

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

DISSERTATION

**Alpha-Untereinheiten und
konstitutive proteolytisch aktive Untereinheiten
des 20S- Proteasoms als Zielantigene
bei Autoimmunerkrankungen**

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

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät Charité-
Universitätsmedizin Berlin

von
Sonja Scheffler
aus Mettmann

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. G.-R. Burmester
2. Prof. Dr. med. H.-M. Lorenz
3. Prof. Dr. med G. Keyßer

Datum der Promotion: 18.09.2009

INHALTSANGABE

1. Einleitung

- 1.1. Autoimmune Erkrankungen S. 6
- 1.2. Rolle der autoreaktiven B-Zellantwort S. 6
- 1.3. Enzymatisch aktive Autoantigene bei Kollagenosen S. 7
- 1.4. Das Proteasom S. 8
- 1.5. Autoantikörper gegen Proteasomen S. 11
- 1.6. Nachweis von Antikörpern mittels Immunoassays:
Charakteristika von ANA-IIF, ELISA und Immunoblot S. 12
- 1.7. Reaktionsprofil von anti-proteasomalen Antikörpern S. 14

2. Problemstellung S. 16

3. Material und Methoden

- 3.1. Seren S. 18
- 3.2. Präparation von 20S-Proteasomen aus Erythrozytenkonzentraten S. 18
- 3.3. Proteasomen- Aktivitätsmessung S. 21
- 3.4. Anti-proteasomaler ELISA S. 21
- 3.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) S. 24
- 3.6. Western blot S. 25
- 3.7. Immunoblot S. 26
- 3.8. Zweidimensionale Gelelektrophorese
(*non equilibrium pH gradient electrophoresis*, NEPHGE) S. 28
- 3.9. Statistische Methoden S. 30
- 3.10. Bezugsquellen und Gerätenachweis S. 30

4. Ergebnisse S. 30

4.1. Standardisierung und Validierung der anti-proteasomalen Testverfahren ELISA und Immunoblot

- 4.1.1. Untersuchung zum Einfluss unspezifischer Reaktionen im
anti-proteasomalen ELISA S. 31

4.1.2. Vergleich beider Testsysteme	S. 33
4.2. Testscreening von Seren mit optimierten Immunoassays	
4.2.1. Untersuchung von Blutspendern	
a) im ELISA	S. 36
b) Immunoblot	S. 37
4.2.2. Testscreening von rheumatologischen Patienten	S. 38
4.3. Charakterisierung von Zieluntereinheiten antiproteasomaler Antikörper mittels eindimensionaler SDS-PAGE	
4.3.1. Beschreibung der Reaktionsmuster	S. 43
4.3.2. Verteilung der Banden im Immunoblot	S. 44
4.3.3. Untersuchung auf Assoziationen der Immunreaktionen gegen verschiedene proteasomale Untereinheiten	S. 48
4.4. Identifizierung von proteasomalen Untereinheiten im ein- und zweidimensionalen Immunoblot	S. 50
5. Diskussion	S. 59
6. Zusammenfassung	S. 69
7. Literaturverzeichnis	S. 70
8. Danksagung	S. 77
9. Eidesstattliche Erklärung	S. 78
10. Lebenslauf	S. 79

ABKÜRZUNGEN

AIH	Autoimmunhepatitis
ANA	Anti-nukleäre Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
DM	Dermatomyositis
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
DTE	Dithioeritrihol
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FPLC	fast protein liquid chromatography
Hep2-Zellen	Humane Larynxkarzinom-Zelllinie
LMP	low molecular weight protein
MCA	7-Amino-4-Methylcoumarin
MECL1	multicatalytic endopeptidase complex subunit MECL-1
NEPHGE	non equilibrium pH gradient electrophoresis
NP-40	Nonidet P-40
PBC	primär biliäre Zirrhose
PM	Polymyositis
POD	Peroxidase
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
pSS	primäres Sjögren-Syndrom
RA	rheumatoide Arthritis
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SLE	systemischer Lupus erythematoses
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TWEEN 20 ®	Polysorbat-20- Polyethylenglycolsorbitanmonolaurat
UCTD	undifferenzierte Kollagenose

1. EINLEITUNG

1.1. Autoimmune Erkrankungen

Autoimmunerkrankungen sind gekennzeichnet durch das Auftreten von entzündlichen Gewebsveränderungen und damit verbundenen Funktionsstörungen bei gleichzeitig nachweisbaren autoreaktiven Antikörpern bzw. autoreaktiven T-Zellen. Es handelt sich um vielfältige, typischerweise chronisch-entzündlich verlaufende Krankheitsbilder. Bei systemischen Autoimmunerkrankungen kann es durch die Aktivierung des Immunsystems zu einer entzündlichen Schädigung innerer Organe kommen. Zu dieser Gruppe gehören sowohl die häufig auftretenden entzündlichen Gelenkerkrankungen wie die rheumatoide Arthritis, als auch seltenere Krankheitsbilder wie die Kollagenosen und Vaskulitiden.

Die Ätiologie der zugrunde liegenden komplexen Immunregulationsstörungen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Indizien weisen auf eine multifaktorielle Genese hin, bei der wahrscheinlich genetische Faktoren, exogene Faktoren wie Infektionen oder Medikamente und auch hormonelle Faktoren eine Rolle spielen.

Inwieweit Mechanismen wie molekulare Mimikry und „Epitope-spreading“ (Schwimmbeck et al. 1987, Hengstman et al. 2004), fehlerhafte T-Regulator-Zellen (Kronenberg und Rudensky 2005) oder die apoptose-spezifische Proteolyse (Targoff 2000) zur Durchbrechung der Toleranz beitragen, ist derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen.

1.2. Rolle der autoreaktiven B-Zellantwort

In der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen spielen sowohl autoreaktive zytotoxische T-Zellen eine Rolle (z.B. bei der Polymyositis; O’Hanlon und Miller 1995) als auch die autoreaktive B-Zellantwort (z.B. bei der Dermatomyositis; Dalakas 1991). Beschrieben worden sind Autoantikörper der Klassen IgA, IgM und IgG, wobei IgG in den meisten Fällen mengenmäßig deutlich dominiert (Lieu et al. 1988). Autoantikörper sind der Untersuchung relativ leicht zugänglich und spielen auch aus diesem Grund eine große Rolle in der Diagnostik der Autoimmunerkrankungen.

Ein klassischer Autoantikörpersuchtest ist der indirekte Immunfluoreszenztest zum Nachweis von antinukleären Autoantikörpern (ANA), der bei Patienten mit Verdacht auf

Kollagenosen durchgeführt wird. Eine Vielzahl von Autoantigenen wird durch diesen Screeningtest erfasst, manche produzieren ein typisches Fluoreszenzmuster. In aller Regel wird aber ein positives Testergebnis (ANA-Titer 1:160 oder höher) in spezifischeren Untersuchungen wie Immunoblots oder ELISA (enzyme linked immunosorbent assays) weiter differenziert (siehe Abschnitt 1.6).

Die Spezifität und Sensitivität der Autoantikörpernachweise variiert dabei beträchtlich (von Mühlen und Tan 1995). In vielen Fällen jedoch ermöglichen Antikörperprofil und auch der Verlaufstiter genauere Diagnosen und Prognosen, was auch Auswirkungen auf die Therapie hat. So kommt es bei Aktivitätsschüben eines SLE in aller Regel zu einem Anstieg der Anti-dsDNA-Antikörper (Hiepe *et al.* 1996).

Eine eindeutige pathogenetische Rolle ist bislang nur für wenige Autoantikörper nachgewiesen worden, z.B. für die mütterlichen Anti-Ro/Anti-La-Antikörper bei der Entstehung des kongenitalen Herzblocks (Buyon *et al.* 2001). Auch die ursächliche Beteiligung von Autoantikörpern bei der SLE-typischen entzündlichen Schädigung der Nieren wurde in Tierversuchen demonstriert (Ehrenstein *et al.* 1995). Dabei steht nach neueren Erkenntnissen nicht mehr die Reaktivität gegen Doppelstrang-DNA im Vordergrund, sondern die Reaktivität gegen Nierengewebsantigene (Deshmuk *et al.* 2006). Für die Gewebeschädigung verantwortlich sind wahrscheinlich die durch die Immunkomplexe ausgelösten Entzündungsprozesse. Seit dem Nachweis von penetrierenden Autoantikörpern in lebenden Zellen *in vivo* werden allerdings auch direkte intrazelluläre Wechselwirkungen diskutiert (Ruiz-Arguelles und Alarcon-Segovia 2001).

Andere Autoantikörper scheinen eher ein Nebenprodukt - ein sogenanntes Epiphänomen - der grundsätzlich gestörten Immunabwehr zu sein. Auch in diesen Fällen könnte jedoch die genaue Charakterisierung von Autoantigenen, beteiligten Immunzellen und Präsentationswegen helfen, dem Kern der Immunstörung auf die Spur zu kommen.

1.3. Enzymatisch aktive Autoantigene bei Kollagenosen

Eine Reihe von Autoantigenen, die bei systemischen rheumatischen Autoimmunerkrankungen identifiziert wurden, sind Bestandteil enzymatisch aktiver Protein-(RNA)-Komplexe, die bedeutende Funktionen in Replikation, Transkription, Splicing und Translation innehaben und gewebs- und organübergreifend vorkommen. So sind

Autoantikörper gegen die DNA-Topoisomerase I, auch bezeichnet als Scl70, spezifisch für Sklerodermie (Guldner *et al.* 1986). Das SLE und Sjögren-Syndrom assoziierte Autoantigen Ro/SS-A 52 kD konnte als E3-Ubiquitinligase charakterisiert werden (Wada *et al.* 2006). Beim Anti-Jo-1-Syndrom, einer Untergruppe der autoimmunen Myositis, findet man Autoantikörper gegen die Histidyl-tRNA-Synthetase (Bernstein *et al.* 1984). Für die Anti-Jo-1-Antikörper konnte *in vitro* eine Inhibition der Histidyl-tRNA-Synthetase nachgewiesen werden (Targoff und Reichlin 1987).

Mit dem 20S-Proteasom wurde 1991 von Arribas *et al.* ein weiterer multikatalytischer Proteinkomplex als Ziel einer Autoimmunreaktion entdeckt.

1.4. Das Proteasom

Das Proteasom ist ein hochkonservierter Proteasenkomplex, der in den Zellen aller Eukaryonten und auch bei Archaeobakterien und einigen Eubakterien vorkommt (Baumeister *et al.* 1998).

Seine Funktion besteht darin, polyubiquitinierte Proteine abzubauen (Seufert und Jentsch 1992). Dies dient nicht nur der Beseitigung alter und falsch gefalteter Proteine, der stete Abbau ermöglicht auch erst die zeitlich begrenzte Wirkung von Proteinen wie z.B. Cyclinen oder Transkriptionsfaktoren (z.B. c-Fos, c-Myc) und somit Zellzyklus und Zelldifferenzierung.

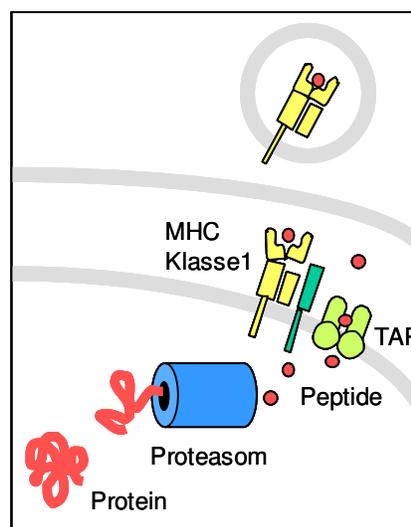


Abb.1: Proteine des Zytosols werden vom Proteasom zu Peptiden gespalten, die über TAP-1 und TAP-2 ins endoplasmatische Retikulum gelangen, wo sie an MHC Klasse 1-Moleküle binden (nach Janeway *et al.* 2001).

Die Inhibition des Proteasoms induziert bei vielen malignen Zelllinien die Apoptose (Pajonk und McBride 2001), klinisch werden Proteasomeninhibitoren bereits erfolgreich in der Hämatologie/Onkologie, z.B. zur Behandlung des Plasmozytoms, eingesetzt. Darüber hinaus spielen Proteasomen bei höheren Wirbeltieren eine wichtige Rolle in der Immunabwehr, indem sie den Großteil der Peptidantigene herstellen, die von den MHC-Klasse1-Molekülen präsentiert werden (Rock *et al.* 1994, Eggers *et al.* 1995). So werden z. B. virale Proteine von Proteasomen zu Peptiden gespalten, welche dann mittels spezieller Transportproteine (TAP-1 und TAP-2) ins endoplasmatische Retikulum gelangen und dort an MHC-Klasse1-Moleküle binden (siehe Abb.1).

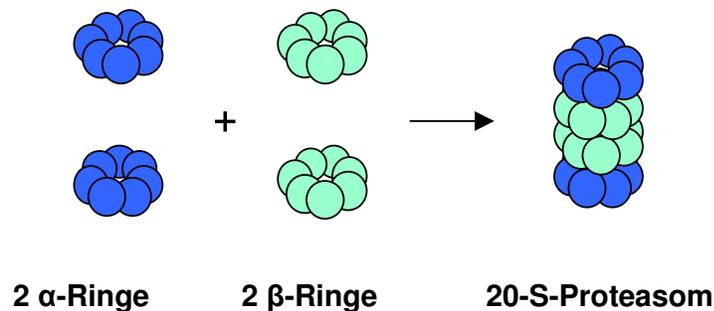


Abb. 2: Schematische Zeichnung des humanen 20S-Proteasoms.

Das humane 20S-Proteasom als Kern der Proteasomenkomplexe ist aus 4 Ringen aufgebaut, die eine Art Zylinder bilden. Jeweils zwei Ringe sind identisch: die beiden äußeren Ringe, die aus jeweils sieben verwandten, aber nicht identischen α -Typ-Proteinen bestehen, und die beiden inneren Ringe, die aus je 7 β -Typ-Untereinheiten bestehen (siehe Abb.2 und Tab.1).

Die proteolytisch aktiven Zentren werden von den drei β -Untereinheiten Z (β 2), δ (β 1) und MB1 (β 5) gebildet, deren N-terminales Threonin katalytisch aktiv ist (Baumeister *et al.* 1998). Die katalytischen Spezifitäten der aktiven Zentren unterscheiden sich voneinander, δ (β 1) werden caspase-artige proteolytische Funktionen zugeordnet, Z (β 2) trypsin-artige und MB1 (β 5) chymotrypsin-artige Eigenschaften (Krüger *et al.* 2003).

Die α -Typ-Proteine interagieren mit Regulatorproteinen wie dem 19S-Regulator oder dem Proteasomenaktivator PA28 (auch 11S Regulator genannt). In Verbindung mit

PA28 können Proteasomen bestimmte Peptide effektiver generieren (Groettrup *et al.* 1996), die Funktion des 19S-Komplex besteht dagegen im Entfalten Ubiquitin-markierter Proteine (Hendil *et al.* 1998).

Proteasomale Untereinheiten				
Nomenklatur nach Groll ¹	alte Nomenklatur	in SDS-PAGE geschätzte kD ²	Molekulargewicht (kD) ³	Isoelektrischer Punkt ³
α 6	C2	32,0	29,6	6,16
α 3	C9	30,0	29,5	7,58
α 7	C8	28,6	28,3	5,20
α 5	Zeta	28,4	26,4	4,69
α 4	C6	28,2	27,9	8,60
β 2	Z	28,0	25,2*	5,54*
α 1	Iota	27,6	27,4	6,35
α 2	C3	25,0	25,7	7,12
β 4	C7	24,0	22,8	6,52
β 7	N3	24,0	24,3*	5,47*
β 6	C5	23,8	26,5*	8,27*
β 1	Y/Delta	23,5	21,7*	4,91*
β 5	X/MB1	21,4	22,5*	8,67*
β 3	C10	n.b.	22,9	6,15
β 5 ⁱ	LMP7	n.b.	22,6*	7,59*
β 1 ⁱ	LMP2	n.b.	21,3*	4,80*
β 2 ⁱ	MECL1	n.b.	24,6*	6,07*

Tab. 1: Die Untereinheiten des humanen 20S-Proteasoms mit tatsächlichen Molekulargewichten und Laufverhalten in der SDS-PAGE (³Groll *et al.* 1997, ²Hendil *et al.* 1993, ³Feist *et al.* 2000), in der Reihenfolge, wie sie sich in der SDS-PAGE darstellen. Außerdem angegeben sind die isoelektrischen Punkte der einzelnen Untereinheiten.

ⁱ Untereinheiten des Immunoproteasoms *prozessierte Form

Das Immunsystem selbst wiederum reguliert das proteolytische Verhalten von Proteasomen durch Interferon- γ (Boes *et al.* 1994, Aki *et al.* 1994). In Anwesenheit von Interferon- γ werden drei alternative „aktive“ β -Typ-Proteine exprimiert und in das Proteasom eingebaut (MECL1, LMP2 und LMP7 ersetzen Z, δ und MB1), was Einfluss auf Schneidemuster und Aktivität der Proteasomen hat. Das solchermaßen veränderte Proteasom wird auch als Immunoproteasom bezeichnet.

1.5. Autoantikörper gegen Proteasomen

Dass nun Proteasomen, die in der Immunabwehr eine zentrale Funktion haben, auch ihrerseits Ziel einer Autoimmunantwort werden können, wurde zuerst bei SLE-Patienten entdeckt (Arribas *et al.* 1991). In nachfolgenden Arbeiten wurden auch andere Patientengruppen, meist aus dem rheumatologischen Formenkreis, untersucht (s.Tab.2).

	Nachweis anti-proteasomaler Antikörper	
	ELISA	Immunoblot
systemischer Lupus erythematodes	58 % (30/52) ²	35 % (15/43) ¹ 42 % (22/52) ² 35 % (35/100) ⁴
Multiple Sklerose		66 % (73/110) ⁵
Primäres Sjögren-Syndrom	33 % (14/43) ³	33 % (14/43) ³ 16 % (5/31) ⁵
autoimmune Myositis	62 % (21/34) ²	47 % (16/34) ² 19 % (4/21) ⁵
M. Behçet		19 % (4/21) ⁵
Sarkoidose		7 % (1/13) ⁵
Vaskulitis		0 % (0/20) ⁴
Primär biliäre Zirrhose		0 % (0/50) ⁴
Primär sklerosierende Cholangitis		0 % (0/14) ⁴
Autoimmunhepatitis		0 % (0/10) ²
Rheumatoide Arthritis	2 % (1/47) ³	0 % (0/47) ³ 0 % (0/50) ⁴
Tumoren	11 % (2/19) ³	0 % (0/19) ³
Gesunde	2 %* (2/112) ² 0 % (0/80) ³	0 % (0/100) ¹ 0 % (0/80) ³ 0 % (0/160) ⁴

Tab.2: Vorkommen anti-proteasomaler Antikörper in verschiedenen Krankheitsentitäten. Zusammenstellung der ELISA- bzw. Immunoblot-Ergebnisse von ¹Arribas *et al.* 1991, ²Feist *et al.* 1996, ³Feist *et al.* 1999, ⁴Mayo *et al.* 2000 und ⁵Mayo *et al.* 2002.

*im spezifischeren Sandwich-ELISA negativ

Die Erstbeschreiber fanden anti-proteasomale Autoantikörper bei 35% der untersuchten SLE-Patienten. Feist *et al.* (1996) gelang der Nachweis auch bei weiteren Kollagenosen wie der Dermatomyositis (63%) und Polymyositis (62%), sowie - mit geringerer Prävalenz - bei primärem Sjögren-Syndrom.

Auch bei Autoimmunerkrankungen, die nicht zu den Kollagenosen zählen, wurden Autoantikörper gegen Proteasomen gefunden. Mayo *et al.* berichteten 2002 von einer hohen Prävalenz (66%) in einem Patientenkollektiv mit aktiver Multipler Sklerose. Auch im Liquor waren bei einem Teil dieser Patienten anti-proteasomale Antikörper nachzuweisen.

Seltener wurden autoimmune Reaktionen gegen Proteasomen auch bei Patienten mit Morbus Behçet (19%), Sarkoidose (7%) und rheumatoider Arthritis (nur im ELISA, 2%) festgestellt.

Bei anderen Autoimmunerkrankungen wie der primären biliären Zirrhose (PBC) und den übrigen systemischen Vaskulitiden wurden anti-proteasomale Antikörper dagegen bisher nicht gefunden. Auch bei Tumorpatienten und gesunden Blutspendern waren sie zumindest im Immunoblot nicht nachweisbar.

Die von den verschiedenen Arbeitsgruppen veröffentlichten Zahlen weichen teilweise erheblich voneinander ab. In den Experimenten wurden Proteasomen unterschiedlichster Herkunft verwendet (Maus-Proteasom und Rattenleber-Proteasom bei Arribas *et al.*, Proteasom aus humanen Erythrozyten bei Feist *et al.*). Zudem unterschieden sich die Untersuchungsmethoden (ELISA, Sandwich-ELISA und Immunoblot).

1.6. Nachweis von Antikörpern mittels Immunoassays: Charakteristika von ANA-IIF, ELISA und Immunoblot

In der rheumatologischen Autoantikörperdiagnostik haben sich vor allem der indirekte ANA-Immunfluoreszenztest, der ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) sowie der Immunoblot durchgesetzt. Andere Verfahren wie Agglutinationstests (Nachweis von Rheumafaktoren), funktionale Tests, der Radio-Immunoassay (RIA) oder die Immundiffusion sind speziellen Fragestellungen vorbehalten.

ANA-IIF, ELISA und Immunoblot haben einige Gemeinsamkeiten. Die drei Immunoassays ermöglichen die Detektion von Antikörpern, die gegen bestimmte Antigene gerichtet sind. Die Antigene liegen dabei in immobilisierter Form vor – beim ELISA adsorbieren die Proteine an die Polystyrolwände der Mikrotiterplatten, beim Immunoblot erfolgt nach der Auftrennung der Proteine durch eine Gelelektrophorese die Überführung auf eine Membran. Beim ANA-IIF liegen auf Objektträgern fixierte HEp-2-Zellen vor. Die Detektion der Antikörper erfolgt in allen Fällen mit Hilfe von markierten

Zweitantikörpern, die spezifisch mit dem Fc-Anteil der zu messenden Antikörper reagieren (z.B. Kaninchen-Ak gegen Human-IgG). Als Markierung werden Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. FITC beim ANA-IIF) bzw. Enzyme wie die Peroxidase benutzt, die im letzten Schritt – nach Anregung der Fluoreszenz bzw. Zugabe eines Substrates – eine Färbung auslösen (ELISA und Immunoblot).

