifische Bindung von Anti-Ro/SSA-Autoantikörpern in der Epidermis, die in der Maus wie auch bei Patienten mit LE identisch abläuft ⁴⁵.

1.3 Intrazelluläre Transportwege von Ro/SSA-Ribonukleoproteinen (Ro-RNP)

Das Expressionsniveau der einzelnen Ro-RNP-Komplexe (Ro/SSA52, Ro/SSA60, La/SSB) wird unterschiedlich bewertet. Die Moleküle des La/SSB-Proteins wurden pro Zelle 100-fach höher gemessen als Moleküle von Ro/SSA52 und Ro/SSA60 ⁴⁶. Ro/SSA60 wird mehrheitlich im Zytoplasma, Ro/SSA52 dagegen im Kern von Zellen beschrieben. Ro-RNP sind zusammen mit Y-RNA im Zytoplasma vorhanden ⁴⁷. In Untersuchungen an Eizellen des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) wird diese Verteilung bestätigt. Bei Säugetieren sind alle Zellen, in denen Y-RNA vorhanden ist, mit Ro/SSA60- und La/SSB-Proteinen und nur zu einem Teil mit Ro/SSA52 assoziiert ^{48,49}. Im Zellkern existiert eine ungebundene Form von Ro/SSA60 und La/SSB-Proteinen ⁵⁰, ungebundene Ro/SSA52-Proteine sind im Zytoplasma vorhanden ⁵¹.

Der zytoplasmatische Transport von Proteinen und RNA in den Zellkern erfolgt über Mikroporen, *Nuclear Pore Complexes* (NPC), die in der äußeren Kernmembran lokalisiert sind. Kleine Proteine können über Diffusionsprozesse den Zellkern erreichen, große Proteine benötigen zum Import oder Export Transportproteine, die als *Nuclear Localisation Signals* (NLS) bezeichnet werden⁵². Im Zytoplasma der Zelle werden NLS durch Rezeptoren erkannt, welche Proteine zur äußeren Kernhülle transportieren. Es erfolgt anschließend die Bildung eines Protein-Rezeptor-Komplexes, der durch die äußere Kernmembran in das Nukleoplasma verlagert wird. Auf Grund der Lokalisation der Ro-RNP können alle Proteinkomponenten in den Zellkern eintreten. Die für diesen Transfer benötigte Energie wird durch eine GTPase (Ran/TC4) bereitgestellt. NLS-Rezeptoren und Ran/TC4 sind nach Dissoziation des Komplexes wieder verwendbar und können in das Zytoplasma zurückkehren⁵³⁻⁵⁵, ebenso wie hY-RNA⁵⁶.

Analog zu Importvorgängen wird auch der Transfer von Proteinen in das Zytoplasma durch Signalproteine gesteuert. Diese als *Nuclear Export Signals* (NES) bezeichneten Proteine weisen keine sequenzspezifischen Ähnlichkeiten mit NLS auf. Die Exportkapazität von Proteinen ist vom Ausmaß der nukleären Speicherung abhängig⁵⁷. Für den Export von RNA ist Größe, Ladung und Assoziation zu Proteinen von großer Bedeutung, passive Exportmechanismen sind sehr unwahrscheinlich^{58,59}. Die Geschwindigkeit, mit denen t-RNA und Y-RNA in das Zytoplasma transportiert werden, ist unterschiedlich. Der Transport von 50% mikroinjizierter t-RNA in das Zytoplasma dauert weniger als 30 Minuten, für dieselbe Menge an Y-RNA werden mehr als 8 Stunden benötigt. Verantwortlich hierfür ist die starke Bindung von Y-RNA zum La/SSB-Protein, durch das Ribonukleinsäuren effizient im Zellkern zurückgehalten werden⁶⁰.

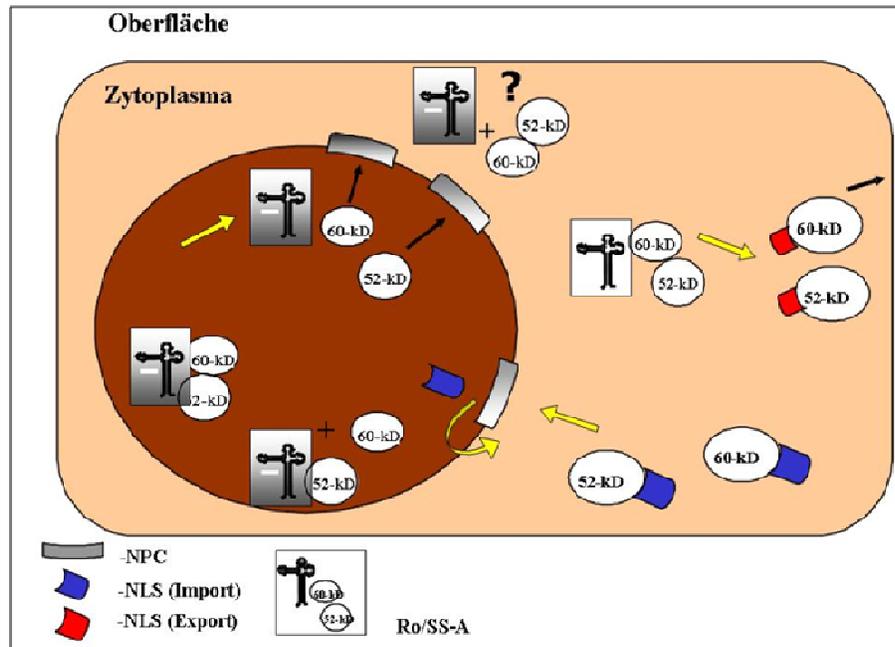


Abbildung 2 Modell der nukleären und zytoplasmatischen Verteilung von Ro- RNP's in humanen Keratinozyten. Modifiziert nach Pruijn et al. ⁴⁶.

1.4 Biochemische Eigenschaften der Ro/SSA-Autoantigene

Das Ro/SSA-Autoantigen wird in verschiedenen Geweben als eine lösliche zytoplasmatische Komponente beschrieben, die eine Resistenz gegenüber proteolytischen Enzymen aufweist. Die exakte Größe des Proteinkomplexes wurde zunächst mit einem Molekulargewicht von 61,00 kDa angegeben ^{61,62}. 1986 erfolgt der Nachweis eines Proteins von 52kDa als ein Bestandteil des Ro/SSA-Autoantigens. In mehr als 50% der untersuchten Patientenserum werden Antikörper gegen Proteine mit einem Molekulargewicht von 52kDa und 60kDa detektiert, 30% sind ausschließlich Ro/SSA52 positiv, 2% sind Ro/SSA60 positiv. Zusätzlich sind weitere Proteine wie La/SSB oder Sm vorhanden ⁶¹. Affinitätsgereinigte Antikörper aus Patientenserum reagieren spezifisch mit Ro/SSA52 und Ro/SSA60 sowie mit dem La/SSB-Protein. Das die Antikörper keine Kreuzreaktivität zeigen, wird mit der Existenz von verschiedenen Epitopen begründet, die auf immunologisch nicht identisch vorliegenden Ro/SSA52-und Ro/SSA60-Proteinen beruht ^{61,63}.

Ro/SSA-Proteine weisen im nativen Zustand Unterschiede auf: affinitätschromatographisch gereinigte Anti-Ro/SSA60-Antikörper präzipitieren 60kDa-Proteine, Anti-Ro/SSA52-Antikörper

präzipitieren Proteine der Größe von 52kDa und 60kDa. Hier ist demnach ein Teil von Ro/SSA52-Protein mit dem Ro/SSA60-Protein assoziiert ⁶¹. Durch Isolierung und Charakterisierung einer cDNA, die für das gesamte Protein kodiert, wird Ro/SSA52 als separate Struktur identifiziert ⁶⁴. Bedingt durch das Fehlen der Kreuzreaktivität zwischen den Antikörpern sowie dem Fehlen eines gemeinsamen proteaseresistenten Degradationsproduktes ist das Ro/SSA52-Protein kein Abbauprodukt von Ro/SSA60. Seine Aminosäuresequenz zeigt keine Homologie mit Sequenzen des Ro/SSA60- und La/SSB-Proteins ⁶⁵. Der Nachweis von Zink-Chelaten am NH₃-Ende, auch als *Zink-Finger* bezeichnet, und die zentral gelegenen *Leuzin-Zipper* sind für die DNA- oder RNA-Bindungsfähigkeit von Ro/SSA52 verantwortlich ⁶⁴.

In humanen Zellen wurden vier Ro/SSA-spezifische RNA-Arten nachgewiesen und sequenziert (hY1, hY3, hY4 und hY5), die in einer Länge von 84 bis 112 Nukleotiden vorliegen ⁶⁶. Wie Abbildung drei zeigt, weisen hY-RNA-Moleküle eine stielartige Sekundärstruktur auf, an deren Basis Ro/SSA-Proteine an eine proteaseresistente Region binden. Der untere Teil des Schaftes weist ein einzelnes *bauchig* aufgeweitete Nukleotid auf, das ein wesentliches strukturelles Element von RNA-Protein-Bindungsstellen darstellt ⁶⁷. Die Bindung von Ro/SSA60 an das hY-RNA-Molekül löst eine Konformationsänderung aus, die die Bindung des Ro/SSA52-Proteins an den Ribonukleoproteinkomplex ermöglicht. Die Anbindung von La/SSB an die hY-RNA wird durch das Nukleosid Uridin begünstigt und wird nicht durch andere Proteine beeinflusst. Eine Anbindung von Ro/SSA-Proteinen an andere RNA-Spezies führt zur Bildung ähnlicher Protein-RNA-Komplexe ⁶⁸.

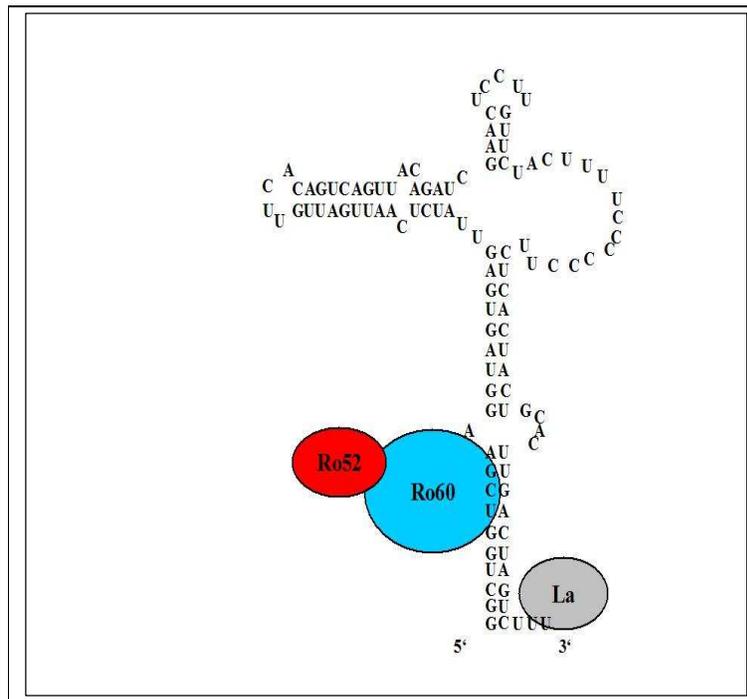


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Ro/SSA-Ribonukleoproteinkomplexes, der aus 52kDa-, 60kDa- und 48kDa (La-Protein) Proteinen besteht, die an eine hY-RNA gebunden sind.

1.5 Molekularbiologische Charakterisierung des Ro/SSA52-Autoantigens

Die molekularbiologische Charakterisierung von Ro/SSA52 ist durch die Isolierung und Klonierung der vollständig kodierenden cDNA erfolgt^{64,69}. Die cDNA wurde aus der humanen T-Zell-Linie MOLT-4 und der hepatischen Tumorzelllinie HepG2 generiert. Nach Bestimmung der Nukleotidsequenz des Proteins kann ein einzelner Leserahmen einer Größe von 475 Aminosäuren identifiziert werden, der einer Molekularmasse von 54,1kDa entspricht (siehe Abbildung 4). Am NH₃-Ende des Proteins sind zwei *Zink-Finger*-Domänen, im zentralen Proteinabschnitt ein *Leuzin-Zipper*-Areal und am COOH-Ende mehrere rfp-Domänen lokalisiert. Die in Ro/SSA52 vorhandenen *Zink-Finger* zeigen keine typischen Sequenzhomologien mit bekannten *Zink-Finger*-Strukturen, so dass der genaue Mechanismus der Nukleinsäure-Bindung ungeklärt ist⁷⁰. Das *Leuzin-Zipper*-Areal von Ro/SSA52 (AS 211-232) befindet sich im zentralen Proteinabschnitt und ist an der Formation von Protein-Dimeren sowie Protein-Protein-Interaktionen beteiligt. Es ist maßgebend für eine Bindung an DNA⁷¹.

Nach Sequenzanalyse können drei Proteine identifiziert werden, die einen hohen Grad an Homologie mit Ro/SSA52 aufweisen. Es handelt sich um ein regulatorisches Protein, *Regulatory Protein T Lymphocyte-1* (rpt1-Protein) der Maus, das humane *Ret-Transforming-Protein* (ret) sowie das *Ret-Finger-Protein* (rfp-Protein). Sequenzvergleiche ergeben eine Übereinstimmung von 50% in der Aminosäureabfolge in den NH₃-Enden. In allen Proteinen sind die Expressionsmuster von Zystein in den *Zink-Finger*-Arealen hoch konserviert. Das Ro/SSA52-Protein weist eine höhere Ähnlichkeit zum rfp -bzw. rpt1-Protein auf als rfp- und rpt1-Proteine untereinander. Proteindomänen von rfp und rpt1 werden daher als eine Art Subklasse von *Zink-Finger*-Proteinen aufgefasst^{64,72}.

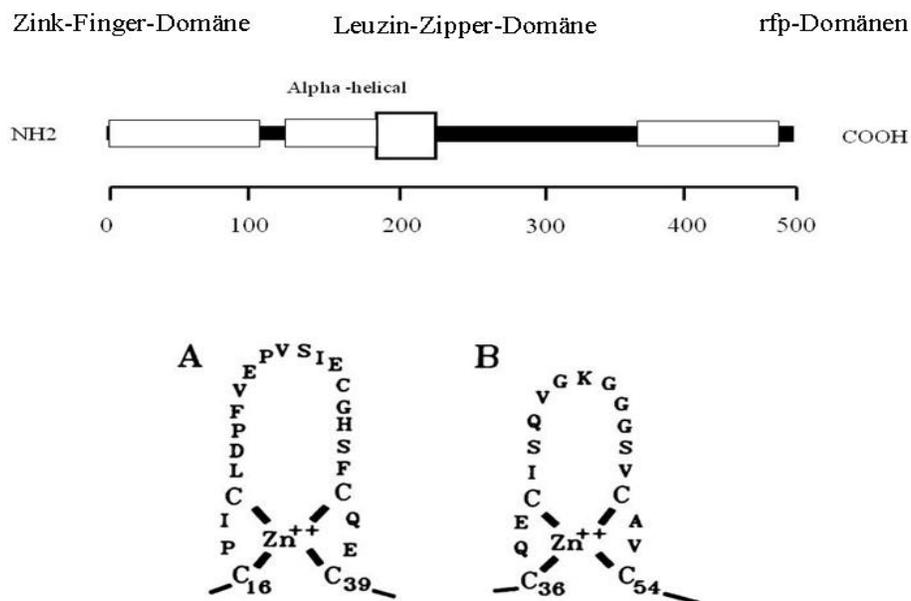


Abbildung 4 Schematische Abbildung der Struktur von Ro/SSA52. Die Größe des Proteins entspricht einem Leserahmen von 475 Aminosäuren. Es sind *Zink-Finger*-Regionen (AS 1-135), *Leuzin-Zipper*-Areale (AS 197-232) sowie Homologien mit dem *regulatory protein T lymphocyte-1* (rpt1) der Maus und dem humanen *red finger protein* (rfp) nachweisbar (AS 293-472). In A und B ist die räumliche Konformation zweier *Zink-Finger*-Areale dargestellt⁷³.

Das Ro/SSA52-Protein wird durch ein einzelnes Gen kodiert, das eine DNA-Molekülmasse von 10kB aufweist⁶⁴ und durch sieben Exons charakterisiert ist^{74,75}. Das Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 11⁷⁶. Neben dem Volllänge-Protein (α -Form) existiert eine als β -

Form bezeichnete zweite Variante, die sechs Exons aufweist. Das Ro/SSA52 β -Protein ist 45kDa groß und ein Produkt alternativen mRNA-*Splicings* von Exon drei zum Exon fünf. Bedingt durch das Überspringen von Exon vier fehlen *Leuzin-Zipper*-Areale, welche für die DNA/RNA-Bindung wichtig sind. Alternativ vorhandene *Zink-Finger* ermöglichen funktionell die DNA/RNA-Anbindung⁷⁴.

Das Ro/SSA52-Protein wurde als Substrat für Ubiquitinylierung charakterisiert. Durch die im zentralen Proteinabschnitt vorhandenen ringförmigen Proteinareale wird Ro/SSA52 als E3-Ligase für Ubiquitin beschrieben. Abzubauen Proteine werden durch die Ubiquitinylierung bevorzugt am Proteasom markiert und entsorgt. Ro/SSA52 ist demnach mit verringerter Lebensfähigkeit und verzögerter Proliferation von Zellen assoziiert, dass sich durch Überexpression des Proteins in aktivierten B-Lymphozyten (nach CD40-Stimulation) bestätigen lässt. Ro/SSA52 moduliert als E3-Ligase Gene, welche die Induktion von Apoptose beeinflussen⁷⁷, darüber hinaus übernimmt das Protein Funktionen in der Qualitätskontrolle von Ribosomen. Ursächlich sind geringfügige Änderungen in der Struktur von zahlenmäßig wenigen Ribosomen durch abnorm gefaltete RNA, die zu einer Freilegung von bislang nicht zugänglichen Determinanten (Strukturproteinen) führen⁷⁸. Als Folge davon wird die Entstehung von Autoimmunität gefördert.

1.6 TNF- α , TNF- α -Rezeptoren und systemische Autoimmunität

Die proinflammatorisch wirkende Zytokin TNF- α wird unter physiologischen Bedingungen als Antwort auf Infektionen und bei immunologischen Schädigungen produziert. Es beeinflusst die zelluläre Differenzierung, die Zellproliferation und den Zelltod. Abweichungen in der TNF- α - oder TNF- α -Rezeptorsynthese führen zu Störungen des Immunsystems, die immunaktivierend oder immunsuppressiv sein können. Die homöostatische Balance des Immunsystems wird nach Exposition von Antigenen durch die kontrollierte Elimination von expandierenden Zellpopulationen, wie T- und B-Lymphozyten oder APC erreicht. TNF- α vermittelt den immunstimulatorisch bedingten Zelltod, *Activation Induced Cell Death* (AICD) in T-Lymphozyten⁷⁹ sowie die FAS-L induzierte Apoptose in Lymphozyten. Die Effekte von TNF- α werden über zwei verschiedene Oberflächenrezeptoren, TNF-RI und TNF-RII vermittelt. In den Abbildungen fünf und sechs ist eine schematische Darstellung dieser Rezeptoren und der

jeweiligen Liganden dargestellt. TNF-RI und TNF-RII sind Transmembran-Rezeptoren, die extrazellulär reich an Zystein sind⁸⁰. Diese werden aufgrund der unterschiedlichen Struktur in zwei Subklassen unterschieden. Das Vorhandensein einer *Death Domain* (DD) definiert die erste Gruppe, zu der TNF-RI und FAS gezählt werden. Nach Bindung von Liganden werden DD-assoziierte Signalproteine aktiviert, welche als *TNF Receptor Type I-associated Death Domain Protein* TRADD (für TNF-RI) und als *Fas-Associated Protein with Death Domain* FADD (für FAS) bekannt sind. Rezeptoren, die eine DD besitzen sind in der Abbildung vier grau umrahmt.

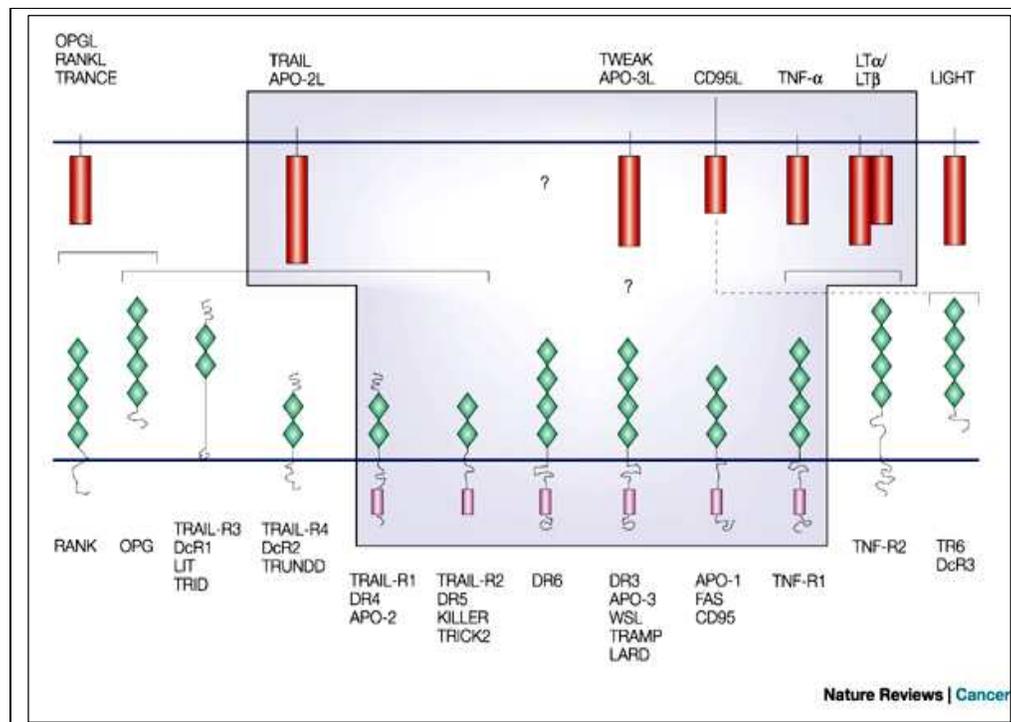


Abbildung 5 Graphische Darstellung von *Death Receptors* (grün) und ihrer Liganden (rot). Rezeptoren, an die eine *Death Domain* (DD) gebunden ist (grau unterlegtes Feld), sind zur Induktion von Apoptose fähig.

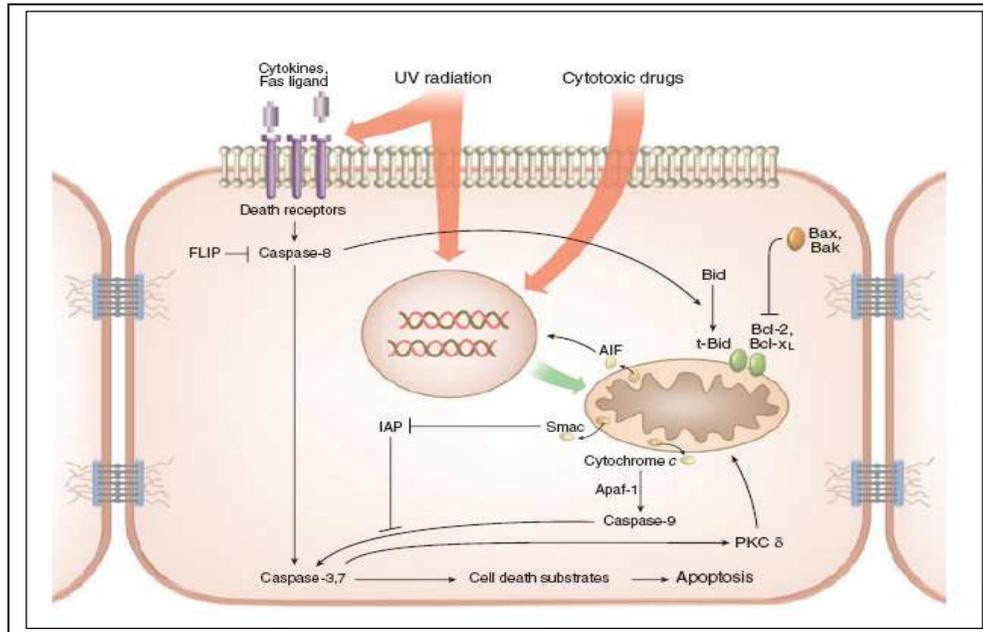


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Induktion von Apoptose in Keratinozyten, die zu einem Verdau intrazellulärer Substrate, zu Kernkondensation und zu Kernfragmentation führt.

Der Komplex aus TNF-RI und Signalproteinen führt zur Rekrutierung und Aktivierung von verschiedenen zellsplattend Enzymen (Kaspasen) und Transkriptionsfaktoren wie *NF-κB* und damit zur Induktion von Apoptose⁸⁰.

Die zweite Gruppe von TNF- α -ähnlichen Rezeptorproteinen, zu der TNF-RII zählt, ist direkt an Bindungsproteine gekoppelt⁸¹. Die Stimulation von TNF-RII induziert die Rekrutierung von Apoptose-inhibierenden Proteinen, *Inhibitor of Apoptosis Protein 1,2* (c-IAP1, c-IAP2). Dieselben Proteine werden auch für den (hauptsächlich proapoptotischen) TNF-RI-Rezeptorsignalkomplex rekrutiert und vermitteln antiapoptotische Effekte⁸². Neben der Hemmung von Apoptose ist TNF-RII an der Aktivierung von proinflammatorisch wirkenden Signalkaskaden beteiligt und führt synergistisch mit TNF-RI zu einer Verstärkung der Apoptose⁸³⁻⁸⁵. Verschiedene Modelle dienen hierbei zur Erklärung der TNF-RII-vermittelten Apoptose^{86,87}.

Homotrimerisches TNF liegt als Zusammensetzung dreier monomerischer Rezeptorketten zu einem Komplex vor, bei dem die zytoplasmatischen Domänen nebeneinander angeordnet sind.

Die TNF-Rezeptorkomplexe werden in Abwesenheit von Liganden auf der Zelloberfläche für den Zusammenbau vorbereitet. Die *in vivo* Aktivität von TNF-RII wurde in transgenen Mäusen nachgewiesen. Die Synthese des Rezeptors verläuft in Maus und Mensch in ähnlich hohen Konzentrationen, führt aber in transgenen Mäusen zu anderen Syndromen. Diese sind durch eine erhöhte *NF- κ B*-Aktivität und durch ein reduziertes B-Lymphozytenkompartiment gekennzeichnet. Der tödlich verlaufende inflammatorische Phänotyp der transgenen TNF-RII-Rezeptormaus entfaltet sich unabhängig vom Nachweis von TNF- α , LT- α oder TNF-RI⁸⁸. In Experimenten mit *Knockout*-Mäusen wird gezeigt, dass beide Rezeptoren an der Induktion von Apoptose und an der nachfolgenden Entfernung von antigenspezifischen T-Lymphozyten beteiligt sind^{79,89,90}.

1.7 Anti-TNF- α -Therapien bei rheumatischen Autoimmunerkrankungen

Bei der Behandlung von rheumatischen Autoimmunerkrankungen werden mehrere Medikamente erfolgreich eingesetzt, die durch die Blockierung des inflammatorischen Botenstoffs TNF eine stark entzündungshemmende Wirkung besitzen. Ein Medikament aus dieser Gruppe ist Etanercept (Enbrel[®]), das ein Fusionsprotein aus dem TNF-RII-Rezeptor mit dem Fc-Teil von IgG1 darstellt. Es kann lösliches TNF- α binden, und somit verhindern, dass das Zytokin an seinen membranständigen Rezeptor andockt. Entzündungsprozesse werden nicht mehr ausgelöst. Zusätzlich bewirkt der Wirkstoff eine Blockierung des TNF-Rezeptors auf der Zelloberfläche. Infliximab (Remicade[®]) als ein weiteres Medikament ist ein *chimärer* Antikörper aus menschlichem und tierischem Protein (Mensch/Maus). Dieser verteilt sich schnell im Gefäßsystem, wo er noch bis zu acht Wochen später nachweisbar ist. Der Antikörper blockiert die TNF- α -gesteuerte Freisetzung von entzündungsauslösenden Zytokinen und führt in vielen Fällen nach zwei Wochen zu einer Reduktion der Entzündungen. Da Infliximab ein *chimäres* Produkt aus menschlichen und murinen Proteinen ist, können Überempfindlichkeitsreaktionen auftreten.

Der erste vollständig humanisierte Antikörper gegen TNF- α , Adalimumab, ist aus dem Genmaterial menschlicher Lymphozyten hergestellt, und weist ein geringeres Potential unerwünschter Nebenreaktionen im Vergleich zu Infliximab auf.

