

Einleitung

Rheumatoide Arthritis

Bei der rheumatoiden Arthritis (RA) – auch chronische Polyarthrit (cP) - handelt es sich um eine systemische, chronische, entzündliche Erkrankung der Gelenke. Rund 1% der Bevölkerung ist von der RA betroffen, womit die RA die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung ist. Sie betrifft überwiegend Frauen (Männer:Frauen 1:3). Welche der geschlechtsspezifischen Faktoren, Genetik oder Hormone, den Ausschlag geben, ist allerdings noch unbekannt.

Die RA bedeutet neben den die Lebensqualität stark verminderten Folgen auch schwere volkswirtschaftliche Folgen, nicht nur durch die direkten Kosten, die durch Behandlung etc. entstehen, sondern auch durch das herabgesetzte Leistungsvermögen der Betroffenen.

Obwohl die Ätiologie und die Pathogenese noch ungeklärt sind, wird angenommen, dass die RA eine multifaktorielle Autoimmunerkrankung mit genetischer Prädisposition ist, da 50% der RA-Patienten das HLA-DR4-Antigen tragen, während dies bei der gesunden Population bei nur 30-40% auftritt [18]. Für eine genetische Disposition sprechen außerdem Beobachtungen, dass bei eineiigen Zwillingen häufiger beide betroffen sind als bei zweieiigen Zwillingen oder Geschwistern. Auch diskutiert werden Umwelteinflüsse und Infektionen mit Viren/Bakterien [2]. Ein einziges auslösendes Agens ist jedoch unbekannt.

In der Regel beginnt die rheumatoide Arthritis langsam, schleichend und primär chronisch, häufig jenseits des 40. Lebensjahres. Sie geht mit einem allgemeinen Krankheitsgefühl einher. Bei Frauen entwickelt sich die RA oft nach einer Schwangerschaft oder im Klimakterium. Sie beginnt meist polyartikulär, bilateral und symmetrisch mit Bevorzugung der peripheren Gelenke [1]. Bereits im Initialstadium kommt es zu schmerzhaftem Befall der Finger und im Vorfußbereich. In Folge treten Schwellungen der Fingergelenke auf. An den betroffenen Gelenken kommt es durch die Entzündung der Synovialmembran mit einhergehender Schwellung und Entwicklung eines Pannusgewebes schließlich zur Zerstörung des Gelenkknorpels und Knochens.

Im fortgeschrittenen Stadium treten massive, irreversible Veränderungen und Deformationen auf, die mit Funktionsbeeinträchtigungen einhergehen. Beginnt die Erkrankung im höheren Alter (Late Onset Rheumatoid Arthritis LORA), kommt es vermehrt zu Schmerzen in den großen Gelenken und zu einer diffusen Schwellung und

Steife der Finger, Vorfüße, Karpal- und Sprunggelenke. Häufig bilden sich Rheumaknoten, die als geschwulstartige Schwellungen auftreten und sich histologisch als Nekrosezonen darstellen.

Das klinische Bild der RA ist sehr heterogen, was das Befallsmuster, die Intensität, den Verlauf, aber auch die diagnostischen Parameter betrifft, so dass die rheumatoide Arthritis von manchen als ein Sammelbegriff für unterschiedliche, die Gelenke betreffende Krankheitsmuster angesehen wird.

Diagnostik

Die Diagnosestellung erfolgt primär anhand der klinischen Symptomatik; deshalb dauert es häufig Monate bis Jahre bis das Krankheitsbild eindeutig zugeordnet werden kann. Insbesondere im Frühstadium ist eine Differenzierung von anderen Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis, wie der systemischen Sklerose, Polymyositis, Morbus Bechterew, Sjögren-Syndrom schwierig, da sich zu diesem Zeitpunkt die Symptome dieser ansonsten sehr unterschiedlichen Erkrankungen ähneln.

Um eine einheitliche Diagnostik zu gewährleisten, hat das American College of Rheumatology (ACR) 1987 einen Kriterienkatalog zur Klassifikation der rheumatoiden Arthritis herausgegeben. Dieser beinhaltet sieben Kriterien, wobei bei Eintreten von vier der sieben Kriterien von einer RA ausgegangen wird. Die Kriterien 1-4 müssen mindestens sechs Wochen bestanden haben.