Neben diesen Gemeinsamkeiten gibt es allerdings bedeutende Unterschiede (s.Tab.3). Im ELISA wird das Antigen wie in einer „black box“ mit den Antikörpern inkubiert, im Gegensatz zu den beiden anderen Verfahren erfolgt keine weitere Charakterisierung des Proteins. Daher ist eine möglichst reine Antigenpräparation erforderlich, um unspezifische Reaktionen zu vermeiden.

Beim Immunoblot erfolgt zunächst eine Auftrennung der Proteine durch Gelelektrophorese. Dies ermöglicht die Identifizierung eines Antigens entsprechend einer abgrenzbaren Proteinbande. Die Ausgangspräparation des betreffenden Proteins muss daher nicht unbedingt frei von jeglichen Verunreinigungen sein. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), die meist verwendet wird, trennt die Proteine nach ihrer Molekülmasse. Bei SDS (sodium dodecyl sulfat) handelt es sich um ein anionisches Detergens, das die hydrophoben Bindungen innerhalb der Proteinstruktur abschwächt. Im Immunoblot liegen die Proteine daher in einer linearen, denaturierten Form vor. Durch die Konformationsänderung ergeben sich Auswirkungen auf die antigenen Eigenschaften und die Antikörperbindung.

	ANA-IIF	ELISA	Immunoblot
Antigenstruktur	teilweise denaturiert	nativ	denaturiert
Antikörperdetektion	quantitativ (Titerangabe)	quantitativ (Units)	semiquantitativ (+/-)
Zeit- und Materialaufwand	relativ hoch	relativ gering	relativ hoch
Sensitivität	sehr hoch	sehr hoch	sehr hoch
Spezifität	eher eingeschränkt, abhängig vom Antigen	sehr hoch	sehr hoch

Tab.3: Charakteristika von indirektem ANA-Immunfluoreszenztest (ANA-IIF), ELISA und Immunoblot nach SDS-PAGE

Da beim ANA-IIF die Strukturen der fixierten HEp2-Zellen in etwa erhalten sind, ist es möglich, die erkannten Antigene über die Lokalisation in der Zelle zu charakterisieren. Für einige Autoantikörper, z.B. für die anti-Zentromer-Antikörper, ergeben sich so spezifische Fluoreszenzmuster. Andere Autoantikörper produzieren zwar typische, aber nicht spezifische Muster. Dies gilt auch für die anti-proteasomalen Antikörper (Feist *et al.* 2006). Neben einer teils filamentösen, teils feingranulären zytoplasmatischen Färbung mit Bevorzugung der perinukleären Regionen färben anti-proteasomale Antikörper auch den Nukleus unter Aussparung der Nukleoli.

Da die Spezifität des ANA-IIF nicht für alle Antigene ausreichend ist, wird der Test meistens als Suchtest eingesetzt und bei positivem Ausgang (ANA-Titer 1:80 oder höher) mit den spezifischeren ELISA- und Immunoblot-Verfahren ergänzt.

Alle drei Assays besitzen eine hohe Sensitivität, für den ELISA wird ein theoretischer maximaler Wert von 10^{-15} bis 10^{-16} mol/l angegeben, für den Immunoblot eine Nachweisgrenze im Pico- bis Nanogrammbereich (Luttmann *et al.* 2004).

1.7. Reaktionsprofil von anti-proteasomalen Antikörpern

Bereits in den ersten Untersuchungen zum Nachweis von anti-proteasomalen Antikörpern wurde eine Reaktion gegen verschiedene Untereinheiten des Maus-Proteasoms im Immunoblot beschrieben. Bemerkenswerterweise reagierten die Antikörper eines Patientenserums jedoch gegen höchstens zwei proteasomale Proteine. In weiterführenden Untersuchungen konnten mehrere Untereinheiten als B-Zellantigen identifiziert werden.

Systematische Immunoblotuntersuchungen zur Diversität der anti-proteasomalen Antikörper wurden bisher bei SLE- und Polymyositis-Patienten (Feist *et al.* 1996) sowie bei Sjögren-Patienten (Feist *et al.* 1999) durchgeführt. Demnach wiesen anti-proteasomale Antikörper aus den Seren sowohl von PM/DM-Patienten als auch von SLE-Patienten im Immunoblot ein bemerkenswert einheitliches Reaktionsmuster auf: alle im Immunoblot positiven Seren reagierten mit einer Bande entsprechend einem Molekulargewicht von etwa 30 kDa, die mittels zweidimensionaler Elektrophorese als Untereinheit C9 ($\alpha 3$) identifiziert werden konnte. Die meisten Seren erkannten sogar ausschließlich diese Bande (14 von 16 DM/PM-Seren, 19 von 22 SLE-Seren), während

die übrigen Seren zusätzlich noch schwach gegen eine Untereinheit mit einem Molekulargewicht von etwa 23 kDa reagierten.

Bei Sjögren-Patienten stellte sich die Situation komplexer dar. Die Hälfte der anti-proteasomen positiven Seren (7/14) produzierte eine singuläre Bande, die in vier Fällen der typischen C9 ($\alpha 3$) - Bande entsprach. Bei der anderen Hälfte der positiven Sjögrenseren wurden Reaktionen mit mindestens zwei Banden gesehen, in drei Fällen sogar polyreaktive Anfärbungen fast aller proteasomaler Untereinheiten. Bei einem Sjögren-Patienten wurde mit Z ($\beta 2$) zum ersten Mal eine aktive Untereinheit als Ziel antiproteasomaler Autoantikörper nachgewiesen.

Bei stichprobenartigen Untersuchungen identifizierten Mayo *et al.* (2002) mit Hilfe rekombinanter humaner Untereinheiten C2($\alpha 6$), C5($\beta 6$), C8($\alpha 7$) und C9($\alpha 3$) als Autoantigene bei Patienten mit Multipler Sklerose.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eventuell krankheitsspezifische Reaktionsmuster der anti-proteasomalen Antikörper bestehen. Jedoch konnte bislang nur einem Teil der anti-proteasomalen Reaktionen konkrete Untereinheiten zugeordnet werden (s. Abb. 3).

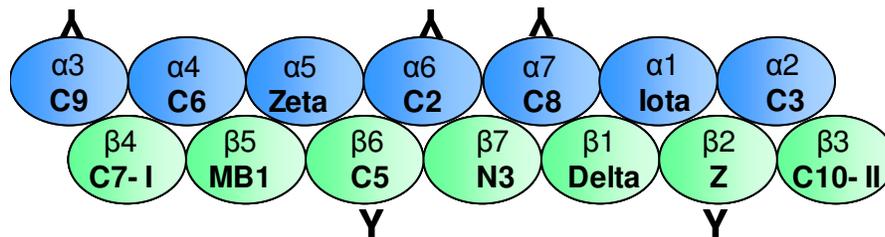


Abb.3: In Vorarbeiten identifizierte Zieluntereinheiten von anti-proteasomalen Autoantikörpern (Y): die zu den α -Untereinheiten gehörenden C2($\alpha 6$), C8($\alpha 7$) und C9($\alpha 3$), sowie die β -Untereinheiten Z($\beta 2$) und C5($\beta 6$).

2. PROBLEMSTELLUNG

Die bisherigen Untersuchungen zum Nachweis anti-proteasomaler Autoantikörper bei einzelnen autoimmunen Erkrankungen brachten teilweise deutlich voneinander abweichende Ergebnisse in Bezug auf die Prävalenz der Antikörper. Diese Abweichungen könnten unter anderem dadurch bedingt sein, dass ein einheitliches Testsystem bislang nicht existiert. Es werden unterschiedliche ELISA und Immunoblot-Verfahren benutzt, die sich nicht nur in der Art der Immunoassays sondern auch in der Herkunft des Antigens unterscheiden: während die Arbeitsgruppe um Arribas und Mayo (1991, 2000, 2002) hauptsächlich mit aus Rattenlebern und Mäusen isolierten Proteasomen arbeitete, wurden bei Feist *et al.* (1996) Proteasomen aus humanen Erythrozyten verwendet.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher zunächst die Untersuchung und Standardisierung der methodischen Grundlagen der anti-proteasomalen Diagnostik. Die beiden Testsysteme ELISA und Immunoblot zum Nachweis anti-proteasomaler Autoantikörper der Klasse IgG auf der Basis humaner Erythrozytenproteasomen sollten für die Routinediagnostik weiterentwickelt und verglichen werden. Mittels der weiterentwickelten Methoden sollten dann Patienten der rheumatologischen Abteilung der Charité mit Verdacht auf das Vorliegen einer Autoimmunerkrankung prospektiv untersucht werden, um weiterführende Daten zu Prävalenz und klinischer Bedeutung der anti-proteasomalen Antikörper zu erlangen.

Da es sich beim 20-S-Proteasom um einen Komplex aus 14 verschiedenen Proteinen (betrachtet man nur die konstitutiven Untereinheiten) handelt, stellt sich die Frage, welche Untereinheiten als Zielantigen dienen. Bisher gehen wenige Arbeiten über eine stichprobenartige Analyse hinaus. Eine systematische Untersuchung mittels ein- und zweidimensionalem Immunoblot wurde von Feist *et al.* (1996 und 1999) bei Patientengruppen mit systemischem Lupus erythematoses (SLE), autoimmuner Myositis und Sjögren-Syndrom durchgeführt. Es ergaben sich Hinweise auf die krankheitsspezifische Reaktion gegen einzelne Untereinheiten wie z.B. der häufige Nachweis von C9 (α 3) als Autoantigen bei SLE und autoimmuner Myositis. Sjögren-Seren zeigten in diesen Untersuchungen auffällige polyreaktive autoimmune Antworten gegen mehrere Untereinheiten gleichzeitig. Solche differenzierte Analysen liegen für andere Kollagenosen und sonstige Autoimmunerkrankungen bisher nicht vor.

Kenntnisse über die jeweiligen Zieluntereinheiten anti-proteasomaler Reaktionen könnten aber sowohl diagnostisch wichtig sein als auch zur Lösung bisher offener Fragen beitragen. So ist bislang ungeklärt, ob molekulare Mimikry oder intermolekulares „Epitope-spreading“ bei der Entstehung der anti-proteasomalen Autoimmunreaktion eine Rolle spielen. Auch die Frage nach einem eventuellen funktionellen Einfluss der anti-proteasomalen Antikörper setzt eine Differenzierung der Autoantikörper nach Zieluntereinheiten voraus. In diesem Zusammenhang interessierte vor allem, ob neben $\beta 2$ (Z) auch andere proteolytisch aktive Untereinheiten Ziel einer Autoimmunantwort werden.

Der zweite Untersuchungsschwerpunkt dieser Arbeit lag daher auf der Charakterisierung der individuellen anti-proteasomalen Reaktionsmuster von Patientenseren mit Hilfe ein- und zweidimensionaler Immunoblots. Hierzu sollte eine größere Anzahl rheumatologischer Patienten verschiedenster Verdachtsdiagnosen untersucht werden, um einen Überblick über die antigenen proteasomalen Untereinheiten zu erhalten und Hinweise auf möglicherweise krankheitsspezifische Zieluntereinheiten zu erlangen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Seren

Es wurden Seren von insgesamt 451 Patienten der rheumatologischen Klinik und 133 gesunden Blutspendern im anti-proteasomalen ELISA und/oder Immunoblot untersucht. Die Untersuchungen geschahen mit Einwilligung der Patienten und waren von der Ethikkommission der Charité genehmigt worden. Da es sich um eine prospektive Studie handelte, wurden die Diagnosen anschließend anhand der Arztbriefe ermittelt. Den Diagnosen zugrunde gelegt wurden international festgelegte Kriterienkataloge wie die ACR-Klassifikationskriterien für den systemischen Lupus erythematodes (Tan *et al.* 1982) und die rheumatoide Arthritis (Arnett *et al.* 1988) sowie die europäisch-amerikanischen Sjögren-Kriterien von 2002 (Vitali *et al.*).

3.2. Präparation von 20S-Proteasomen aus Erythrozytenkonzentraten

3.2.1. Lyse der Erythrozyten

Für die Präparation humaner 20S-Proteasomen dienten Erythrozytenkonzentrate als Ausgangsmaterial. Die Erythrozyten wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation 20 min bei 800 xg , JLA 10.500) und anschließend durch Zugabe von drei Volumen Lysepuffer lysiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte eine einstündige Zentrifugation mit 10.000 rpm (JLA 10.500).

PBS: 0,01M Na₂HPO₄ (Merck, Darmstadt)
 0,01M NaH₂PO₄ (Merck, Darmstadt)
 0,15M NaCl (Merck, Darmstadt)
 pH 7,4

Lysepuffer: 1x TEA (s.u.)
 1 mM DTT (Sigma-Aldrich, Steinheim)
 0.1% NP40 (Sigma-Aldrich, Steinheim)

3.2.2. Proteinanreicherung durch DEAE-Sephacel und Ultrafiltration

Der membranfreie Überstand wurde mit ca.100 ml DEAE Sephacel-Gel (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) inkubiert, welches zuvor in TEA äquilibriert worden war. Die Inkubation zur Bindung der Proteine erfolgte eine Stunde lang bei 4°C auf dem Flaschen-Roller, anschließend wurde das Gel auf einer G3-Fritte mit Puffer A gewaschen, bis kein Hämoglobin mehr nachweisbar war (Kontrolle durch Messung der Absorption bei 280 nm). Die gebundenen Proteine wurden durch sechsmalige Zugabe von 25 ml Puffer B eluiert. In den einzelnen Fraktionen wurde die proteolytische Aktivität bestimmt (siehe Abschnitt 2.2). Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und mit Hilfe einer Amicon-Kammer (XM 100 Membran) gegen TEAD dialysiert (Endkonzentration 60-70 mM NaCl) und eingeengt.

TEA: 20 mM Tris, pH 7.2 (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
 1 mM EDTA (Boehringer, Mannheim)
 1 mM Azid (Merck, Darmstadt)

TEAD: 1 mM DTT in TEA-Puffer
Puffer A: TEAD/ 50 mM NaCl
Puffer B: TEAD/ 500 mM NaCl

3.2.3. Anionenaustauscherchromatographie (DEAE-TOYOPEARL)

Das Dialysat wurde auf eine 35 ml-Säule mit TSK-Gel (DEAE-TOYOPEARL 650S von Tosohaas, Tokyo.) aufgetragen (2 ml/min). Nach einem Waschschrift mit dem fünffachen Säulenvolumen Puffer A erfolgte die Eluierung durch einen NaCl-Gradienten (s.unten). Nach Identifizierung der proteolytisch aktiven Fraktionen wurden diese vereinigt und durch Dialyse auf ein Volumen von 6 ml eingeengt (Amicon, XM 100) bzw. durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (35- 70% Sättigung) gefällt und in 6 ml TEAD wieder gelöst.

Puffer A: TEAD/50 mM NaCl
Puffer B: TEAD/500 mM NaCl

Gradient: 100%Puffer A - 70% Puffer B/30% Puffer A
365 ml (ca. 10 Säulenvolumen) insgesamt
1 ml/min Durchfluss
4 ml Fraktionen

3.2.4. Saccharose-Gradienten Ultrazentrifugation

Die Probe (jeweils 1 ml pro Gradient) wurde auf einen 10-40%igen Saccharose-Gradienten (Saccharose in Puffer A) aufgetragen und 16 h bei 40 000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Gradient in 0,6 ml Aliquots fraktioniert und die proteolytische Aktivität überprüft.

Saccharose (Merck, Darmstadt)

Rotor: SW40 (BECKMAN); 13 ml Saccharoselösung/ Röhrcchen + ca. 1 ml eingeeingte Probe

3.2.5. FPLC- Chromatographie (MonoQ)

Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt, mit Puffer C auf 50 ml verdünnt und auf eine MonoQ-Anionenaustauschersäule (HR5/5, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) geladen. Die 20S-Proteasomen wurden mit einem NaCl-Gradienten (s.u.) eluiert und zur Kontrolle abschließend noch auf enzymatische Aktivität untersucht. Die Quantifizierung der gewonnenen 20S-Proteasomen erfolgte über die Messung der UV-Absorption bei 280 nm, wobei ein Extinktionskoeffizient von $1.0\text{cm}^2/\text{mg}$ angenommen wurde.

Puffer C TEAD/100mM NaCl

Puffer D TEAD/1000mM NaCl

Auftragung erfolgte über den Superloop (max. 50 ml)

Gradient: 5 min 0- 20% D
20 min 20- 35% D
2 min 35-100% D
5 min 100% D
2 min 100- 0% D
5 min 0% D

Flußrate: 1ml/min, Fraktionen: 1ml
Proteasom eluiert bei 28-30% D.

3.3. Proteasomen- Aktivitätsmessung

Die proteolytische Aktivität der aufgereinigten 20S Proteasomen wurde anhand eines Assays bestimmt, in dem ein fluorogenes Peptid (Z-GGL-MCA) als Substrat diente. Durch die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität der Proteasomen wird MCA abgespalten. Das freigesetzte MCA emittiert unter Anregung (I_{ex} 380 nm) Licht mit einem Wellenlängenmaximum von 460nm. Zu 100 µl Assay-Puffer wurden 10 µl der Probe pipettiert und der Ansatz 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Fluoreszenzanstieg in einem Platten-Reader (SLT- Fluostar) bei 460 nm gemessen.

Assaypuffer : 50 mM Tris, pH 7.5
25 mM KCl (Merck, Darmstadt)
10 mM NaCl
20 µM Z-GGL-MCA

3.4. Anti-proteasomaler ELISA

Der in den vorausgehenden Arbeiten von Feist *et al.* (1996) verwendete ELISA wurde in Grundzügen beibehalten, aber in einigen Eckpunkten geändert. Die Inkubationszeiten wurden gekürzt, um sowohl die Handhabbarkeit als auch die Spezifität der Proteinwechselwirkungen zu verbessern.

Der bisher als Eichserum verwandte Kaninchen-Antikörper MP-3 benötigte im Gegensatz zu den untersuchten Patientenseren einen Anti-Kaninchen-Antikörper als Konjugat. Die Verwendung zweier unterschiedlicher Konjugate innerhalb eines ELISA ist nicht optimal, da Schwankungen der Konjugatmengen bzw. der Konjugatqualität sich auf Eichkurve und Testseren in unterschiedlicher, nicht kontrollierbarer Weise auswirken könnten. Daher erschien ein Humanserum als Eichserum geeigneter.

Ausgewählt wurde das Serum 3647 einer Patientin mit V.a. Kollagenose, das sowohl im Immunoblot als auch im ELISA eine starke Reaktion zeigte und in ausreichender Menge zur Verfügung stand. In jedem ELISA-Ansatz wurde mittels sechs Verdünnungsstufen dieses Eichserums eine Eichkurve aufgestellt, dem OD- Wert der niedrigsten Verdünnung (1:100) wurde als relative Einheit 100 % zugeordnet. Als Positivkontrolle wurde bei jedem ELISA das Serum Nr. 2110 mitgeführt.

Um mögliche Reaktionen der Patientenseren mit Pufferbestandteilen auszuschließen, wurde für jedes Serum eine Negativkontrolle in unbeschichteten Kavitäten mitgeführt. Zum Ausschluss aus der Bewertung führte ein Negativkontrollwert von über 5% des OD-Wertes der 1:100 Verdünnung des Eichstandards.

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte des ELISA beschrieben und in Tab.4 zusammengefasst:

Beschichtung	pro Kavität 0,5 µg Proteasom. Benetzung mit Proteasomenlösung in Carbonatpuffer pH 9,5 (10 µg Proteasom/ml), 3 h bei RT
Nicht beschichtet wurden die für die Negativkontrollen vorgesehenen Kavitäten (eine Kavität pro Testserum).	
Blocken	mit 0,5% Magermilchpulver gelöst in PBS pH 7,4 1 h bei RT auf Schüttler
Spülen	0,1% TWEEN 20 gelöst in PBS pH 7,4
Seren	Verdünnung 1:100, Inkubationszeit 30 min bei RT auf dem Schüttler Verdünnungsreihe des Serum 3647 als Eichkurve (OD bei Verdünnungsstufe 1:100 entsprach 100 relativen Einheiten) Positivkontrolle: Serum 2110
Zweitantikörper	anti-human-IgG Antikörper (Peroxidase-markiert) 1:800 verdünnt (Imtec, Wiesbaden). Inkubation 30 min bei RT auf dem Schüttler
Färbesubstrat	TMB (Medipan, Dahlewitz/Berlin)
Stopplösung	0,5 M H ₂ SO ₄ (Medipan, Dahlewitz/Berlin)

Tab. 4: Beschreibung des weiterentwickelten anti-proteasomalen ELISA

Immuno-Maxi-Sorb Platten (Firma Nunc, Wiesbaden) wurden beschichtet mit einer in Carbonatpuffer (pH 9,5) verdünnten Proteasomenpräparation. In jede Kavität wurden 50µl der Proteasomenverdünnung (Endkonzentration 10 µg/ml) pipettiert, und für 3 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert.

Zum Blockieren wurden 100 µl einer 0,5% Milchpulver-PBS-Lösung pro Kavität für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Daraufhin wurde dreimal mit 0,1% Tween 20-PBS gespült, nach dem Spülen wurden übriggebliebene Flüssigkeitsreste sorgfältig ausgeschlagen.

Die Testseren wurden zunächst mittels Vortexer gemischt und anschließend 1:100 in Probenpuffer (Milchpulver-PBS-Tween) verdünnt. Nach einer 30-minütigen Präinkubation wurden jeweils 50 µl dieser Verdünnung pro Kavität eingesetzt, wobei immer Doppelwerte bestimmt wurden. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 30 min auf dem Schüttler.

Nach erneutem Spülen wurde der POD-markierte Zweitantikörper (anti-Human-IgG, IMTEC, Wiesbaden) aufgetragen. Dazu wurde eine 1:800-Verdünnung in Probenpuffer hergestellt und 50 µl je Ansatz eingesetzt. Inkubiert wurde bei Raumtemperatur 30 min auf dem Schüttler, anschließend wurde wie oben beschrieben gespült.

Für die Farbreaktion wurden in jede Vertiefung 50 µl Färbelösung (TMB) pipettiert, die Platte wurde für 8 min auf den Schüttler gestellt und die Reaktion dann durch Zugabe von je 50 µl Stopplösung abgebrochen.

Die Auswertung erfolgte mit einem Photometer (Anthos 2001, Anthos, Krefeld) bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Um die Hintergrundfärbung feststellen zu können, wurden in zwei der Proteasomen-beschichteten Vertiefungen keine Seren gegeben, der ermittelte Hintergrundwert („Blank“) wurde von allen OD-Werten abgezogen.