1.7.1 Rheumatoide Arthritis (RA)

Von Etanercept, Infliximab und Adalimumab konnte gezeigt werden, dass sie effizient inflammatorische Prozesse und Gelenkdestruktionen bei der RA unterdrücken können und zu einer Reduktion von Autoantikörpern wie dem Rheumafaktor (RF) oder zitruillinierten Peptid-Autoantikörpern (Anti-CCP-Autoantikörper) führen^{91,92}. Der Einsatz von Adalimumab erweitert die Therapieoptionen der Rheumatoiden Arthritis und wird in großen Studien geprüft⁹³.

1.7.2 Psoriasis-Arthritis (PsA)

Die Therapiestandards der Psoriasis-Arthritis (PsA) sind ähnlich zu denen der RA und schließen nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID), Antirheumatika (DMARD) und Immunsuppressiva ein. TNF- α wird aufgrund seiner regulativen Eigenschaften eine pathogenetische Bedeutung bei der PsA zugeschrieben⁹⁴⁻⁹⁶. Doppelblindstudien zeigen, dass eine sechswöchige Behandlung mit Infliximab zu einer signifikanten Verbesserung von C-reaktivem Protein (CRP), Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) sowie des Krankheitszustandes (Physicians Global Assessment, PGA) führt⁹⁷. Längerfristige Studien liegen hier vor⁹⁸.

1.7.3 Ankylosierende Spondylitis (AS)

Zur Therapie der ankylosierenden Spondylitis (AS) werden NSAID, Sulfosalazin und DMARD verwendet. TNF- α -Serumspiegel korrelierten mit dem Krankheitsindex *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index* (BASDAI)⁹⁹. Der Erfolg einer Therapie mit Adalimumab ist in klinischen Studien belegt¹⁰⁰.

Die längerfristige Anwendung von TNF- α -Blockern ist mit einem erhöhten Risiko für Nebenwirkungen verbunden. Hierzu zählt die Induktion von Autoantikörpern, Lupus-ähnlichen Symptomen und ein eigenes Krankheitsbild, der *Drug-Induced Lupus Erythematosus* (DILE)¹⁰¹. Der genaue Mechanismus, wie Autoantikörper bei einer Anti-TNF- α -Therapie induziert werden, ist unklar. Bedeutsam ist der Einfluss von TNF- α auf die Typ I-FN-Synthese (IFN- α), der durch eine Anti-TNF- α -Therapie unterdrückt wird. Die dadurch gesteigerte Aktivität IFN- α -

abhängiger Gene begünstigt die Entstehung von Autoantikörpern. TNF- α -Blocker sollten deshalb bei Patienten mit SLE zurückhaltend sowie zeitbegrenzt angewendet werden. Eine strenge Indikation vorausgesetzt, hat die Anti-TNF- α -Therapie bei Lupuspatienten mit ausgeprägter Nierenentzündung oder starken Hautmanifestationen positive Effekte gezeigt^{102,103}.

2 Fragestellung

Der systemische Lupus erythematoses stellt den Prototyp einer systemischen Autoimmunerkrankung dar, der durch vielfältige Organmanifestationen und den Nachweis von Autoantikörpern gegen nukleäre Antigene charakterisiert ist. Zu den häufig detektierten Autoantikörpern gehören Anti-Ro/SSA-Antikörper, die sich insbesondere bei SLE-Patienten mit sekundärem Sjögren-Syndrom oder mit photosensitiven Hautmanifestationen nachweisen lassen. Die Assoziation zwischen kutanen Manifestationen und den Anti-Ro/SSA-Autoantikörpern lässt eine Rolle dieser Autoantikörper in der Pathogenese vermuten. In der Epidermis von entzündeter und nicht-entzündeter Haut von SLE-Patienten sind IgG-Ablagerungen einschließlich Autoantikörper gegen Ro/SSA vorhanden ^{104,105}. Hierbei wird angenommen, dass UVB-Exposition sowie proinflammatorische Zytokine wie TNF- α durch Induktion der Oberflächenexpression von Ro/SSA auf Keratinozyten an den Ablagerungen beteiligt sind. Mittels Zell-ELISA ließ sich eine TNF- α -abhängige, erhöhte Membranexpression von Ro/SSA52 auf Keratinozyten zeigen ^{30,106}, durch die teilweise photosensitive Hautmanifestationen bei Lupus erythematoses erklärt werden können, da eine UV-Exposition wiederum die Freisetzung von TNF in Keratinozyten und Mastzellen fördert ¹²⁰. Es ist bislang noch nicht ausreichend beschrieben, wie sich die mRNA- und Proteinexpression des Ro/SSA52-Autoantigens in Keratinozyten in Gegenwart des proinflammatorischen Zytokins TNF- α verhalten.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, eine quantitative PCR zu entwickeln, um die Effekte von TNF- α auf die Transkriptionsrate des Autoantigens Ro/SSA52 in Keratinozyten zu untersuchen und mit den schon vorliegenden Daten zu der Expression von Ro/SSA52 auf Proteinebene zu vergleichen. Weitergehend soll geklärt werden, ob TNF- α seine eigene Freisetzung vermehrt fördert sowie an der Freisetzung von sekundären inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IL-8 beteiligt ist. Die Bestimmung der Transkriptionsrate von Ro/SSA52 wird durch die relative Quantifizierung mittels externer Standards und des Haushaltsgenes GAPDH ermittelt. Die TNF- α -abhängige mRNA-Expression von Ro/SSA52 soll mit der mRNA-Expression eines anderen Autoantigens (Sm-D1) verglichen werden. Desweiteren soll die Rolle der TNF-RI- und RII-Rezeptoren bei der TNF- α -induzierten-Ro/SSA52-mRNA-Expression bestimmt werden. Die Untersuchungen sollen letztlich dazu beitragen, die Rolle des proinflammatorischen Zytokins

TNF- α in der Pathogenese von Anti-Ro/SSA52-assoziierten Hautmanifestationen bei Lupus erythematoses aufzuklären.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Materialien für zellbiologische Arbeiten

Zentrifugationsröhrchen 50ml (Corning Costar, USA)
Zentrifugationsröhrchen 15ml (Corning Costar, USA)
Reaktionsgefäße 0,5ml (Eppendorf, Deutschland)
Reaktionsgefäße 2,0ml (Eppendorf, Deutschland)
Reaktionsgefäße 1,5ml (Eppendorf, Deutschland)
automatische Pipettierhilfen (Hirschmann, Deutschland)
Pipetten (5/10/25ml) (Abimed, Deutschland)
Pipettenspitzen (Fisher Scientific; USA)
Sterilfilter (Millipore, USA)
Zellkulturflaschen 25cm² Corning Costar, USA)
Zellkulturflaschen 75cm² (Corning Costar, USA)
Zellkulturflaschen 125cm² (Corning Costar, USA)
Glaspipetten 5/10/25ml, steril (DRFZ, Berlin)
Biopure Safe- Lock-Tubes (Fisher Scientific, USA)
-1,5ml (DNase -und RNase frei)
-2,0ml (DNase -und RNase frei)

3.1.1.1 Kulturmedien und Zusätze

RPMI 1640-Kulturmedium (DRFZ, Berlin)
Keratinocytenmedium Epilife[®] (Tebu, Deutschland)
-CaCl₂, 60µM

-EDGS (Epilife Defined Growth Supplement) beinhaltet Wachstumsfaktoren, Insulin, Glukocortikoide

Phosphatgepufferte Saline (PBS) (Biochrom, Deutschland)

Fetales Kälberserum FCS (Sigma, Deutschland)

Trypsin/EDTA (Sigma, Deutschland)

Accutase[®] (PAA, Österreich)

Penicillin (GIBCO, Schottland)

Streptomycin (GIBCO, Schottland)

3.1.1.2 Zellen

Es wurden humane transformierte Keratinozyten HaCaT [106] und primäre Keratinozyten von gesunden Personen verwendet.

3.1.1.3 Reagenzien für den Nachweis von Apoptose

Annexin-V-FITC (Becton Dickinson, USA)

Inkubationspuffer (DRFZ, Berlin):

-Hepes-Puffer 1M

-CaCl₂ 1M

-NaCl 5M

Propidiumjodid (PI), 50µg/ml (DRFZ, Berlin)

3.1.2 Materialien für molekularbiologische Arbeiten

3.1.2.1 Reagenzien für die mRNA-Extraktion

Qiaprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen, Deutschland)

Oligotex[®] Direkt mRNA Mini Kit (Qiagen, Deutschland)

Oligotex[®]-Suspension (Qiagen, Deutschland)

RNAse-ZAP (Sigma, Deutschland)

3.1.2.2 Reagenzien für die cDNA-Synthese und PCR-Amplifikation

Erststrang-Puffer:

-Tris-HCl, 250mM (Invitrogen, Niederlande)

-KCl, 375mM (Invitrogen, Niederlande)

-MgCl₂, 15mM (Invitrogen, Niederlande)

Oligonukleotide (Oligo-dt) 500µg/ml (Invitrogen, Niederlande)

First-Strand Synthesis-Kit für die RT-PCR (Invitrogen, Niederlande)

-DTT 0,1M

-dNTP-Mix, 25mM

-Superscript II, 200 Unit/ml

DEPC-H₂O (Diethyldicarbonat) (DRFZ, Berlin)

BioTherm™ 10x-Puffer (Rapidozym, Deutschland)

Forward Primer, 10pM/µl

Reverse Primer, 10pM/µl

BioTherm™ Taq-Polymerase, 500U/ml (Rapidozym, Deutschland)

3.1.2.3 Amplifikationskits für die *Realtime*-PCR

Für die Expressionsanalysen der Zielgene und Haushaltsgene sind Reagenzien von Roche Diagnostics (Deutschland) verwendet worden.

Light Cycler® RNA Amplifikation Kit Hybridisation Probes

Light Cycler® RNA Master Hybridisation Probes

Light Cycler® h-β2MG Housekeeping Gene Set

Light Cycler® hHRPT Housekeeping Gene Set

Light Cycler® hG6PDH Housekeeping Gene Set

3.1.3 Puffer und Lösungen

3.1.3.1 elektrophoretische Trennung von DNA

3.1.3.1.1 TAE-Puffer

TAE-Puffer50x: Tris, 40mM

-EDTA, 1mM

Der pH-Wert wurde mit Eisessig auf 7,8 eingestellt, der Puffer für 30min autoklaviert und anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

3.1.3.1.2 DNA-Ladepuffer

DNA-Längenstandard, Marker VI (Roche Diagnostics, Mannheim)

DNA-Ladepuffer 5x: Tris-Acetat 100mM, pH 7,5

-EDTA, 50mM

-Ficoll (Biochrom, Berlin, Deutschland)

-SDS

-Bromphenolblau (Invitrogen, Heidelberg, Deutschland)

-Xylencyanol (Invitrogen, Heidelberg, Deutschland)

Der DNA-Ladepuffer wurde für 30min autoklaviert und anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

3.1.3.1.3 Ethidiumbromid

Ethidiumbromid (EtBr), 0,7mg/ml

3.1.3.2 Klonierungen

Luria Bertani Medium (LB-Medium)

-Trypton, 1,0g/100ml

-Hefeextrakt, 0,5g/100ml

-NaCl, 0,5g/100ml

Für die LB-Agarplatten wurde hinzugefügt:

-Agar, 1,5g/100ml

Das LB-Medium wurde für 20min autoklaviert und vor der Zugabe von Ampicillin (100µg/ml) auf 50°C gekühlt.

Ampicillin 50mg/ml (Sigma, Deutschland)

3.1.4 Laborgeräte

CASY-Zellzähler (Schärfe-System GmbH)

Durchflusszytometer FACS Calibur (Becton Dickinson, USA)

Zellsortierer FACS LSR (Becton Dickinson, USA)

Heraeus Brutschrank BR 6000 (Heraeus Instruments, Deutschland)

Herasafe Sterilbank (Heraeus Instruments, Deutschland)

Heraeus Biofuge F-161621 (Heraeus Instruments, Deutschland)

Heraeus Megafuge 1.0-Zentrifuge (Heraeus Instruments, Deutschland)

Heraeus Multifuge 3 S-R (Heraeus Instruments, Deutschland)

Light Cycler[®]-Instrument (Roche Diagnostics, Deutschland)

Spektralphotometer UV-12 (Shimadzu, Japan)

Video-Graphic-Printer UP890CE (Intas Science Imaging, Deutschland)

Agarose Gelkammern (Biorad, Deutschland)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultivierung humaner Keratinozyten

Primäre Keratinozyten wurden aus klinisch unauffälliger Epidermis gesunder Personen gewonnen (Bauchdecken- und Mammareduktionen). Die Präparation der Haut und die Herstellung der Kulturen wurden in Kooperation mit Frau Dr. Christa Johnen, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Charité, Universitätsmedizin Berlin, durchgeführt. Die Startkultur stellte die Kultivierung der frisch aus der Epidermis isolierten primären Keratinozyten dar. Nach dem Doppelverdau mit Dispase[®] und Trypsin/ETDA wurden 50.000 Zellen in 75cm²-Zellkulturflaschen pipettiert und mit dem Kulturmedium Epi-Life[®] (sowie EGDS, Penicillin und Streptomycin) bei 37°C und fünf Prozent CO₂-Gehalt im Brutschrank kultiviert. Die Kultivierung von HaCaT-Zellen¹⁰⁷ erfolgte analog zu den Primärzellen in 75cm²-Kulturflaschen mit RPMI-1640-Zellkulturmedium und Zusatz von 10% FCS, Penicillin und Streptomycin.

Vor der Passagierung wurden primäre Keratinozyten mit PBS gewaschen und mit 5ml Accutase[®] (bei HaCaT-Zellen mit 5ml Trypsin/EDTA-Lösung) abgelöst. Die Zugabe einer zehnpromzentigen PSB/FCS-Lösung diente der Inaktivierung der Accutase[®] bzw. Trypsin. Nach dem zentrifugieren wurde das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und in neue Kulturflaschen ausgesät.

3.2.2 Nachweis von Apoptose

Eine frühzeitig messbare Veränderung apoptotischer Zellen ist die Translokation von Phosphatidylserin (PS) von der Innenseite auf die Außenseite der Zellmembran¹⁰⁸. Durch die gleichzeitige Anfärbung der Keratinozyten mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertem Annexin-V und Propidiumjodid (PJ) konnte die Verteilung der Zellen auf frühe und späte Phasen des Zelltodes bestimmt werden. Späte Phasen der Apoptose sind durch Auflösung der Zellmembran in einzelne Bestandteile, durch Fragmentierung des Zellkerns und durch den Abbau intrazellulärer Substrate gekennzeichnet.

3.2.2.1 Quantifizierung der Apoptose durch Annexin-V und Propidiumjodid (PJ)

0,5x10⁵ Keratinozytenzellen wurden in 400µl Annexin-Puffer aufgenommen und mit FITC-markiertem Annexin-V für 10min inkubiert. Die Färbung der Keratinozyten mit PJ erfolgte für 30 Sekunden kurz vor der Analyse am FACS-Calibur-Zytometer.

3.2.2.2 Annexin-V-Zellsortierung

Nach dem Ablösen primärer Keratinozyten von den Kulturgefäßen erfolgten eine Filterung und die Färbung mit Annexin-V, die im vorigen Kapitel beschrieben wurde. Die Analyse und Sortierung wurde mittels Fluozytometer LSR II durchgeführt. Annexin-V-negativ und Annexin-V-positiv gefärbte Zellen wurden gewaschen und für die Extraktion von mRNA in Lyse-Puffer aufgenommen.

3.2.3 RNA-Extraktion aus Zellen

Die mRNA aus Keratinozyten wurde auf direktem Weg in RNase-freier Umgebung gewonnen. Die Geräte, Arbeitsflächen und Plastikmaterialien (Pipettenspitzen) wurden dafür mit RNase-ZAP[®] behandelt.

3.2.3.1 Extraktion von mRNA aus Keratinozyten

Zur Extraktion wurde der Oligotex-mRNA-direkt-Kit (Qiagen) genutzt, die mRNA nach den Angaben des Herstellers aus primären Keratinozyten und HaCaT-Keratinozyten extrahiert. Die Methode beruht auf einer Hybridisierungsreaktion zwischen Poly-A-Tails eukaryotischer mRNA-Moleküle und von Oligomeren einer Festphasenmatrix (Oligotex[®]-Suspension). Nach Extraktion wurde mit einem Spektralphotometer ($\lambda = 260\text{nm}$) die Konzentration der mRNA bestimmt¹⁰⁹, das Probenmaterial bei -30°C tiefgefroren.

3.2.4 Umschreibung (Reverse Transkription, RT) von RNA in cDNA

Die Reaktion erfolgte mit der RNA-abhängigen DNA-Polymerase Reverse Transkriptase, das Reaktionsprodukt ist eine zur eingesetzten RNA-Matrize komplementäre Einzelstrang-DNA (cDNA). Zur Umschreibung zu cDNA wurde die Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (MMLV-RT) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Nach der Synthese der cDNA wurde das RNA-Template zur Vermeidung von Sekundärstrukturen denaturiert.

3.2.4.1 DNA-Gelelektrophorese

Hierzu wurde 1,5%ige Agarose mit TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt, nach dem Abkühlen mit einer 1%igen Lösung von Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Nach 20min regelieren wurde die DNA für 45min bei 75V aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet, als Längenstandard für den Bereich von 154 - 2176 bp diente der DNA-Marker VI (Roche Diagnostics). Die Detektion der DNA erfolgte mittels UV-Durchlichtlampe mit angeschlossener CCD-Kamera.

3.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ¹¹⁰ werden selektiv Abschnitte der DNA exponentiell amplifiziert. Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten:

1. Hitzedenaturierung der Doppelstrang-DNA, dabei wird die DNA in Einzelstränge aufgespalten.
2. Anlagerung von Primern (*Annealing*) an die DNA-Einzelstränge bei einer spezifischen Temperatur.
3. Synthese des komplementären DNA-Doppelstranges (Extension).
4. Finale Denaturierung.

Den Zyklen wird eine Denaturierungsphase von 3min vorangestellt, die die vollständige Denaturierung der Target-DNA (Matrizen-DNA) gewährleistet.

PCR-Bedingungen		Temperatur	Zeit
	Initiale Denaturierung	94°C	3min
1.-3.	35 Zyklen	Denaturierung	94°C
		Annealing	57 - 59°C
		Extension	72°C
4.	Finale Denaturierung	72°C	10min
	Schluss	4°C	Endlos

Tabelle 2 PCR-Protokoll zur Amplifizierung von Ro/SSA52 aus cDNA von HaCaT-Keratinocyten.

3.2.5.1 Primerdesign

Die Herstellung von Primern und die Auswahl der Hybridisationssonden für Ro/SSA52, TNF- α , GAPDH und Sm-D1 wurden von der Firma TIB-MOLBIOL (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Um die Spezifität der Hybridisationssonden zu erhöhen und um eine mögliche Amplifizierung von genomischer DNA zu vermeiden, wurde die Länge von Sonden und Primer größer als die Exon-Intron-Grenze gewählt.

Aus den Herstellerangaben der kommerziellen Amplifikationskits für β 2-MG und G6-P-DH ließen sich die Sequenzen von Primern und Hybridisationssonden nicht ersehen.

Genbezeichnung		Primersequenz
Ro/SSA52 (1099bp)	Sense	5'-AAgCTCCAggTggCATTAg
	Antisense	5'-CAgAgTTCATggggAAAAgA
Ro/SSA52 (598bp)	Sense	5'-gAgTTggCTgAgAAgTTggAAgT
	Antisense	5'-TgTCACATCTACCTCCCAgTAATg
Ro/SSA52 (167bp)	Sense	5'-gCAgCAAAAAAACTTCCTggTTg
	Antisense	5'-gAgCTgTggCACCTTCgATC
Ro/SSA60a (1458bp)	Sense	5'-TCAAgAAggCAgAACCACAAAg
	Antisense	5'-ggAgATTAgCTgggAAgTAgCTg
Ro/SSA60b (1360bp)	Sense	5'-TCAAgAAggCAgAACCACAAAg
	Antisense	5'-ACAgtTCCACCTgCACTCC
GAPDH (960bp)	Forward	5'-ACAgTCAgCCgCATCTTCTTTTg
	Reverse	5'-ACgCCTgCTTACCACCTTCT
GAPDH (292bp)	Forward	5'-gCAgggggggAgCCEAAAag
	Reverse	5'-AggCAgggATgATgTTCTggA
TNF- α (518bp)	Forward	5'-CTCTggCCCAggCAgTC
	Reverse	5'-ggCgTTTgggAAggTTggAT
Sm-D1 (220bp)	Forward	5'-gCTAaggATgAAgCTCgTgAgATTT
	Reverse	5'-CgAATACTCAgCgTTTCCAgC
LC-Sonden für Ro/SSA52	FL	5'-gCCTCTTTCTCCCCCAggATTCTCAgC
	LC red 640	5'-CTCCCTCTCATCCTTCTCCAgCTCCTgC
LC-Sonden für GAPDH	FL	5'-CCCAgAAgACTgTCgATggCCCCTCC
	LC red 705	5'-AAACTgTggCgTgATggCCgCg
LC-Sonden für TNF- α	FL	5'-gCATTggCCCggCggTTC
	LC red 640	5'-CCACTggAgCTgCCCCTCAgCT
LC-Sonden für Sm- D1	FL	5'-CTgACATCCACACCTgTgATTgTTCC
	LC red 640	5'-TggACCTgTgTTCCgTTCTTCAATTCA

Tabelle 3 Auflistung von Primern und Fluoreszenzsonden, die für die konventionelle und *Realtime*-Quantifizierung von Ro/SSA52,-TNF- α ,-Sm-D1-mRNA eingesetzt wurden.

3.2.6 Klonierung und Transformation

Die Klonierung wurde mit dem TOPO™ TA Cloning Kit, Version H, (Invitrogen) mit Zellen vom Stamm TOP 10F⁷ durchgeführt und erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip einer Hybridisierung zwischen den A/T-Überhängen und der nachfolgenden Integration des Inserts über die gebundene Topoisomerase¹¹¹.

In der nachfolgenden Transformation wurden die Plasmide in Bakterienzellen aufgenommen und anschließend über Vektor-kodierte Selektionsmarker auf einem entsprechenden Nährmedium kultiviert. Neben den Antibiotikaresistenzen wird über das lacZ-Gen, das für die β -Galaktosidase kodiert, die sogenannte Blau/Weiß-Selektion ermöglicht. Die Expression dieses Gens wird durch das Laktose-Analogon Isopropyl β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die β -Galaktosidase spaltet 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galaktopyranosid (X-Gal) in den blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlorindigo und in die Zuckerkomponente Allolaktose. Die Integration von Fremd-DNA unterbricht hierbei den Leserahmen des lacZ-Gens und führt zur Inaktivierung der β -Galaktosidase. Dadurch wird die Spaltung von X-Gal verhindert und Klone mit Insert werden nicht angefärbt, Kolonien, die den Ursprungsvektor ohne Insert aufgenommen haben, weisen eine dunkelblaue Färbung auf. Pro Klonierung wurden auf zwei LB Amp⁺-Agarplatten je 40 μ l IPTG (20mg/ml) und X-Gal (20mg/ml) ausplattiert. Die Platten wurden für 45min bei 37C° inkubiert und mit 50 - 150 μ l des Transformationsansatzes überschichtet. Die Inkubation erfolgte für 12 - 16h bei 37C°.

3.2.6.1 Flüssigkulturen

Durch den Ansatz von Flüssigkulturen wurden ausreichende Mengen an amplifizierter DNA hergestellt. Einzelne Klone wurden mit autoklavierten Pipettenspitzen von den Agar-Platten abgenommen und in LB-Medium überführt. Die Inkubation der Kulturen erfolgte für 12 - 16h und 220 rpm in einem Schüttel-Inkubator.

3.2.6.2 Isolierung und Charakterisierung von Plasmiden

Die Isolation der Plasmide erfolgte mit dem Qiaprep[®] Miniprep-Kit nach Herstellerangaben. Durch alkalische Lyse und über den Zusatz von RNase A wurden die Bakterienzellen geöffnet.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand auf eine Anionenaustauscher-Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Die Säule wurde mit ethanolhaltigem Puffer gewaschen und in sterilem Wasser 1min inkubiert. Nach Zentrifugation konnte die Plasmid-DNA eluiert werden. Durch Fällung ließ sich die Plasmid-DNA in einem 1%igen Agarosegel (Spannung 90mV) auftrennen. Rezirkularisierte TA-Kloning-Vektoren wurden auf Grund ihres höheren Molekulargewichts von Plasmiden mit größeren Insert unterschieden.

3.2.6.3 *Colony-PCR* (CPCR) zur Charakterisierung von Inserts

Integrierte Genabschnitte werden die *Colony-PCR* (CPCR) von möglichen Klonierungsartefakten unterschieden. Ausgangsmaterial der CPCR sind Bakterienzellen oder angesetzte Flüssigkulturen. Nach Aufnahme von 20µl der Flüssigkultur in steriles H₂O erfolgte die PCR-Amplifizierung mit denselben Primern, die für die Ausgangs-PCR verwendet wurden. Die PCR mit gereinigter DNA ist durch eine verlängerte initiale Denaturierungsphase sowie durch eine Reduktion von Zyklus-Zahl und Extensionszeit gekennzeichnet. Endprodukte der CPCR wurden anschließend auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt.

<i>Colony-PCR</i> (CPCR)	
Reagenzien	Volumen pro Ansatz
H ₂ O	20,75µl
BioTherm® 10x-Puffer	2,5µl
dNTP 2,5mM	0,2µl
Forward Primer (10pM/ml)	0,25µl
Reverse Primer (10pM/ml)	0,25µl
BioTherm® Taq-Polymerase	1µl

Tabelle 4 PCR-Protokoll der *Colony-PCR* (CPCR)

PCR-Bedingungen		Temperatur	Zeit
	Initiale Denaturierung	94°C	5min
1.-3.	30 Zyklen	Denaturierung	94°C
		<i>Annealing</i>	57 - 59°C
		Extension	72°C
4.	Finale Denaturierung	72°C	10min
	Schluss	4°C	endlos

Tabelle 5 PCR-Bedingungen der *Colony-PCR* (CPCR).

3.2.7 Durchführung der quantitativen PCR mit dem Light Cycler[®]-Instrument

Die Quantifizierung wurde mit dem Light Cycler[®] (Roche Diagnostics) durchgeführt. Das Probenmaterial wurde dafür in Kapillaren auf einem Probenkarussell umgefüllt und deren Position automatisch über dem Fluorimeter optimiert. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden in den Spitzen der Kapillaren durch eine LED angeregt. Eine Kombination von Spiegeln und wellenlängenspezifischen Filtern leitete die emittierte Fluoreszenzstrahlung zu Photohybriden (530nm, 640nm, 710nm), welche die Signale digital weiterverarbeiten.

3.2.7.1 Messprinzipien

Das Messprinzip beruht auf einem Energietransfer, *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET), zwischen zwei fluoreszenzmarkierten Molekülen (Hybridisationsproben). Nach Bindung der Hybridisationsproben an DNA wird Energie in Form von Licht von der ersten *Donor*-Hybridisationsprobe auf die zweite *Akzeptor*-Hybridisationsprobe übertragen. Da die Messung des Signals einmal pro Zyklus nach der *Annealing*-Phase erfolgt, ist emittierte Fluoreszenzintensität direkt proportional der Menge an DNA.

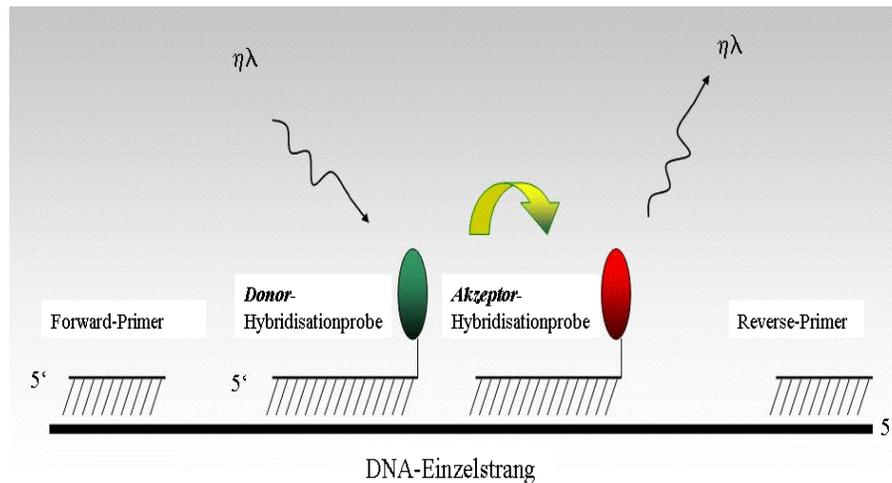


Abbildung 7 Das Messprinzip der quantitativen PCR mit dem Light Cycler[®] beruht auf einem Energietransfer *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) zwischen zwei Fluoreszenzmolekülen, einer *Donor*-Hybridisationsprobe und der *Akzeptor*-Hybridisationsprobe, deren emittiertes Licht proportional der Menge von DNA ist.