1. Morgensteifigkeit (mind. eine Stunde)
2. Arthritis in drei oder mehr Gelenkbereichen
3. Arthritis der Gelenke der Hand, Metacarpophalangeal –(MCP) oder proximale Interphalangealgelenke (PIP)
4. Symmetrische Schwellung
5. Rheumaknoten
6. Rheumafaktor im Serum
7. Radiologische Veränderungen

Serologische Parameter

Bei der RA kommt es zu signifikanten Veränderungen der allgemeinen Entzündungsparameter, die serologisch festgestellt werden. Die Krankheitsaktivität geht mit einer erhöhten Blutsenkungsgeschwindigkeit einher. Ebenso stark erhöht sind das C-reaktive Protein (CRP) und andere Akutphaseproteine.

Antinukleäre Antikörper, hier scheinen vor allem Histone eine Rolle als Zielstrukturen zu spielen, lassen sich bei ca. 30%, zirkulierende Immunkomplexe bei ca. 50% der Patienten nachweisen. Ebenso treten bei ca. 40% der RA-Patienten Antikörper gegen Typ-II-Kollagen auf.

Der einzige serologische Marker der ACR-Kriterien ist der Rheumafaktor (RF), der bei ca. 75% der RA-Patienten, aber auch bei anderen Erkrankungen und bei Gesunden zu 5-10% vorkommt. Es wird unterschieden zwischen einer RF-negativen (seronegativen) und einer RF-positiven (seropositiven) RA, wobei eine (hochtitrige) RF-positive RA meist auf einen schweren Verlauf der RA hindeutet. Beim Rheumafaktor handelt es sich um einen Antikörper, der sich gegen den Fc-Teil des Immunglobulins G (IgG) richtet. Zwar gibt es RF verschiedener Immunglobulinklassen, in der Diagnostik wird aber üblicherweise der Typ IgM bestimmt. Unklar bleibt jedoch, ob diese Autoantikörper auch eine Bedeutung in der Pathogenese spielen.

Morphologie, Pathogenese und Krankheitsverlauf

Bei der RA kommt es zu einer Synovitis, einer proliferativen und destruktiven Entzündung der Synovialis, der Gelenkinnenhaut, die die Innenhaut der Gelenkkapsel bildet und die Synovialflüssigkeit (Synovia) sezerniert. Die sonst einzellige Deckschicht der Synovialis fängt an zu wuchern und wird in Folge von Hyperplasie und Hypertrophie mehrschichtig. Aus den aktivierten von Makrophagen und Fibroblasten abstammenden Zellen dieser nun mehrschichtigen Deckschicht bildet sich ein aggressiver Pannus der meist am Gelenkkapselansatz in den angrenzenden Knochen hineinwächst und zu den symptomatischen Zerstörungen der sonst glatten Knorpel- und Knochenoberflächen führt. Die Knorpelschädigung wird durch die Ausschüttung lysosomaler Enzyme, wie Proteasen, Kollagenasen und Glykosidasen verursacht, während eine erhöhte Osteoklastenaktivität für die knöchernen Erosionen verantwortlich ist. Wächst das Pannusgewebe in den Gelenkspalt, so kann es zunächst über Bindegewebe, schließlich über Verknöcherungen den Gelenkspalt überbrücken (Ankylose). Darüber hinaus wird

vermehrt Synovialflüssigkeit (Synovia) produziert, was zur Ergußbildung der betroffenen Gelenke führt. Die Synovia im rheumatischen Gelenk zeichnet sich durch stark herabgesetzte Viskosität aus, was eine verminderte Gleitfähigkeit im Gelenk zur Folge hat.

Des Weiteren kommt es im erkrankten Gelenk zur Infiltration lymphoider Zellen, die lymphozytäre Aggregate bilden. Die Synovialis unterliegt einer intensiven Vaskularisierung. Die Folge ist eine Akkumulation von Entzündungszellen, die durch Zytokinausschüttung zusätzlich weitere Immunzellen in das Gelenk rekrutieren sowie die Aktivierung mesenchymaler Zellen im Gelenk.

Grundsätzlich gibt es zwei Hypothesen zum Einfluss der Entzündungszellen auf die Manifestation der RA. Die mesenchymale Hypothese geht davon aus, dass nach der Initialisierung durch die $CD4^+$ -T-Zellen kein weiterer Einfluß dieser Zellen notwendig ist, um die Entzündung aufrecht zu erhalten. Für eine stärkere pathogenetische Bedeutung der T-Zellen spricht, dass in Tiermodellen eine Übertragung der RA durch T-Zellen möglich war [37]. Eine andere Arbeit zeigte, dass es in vitro bei der Kultivierung von makrophagen- und fibroblastenähnlichen Zellen nur dann zur Ausbildung eines aggressiven Pannusgewebes kam, wenn T-Zellen, die das Synovialgewebe infiltrieren, anwesend waren [38].