Carbonatpuffer: 0,1 M NaHCO₃
0,1 M Na₂CO₃
auf pH 9,5 einstellen

Magermilchpulver: Milasan 2 (Milasan, Maliß)
TWEEN 20 (Serva, Heidelberg)

3.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

Die eindimensionale Auftrennung der Proteasomenuntereinheiten erfolgte durch Gelelektrophorese in einer Hoefer-Gelkammer („mighty small“), wobei zusammengesetzte Gele aus Trenngel (15%) und Sammelgel (3%) benutzt wurden.

Die 8 cm x 8 cm großen Gele ohne Taschen wurden jeweils mit 40 µg Proteasomenaufreinigung gleichmäßig beladen. Dazu wurde die Proteasomenaufreinigung 1:1 mit Probenauftragspuffer versetzt und die Mischung unmittelbar vor dem Auftragen 5 min lang aufgeköcht.

In einem Kontrollexperiment wurde rekombinantes $\alpha 3$ (C9) gelelektrophoretisch aufgetrennt und für Immunoblots verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Carsten Urbanek). Die $\alpha 3$ -cDNA humaner Herkunft wurde pQE31 als His-tag Protein exprimiert und denaturierend mit Harnstoff gereinigt. Für die Gelelektrophorese wurden jeweils 0,5 µg der rek.C9-Präparation pro Tasche eingesetzt.

Während des Laufs durch das Sammelgel betrug die Spannung 80 Volt, anschließend 180 Volt. Die Elektrophorese wurde 15 min nach Herauslaufen der blauen Farbfront beendet.

Trenngel (15%)

Aqua dest.	10 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	15 ml
SDS-Lösung (Serva, Heidelberg)	0,3 ml
APS-Lösung (Ferak, Berlin)	100 µl
TEMED (Gibco BRL, Paisley, USA)	10 µl

Sammelgel (3%)

Aqua dest.	3,15 ml
Sammelgelpuffer	1,25 ml
Acryl/Bisacrylamid-Lösung	0,5 ml
SDS-Lösung	50 µl
APS-Lösung	50 µl
TEMED	3 µl

Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
Acrylamid/Bisacrylamidlösung:	30 g Acrylamid (Serva, Heidelberg) 0,8 g N,N-Methylenbisacrylamid (Serva, Heidelberg) in 100 ml Aqua dest.
SDS-Lösung :	10% SDS in Aqua dest.
APS-Lösung:	10% Ammoniumpersulfat in Aqua dest.
Elektrodenpuffer 5x:	75,5 g Tris 360 g Glycin (Serva, Heidelberg) 25 g SDS in 5 l Aqua dest.
Probenauftragspuffer:	2,25 ml Sammelgelpuffer 2 ml Glycerin (Fluka, Neu-Ulm) 5,75 ml Aqua dest. 320 mg DTE (AppliChem, Darmstadt) 460 mg SDS 10 µl Bromphenolblau (10% w/v) (Serva, Heidelberg)

3.6. Western blot

Mittels der diskontinuierlichen Semi-Dry-Blot-Technik wurden die aufgetrennten Proteine im Anschluß an die SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schüll, Düren) bzw. bei zweidimensionaler Gelelektrophorese auf eine PVDF-Membran (Millipore) transferiert.

Zunächst wurden die Membran und die Filterpapiere (Whatmanpapier von Schleicher und Schüller) auf Gelgröße zugeschnitten und in den jeweiligen Blotpuffer gelegt:

2 Filterpapiere	Anodenpuffer I	(0,3 M Tris in 20% Methanol)
2 Filterpapiere, Nitrozellulose	Anodenpuffer II	(0,025 M Tris in 20% Methanol)
4 Filterpapiere	Kathodenpuffer	(0,04 M ϵ -Aminocaprinsäure in 20 % Methanol)

Auf die Anode der Semi-Dry-Blotapparatur wurden in der angegebenen Reihenfolge zunächst die in Anodenpuffer getränkten Filterpapiere blasenfrei geschichtet, dann die Membran, darauf das Gel und zuletzt die in Kathodenpuffer getränkten Filterpapiere. Der Transfer erfolgte mit einer Stromstärke von 400 mA (Zeitdauer 1 h).

War dem Western blot eine eindimensionale SDS-PAGE vorausgegangen, wurde die Nitrozellulose nun mit Ponceau-Rot gefärbt, um die transferierten Proteine sichtbar zu machen. Zur Vorbereitung des Immunoblots wurde die Nitrozellulose daraufhin mit einem Skalpell in ca. 4 mm breite Streifen geschnitten. Ein Gel bzw. eine Nitrozellulosemembran ergab 20 bis 25 Streifen (entspricht 1,6-2 µg Proteasomen/Streifen).

Nach zweidimensionaler Auftrennung wurde das Proteinmuster auf der PVDF-Membran mit Coomassieblau sichtbar gemacht und zum Vergleich mit späteren Immunoblots mit einem digitalen Scanner aufgenommen. Die Entfärbung vor Durchführung der Immunoblots erfolgte mit 50% Methanol.

Methanol (Roth, Karlsruhe)

ε-Aminocapronsäure (Calbiochem, La Jolla, USA)

3.7. Immunoblot

Das von Feist *et al.* (1996) verwendete Immunoblot-Protokoll wurde ergänzt durch die Einführung eines Humanserums als Referenzserum. Hierdurch sollte eine semiquantitative Auswertung ermöglicht werden. Die „inter-assay“-Unterschiede beim Immunoblot können bedeutend sein aufgrund der unterschiedlich effektiv übertragenen Proteinmengen im Westernblot, sowie der eventuell schwankenden Konjugat-, Entwickler- oder Belichtungsstärke. Der Bezug auf ein Referenzserum erlaubt unabhängig von diesen Schwankungen relative Aussagen über die Reaktionsstärke einer Serumprobe.

Als Referenzserum ausgewählt wurde das Serum einer SLE-Patientin (0441), welches in der 1:100 - Verdünnung eine deutliche Reaktionsbande gegen eine Proteasomen-untereinheit von ca. 30 kD produzierte. Die anti-proteasomale Aktivität des Serums im ELISA betrug 31,4 rel. Einheiten. Das Referenzserum wurde in jedem Versuchsansatz in den zwei Verdünnungsstufen 1:100 und 1:200 aufgetragen. Bei einer Belichtungszeit von 30 Sekunden war ein Signal der 1:200 Verdünnung des Referenzserums nur

äußerst schwach zu erkennen. Seren, bei denen nach 30 Sekunden Belichtungszeit kein Signal zu erkennen war, wurden als negativ gewertet. Die 1:200 Verdünnung der Referenz diente damit als interner Cut-off. Für die Analyse der Zieluntereinheiten im zweiten Teil der Arbeit wurde mit längeren Belichtungszeiten gearbeitet, um auch sehr schwache Reaktivitäten charakterisieren zu können.

Die Bandenintensität der reagierenden Testseren wurde zur Bandenintensität der Vergleichsseren in Bezug gesetzt. Dazu wurde die Bandenintensität densitometrisch erfasst mittels der „NHI-image“ Software (<http://rsb.info.nhi.gov/nhi-image/>). Diese Vorgehensweise ermöglichte eine semi-quantitative Einteilung der Reaktionsstärken nach folgendem Schema:

Bandenintensität	Reaktionsstärke
≥ 1:100 Verdünnung des Referenzserums	+++ (positiv)
≥ 1:200 Verdünnung des Referenzserums	+ (schwach positiv)
keine Bande	0 (negativ)

bei einer Belichtungszeit von 30 Sekunden

Imunoblot-Protokoll: Nach Entfärbung der Nitrozellulose mit Aqua dest (bei Ponceau-Färbungen) oder 60% Methanol (bei Coomassieblau) wurde 15 min mit Blockiermedium auf dem Schüttler inkubiert und anschließend nach Wechsel des Blockiermediums über Nacht im Kühlschrank blockiert. Am nächsten Morgen erfolgte erneut ein Mediumwechsel und eine 15-minütige Inkubation auf dem Schüttler.

Die Seren wurden 1:100 in Probenpuffer verdünnt und 2 h auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Ungebundene Serumbestandteile wurden dann durch einen 30-minütigen Waschvorgang, ebenfalls auf dem Schüttler, entfernt. Dabei wurde der Waschpuffer 4x gewechselt.

Als Konjugat wurde ein POD-markierter anti-Human IgG-Antikörper (Imtec, Wiesbaden) in einer Verdünnung von 1:10000 (in Probenpuffer) verwendet. Die Inkubationszeit betrug 2 h auf dem Schüttler bei RT. Daraufhin erfolgte ein erneuter Waschvorgang. Abschließend wurden die Nitrozellulosestreifen mit einem Chemoluminiszenz auslösenden Agens (ECL, Boehringer Mannheim) 1 min inkubiert und spezielle ECL-geeignete Filme belichtet (Kodak X-Omat DS).

Blockiermedium: 3,5% Trockenmilchpulver (Milasan) in PBS mit 0,3 M NaCl,
zum Lösen auf 50 C° erhitzt

Probenpuffer: Blockiermedium mit 0,1% Tween

Waschpuffer: 0,1% Tween in 0,3 M NaCl-PBS

ECL (enhanced chemoluminescence) (Boehringer, Mannheim)

Ponceau-S (Serva, Heidelberg)

Coomassie brilliant blue R-250 (Serva, Heidelberg)

3.8. Zweidimensionale Gelelektrophorese (*non equilibrium pH gradient electrophoresis, NEPHGE*)

Zur besseren Auftrennung eines Proteingemisches aus Proteinen ähnlicher Molekulargewichte erfolgt bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese zunächst eine Trennung nach dem jeweiligen isoelektrischen Punkt. Dies erreicht man durch einen pH-Gradienten in einem Kapillargel, der durch eine Mischung sogenannter Ampholyte (Polyamino-polycarbonsäuren) aufgebaut wird. Nach Beendigung der pH-Gradienten-Elektrophorese wird das Kapillargel auf ein konventionelles SDS-Gel aufgelegt, so dass die Proteine in dieses einwandern können. Die Auftrennung nach Molekulargewicht verläuft also senkrecht zur vorherigen isoelektrischen Fokussierung.

1. Dimension

Für die Auftrennung nach Ladungseigenschaften wurden Kapillargele (s.u.) in Säulen mit einem Innendurchmesser von 3 mm gegossen (O`Farrell et al. 1977). Die Proben (60 µg 20S-Proteasom) wurden mit verdünnter Trichloressigsäure gefällt (Endkonzentration 10% TCE, 20 min auf Eis) und zentrifugiert (30 min, 14.000 rpm, 4°C). Die Pellets wurden erst mit 70% Ethanol und anschließend mit Aceton gewaschen und nach dem Trocknen in 100 µl NEPHGE-Probenpuffer aufgenommen (unter mindestens dreistündigem Schütteln). Die Proben wurden auf die Kapillargele aufgetragen und mit 30 µl Overlaypuffer überschichtet. Die Auftrennung erfolgte bei 400 V über 4 h. Nach Beendigung des Laufes wurden die Gele aus der Kapillare

herausgedrückt und 45 min in Equilibrierungspuffer inkubiert, wobei der Puffer mehrfach gewechselt wurde.

2. Dimension

Für die Auftrennung in der zweiten Ebene wurde eine konventionelle SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) durchgeführt (siehe Absatz 3.4). Dazu wurde auf das fertige Sammelgel eine Schicht Agarose gegossen und die equilibrierten Kapillargele in die noch flüssige Agarose luftblasenfrei eingebettet. Für den Durchlauf durch das Sammelgel (5% Acrylamid) wurde eine Spannung von 60 V angelegt, beim Durchlauf durch das Trenngel (15% Acrylamid) wurde die Spannung auf 200 V erhöht (insgesamt 1200Vh).

Kapillargel: 15,5 M Harnstoff, 7,4% Acrylamid, 0,3% NP40,
8,5 vol% Ampholine 3-10 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
in Aqua dest.

NEPHGE-Probenpuffer: 9,5 M Harnstoff, 2% NP40, 5 vol% Ampholine 3-10,
5 vol% β -Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen), 0,3% SDS
in Aqua dest.

Overlaypuffer: 9 M Harnstoff, 2,5 vol% Ampholine 3-10
in Aqua dest.

Anodenlösung (oben): 0,01 M H_3PO_4

Kathodenlösung (unten): 0,02 M NaOH (Serva, Heidelberg)

Equilibrierungspuffer: 10 vol% Glycerol, 10 vol% β -Mercaptoethanol,
2,3% SDS, 0,062 M Tris pH 6,8, in Aqua dest.

Einbettagarose: 10 vol% Glycerol, 10 vol% β -Mercaptoethanol,
2,3% SDS, 0,062 M Tris pH 6,8, 1% Agarose,
in Aqua dest.

3.9 Statistische Methoden

Beim anti-proteasomalen ELISA wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert verwendet. Zum Vergleich der ELISA-Ergebnisse verschiedener Patientengruppen wurde der nicht-parametrische U-Test nach Mann-Whitney benutzt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% wurde als statistisch signifikant betrachtet. In den Abbildungen wurden die Medianwerte angezeigt, wenn nicht anders angegeben. Zur Berechnung der Korrelation zwischen den Ergebnissen der beiden Testsysteme ELISA und Immunoblot wurde das Spearman r berechnet.

3.10 Bezugsquellen und Gerätenachweis

a) Chemikalien, Verbrauchsmaterialien

Die Herkunft der verwendeten Chemikalien ist im Text beschrieben. Alle Lösungen wurden in voll entsalztem H₂O angesetzt, das zusätzlich über eine Filteranlage von Millipore gereingt wurde.

b) Geräte

Geräte	Hersteller
Amicon-Ultrafiltrationskammer	Millipore Deutschland, Schwalbach
JLA 10.500 Rotor	Beckman Coulter Deutschland, Krefeld
Kühlzentrifuge RC24	Beckman Coulter Deutschland, Krefeld
Mighty small Elektrophoresekammern	Hoefler Pharmacia Biotech, San Francisco, USA
MonoQ-Austauschersäule HR5/5	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Nitrozellulosemembran	Schleicher und Schüll, Düren
Photometer Anthos 2001	Anthos, Krefeld
Plattenreader SLT-Fluostar	SLT, Crailsheim
Röntgenfilmentwickler Hyperprocessor	Amersham Pharmacia Biotech Deutschland, Freiburg
Semi-dry Blotkammer	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
SW40 Rotor	Beckman Coulter Deutschland, Krefeld
Tischzentrifuge	Heraeus, Osterode

4. ERGEBNISSE

4.1. Standardisierung und Validierung der anti-proteasomalen Testverfahren ELISA und Immunoblot

Zur Standardisierung der von Feist *et al.* (2006) etablierten ELISA- und Immunoblot-Protokolle wurden humane Seren als Eichserum und Positivkontrolle statt der vorher verwendeten Kaninchen-Antikörper eingeführt. Dies ermöglichte zudem eine semiquantitative Auswertung des Immunoblots (Einteilung in stark positive, schwach positive und negative Reaktionen), wie im Methodenteil beschrieben. Weitere Änderungen betrafen vor allem den ELISA. Zum Ausschluß von unspezifischen Reaktionen gegen das Blockiermedium wurden Negativkontrollen mitgeführt (siehe nächsten Abschnitt). Die Inkubationszeiten wurden aus praktischen Erwägungen gekürzt.

4.1.1. Untersuchung zum Einfluss unspezifischer Reaktionen im anti-proteasomalen ELISA

Gerade bei einem Testsystem wie dem ELISA besteht die Möglichkeit, dass positiv getestete Seren nicht nur mit dem untersuchten Antigen reagieren, sondern auch andere Bestandteile des Systems erkennen. Eine unspezifische Reaktion kann gegen Verunreinigungen des Antigens oder gegen die benutzten Platten und Puffer bzw. Lösungen gerichtet sein.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss der verwendeten Lösungen und Platten bzw. die Antigenspezifität der Antikörperreaktion im anti-proteasomalen ELISA untersucht werden. Dazu wurden Multititerplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen des Proteasoms als Antigen benetzt (0µg/Kavität bis zu 2µg/Kavität). Auf diesen Platten wurden acht bekannte Patientenseren (vier mit vorher starker Reaktion, vier mit schwacher bis negativer Reaktion im ELISA) mit dem sonst unveränderten ELISA-Protokoll getestet. Nur bei einer spezifischen Reaktion gegen Proteasomen wurde ein proportionaler Anstieg der Reaktionsstärke mit steigender Benetzungskonzentration erwartet.

Gleichzeitig sollte mit dieser Testanordnung festgestellt werden, welche Proteasomenkonzentration zur Beschichtung bei den geänderten Testbedingungen optimal ist.

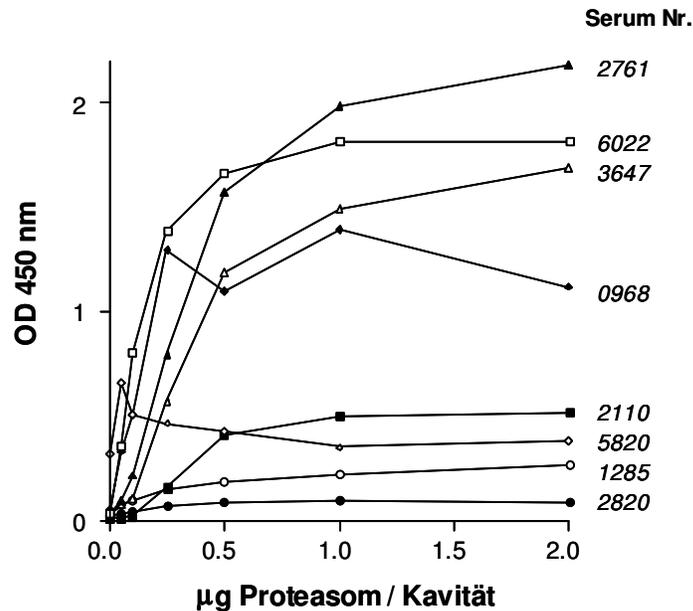


Abb.4: Untersuchung zur Antigen-spezifität des anti-proteasomalen ELISA. Mit acht Patientenseren wurden Tests mit unterschiedlichen Benetzungskonzentrationen durchgeführt (0,0µg; 0,05 µg; 0,10 µg; 0,25 µg; 1,00 µg und 2,00 µg Proteasomen/Kavität).

Die Ergebnisse sind in Abb. 4 zusammengefasst. Wie schon in den Vorversuchen zeigten vier der Seren eine starke Reaktion gegen Proteasomen. Die Reaktivität dieser Seren stieg mit zunehmenden Proteasomenkonzentrationen in Form einer Sättigungskurve an, mit beginnendem Plateau bei einer Konzentration von etwa 1µg/Kavität. Bei fehlender Beschichtung mit Proteasomen lagen die OD-Werte aller vier Seren nahe Null.

Die vier weiteren Seren reagierten wie erwartet schwächer. Die OD-Werte der Seren Nr. 1285 und Nr. 2820 blieben im Wesentlichen von der Proteasomenkonzentration unbeeinflusst und stiegen nur leicht über den Ausgangswert ohne Beschichtung mit Proteasomen an. Dagegen zeigten die Werte für Serum Nr. 2110 einen deutlichen, wenn auch relativ geringen Anstieg. Eine unspezifische Wechselwirkung mit Lösungsbestandteilen wie z.B. Milchpulver konnte hiermit auch für dieses Serum ausgeschlossen werden.

Bei Serum Nr. 5820 lag schon der Ausgangswert ohne Proteasomenbenetzung weit höher als bei den anderen Seren, die OD stieg bei geringer Proteasomenkonzentration noch leicht an und fiel dann bei steigenden Proteasomenkonzentrationen wieder geringfügig ab. Somit kann dieses Serum als nicht reaktiv gegen 20S-Proteasomen eingeordnet werden. Es ist eine unspezifische Reaktion anzunehmen, da schon beim ELISA ohne Proteasomenbenetzung eine relativ hohe OD gemessen wurde. Dass die OD-Werte bei ganz geringer Proteasomenkonzentration zunächst ansteigen, um dann bei höheren Konzentrationen wieder zu sinken, lässt sich ohne genaue Kenntnisse der Proteinwechselwirkungen nicht erklären.

Um Seren mit derartigen unspezifischen Reaktionen zu identifizieren, ist es nötig, für alle untersuchten Seren Kontrollwerte auf unbeschichteten Kavitäten bei sonst identischer Handhabung des ELISA zu bestimmen.

Die hier dargestellten Versuchsreihen sollten auch Aufschluss darüber geben, welche Proteasomenkonzentration optimal für die Benetzung der Multititerplatten geeignet ist. Wichtig für eine gute Differenzierbarkeit zwischen positiven und negativen Seren ist ein möglichst großer Abstand der entsprechenden OD-Werte voneinander. Eine maximale Auftrennung wurde hier bei Benetzungen von mindestens 1 µg/Kavität beobachtet. Aber auch eine Konzentration von 0,5 µg/Kavität zeigt bereits eine gute Auftrennung. Darüber hinaus liegen die Messwerte bei dieser Konzentration noch im ansteigenden Bereich der Kurve, was für die Messgenauigkeit ebenfalls von Bedeutung ist. Daher wurde im Folgenden eine Beschichtungskonzentration von 0,5 µg/Kavität gewählt.

4.1.2. Vergleich beider Testsysteme

Nach Optimierung des anti-proteasomalen ELISA und des Immunoblots wurde der Frage nachgegangen, in welchem Ausmaß die Ergebnisse der beiden Testsysteme korrelieren.

Insgesamt 115 Seren wurden mit beiden Verfahren auf proteasomale Antikörper untersucht, darunter 63 zufällig ausgewählte Seren von Patienten der Charité im Rahmen der prospektiven Studie sowie 52 Seren von gesunden Blutspendern. Die Ergebnisse sind in Abb.5 und Tab.5 zusammenfassend dargestellt.

Der Median der ELISA-Ergebnisse für die im Immunoblot negativen Seren lag bei 4,5 relativen Einheiten (rel. Einheiten). Demgegenüber betrug der Median für die stark positiven Seren 32,6 rel. Einheiten. Die Gruppe der 16 Seren, die im Immunoblot

schwach positiv waren, nimmt eine Zwischenstellung ein, was auch der Median von 17,6 rel. Einheiten anzeigt. Die Berechnung der Rangkorrelation nach Spearman bestätigt eine positive Korrelation der Immunoblot- und ELISA-Daten ($r=0,64$; $p<0,0001$).

Das Referenzserum, mit dessen Hilfe die Reaktionsstärken im Immunoblot definiert wurden, erreichte im anti-proteasomalen ELISA einen Wert von 31,4 rel. Einheiten in der Verdünnung 1:100. Theoretisch sollte ein Serum mit einem positiven Immunoblotergebnis also im ELISA einen Wert von $\geq 31,4$ rel. Einheiten erreichen, ein Serum mit einem negativen Immunoblotergebnis einen Wert von $< 15,7$ rel. Einheiten.