3.2.7.2 Quantitative Einschritt-PCR (*Realtime-RT-PCR*)

Bei Durchführung der quantitativen Einschritt-PCR (siehe Abbildung 8) wird als erster Schritt die cDNA-Synthese durchgeführt, an die sich ohne zeitliche Unterbrechung die PCR-Amplifizierung anschließt. Dieser Vorgang wird durch die bereits im Reaktionsgemisch vorliegenden RNA- und DNA-Polymerasen möglich.

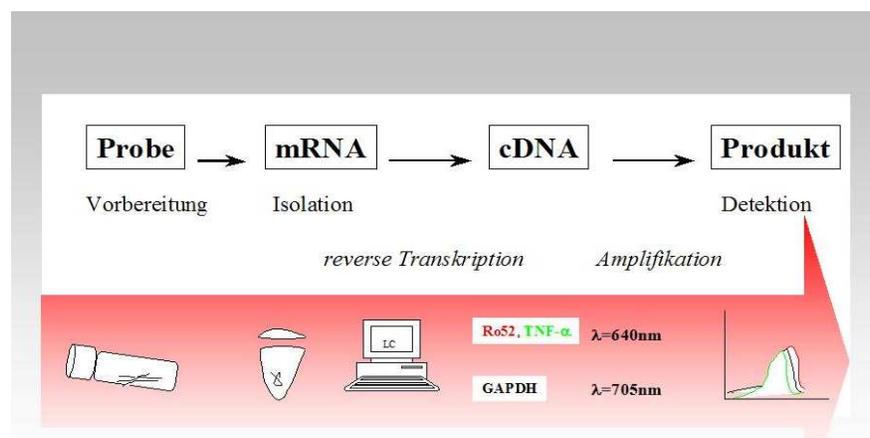


Abbildung 8 schematischer Ablauf einer quantitativen Einschritt-PCR zur Bestimmung

In Gegensatz zur konventionellen PCR sind bei der quantitativen PCR Fluoreszenzkurven über der Zeit die maßgebenden Größen. Das PCR-Profil wird, siehe Abbildung 9, in eine *Background*-Phase ohne signifikante Aktivität, in eine Wachstumsphase (Logarithmus-Phase) mit exponentiellem Anwachsen von PCR-Produkt und eine *Plateau*-Phase, die das Ende der PCR-Reaktion darstellt, unterschieden. Jede Kurve stellt eine PCR-Reaktion dar und wird mit einer Software vom ersten Zyklus bis zum letzten Zyklus überwacht und analysiert. Das Auftreten von falsch positiven Signalen (z.B. die Koamplifizierung von genomischer DNA mit cDNA) wird durch Verwendung von Intron-Exon-überspannenden Hybridisationssonden verhindert ¹¹².

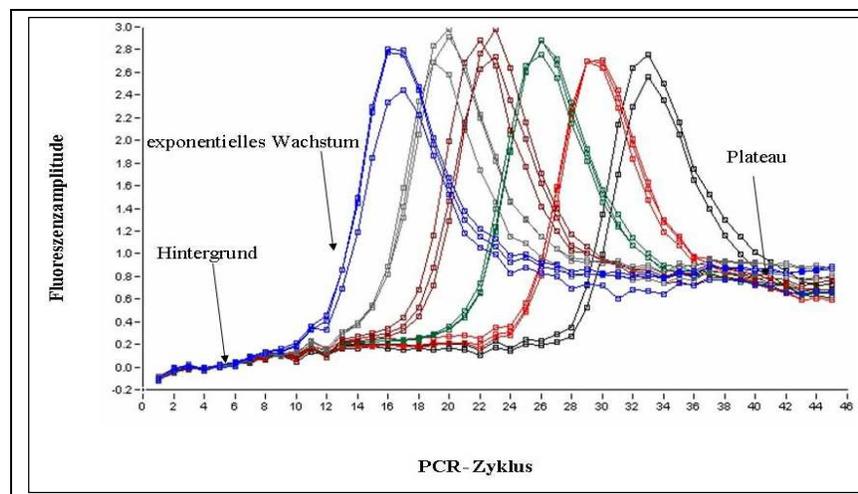


Abbildung 9 Der Verlauf einer quantitativen PCR bei Verwendung von Hybridisationssonden ist über 45 PCR-Zyklen dargestellt. Das PCR-Profil ist durch eine *Background*-Phase, eine exponentielle Wachstumsphase und durch eine *Plateau*-Phase gekennzeichnet.

3.2.7.3 Relative Quantifizierung über externe Standards

Die Verwendung eines Referenzsystems war auf Grund von Abweichungen in der Umschreibung zu cDNA sowie auf Grund der komplexen PCR-Reaktion notwendig. Als Referenzsystem wurden DNA-Plasmide mit bekannter Konzentration verdünnt und separat zu den Proben mit unbekannter Konzentration amplifiziert. Nach Abschluss der PCR-Reaktion ließ sich aus den Verdünnungen der DNA-Plasmide eine Eichgerade erstellen, aus der die Konzentration bzw. die Molekülzahl von Ro/SSA52, GAPDH und Sm-D1 angegeben wurde. Die Bezugspunkte, bei denen die Konzentration der Probe gegen die der Referenzplasmide ermittelt werden, heißen *crossing Points* (CP) (LC- Notes 12/2000).

Die Abbildung 10 stellt schematisch die Quantifizierung über ein externes Referenzsystem dar. Die Abbildung 11 zeigt Fluoreszenzkurven anhand der Verdünnungsreihe eines Ro/SSA52-Plasmids und die zugehörige Eichgerade.

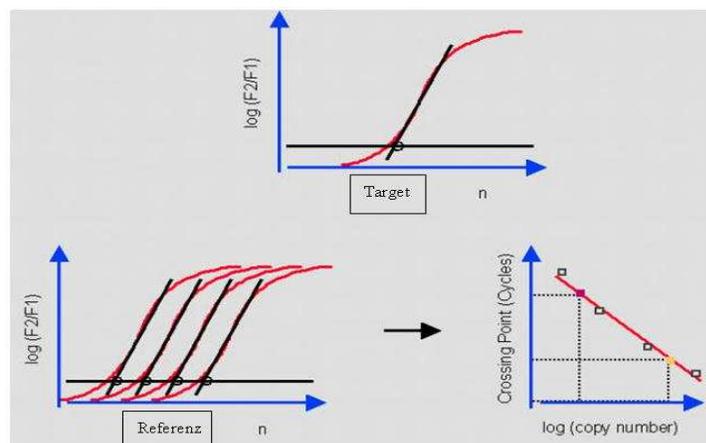


Abbildung 10 Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgt durch die Verwendung eines Referenzsystems.

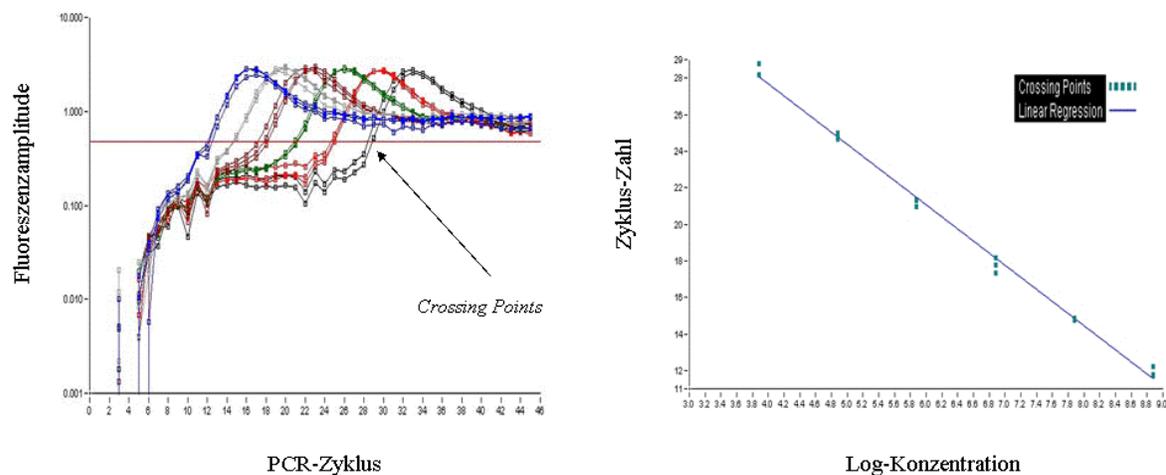


Abbildung 11 Die Festlegung von Bezugspunkten, *crossing Points*, in der exponentiellen Wachstumsphase der quantitativen PCR (Darstellung links) ermöglicht die Erstellung einer linearen Regressionsgerade (Darstellung rechts).

Für jede Verdünnung von Ro/SSA52-Plasmid-DNA lässt sich die Anzahl von Molekülen angeben (Tabelle 6).

<i>crossing Point</i> (cP)	28,48	24,83	21,21	17,76	14,79	11,89
Moleküle Ro/SSA52-Plasmid- DNA	5,86E+03	7,33E+04	9,11E+05	1,03E+07	7,86E+07	5,96E+08

Tabelle 6 Angabe der Molekülzahlen für jede Verdünnungsstufe von Ro/SSA52-Plasmid-DNA.

3.2.8 Zytokin-ELISA

Zum Nachweis von Zytokinen aus Überständen der Keratinozytenkulturen wurde ein Zytokin-ELISA (Biermann, Deutschland) genutzt, mit dem sich neben der TNF- α -Proteinkonzentration die Konzentrationen von IL-6, IL-8, IL-10 und IL-1 β messen ließen. Von unbehandelten wie auch von behandelten Zellkulturen wurden für die Charakterisierung 2ml Kulturüberstand abgenommen.

3.2.8.1 Nachweis von TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β und IL-10

Zum Nachweis von TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β und IL-10 wurden zytokinspezifische, Antikörperbeschichtete Kunststoffkugeln verwendet. Enzym-markierte Reagenzien und ein chemilumineszierendes Enzymsubstrat ermöglichen die optische Messung. Die Kugeln befinden sich in einem Teströhrchen, welches als Reaktionsgefäß für die Signalentwicklung dient. Die Menge des gebundenen Enzyms wird mit Hilfe eines Substrates, dem Adamantylidioetanphenylphosphat (ADPP²⁻), bestimmt. Der Zerfall instabiler ADP-Anionen führt zu einer Lichtemission, die über optische Systeme zu Photohybriden weitergeleitet wird. Über die entsprechende Software lässt sich die Proteinkonzentration in pg/ml angeben.

4 Ergebnisse

4.1 Grundlage der Analyse

Die Analyse der differentiellen Genexpression von Ro/SSA52A wurde auf der Grundlage der Kultivierung der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT¹⁰⁷ durchgeführt. HaCaT-Keratinozyten wachsen adhärent, konfluent (siehe Abbildung 12), weisen eine hohe Proliferationsrate auf und sind einfach zu kultivieren. Durch Anwendung von RPMI-1640-Kulturmedium (zusätzlich Antibiose mit Penicillin/Streptomycin) ließ sich innerhalb von zwei bis drei Tagen ein vollständig konfluentes Wachstum erreichen. Der Zellrasen ist in Abbildung 12A und 12B 200-fach vergrößert zu sehen.

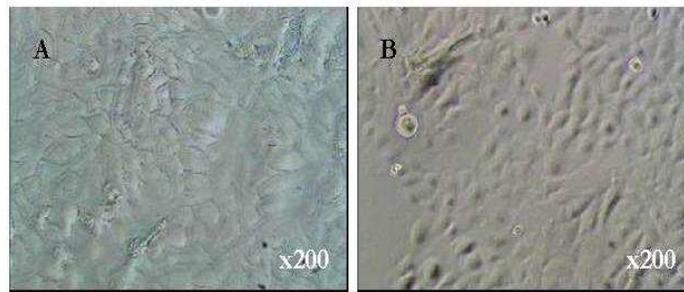


Abbildung 12 Zwei Beispiele für den charakteristischen Zellrasen von HaCaT-Keratinozyten bei 200-facher Vergrößerung.

4.2 Ro/SSA52-mRNA-Expressionsanalyse in HaCaT-Keratinozyten mittels konventioneller PCR

4.2.1 Untersuchungen der konstitutiven Expression von Ro/SSA52

Verschiedene Varianten, wie stark Ro/SSA52 in HaCaT-Zellen exprimiert ist, waren nach Durchführung der PCR sichtbar. Wie Abbildung 13 zeigt, wird für Ro/SSA52 ein Fragment der Länge von 1099bp amplifiziert. Als Vergleich wird von Ro/SSA60 ein Fragment der Länge von 1485bp mitgeführt, für GAPDH wird ein 960bp-großes Fragment vervielfältigt. Um erste Hinweise über eine mögliche Detektionsgrenze der PCR zu erhalten, wurden Doppelbestimmungen mit 10ng und 20ng cDNA durchgeführt.

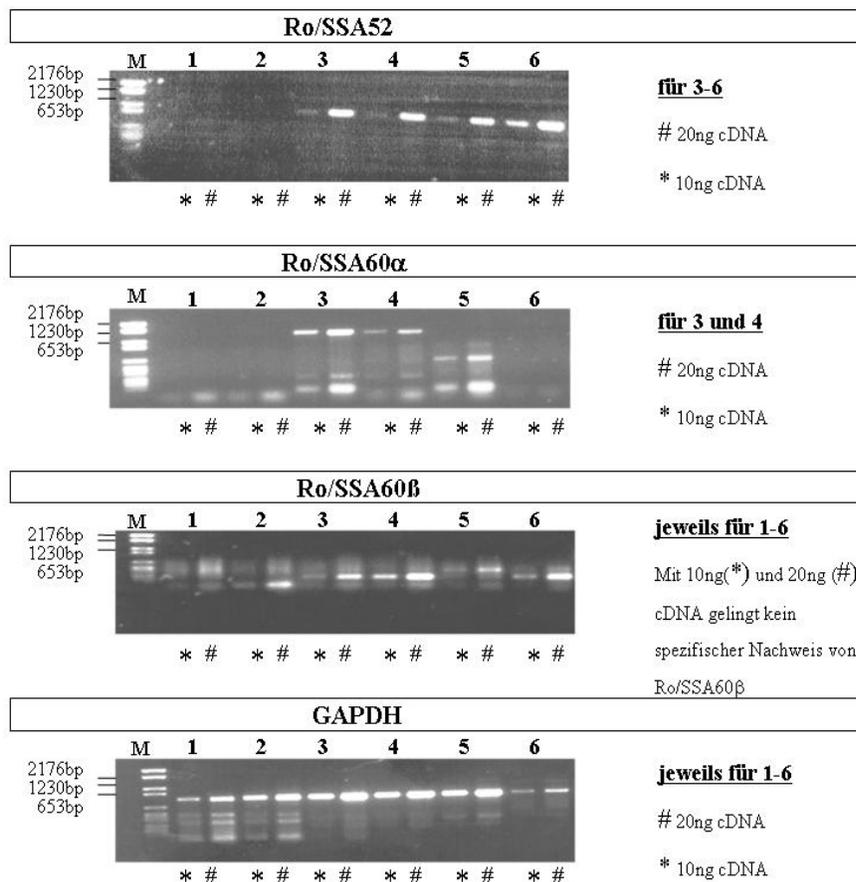


Abbildung 13 Doppelbestimmungen der mRNA-Expression von GAPDH, Ro/SSA52, Ro/SSA60α, Ro/SSA60β in HaCaT-Keratinocyten. In vier von sechs Proben ließ sich Ro/SSA52-mRNA nachweisen, Ro/SSA60α war in 2 Proben nachweisbar, Ro/SSA60β wurde nicht detektiert.

Die Auswertung von sechs Proben aus der HaCaT-Zelllinie bringt den Nachweis von Ro/SSA52-mRNA (in vier von sechs Proben) und Ro/SSA60-mRNA (in zwei von sechs Proben). Es wird deutlich, dass Ro/SSA52 und Ro/SSA60 unterschiedlich stark vorhanden sind. Ro/SSA52 ist in den positiv detektierten Proben konstant exprimiert und weist keine weiteren Nebenprodukte auf. Bei Ro/SSA60 zeigen sich neben dem spezifischen Produkt von 1485bp mehrere Nebenprodukte der Länge von 150bp, 300bp und 650bp, die in wesentlichen Abbauprodukte und Artefakte darstellen. Die Schwankungsbreite im Nachweis der RoSSA60- Expression ist deutlich stärker ausgeprägt. Der Nachweis der Zielmoleküle gestaltet sich bei so geringen Mengen wie 20ng cDNA schwierig. Die verschiedenen cDNA-Präparationen zeigen, dass die initiale PCR für eine

Quantifizierung von Ro/SSA52-mRNA nicht empfindlich genug ist. Nach Halbierung der Eingangskonzentration sind nur noch sehr schwache Banden von Ro/SSA52 nachweisbar oder der Nachweis gelingt nicht mehr. Für weitere, mit dem Light Cycler[®] durchgeführten PCR-Experimente wurden die PCR-Bedingungen und das PCR-Profil auf Grundlage dieser Ergebnisse verbessert.

4.2.2 Untersuchungen der TNF α -induzierten Expression von Ro/SSA52

Die Festlegung der Konzentration von 4ng/ml TNF- α für die in vitro Stimulation erfolgte anhand von Publikationen über die Konzentrationen verschiedener Zytokine im Serum von SLE-Patienten¹¹³. Stimuliert wurde nach 1h, 2h, 4h, 8h und 24h.

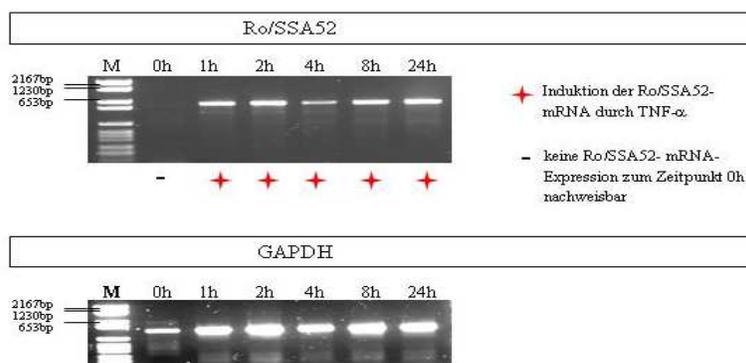


Abbildung 14 TNF- α induziert die Ro/SSA52-mRNA-Expression nach 1h, 2h, 8h und 24h. Der Anstieg nach 1h fällt innerhalb der Messreihe deutlich auf.

Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, induziert TNF- α die Ro/SSA52-mRNA-Expression nach 1h, 2h, 4h, 8h und 24h. Zum Zeitpunkt von 0h lässt sich Ro/SSA52-mRNA nicht detektieren, weshalb der Unterschied zwischen diesem Zeitpunkt und allen Stimulationszeitpunkten innerhalb der gesamten Stimulationsreihe am deutlichsten auffällt. Die Ro/SSA52-mRNA-Expressionserhöhung nach 1h und nach 2h TNF- α -Behandlung entspricht optisch dem Expressionsniveau nach 8h und 24h. Nach 4h ist eine leichte Verringerung des Expressionsniveaus Ro/SSA52 nachweisbar, die aber nicht eindeutig bewertet werden kann, da

zu diesem Zeitpunkt Schwankungen im Expressionsniveau von GAPDH vorhanden sind. Die Unterschiede in der Ro/SSA52-mRNA-Expression innerhalb von 1h bis 24h sind nicht sehr deutlich ausgeprägt. Es ist deshalb nicht abzuschätzen, um welchen Faktor die Expression variiert. Mit der herkömmlichen PCR ist die Detektionsgrenze von Ro/SSA52 bereits erreicht, da zum Zeitpunkt null Stunden keine Expression nachweisbar ist.

4.3 Etablierung der quantitativen *Realtime*-PCR (qPCR)

Die Voruntersuchungen für die Etablierung der qPCR wurden an primären Keratinozyten von gesunden Personen durchgeführt. Wie aus Abbildung 15 ersichtlich, handelt es sich ebenso wie HaCaT-Keratinozyten um adhärent, konfluent wachsende Zellen.

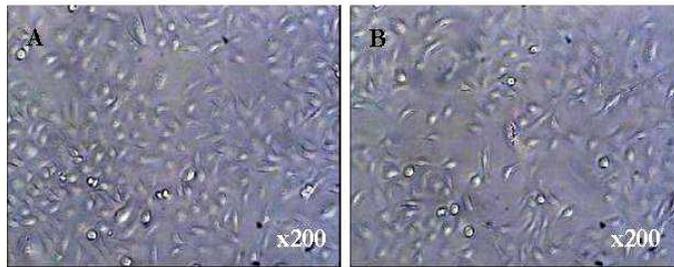


Abbildung 15 Zwei Beispiele für den charakteristischen Zellrasen von primäre Keratinozyten bei 200-facher Vergrößerung.

4.3.1 Plasmid-DNA wird als Referenzsystem für der qPCR verwendet

Ausgangspunkt der Herstellung von Plasmiden war cDNA von primären Keratinozyten, die nach der PCR-Amplifizierung in einen Vektor ligiert wurde. In der folgenden Transformation wurden Plasmide in *E.coli*-Bakterienzellen importiert und deren Stoffwechsel in einem Nährmedium aktiviert. Die Unterscheidung der Kolonien in Bezug auf einen Einbau von DNA in das Plasmid erfolgte durch den Umsatz eines blauen Farbstoffes (Blau/Weiß-Selektion). Nach Aufnahme weißer Kolonien (*picken* der Klone) wurden diese durch die *Colony-PCR* (CPCR) auf eingebaute Plasmid-DNA von Ro/SSA52, GAPDH, TNF- α und Sm-D1 untersucht. Die Abbildung 16A

zeigt anhand der spezifischen Bande, dass die eingeklonen Fragmente die richtige Größe aufweisen. Diese beträgt für Ro/SSA52 598bp, für GAPDH 292bp, für TNF- α 518bp und für Sm-D1 220bp.

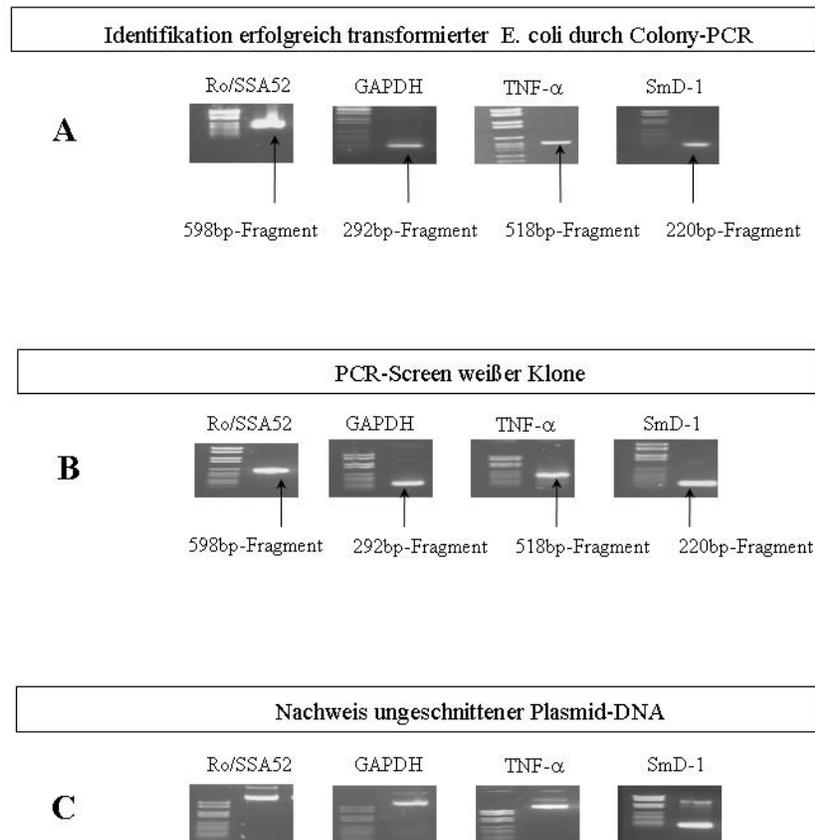


Abbildung 16 Aus erfolgreich transformierten E.coli-Bakterien wurde durch die *Colony-PCR* der korrekte Einbau von DNA von Ro/SSA52, GAPDH, TNF- α und Sm-D1 in den Klonierungsvektor bestätigt (A). Der PCR-Screen positiver Klone (B) beweist die korrekte Größe der eingeklonen Fragmente (B). Plasmid-DNA ist durch die elektrophoretische Auftrennung sichtbar (C).

Das in Abbildung 16B gezeigte PCR-Screening erfolgt zur nochmaligen Kontrolle der Größe der Fragmente und bestätigt den erfolgreichen Einbaus von DNA in den Ligationsvektor (Abbildung 16B). Die Plasmid-DNA wurde in der Gelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 16C). Es sind Nebenbanden sichtbar, die auf eine unterschiedliche Konformation der Moleküle hinweisen und die für Plasmid-DNA nicht ungewöhnlich ist. Die Herstellung von DNA-Plasmiden dient der

späteren Mitführung in der qPCR, wodurch die Angabe von Molekülzahlen pro Zelle möglich wird.

4.3.2 Expressionsprofile von Haushaltsgenen nach TNF- α -Stimulation

Die Messung der mRNA-Expression von GAPDH, G-6-PDH und β 2-MG erfolgte in primären Keratinozyten zu verschiedenen Stimulationszeitpunkten. Abbildung 17 zeigt die Angabe von Molekülzahlen der Haushaltsgene. Diese Art der Auswertung wird als absolute Quantifizierung bezeichnet. Die Expression bezieht sich bei allen Stimulationszeitpunkten auf eine einheitliche Konzentration.

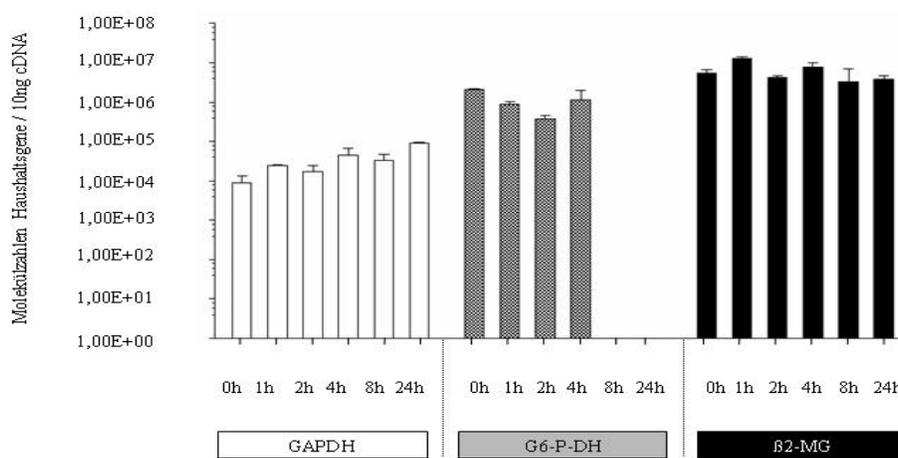


Abbildung 17 Expressionsprofile von 3 ausgewählten Haushaltsgenen in TNF- α -stimulierten primären Keratinozyten. GAPDH und β 2-MG werden konstant über 24h exprimiert, G6-P-DH ist nach 8h nicht mehr nachweisbar. Die Darstellung erfolgt über Molekülzahlen. Die Experimente wurden in dreifachen Ansätzen bei drei verschiedenen Spendern durchgeführt.

Bei den getesteten Haushaltsgenen bestehen über 24h Unterschiede in der Stärke und Kontinuität der Expression. GAPDH weist das niedrigste Expressionsniveau, β 2-MG das höchste Expressionsniveau auf. Nach Stimulation werden nur GAPDH und β 2-MG über alle fünf Stimulationszeitpunkte nachgewiesen, G-6-P-DH ist nach 8h nicht mehr nachweisbar. Die Expression aller drei Haushaltsgene schwankt innerhalb der Stimulationsperiode, wobei die geringsten Schwankungen bei β 2-MG auftreten. Abweichungen zwischen dem fünf-und

zehnfachen Wert der Kontrolle sind bei G-6-P-DH und GAPDH nachweisbar (siehe Tabellen 7-9).

		0h	1h TNF- α	2h TNF- α	4h TNF- α	8h TNF- α	24h TNF- α
GAPDH	Molekülzahlen	9,01E+03	2,50E+04	1,69E+04	4,50E+04	3,30E+04	8,91E+04
	Abweichung zu 0h (x-vielfach)	-	2,8	1,9	5	3,7	10

Tabelle 7 Die mRNA-Expression von GAPDH wird durch Molekülzahlen dargestellt. Es treten Schwankungen über 24h auf, die zwischen vom 1,9-fachen bis zum 10-fachen der Kontrolle (0h-Wert) variieren.

		0h	1h TNF- α	2h TNF- α	4h TNF- α	8h TNF- α	24h TNF- α
G6-P-DH	Molekülzahlen	2,06E+06	8,94E+05	3,84E+05	1,15E+06	n.n.	n.n.
	Abweichung zu 0h (x-vielfach)	-	2,3	5,4	1,8	-	-

Tabelle 8 Die mRNA-Expression von G6-P-DH wird durch Molekülzahlen dargestellt. Nach 8h ist die mRNA vom G6-P-DH nicht mehr nachweisbar. Die größte Abweichung variiert um Faktor 5,4.