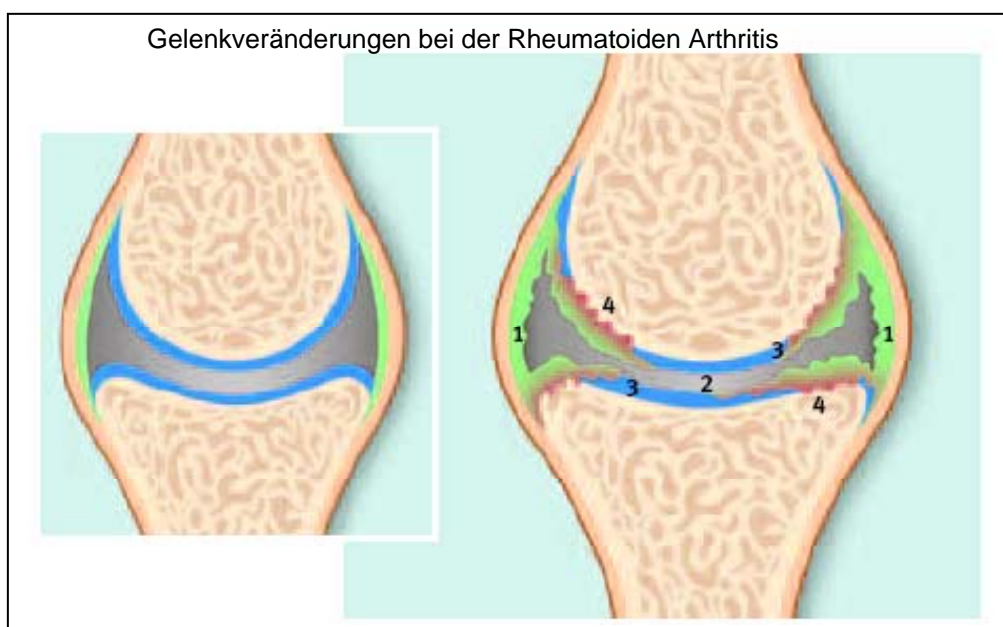


Abb. 1: Gelenkveränderungen bei der RA;
links: gesundes Gelenk mit Knochen, Knorpel (blau), Gelenkkapsel (braun/beige) und Synovialis (grün)
rechts: entzündetes Gelenk, die Synovialis (1) verdickt sich, es wird vermehrt Synovia gebildet, was zum Gelenkerguss führt. In Folge der verdickten Synovialis kommt es zur Bildung eines aggressiven Pannus, der letztlich Knorpel (3) und später auch Knochen (4) angreift. Mitunter wuchert die Synovialis (1) auch in den Gelenkspalt (2). Aus: (www.gesundheitpro.de/PGA/PDF/rheuma1.pdf)

RA und Autoreaktivität

Autoimmunerkrankungen beschreiben Krankheitsbilder, bei denen durch autoreaktive Immunzellen einzelne Systeme oder der Gesamtorganismus geschädigt werden.

Die RA ist, wie viele andere Autoimmunerkrankungen, T-Zell vermittelt. Bei der RA scheint dem MHC II Komplex eine besondere Bedeutung zuzukommen. Peptide werden durch MHC II den CD4⁺-Zellen präsentiert. Von großer Bedeutung scheint vor allem das Sequenzmotiv QKRAA und QRRAA zu sein, das so genannte „shared epitope“, das auf Zellen von RA-Patienten vorkommt, da es an der Präsentation von Peptiden gegenüber CD4⁺-T-Zellen beteiligt ist. Durch diese Präsentation kommt es vermutlich zur Expansion klonaler CD4⁺-T-Zellen. Durch Zytokinfreisetzung und direkten Kontakt zu anderen Zellen werden in Folge Makrophagen und Fibroblasten aktiviert sowie weitere Immunzellen in das Gelenk rekrutiert. Außerdem veranlassen sie durch Zellkontakt und über den CD40-Liganden B-Zellen zur Produktion von Immunglobulinen und erhalten somit den Entzündungsprozess aufrecht. Bei den genetischen Faktoren besteht die deutlichste Korrelation mit dem HLA und dem Geschlecht. Während beim HLA diese Korrelation vermutlich mit der Selektion bestimmter (Auto-)Antigene sowie mit der intrinsischen Stabilität der MHC Moleküle zusammenhängt, sind die geschlechtsspezifischen Faktoren und deren Wirkung noch unbekannt. Da bei einigen Autoimmunerkrankungen die globalen Verteilungsunterschiede sehr deutlich sind, wird außerdem angenommen, dass UV-Licht (geographische Höhe) einen Einfluß (insbesondere bei SLE) ausübt. Auch ethnische Unterschiede sind zu verzeichnen.