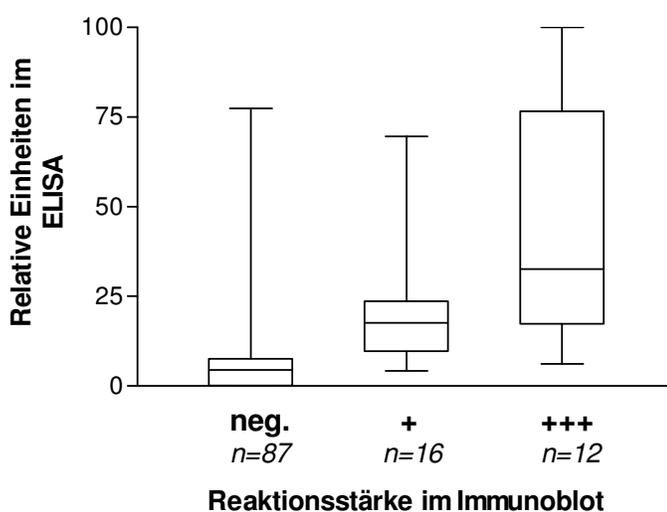


Abb.5: Vergleich der beiden Testsysteme zur Bestimmung von anti-proteasomalen Antikörpern. Insgesamt 115 Seren (52 gesunde Blutspender, 63 Patienten der Rheumatologischen Station der Charité) wurden sowohl im ELISA als auch im Immunoblot untersucht. Abhängig von der Stärke der Reaktion im Immunoblot wurden die Seren in drei Gruppen aufgeteilt, auf der y-Achse wurden die Resultate des anti-proteasomalen ELISA aufgetragen. Die Rechtecke umfassen die Werte zwischen der 25. und 75. Perzentile, als Querstrich markiert ist der Median. Die Arme zu beiden Seiten zeigen den höchsten bzw. niedrigsten Wert an.

Entsprechend sollten die ELISA-Werte für schwach positive Seren zwischen 15,7 und 31,4 rel. Einheiten liegen (s. Abschnitt 3.6.).

Inwieweit die einzelnen Seren in beiden Testsystemen übereinstimmende Ergebnisse produzierten, ist aus Tab. 6 zu entnehmen.

Die Mehrheit der Seren (98/115; 85%) zeigte ein übereinstimmendes Verhalten in den beiden Testsystemen.

	IB negativ <i>n = 87</i>	IB schwach positiv <i>n = 16</i>	IB positiv <i>n = 12</i>
ELISA $\geq 31,4$ rel.E. <i>n = 11</i>	1	3	7
ELISA $< 31,4$ rel.E. $\geq 15,7$ rel.E. <i>n = 12</i>	2	7	3
ELISA $< 15,7$ rel.E. <i>n = 92</i>	84	6	2

Tab. 5: Gegenüberstellung der ELISA- und Immunoblot (IB)-Testergebnisse von 115 Seren, die mit beiden Methoden auf anti-proteasomale Antikörper untersucht worden waren. Das Referenzserum für die semi-quantitative Einteilung der Immunoblotergebnisse (siehe Abschnitt 1.2.) hatte in der Verdünnung 1:100 einen ELISA-Wert von 31,4 rel. Einheiten. Fett hervorgehoben sind die übereinstimmenden Ergebnisse.

Von den 87 im Immunoblot negativen Seren lagen 84 Seren im ELISA unter dem rechnerischen Grenzwert von 15,7 rel. Einheiten (96,6% Übereinstimmung). Zwei Seren lagen mit 15,7 und 16,1 rel. Einheiten knapp darüber, nur ein Serum wies mit 77,4 rel. Einheiten einen erheblich höheren Wert auf.

Bei den insgesamt 12 im Immunoblot stark positiven Seren zeigten sich im ELISA bei 7 Seren (58% Übereinstimmung) die theoretisch erwarteten Werte über 31,4 rel. Einheiten. Ein Serum lag knapp darunter (29,6 rel. Einheiten), vier Seren deutlicher.

Bei Seren mit schwachen Banden waren die Abweichungen der ELISA-Ergebnisse ausgeprägter, nur 7 von 16 Seren (44%) stimmten genau überein. Möglicherweise liegt eine Ursache dafür in dem relativ eng gefassten Definitionsbereich dieser Kategorie.

Zusammenfassend wurden mittels ELISA-Verfahren bei 23 von 115 Seren mittelmäßig bis stark reagierende anti-proteasomale Antikörper gefunden, während im Immunoblot 28 Seren eine mittelgradige bis starke Reaktion zeigten.

Insgesamt fünf Seren produzierten deutlich abweichende Ergebnisse in ELISA und Immunoblot. In Tab. 6 werden diese Seren näher charakterisiert:

Gesundheitsstatus	Alter	IB	Längenbereich	im ELISA rel. Einheiten
Sicca-Symptomatik	65 Jahre	neg.	keine Bande	77,4
gesund	30 Jahre	+++	30 kD ¹	13,8
gesund	<18 Jahre	+++	32 kD ¹	17,6
Arteriitis temporalis	72 Jahre	+++	25< Bande<30 kD ²	17,0
Rheumatoide Arthritis	65 Jahre	+++	30 kD ¹	6,2

Tab. 6: Charakterisierung der Seren mit abweichendem Verhalten in ELISA und Immunoblot.

¹eine einzelne Bande in den angegebenen Längenbereichen.

²zwei Banden im Bereich zwischen 25 und 30 kD.

Bei den Seren, die im ELISA im Gegensatz zum Immunoblotergebnis negativ waren, lässt sich im Hinblick auf die erkannten Proteasomenuntereinheiten anhand des Molekulargewichts der Banden kein einheitliches Muster erkennen.

4.2. Testscreening von Seren mit optimierten Immunoassays

4.2.1. Untersuchung von Blutspendern

a) im ELISA

Im ELISA untersucht wurden 133 Seren von gesunden Blutspendern. Bei 7 Seren wurde eine zu hohe unspezifische Hintergrundreaktion gegen das verwendete Blockierungsmedium festgestellt, so dass die Ergebnisse nicht berücksichtigt wurden. Auswertbar waren die Testergebnisse von 126 Seren (siehe Abb.6).

Der Mittelwert betrug 4,3 rel. Einheiten, der Median 3,6 rel. Einheiten. Die 75%-Perzentile der ELISA-Werte lag bei 6,4 rel. Einheiten.

Ein Serum erreichte einen Wert von 46,3 rel. Einheiten und hob sich damit deutlich von den anderen Ergebnissen ab. Somit kann dieses Serum als Ausreißer betrachtet werden und wurde für die Berechnung des Cut-off nicht berücksichtigt. Zum Mittelwert der übrigen 125 Blutspenderseren (4,0 rel. Einh.) wurde die dreifache Standardabweichung (3 x 4,5 rel. Einh.) addiert, es ergab sich daraus ein Cut-off von 17,5 rel. Einheiten.

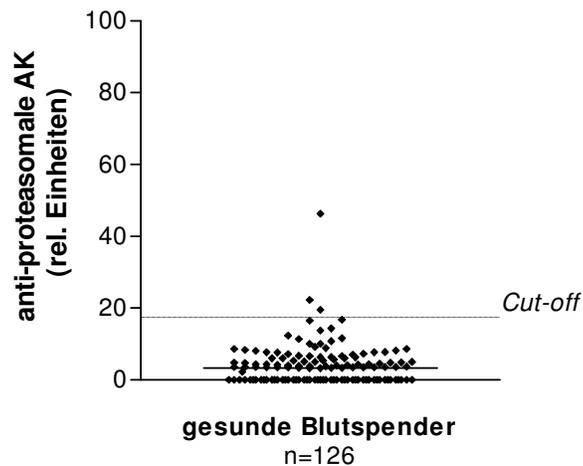


Abb.6: 126 Seren wurden im ELISA auf anti-proteasomale Antikörper getestet. Der Median der Ergebnisse lag bei 3,6 rel. Einheiten (durchgezogener Strich), die unterbrochene Linie markiert den Cut-off bei 17,5 rel. Einheiten.

Von 126 Seren wiesen drei Seren einen Wert oberhalb des Cut-off auf. Klinische Angaben zu den positiven Blutspendern lagen nicht vor. Bemerkenswert war, dass das im ELISA stark positive Serum auch im anti-proteasomalen Immunoblot stark reagierte; dagegen waren ANA nur im Titer 1:80 nachzuweisen (feingranulär, nukleolär).

Insgesamt waren 2,4% (3/126) der gesunden Kontrollgruppe im ELISA positiv für anti-proteasomale Antikörper.

Bezogen auf das untersuchte gesunde Kontrollkollektiv beträgt die Spezifität der anti-proteasomalen Antikörper somit 97,6% für den ELISA.

b) im Immunoblot

Im anti-proteasomalen Immunoblot wurden 55 Seren gesunder Blutspender untersucht. Bei einer Belichtungszeit von 30 Sekunden zeigten 50 Seren keine Reaktion (90,9 %). Ein Serum reagierte stark positiv (1,8%), 4 Seren produzierten eindeutige, jedoch schwächer ausgeprägte Banden (7,3%). Als positive Ergebnisse wurden schwach positive und stark positive Banden gewertet.

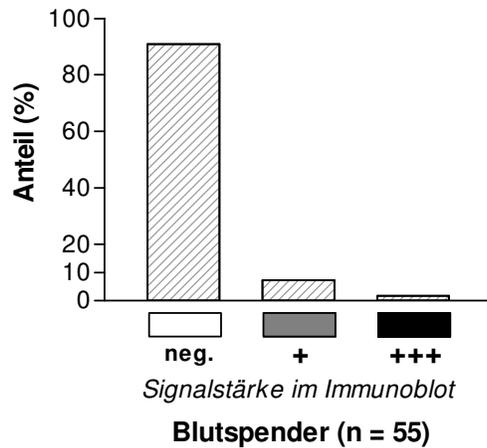


Abb.7: 55 gesunde Blutspender wurden im Immunoblot untersucht, die Reaktion gegen Proteasomen wurde im Vergleich mit einem Referenzserum in drei Klassen eingeteilt (negativ, schwach positiv, stark positiv). Details zur semi-quantitativen Auswertung siehe Abschnitt 3.6.

Die Verdünnung des Referenzserums, die im Immunoblot eine gerade noch sichtbare Bande produzierte, hatte im ELISA einen Wert von 15,7 rel. Einheiten. Der Grenzwert für positive Seren liegt also im Immunoblot geringfügig unter dem Cut-off des ELISA (dort 17,5 rel. Einheiten).

Die Spezifität des anti-Proteasomen-Immunoblots bezogen auf die gesunde Kontrollgruppe liegt bei 90,9%.

4.2.2. Testscreening von rheumatologischen Patienten

Für die prospektive Studie wurden Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsbildern aus dem entzündlich-rheumatischen Formenkreis und auch solche mit bloßem Verdacht auf ein derartiges Krankheitsbild untersucht, um die Aussagekraft der anti-proteasomalen Antikörperdiagnostik an einem Kollektiv zu überprüfen, das der realen klinischen Situation entspricht.

Die Untersuchung erfolgte bei stationärer Aufnahme in die Charité oder bei ambulanter Vorstellung. Bei mehrfach aufgenommenen Patienten wurde nur das erste Serum berücksichtigt. Insgesamt wurden 301 Seren im anti-proteasomalen ELISA und 217 Seren im Immunoblot untersucht (davon 67 Seren mit beiden Assays).

Die Diagnosen wurden anhand der Arztbriefe ermittelt. Dem prospektiven Ansatz entsprechend fanden sich bei der im nachhinein erfolgten Feststellung eine Vielzahl unterschiedlicher Diagnosen und auch eine große Anzahl von Krankheitsbildern unsicherer Genese. Bei den eindeutig diagnostizierten Erkrankungen dominierten die Autoimmunerkrankungen (75%). Dabei handelte es sich größtenteils um Kollagenosen im engeren Sinne (54%), wie z.B. SLE, primäres Sjögren-Syndrom, Poly- und Dermatomyositiden, undifferenzierte Kollagenosen (UCTD), Sklerodermie inklusive CREST-Syndrom sowie Mischkollagenosen (MCTD).

Die übrigen 25% der Erkrankungen waren nicht primär entzündlich-autoimmun bedingt, wie z.B. degenerative Gelenkerkrankungen, Fibromyalgie oder Lyme Borreliose.

Im Patientenkollektiv kamen einige Krankheitsbilder mehrfach vor, so dass Subgruppen auf die Prävalenz anti-proteasomaler Antikörper untersucht werden konnten. Die ELISA-Ergebnisse der sieben größten Patientengruppen sind in Abb.8 dargestellt.

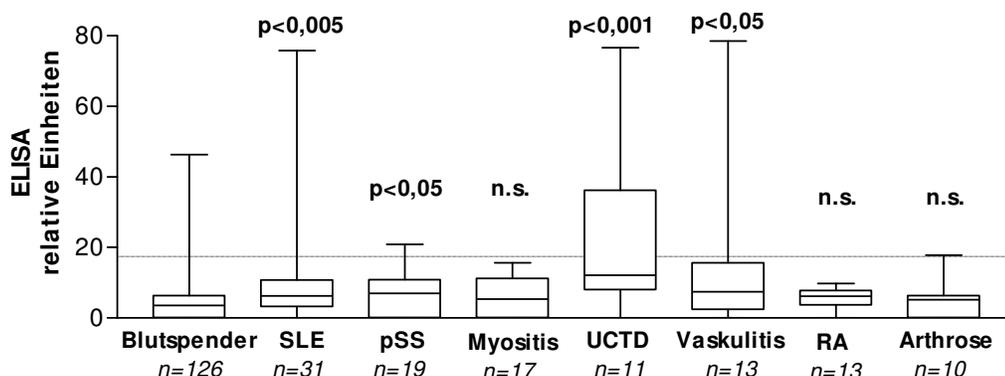


Abb.8: Darstellung der ELISA-Ergebnisse bei Subgruppen der Patientenstichprobe. Die Signifikanzangaben beziehen sich auf den Vergleich mit der Blutspendergruppe (nicht parametrischer Mann-Whitney-Test). Angegeben sind die Bereiche zwischen 25. und 75. Perzentile sowie die Mediane (Striche in den Kästchen) und die höchsten bzw. niedrigsten vorkommenden Werte (T-förmige Ausläufer). Die unterbrochene Linie markiert den Cut-off bei 17,5 rel. Einheiten.

Die Gruppen der Myositiden und der Vaskulitiden umfassten verschiedene Krankheitsentitäten. Zu den Myositiden gezählt wurden die primär idiopathische

Dermatomyositis (n=9), die juvenile Dermatomyositis (n=1), die primär idiopatische Polymyositis (n=2), das Antisynthetase-Syndrom (n=2), Myositis ossificans progressiva (n=1) und zwei nicht genauer definierte Myositisfälle. Zur Gruppe „Vaskulitiden“ zusammengefasst wurden folgende Krankheitsbilder: Arteriitis temporalis (n=2), Polymyalgia rheumatica (n=3), M. Wegener (n=3), Arteriitis ohne nähere Definition (n=1) und Vaskulitis ohne nähere Definition (n=4).

Die ELISA-Ergebnisse der verschiedenen Subgruppen weisen deutliche Differenzen auf. Signifikant erhöht sind die Mediane bei SLE (6,3 rel. Einheiten; $p = 0,0016$), primärem Sjögren-Syndrom (7,0 rel. Einheiten; $p = 0,0339$), undifferenzierter Kollagenose (12,2 rel. Einheiten; $p = 0,0007$) und bei den Vaskulitiden (7,5 rel. Einh.; $p = 0,0149$). Kein signifikanter Unterschied zur Werteverteilung bei Blutspendern besteht bei den Patientenkollektiven mit Myositis, rheumatoider Arthritis und Arthrose nichtentzündlicher Genese.

Die Prävalenz für ELISA-positive Seren beträgt bei SLE-Patienten 12,9% (4/31), für das primäre Sjögren-Syndrom 5,3% (1/19) und für UCTD 45,5% (5/11). In der Vaskulitisgruppe reagierten zwei Seren positiv (15,4%), die betreffenden Patienten litten an M.Wegener bzw. an einer nicht weiter spezifizierten Vaskulitis. Auch bei den Arthrosen gab es ein positives Serum von einem Patienten mit Spondylarthrose (10%), das knapp über dem Cut-off lag. Kein positives ELISA-Ergebnis war bei Myositis und rheumatoider Arthritis nachzuweisen.

Auch die im Immunoblot untersuchten Seren wurden nach Subgruppen getrennt analysiert. Nur ein Teil dieser Seren ist auch im ELISA getestet worden (z.B. 14/33 SLE-Seren). Dennoch ergibt sich ein ähnliches Bild (Abb.9):

Positive Reaktionen waren am häufigsten bei UCTD (42,9%), primärem Sjögren-Syndrom (23,1%), Vaskulitiden (20%) und SLE (12,1%). In der Myositisgruppe waren wie beim ELISA alle Seren negativ.

Im Gegensatz zum ELISA ergaben im Immunoblot alle Seren der Arthrosegruppe negative Ergebnisse. Andererseits wies im Immunoblot auch eine Patientin mit rheumatoider Arthritis eine positive Reaktion auf (1/7; 14,3%), interessanterweise war dieses Serum im ELISA negativ. Stark positive Reaktionen waren nur bei SLE, Vaskulitis und rheumatoider Arthritis zu beobachten.

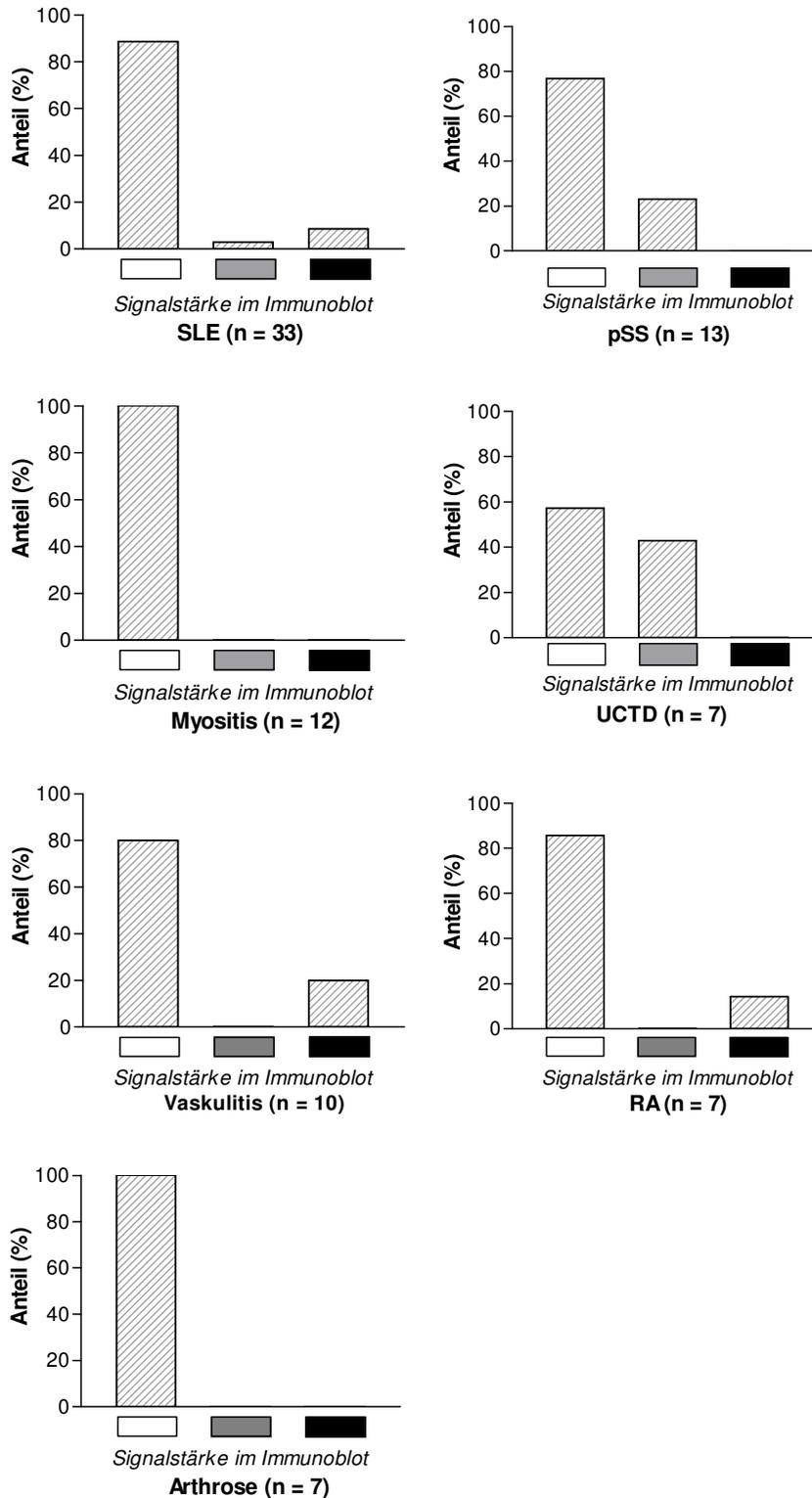


Abb.9: Zusammenstellung der Immunoblotergebnisse für verschiedene Subgruppen. Angegeben sind die prozentualen Anteile der Seren mit stark positiver (schwarze Kästchen), schwach positiver (grau) und negativer Reaktion (weiß).

Die durch die beiden Immunoassays bestimmten Prävalenzwerte in den verschiedenen Subgruppen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

	ELISA	Immunoblot
SLE	12,9%	12,1%
pSS	5,3%	23,1%
Myositis	0%	0%
UCTD	45,5%	42,9%
Vaskulitis	15,4 %	20,0%
RA	0%	14,3%
Arthrose	10%	0%

Tab.7: ELISA- und Immunoblotergebnisse des Testscreenings.
Details siehe Abb. 8 und 9.

4.3. Charakterisierung von Zieluntereinheiten antiproteasomaler Antikörper mittels eindimensionaler SDS-PAGE

4.3.1. Beschreibung der Reaktionsmuster

Zur Charakterisierung der anti-proteasomalen Reaktionsmuster rheumatologischer Patienten wurden die Immunoblotergebnisse der prospektiven Studie genauer analysiert. Bei 85 der 211 untersuchten Patienten war eine Autoimmunerkrankung diagnostiziert worden. Von diesen 85 Seren zeigten 46 Seren (54%) eine anti-proteasomale Reaktion unterschiedlicher Intensität. Die Reaktionsmuster der einzelnen Seren variierten ebenfalls stark, sowohl in der Zahl der detektierten Banden pro Serum als auch in der Höhe der Banden.