		0h	1h TNF- α	2h TNF- α	4h TNF- α	8h TNF- α	24h TNF- α
β2-MG	Molekülzahlen	5,43E+06	1,27E+07	4,35E+06	7,92E+06	3,38E+06	3,81E+06
	Abweichung zu 0h (x-vielfach)	-	2,4	1,3	1,5	1,6	1,4

Tabelle 9 Die mRNA-Expression von β 2-MG wird durch Molekülzahlen dargestellt. Innerhalb 24h weist β 2-MG die geringsten Schwankungen im Vergleich zur Kontrolle auf.

4.3.3 Durchführung einer Multiplex-qPCR mit dem Light Cycler®

Durch die Multiplex-PCR können mindestens zwei oder mehr DNA-Abschnitte gleichzeitig analysiert werden. Die Multiplex-Amplifizierung von Ro/SSA52 mit GAPDH wird mit der Einzel-Amplifizierung beider Gene verglichen, um die günstigsten Bedingungen für die Quantifizierung von Ro/SSA52-mRNA zu bestimmen. Der Einfluss von unterschiedlich großen DNA-Fragmenten auf die PCR-Bedingungen wird über 167bp und 598bp große Ro/SSA52-Fragmente und ein 292bp großes Fragment von GAPDH untersucht. Die qPCR wird über CP definiert.

4.3.3.1 Die Multiplex- Amplifizierung von Genfragmenten kleinerer Größe läuft stabil ab

Die Abbildung 18 zeigt die qPCR-Reaktion bei Amplifizierung ähnlich großer PCR-Fragmente (167bp Ro/SSA52, 292bp GAPDH). Die Abweichungen in den CP werden durch die Gleichung $2^{\Delta C_p}$ erfasst. Die Zahl 2 bezieht sich dabei auf die maximal erreichbare Amplifikationseffizienz.

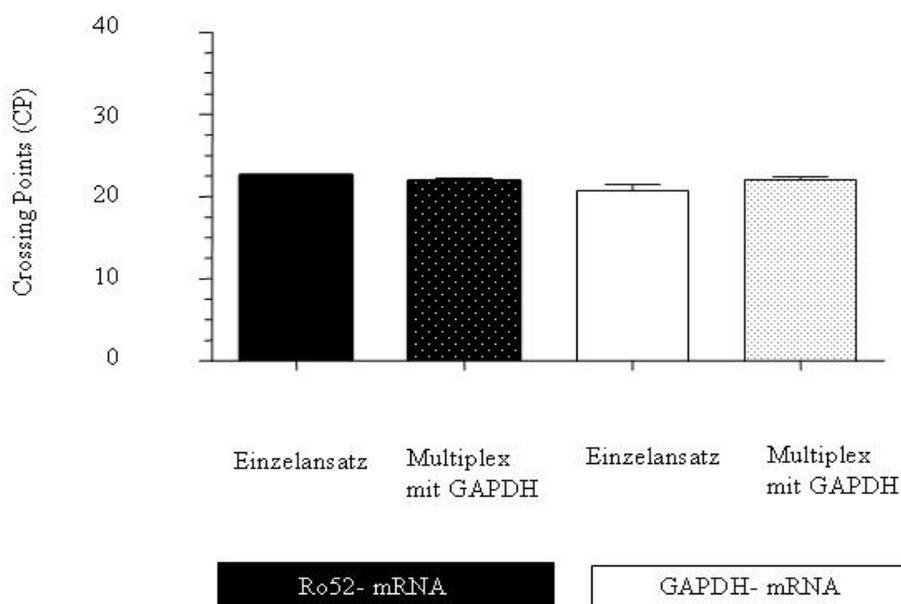


Abbildung 18 Bei Verwendung eines 167bp großen Fragmentes von Ro/SSA52 (schwarz dargestellt) in einer Einzel-PCR und in der Multiplex-PCR mit GAPDH (292bp, weiß dargestellt) wird eine stabile

Amplifizierung in allen Ansätzen erreicht. Dargestellt sind drei Experimente mittels dreifachen Messungen (Mittelwert \pm SEM).

Es wird deutlich, dass die CP in allen Ansätzen ähnliche Werte aufweisen. Die maximal auftretenden Abweichungen liegen unterhalb des Faktors 2,7 (siehe Tab 10).

	Amplifikation Ro/SSA52 (167bp-Fragment)		Amplifikation GAPDH (292bp-Fragment)	
	Einzelansatz	Multiplex-Ansatz	Einzelansatz	Multiplex-Ansatz
<i>crossing Points CP</i>	22,61	21,91	20,76	22,06
Faktor-Vielfaches ($2^{\Delta C_p}$)	1,97		2,62	

Tabelle 10 Nach Amplifikation zweier ähnlich großer PCR-Fragmente von Ro/SSA52 und GAPDH lassen sich in der qPCR Unterschiede um den Faktor 2,62 nachweisen.

4.3.3.2 Die Multiplex-Amplifizierung von größeren Genfragmenten läuft verzögert ab

In einem vergleichenden Versuchsansatz beträgt die Größe des Fragmentes für Ro/SSA52 598bp, die von GAPDH 292bp. In Abbildung 19 ist die Amplifizierung dieser PCR-Fragmente dargestellt.

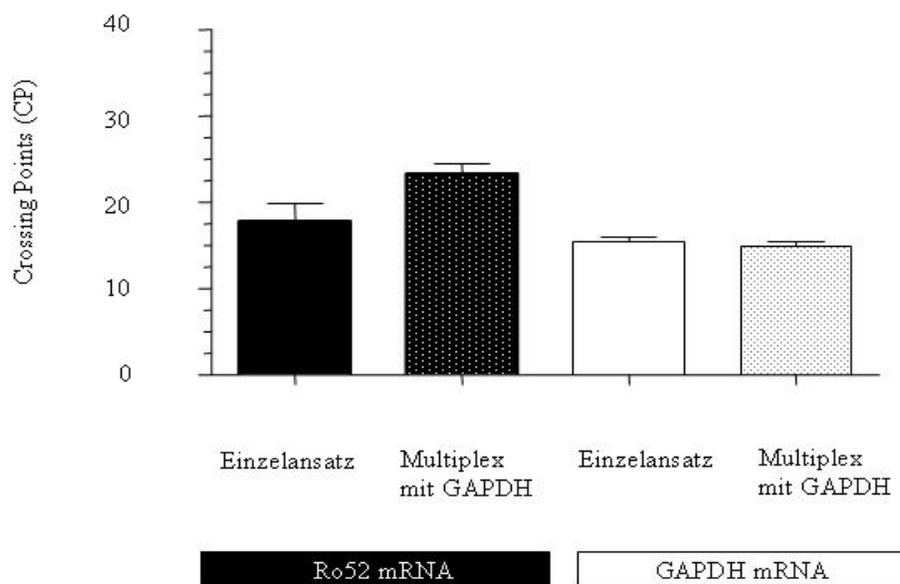


Abbildung 19 Bei Verwendung eines 598bp großen Fragmentes von Ro/SSA52 (schwarz dargestellt) in einer Einzel-PCR und in der Multiplex-PCR mit GAPDH (292bp, weiß dargestellt) treten größere Unterschiede in der Amplifizierung auf. Dargestellt sind drei Experimente mittels dreifach Messungen (Mittelwert±SEM).

Für Ro/SSA52 (schwarze Balken) besteht ein Unterschied in den CP-Werten beider Reaktionen, der Faktor 45 beträgt. Die Amplifikation des Ro/SSA52-Fragmentes erfolgt damit in der Multiplex-PCR 45-fach langsamer als im Vergleich zur Einzel-Amplifizierung, es wird wesentlich weniger PCR-Produkt erzeugt. Die Amplifikation von GAPDH verläuft dagegen ausgeglichen (siehe Tabelle11).

	Amplifikation Ro/SSA52 (598bp-Fragment)		Amplifikation GAPDH (292bp-Fragment)	
	Einzelansatz	Multiplex-Ansatz	Einzelansatz	Multiplex-Ansatz
crossing Points CP	17,81	23,31	15,51	14,99
Faktor-Vielfaches ($2^{\Delta Cp}$)	45,25		1,43	

Tabelle 11 Die Auswertung der Multiplex-PCR nach Amplifikation von zwei verschiedenen großen PCR-Fragmenten (598bp Ro/SSA, 292bp GAPDH) zeigt eine einseitig zu Lasten von Ro/SSA52 ablaufende PCR-

Reaktion, bei der 45-fache Unterschiede auftreten. Die Amplifikation von GAPDH verläuft in allen Ansätzen stabil. Dargestellt sind 3 Experimente über dreifache Messungen (Mittelwert).

4.3.3.3 Zusammenfassung der *Realtime*-PCR-Evaluierung

Die Amplifizierung eines doppelt so großen Fragmentes von Ro/SSA52 (598bp) wie des Haushaltsgens GAPDH führt dazu, dass von Ro/SSA52 45-fach weniger PCR-Produkt vorhanden ist als von GAPDH. Die Vervielfältigung des Ro/SSA52-Fragmentes wird durch kompetitive PCR-Bedingungen negativ beeinflusst. Kompetitive PCR-Bedingungen schließen die Konkurrenz um Primer, Nukleotide und um Polymerasen. Im Ergebnis sinkt die Effizienz der Reaktion, da unspezifische Nebenreaktionen steigen.

Die Amplifizierung zweier gleich kleiner Fragmente (<300bp jeweils für Ro/SSA52 und GAPDH) läuft ausgeglichener ab, als die von unterschiedlich großen Fragmenten. Die Auswertung über CP zeigt eine stabile Amplifikation über der Zeit. Die Ergebnisse legen nahe, dass PCR-Primer, die kleine DNA-Fragmente amplifizieren, für weitere Experimente in einer Multiplex-PCR verwendbar sind. Die Multiplex-PCR kann hierbei an Zellen der Keratinozytenzelllinie HaCaT und primären Keratinozyten eingesetzt werden.

4.3.4 Molekülzahlen von Ro/SSA52 in Keratinozyten

4.3.4.1 Molekülzahlen nach Amplifizierung von Ro/SSA52-cDNA

Nach Amplifikation von 20ng cDNA sind Molekülzahlen von Ro/SSA52 (167bp) und GAPDH (292bp) im Multiplex-PCR-Ansatz in Abbildung 20 ersichtlich. Von Ro/SSA52-mRNA (schwarze Balken) wurden $3,2 \times 10^5$ Moleküle detektiert, im Einzelansatz wurden $2,6 \times 10^5$ Moleküle gemessen. Als Kontrolle wurden die Molekülzahlen von GAPDH (weiß dargestellt) mitbestimmt. Diese zeigt, dass das Molekülniveau von GAPDH um zwei Zehnerpotenzen stärker ausgeprägt ist als das von Ro/SSA52.

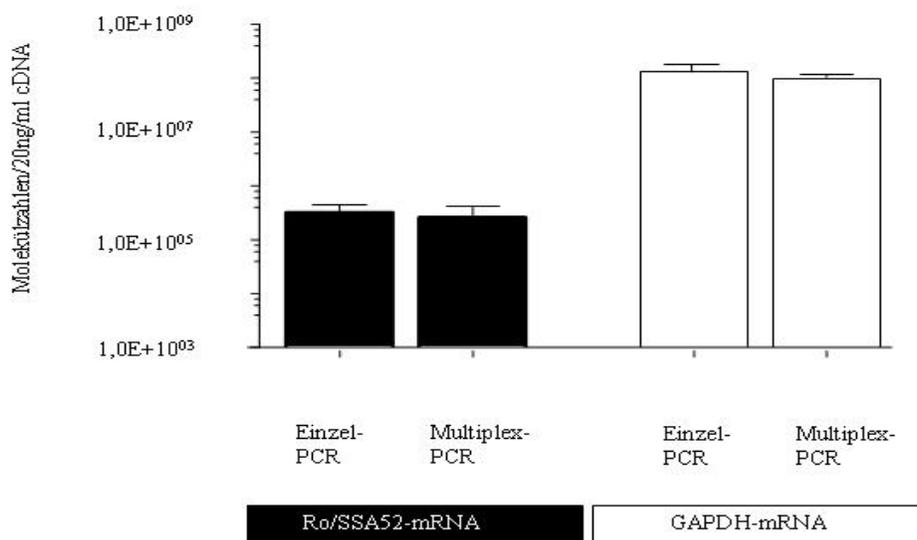


Abbildung 20 Nach Einsatz von 20ng cDNA wurden für Ro/SSA52 im Multiplex-Ansatz $3,2 \times 10^5$ Moleküle und $2,6 \times 10^5$ Moleküle in der Einzel-PCR gemessen. Die Molekülzahl von GAPDH weist ein höheres Expressionsniveau auf. Dargestellt sind 3 Experimente über dreifache Messungen (Mittelwert \pm SEM).

4.3.4.2 Molekülzahlen nach Amplifizierung von Ro/SSA52-Plasmid-DNA

Die Amplifikation von Ro/SSA52-Plasmid-DNA erfolgte in gleichbleibender Konzentration zusammen mit GAPDH-Plasmid-DNA in verschiedenen Verdünnungsstufen. Von Ro/SSA52-Plasmid-DNA liegen $384 \mu\text{g/ml}$ vor, von GAPDH-Plasmid-DNA $320 \mu\text{g/ml}$. Wie in Abbildung 21 zu erkennen, wird für Ro/SSA52 die 100-fache Verdünnung ($3,84 \mu\text{g/ml}$), zusammen mit fünf verschiedenen Verdünnungsstufen von GAPDH-Plasmid-DNA ($3,2 \mu\text{g/ml}$ bis $3,2 \text{ng/ml}$) vervielfältigt. Für Ro/SSA52 lässt sich in allen fünf Ansätzen eine konstante Molekülzahl von durchschnittlich $8,8 \times 10^8$ zeigen, für GAPDH tritt entsprechend der eingesetzten Verdünnung eine proportionale Verringerung auf. Die große Stabilität bezüglich der Amplifizierung von Ro/SSA52 beruht in wesentlichen auf der Wahl der Primer, mit denen kleine Amplifikationsprodukte ($<300\text{bp}$) vervielfältigt wurden. Die Reproduzierbarkeit der Multiplex-PCR-Reaktion zeigt sich damit unabhängig vom Ausgangsmaterial.

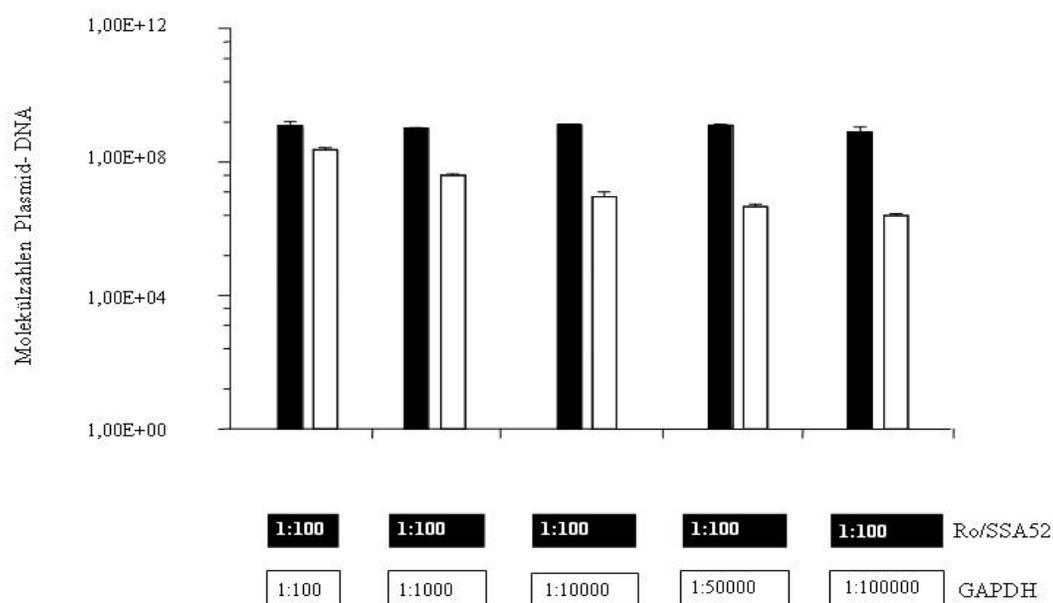


Abbildung 21 Die Multiplex-PCR-Reaktion von Ro/SSA52- und GAPDH-Plasmid-DNA läuft unter ausgeglichenen PCR-Bedingungen ab. Primer, mit denen kleine PCR-Fragmente vervielfältigt werden (<300bp), erweisen sich zur Durchführung einer Multiplex-PCR als geeignet. Dargestellt sind drei Experimente über dreifache Messungen (Mittelwert±SEM).

4.4 qPCR zur Bestimmung der Ro/SSA52-mRNA-Expression in Keratinozyten

4.4.1 TNF- α -induzierte mRNA-Expression von Ro/SSA52 in HaCaT-Keratinozyten

Die Bestimmung der Ro/SSA52-mRNA-Expression erfolgte in HaCaT-Keratinozyten mit 4ng/ml TNF- α nach 1h, 2h, 4h, 8h, 24h. Die mRNA-Expression von Ro/SSA52 wird durch das Verhältnis zum Haushaltsgen GAPDH angegeben. Die Ratio Ro/SSA52 zu GAPDH ist durch einen frühen Anstieg und durch ein Maximum nach 4h gekennzeichnet (Abbildung 22), dass einer 300-fachen Erhöhung gegenüber dem Normalniveau entspricht. Bis 24h ist ein deutlicher Abfall im Expressionsniveau zu verzeichnen, zu dem zu wesentlichen Teilen der Abbau (Aufbrauch) der mRNA beiträgt. Es wurden 3 Experimente mit jeweils dreifachen Messungen durchgeführt.

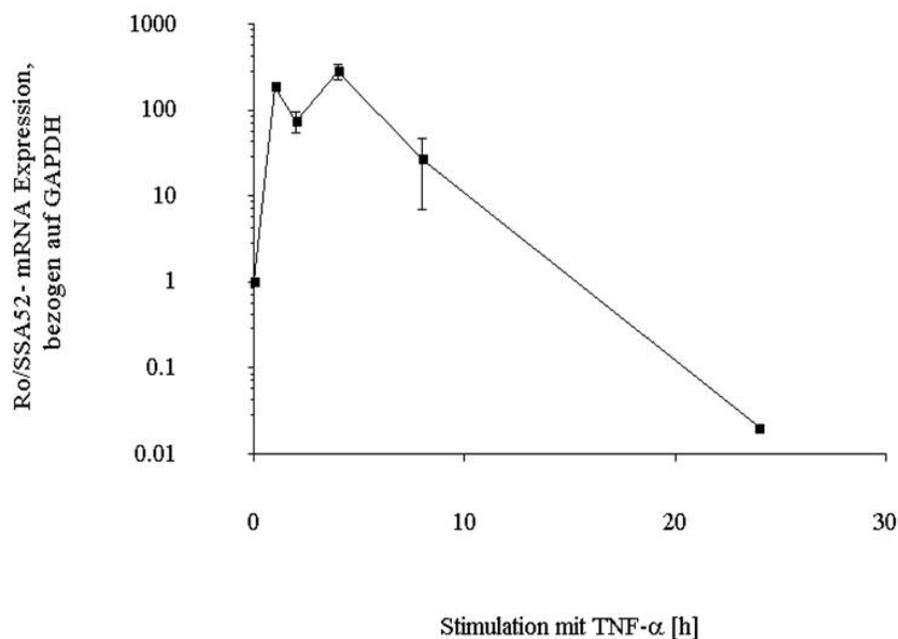


Abbildung 22 Der Verlauf der TNF- α -induzierten mRNA-Expression von Ro/SSA52 in HaCaT-Keratinocyten zeigt Anstiege nach 1h und 4h. Das zweite Maximum entspricht einer 300-fachen Erhöhung der Transkriptionsprodukte, an die sich bis 24h eine deutliche Verringerung anschließt. Dargestellt sind drei Experimente mittels dreifachen Messungen (Mittelwert \pm SEM)

Die mRNA-Expression von Ro/SSA52 und GAPDH in HaCaT-Keratinocyten ist in einem weiteren Diagramm dargestellt (Abbildung 23), das das Molekülniveau über 24h angibt. Hierbei werden nach 4h für Ro/SSA52 2×10^9 Moleküle gemessen. Bei der Zahl von 3×10^6 Zellen sind das 667 Ro/SSA52-mRNA-Moleküle pro Zelle. Zum Zeitpunkt von 24h liegen noch $2,5 \times 10^6$ Moleküle vor, was einem Molekül pro Zelle entspricht.

Das Expressionsniveau von GAPDH liegt durchschnittlich bei $5,25 \times 10^7$ Molekülen. Auftretende Schwankungen werden in Abbildung 23 deutlicher als in der Abbildung 22. Die TNF- α -Behandlung führt in dem ersten 4h zu Abweichungen in der Größenordnung von Faktor zehn. Erst im Verlauf von 4h bis 24h tritt eine Stabilisierung ein. Da im Zeitfenster von 8h bis 24h kein weiterer Messwert genommen wurde, kann zu Änderungen keine Angabe gemacht werden. Gleiches gilt für auch Ro/SSA52 mRNA-Expression in diesem Zeitraum.

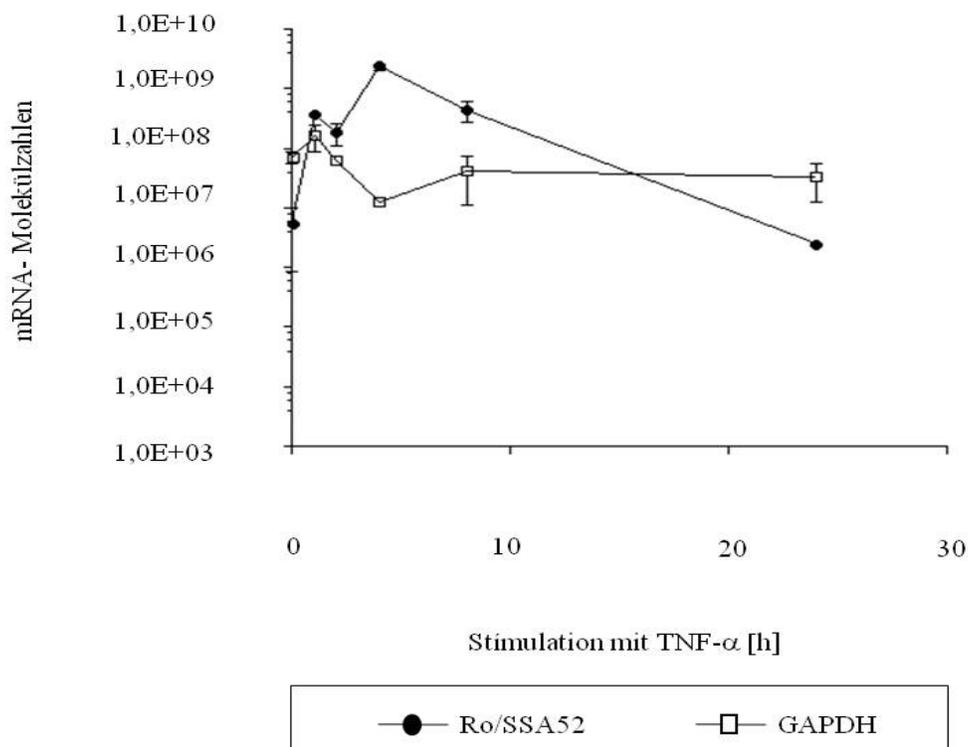


Abbildung 23 Das Maximum der Ro/SSA52-mRNA-Expression entspricht 2×10^9 Molekülen und wird nach 4h erreicht. Das Molekülniveau von GAPDH liegt im Durchschnitt bei $5,25 \times 10^7$ Molekülen. Dargestellt sind 3 Experimente über dreifache Messungen (Mittelwert \pm SEM).

4.4.2 TNF- α -induzierte mRNA-Expression von Ro/SSA52 in primären Keratinozyten

Abbildung 24 stellt die TNF- α -induzierte mRNA-Expression von Ro/SSA52 an primären Keratinozyten sechs gesunder Personen dar, die sich auf das Haushaltsgen GAPDH bezieht.

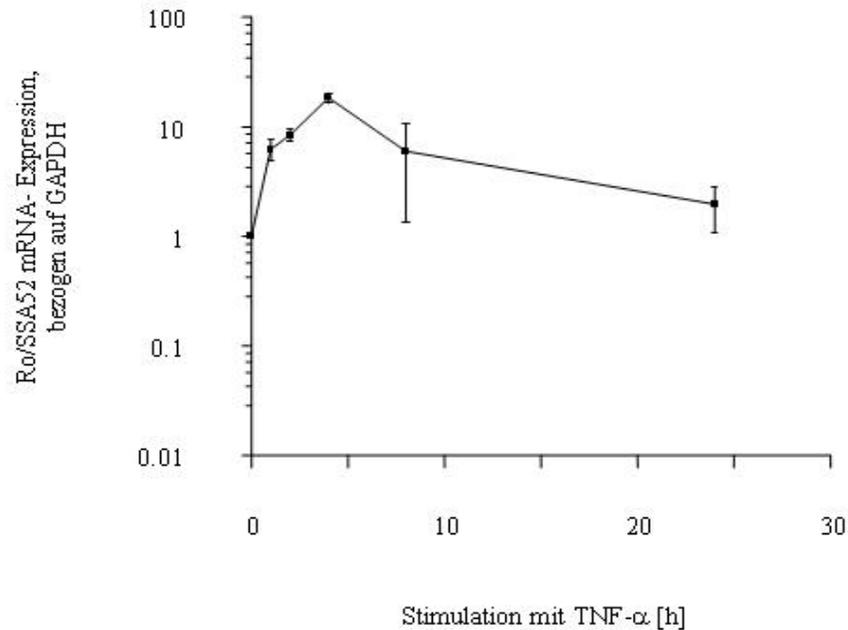


Abbildung 24 Ro/SSA52-mRNA-Induktion durch TNF- α in primären Keratinozyten von sechs gesunden Personen. Das Maximum der Expressionserhöhung wird nach 4h erreicht und entspricht einem 20-fachen Anstieg. Der Erhöhung folgt ein allmählicher Abfall bis 24h. Das Ausgangsniveau wird nicht erreicht. Angabe von sechs Experimenten gesunder Probanden mittels dreifachen Messungen (Mittelwerte \pm SEM)

Die Induktion beginnt nach 1h und erreicht nach 4h ein Maximum, bei dem eine 20-fache Erhöhung von Transkriptionsprodukten nachweisbar ist. Nach diesem Maximum tritt eine leichte Verringerung ein, so dass auch nach 24h noch eine erhöhte mRNA-Expression von Ro/SSA52 nachweisbar ist. Der Expressionsanstieg wie auch die Expressionsverringerng von Ro/SSA52 fallen geringer aus als im Vergleich zu HaCaT-Keratinozyten.

Darstellung 25 gibt die Molekülzahlen von Ro/SSA52 und von GAPDH in primären Keratinozyten über 24h Stimulation mit TNF- α an. Aus dieser geht hervor, dass GAPDH vor der Stimulation ein wesentlich höheres Molekülniveau aufweist als Ro/SSA52. Das durchschnittliche Molekülniveau liegt bei $7,8 \times 10^7$. Die TNF- α -bedingten Schwankungen in der Expression verbleiben kleiner oder gleich Faktor fünf. Der Einfluss von TNF- α auf Ro/SSA52 zeigt sich nach 4h durch die Induktion von $2,3 \times 10^2$ auf $2,9 \times 10^4$ Moleküle (Faktor 100). Bei $2,5 \times 10^6$ geernteten Zellen weist das jeder Zelle 0,01 Moleküle von Ro/SSA52-mRNA zu. Bei $1,86 \times 10^3$ Molekülen nach 24h bedeutet das für jede Zelle 0,001 Moleküle. Aufgrund dieses

begrenzten Aussagewertes wird für primäre Keratinozyten die Ratio Ro/SSA52 zu GAPDH als maßgebend erachtet.

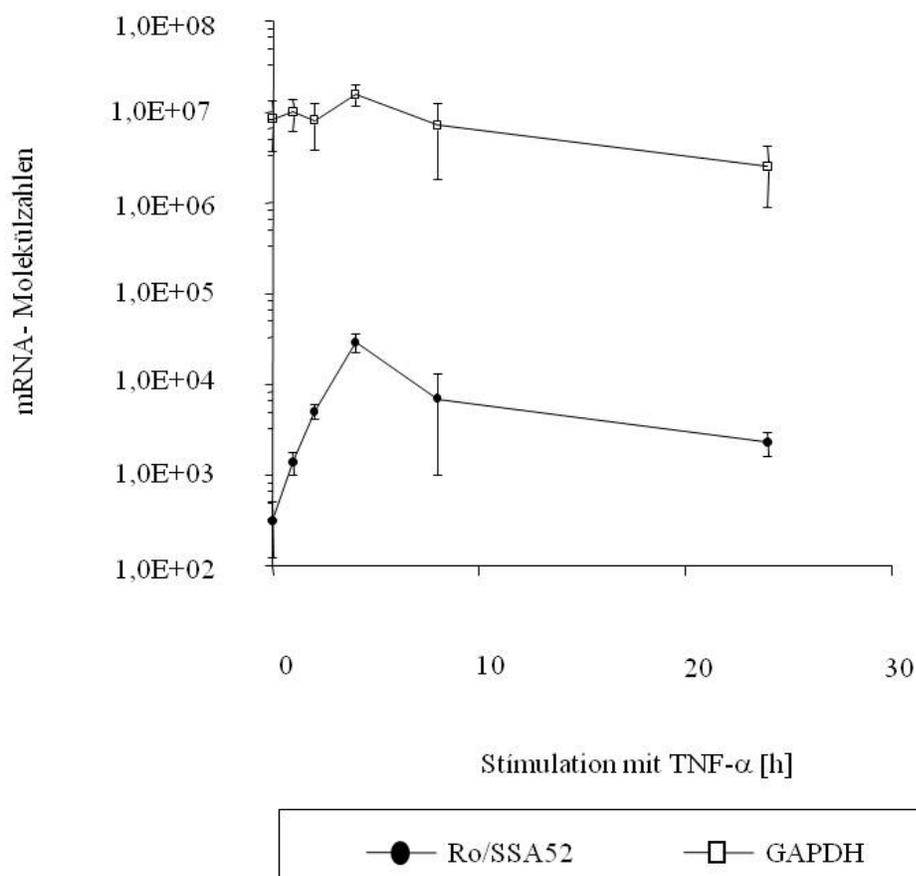


Abbildung 25 Darstellung der Molekülzahlen von Ro/SSA52 und GAPDH-mRNA nach Messung an Keratinozyten von sechs gesunden Personen: Nach 4h liegen von Ro/SSA52-mRNA $2,9 \times 10^4$ Moleküle vor, nach 24h $1,86 \times 10^3$ Moleküle. Für GAPDH liegen durchschnittlich $7,8 \times 10^7$ Moleküle vor. Angabe von sechs Experimenten gesunder Probanden mittels dreifachen Messungen (Mittelwerte \pm SEM)

Die Ro/SSA52-mRNA-Expression wurde in Keratinozyten unter dem Einfluss von TNF- α von insgesamt zwölf gesunden Personen untersucht. Dabei zeigte sich kein einheitliches Ansprechen. Bei den verbleibenden sechs Personen (hier nicht dargestellt) ließ sich eine TNF- α -abhängige Regulation von Ro/SSA52 nachweisen, bei der der maximale Anstieg der Ro/SSA52-mRNA (Zeitpunkt von 4h) unter dem Faktor 1,5 verblieb. Keratinozyten von der Hälfte der untersuchten Personen waren für die TNF- α -Behandlung wesentlich weniger empfänglich.

4.4.3 TNF-RI- und RII-Rezeptoren sind an der Ro/SSA52-mRNA-Expression beteiligt

Für die Charakterisierung der Beteiligung von TNF-RI- und TNF-II-Rezeptoren an der Ro/SSA52-mRNA-Hochregulation diente ein funktioneller Neutralisationsassay. Dazu wurden spezifische Antikörper gegen TNF-RI und TNF-II verwendet¹¹⁴. Die Experimente wurden an Keratinozyten von fünf gesunden Personen, die nicht identisch mit denen aus Abbildung 24 und 25 sind, durchgeführt. Diese zeigen (Abbildung 26), dass die Blockade von TNF-RI in einer Reduktion der Ro/SSA52-mRNA-Expression um 40% resultiert (die Ratio Ro/SSA52/GAP sinkt von 4,9 auf 3,4). Die Blockade von TNF-II führt zu einer Erhöhung der Expression um den Faktor 4 (Anstieg der Ratio von 4,9 auf 19,5). Werden beide TNF- α -Rezeptoren blockiert, verringert sich die Ro/SSA52-mRNA-Expression von 4,9 auf 0,2. TNF-RI- und TNF-II-Rezeptoren sind an der TNF- α -induzierten Hochregulation von Ro/SSA52-mRNA beteiligt.

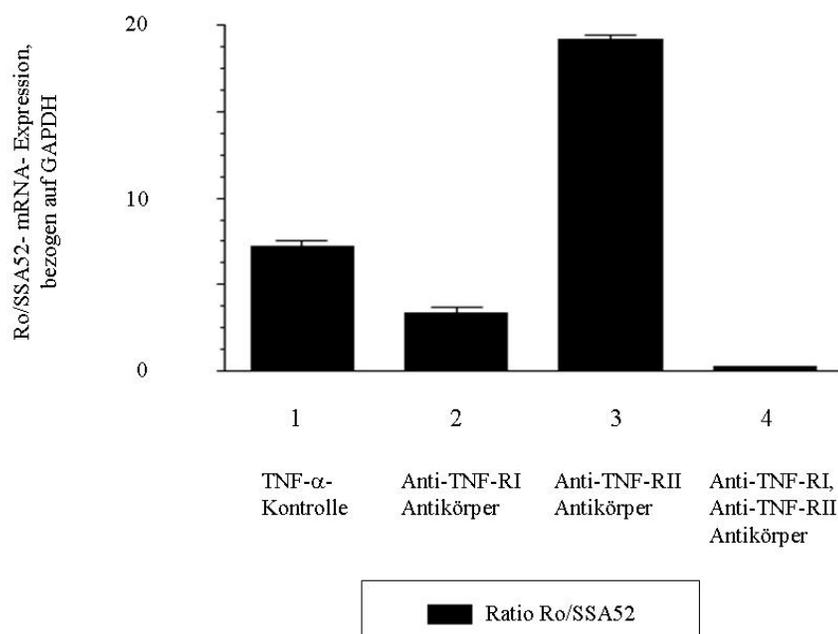


Abbildung 26 TNF- α induziert Ro/SSA52-mRNA nach 4h (1). Die Hochregulation über TNF-RI lässt sich durch einen neutralisierenden Antikörper blockieren (2). Durch die Blockierung von TNF-II wird Ro/SSA52-mRNA verstärkt exprimiert (3). Die Blockierung beider Rezeptoren führt zu einer Neutralisation der Ro/SSA52-mRNA-Expression (4). Angabe von 5 Experimenten, durchgeführt an gesunden Probanden mittels dreifachen Messungen (Mittelwerte \pm SEM). Die Probanden sind mit denen aus Abbildung 24 und 25 nicht identisch.

	TNF- α -Kontrolle	Anti-TNF-RI	Anti-TNF-RII	Anti-TNF-RI,RII
Ratio Ro/SSA52-mRNA-Induktion	4,9	3,4	19,5	0,2

Tabelle 12 Das Ro/SSA52-mRNA-Expressionsniveau ist im Verhältnis zur internen Kontrolle dargestellt und zeigt den Einfluss der neutralisierenden Antikörper gegen TNF-RI- und TNF-RII. Die Experimente wurden an primären Keratinozyten von 5 gesunden Personen durchgeführt.

4.4.4 Die mRNA-Induktion von Ro/SSA52 erfolgt unabhängig von Apoptose

Frühzeitig apoptotische und lebende Keratinozyten werden durch Färbung mit Annexin-V und anschließender Zellsortierung unterscheidbar. Die Sortierung mittels des LSR II-Zellsortierers ermöglicht die Separierung zweier Fraktionen (Annexin-positive-bzw. Annexin-negative Zellen), die in Abbildung 27 dargestellt ist. Bei 10.000 aufgenommenen Zellen werden 90,41% als Annexin-V-negativ detektiert, 9,59% sind Annexin-V-positiv. Die für die Quantifizierung notwendige Extraktion der mRNA war in der Annexin-V-positiven Fraktion auf Grund der geringen Zellzahl nicht erfolgreich.

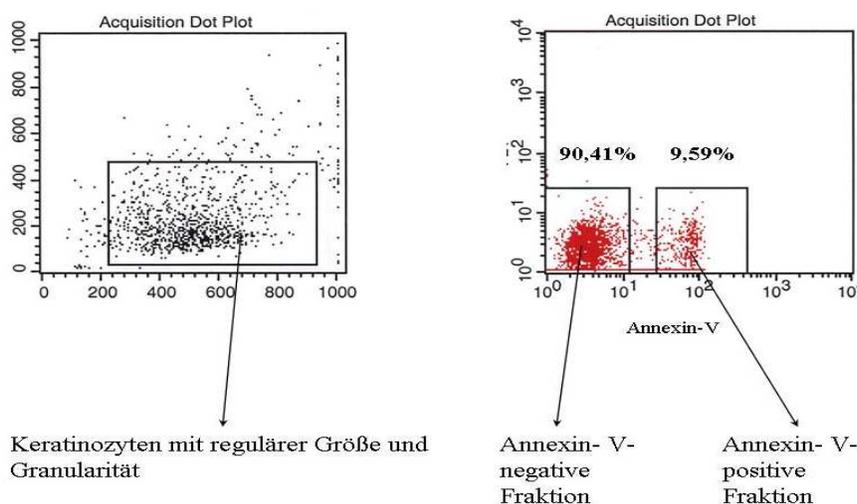


Abbildung 27 Die Zellsortierung am LSR II nach Annexin-V-Färbung ermöglicht die Unterscheidung zweier Zellpopulationen. 90,41 % der aufgenommenen Zellen werden als Annexin-negativ, 9,59% der Zellen als Annexin-positiv detektiert.

Abbildung 28 zeigt Ergebnisse nach Auswertung der Proben von fünf gesunden Personen: In primären Keratinozyten erfolgt die TNF- α -induzierte mRNA-Induktion von Ro/SSA52 nach 4h sowohl in Zellen, in denen Apoptose auftritt als auch in nichtapoptotischen Zellen. Hierbei ist in der letzteren Zellfraktion die Induktion 1,5-fach weniger stark als im Vergleich zu der ersteren Zellfraktion. Als Kontrolle wurde die mRNA-Expression von TNF- α in beiden Zellfraktionen mit gemessen. Nach 4h Stimulation ergibt die Auswertung ähnliche Resultate wie die für Ro/SSA52. Primäre Keratinozyten, in denen keine Apoptose auftritt, weisen eine 1,5-fach geringere TNF- α -mRNA-Expression auf, als apoptotische Keratinozyten. Das Expressionsniveau von TNF- α ist hierbei zehnfach höher als das von Ro/SSA52.

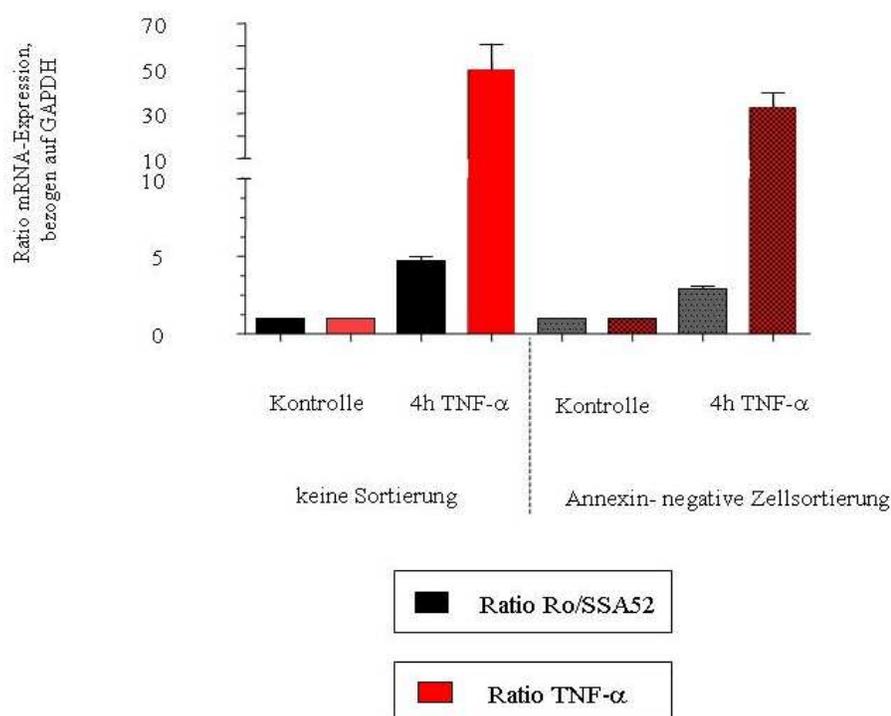


Abbildung 28 TNF- α induziert die mRNA-Expression von Ro/SSA52 in nichtapoptotischen Keratinozyten. Ro/SSA52-mRNA ist 1,5-fach geringer exprimiert als in nichtsortierten Zellen, die apoptotische Zellen einschließen. Auch TNF- α -mRNA wird in nichtapoptotischen Keratinozyten geringer als reguliert als in Zellen, in denen Apoptose auftritt. Die Abbildung stellt die Auswertung von fünf Experimenten mittels dreifachen Messungen dar (Mittelwerte \pm SEM).

4.4.5 TNF- α -Effekt auf die mRNA-Expression von Sm-D1 in primären Keratinozyten

Abbildung 29 zeigt Veränderungen der mRNA-Expression von Sm-D1 nach 24h Inkubation mit TNF- α . Nach 4h führt dies maximal zu einer 1,6-fachen Erhöhung als im Vergleich zur Kontrolle. Bis zum Zeitpunkt von 24h zeigt das mRNA-Expressionsniveau keinen weiteren Anstieg. Die Experimente wurden an primären Keratinozyten von drei gesunden Spendern durchgeführt. Die parallel durchgeführte Analyse der mRNA-Expression von Ro/SSA52 zeigt allerdings, dass diese drei Spender auf TNF- α -Stimulation nicht sensibel und somit *Non-Responder* sind. Der Aussagewert über den TNF- α -Einfluss auf SmD-1-mRNA ist daher in diesen Experimenten begrenzt.

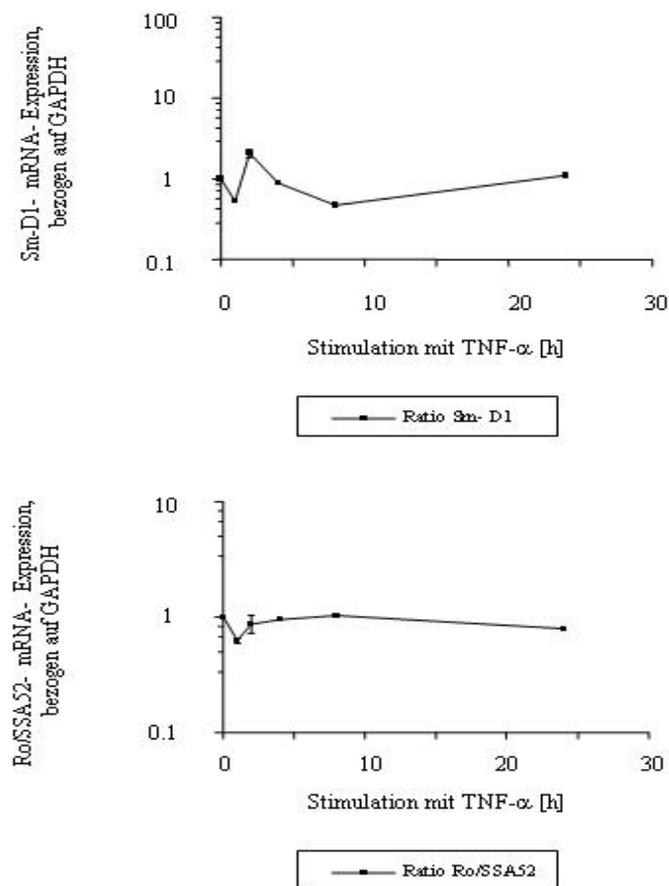


Abbildung 29 Das Expressionsprofil von Sm-D1-mRNA ändert sich nach TNF- α -Stimulation nur geringfügig. Die Schwankungen betragen maximal das 1,6-fache des Ausgangswertes (oben). Eine Erhöhung von Ro/SSA52-mRNA durch TNF- α lässt sich bei den untersuchten gesunden Personen nicht zeigen (unten). Angabe von drei Experimenten mittels dreifachen Messungen (Mittelwerte \pm SEM)

4.4.6 TNF- α induziert die eigene mRNA-Freisetzung nach 1h

Abbildung 30 zeigt den Einfluss von TNF- α auf die eigene mRNA-Expression in primären Keratinozyten. Die Inkubation mit TNF- α führt zu einer frühzeitigen Hochregulation mit einem Maximum nach 1h, bei dem 200-fach mehr Transkriptionsprodukte vorliegen. Der Verlauf danach gestaltet sich uneinheitlich, da stärkere Schwankungen auftreten: Nach 4h ist ein weiteres Maximum messbar, danach erfolgt eine Verringerung bis 24h, ohne dass das Ausgangsniveau wieder erreicht wird. Deutlich wird, dass ausgeprägte Veränderungen innerhalb eines Zeitintervalls von 8h auftreten. Es wurden Keratinozyten von fünf gesunden Personen untersucht und jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

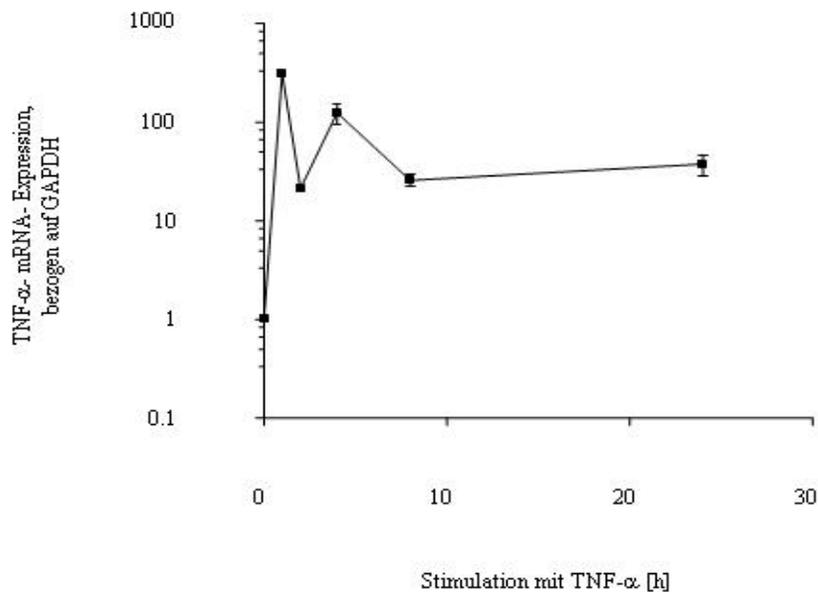


Abbildung 30 TNF- α induziert die eigene mRNA-Freisetzung in primären Keratinozyten. Das Maximum der Expressionserhöhung wird nach 1h erreicht. Nach 24h Stimulation ist TNF- α -mRNA erhöht nachweisbar. Angabe von fünf Experimenten mittels dreifachen Messungen (Mittelwerte \pm SEM)

4.4.7 Nach 24h induziert TNF- α die eigene Proteinfreisetzung und die von IL6, IL-8 und IL-10

Primäre Keratinozyten von fünf gesunden Personen wurden für die Testreihe untersucht. Die in Abbildung 31 gezeigten Konzentrationen beziehen sich auf die im Überstand vorhandenen

Proteinkonzentrationen nach Abzug der Stimulationskonzentration von 4ng/ml. 24h Stimulation mit TNF- α führen zu einer vermehrten Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 sowie des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. TNF- α induziert darüber hinaus seine eigene Proteinfreisetzung. Die TNF- α -Proteinkonzentration wurde im Kulturüberstand 100-fach höher gemessen, gefolgt von IL-6 (vierfach höher), IL-8 (dreifach höher) und IL-10 (Faktor 2,5-fach erhöht). Zur Freisetzung von IL-1 β kann keine Aussage getroffen werden, da die Proteinkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze des Tests lagen (<5pg/ml).

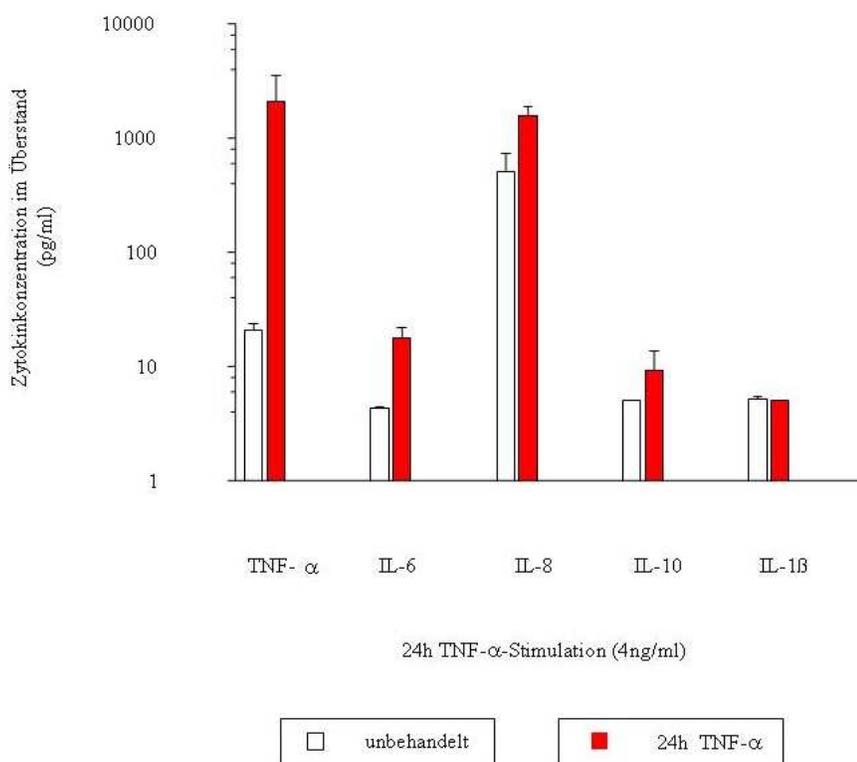


Abbildung 31 24h TNF- α -Stimulation führt zu einer Induktion von IL-6-, IL-8- und IL-10. TNF- α induziert darüber hinaus seine eigene Freisetzung. Angabe von fünf Experimenten mittels dreifachen Messungen (Mittelwerte \pm SEM)

Der Effekt von TNF- α auf die Freisetzung sekundärer Zytokine wurde zusätzlich in einer Dosis-Wirkungskinetik (siehe Abbildung 32) charakterisiert. Hierzu wurden primäre Keratinozyten mit 0,1ng/ml bis 100ng/ml TNF- α für 4h inkubiert. Der Zeitpunkt nach 4h wurde gewählt, um zu klären, ob die Proteinfreisetzung ein frühes oder spätes Maximum aufweist (vergleiche

Abbildung 31). Die Induktion von TNF- α , IL-6 und IL-8 nach 4h erfolgt dosisabhängig. Die IL-6- und TNF- α -Proteinkonzentration steigt mit der steigenden TNF- α -Stimulationskonzentration an, für IL-8 ist bei der TNF- α -Stimulationskonzentration von 100ng/ml ein Sättigungseffekt nachweisbar. Für IL-10 und IL-1 β lässt sich nach 4h keine erhöhte Freisetzung zeigen.

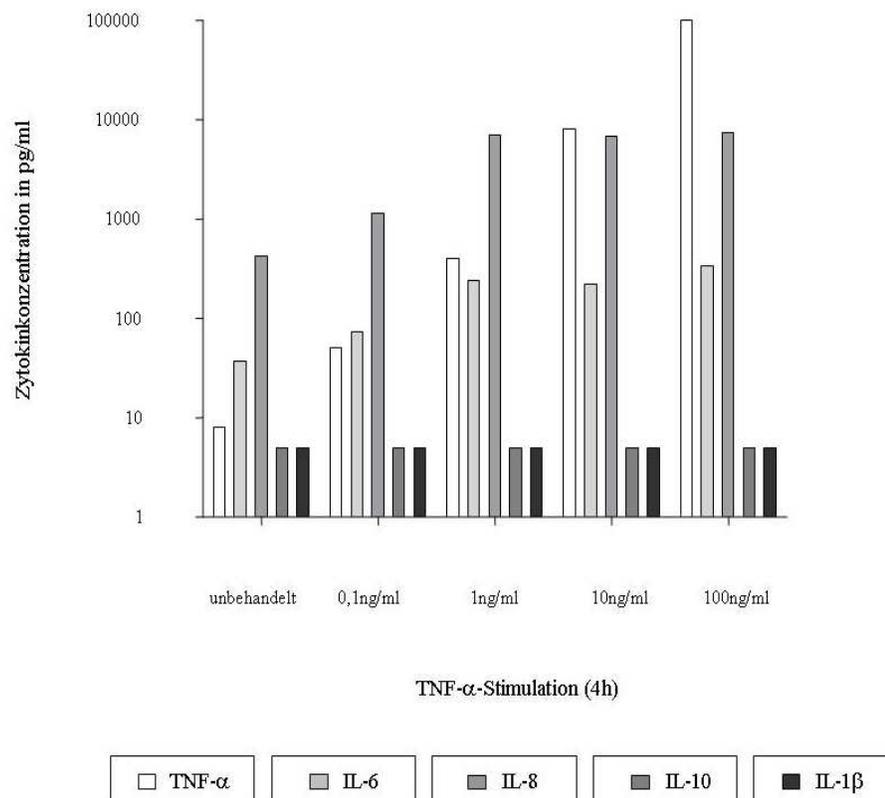


Abbildung 32 Die Induktion von TNF- α , IL-6 und IL-8 erfolgt dosisabhängig von 0,1ng/ml bis 100ng/ml. Die IL-6- und TNF- α -Proteinkonzentrationen steigen mit der steigenden TNF- α -Stimulationskonzentration an. Für IL-8 ist ein Sättigungseffekt nachweisbar.

Nach 4h Stimulation zeigt sich ein stärkerer Effekt von TNF- α auf die Proteinfreisetzung der sekundären inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 als nach 24h Stimulation. Das IL-8-Protein findet sich fast 20-mal mehr im Überstand, während es nach 24h dreifach vermehrt vorliegt. IL-6 wird nach 4h siebenfach höher nachgewiesen, nach 24h ist es vierfach erhöht. Der Effekt von TNF- α auf die IL-6 und IL-8-Freisetzung fällt demnach nach 4h eindeutiger aus als

nach 24h. Bezüglich des TNF- α -Proteins gilt diese Aussage nicht, da TNF- α nach 4h etwa 50-fach stärker nachgewiesen wird und bis 24h auf das 100-fache im Überstand ansteigt. Ebenso zeigt sich für IL-10 erst nach 24h TNF- α -Stimulation eine erhöhte Freisetzung. IL-1 β spricht weder nach 4h noch nach 24h auf TNF- α an.

4.5 FACS-Analysen

4.5.1 TNF- α vermittelte Effekte auf die Apoptoserate in primären Keratinozyten

Der Einfluss von TNF- α auf die Apoptoserate in primären Keratinozyten wurde zytometrisch untersucht. Die FACS-Analyse zeigt, dass nach 4h und nach 24h TNF- α -Stimulation weniger als 1% der Zellen frühzeitig apoptotisch, d.h. Annexin-V positiv, sind. 15% - 18% der Zellen werden als doppelt positiv, d.h. apoptotisch gemessen (siehe Abbildung 33). Die Stimulation mit TNF- α führt nicht zu einer Erhöhung von doppelt positiven Zellen, sondern diese Population hat sich nach 24h von 18,5% auf 15% verringert. Dieser Effekt lässt sich in 4 Experimenten bestätigen, so dass TNF- α eine antiapoptotische Wirkung in primären Keratinozyten zugeschrieben werden kann. Die rote Markierung der Keratinozyten in der Abbildung weist auf eine Kernpopulation mit regulärer Größe und Granularität hin.

Nach Zellsortierung wird der Anteil frühzeitig apoptotischer Zellen mit 9,6% (siehe auch Abbildung 27) bestimmt. Der Unterschied zu dem hier mittels FACS-Analyse bestimmten 1% kann als ein interindividueller Unterschied angenommen werden, da die FACS-Analysen und die Zellsortierung mit Zellen verschiedener Spender durchgeführt wurden.