Von den 46 reagierenden Seren erkannten 32 Seren (69,6%) nur eine Bande, 11 Seren (23,9%) zwei Banden und 3 Seren (6,5%) drei Banden. (siehe Abb.10).

Alle der zuletzt erwähnten oligoklonalen Seren mit drei Banden zeigten eine sehr schwache Reaktion (< 1.200 Verdünnung des Referenzserums, siehe Methoden Abschnitt 3.6.).

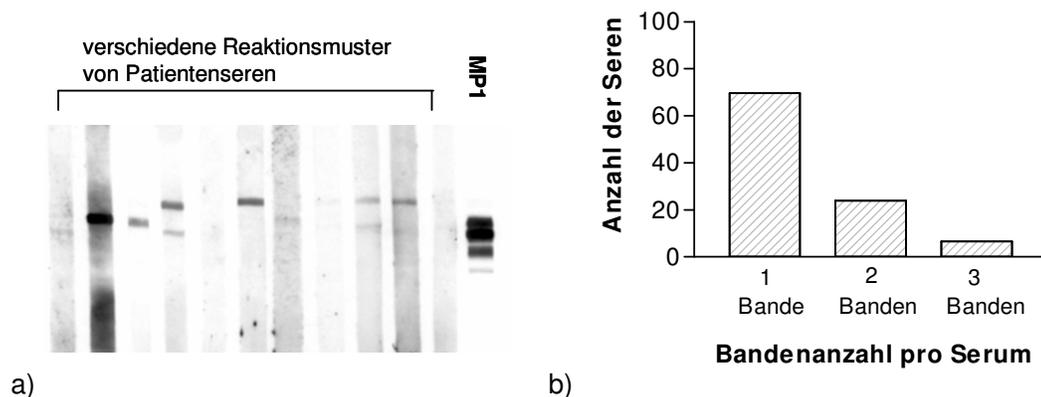


Abb. 10: 46 von 85 untersuchten Seren von Patienten mit Autoimmunerkrankungen reagierten im Immunoblot mit einer oder mehreren Banden des aufgetrennten 20S-Proteasoms.

a) exemplarischer Immunoblot mit dem polyklonalen anti-proteasomalen Kaninchenantikörper MP1 ganz rechts b) Diagramm: Anzahl der Seren, die jeweils eine, zwei oder drei Banden aufwiesen.

Um möglicherweise krankheitsspezifische Reaktionsmuster zu erkennen, wurde die Anzahl der Banden in verschiedenen Subgruppen miteinander verglichen (Tab.8).

Reaktionen mit mehr als zwei Banden sind in dieser Untersuchung bei SLE-, UCTD- und pSS-Patienten nicht aufgetreten. Dagegen war in der Gruppe der Polymyositiden bei drei Seren (von insgesamt sechs Seren) eine solche Reaktion zu beobachten.

Vergleicht man das Auftreten einer singulären Bande mit dem Auftreten mehrerer Banden, ergeben sich tendenzielle Unterschiede zwischen den Krankheitsentitäten. SLE- und UCTD-Seren produzierten häufiger singuläre Banden (80% bzw. 100%) als pSS- und Polymyositiden-Seren (57% bzw. 50%).

Bei den Myositiden gab es kein Serum, das genau zwei Banden erkannte, wie oben beschrieben reagierten allerdings 50% der Seren mit drei Banden. Zu beachten sind hierbei die teils geringen Fallzahlen.

Krankheit	1 Bande	2 Banden	>2 Banden
SLE <i>n=15</i>	12 (80%)	3 (20%)	0
pSS <i>n=7</i>	4 (57%)	3 (43%)	0
PM/DM <i>n=6</i>	3 (50%)	0	3 (50%)
UCTD <i>n=4</i>	4 (100%)	0	0

Tab. 8: Häufigkeit des Auftretens singulärer Banden, Doppelbanden und oligoklonaler Banden im anti-proteasomalen Immunoblot in verschiedenen Subgruppen der prospektiven Studie. n= Anzahl der Seren mit erkennbaren Banden.

4.3.2. Verteilung der Banden im Immunoblot

Der erste Schritt zur Identifizierung der erkannten Untereinheiten war das Bestimmen der Proteingröße über die Höhe der Banden. Da die Laufgeschwindigkeit im SDS-Gel von der Proteingröße bestimmt wird und diese für die humanen Proteasomen-untereinheiten bekannt sind, gibt das Bandenmuster der SDS-Page gewisse Hinweise auf die detektierten Untereinheiten. Für die meisten proteasomalen Untereinheiten sind zudem Untersuchungen über das Laufverhalten in der SDS-PAGE veröffentlicht (siehe Einleitung, Tab.1).

Abb.11 zeigt das typische Proteinmuster nach Auftrennung der proteasomalen Untereinheiten in der SDS-PAGE. Außerdem dargestellt ist die Reaktion des

polyklonalen antiproteasomalen Kaninchenantikörpers MP1, der proteasomale Untereinheiten im Bereich von 32 kD bis ca. 23 kD erkennt. Um im Immunoblot die Zuordnung von Banden zu den jeweiligen Untereinheiten zu erleichtern, wurde in jedem Ansatz auch ein Zellulosestreifen mit MP1 inkubiert.

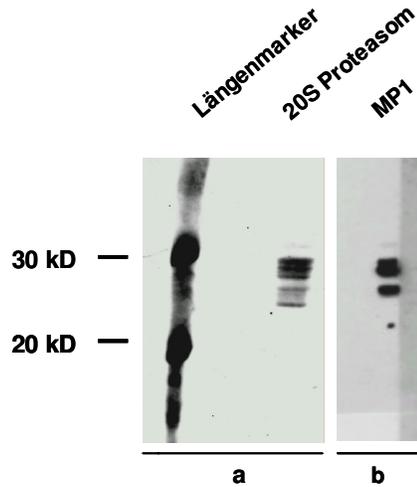


Abb. 11: a) Ponceaufärbung von gelelektrophoretisch aufgetrenntem 20S-Proteasom und Molekulargewichtsmarker und b) Reaktionsmuster des polyklonalen anti-proteasomalen Kaninchenantikörpers MP1 im ECL-gefärbten Immunoblot des gleichen Westernblots.

Die 46 Seren rheumatologischer Patienten, die im Immunoblot gegen 20S-Proteasomen reagierten, produzierten insgesamt 63 Banden, die sich wie folgt über den Bereich des aufgetrennten Proteasoms verteilen:

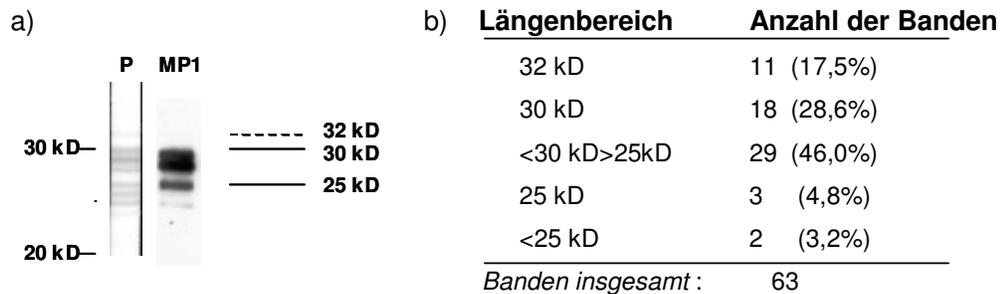


Abb.12: a) Einteilung des Reaktionsspektrums mit Hilfe des polyklonalen AP-Ak MP1 sowie eines Molekulargewichtsmarkers. Links die Banden des 20S-Proteasoms im mit Ponceau gefärbten Westernblot, daneben der anschließende Immunoblot mit MP1 b) Verteilung der anti-proteasomalen Banden von 46 Patienten der Charité mit der Diagnose einer entzündl.-rheum. Erkrankung .

Aus der Tabelle geht hervor, dass es keine einheitliche Reaktion gegen eine bestimmte proteasomale Untereinheit gibt. Es werden Banden aus dem gesamten Längenspektrum erkannt, bevorzugt im Bereich >25 kD. In diesem Bereich liegen 92% aller Banden.

Die beiden Banden bei 32 kD und 30 kD werden zusammengenommen in ca. 46,1 % aller Reaktionen erkannt, ebenso häufig der Bereich zwischen 30 kD und 25 kD (46%).

Da die verschiedenen Patientenserum unterschiedlich starke anti-proteasomale Reaktionen zeigten, stellte sich die Frage, ob bestimmte Untereinheiten vielleicht tendenziell eine besonders starke bzw. schwache Autoimmunantwort hervorriefen.

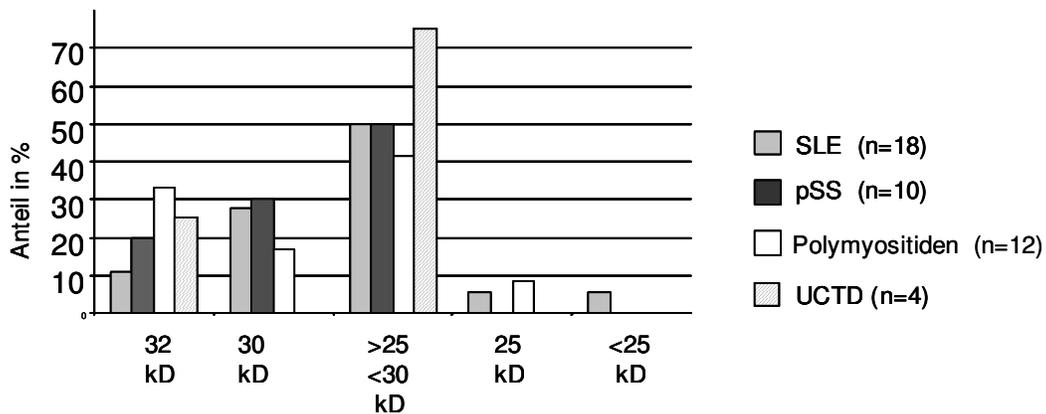
Von den insgesamt 63 Banden waren 20 als „starke“ Reaktion ($\geq 1:200$ Verdünnung des Referenzserums), sowie 43 als „schwache“ Reaktion ($<1:200$ Verdünnung des Referenzserums) einzustufen. In Abb. 13 wird dargestellt, mit welcher Häufigkeit die einzelnen Bandenbereiche in der schwachen und in der starken Gruppe erkannt wurden.

Längenbereich	Anzahl der Banden mit	
	starker Reaktion	schwacher Reaktion
32 kD	1 (5%)	9 (21%)
30 kD	9 (45%)	10 (23%)
<30 kD>25 kD	9 (45%)	20 (47%)
25 kD	1 (5%)	2 (5%)
<25 kD	0	2 (5%)
<i>Banden insgesamt</i> :	20	43

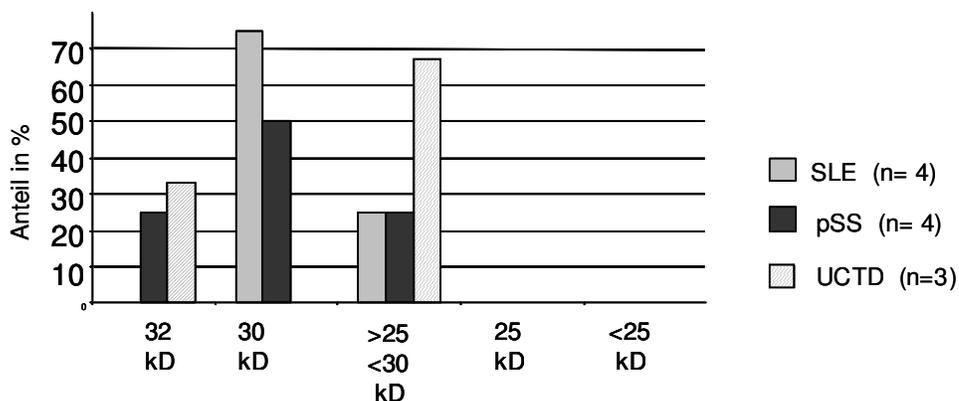
Abb.13: Vergleichende Darstellung der im anti-proteasomalen Immunoblot erkannten Bandenbereiche bei starken Reaktionen ($\geq 1:200$ Verdünnung des Referenzserums) und schwachen Reaktionen ($<1:200$ Verdünnung des Referenzserums).

Der Vergleich der Banden von schwach reagierenden Seren mit denen von stärker reagierenden zeigt deutliche Unterschiede. So wird die Bande bei 30 kD von starken Seren häufiger erkannt (45% gegenüber 23 %), während die 32 kD-Bande häufiger bei schwachen Reaktionen vorkam. Es gab keine starken Reaktionen mit Banden unterhalb 25 kD.

Auf der Suche nach möglicherweise krankheitsspezifischen Antigenen wurden die Immunoblotbanden nach Patientengruppen getrennt analysiert, zunächst unter Einbeziehung auch der schwachen Banden (Abb.14a).



a) Verteilung von Banden aller Intensitäten



b) Verteilung von starken Banden

Abb.14: Bei SLE- und Sjögren-Patienten wurden von stark reagierenden Seren (Reaktion \geq 1:200 Verdünnung des Referenzserums) bevorzugt die 30 kD-Bande erkannt, während bei Berücksichtigung auch der schwächeren Seren vor allem Banden im Bereich 25-30 kD erkannt wurden.

In den wesentlichen Aspekten ähnelt die Verteilung in den einzelnen Patientengruppen der Verteilung in der Gesamtgruppe. So kommen in allen vier vorgestellten Gruppen hauptsächlich Banden >25 kD vor und die Reaktionen verteilen sich auf mehrere Untereinheiten. Eine dominante Reaktion ist nur bei der Gruppe der UCTD-Patienten angedeutet (75% der Banden liegen im Bereich zwischen 25 kD und 30 kD bei allerdings kleiner Fallzahl).

Dennoch bestehen tendenzielle Unterschiede zwischen den Patientengruppen. Bei SLE-Patienten ist ein relativ geringer Anteil der 32 kD-Bande festzustellen, im Gegensatz dazu wurde die 32 kD-Bande von den Myositis-Seren überdurchschnittlich häufig erkannt (33%).

Die Verteilung der Banden bei den Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom entspricht annähernd dem Durchschnitt aller Patienten in Bezug auf die Banden >25 kD. Kleinere Untereinheiten wurden in diesem Sjögren-Kollektiv nicht erkannt.

Das Bild verschiebt sich etwas, wenn man nur die Banden betrachtet, die eine stärkere Antikörperreaktion ausgelöst haben (Abb. 14b).

Sowohl bei SLE als auch bei Sjögren-Patienten ist nun die 30 kD-Bande das häufigste Antigen, während bei der UCTD weiterhin der Bereich zwischen 25 und 30 kD dominiert.

4.3.3. Untersuchung auf Assoziationen der Immunreaktionen gegen verschiedene proteasomale Untereinheiten

In Tab.9 ist dargestellt, mit welcher Häufigkeit in dieser Untersuchung die unterschiedlichen Banden allein oder aber gemeinsam mit anderen Banden auftraten.

Bande	Auftreten als singuläre Bande	zusammen mit anderen Banden
32 kD	n= 3	n= 8
30 kD	n=11	n= 7
<30 kD>25kD	n=14	n=15
25 kD	n= 2	n= 1
<25 kD	n= 2	n= 0

Tab.9: Häufigkeit des Auftretens der unterschiedlichen Immunoblotbanden als alleinige Bande bzw. gemeinsam mit anderen Banden.

Es konnte keine Bande identifiziert werden, die nur im Zusammenhang mit einer anderen Bande zu beobachten wäre. Ebenso gab es keine Bande, die ausnahmslos als singuläre Bande auftrat. Diese Aussagen können allerdings mit Sicherheit nur für die gut abzugrenzenden Einzelbanden (32 kD, 30 kD und 25 kD) getroffen werden, da es nicht möglich ist, die einzelnen Untereinheiten in den Bereichen zwischen 25 und 30 kD sowie im Bereich <25 im eindimensionalen Immunoblot zu diskriminieren.

Banden bei 30 kD traten etwas häufiger alleine auf, dagegen wurden die Banden bei 32 kD häufiger im Zusammenhang mit anderen Banden gesehen.

Desweiteren wurden die Reaktionsmuster mit mindestens zwei Banden daraufhin untersucht, ob bestimmte Banden überproportional häufig gleichzeitig auftraten (s.Abb.15).

Eine ausschließliche Assoziation zwischen zwei Banden wurde nicht gesehen. Vielmehr entsprach die Verteilung der assoziierten Banden in etwa der in der Studie festgestellten generellen Bandenverteilung. Ein gemeinsames Vorkommen von Banden aus dem Bereich zwischen 25 und 30 kD und der 32 kD-Bande war jedoch etwas häufiger als erwartet zu beobachten.

Die selten aufgetretene 25 kD-Bande wurde einmal gemeinsam mit einer anderen Bande gesehen, es handelte sich dabei um die 32 kD-Bande.

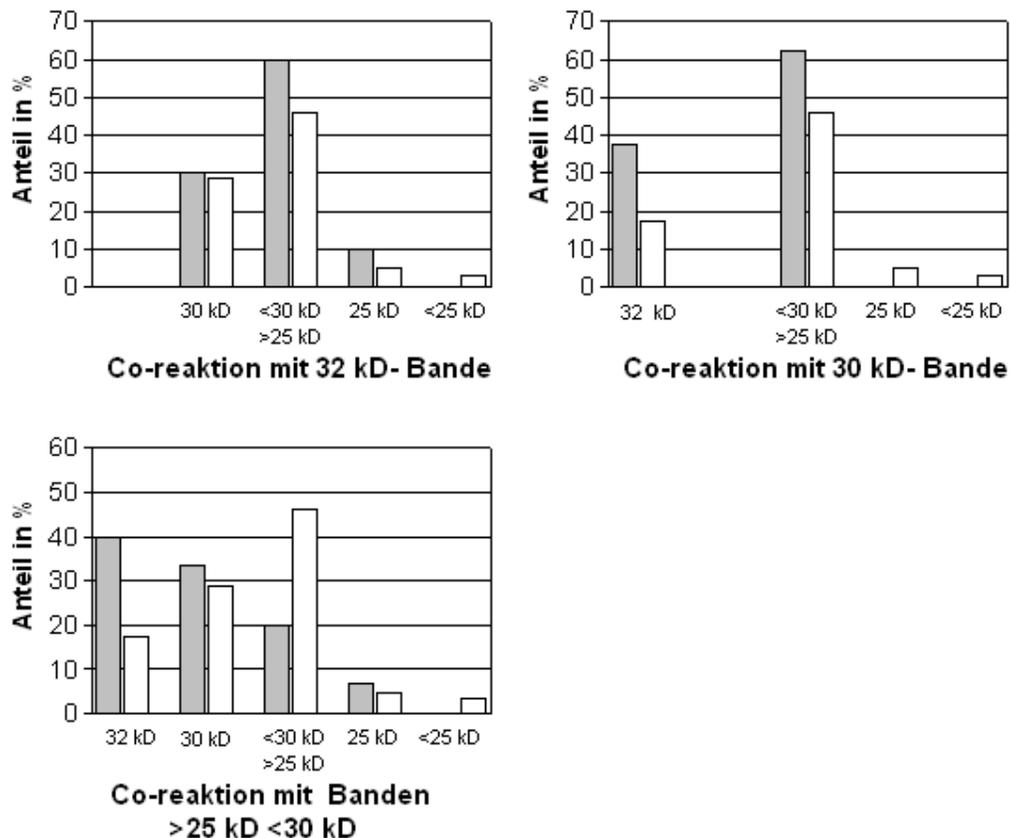


Abb.15: Übersicht über das gemeinsame Auftreten von Banden im anti-proteasomalen Immunoblot. Dunkle Balken geben an, wie häufig Banden der angegebenen Bereiche mit der jeweiligen Bande assoziiert waren (in Prozent). Weiße Balken: die relative Häufigkeit der Bandenbereiche im Gesamtkollektiv.

4.4. Identifizierung von proteasomalen Untereinheiten im ein- und zweidimensionalen Immunoblot

Alle α -Typ-Untereinheiten laufen in der SDS-PAGE im Bereich oberhalb von 25 kD, so dass man eventuell darunter laufende Untereinheiten dem β -Typ zuordnen kann. Direkte Rückschlüsse vom Immunoblotergebnis auf eine konkrete Untereinheit kann man allerdings nur im Falle der Banden bei 32 kD, 30 kD und 25 kD ziehen, die alle im Bandenmuster eine gewisse Distanz zu den Nachbarbanden aufweisen und daher relativ leicht zu identifizieren sind.

Nach den Untersuchungen von Hendil *et al.* 1993 (siehe Einleitung, Tab.1) entsprechen diese Banden folgenden Untereinheiten:

32 kD-Bande	=>	$\alpha 6$ (C2)
30 kD-Bande	=>	$\alpha 3$ (C9)
25 kD-Bande	=>	$\alpha 2$ (C3)

Diese Aussagen wurden im Immunoblot mit zweidimensional gelelektrophoretisch aufgetrenntem Proteasom stichprobenartig bei einigen Seren überprüft, die im eindimensionalen Immunoblot jeweils eine der drei Banden aufwiesen (Abb.16).

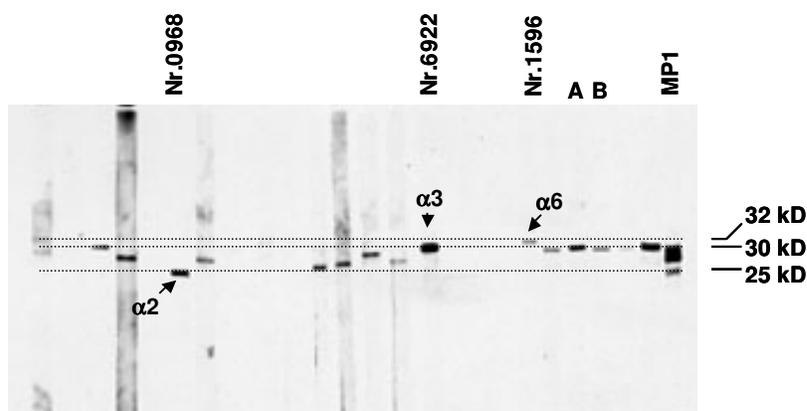


Abb. 16: Mit Hilfe des Reaktionsmusters des Antiserums MP1 können im eindimensionalen Immunoblot drei Banden (32kD, 30kD, 25kD) direkt den jeweiligen proteasomalen Untereinheiten zugeordnet werden. Serum Nr. 0968 (Sklerodermie) produzierte eine Bande bei 25 kD ($\alpha 2$), Serum Nr. 6922 (SLE) reagierte mit der Bande bei 30 kD ($\alpha 3$), Serum Nr. 1596 (UCTD) mit der 32 kD-Bande ($\alpha 6$). Zweidimensionale Immunoblots der genannten Seren siehe Abb. 17. Rechts: Referenzserum 1:100 (A) und 1:200 (B) verdünnt, sowie polyklonales anti-proteasomales Kaninchenserum (MP1).