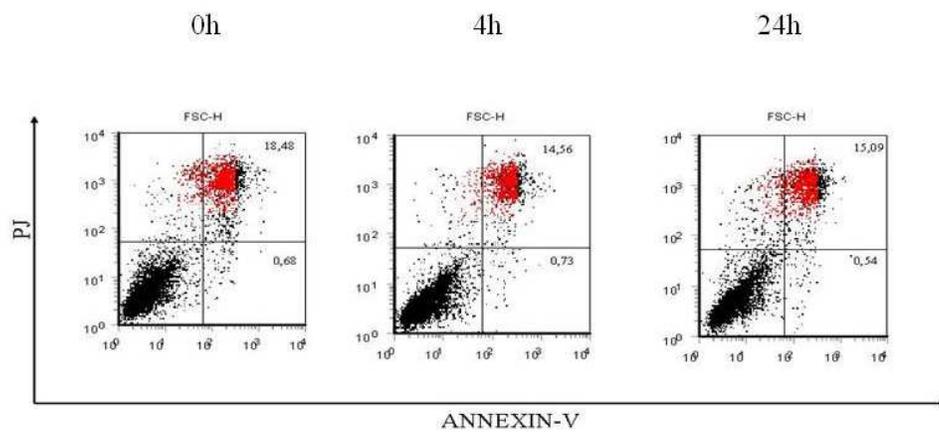


Abbildung 33 Annexin/PJ-Färbungen in primären Keratinozyten: TNF- α induziert weder nach 4h noch 24h Apoptose. Es lässt sich ein antiapoptotischer Effekt nachweisen, der in vier Experimenten bestätigt wird.

5 Diskussion

Unterschiedliche Untersuchungsmethoden haben seit der Erstbeschreibung des Ro/SSA-Autoantigens 1967 dazu beigetragen, die biologische Bedeutung, Eigenschaften, Größe und Struktur dieses Ribonukleoprotein-Komplexes zu charakterisieren. Anti-Ro/SSA52-Autoantikörper sind bei Patienten mit rheumatischen Autoimmunerkrankungen maßgeblich mit photosensitiven Hautmanifestationen, Dermatitis, Vaskulitis, mit pulmonaler und renaler Beteiligung sowie Lymphopenie assoziiert ¹¹⁵, deren Auftreten zusammen mit klinischen Manifestationen für eine Beteiligung an der Pathogenese des Lupus erythematoses spricht ^{116,117}. Die diagnostische Wertigkeit konnte für das Sjögren-Syndrom und dem kongenitalen Herzblock gesichert werden ¹¹⁸. Detaillierte Mechanismen, warum Entzündungsreaktionen in bestimmten Geweben ablaufen und welchen Einfluss dabei Autoantikörper gegen Ro/SSA52 haben, sind erst teilweise aufgeklärt.

Die bei Lupus erythematoses mit positiven Anti-Ro/SSA-Autoantikörpern überdurchschnittlich häufig auftretenden photosensitiven Hautmanifestationen werden sowohl als Folge einer erhöhten UVB-vermittelten Autoantigenexpression von Ro/SSA als auch einer gesteigerten Anti-Ro/SSA-vermittelten Zytotoxizität angesehen. Durch die Exposition von UVB-Licht, Radiologie und adverbialer Infektion lässt sich eine erhöhte Oberflächlichkeit von Ro/SSA in humanen Keratinozyten nachweisen, die auf einer Translokation oder Induktion von intrazellulären Proteinen beruht ¹⁰⁶. In humanen Keratinozyten wurde eine UVB-abhängige Induktion des Zytokins TNF- α und der Interleukine IL-6, IL-8 beschrieben, wie auch eine TNF- α -abhängige Induktion von Granulozyten-spezifischer Proteinase3, einem Zielantigen für Autoantikörper bei der Wegener'schen Granulomatose ¹¹⁹. Darüber hinaus ist gesichert, dass durch die UVB-bedingte Induktion von Apoptose Ro/SSA- und La/SSB-Autoantigene in verschiedenen Arten apoptotischer Strukturen akkumulieren, die eine erhöhte Bindung von Autoantikörpern zur Folge hat ³³.

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren Untersuchungen von Dörner et al., die mittels Zell-ELISA nachweisen konnten, dass TNF- α -Stimulation in humanen Keratinozyten eine erhöhte Membranexpression von Ro/SSA52 bewirkt. Die Arbeit stellte die pathogenetische Bedeutung von Ro/SSA52 heraus, durch die Hautmanifestationen von Lupuspatienten durch eine erhöhte Oberflächenbindung von Anti-Ro/SSA52-Autoantikörpern erklärt werden ³⁰. Ungeklärt blieb,

warum in 20% der untersuchten Personen keine Oberflächenexpression nachweisbar war und welche Effekte eine Autoantikörperbindung auf apoptotische Zellen hat. Als mögliche Ursachen geben die Autoren eine unterschiedliche Empfindlichkeit von Rezeptoren und Unterschiede im Zellzyklus an. In der hier präsentierten Arbeit wurde der Einfluss von TNF- α auf die Induktion von Ro/SSA52-mRNA in humanen Keratinozyten untersucht und die übergeordnete Rolle von TNF- α bei Anti-Ro/SSA52-Autoantikörper-vermittelten Hautmanifestationen herausgestellt.

5.1 Immunologisches Konzept von Anti- Ro/SSA52-Autoantikörper-vermittelten Hautmanifestationen

Eine Erklärung für den Ablauf von Anti-Ro/SSA52-vermittelten Hautmanifestationen bei Lupus erythematoses kann eine UVB-induzierte Freisetzung von TNF- α aus Hautzellen sowie anderen gewebeständigen Zellen wie Monozyten, Mastzellen oder Fibroblasten¹²⁰ sein, die an einer Induktion von Ro/SSA in Keratinozyten beteiligt sind. Die TNF- α -induzierte Erhöhung der Membranexpression von Ro/SSA52 betrifft neben apoptotischen Zellen auch lebende Zellen. Die Anreicherung des Antigens auf Zellmembranen wird durch Translokation vermittelt. Diese stellt einen spezifischen Proteintransfer auf Zellmembranen dar, welche durch eine erhöhte Bindung von Anti-Ro/SSA-Autoantikörpern zu einer gesteigerten ADCC und damit zur Ausprägung von kutanen Läsionen führt. Keratinozyten von Patienten mit einer Lupuserkrankung weisen im Vergleich zu gesunden Personen eine höhere Empfänglichkeit für eine autoantikörpervermittelte Zytotoxizität auf, so dass phototoxische Entzündungsreaktionen³⁹ deutlich stärker ausgeprägt sind.

Die Freisetzung von Ro/SSA52 in die Dermis kann die Aufnahme des Proteins durch professionelle APC zur Folge haben, die mit MHC-II-Molekülen Ro/SSA52-Peptide T- und B-Lymphozyten präsentieren. Die Präsentation der Peptide auf APC beeinflusst die Aktivierung von B-Lymphozyten, die zu einer simultanen Aufnahme von Antigenen sowie Bestandteilen der Zellmembran fähig sind. Dieser als Trogozytose (trogo, abnagen) bezeichnete Prozess ist ein aktiver Transportmechanismus von Antigen in lebenden Zellen¹²¹ und nicht das Ergebnis der Phagozytose oder von Apoptose der für T- und B-Lymphozyten über zellspezifische Antigenrezeptoren vermittelt wird¹²². Chemokine und Adhäsionsmoleküle, die durch proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden, induzieren die Migration von T-Zellen sowie

pDC in die Dermis und Epidermis ¹²³. Diese Annahme wird durch den Nachweis einer verminderte Frequenz von pDC im Blut, verbunden mit einer erhöhten Anzahl in peripheren Geweben von Patienten mit LE gegenüber gesunden Personen, gestützt ¹²⁴. Die lokale Produktion von Autoantikörpern gegen Ro/SSA wäre über die Reifung von hautständigen Gedächtnis-B-Lymphozyten somit in Abhängigkeit vom Antigen möglich (Abbildung 36). Erkenntnisse über die zelluläre Zusammensetzung von infiltrierten Speicheldrüsen von Patienten mit SS stützen die Annahme einer lokalen Anti-Ro/SSA-Autoantikörpersynthese ¹²⁵. Die lokale Synthese von Autoantikörpern in peripheren Geweben ist in hohem Maße von weiteren Faktoren abhängig, die zum Überleben der Autoantikörper-produzierenden Plasmazellen beitragen ¹²⁶.

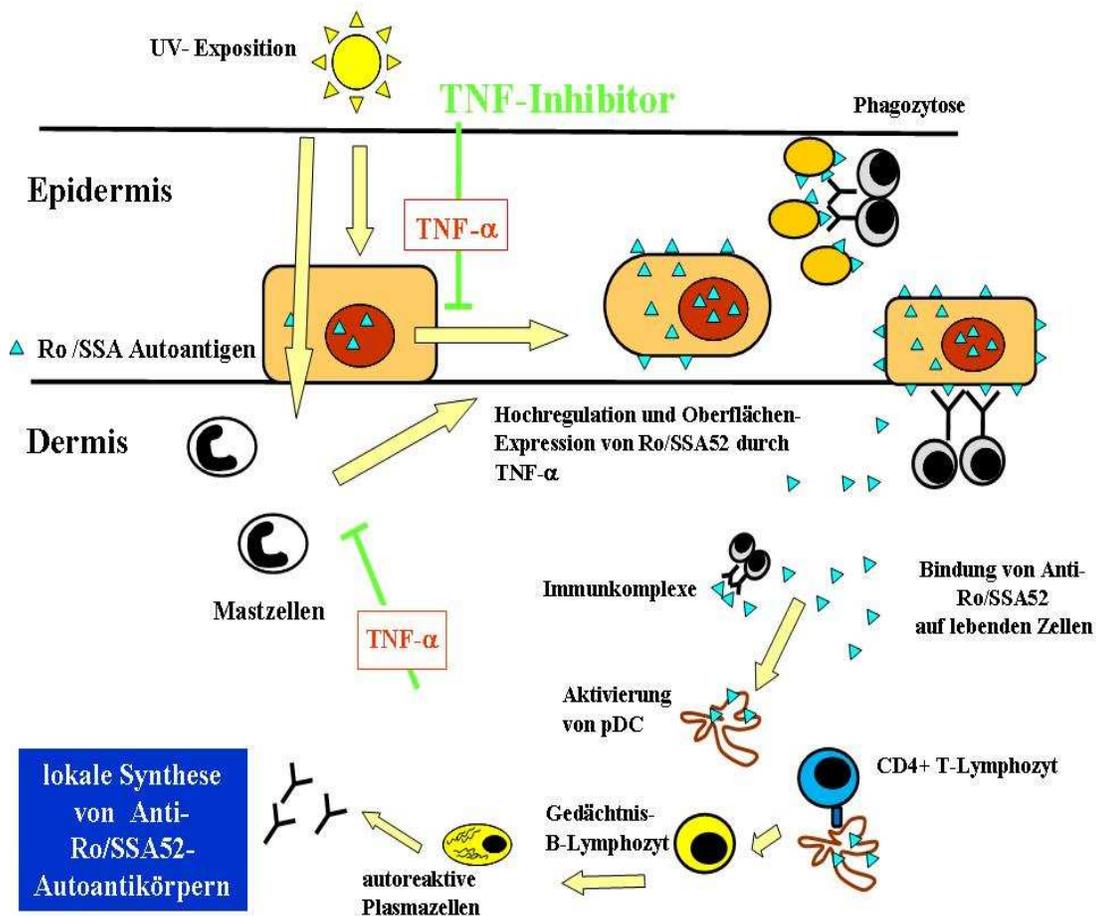


Abbildung 34 Keratinozyten als Zielzellen für die Charakterisierung von Anti-Ro/SSA-vermittelten Hauterscheinungen bei Patienten mit photosensitivem Lupus erythematoses ^{30,127,128}.

Keratinocytenabhängige Chemokine und Zytokine sind an Entzündungsreaktionen in der Haut beteiligt. Die Th1-assoziierten Chemokine CXCL9, CXCL10, CXCL11 sowie der korrespondierende Rezeptor CXCR3 gehören zu den am höchsten regulierten Liganden bzw. Rezeptoren bei Patienten mit kutanem LE. Humane Keratinocyten synthetisieren großen Mengen an CXCL10 sowie CXCL9. CXCR3 wird von der Mehrheit der in die Haut infiltrierenden Zellen, einschließlich pDC und CD4⁺-sowie CD8⁺-Gedächtnis T-Zellen produziert, so dass CXCR3-Liganden optimal für ein Zusammenwirken positioniert sind ¹²⁹.

Neue Kenntnisse der biologischen Funktion von Ro/SSA52 verweisen auf eine Ring-Box (TRIM) im zentralen Proteinabschnitt, die auf Bindungen zu anderen Proteinen hindeutet. Ro/SSA52 wird auch als TRIM 21 ¹³⁰ bezeichnet, das eine Ligaseaktivität aufweist, wodurch Ro/SSA52 andere Proteine durch Kopplung an Ubiquitin modifizieren kann. Diese werden an 26s-Proteasomen markiert und lysosomal abgebaut. In einem in vitro-Zellsystem von PBMC sind Ro/SSA-Proteine mit verringerter Proliferationsaktivität und Apoptose assoziiert ⁷⁷. Durch die Assoziation mit anormal gefalteter RNA, nachgewiesen in *Xenopus laevis* und in Stammzellen der Maus, wird eine Funktion in der Qualitätskontrolle dieser Moleküle angenommen ¹³¹. Im Mausmodell führt das Fehlen von Ro/SSA60 zur Entwicklung von Autoimmunsyndromen mit dem Auftreten von Anti-Chromatin,- und Anti-Ribosomen-Antikörpern sowie einer Glomerulonephritis ⁷⁸. Ro/SSA-Proteine können demnach auch als ein Überlebensfaktor in entzündeten Epithelgeweben wirken.

5.2 Die konventionelle PCR im Vergleich zur *Realtime*-PCR-Technologie, um Ro/SSA52-mRNA zu quantifizieren

Mit der konventionellen PCR-Methode lässt sich die Expression von Ro/SSA52 in Hautzellen nur unzureichend darstellen. Die Ro/SSA52-qPCR ist entwickelt worden, um damit auch geringfügige Änderungen im Expressionsniveau exakt detektieren zu können. Mit 10ng DNA ist die Detektionsgrenze der konventionellen PCR erreicht (Abbildung 13). Diese hängt von verschiedenen Faktoren ab. Enzym-abhängige Unterschiede in der Umschreibungseffizienz zu cDNA machen bis zu 20% aus. Sekundärstrukturen in der mRNA von Ro/SSA52 haben ebenfalls Einfluss auf die Umschreibung, so dass bei gleicher Ausgangskonzentration erhebliche Unterschiede im Detektionsbereich auftreten können. Mit der konventionellen PCR lässt sich nur

schwer abschätzen, um welchen Faktor die mRNA-Expression variiert, da die Stärke der Banden für Ro/SSA52 subjektiv wahrgenommen wird (siehe Abbildungen 13 und 14). Die Verringerung der Ro/SSA52- Expression nach 4h Stimulation (Abbildung 14) ist nicht eindeutig zu bewerten, da auch Schwankungen in der Expression von GAPDH nachweisbar sind. Eine mögliche Ursache hierfür liegt in Unterschieden in der cDNA-Präparation. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich der Bereich der Expressionsvariation für GAPDH unterhalb einer Logarithmus-Stufe bewegt. Für weitere Experimente wurde die PCR hinsichtlich der Amplifikatgröße und des PCR-Profiles überarbeitet, was sich in der verbesserten Effizienz durch die Amplifizierung von kleineren DNA-Fragmenten widerspiegelt. Mit der direkten Extraktion von mRNA aus Keratinozyten wurde Zeit und Material gespart, darüber hinaus kann in der Einschnitt-qPCR die Umschreibung zu cDNA und Amplifizierung unmittelbar nacheinander ablaufen, so dass kein neuer PCR-Ansatz vorbereitet werden muss. Die Stärke der Ro/SSA52-Expression wird im Verhältnis (Ratio) zu GAPDH dargestellt und es lassen sich zusätzlich Molekülzahlen angeben. Die absolute Quantifizierung, die Darstellung von Molekülzahlen von Ro/SSA52 wird durch die Mitführung von DNA-Plasmiden möglich. Durch die Einbringung von Fremd-DNA in ein Plasmid wird die Möglichkeit geschaffen, diese DNA in Bakterienzellen stabil zu erhalten. Nach der Klonierung der cDNA-Abschnitte wurden Plasmide von Ro/SSA52 und GAPDH in verschiedenen Verdünnungsstufen als externe Standards verwendet (Abbildung 9) und so ein großer dynamischer Messbereich möglich gemacht. Ein Nachteil stellt die fehlende Kontrolle der reversen Transkription dar, so dass vor den Einsatz in den Untersuchungen ausreichend Daten hinsichtlich Plasmid-Stabilität und der üblichen RT-Effizienz vorhanden sein sollten. Bei endogenen RNA-Standards (Aktin, G3-P-DH) ergeben sich Probleme mit verschiedenen Amplifikationsprimern, variierenden Mengen und Schwankungen nach Stimulation. Heterologe externe RNA-Standards sind stabiler in der Expression, aber häufig nicht homolog zur Zielsequenz und weisen eine unterschiedliche Amplifikationseffizienz als das Zielgen auf. Ausgedehnte Sekundärstrukturen der RNA-Standards beeinträchtigen die Umschreibungseffizienz zu cDNA mehr als die Amplifizierung.

Ein weiterer Aspekt zur Etablierung der *Realtime*-PCR stellt die Auswahl geeigneter interner Kontrollen dar. Welches Haushaltsgen sich idealerweise mit Ro/SSA52 koamplizieren lässt, wurde über eine Expressionsanalyse der Haushaltsgenen GAPDH, β 2-MG, G6-P-DH getestet. Bei allen drei Haushaltsgenen bestehen über 24h Schwankungen in der Expression. GAPDH weist das geringste Expressionsniveau, β 2-MG das höchste Expressionsniveau auf. Das geringe

Expressionsniveau von GAPDH ist als günstig anzusehen, nachteilig ist die hohe Schwankungsbreite von Faktor zehn innerhalb von 24h. Die geringsten Abweichungen werden bei β 2-MG gemessen. G6-P-DH wird über 24h nicht konstant exprimiert, es ist in primären Keratinozyten bis nur 8h nachweisbar (siehe auch Abbildung 17). Auf Grund des geringen Expressionsniveaus von GAPDH in primären Keratinozyten wurde eine Koamplifizierung mit Ro/SSA52 favorisiert, das als *low abundance* Gen charakterisiert wurde^{132,133}. Neuere Studien zeigen, dass auch andere Haushaltsgene wie die ribosomale Untereinheit S26 in Expressionsstudien erfolgreich getestet wurden¹³⁴. Daten über eine Koamplifizierung mit Ro/SSA52 gibt es bislang noch nicht.

Die Verwendung von zwei verschiedenen Farbstoffen, LC Red 640 und LC Red 705, machte ein gleichzeitiges Ablaufen mehrerer PCR-Reaktionen als Multiplex-PCR möglich. Bei dieser Art der PCR treten häufig kompetitive Effekte auf, in denen Primer, Polymerasen und Nukleotide untereinander konkurrieren und dadurch unspezifische Nebenreaktionen hervorrufen. In der kompetitiven PCR unterscheidet sich die Effizienz der PCR-Reaktionen. Hierbei definiert der *Slope* das Verhältnis der Amplifikationseffizienz von Target zum Referenzsystem. Optimal ist ein Slope, der in allen Reaktionen gleich groß ist^{135,136}. Zur Vermeidung von kompetitiven PCR-Bedingungen wurden daher kleinere DNA-Abschnitte von Ro/SSA52 und GAPDH (<300bp) amplifiziert. Bei größeren Fragmenten von 600bp treten unerwünschte Effekte auf, die besonders die Amplifizierung von Ro/SSA52 verzögern. In Abbildung 19 wird gezeigt, dass bei einem doppelt so großen Fragment von Ro/SSA52 wie von GAPDH die Multiplex-Reaktion wesentlich langsamer abläuft. Im Ergebnis ist 45-fach weniger PCR-Produkt von Ro/SSA52 nachweisbar. Mit steigender Größe des PCR-Fragmente nehmen inhibitorische Einflüsse auf die PCR-Reaktion zu.

Die hier gezeigten experimentellen Vorarbeiten machen deutlich, dass qPCR als eine sehr sensitive Methode zur Bestimmung der mRNA-Expression von Ro/SSA52 in Keratinozyten anzusehen ist. Mit der Ro/SSA52 *Realtime*-PCR lassen sich reproduzierbare Daten gewinnen. Der Einsatz fluoreszenzmarkierter Primer, *Hybridisation Probes*, erlaubt die Durchführung von Multiplex-PCR-Reaktionen, bei denen DNA-Abschnitte sequenzspezifisch nachgewiesen werden. Der große dynamische Messbereich der *Realtime*-PCR ist anderen bislang verwendeten Verfahren wie dem Northern-Blot oder der konventionellen PCR überlegen. Bei Stabilität entsprechender Standards kann sogar der Nachweis eines einzelnen Moleküls erfolgen.

5.3 Die Effekte von TNF- α auf Ro/SSA52-mRNA in humanen Keratinozyten

TNF- α ist ein Makrophagen-abhängiger Faktor, der eine hämorrhagischer Nekrose in Tumorzellen der Maus, ebenso wie zytotoxische Effekte in humanen Zelllinien auslöst¹³⁷ und dessen Wirkung in der Regulation und Modulation immunologischer Reaktionen beseht. Das Zytokin vermittelt die Freisetzung inflammatorischer Zytokine und von Prostaglandinen; es erhöht die MHC-I-Expression auf T-Lymphozyten und begünstigt die T-Lymphozytenproliferation. Zudem ist TNF- α als neutrophiler Degranulationsfaktor sowie als Faktor in der B-Lymphozytenproliferation und Immunglobulinsynthese bekannt¹³⁸. Die durch TNF- α vermittelten Entzündungen können sich in einer Phase hoher Krankheitsaktivität sowohl lokal als auch systemisch manifestieren. SLE-Patienten weisen deutlich höhere Konzentrationen an TNF- α als gesunde Personen auf, zusätzlich sind Entzündungsparameter wie das C-reaktive Protein (CRP) erhöht¹³⁹. TNF- α induziert in primären Keratinozyten eine transiente Hochregulation von Ro/SSA52-mRNA. Der TNF- α -Effekt ist nach 4h am stärksten und zeigt eine langsame Abschwächung innerhalb von 24h (Abbildung 24). Verschiedene gesunde Personen sind dabei unterschiedlich empfindlich auf die Behandlung mit dem Zytokin. Bei der Hälfte der untersuchten gesunden Personen (n=6) lässt sich eine Hochregulation zeigen, die 20-fach über dem Normalniveau liegt. Diese gelten als *Intermediate Responder*, bei denen sich in Keratinozyten mit dem vorliegenden qPCR-Profil Expressionsänderungen im Bereich von 600 - 700 Molekülen messen lassen. Bei einer Erweiterung des Referenzbereichs um zwei Logarithmus-Stufen wäre der Nachweis von weniger als 10 Molekülen pro Zelle möglich. Bei den sechs verbleibenden gesunden Personen sind Maxima in der mRNA-Expression von Ro/SSA52 messbar, die 1,5-fach über der Kontrolle liegen, so dass diese als *Low Responder* gelten.

In der zur Kontrolle des Effektes verwendeten humanen Hautzelllinie HaCaT lässt sich das Expressionsprofil bestätigen: Ein Expressionsmaximum wird auch hier nach 4h detektiert, danach ist eine Verringerung bis 24h messbar (Abbildung 22). Die Zellen der Zelllinie weisen im Unterschied zu primären Keratinozyten ein viel höheren *Peak* und auch einen viel schnelleren Rückgang in der Expression auf. Anzunehmen ist, dass die mRNA-Induktion von Ro/SSA52 auf posttranskriptionellen Modifikationen beruht, die zu mRNA-Molekülen mit verlängerter Halbwertszeit führen. Darüber hinaus ist eine Aktivierung von TNF-RI- und TNF-RII-Rezeptoren

an der mRNA-Regulation von Ro/SSA52 beteiligt. Der Einfluss genetischer Faktoren wie der HLA-Region DRB1 und Promotorpolymorphismen des TNF- α -Gens (-308A) werden als wesentlich an der Ethnologie des SLE erachtet¹⁴⁰⁻¹⁴². Dieser Promotorpolymorphismus war bei Patienten mit SLE mit einer hohen Promotoraktivität und einem erhöhten TNF- α -Serumspiegel assoziiert¹⁴³.

Neben Faktoren, die die mRNA-Induktion verstärken, sind auch hemmende Einflüsse von Bedeutung. Eine Ursache der geringen Sensitivität von sechs gesunden Personen auf die Stimulation mit TNF- α ist durch die Aktivität von *Shedding-Proteinen* bedingt, die extrazelluläre Bereiche von membranständigen Proteinen spalten. Proteinasen wie ADAM17 (*TNF- α Converting Enzyme*) sind maßgeblich an der Prozessierung von TNF und TNF-Rezeptoren von der Zelloberfläche beteiligt¹⁴⁴. Ein weiterer Grund für die fehlende Ro/SSA52-mRNA-Induktion durch TNF- α liegt in der langen Kultivierungszeit der Keratinozyten (sieben Tage) begründet, die die Empfänglichkeit auf eine Stimulation reduziert haben könnte.

Ob die TNF- α -abhängige Induktion von Ro/SSA52-mRNA einen spezifischen Effekt darstellt, wurde durch Analyse der mRNA-Expression von Sm-D1 untersucht. Diese wird wesentlich weniger durch TNF- α beeinflusst als die von Ro/SSA52 (siehe auch Abbildung 29). Da Sm-D1 einen aktiven Bestandteil bei *Splicing*-Vorgängen von Introns von prä-mRNA zu mRNA darstellt, ist eine direkte Beteiligung an TNF- α -vermittelten Entzündungsprozessen unwahrscheinlich. Weitere Kontrollexperimente sind notwendig, da Ergebnisse über die Proteinexpression von Sm-D1 fehlen. Die bisherigen Experimente lassen daher noch keine abschließende Aussage zu dieser Frage zu.

Es wurde gezeigt, dass TNF- α auch einen Effekt auf die Induktion des intrazellulären Ro/SSA52-Proteins aufweist¹²⁷. Dieser erreicht nach 24h ein Maximum und führt dazu, dass Ro/SSA52-Proteine im Zellkern und Zytoplasma akkumulieren. Abhängig von der Verfügbarkeit intrazellulärer Transportproteine kann Ro/SSA52 auf die Zellmembran von Zellen transferiert werden und somit einen Einfluss auf die Synthese von Transportproteinen ausüben. Durch Dissoziation von Proteinkomponenten (Ro/SSA52, Ro/SSA60, La/SSB) und hY-RNA liegt ungebundenes Ro/SSA52 in Zytoplasma vor und wird von spezifischen Transportproteinen erkannt. Für RNA ist ein Transport zur Zellmembran unwahrscheinlich, da diese durch intrazelluläre RNasen viel stärker abgebaut wird.

5.3.1 TNF- α -Rezeptoren sind an der Ro/SSA52-mRNA-Regulation beteiligt

Die Effekte von TNF- α werden über 2 verschiedene Oberflächenrezeptoren, TNF-RI und TNF-II vermittelt. Die DD definiert die erste Gruppe von Rezeptoren, die zur Aktivierung von Kaspasen führen und mittels des Transkriptionsfaktors NF- κ B die Induktion von Apoptose bedingt. Die zweite Gruppe von Rezeptorproteinen, zu der TNF-RII zählt, kann direkt an zytoplasmatische Bindungsproteine binden ⁸¹. Die Stimulation von TNF-RII induziert die Rekrutierung von Apoptose-inhibierenden Proteinen.

Die Verwendung von neutralisierenden Antikörpern gegen TNF-RI und TNF-RII bringt den Nachweis, dass beide Rezeptoren an der TNF- α -abhängigen Hochregulation von Ro/SSA52 in primären Keratinozyten beteiligt sind. Über TNF-RI wird Ro/SSA52-mRNA induziert, da der Antikörper zu einer Reduktion der mRNA-Expression führt. TNF-RII ist zusätzlich in die Regulation eingebunden, da durch die Neutralisierung des Rezeptors eine vierfache Erhöhung von Ro/SSA52-mRNA nachweisbar ist (Abbildung 26). Die Hochregulation spricht für eine inhibitorische Funktion dieses Rezeptors. TNF-RII wirkt als ein negativer Regulator, der eine unkontrolliert stark ablaufende Reaktion moduliert. Dass durch die Blockade beider TNF- α -Rezeptoren die mRNA-Induktion von Ro/SSA52 fast vollständig gehemmt wird, zeigt, dass TNF-RI und TNF-RII wesentliche funktionelle Elemente an der Induktion von Ro/SSA52-mRNA darstellen. Um die Beteiligung von TNF-Rezeptoren an der Ro/SSA52-mRNA-Regulation weitergehend zu charakterisieren, ist es notwendig, *downstream* der Rezeptoren liegende Signaltransduktionswege wie die von TRAF-Proteinen (für TNF-RII) und FADD/TRADD-Proteinen (für TNF-RI) zu untersuchen.