Die Ergebnisse des zweidimensionalen Immunoblots sind exemplarisch wiedergegeben in Abb.17a) für die 32 kD-Bande, b) für die 30 kD-Bande und c) für die 25 kD-Bande.

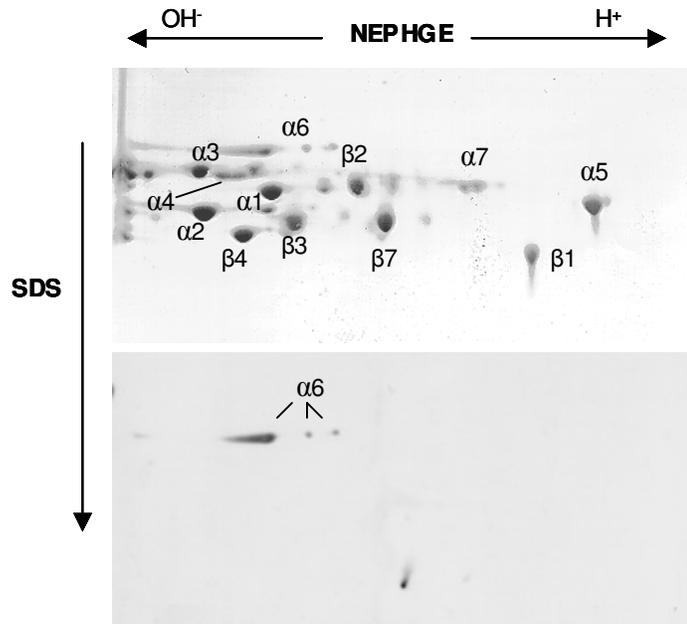


Abb. 17a): Identifizierung der 32 kD-Bande. Im zweidimensionalen Immunoblot reagierte Serum Nr. 1596 (Patientin mit UCTD) mit Untereinheit α6 (C2). Die Auftrennung in der ersten Dimension erfolgte durch non-equilibrium-pH-Gelelektrophorese (NEPHGE).

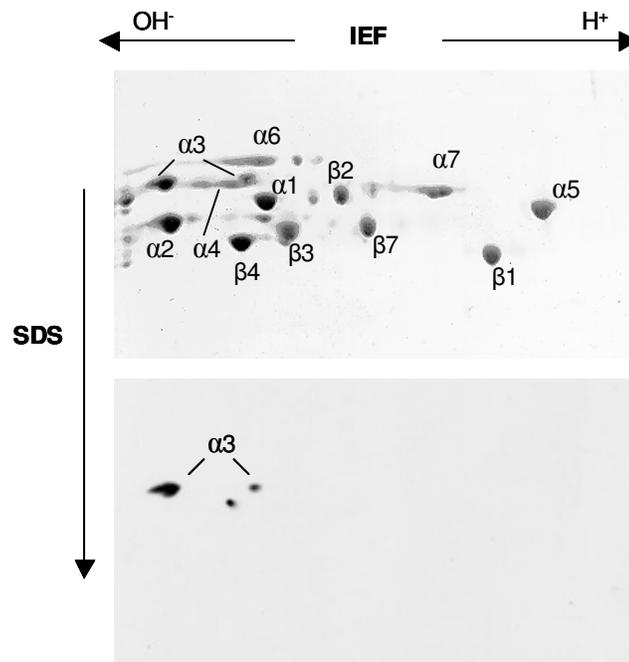


Abb. 17b): Identifizierung der 30 kD-Bande. Im zweidimensionalen Immunoblot reagierte Serum Nr. 6922 (Patientin mit SLE) mit zwei Isoformen der Untereinheit α3 (C9). Das Signal darunter konnte keiner proteasomalen Untereinheit zugeordnet werden.

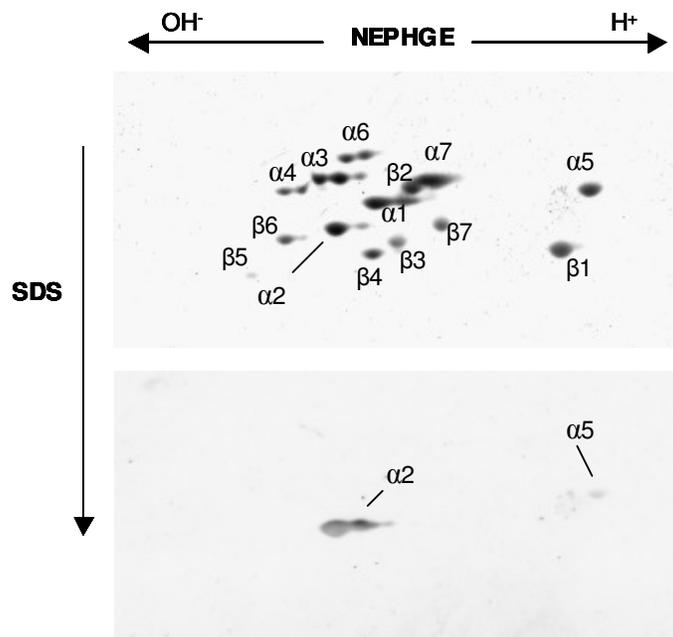


Abb. 17c): Identifizierung der 25 kD-Bande. Im zweidimensionalen Immunoblot reagierte Serum Nr. 0968 (Patientin mit Sklerodermie) mit $\alpha 2$ (C3) und schwächer mit $\alpha 5$ (Zeta).

Die Interpretation der betreffenden Banden als Untereinheiten $\alpha 6$ (C2), $\alpha 3$ (C9) bzw. $\alpha 2$ (C3) wurde im zweidimensionalen Immunoblot bestätigt.

Als zusätzliche Kontrolle, um die Identität der Bande bei 30 kD abzusichern, wurden Immunoblotuntersuchungen mit rekombinantem $\alpha 3$ (C9) auf der Basis der humanen Sequenz durchgeführt (siehe auch Material und Methoden 3.5.). Dafür wurden 13 Seren, die im Immunoblot gegen Gesamt-20S-Proteasom eine Bande bei 30 kD aufwiesen, einem Immunoblot gegen rekombinantes $\alpha 3$ (C9) unterzogen. Bei 8 Seren zeigte sich eine Reaktivität (exemplarische Immunoblots siehe Abb.18). Die fünf Seren, die keine Banden gegen das rekombinante Protein produzierten, hatten auch im Immunoblot gegen das komplette 20S-Proteasom nur sehr schwach reagiert. Das abweichende Ergebnis könnte eine Folge unterschiedlicher Antigenkonzentrationen bzw. Unterschiede in den antigenen Eigenschaften von natürlichem und rekombinanten $\alpha 3$ (C9) widerspiegeln, wie z.B. sekundäre Modifikationen, die im bakteriellen System nicht erfolgen.

Sämtliche Negativkontrollen (11 Seren mit Banden von 32 kD oder <30 kD) reagierten nicht mit dem rekombinanten C9-Protein.

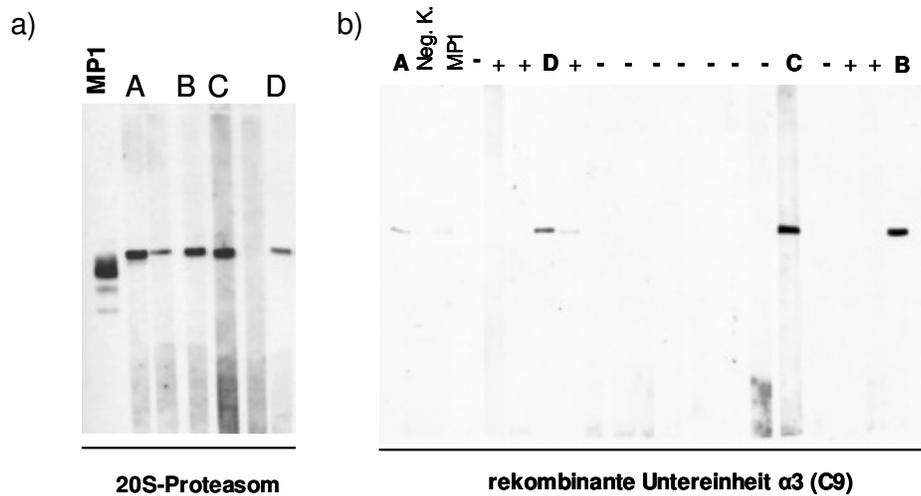


Abb. 18 : Immunoblot mit rekombinatem C9. (a) Die Seren A,B,C und D produzierten im Immunoblot gegen komplettes 20-S-Proteasom eine starke Bande bei 30 kD und (b) reagierten auch im Immunoblot gegen rekombinantes $\alpha 3$ (C9)-Protein. Auf dem rechten Blot aufgetragen waren zusätzlich Seren, die schwächer mit der 30 kD-Bande reagiert hatten (+) und Seren, die Banden mit anderen Molekulargewichten produziert hatten (-).

Zusammenfassend ist also durch einen einfachen eindimensionalen Immunoblot eine Identifizierung der drei Untereinheiten C2, C9 und C3 möglich. Im Bereich zwischen 30 kD und 25 kD sowie im Bereich unter 25 kD ist ein derartiges Verfahren nicht praktikabel, da die Banden sehr dicht übereinander liegen.

Seren mit Banden in diesen Bereichen wurden im zweidimensionalen Immunoblot getestet. Dafür wurden sowohl stark als auch schwach reagierende Seren und auch Seren mit mehreren Banden ausgewählt.

Die Ergebnisse sind in Abb. 19 – 24 gezeigt:

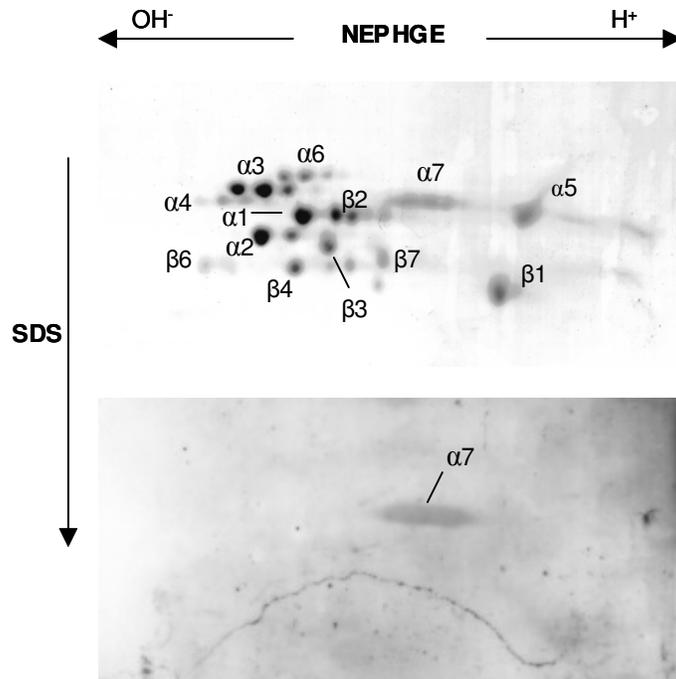


Abb. 19: Serum Nr.4702 einer Patientin mit UCTD reagierte mit Untereinheit C8 (α7).

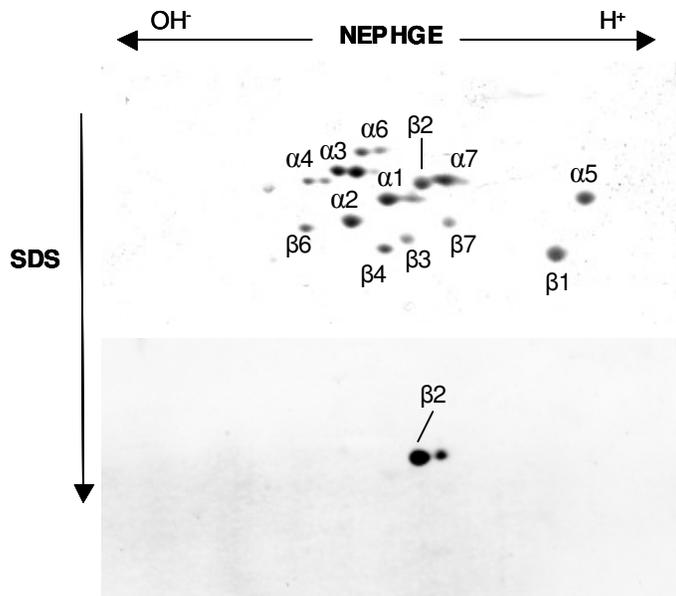


Abb. 20: Serum Nr. 3838 (Patientin mit Diabetes mellitus Typ I) reagierte im zweidimensionalen Immunoblot mit der proteasomalen Untereinheit β2 (Z). Die zweite, kleinere Markierung entspricht am ehesten modifizierten Z-Proteinen, die im Coomassie-gefärbten oberen Bild im Bereich der C8-Proteine lokalisiert sind und sich von diesen nicht abgrenzen lassen.

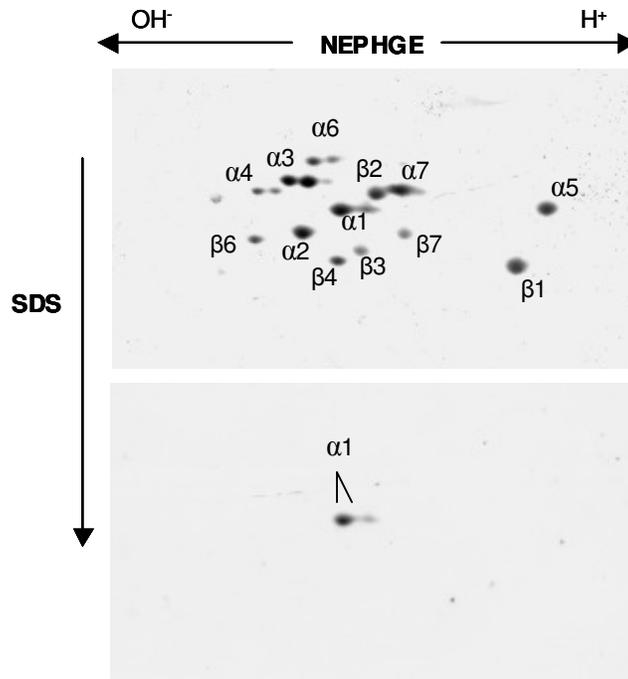


Abb. 21: Serum Nr. 5382 (Patientin mit UCTD) reagierte im zweidimensionalen Immunoblot mit der proteasomalen Untereinheit $\alpha 1$ (Iota).

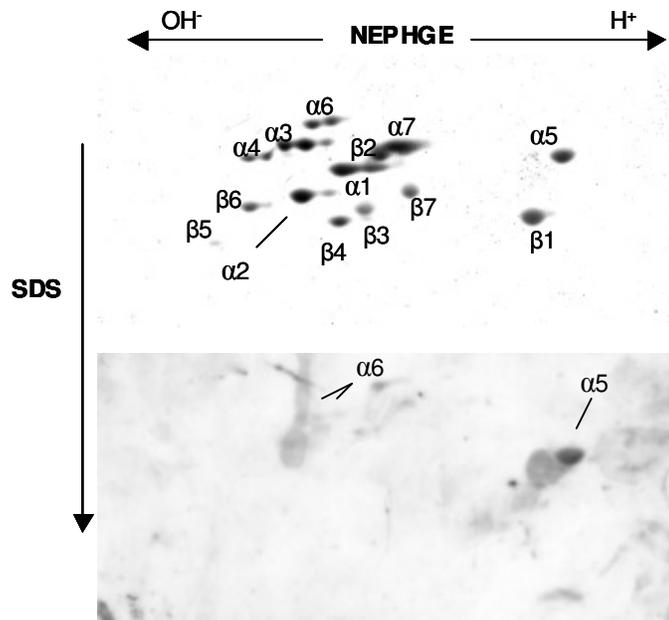


Abb. 22: Serum Nr. 6022 (Patientin mit M. Wegener) reagierte im zweidimensionalen Immunoblot mit der proteasomalen Untereinheit $\alpha 5$ (Zeta) und – allerdings sehr schwach – mit $\alpha 6$ (C2).

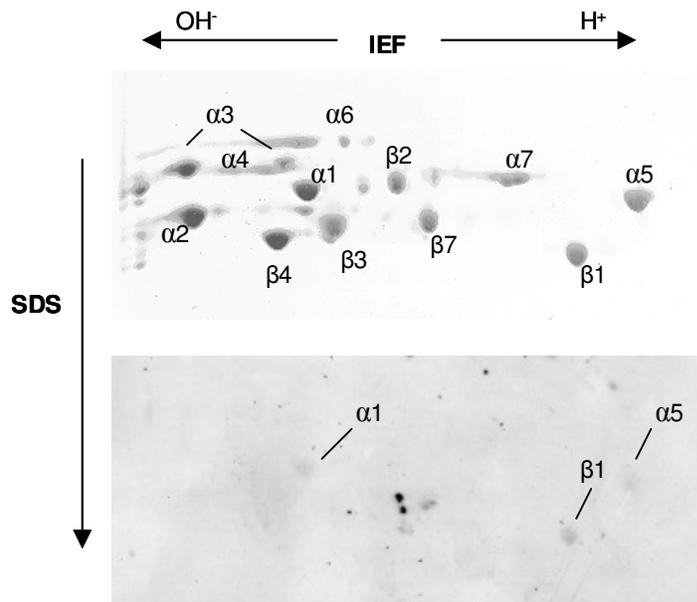


Abb. 23: Das oligoklonale Serum einer Patientin mit primärem Sjögren-Syndrom (aus dem Patientenkollektiv siehe Feist *et al.* 1999) reagierte im zweidimensionalen Immunoblot schwach mit den proteasomalen Untereinheiten $\alpha 5$ (Zeta), $\beta 1$ (Delta) sowie $\alpha 1$ (Iota).

Bei der Untersuchung des Serums einer SLE – Patientin (siehe Abb.24) im zweidimensionalen Immunoblot stellte sich heraus, dass die anti-proteasomalen Autoantikörper mit einer Untereinheit reagierten, die ein etwas geringeres Molekulargewicht als $\beta 2$ (Z) besaß. Mit Hilfe affinitätsgereinigter Antikörper gegen MECL-1 konnte gezeigt werden, dass es sich um die Immununtereinheit $\beta 2^i$ (MECL1) handelte.

In den übrigen verwendeten Proteasomenpräparationen ließ sich $\beta 2^i$ (MECL1) und auch die beiden anderen Immununtereinheiten $\beta 1^i$ (LMP2) und $\beta 5^i$ (LMP7) im übrigen nicht nachweisen.

Somit konnten durch Immunoblotuntersuchungen mit zweidimensional aufgetrenntem Proteasom neun Untereinheiten als Ziel einer autoimmunen Reaktion identifiziert werden (s.Tab. 10).

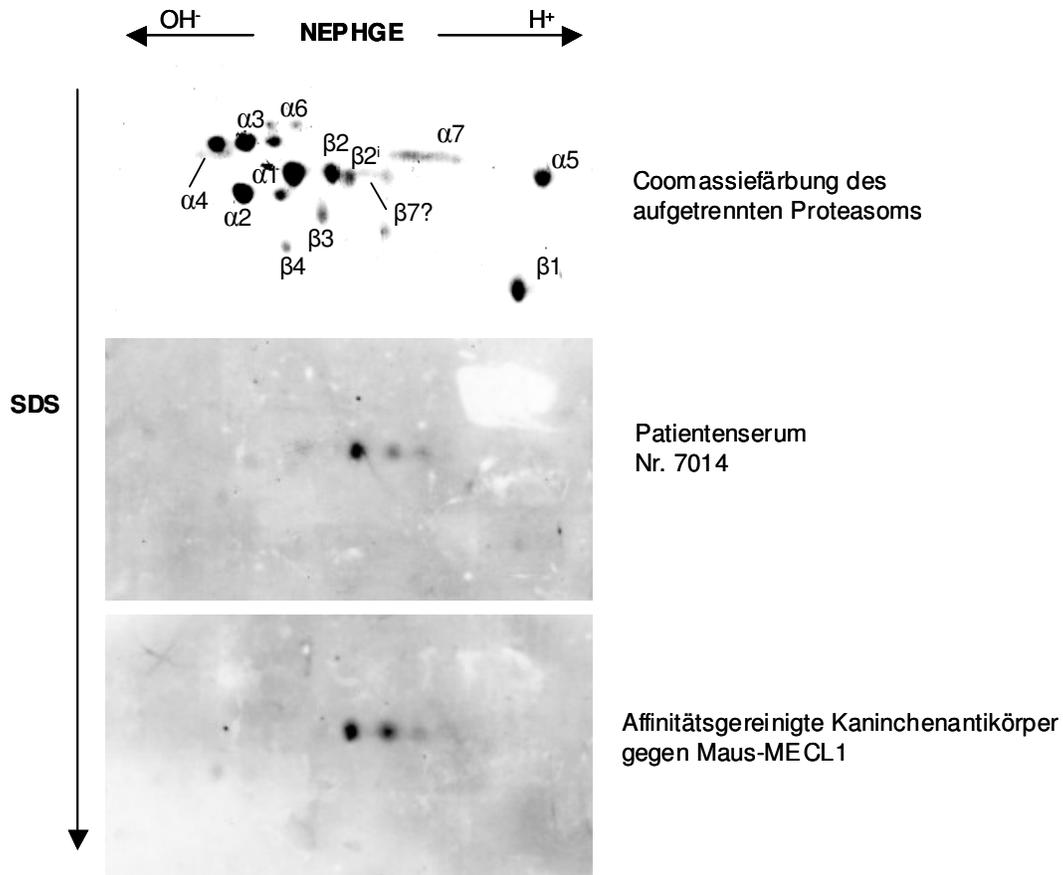


Abb. 24: Serum Nr. 7014 (Patientin mit SLE) reagierte im zweidimensionalen Immunoblot mit der proteasomalen Untereinheit $\beta 2^i$ (MECL1). Die Identität der erkannten Untereinheit wurde durch Immunoblot mit einem affinitätsgereinigten anti-MECL1-Antikörper (Gabe von Christine Knühl) verifiziert.

Serum Nr.	Erkrankung	identifizierte Untereinheit
Nr. 6922	SLE	$\alpha 3$ (C9)
Nr. 1596	UCTD	$\alpha 6$ (C2)
Nr. 4702	UCTD	$\alpha 7$ (C8)
Nr. 0968	Sklerodermie	$\alpha 2$ (C3), $\alpha 5$ (Zeta)
Nr. 3838	D.mellitus Typ1	$\beta 2$ (Z)
Nr. 6022	M. Wegener	$\alpha 5$ (Zeta), $\alpha 6$ (C2)
Nr. pSS-1	pSS	$\alpha 1$ (Iota), $\beta 1$ (Delta), $\alpha 5$ (Zeta)
Nr. 5382	UCTD	$\alpha 1$ (Iota)
Nr. 7014	SLE	2^i (MECL1)

Tab. 10: Ergebnisse der zweidimensionalen anti-proteasomalen Immunoblots mit Seren rheumatologischer Patienten, welche im eindimensionalen Immunoblot Autoantikörper gegen Banden des aufgetrennten 20S-Proteasoms aufgewiesen hatten.

Wie in der Übersichtsdarstellung (Abb. 25) gezeigt, wurden in dieser Arbeit Autoantikörper gegen alle Untereinheiten des α -Typs mit Ausnahme von $\alpha 4$ nachgewiesen. Es konnten jedoch auch drei β -Untereinheiten identifiziert werden, gegen die Autoantikörper gerichtet waren. Interessanterweise gehören diese drei zu den aktiven Untereinheiten. MECL1 ist eine der interferon-induzierbaren aktiven Untereinheiten. Da als Antigen Proteasom aus Erythrozyten verwendet wurde, das keine LMP2/LMP7-Untereinheiten aufweist, konnte eine Aktivität gegen diese nicht geprüft werden.

Da bei weitem nicht alle Banden im Bereich <30 kD charakterisiert wurden, kann aus der Tabelle nicht die relative Häufigkeit der Reaktion gegen die einzelnen Untereinheiten abgelesen werden. Sie gibt aber einen Überblick darüber, welche Untereinheiten nachgewiesenermaßen Ziel einer B-Zellantwort waren. Für die α -Untereinheiten $\alpha 1$ (Iota) und $\alpha 5$ (Zeta), sowie für die β -Untereinheiten $\beta 1$ (Delta) und $\beta 2^i$ (MECL1) ist dies der erste Nachweis einer gegen sie gerichteten autoimmunen Reaktion.

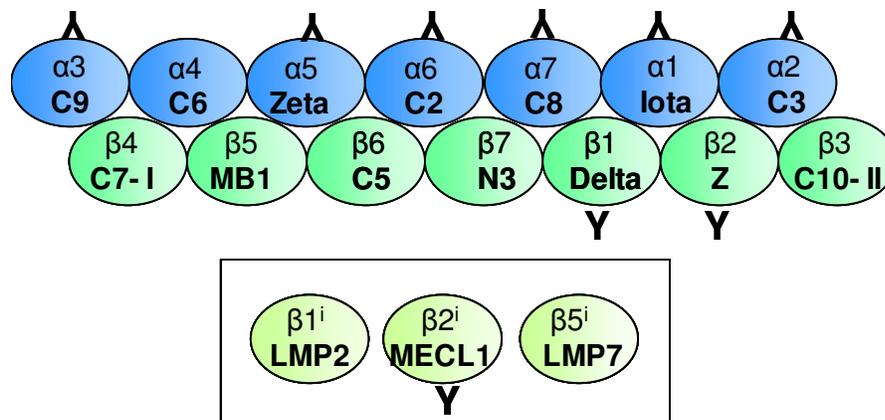


Abb. 25: Zusammenstellung der in dieser Arbeit identifizierten proteasomalen Untereinheiten, die durch anti-proteasomale Antikörper rheumatologischer Patienten erkannt wurden. Die Charakterisierung erfolgte mittels ein- und zweidimensionalem Immunoblot sowie Immunoblot mit rekombinantem C9. Im Kasten dargestellt sind die interferon-induzierbaren Untereinheiten.

5. DISKUSSION

Optimierung der Tests zum Nachweis anti-proteasomaler Antikörper

Durch die Weiterentwicklung sowohl des anti-proteasomalen ELISA als auch des Immunoblots für die Analyse von Patientenseren wurde die Grundlage für einen langfristigen und reproduzierbaren Einsatz dieser Testsysteme geschaffen (s. Ergebnisse 4.1.). Beim ELISA trug vor allem der Austausch des Standards (humanes Serum statt Kaninchenserum) zu einer besseren Standardisierung bei, da dadurch mit nur einem Konjugat gearbeitet werden konnte. Als interne Positivkontrolle wurde ein weiteres Humanserum mitgeführt sowie Negativkontrollen, um unspezifische Reaktionen gegen Pufferbestandteile auszuschließen.

Die Antigenspezifität der anti-proteasomalen Reaktion wurde überdies in einem unter Abschnitt 1.1.3. beschriebenen Versuch überprüft, bei dem Seren einem ELISA mit unterschiedlichen Proteasomenkonzentrationen unterzogen wurden. Alle vorher positiv getesteten Seren zeigten einen Anstieg der OD bei steigenden proteasomalen Benetzungskonzentrationen, so dass von einer spezifischen Reaktion gegen die Proteasomenaufreinigung ausgegangen werden kann. Feist *et al.* (1996) hatten in diesem Zusammenhang mit einem Sandwich-ELISA (1. Beschichtung: anti-proteasomale Antikörper, 2. Beschichtung: Proteasomenpräparation) nachgewiesen, dass sich die Immunantwort der Patientenseren im einfachen anti-proteasomalen ELISA in 95% der Fälle tatsächlich gegen den Proteasomenanteil der Proteasomenpräparation richtete.

Parallel zum ELISA wurde auch beim anti-proteasomalen Immunoblot zur Standardisierung eine Positivkontrolle zum ansonsten übernommenen Testaufbau von Feist *et al.* (1996) hinzugefügt. Das Kontrollserum wurde jeweils in zwei unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen und ließ somit eine semiquantitative Einschätzung der Reaktionsstärke zu (Details s. Abschnitt 3.6.).

Der Vergleich von Immunoblot- und ELISA-Ergebnissen anhand von 115 mit beiden Methoden untersuchten Seren ergab eine weitgehende Übereinstimmung. Bei einer semiquantitativen Einteilung der Ergebnisse in drei Gruppen (negativ, schwach positiv und positiv) hatten 85% der Seren gleiche Resultate in beiden Testmethoden. Es gab nur ein Serum, das eine starke Reaktion im ELISA zeigte und im Immunoblot überhaupt keine Bande produzierte. Bei zwei Seren war hingegen bei negativem ELISA der

Immunoblot stark positiv. Die insgesamt geringe Anzahl derartiger, deutlich voneinander abweichender Ergebnisse lässt vermuten, dass der überwiegende Anteil anti-proteasomaler Autoantikörper lineare, nicht konformationsabhängige Epitope erkennt, die auch in intakten 20S-Proteasomenkomplexen, wie sie unter ELISA-Bedingungen vorliegen, gut zugänglich sind. Die weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse beider Assays ist darüber hinaus auch ein Indiz für die Qualität des ELISA – die Bestätigung von positiven Ergebnissen im Immunoblot spricht für eine proteasomenspezifische Antikörperreaktion im ELISA.

In einer prospektiven Pilotstudie wurden die beiden weiterentwickelten Testverfahren auf ihre Eignung zur klinischen Diagnostik bei rheumatologischen Patienten untersucht. Trotz der Vielzahl an untersuchten Patientenseren (insgesamt 517) erreichten die daraus resultierenden Subgruppen mit Patienten gleicher Erkrankungen relativ geringe Fallzahlen, was dem prospektiven Aufbau der Untersuchung geschuldet ist. Mit dieser Einschränkung können dennoch einige Aussagen getroffen werden.

ELISA- und Immunoblot-Untersuchungen ergaben bei der Subgruppenanalyse in den meisten Fällen ähnliche Prävalenzwerte, was die Ergebnisse der oben beschriebenen vergleichenden Untersuchung stützt. Nur beim primären Sjögren-Syndrom reagierten im Immunoblot erheblich mehr Seren positiv (3/13; 23,1%) als im ELISA (1/19; 5,3%). Die durch Immunoblot bestimmte Prävalenz anti-proteasomaler Autoantikörper beim Sjögren-Syndrom entspricht in etwa den Literaturangaben (Feist *et al.* 1999, Mayo *et al.* 2002), während der durch ELISA ermittelte Prozentwert unter dem bisher in der Literatur beschriebenen (33%; Feist *et al.* 1999) liegt. Dabei wiesen zwei der im ELISA untersuchten Seren Werte knapp unterhalb des Cut-offs auf, zudem könnte die relativ geringe Zahl der untersuchten Seren für die Abweichung verantwortlich sein.

Erstmals untersucht wurde in dieser Arbeit das Auftreten von anti-proteasomalen Autoantikörpern bei einer kleinen Gruppe von Patienten mit undifferenzierter Kollagenose. Fasst man die Ergebnisse beider Testsysteme zusammen, so beträgt die Prävalenz 38,5% (5/13 Seren). Dies übertrifft die Werte für die anderen Kollagenosen in dieser Untersuchung deutlich, aufgrund der relativ kleinen Fallzahl wäre eine Überprüfung dieses Ergebnisses in größerem Rahmen aber sinnvoll. Eine undifferenzierte Kollagenose wird häufig bei beginnenden Autoimmunerkrankungen diagnostiziert, bei denen sich oft erst im weiteren Verlauf spezifischere Autoimmunphänomene und Autoantikörper ausbilden. Die Präsenz anti-proteasomaler Autoantikörper noch vor dem Auftreten anderer bekannter Autoantikörper könnte

Hinweise auf die pathogenetischen Prozesse geben. Bei den hier untersuchten UCTD-Seren traten in der ANA-Floureszenzfärbung (auf HEp2-Zellen) bei 9 von 11 untersuchten Seren Titer von mindestens 1:640 auf. Eine Korrelation zwischen ANA-Titer und anti-proteasomalem Titer ließ sich allerdings weder für die UCTD-Gruppe noch für die Gesamtgruppe der untersuchten Patienten nachweisen (eigene Daten), so dass die anti-proteasomalen Autoantikörper die antinukleäre Immunfluoreszenz wohl nicht entscheidend beeinflussen, sondern die gleichzeitige Existenz anderer Autoantikörper angenommen werden muss.

Vergleicht man die bisher veröffentlichten Ergebnisse anti-proteasomaler Assays bezüglich gesunder Kontrollgruppen sowie rheumatologischer Patientengruppen mit den Resultaten der hier getesteten Verfahren, so weisen beide Verfahren in dieser Arbeit eine geringere Spezifität (vor allem der Immunoblot mit einer Spezifität von 90,9%) sowie eine ebenfalls geringere Sensitivität auf.

So fiel z.B. der Anteil positiver Seren bei SLE geringer aus als nach den Vorarbeiten zu erwarten war. Im Immunoblot waren 12,1% der Seren positiv. Arribas *et al.* (1991) berichteten dagegen von 35% positiver Seren. Besonders auffallend ist das Fehlen eines positiven Testergebnisses in der Gruppe der autoimmunen Myositiden bei insgesamt 24 getesteten Patienten (in der Literatur Prävalenzen von 19% bis 62%, siehe Einleitung Tab.2).

Diese Abweichungen von den Literaturangaben könnten zum einen durch statistische Schwankungen bei relativ geringen Fallzahlen oder durch Unterschiede in den jeweiligen Patientenkollektiven bzw. Kontrollgruppen bedingt sein. Charakteristisch für das hier untersuchte Patientenkollektiv war zudem ein hoher Anteil an vorbehandelten Patienten mit schon länger dauernder Krankengeschichte, die die Charité zu Kontrolluntersuchungen oder wegen Komplikationen aufsuchten.

Auch methodische Ursachen für die Divergenzen sind möglich. Diese können jeden einzelnen Schritt der Assays betreffen, insbesondere die Proteasomenpräparation, die Zweitantikörper, die Inkubationszeiten, Waschschritte und das Blockierungsreagenz. Als Blockiermedium wurde in dieser Studie Milchpulver verwendet. Bei immerhin 10,3% der Testseren wurden im ELISA unzulässig hohe Reaktionen der Negativkontrollen festgestellt, bei denen die Kavitäten nur mit Blockiermedium beschichtet worden waren. Dies kann bedingt sein durch Wechselwirkungen von Patientenantikörpern mit Milchpulverbestandteilen oder aber durch eine unzureichende Abblockung der Gefäßwände.

Arribas *et al.* (1991) benutzten in ihren Immunoassays keine klassenspezifischen Zweitantikörper, so dass sie nicht nur IgG-Autoantikörper (wie in dieser Arbeit) sondern auch die übrigen Immunglobuline detektierten.

Desweiteren könnten Verunreinigungen der Proteasomenpräparationen negative Auswirkungen auf die Spezifität, vor allem des ELISA, haben. Es ist bekannt, dass bei Proteasomenaufreinigungen oft eine Verunreinigung mit heat shock-Proteinen (vor allem Hsp90) gefunden wird und dass eine autoimmune Reaktion gegen diese Proteine relativ häufig ist (Ludemann *et al.* 1993, Rea *et al.* 2001). Eine Erklärung für die relativ geringe Spezifität des in dieser Arbeit entwickelten anti-proteasomalen Immunoblots kann dies allerdings nicht sein, da sich die heat shock-Proteine durch ihr Molekulargewicht von den proteasomalen Banden klar abgrenzen lassen.

Die Proteasomen, die Mayo *et al.*(2002) für ihre Tests verwendeten, stammten aus Rattenlebern, während in dieser Arbeit und in den Untersuchungen von Feist *et al.* (1996,1999) Proteasomen aus humanen Erythrozyten präpariert wurden. Proteasomen aus unterschiedlichen Geweben bzw. Zellarten können sich im Aufbau deutlich unterscheiden: die sogenannten Immunoproteasomen, die die induzierbaren aktiven Untereinheiten enthalten, werden z.B. regelmäßig in Lymphozyten und Milz angetroffen, während in humanen Erythrozyten typischerweise nur die konstitutiven Proteasomenuntereinheiten vorkommen (Claverol *et al.* 2002). In Proteasomen aus Rattenlebern können Immununtereinheiten nachgewiesen werden (Schmidt *et al.* 2006). Vor kurzem wurde eine zusätzliche Variante von $\beta 5$ ($\beta 5^t$ genannt) in positiv selektionierenden Zellen des Thymus entdeckt (Murata *et al.* 2007). Unterschiede in den Proteasomenpopulationen sind allerdings selbst bei Verwendung des gleichen Zelltyps als Quelle nicht völlig auszuschließen, da es spenderabhängige Abweichungen in der Zusammensetzung der Proteasomen zu geben scheint. So fand sich in einer aus humanen Erythrozyten hergestellten Proteasomenpräparation, die in dieser Arbeit verwendet wurde, eindeutig MECL1 ($\beta 2^i$). Zudem kann auch die Proteasomenpopulation in humanen Erythrozyten chromatographisch in bis zu sechs Subpopulationen unterteilt werden, die sich wahrscheinlich durch Modifikationen (wie z.B. Phosphorylierungen) einzelner Untereinheiten voneinander unterscheiden (Zoeger *et al.* 2006, Froment 2005, Kuckelkorn *et al.* 2002, Dahlmann *et al.* 2000). Inwieweit die Anteile der einzelnen Subpopulationen individuell verschieden sind, ist noch nicht bekannt. Aufgrund der großen Diversität der jeweils benutzten Proteasomenpräparationen erscheinen die relativ großen Schwankungen der

Ergebnisse von anti-proteasomalen Immunassays verständlich, zumal Autoantikörper gegen induzierbare Untereinheiten bei Kollagenosen nachgewiesen wurden (siehe nächsten Abschnitt).

Um die hier verwendeten anti-proteasomalen Assays diagnostisch sinnvoll nutzen zu können, sollten Spezifität und Sensitivität verbessert werden. Dazu sollten zum einen methodische Änderungen wie die Einführung eines Blockiermediums mit weniger ausgeprägten antigenen Eigenschaften (z.B. das proteinfreie Roti-Block, Firma Roth), verlängerte Blockierzeiten oder eine Erhöhung der Waschschritte getestet werden. Eine entscheidende Rolle scheint allerdings die Herkunft sowie die Präparationsweise der Proteasomen zu spielen. Auf lange Sicht wäre daher die Verwendung rekombinanter proteasomaler Untereinheiten im ELISA anzustreben, da so Schwankungen in der Zusammensetzung der Proteasomenpräparation keinen Einfluss mehr hätten und auch die Verwendung von induzierbaren Untereinheiten möglich wäre. Um eine sinnvolle Auswahl an Untereinheiten treffen zu können, die als Beschichtung eines ELISA in Frage kommen (alle 14 bzw. 17 Untereinheiten zu exprimieren, wäre sehr aufwändig), sollte das Spektrum anti-proteasomaler Autoantikörper genauer analysiert werden, wie im zweiten Teil dieser Arbeit begonnen. Ein gut eingestellter anti-proteasomaler Test mit verbesserter Sensitivität und Spezifität wäre diagnostisch hilfreich vor allem bei autoimmunen Erkrankungen, die keine hohen Prävalenzen an sonstigen Autoantikörpern aufweisen, wie z.B. die Myositiden oder auch die undifferenzierten Kollagenosen.

Identifizierung von Zieluntereinheiten anti-proteasomaler Antikörper

Bisher ist nicht bekannt, auf welcher Stufe der autoimmunen Dysregulation anti-proteasomale Antikörper entstehen. Treten sie erst nach Entwicklung der Immunregulationsstörung als sogenanntes Epiphänomen auf, eventuell induziert durch die Präsenz zirkulierender Proteasomen infolge autoimmuner Entzündungen bzw. schwerer Erkrankungen (Egerer *et al.* 2002)? Oder sind sie von Anfang an nachzuweisen, möglicherweise hervorgerufen durch Kreuzreaktionen mit bakteriellen / viralen Antigenen, und pathogenetisch an der Entwicklung der Autoimmunstörung beteiligt? Zur Aufklärung der Induktionsmechanismen ist die Kenntnis der immunogenen proteasomalen Untereinheiten und der betreffenden Epitope notwendig. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Diversität anti-proteasomaler

Autoantikörper größer ist als bislang bekannt war. Durch die Analyse von Seren rheumatologischer Patienten im zweidimensionalen Immunoblot (NEPHGE) konnten 9 von 14 Proteinen des konstitutiven 20S-Proteasomenkomplexes als Ziel anti-proteasomaler Autoantikörper identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die α -Untereinheiten C2 ($\alpha 6$), C9 ($\alpha 3$), C8 ($\alpha 7$), C3 ($\alpha 2$), Iota ($\alpha 1$) und Zeta ($\alpha 5$) sowie die zwei β -Untereinheiten Delta ($\beta 1$) und Z ($\beta 2$). In einem zweidimensionalen Immunoblot mit aufgetrenntem Proteasom, das MECL1 ($\beta 2^i$) enthielt, konnte zudem mit MECL1 erstmals eine der interferoninduzierbaren Immununtereinheiten als Autoantigen nachgewiesen werden (Scheffler *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht). Mittlerweile wurden von unserer Arbeitsgruppe auch Autoantikörper gegen die rekombinanten murinen Immununtereinheiten LMP2 ($\beta 1^i$) und LMP7 ($\beta 5^i$) bei Patienten mit Kollagenosen gefunden, die vermutlich - aufgrund der hohen Konservierung der proteasomalen Proteine- auch mit den humanen LMP-Proteinen reagieren (Scheffler *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht). Immunreaktionen gegen LMP2 ($\beta 1^i$) und LMP7 ($\beta 5^i$) konnten in der vorliegenden Arbeit aufgrund der Proteasomenpräparation aus humanen Erythrozyten nicht detektiert werden. Zur Vervollständigung soll noch erwähnt werden, dass Brychcy *et al.* 2006 Autoantikörper gegen $\alpha 4$ (C6) bei einem Kollagenosepatienten fanden, so dass aktuell Autoimmunreaktionen gegen alle sieben α -Untereinheiten sowie gegen drei β -Untereinheiten und die drei Immununtereinheiten bekannt sind (siehe Abb. 26).

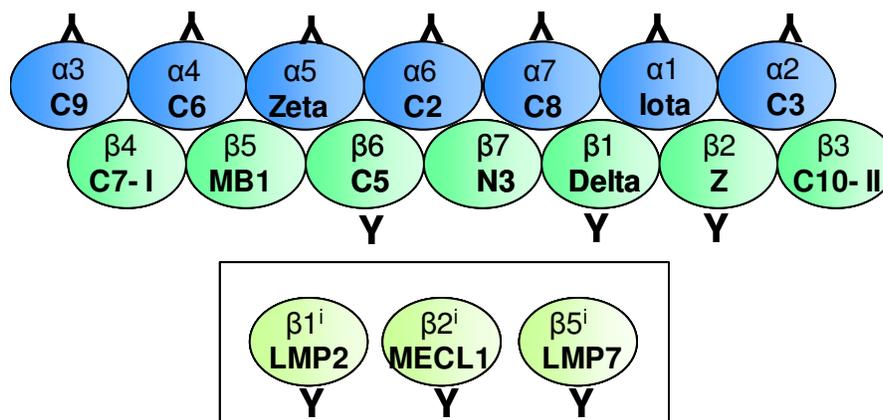


Abb. 26: Zusammenfassung aller bisher identifizierten proteasomalen Untereinheiten, die im Rahmen von Autoimmunerkrankungen Angriffspunkt anti-proteasomaler Autoantikörper waren.

Bei dieser Vielfalt anti-proteasomaler Autoantikörper wäre es von Interesse, „primär“ antigene Untereinheiten von eventuell durch Kreuzreaktionen erkannten Untereinheiten abgrenzen zu können.