Ein anderer Aspekt betrifft die positive Korrelation der Expression von Ro/SSA und La/SSB in der Haut mit Anti-Ro/SSA- und La/SSB-Autoantikörpern im Serum von SLE-Patienten ¹⁰⁵. Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden in der Haut von Lupuspatienten, unabhängig von Alter bzw. Geschlecht bis zu 2000-fache Expressionsunterschiede von Ro/SSA und La/SSB detektiert, ohne Angaben über die zelluläre Lokalisation zu machen ¹³³. Eine Therapie mit TNF- α -Blockern geht nicht mit einer Änderung der Serumkonzentration von Anti-Ro/SSA-Autoantikörpern einher ¹⁴⁵, da organbedingte Entzündungen durch die Anti-TNF- α -Therapie positiv beeinflusst werden, Autoantikörper-Konzentrationen aber unbeeinflusst blieben ^{139,146}. Unabhängig davon sind Therapien, die TNF- α und/oder TNF- α -Rezeptoren blockieren, mit

Nebenwirkungen verbunden. Nachgewiesen sind die Entstehung von antinukleären Antikörpern, Anti-dsDNA- und Anti-Kardiolipin-Antikörpern sowie das Auftreten von Lupus-ähnlichen Symptomen. TNF- α -Blocker sollten deshalb bei Patienten mit SLE zurückhaltend und zeitlich befristet als anti-inflammatorische Therapie eingesetzt werden. Bei der Auswahl geeigneter Patienten stehen die Lupusnephritis und ausgeprägte Hautmanifestationen im Vordergrund. Bisher ist beim Menschen und im Mausmodell ungeklärt, welchen Stellenwert TNF- α in den pathogenetischen Signalwegen von Immunkomplexen, Fc-Rezeptoren und Zytokinen einnimmt^{101,102}. Eine Erklärung der Entstehung von Autoantikörpern unter der Anti-TNF- α -Therapie ist die gesteigerte Funktionalität von T-Zell-Rezeptoren und die Wirkung von TNF- α als Überlebensfaktor. Durch die Blockierung des Zytokins erfolgt via Apoptose eine nukleäre Speicherung von Autoantigenen, die T-Zellen präsentiert werden. Eine verbesserte Stimulierbarkeit von T-Zellen würde zu einer effektiveren T-Zell-Unterstützung von B-Lymphozyten führen¹⁴⁷.

5.3.2 Ro/SSA52-mRNA wird durch TNF- α unabhängig von Apoptose induziert

Die UVB-Bestrahlung *in vitro* führt in Keratinozyten zu der Entstehung von apoptotischen Blebs, in denen Ro/SSA- und La/SSB-Proteine akkumulieren. Die Akkumulation dieser Proteine auf der Oberfläche der Blebs führt zu der verstärkten Bindung von Autoantikörpern³³. Im Gegensatz zu der Exposition von UVB wirkt TNF- α in Keratinozyten nicht proapoptotisch, sondern antiapoptotisch. FACS-Analysen belegen, dass nach 24h der Anteil apoptotischer Keratinozyten von 18% auf 15% zurückgeht (Abbildung 32). Hierbei wurde der Anteil frühzeitig apoptotischer Zellen mit unter 1% bestimmt. In einem zweiten Verfahren wurden durch Zellsortierung Keratinozytenzellen nach Annexin-V-Färbung in eine lebende und frühzeitig apoptotische Zellfraktion separiert. Der Anteil lebender Zellen beträgt 90,4%, der Anteil frühzeitig apoptotischer Zellen 9,6% (Abbildung 27). Der Gegensatz zu dem durch FACS-Analysen bestimmten Anteil von unter 1% (Abbildung 33) wird als ein interindividueller Unterschied gesunder Spender angenommen. Weiterhin sind artifizielle Membranschäden durch das Ablösen der Zellen mit Proteasen zu berücksichtigen. Primäre Keratinozyten aller 12 untersuchten Personen wurden unterschiedlich lange mit Accutase[®] behandelt, um ein vollständiges Ablösen von der Kulturflasche zu erreichen.

Die *Realtime*-PCR zeigt, dass Ro/SSA52-mRNA unabhängig von Apoptose induziert wird. Die Ro/SSA52-mRNA-Induktion läuft in vitalen Zellen 1,5-fach schwächer als im Vergleich zu Kontrollen ab, in denen spontan apoptotische Zellen mit eingeschlossen waren (Abbildung 28). Es ist daher wahrscheinlich, dass auf Grund der erhöhten mRNA-Synthese vermehrt Ro/SSA52-Proteine auf die Zellmembran intakter, lebender Zellen gelangen. Der Proteinnachweis von Ro/SSA52 auf lebenden Keratinozyten konnte bislang aber nicht erbracht werden, so dass das es notwendig ist, entsprechend sensitive Nachweisverfahren zu etablieren.

Für weitere Zellsortierungs-Studien würde es sich anbieten, die *Realtime*-PCR auf der Grundlage von Gesamt-RNA durchzuführen, das die Ausbeute an mRNA in frühzeitig apoptotischen Zellen sehr gering war. Unterschiede in der mRNA-Expression von Ro/SSA52 bei gesunden Personen und SLE-Patienten konnten nicht in dieser Arbeit nicht analysiert werden, da die Kultivierung von Keratinozyten von SLE-Patienten auf Grund einer hohen Spontanapoptoserate nicht erfolgreich verlief. Es ist denkbar, dass diese Zellen aufgrund genetischer Unterschiede empfänglicher für eine TNF- α -induzierte Ro/SSA52-mRNA- und Proteinexpression als die gesunder Personen sind. Durch eine verstärkte Membranexpression wäre auch eine Freisetzung von Ro/SSA52-Autoantigenen in den Extrazellularraum möglich. Zur weiteren Charakterisierung werden daher Methoden benötigt, die den Nachweis der Ro/SSA mRNA- und Proteinexpression auf Hautzellen von Patienten belegen.

5.4 Auswirkungen von Störungen der TNF- α -Funktion

Eine Minderung der Funktionalität im TNF- α /TNF- α -Rezeptorsystem kann ein aggressives Autoimmunverhalten auslösen oder verstärken, so dass die Entwicklung eines spontanen Krankheitsgeschehens begünstigt wird. Die Durchbrechung von Toleranz gegen nukleäre Antigene wird als Basis für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wie dem SLE angesehen. Die enge Verbindung des TNF- α - Gens mit dem MHC-Gen sowie die Heterogenität der TNF- α -Spiegel in Tiermodellen und bei Patienten mit SLE erlauben keine klare Einschätzung der Rolle von TNF- α . In HLA-DR3-positiven SLE-Patienten und MRL-lpr/lpr- sowie BxSB-Mäusen ⁹⁰ werden ähnlich hohe Titer des TNF- α -Proteins nachgewiesen. Epidemiologische Untersuchungen bei Patienten mit SLE bestätigen eine enge Bindung von HLA-DR2- und HLA-DR3-Haplotypen. Da das TNF- α -Gen in der Region lokalisiert ist, die für

HLA-Gene kodiert, wird dieses als ein genetischer Faktor in der Ätiologie des humanen SLE angesehen¹⁴⁰. HLA-DR2-positive SLE-Patienten weisen geringe TNF- α -Serumkonzentrationen auf und besitzen eine hohe Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer Lupusnephritis. Im Gegensatz hierzu ist das Auftreten von Polymorphismen in der Promoterregion (308-A) von TNF- α mit einer hohen Genaktivität assoziiert¹⁴³. Eine erhöhte Serum-Konzentration von TNF- α ist mit der Krankheitsaktivität korreliert¹⁴². TNF- α -Promotorpolymorphismen (TNF2) sind zudem mit einer erhöhten Anti-Ro/SSA- und Anti-La/SSAB-Autoantikörperproduktion sowie mit einer erhöhten Frequenz von HLA-DR3 verbunden¹. Es ist ungeklärt, ob TNF- α bei der Entwicklung unterschiedlicher Autoimmunreaktionen biologische Effekte hervorbringt, oder ob die TNF- α -vermittelte Wirkung darin besteht, den Verlauf und die Ausprägung von Gewebeschäden zu modifizieren. In Bezug auf rheumatische Autoimmunerkrankungen gilt als akzeptiert, dass ein Absinken der physiologischen TNF- α -Synthese zu einem gestörten Gleichgewicht des Immunsystems führt, das das Auftreten von antinukleären Antikörpern und das Fortschreiten der Erkrankung verstärken kann.

Die Applikation von TNF- α an vier Monate alte, nicht erkrankte (NZB/NZW)-Mäuse verursacht eine Verzögerung von Entzündungsprozessen in der Niere, der Krankheitsausbruch wird verlangsamt. Eine Hyperreaktivität von B-Zellen und eine Autoantikörperantwort sind hier selten¹⁴⁸. Studien zeigen einen Konzentrations- und zeitabhängigen Effekt von TNF- α auf die Pathogenese der renalen Erkrankung: Geringe Konzentrationen von rekombinantem TNF- α hatte bei jungen Mäusen (2-4 Monate) keine eindeutigen Auswirkungen auf den Verlauf der vermehrten Proteinausscheidung, bei älteren Mäusen hingegen führt TNF- α zu einer Erhöhung der Proteinausscheidungsrate sowie der Mortalität¹⁴⁹. Die Beschleunigung der Nierenfunktionsstörungen nach *Low Dose*-TNF- α -Gabe zeigt, dass TNF- α eine pathogenetische Rolle für die Entwicklung einer Nephritis einnimmt¹⁵⁰.

5.5 TNF- α induziert in Keratinozyten die Freisetzung der sekundären proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8

TNF- α wird als *primäres* Zytokin bezeichnet, da es die Freisetzung anderer proinflammatorischen Zytokine beeinflusst. Es induziert die Synthese von sekundären

inflammatorischen Zytokinen, von Prostaglandinen und Wachstumsfaktoren. Diese Moleküle wirken als kostimulatorische Faktoren für die Aktivierung von Lymphozyten und APC sowie bei der Aktivierung von akute-Phase-Entzündungsproteinen. Die Auswertung des Zytokin-ELISA legt nahe, dass in Keratinozyten Entzündungsreaktionen ablaufen, die die Induktion der mRNA von Ro/SSA52 begleiten. Das wird dadurch deutlich, dass TNF- α in primären Keratinozyten die Freisetzung von IL-6, IL-8 und auch seine eigene, vermehrte-Freisetzung induziert (Abbildung 31). Die Freisetzung der Proteine erfolgt zeitabhängig: Nach 4h ist der Effekt von TNF- α auf IL-6 und IL-8 stärker nachweisbar als nach 24h. IL-6 wird nach 4h siebenfach höher nachgewiesen, während es nach 24h noch vierfach erhöht ist. IL-8 findet sich nach 4h 20-fach mehr im Überstand und liegt nach 24h noch dreifach vermehrt vor. Die TNF- α -Proteinfreisetzung unterliegt einer Kinetik, bei der ein Anstieg bis 24h messbar ist. Nach 4h ist das Protein 50-fach erhöht, die Konzentration steigt bis 24h auf den 100-fachen Wert der Kontrolle an. Neben proinflammatorischen Zytokinen wird auch das antiinflammatorische Interleukin IL-10 durch TNF- α induziert, dessen Hochregulation deutlich aber schwächer als die von IL-6 oder IL-8 ausfällt. In Expressionsstudien wurde gezeigt, dass TNF- α in der Haut von Patienten mit SCLE während einer immunsuppressiven Therapie erhöht nachweisbar ist¹⁵¹ und der Hauptanteil des von Keratinozyten produzierten TNF- α in die Epidermis sowie die Dermis freigesetzt wird. Durch Behandlung mit TNF- α -Blockern lassen sich Hautmanifestationen bei Patienten mit photosensitivem Lupus erythematoses positiv beeinflussen¹⁰³. Die hohen Konzentrationen von IL-8, IL-6 und TNF- α in dem Zeitfenster, in den auch Ro/SSA52-mRNA hochreguliert wird, sprechen für ausgeprägte Entzündungen bei Ro/SSA52-Autoantigen-vermittelten Immunreaktionen.

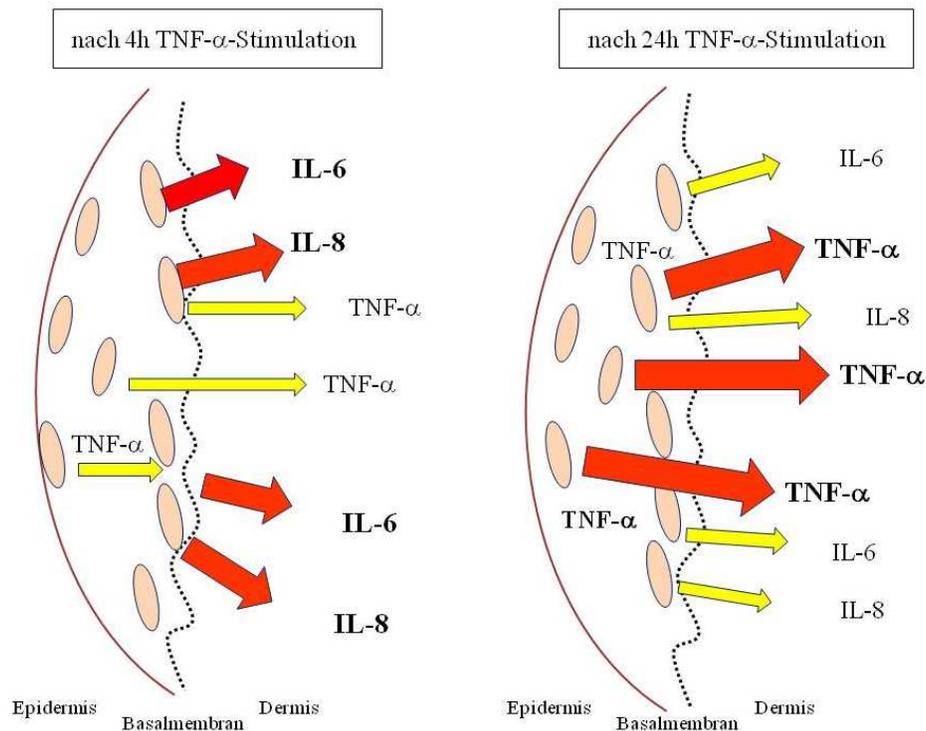


Abbildung 35 Die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 werden in primären Keratinozyten nach 4h, TNF- α wird nach 24h maximal freigesetzt und sind in hohen Konzentrationen in Kulturüberständen von Keratinozyten nachweisbar.

5.6 Zusammenfassung

Der systemische Lupus erythematoses ist eine klassische Autoimmunerkrankung, die unterschiedliche Organe betrifft und durch das Vorkommen einer Vielzahl von Autoantikörpern, die u.a. gegen nukleäre und zytoplasmatische Autoantigene gerichtet sind, gekennzeichnet ist. Autoantikörper gegen das nukleäre Ribonukleoprotein Ro/SSA sind überdurchschnittlich häufig mit photosensitiven Hauterscheinungen assoziiert und werden in 50% der Seren von Patienten mit SLE sowie in mehr als 80% der Seren von Patienten mit Sjögren-Syndrom, subakut kutanem Lupus sowie neonatalem Lupus detektiert. Die dabei entstehenden Ro/SSA-Immunkomplexe lassen sich insbesondere in der Epidermis von SLE-Patienten nachweisen^{104,105}. Zytokine wie TNF- α sind an der Membranexpression des intrazellulären Ro/SSA52-Proteins in humanen Keratinozyten beteiligt^{30,106}. In dieser Arbeit wurde eine Methode zur quantitativen Bestimmung

der Ro/SSA52-mRNA-Expression in humanen Keratinozyten etabliert. Durch die *Realtime*-PCR können mittels relativer Quantifizierung und interner Kontrolle durch GAPDH hochsensitiv Ro/SSA52-mRNA-Produkte detektiert werden. Das Maximum der Ro/SSA52-mRNA-Expression wird in primären Keratinozyten wie auch in der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT nach 4h erreicht. Die Keratinozyten verschiedener gesunder Personen sind hierbei unterschiedlich empfindlich auf die Behandlung mit dem Zytokin. In der HaCaT-Zelllinie lässt sich eine deutlich höhere Ro/SSA52-mRNA-Expression als in primären Zellen beobachten. Die Induktion der Ro/SSA52-mRNA-Expression wird über den TNF-Rezeptor I vermittelt, während der TNF-Rezeptor II die über den TNF-Rezeptor I hervorgerufene Expressionserhöhung von Ro/SSA52-mRNA unterdrückt. TNF- α induziert die Freisetzung von sekundären proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IL-8 sowie die des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. Darüber hinaus fördert TNF- α in primären Keratinozyten nach 24h Stimulation seine eigene vermehrte Freisetzung und ist 100-fach erhöht nachweisbar. IL-6 und IL-8 weisen eine maximale Freisetzung schon nach 4h auf und sind siebenfach bzw. 20-fach erhöht detektierbar.

Die *Realtime*-PCR ist eine sehr sensitive Methode zur Bestimmung der mRNA-Expression des Ro/SA52-Autoantigens in Keratinozyten, die anderen bislang verwendeten Methoden wie der konventionelle PCR oder dem Northern-Blot überlegen ist. Die Effekte von TNF- α auf die Induktion von Ro/SSA52-mRNA zusammen mit schon publizierten Daten zur Ro/SSA52-Proteinexpression^{30,127} deutet auf eine bedeutende Rolle von TNF- α bei Anti-Ro/SSA-assoziierten, inflammatorischen Hautmanifestationen bei Patienten mit Lupus erythematoses hin. Der wesentliche pathophysiologische Einfluss des Zytokins lässt den therapeutischen Einsatz von TNF- α -Blockern bei photosensitiven, Anti-Ro/SSA-assoziierten kutanen Formen des Lupus erythematoses vielversprechend erscheinen.

5.7 Ausblick

An der Induktion von Ro/SSA52-mRNA in Keratinozyten können unterschiedliche Signalwege beteiligt sein. So sind neben einer TNF- α -Rezeptoraktivierung auch posttranslationelle Veränderungen möglich, durch die Ro/SSA52-mRNA hochreguliert wird. Ein Mechanismus, der zu einer Verringerung in der mRNA-Expression führt, sind auf der Zelloberfläche befindliche

Shedding-Proteine, die extrazelluläre Bereiche membranständiger Proteinen spalten. Da in der Hälfte der untersuchten gesunden Personen die Empfänglichkeit von primären Keratinozyten für TNF- α sehr gering war, kann eine Analyse des TNF- α -Genotyps auf Promotorpolymorphismen wie an Position 308A weiteren Aufschluss liefern. Diese sind bei SLE-Patienten mit hohen TNF- α -Serumspiegeln und einer hohen Genaktivität assoziiert. In künftigen Studien werden damit weitergehende Aussagen über die Empfänglichkeit von Keratinozyten auf TNF- α möglich. Darüber hinaus ist die Charakterisierung weiterer Signalproteine wie TRAF-Proteine (für TNF-RII) und FADD/TRADD-Proteine (für TNF-RI) in Bezug auf eine Beteiligung an der Ro/SSA52-Regulation von wesentlicher Bedeutung. Die hohe Apoptoserate von Keratinozyten, die aus Lupusläsionen von SLE-Patienten entnommen wurden, macht bislang eine stabile Zellkultivierung unmöglich. Durch die Ko-Kultivierung mit *feed-layer*-Zellen wie z.B. Fibroblasten besteht die Möglichkeit, diese Keratinozyten zuverlässig in Kultur zu halten. Perspektivisch kann hierdurch die Analyse der Ro/SSA52-Expression auf mRNA- und Proteinebene aus beliebigen Hautarealen von Patienten erfolgen. Dies würde es ermöglichen, dass der Effekt von TNF- α und anderen möglichen pathogenen Faktoren an Keratinozyten von SLE-Patienten im Vergleich zu Keratinozyten von Gesunden untersucht werden kann.

6 Literaturverzeichnis

1. Wilson AG, Gordon C, di Giovine FS, et al. A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumor necrosis factor alpha. *Eur J Immunol.* 1994;24:191-195.
2. Lin JH, Dutz JP, Sontheimer RD, Werth VP. Pathophysiology of cutaneous lupus erythematosus. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2007;33:85-106.
3. Namjou B, Kilpatrick J, Harley JB. Genetics of clinical expression in SLE. *Autoimmunity.* 2007;40:602-612.
4. Ballestar E, Esteller M, Richardson BC. The epigenetic face of systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2006;176:7143-7147.
5. Kurien BT, Scofield RH. Autoantibody determination in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol.* 2006;64:227-235.
6. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1725.
7. de Vlam K, De Keyser F, Verbruggen G, et al. Detection and identification of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. *Clin Exp Rheumatol.* 1993;11:393-397.
8. Gardner GC, Kadel NJ. Ordering and interpreting rheumatologic laboratory tests. *J Am Acad Orthop Surg.* 2003;11:60-67.
9. Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol.* 1989;44:93-151.
10. Krieg AM. CpG DNA: a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus? *J Clin Immunol.* 1995;15:284-292.
11. Medzhitov R. CpG DNA: security code for host defense. *Nat Immunol.* 2001;2:15-16.
12. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2003;349:1526-1533.

13. Riemekasten G, Marell J, Trebeljahr G, et al. A novel epitope on the C-terminus of SmD1 is recognized by the majority of sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1998;102:754-763.
14. Sawalha AH, Harley JB. Antinuclear autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 2004;16:534-540.
15. von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum.* 1995;24:323-358.
16. Clark G, Reichlin M, Tomasi TB, Jr. Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1969;102:117-122.
17. Hiepe F, Dorner T, Burmester G. Antinuclear antibody- and extractable nuclear antigen-related diseases. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000;123:5-9.
18. Sontheimer RD, Maddison PJ, Reichlin M, Jordon RE, Stastny P, Gilliam JN. Serologic and HLA associations in subacute cutaneous lupus erythematosus, a clinical subset of lupus erythematosus. *Ann Intern Med.* 1982;97:664-671.
19. Buyon JP, Ben-Chetrit E, Karp S, et al. Acquired congenital heart block. Pattern of maternal antibody response to biochemically defined antigens of the SSA/Ro-SSB/La system in neonatal lupus. *J Clin Invest.* 1989;84:627-634.
20. Slobbe RL, Pruijn GJ, Van Venrooij WJ. Ro (SS-A) and La (SS-B) ribonucleoprotein complexes: structure, function and antigenicity. *Ann Med Interne (Paris).* 1991;142:592-600.
21. Pourmand N, Wahren-Herlenius M, Gunnarsson I, et al. Ro/SSA and La/SSB specific IgA autoantibodies in serum of patients with Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 1999;58:623-629.
22. Burnham TK, Neblett TR, Fine G. The Application of the Fluorescent Antibody Technic to the Investigation of Lupus Erythematosus and Various Dermatoses. *J Invest Dermatol.* 1963;41:451-456.
23. Everett MA, Olson RL. Response of Cutaneous Lupus Erythematosus to Ultraviolet Light. *J Invest Dermatol.* 1965;44:133-138.

24. Golan TD, Elkon KB, Gharavi AE, Krueger JG. Enhanced membrane binding of autoantibodies to cultured keratinocytes of systemic lupus erythematosus patients after ultraviolet B/ultraviolet A irradiation. *J Clin Invest.* 1992;90:1067-1076.
25. Furukawa F, Kanauchi H, Imamura S. Susceptibility to UVB light in cultured keratinocytes of cutaneous lupus erythematosus. *Dermatology.* 1994;189 Suppl 1:18-23.
26. LeFeber WP, Norris DA, Ryan SR, et al. Ultraviolet light induces binding of antibodies to selected nuclear antigens on cultured human keratinocytes. *J Clin Invest.* 1984;74:1545-1551.
27. Furukawa F, Ikai K, Matsuyoshi N, Shimizu K, Imamura S. Relationship between heat shock protein induction and the binding of antibodies to the extractable nuclear antigens on cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1993;101:191-195.
28. Saegusa J, Kawano S, Koshiba M, et al. Oxidative stress mediates cell surface expression of SS-A/Ro antigen on keratinocytes. *Free Radic Biol Med.* 2002;32:1006-1016.
29. Zhang J, Xu Z, Jin J, Zhu T, Ma S. Induction of Ro/SSA antigen expression on keratinocyte cell membrane by heat shock and phorbol 12-myristate 13-acetate as well as estradiol and ultraviolet B. *J Dermatol Sci.* 2000;24:92-98.
30. Dorner T, Hucko M, Mayet WJ, Trefzer U, Burmester GR, Hiepe F. Enhanced membrane expression of the 52 kDa Ro(SS-A) and La(SS-B) antigens by human keratinocytes induced by TNF alpha. *Ann Rheum Dis.* 1995;54:904-909.
31. Furukawa F, Kashihara-Sawami M, Lyons MB, Norris DA. Binding of antibodies to the extractable nuclear antigens SS-A/Ro and SS-B/La is induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet light (UVL): implications for the pathogenesis of photosensitive cutaneous lupus. *J Invest Dermatol.* 1990;94:77-85.
32. Kawashima T, Zappi EG, Lieu TS, Sontheimer RD. Impact of ultraviolet irradiation on expression of SSA/Ro autoantigenic polypeptides in transformed human epidermal keratinocytes. *Lupus.* 1994;3:493-500.
33. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med.* 1994;179:1317-1330.

34. Inaba K, Turley S, Yamaide F, et al. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med.* 1998;188:2163-2173.
35. van Venrooij WJ, Slobbe RL, Pruijn GJ. Structure and function of La and Ro RNPs. *Mol Biol Rep.* 1993;18:113-119.
36. Provost TT. Lupus band test. *Int J Dermatol.* 1981;20:475-481.
37. Natali PG, Tan EM. Experimental skin lesions in mice resembling systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1973;16:579-589.
38. Norris DA, Ryan SR, Fritz KA, et al. The role of RNP, Sm, and SS-A/Ro-specific antisera from patients with lupus erythematosus in inducing antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of targets coated with nonhistone nuclear antigens. *Clin Immunol Immunopathol.* 1984;31:311-320.
39. Furukawa F, Itoh T, Wakita H, et al. Keratinocytes from patients with lupus erythematosus show enhanced cytotoxicity to ultraviolet radiation and to antibody-mediated cytotoxicity. *Clin Exp Immunol.* 1999;118:164-170.
40. Norris DA, Lee LA. Pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. *Clin Dermatol.* 1985;3:20-35.
41. Nickoloff BJ, Turka LA. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol Today.* 1994;15:464-469.
42. Li J, Farthing PM, Thornhill MH. Cytokine regulation of major histocompatibility complex antigen expression by human oral and skin keratinocytes. *Arch Oral Biol.* 1996;41:533-538.
43. Carr MM, McVittie E, Guy K, Gawkrödger DJ, Hunter JA. MHC class II antigen expression in normal human epidermis. *Immunology.* 1986;59:223-227.
44. Williams IR, Ort RJ, Kupper TS. Keratinocyte expression of B7-1 in transgenic mice amplifies the primary immune response to cutaneous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:12780-12784.

45. Ashany D, Hines J, Gharavi A, Mouradian J, Elkon KB. Analysis of autoantibody production in SCID-systemic lupus erythematosus (SLE) chimeras. *Clin Exp Immunol.* 1992;88:84-90.
46. Pruijn GJ, Simons FH, van Venrooij WJ. Intracellular localization and nucleocytoplasmic transport of Ro RNP components. *Eur J Cell Biol.* 1997;74:123-132.
47. O'Brien CA, Margelot K, Wolin SL. Xenopus Ro ribonucleoproteins: members of an evolutionarily conserved class of cytoplasmic ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:7250-7254.
48. Boire G, Craft J. Human Ro ribonucleoprotein particles: characterization of native structure and stable association with the La polypeptide. *J Clin Invest.* 1990;85:1182-1190.
49. Boire G, Gendron M, Monast N, Bastin B, Menard HA. Purification of antigenically intact Ro ribonucleoproteins; biochemical and immunological evidence that the 52-kD protein is not a Ro protein. *Clin Exp Immunol.* 1995;100:489-498.
50. Peek R, Pruijn GJ, van der Kemp AJ, van Venrooij WJ. Subcellular distribution of Ro ribonucleoprotein complexes and their constituents. *J Cell Sci.* 1993;106 (Pt 3):929-935.
51. Kelekar A, Saitta MR, Keene JD. Molecular composition of Ro small ribonucleoprotein complexes in human cells. Intracellular localization of the 60- and 52-kD proteins. *J Clin Invest.* 1994;93:1637-1644.
52. Simos G, Hurt EC. Nucleocytoplasmic transport: factors and mechanisms. *FEBS Lett.* 1995;369:107-112.
53. Melchior F, Paschal B, Evans J, Gerace L. Inhibition of nuclear protein import by non-hydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J Cell Biol.* 1993;123:1649-1659.
54. Moore MS, Blobel G. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature.* 1993;365:661-663.
55. Newmeyer DD, Forbes DJ. Nuclear import can be separated into distinct steps in vitro: nuclear pore binding and translocation. *Cell.* 1988;52:641-653.
56. Simons FH, Pruijn GJ, van Venrooij WJ. Analysis of the intracellular localization and assembly of Ro ribonucleoprotein particles by microinjection into *Xenopus laevis* oocytes. *J Cell Biol.* 1994;125:981-988.