Kreuzreaktionen der Antikörper gegenüber ähnlichen Epitopen sind theoretisch denkbar, da unter α -Untereinheiten Homologien von mindestens 20% bestehen (Coux 1994). Die Analyse der Reaktionsmuster im eindimensionalen Immunoblot (siehe Abschnitt 4.3.1.) zeigte allerdings, dass die meisten anti-Proteasomen Antikörper-positiven Seren nur eine singuläre Bande aufwiesen (69,6%). Bei diesen Seren reagierten 23,9% mit zwei Untereinheiten. Oligoklonale bzw. polyklonale Reaktionen mit mehr als drei Banden waren sehr selten und die jeweiligen Banden nur schwach ausgeprägt. Dies spricht dafür, dass die Epitope der anti-proteasomalen Autoantikörper in den meisten Fällen untereinheitenspezifisch sind und konservierte, α - oder β -typische Sequenzen überwiegend nicht als Antigen dienen. Auch gab es keine Bande, die sich nur im Zusammenhang mit anderen Banden fand. Allerdings traten Reaktionen mit der Untereinheit C2 (α 6) relativ selten als singuläre Bande auf (C2: 27% singuläre Banden, C9: 61%) und waren darüber hinaus eher schwach, so dass bei dieser Untereinheit der Verdacht auf Kreuzreaktionen besteht (am ehesten mit α -Untereinheiten aus dem Bereich zwischen 25 und 30 kD). Das überproportional häufige gemeinsame Auftreten von Autoantikörpern gegen C2 (α 6) und Autoantikörpern gegen Untereinheiten des genannten Bereichs könnte auch auf intermolekulares „epitope spreading“ hinweisen. Mit „epitope spreading“ wird eine Ausweitung der Immunreaktion auf ein räumlich eng verknüpftes Antigen/Protein durch gemeinsame Internalisierung bezeichnet. Topfer et al. (1995) konnten diesen Mechanismus im Mausmodell für die anti-Ro/anti-La Immunantwort nachweisen. Die Analyse der Reaktionsmuster im eindimensionalen Immunoblot ergab keine Anhaltspunkte für ein mögliches „epitope spreading“ bei weiteren Untereinheiten.

Schon von Voruntersuchungen war bekannt, dass bestimmte proteasomale Untereinheiten besonders häufig Autoantikörper induzieren. Die Auswertung der eindimensionalen Immunoblots von 46 Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen zeigte, dass 96,8% aller Banden im Bereich ≥ 25 kDa lagen, in dem sich alle α -Untereinheiten sowie die β -Untereinheit z (β 2) befinden (siehe Ergebnisse 4.4.). Die konstitutiven β -Untereinheiten spielen also eine eher untergeordnete Rolle als Autoantigene, während die α -Untereinheiten dominieren. Diese Ungleichverteilung

könnte durch die räumliche Anordnung der Untereinheiten innerhalb des zylinderförmigen 20S-Proteasoms bedingt sein (siehe Einleitung Abb.2), da die β -Untereinheiten durch ihre Lage in der Mitte des Zylinders weniger Angriffsfläche bieten. 20S-Proteasomen sind relativ stabil und zirkulieren selbst im Serum als vollständiger Proteinkomplex (Egerer *et al.* 2002, Zoeger *et al.* 2006), so dass viele β -Epitope unzugänglich bleiben.

Die Untereinheit $\alpha 3$ (C9) wurde in dem untersuchten Patientenkollektiv überproportional häufig erkannt. Insgesamt reagierten 45% der hochaffinen bzw. hochtitrigen Seren mit diesem Protein, während starke Autoimmunreaktionen gegen $\alpha 2$ (C3) und $\alpha 6$ (C2) nur in jeweils 5% vorkamen. Für die fünf proteasomalen Untereinheiten, die wegen mangelnder Abgrenzbarkeit im eindimensionalen Immunoblot zu einer Gruppe zusammengezogen wurden (<30 kD>25kD), können keine individuellen Prozentzahlen angegeben werden. Immerhin 45% aller Banden lagen in diesem Bereich, der die Untereinheiten C8 ($\alpha 7$), Zeta ($\alpha 5$), C6 ($\alpha 4$), Z ($\beta 2$) sowie Iota ($\alpha 1$) umfasst. Reaktionen gegen Untereinheiten dieser Gruppe könnten durch Immunoassays mit rekombinanten oder in Zellen überexprimierten Untereinheiten genauer quantifiziert werden.

Im Laufe der prospektiven Untersuchung konnten kleinere Subgruppen von proteasomen-reaktiven Patienten mit gleichen Diagnosen gebildet und somit nach krankheitsspezifischen Reaktionen gesucht werden. Unter Berücksichtigung der geringen Fallzahlen sind tendenzielle Unterschiede zwischen den Krankheitsgruppen erkennbar, die an größeren Patientengruppen überprüft werden müssten. Bei den Seren von Patienten mit UCTD fiel auf, dass sie keine Reaktion gegen C9 ($\alpha 3$) zeigten, sondern C2 ($\alpha 6$) sowie Untereinheiten im Bereich <30kD>25kD erkannten. Bei Patienten mit SLE war die Mehrheit (75% der Banden) der starken anti-proteasomalen Reaktionen gegen C9 ($\alpha 3$) gerichtet, wie schon Feist *et al.* (1996) bei proteasomen-reaktiven SLE-Patienten in noch größerem Ausmaß gesehen hatten. Beim Sjögrenkollektiv wurde C9 ($\alpha 3$) ebenfalls am häufigsten erkannt (50% der Banden).

Die Dominanz der Reaktionen gegen C9 ($\alpha 3$) lässt auf den ersten Blick vermuten, dass diese Untereinheit zumindest bei Patienten mit SLE oder Sjögren-Syndrom in vielen Fällen die anti-proteasomale Immunantwort induziert. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist jedoch zu beachten, dass die für den eindimensionalen Immunoblot verwendete Proteasomenpräparation keine induzierbaren Untereinheiten enthielt, und daher mögliche Reaktionen gegen diese Immununtereinheiten nicht nachgewiesen

werden konnten. Da aber in dieser Arbeit die Existenz von Autoantikörpern gegen MECL1 ($\beta 2^i$) belegt wurde und zwischenzeitlich auch Autoantikörper gegen LMP2 ($\beta 1^i$) und LMP7 ($\beta 5^i$) in bis zu 70% proteasomen-positiver Sjögren- und SLE-Patienten gefunden wurden (Scheffler et al., siehe oben), sollte in weiterführenden Untersuchungen auch die Frequenz von Autoantikörpern gegen MECL1 ($\beta 2^i$) bestimmt werden und dann nach eventuellen Kreuzreaktionen oder Assoziationen zwischen den induzierbaren Untereinheiten und C9 ($\alpha 3$) gesucht werden. Dies könnte am besten mit ELISA oder Immunoblot-Tests geschehen, die rekombinante oder überexprimierte Untereinheiten als Antigene enthalten. Der Verdacht auf bestimmte Kreuzreaktionen könnte durch Inhibitionstests bestätigt werden, bei denen das Serum zunächst mit einer der verdächtigen Untereinheiten vorinkubiert wird, bevor der Immunoassay mit der anderen Untereinheit als Antigen durchgeführt wird. Sehr interessant wären auch Verlaufsbeobachtungen an einzelnen Patienten, mit deren Hilfe eine Ausbreitung oder Veränderung der Immunantwort nachweisbar wäre. Falls sich durch diese Untersuchungen eine Untereinheit als Kandidat für ein "primäres" Antigen identifizieren ließe, könnten durch „epitope-mapping“ mit unterschiedlich deletierten rekombinanten Proteinen die erkannten Epitope charakterisiert werden und nach eventuellen Kreuzreaktionen mit bakteriellen oder viralen Antigenen gezielt gesucht werden. Bislang sind weder für C9 ($\alpha 3$) noch für die induzierbaren Untereinheiten derartige Kreuzreaktionen oder Homologien bekannt. Der Verdacht auf eine Kreuzreaktion von anti-proteasomalen Autoantikörpern mit der E. coli protease EclpP bestätigte sich nicht (Mayo et al. 2000).

Durch die Entdeckung von Autoantikörpern gegen die induzierbaren proteasomalen Untereinheiten stellt sich die Frage nach möglichen physiologischen Auswirkungen von anti-proteasomalen Autoantikörpern neu. In bisherigen Untersuchungen an konstitutiven Proteasomen konnte ein direkter Einfluss von anti-proteasomalen Autoantikörpern auf die proteolytischen Eigenschaften des 20S-Kernkomplexes *in vitro* nicht demonstriert werden (Arribas et al. 1991, Brychcy et al. 2006). Es gelang aber der Nachweis, dass Autoantikörper gegen α -Untereinheiten *in vitro* die Interaktion mit dem Regulator PA28 inhibieren (Brychcy et al. 2006), möglicherweise durch eine sterische Behinderung dieser Interaktion. Insofern ist es interessant, dass die α -Untereinheiten die am häufigsten erkannten Antigene von allen Untereinheiten des konstitutiven 20S-Komplexes sind, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde. Bei SLE- und Sjögren-Patienten

wurden auch Autoantikörper gegen die PA28-Untereinheiten PA28 α und Ki nachgewiesen (Matsushita *et al.* 2004), ein möglicher Effekt dieser Antikörper auf die Proteasomenfunktion wurde bislang noch nicht untersucht.

Im Zusammenhang mit den nun nachgewiesenen Autoantikörpern gegen induzierbare Untereinheiten, sollte ein möglicher Einfluss dieser Autoantikörper in Funktionsassays mit Immunoproteasomen überprüft werden.

Ob eine Beeinflussung des proteolytischen Verhaltens von Proteasomen auch *in vivo* stattfindet, etwa durch in Zellen penetrierte anti-proteasomale Autoantikörper, oder ob anti-proteasomale Autoantikörper eine physiologische Funktion bei der Eliminierung zirkulierender, proteolytisch aktiver Proteasomenkomplexe ausüben, ist noch nicht bekannt und sollte Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

ZUSAMMENFASSUNG

Für die routinemäßige Untersuchung von Patientenserum auf anti-proteasomale Autoantikörper wurden die Testsysteme ELISA und Immunoblot auf der Basis humaner Erythrozytenproteasomen standardisiert und etabliert. Die Spezifität bezogen auf gesunde Blutspender betrug 97,6% für den ELISA bzw. 90,9% für den Immunoblot. Vergleichende Untersuchungen von Seren mit beiden Immunoassays ergaben eine Übereinstimmung der Ergebnisse in 85% und deuten auf einen linearen Charakter der meisten proteasomalen Epitope hin. In einem orientierenden Screening von rheumatologischen Patienten mit den weiterentwickelten Testsystemen wurden bei Patienten mit undifferenzierter Kollagenose (UCTD) in 38,5% der Fälle anti-proteasomale Antikörper gefunden. Im Gegensatz dazu waren die Testsensitivitäten bei anderen Kollagenosen geringer als in der Literatur beschrieben, der Anteil positiver Seren im Immunoblot betrug beim primären Sjögren-Syndrom 23,1%, bei SLE 12,1% und bei autoimmuner Myositis 0%.

Die Charakterisierung der Immunoblotbanden von Patienten mit rheumatologischen Erkrankungen zeigte eine große Diversität der anti-proteasomalen Immunantwort mit einer Dominanz der α -Untereinheiten, vor allem von $\alpha 3(C9)$. Krankheitsspezifische Reaktionsmuster konnten nur tendenziell festgestellt werden. Bei SLE-Patienten richteten sich 75% der stark anti-proteasomalen Reaktionen gegen $\alpha 3(C9)$, bei UCTD dagegen wurde eine Reaktion gegen $\alpha 3(C9)$ nicht beobachtet.

Durch zweidimensionale Immunoblotanalyse (NEPHGE) gelang die Identifizierung von neun proteasomalen Untereinheiten als Autoantigen. Dabei handelt es sich um die sechs α -Untereinheiten C2 ($\alpha 6$), C9 ($\alpha 3$), C8 ($\alpha 7$), C3 ($\alpha 2$), Iota ($\alpha 1$) und Zeta ($\alpha 5$) sowie die drei β -Untereinheiten Delta ($\beta 1$), Z ($\beta 2$) und $\beta 2^i$ (MECL1).

Für die α -Untereinheiten $\alpha 1$ (Iota), $\alpha 2$ (C3) und $\alpha 5$ (Zeta), sowie für die β -Untereinheiten $\beta 1$ (Delta) und $\beta 2^i$ (MECL1) ist dies der erste Nachweis einer gegen sie gerichteten autoimmunen B-Zell-Reaktion.

LITERATURVERZEICHNIS

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

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al.: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31(3): 315-324.

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

Baumeister W, Walz J, Zühl F, Seemüller E: The Proteasome: Paradigm of a Self-Compartmentalizing Protease. *Cell* 1998; 92:367-380.

Bernstein RM, Morgan SH, Chapman J, Bunn CC, Mathews MB, Turner Warwick M, Hughes GR: Anti-Jo-1 antibody: a marker for myositis with interstitial lung disease. *Br Med J Clin Res Ed* 1984; 289:151-152.

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

Brychcy M, Kuckelkorn U, Hausdorf G, Egerer K, Kloetzel PM, Burmester GR, Feist E: Anti-20S proteasome autoantibodies inhibit proteasome stimulation by proteasome activator PA28. *Arthritis Rheum* 2006; 54(7): 2175-2183.

Buyon JP, Kim MY, Copel JA, Friedman DM: Anti-Ro/SSA antibodies and congenital heart block: necessary but not sufficient. *Arthritis Rheum* 2001; 44(8):1723-1727.

Claverol S, Burlet-Schiltz O, Girbal-Neuhauser E, Gairin JE, Monsarrat B: Mapping and structural dissection of human 20 S proteasome using proteomic approaches. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1(8): 567-578.

Coux O, Nothwang HG, Silva Pereira I, Recillas Targa F, Bey F, Scherrer K: Phylogenic relationships of the amino acid sequences of prosome (proteasome, MCP) subunits. *Mol Gen Genet.* 1994; 245: 769-80.

Dahlmann B, Ruppert T, Kuehn L, Merforth S, Kloetzel PM: Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. *J Mol Biol* 2000; 303(5): 643-653.

Deshmuk US, Bagavanti H, Fu SM: Role of anti-DNA antibodies in the pathogenesis of lupus nephritis. *Autoimmun Rev* 2006; 5(6): 414-418.

Egerer K, Kuckelkorn U, Rudolph PE, Ruckert JC, Dörner T, Burmester GR, Kloetzel PM, Feist E: Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases. *J Rheumatol* 2002; 29: 2045-2052.

Ehrenstein MR, Katz DR, Griffiths MH, Papadaki L, Winkler TH, Kalden JR, Isenberg DA: Human IgG anti-DNA antibodies deposit in kidneys and induce proteinuria in SCID mice. *Kidney Int* 1995; 48(3): 705-711.

Eggers M, Boes-Fabian B, Ruppert T, Kloetzel PM, Koszinowski UH: The cleavage preference of the proteasome governs the yield of antigenic peptides. *J Exp Med* 1995; 182:1865-1870.

Espinosa A, Zhou W, Ek M, Hedlund M, Brauner S, Popovic K, Horvath L, Wallerskog T, Oukka M, Nyberg F, Kuchroo V, Wahren-Herlenius M: The Sjögren's Syndrome-Associated Autoantigen Ro52 Is an E3 Ligase That Regulates Proliferation and Cell Death. *J Immunol* 2006; 176: 6277-6285.

Feist E, Dörner T, Kuckelkorn U, Schmidtke G, Micheel B, Hiepe F, Burmester G-R, Kloetzel PM: The proteasome α -type subunit C9 is a primary target of autoantibodies in sera of patients with myositis and systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1996; 184:1313-1318.

Feist E, Kuckelkorn U, Dörner T, Dönitz H, Scheffler S, Hiepe F, Kloetzel PM, Burmester GR: Autoantibodies in primary Sjögren`s syndrome are directed against proteasomal subunits of the α and β type. *Arthritis Rheum* 1999; 42:697-702.

Feist E, Dörner T, Kuckelkorn U, Scheffler S, Burmester GR, Kloetzel PM: Diagnostic Importance of Anti-Proteasome Antibodies. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123:92-97.

Feist E, Brychcy M, Hausdorf G, Hoyer B, Egerer K, Dörner T, Kuckelkorn U, Burmester G-R: Anti-Proteasome Autoantibodies Contribute to ANA-Patterns on HEP-2 cells. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66: 5-11.

Froment C, Uttenweiler-Joseph S, Bousquet-Dubouch M-P, Matondo M, Borges J-P, Esmenjaud C, Lacroix C, Monsarrat B, Burlet-Schiltz O: A quantitative proteomic approach using two-dimensional gel electrophoresis and isotope-coded affinity tag labeling for studying human 20S proteasome heterogeneity. *Proteomics* 2005; 5: 2351-2363.

Groettrup M, Soza A, Eggers M, Kuehn L, Dick TP, H Schild, Rammensee H-G, Koszinowski UH, Kloetzel PM: A role for the proteasome regulator PA28a in antigen presentation. *Nature* 1996; 381: 166–168.

Groettrup M, Soza A, Kuckelkorn U, Kloetzel PM: Peptide antigen production by the proteasome: Complexity provides efficiency. *Immunol Today* 1996; 17:429-435.

Groll M, Huber R: Structure of the 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 1997; 386: 463-471.

Hendil KB, Welinder KG, Pedersen D, Uerkvitz W, Kristensen P: Subunit stoichiometry of human proteasomes. *Enzyme Protein* 1993; 47 (4-6): 232-40.

Hendil KB, Khan S, Tanaka K: Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20S proteasomes. *Biochem J* 1998; 332 (Pt 3): 749-754.

Hengstman GJD, van Engelen BGM, van Venrooij WJ: Myositis specific autoantibodies: changing insights in pathophysiology and clinical associations. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16: 692-699.

Hiepe F, Riemekasten G, Dörner T: Autoantikörperdiagnostik beim systemischen Lupus erythematodes (SLE). *Akt Rheumatol* 1996; 21: 62-71.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: *Immunobiology*. 5th ed. 2001. Garland Publishing (New York and London).

Kronenberg M, Rudensky A: An array of possibilities for the study of autoimmunity. *Nature* 2005; 435: 598-604.

Krüger E, Kuckelkorn U, Sijts A, Kloetzel P-M: The components of the proteasome system and their role in MHC class I antigen processing. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003; 148:81-104.

Kuckelkorn U, Ruppert T, Strehl B, Jungblut PR, Zimny-Arndt U, Lamer S, Prinz I, Drung I, Kloetzel P-M, Kaufmann SHE, Steinhoff U: Link between Organ-specific Antigen Processing by 20S-Proteasomes and CD8⁺T-Cell-mediated Autoimmunity. *J Exp Med* 2002; 195 (8): 983-990.

Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.

Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D: *Der Experimentator. Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag 2004.

Maksymowych WP, Suarez-Almazor M, Chou C-T, Russell AS: Polymorphism in the LMP2 gene influences susceptibility to extraspinal disease in HLA-B27 positive individuals with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 321-324.

Matsushita M, Takasaki Y, Takeuchi K, Yamada H, Matsudaira R, Hashimoto H: Autoimmune response to proteasome activator 28 α in patients with connective tissue diseases. *J Rheumatol* 2004; 31:252-259.

Mayo I, Arizti P, Pares A, Oliva J, DoForno RA, de Sagarra MR, Rodes J, Castano JG: Antibodies against the C-terminal region of E. coli ClpP protease in patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33:528-536.

Mayo I, Arribas J, Villoslada P, DoForno RA, Rodriguez-Vilarino S, Montalban X, de Sagarra MR, Castano JG: The proteasome is a major autoantigen in multiple sclerosis. *Brain* 2002; 125:2658-2667.

Murata S, Sasaki K, Kishimoto T, Niwa S, Hayashi H, Takahama Y, Tanaka K: Regulation of CD8+T Cell Development by Thymus-Specific Proteasomes. *Science* 2007; 316: 1349-1353.

Pajonk F, McBride WH: The Proteasome in Cancer Biology and Treatment. *Radiation Research* 2001; 156:447-459.

Rea IM, McNerlana S, Pockleyb AG: Serum heat shock protein and anti-heat shock protein antibody levels in aging. *Experimental Gerontology* 2001; 36: 341-352.

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

Ruiz-Arguelles A, Alarcon-Segovia D: Penetration of autoantibodies into living cells. *Isr Med Assoc J* 2001; 3(2): 121-126.

Scheffler S, Kuckelkorn U, Egerer K, Dörner T, Reiter K, Kloetzel P-M, Gerd-R. Burmester G-R, Feist E: Autoimmune Reactivity Against the 20S-Proteasome Includes Immunosubunits LMP2 (β 1i), MECL1 (β 2i) and LMP7 (β 5i). Zur Veröffentlichung eingereicht.

Schmidt F, Dahmann B, Janek K, Kloss A, Wacker M, Ackermann R, Thiede B, Jungblut PR: Comprehensive quantitative proteome analysis of 20S proteasome subtypes from rat liver by isotope coded affinity tag and 2-D gel-based approaches. *Proteomics* 2006; 6(16): 4622-463

Schwimmbeck PL, Yu DTY, Oldstone MBA: Autoantibodies to HLA-B27 in the sera of HLA-B27 patients with ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome. *J Exp Med* 1987; 166:173-181.

Seufert W, Jentsch S: In vivo function of the proteasome in the ubiquitin pathway. *EMBO J* 1992; 11:3077-3080.

Storstein A, Knudsen A, Vedeler CA: Proteasome antibodies in paraneoplastic cerebellar degeneration. *J Neuroim* 2005; 165:172-178.

Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25(11): 1271-1277.

Targoff IN, Reichlin M: Measurement of antibody to Jo-1 by ELISA and comparison to enzyme inhibitory activity. *J Immunol* 1987; 138(9): 2874-2882.

Targoff IN: Update on myositis-specific and myositis-associated autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12:475-481.

Topfer F, Gordon T, McCluskey J: Intra- and intermolecular spreading of autoimmunity involving the nuclear self-antigens La (SS-B) and ro (SS-A). *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92, 875-879.

Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox PC, Fox RI, Kassan SS, Pillemer SR, Talal N, Weisman MH; European Study Group on Classification Criteria for Sjogren's Syndrome: Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002; 61(6):554-558.

Von Mühlen CA, Tan EM: Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 5: 323-358.

Zoeger A, Blau M, Egerer K, Feist E, Dahmann B: Circulating Proteasomes Are Functional and Have a Subtype Pattern Distinct from 20S Proteasomes in Major Blood Cells. *Clin Chem* 2006; 52(11): 2079-86.

Danksagung

Für die Überlassung des Themas sowie die fachliche Beratung bei der Anfertigung der Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Gerd-R. Burmester danken.

Herrn Dr. med. Eugen Feist danke ich für die ausdauernde und sehr engagierte Betreuung der Arbeit sowie Frau Dr. Ulrike Kuckelkorn für ihre außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und die Unterstützung vor allem bei der Proteasomenpräparation und den zweidimensionalen Immunoblots.

Bei Prof. Dr. Peter-M. Kloetzel bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit mit dem Institut für Biochemie der Charité und für die Bereitstellung von Laborkapazitäten.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern für die seelische und materielle Unterstützung in der Studienzeit und darüber hinaus sowie bei meinem Mann für die Motivation und das „Rückenfreihalten“ vor allem während des Zusammenschreibens.

Erklärung an Eides Statt

Ich, Sonja Scheffler, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Alpha-Untereinheiten und konstitutive proteolytisch aktive Untereinheiten des 20S- Proteasoms als Zielantigene bei Autoimmunerkrankungen“ selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst habe, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 16.02.2008

Sonja Scheffler

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