57. Michael WM, Choi M, Dreyfuss G. A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell*. 1995;83:415-422.
58. Jarmolowski A, Boelens WC, Izaurralde E, Mattaj IW. Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *J Cell Biol*. 1994;124:627-635.
59. Izaurralde E, Mattaj IW. RNA export. *Cell*. 1995;81:153-159.
60. Fischer U, Michael WM, Luhrmann R, Dreyfuss G. Singla-mediated nuclear export pathways of proteins and RNAs. *Trends Cell Biol*. 1996;6:290-293.
61. Ben-Chetrit E, Chan EK, Sullivan KF, Tan EM. A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. *J Exp Med*. 1988;167:1560-1571.
62. Yamagata H, Harley JB, Reichlin M. Molecular properties of the Ro/SSA antigen and enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibody. *J Clin Invest*. 1984;74:625-633.
63. Elkon KB, Jankowski PW. Fine specificities of autoantibodies directed against the Ro, La, Sm, RNP, and Jo-1 proteins defined by two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting. *J Immunol*. 1985;134:3819-3824.
64. Chan EK, Hamel JC, Buyon JP, Tan EM. Molecular definition and sequence motifs of the 52-kD component of human SS-A/Ro autoantigen. *J Clin Invest*. 1991;87:68-76.
65. Deutscher SL, Harley JB, Keene JD. Molecular analysis of the 60-kDa human Ro ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:9479-9483.
66. Wolin SL, Steitz JA. Genes for two small cytoplasmic Ro RNAs are adjacent and appear to be single-copy in the human genome. *Cell*. 1983;32:735-744.
67. Wolin SL, Steitz JA. The Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins: identification of the antigenic protein and its binding site on the Ro RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81:1996-2000.
68. Slobbe RL, Pluk W, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. Ro ribonucleoprotein assembly in vitro. Identification of RNA-protein and protein-protein interactions. *J Mol Biol*. 1992;227:361-366.

69. Itoh K, Itoh Y, Frank MB. Protein heterogeneity in the human Ro/SSA ribonucleoproteins. The 52- and 60-kD Ro/SSA autoantigens are encoded by separate genes. *J Clin Invest.* 1991;87:177-186.
70. Berg JM. Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science.* 1986;232:485-487.
71. Kouzarides T, Ziff E. The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature.* 1988;336:646-651.
72. Takahashi M, Cooper GM. ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. *Mol Cell Biol.* 1987;7:1378-1385.
73. Elagib KE, Tengner P, Levi M, et al. Immunoglobulin variable genes and epitope recognition of human monoclonal anti-Ro 52-kd in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1999;42:2471-2481.
74. Chan EK, Di Donato F, Hamel JC, Tseng CE, Buyon JP. 52-kD SS-A/Ro: genomic structure and identification of an alternatively spliced transcript encoding a novel leucine zipper-minus autoantigen expressed in fetal and adult heart. *J Exp Med.* 1995;182:983-992.
75. Itoh Y, Itoh K, Frank MB, Reichlin M. Autoantibodies to the Ro/SSA autoantigen are conformation dependent. II: Antibodies to the denatured form of 52 kD Ro/SSA are a cross reacting subset of antibodies to the native 60 kD Ro/SSA molecule. *Autoimmunity.* 1992;14:89-95.
76. Frank MB, Itoh K, Fujisaku A, Pontarotti P, Mattei MG, Neas BR. The mapping of the human 52-kD Ro/SSA autoantigen gene to human chromosome 11, and its polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 1993;52:183-191.
77. Espinosa A, Zhou W, Ek M, et al. The Sjogren's syndrome-associated autoantigen Ro52 is an E3 ligase that regulates proliferation and cell death. *J Immunol.* 2006;176:6277-6285.
78. Xue D, Shi H, Smith JD, et al. A lupus-like syndrome develops in mice lacking the Ro 60-kDa protein, a major lupus autoantigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:7503-7508.
79. Zheng L, Fisher G, Miller RE, Peschon J, Lynch DH, Lenardo MJ. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature.* 1995;377:348-351.
80. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell.* 1994;76:959-962.

81. Ye H, Park YC, Kreishman M, Kieff E, Wu H. The structural basis for the recognition of diverse receptor sequences by TRAF2. *Mol Cell*. 1999;4:321-330.
82. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB anti-apoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*. 1998;281:1680-1683.
83. Grell M, Douni E, Wajant H, et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 1995;83:793-802.
84. Vandenabeele P, Declercq W, Vanhaesebroeck B, Grooten J, Fiers W. Both TNF receptors are required for TNF-mediated induction of apoptosis in PC60 cells. *J Immunol*. 1995;154:2904-2913.
85. Weiss T, Grell M, Hessabi B, et al. Enhancement of TNF receptor p60-mediated cytotoxicity by TNF receptor p80: requirement of the TNF receptor-associated factor-2 binding site. *J Immunol*. 1997;158:2398-2404.
86. Tartaglia LA, Pennica D, Goeddel DV. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem*. 1993;268:18542-18548.
87. Chan FK, Lenardo MJ. A crucial role for p80 TNF-R2 in amplifying p60 TNF-R1 apoptosis signals in T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 2000;30:652-660.
88. Douni E, Kollias G. A critical role of the p75 tumor necrosis factor receptor (p75TNF-R) in organ inflammation independent of TNF, lymphotoxin alpha, or the p55TNF-R. *J Exp Med*. 1998;188:1343-1352.
89. Speiser DE, Sebzda E, Ohteki T, et al. Tumor necrosis factor receptor p55 mediates deletion of peripheral cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Eur J Immunol*. 1996;26:3055-3060.
90. Jacob CO, Hwang F, Lewis GD, Stall AM. Tumor necrosis factor alpha in murine systemic lupus erythematosus disease models: implications for genetic predisposition and immune regulation. *Cytokine*. 1991;3:551-561.
91. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:9784-9788.

92. Atzeni F, Turiel M, Capsoni F, Doria A, Meroni P, Sarzi-Puttini P. Autoimmunity and anti-TNF-alpha agents. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1051:559-569.
93. van der Bijl AE, Breedveld FC, Antoni CE, et al. An open-label pilot study of the effectiveness of adalimumab in patients with rheumatoid arthritis and previous infliximab treatment: relationship to reasons for failure and anti-infliximab antibody status. *Clin Rheumatol.* 2008;27:1021-1028.
94. Wakefield PE, James WD, Samlaska CP, Meltzer MS. Tumor necrosis factor. *J Am Acad Dermatol.* 1991;24:675-685.
95. Austin LM, Ozawa M, Kikuchi T, Walters IB, Krueger JG. The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J Invest Dermatol.* 1999;113:752-759.
96. Etehadhi P, Greaves MW, Wallach D, Aderka D, Camp RD. Elevated tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) biological activity in psoriatic skin lesions. *Clin Exp Immunol.* 1994;96:146-151.
97. Mease PJ, Goffe BS, Metz J, VanderStoep A, Finck B, Burge DJ. Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomised trial. *Lancet.* 2000;356:385-390.
98. Heiberg MS, Koldingsnes W, Mikkelsen K, et al. The comparative one-year performance of anti-tumor necrosis factor alpha drugs in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis: results from a longitudinal, observational, multicenter study. *Arthritis Rheum.* 2008;59:234-240.
99. Lange U, Teichmann J, Stracke H. Correlation between plasma TNF-alpha, IGF-1, biochemical markers of bone metabolism, markers of inflammation/disease activity, and clinical manifestations in ankylosing spondylitis. *Eur J Med Res.* 2000;5:507-511.
100. van der Heijde D, Schiff MH, Sieper J, et al. Adalimumab effectiveness for the treatment of ankylosing spondylitis is maintained for up to 2 years: long-term results from the ATLAS trial. *Ann Rheum Dis.* 2008.
101. Costa MF, Said NR, Zimmermann B. Drug-Induced Lupus due to Anti-Tumor Necrosis Factor alpha Agents. *Semin Arthritis Rheum.* 2007.

102. Aringer M, Graninger WB, Steiner G, Smolen JS. Safety and efficacy of tumor necrosis factor alpha blockade in systemic lupus erythematosus: an open-label study. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3161-3169.
103. Hiepe F BA, Feist E, Burmester G-R. Successful treatment of a patient suffering from a refractory subacute cutaneous lupus erythematosus (SCLE) with blockers of tumor necrosis factor A. *Arthritis Rheum.* 2004;50:S 413.
104. Provost TT, Watson R, Simmons-O'Brien E. Significance of the anti-Ro (SS-A) antibody in evaluation of patients with cutaneous manifestations of a connective tissue disease. *J Am Acad Dermatol.* 1996;35:147-169; quiz 170-142.
105. Ioannides D, Golden BD, Buyon JP, Bystryn JC. Expression of SS-A/Ro and SS-B/La antigens in skin biopsy specimens of patients with photosensitive forms of lupus erythematosus. *Arch Dermatol.* 2000;136:340-346.
106. Furukawa F, Lyons MB, Lee LA, Coulter SN, Norris DA. Estradiol enhances binding to cultured human keratinocytes of antibodies specific for SS-A/Ro and SS-B/La. Another possible mechanism for estradiol influence of lupus erythematosus. *J Immunol.* 1988;141:1480-1488.
107. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 1988;106:761-771.
108. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995;184:39-51.
109. Glasel JA. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques.* 1995;18:62-63.
110. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-273.
111. Shuman S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem.* 1994;269:32678-32684.

112. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996;6:995-1001.
113. Lesiak A, Sysa-Jedrzejowska A, Narbutt J, Lukamowicz J, Robak E, Wozniacka A. [Proinflammatory cytokines in inactive lupus erythematosus patients]. *Przegl Lek.* 2005;62:838-842.
114. Trefzer U, Brockhaus M, Lotscher H, et al. The 55-kD tumor necrosis factor receptor on human keratinocytes is regulated by tumor necrosis factor-alpha and by ultraviolet B radiation. *J Clin Invest.* 1993;92:462-470.
115. Reichlin M. Molecular definition of the Ro(SSA) particle(s): a frequent target of autoimmunity in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Br J Rheumatol.* 1991;30 Suppl 1:58-62.
116. Hamilton RG, Harley JB, Bias WB, et al. Two Ro (SS-A) autoantibody responses in systemic lupus erythematosus. Correlation of HLA-DR/DQ specificities with quantitative expression of Ro (SS-A) autoantibody. *Arthritis Rheum.* 1988;31:496-505.
117. Mond CB, Peterson MG, Rothfield NF. Correlation of anti-Ro antibody with photosensitivity rash in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum.* 1989;32:202-204.
118. Locht H, Pelck R, Manthorpe R. Diagnostic and prognostic significance of measuring antibodies to alpha-fodrin compared to anti-Ro-52, anti-Ro-60, and anti-La in primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol.* 2008;35:845-849.
119. Mayet WJ, Meyer zum Buschenfelde KH. Antibodies to proteinase 3 increase adhesion of neutrophils to human endothelial cells. *Clin Exp Immunol.* 1993;94:440-446.
120. Longuet-Perret I, Schmitt D, Viac J. Tumour necrosis factor-alpha is involved in the contrasting effects of ultraviolet B and ultraviolet A1 radiation on the release by normal human keratinocytes of vascular permeability factor. *Br J Dermatol.* 1998;138:221-224.
121. Joly E, Hudrisier D. What is trogocytosis and what is its purpose? *Nat Immunol.* 2003;4:815.
122. Hudrisier D, Aucher A, Puaux AL, Bordier C, Joly E. Capture of target cell membrane components via trogocytosis is triggered by a selected set of surface molecules on T or B cells. *J Immunol.* 2007;178:3637-3647.

123. Kita Y, Kuroda K, Mimori T, et al. T cell receptor clonotypes in skin lesions from patients with systemic lupus erythematosus. *J Invest Dermatol.* 1998;110:41-46.
124. Cederblad B, Blomberg S, Vallin H, Perers A, Alm GV, Ronnblom L. Patients with systemic lupus erythematosus have reduced numbers of circulating natural interferon-alpha-producing cells. *J Autoimmun.* 1998;11:465-470.
125. Salomonsson S, Wahren-Herlenius M. Local production of Ro/SSA and La/SSB autoantibodies in the target organ coincides with high levels of circulating antibodies in sera of patients with Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol.* 2003;32:79-82.
126. Hiepe F, Radbruch A. Is long-term humoral immunity in the mucosa provided by long-lived plasma cells? A question still open. *Eur J Immunol.* 2006;36:1068-1069.
127. Gerl V, Hostmann B, Johnen C, et al. The intracellular 52-kd Ro/SSA autoantigen in keratinocytes is up-regulated by tumor necrosis factor alpha via tumor necrosis factor receptor I. *Arthritis Rheum.* 2005;52:531-538.
128. Lovgren T, Eloranta ML, Kastner B, Wahren-Herlenius M, Alm GV, Ronnblom L. Induction of interferon-alpha by immune complexes or liposomes containing systemic lupus erythematosus autoantigen- and Sjogren's syndrome autoantigen-associated RNA. *Arthritis Rheum.* 2006;54:1917-1927.
129. Meller S, Winterberg F, Gilliet M, et al. Ultraviolet radiation-induced injury, chemokines, and leukocyte recruitment: An amplification cycle triggering cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2005;52:1504-1516.
130. Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, et al. The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.* 2001;20:2140-2151.
131. Chen X, Smith JD, Shi H, Yang DD, Flavell RA, Wolin SL. The Ro autoantigen binds misfolded U2 small nuclear RNAs and assists mammalian cell survival after UV irradiation. *Curr Biol.* 2003;13:2206-2211.
132. Veldhoven CH, Pruijn GJ, Meilof JF, et al. Characterization of murine monoclonal antibodies against 60-kD Ro/SS-A and La/SS-B autoantigens. *Clin Exp Immunol.* 1995;101:45-54.
133. Niimi Y, Ioannides D, Buyon J, Bystryjn JC. Heterogeneity in the expression of Ro and La antigens in human skin. *Arthritis Rheum.* 1995;38:1271-1276.

134. Bonnet-Duquennoy M, Abaibou H, Tailhardat M, et al. Study of housekeeping gene expression in human keratinocytes using OLISA, a long-oligonucleotide microarray and q RT-PCR. *Eur J Dermatol.* 2006;16:136-140.
135. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Bio-techniques.* 1999;26:112-122, 124-115.
136. Shiao YH. A new reverse transcription-polymerase chain reaction method for accurate quantification. *BMC Biotechnol.* 2003;3:22.
137. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, et al. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature.* 1984;312:724-729.
138. Balkwill FR. Tumour necrosis factor. *Br Med Bull.* 1989;45:389-400.
139. Aringer M, Smolen JS. Efficacy and safety of TNF-blocker therapy in systemic lupus erythematosus. *Expert Opin Drug Saf.* 2008;7:411-419.
140. Tsuchiya N, Kawasaki A, Tsao BP, Komata T, Grossman JM, Tokunaga K. Analysis of the association of HLA-DRB1, TNFalpha promoter and TNFR2 (TNFRSF1B) polymorphisms with SLE using transmission disequilibrium test. *Genes Immun.* 2001;2:317-322.
141. Smerdel-Ramoya A, Finholt C, Lilleby V, et al. Systemic lupus erythematosus and the extended major histocompatibility complex--evidence for several predisposing loci. *Rheumatology (Oxford).* 2005;44:1368-1373.
142. Rood MJ, van Krugten MV, Zanelli E, et al. TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2000;43:129-134.
143. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:3195-3199.
144. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature.* 1997;385:729-733.
145. Edwards CK, 3rd, Zhou T, Zhang J, et al. Inhibition of superantigen-induced proinflammatory cytokine production and inflammatory arthritis in MRL-lpr/lpr mice by a transcriptional inhibitor of TNF-alpha. *J Immunol.* 1996;157:1758-1772.

146. Schwarting A, Wada T, Kinoshita K, Tesch G, Kelley VR. IFN-gamma receptor signaling is essential for the initiation, acceleration, and destruction of autoimmune kidney disease in MRL-Fas(lpr) mice. *J Immunol.* 1998;161:494-503.
147. Aringer M, Feierl E, Smolen J. [Cytokine blockade - a promising therapeutic option in SLE]. *Z Rheumatol.* 2008;67:315-317.
148. Jacob CO, McDevitt HO. Tumour necrosis factor-alpha in murine autoimmune 'lupus' nephritis. *Nature.* 1988;331:356-358.
149. Brennan DC, Yui MA, Wuthrich RP, Kelley VE. Tumor necrosis factor and IL-1 in New Zealand Black/White mice. Enhanced gene expression and acceleration of renal injury. *J Immunol.* 1989;143:3470-3475.
150. Gordon C, Wofsy D. Effects of recombinant murine tumor necrosis factor-alpha on immune function. *J Immunol.* 1990;144:1753-1758.
151. Zampieri S, Alaibac M, Iaccarino L, et al. Tumour necrosis factor alpha is expressed in refractory skin lesions from patients with subacute cutaneous lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2006;65:545-548.

Abbildung 1 Die Detektion von Ro/SSA52 durch Anti-Ro/SSA-Autoantikörper ist in Abbildung 1A durch Western-Blot-Analyse, in Abbildung 1B durch indirekte Immunfluoreszenz erfolgt. Die intrazelluläre Lokalisation von Ro/SSA52 (rechtes Bild) ist durch ein feinkörniges, granuläres Muster gekennzeichnet.....7

Abbildung 2 Modell der nukleären und zytoplasmatischen Verteilung von Ro- RNP's in humanen Keratinozyten. Modifiziert nach Pruijn et al. ⁴⁶..... 11

Abbildung 3 Schematische Darstellung des Ro/SSA-Ribonukleoproteinkomplexes, der aus 52kDa,-60kDa-und 48kDa (La-Protein) Proteinen besteht, die an eine hY-RNA gebunden sind.13

Abbildung 4 Schematische Abbildung der Struktur von Ro/SSA52. Die Größe des Proteins entspricht einem Leserahmen von 475 Aminosäuren. Es sind *Zink-Finger*-Regionen (AS 1-135), *Leuzin-Zipper*-Areale (AS 197-232) sowie Homologien mit dem *regulatory*

protein T lymphocyte-1 (rpt1) der Maus und dem humanen *red finger protein* (rfp) nachweisbar (AS 293-472). In A und B ist die räumliche Konformation zweier *Zink-Finger*-Areale dargestellt ⁷³14

Abbildung 5 Graphische Darstellung von *Death Receptors* (grün) und ihrer Liganden (rot). Rezeptoren, an die eine *Death Domain* (DD) gebunden ist (grau unterlegtes Feld), sind zur Induktion von Apoptose fähig.16

Abbildung 6 Schematische Darstellung der Induktion von Apoptose in Keratinozyten, die zu einem Verdau intrazellulärer Substrate, zu Kernkondensation und zu Kernfragmentation führt.17

Abbildung 7 Das Messprinzip der quantitativen PCR mit dem Light Cycler[®] beruht auf einem Energietransfer *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) zwischen zwei Fluoreszenzmolekülen, einer *Donor*-Hybridisationsprobe und der *Akzeptor*-Hybridisationsprobe, deren emittiertes Licht proportional der Menge von DNA ist.36

Abbildung 8 schematischer Ablauf einer quantitativen Einschnitt-PCR zur Bestimmung36

Abbildung 9 Der Verlauf einer quantitativen PCR bei Verwendung von Hybridisationssonden ist über 45 PCR-Zyklen dargestellt. Das PCR-Profil ist durch eine *Background*-Phase, eine exponentielle Wachstumsphase und durch eine *Plateau*-Phase gekennzeichnet.37

Abbildung 10 Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgt durch die Verwendung eines Referenzsystems.38

Abbildung 11 Die Festlegung von Bezugspunkten, *crossing Points*, in der exponentiellen Wachstumsphase der quantitativen PCR (Darstellung links) ermöglicht die Erstellung einer linearen Regressionsgerade (Darstellung rechts).....39

Abbildung 12 Zwei Beispiele für den charakteristischen Zellrasen von HaCaT-Keratinozyten bei 200-facher Vergrößerung.....41

Abbildung 13 Doppelbestimmungen der mRNA-Expression von GAPDH, Ro/SSA52, Ro/SSA60 α , Ro/SSA60 β in HaCaT-Keratinozyten. In vier von sechs Proben ließ sich

Ro/SSA52-mRNA nachweisen, Ro/SSA60 α war in 2 Proben nachweisbar, Ro/SSA60 β wurde nicht detektiert.	42
Abbildung 14 TNF- α induziert die Ro/SSA52-mRNA-Expression nach 1h, 2h, 8h und 24h. Der Anstieg nach 1h fällt innerhalb der Messreihe deutlich auf.	43
Abbildung 15 Zwei Beispiele für den charakteristischen Zellrasen von primäre Keratinozyten bei 200-facher Vergrößerung.	44
Abbildung 16 Aus erfolgreich transformierten E.coli-Bakterien wurde durch die <i>Colony-PCR</i> der korrekte Einbau von DNA von Ro/SSA52, GAPDH, TNF- α und Sm-D1 in den Klonierungsvektor bestätigt (A). Der PCR-Screen positiver Klone (B) beweist die korrekte Größe der eingeklonten Fragmente (B). Plasmid-DNA ist durch die elektrophoretische Auftrennung sichtbar (C).	45
Abbildung 17 Expressionsprofile von 3 ausgewählten Haushaltsgenen in TNF- α -stimulierten primären Keratinozyten. GAPDH und β 2-MG werden konstant über 24h exprimiert, G6-P-DH ist nach 8h nicht mehr nachweisbar. Die Darstellung erfolgt über Molekülzahlen. Die Experimente wurden in dreifachen Ansätzen bei drei verschiedenen Spendern durchgeführt.	46
Abbildung 18 Bei Verwendung eines 167bp großen Fragmentes von Ro/SSA52 (schwarz dargestellt) in einer Einzel-PCR und in der Multiplex-PCR mit GAPDH (292bp, weiß dargestellt) wird eine stabile Amplifizierung in allen Ansätzen erreicht. Dargestellt sind drei Experimente mittels dreifachen Messungen (Mittelwert \pm SEM).	48
Abbildung 19 Bei Verwendung eines 598bp großen Fragmentes von Ro/SSA52 (schwarz dargestellt) in einer Einzel-PCR und in der Multiplex-PCR mit GAPDH (292bp, weiß dargestellt) treten größere Unterschiede in der Amplifizierung auf. Dargestellt sind drei Experimente mittels dreifach Messungen (Mittelwert \pm SEM).	50
Abbildung 20 Nach Einsatz von 20ng cDNA wurden für Ro/SSA52 im Multiplex-Ansatz $3,2 \times 10^5$ Moleküle und $2,6 \times 10^5$ Moleküle in der Einzel-PCR gemessen. Die Molekülzahl von GAPDH weist ein höheres Expressionsniveau auf. Dargestellt sind 3 Experimente über dreifache Messungen (Mittelwert \pm SEM).	52

- Abbildung 21** Die Multiplex-PCR-Reaktion von Ro/SSA52- und GAPDH-Plasmid-DNA läuft unter ausgeglichenen PCR-Bedingungen ab. Primer, mit denen kleine PCR-Fragmente vervielfältigt werden (<300bp), erweisen sich zur Durchführung einer Multiplex-PCR als geeignet. Dargestellt sind 3 Experimente über dreifache Messungen (Mittelwert±SEM).53
- Abbildung 22** Der Verlauf der TNF- α -induzierten mRNA-Expression von Ro/SSA52 in HaCaT-Keratinocyten zeigt Anstiege nach 1h und 4h. Das zweite Maximum entspricht einer 300-fachen Erhöhung der Transkriptionsprodukte, an die sich bis 24h eine deutliche Verringerung anschließt. Dargestellt sind drei Experimente mittels dreifachen Messungen (Mittelwert \pm SEM)54
- Abbildung 23** Das Maximum der Ro/SSA52-mRNA-Expression entspricht 2×10^9 Molekülen und wird nach 4h erreicht. Das Molekülniveau von GAPDH liegt im Durchschnitt bei $5,25 \times 10^7$ Molekülen. Dargestellt sind 3 Experimente über dreifache Messungen (Mittelwert±SEM).55
- Abbildung 24** Ro/SSA52-mRNA-Induktion durch TNF- α in primären Keratinocyten von sechs gesunden Personen. Das Maximum der Expressionserhöhung wird nach 4h erreicht und entspricht einem 20-fachen Anstieg. Der Erhöhung folgt ein allmählicher Abfall bis 24h. Das Ausgangsniveau wird nicht erreicht. Angabe von sechs Experimenten gesunder Probanden mittels dreifachen Messungen (Mittelwerte \pm SEM).....56
- Abbildung 25** Darstellung der Molekülzahlen von Ro/SSA52 und GAPDH-mRNA nach Messung an Keratinocyten von sechs gesunden Personen: Nach 4h liegen von Ro/SSA52-mRNA $2,9 \times 10^4$ Moleküle vor, nach 24h $1,86 \times 10^3$ Moleküle. Für GAPDH liegen durchschnittlich $7,8 \times 10^7$ Moleküle vor. Angabe von sechs Experimenten gesunder Probanden mittels dreifachen Messungen (Mittelwerte \pm SEM)57
- Abbildung 26** TNF- α induziert Ro/SSA52-mRNA nach 4h (1). Die Hochregulation über TNF-RI lässt sich durch einen neutralisierenden Antikörper blockieren (2). Durch die Blockierung von TNF-RII wird Ro/SSA52-mRNA verstärkt exprimiert (3). Die Blockierung beider Rezeptoren führt zu einer Neutralisation der Ro/SSA52-mRNA-Expression (4). Angabe von 5 Experimenten, durchgeführt an gesunden Probanden mittels dreifachen

Messungen (Mittelwerte \pm SEM). Die Probanden sind mit denen aus Abbildung 24 und 25 nicht identisch.	58
Abbildung 27 Die Zellsortierung am LSR II nach Annexin-V-Färbung ermöglicht die Unterscheidung zweier Zellpopulationen. 90,41 % der aufgenommenen Zellen werden als Annexin-negativ, 9,59% der Zellen als Annexin-positiv detektiert.	59
Abbildung 28 TNF- α induziert die mRNA-Expression von Ro/SSA52 in nichtapoptotischen Keratinozyten. Ro/SSA52-mRNA ist 1,5-fach geringer exprimiert als in nichtsortierten Zellen, die apoptotische Zellen einschließen. Auch TNF- α -mRNA wird in nichtapoptotischen Keratinozyten geringer als reguliert als in Zellen, in denen Apoptose auftritt. Die Abbildung stellt die Auswertung von fünf Experimenten mittels dreifachen Messungen dar (Mittelwerte \pm SEM).	60
Abbildung 29 Das Expressionsprofil von Sm-D1-mRNA ändert sich nach TNF- α -Stimulation nur geringfügig. Die Schwankungen betragen maximal das 1,6-fache des Ausgangswertes (oben). Eine Erhöhung von Ro/SSA52-mRNA durch TNF- α lässt sich bei den untersuchten gesunden Personen nicht zeigen (unten). Angabe von drei Experimenten mittels dreifachen Messungen (Mittelwerte \pm SEM)	61
Abbildung 30 TNF- α induziert die eigene mRNA-Freisetzung in primären Keratinozyten. Das Maximum der Expressionserhöhung wird nach 1h erreicht Nach 24h Stimulation ist TNF- α -mRNA erhöht nachweisbar. Angabe von fünf Experimenten mittels dreifachen Messungen (Mittelwerte \pm SEM).....	62
Abbildung 31 24h TNF- α -Stimulation führt zu einer Induktion von IL-6-, IL-8- und IL-10. TNF- α induziert darüber hinaus seine eigene Freisetzung. Angabe von fünf Experimenten mittels dreifachen Messungen (Mittelwerte \pm SEM).....	63
Abbildung 32 Die Induktion von TNF- α , IL-6 und IL-8 erfolgt dosisabhängig von 0,1ng/ml bis 100ng/ml. Die IL-6-und TNF- α -Proteinkonzentrationen steigen mit der steigenden TNF- α -Stimulationskonzentration an. Für IL-8 ist ein Sättigungseffekt nachweisbar.	64

Abbildung 33 Annexin/PJ-Färbungen in primären Keratinozyten: TNF- α induziert weder nach 4h noch 24h Apoptose. Es lässt sich ein antiapoptotischer Effekt nachweisen, der in vier Experimenten bestätigt wird.66

Abbildung 34 Keratinozyten als Zielzellen für die Charakterisierung von Anti-Ro/SSA-vermittelten Hauterscheinungen bei Patienten mit photosensitivem Lupus erythematoses 30,127,12869

Abbildung 35 Die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 werden in primären Keratinozyten nach 4h, TNF- α wird nach 24h maximal freigesetzt und sind in hohen Konzentrationen in Kulturüberständen von Keratinozyten nachweisbar.80

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

Erklärung

Ich, Bjoern Hostmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema “Etablierung der *Realtime*-PCR zur Charakterisierung der Effekte von TNF- α auf die mRNA-Expression des mit kutanen Lupus-Manifestationen assoziierten Autoantigens Ro/SSA52 in humanen Keratinozyten“ selbst verfasst, weder die unzulässige Hilfe Dritter in Anspruch genommen, noch in Teilen Kopien anderer Arbeiten dargestellt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 18.02.2009

Bjoern Hostmann