Grundsätzlich sind Autoimmunphänomene nicht immer „krankhaft“, sondern häufig Begleiterscheinungen anderer Immunreaktionen. So treten beispielsweise bei Gesunden häufig Rheumafaktoren während einer schweren bakteriellen Infektion auf. Die Bedeutung dieser Erscheinung ist allerdings noch ungeklärt. Ältere Menschen wiederum zeigen gehäuft antinukleäre Antikörper, die jedoch zu keinem Krankheitsbild führen.

Das Immunsystem eines gesunden Organismus ist also derart gestaltet, dass Autoreaktivitäten gegen körpereigene Antigene möglich sind, ohne dass es zu einer Autoimmunerkrankung kommt, da kontrollierende, regulatorische Mechanismen greifen. Es handelt sich also lediglich um temporäre Autoreaktivitäten. Die Verschiebung eines gesunden zu einem autoimmunen Zustand ist gekennzeichnet durch die Persistenz

inflammatorischer Zytokine und autoreaktiver Lymphozyten mit anschließender Autoaggressivität.

Charakteristisch für humorale Autoimmunphänomene bei der RA sind Immunkomplexe, Antikörper gegen Kollagene, Proteoglycane und nukleäre Bestandteile [3].

Im rheumatischen Gelenk kommt es zur Bildung großer Immunkomplexe, z.B. durch die starke Neigung von IgG-RF zu aggregieren. Diese Immunkomplexe sind dann wiederum in der Lage, Komplement zu fixieren, die Komplementkaskade zu initiieren und antigensensitive Immunzellen zu aktivieren. Außerdem kommt es durch Phagozytose der Immunkomplexe durch Granulozyten und Makrophagen zur Freisetzung von lysosomalen Enzymen, die den Destruktionsprozess weiter vorantreiben. Freigesetzte Interleukine rekrutieren weiter entzündungsaktive Zellen.

Es kommt also zu einer Verlagerung von einem gesunden zu einem autoimmunen Gleichgewichtszustand, der durch autoaggressive Zellen und inflammatorische Zytokine gekennzeichnet ist. Die RA ist gekennzeichnet durch eine Vielzahl von autoreaktiven T- und B-Zellen, die bereits im Frühstadium der Erkrankung auftreten. Den hier auftretenden Autoreaktivitäten kommt wahrscheinlich tatsächlich eine pathogenetische Bedeutung zu. Trotz allem korrelieren die bisher bekannten Autoreaktivitäten, mit Ausnahme des RF, nicht mit dem klinischen Bild der RA. Die Heterogenität der Autoreaktivitäten steht dem heterogenen Bild des klinischen, schubweisen Verlaufes, der Intensität und dem Befallsmuster gegenüber. Lediglich ein hoher RF-Titer kann als Hinweis für einen schweren Verlauf der RA gewertet werden. Unklar ist bis dato, ob die Vielfalt an Autoreaktivitäten eine Folge von epitope spreading ist, also eines Übergreifens einer Reaktivität von einem Molekül auf ein weiteres, häufig strukturell ähnliches Molekül. Wann und wie auch immer diese Vielfalt an Antigenen entsteht, es bestehen erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten bezüglich ihres Autoreaktivitätsprofils. Dies wird vor allem in der unterschiedlichen Sensitivität der einzelnen Antikörper sichtbar. Neben der Sensitivität gibt es auch gewichtige Unterschiede in der Spezifität der Autoreaktivitäten. Einige Antikörper treten auch bei anderen Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis auf. Die Heterogenität beschränkt sich jedoch nicht nur auf unterschiedliche Patienten oder unterschiedliche rheumatische Erkrankungen, sondern trifft auch das Individuum. So kann man bei einzelnen Patienten eine Änderung im Autoreaktivitätsprofil im Verlauf der Erkrankung feststellen.

Die herkömmlichen Therapien zur Immunsuppression unterdrücken die Immunreaktion nur unspezifisch und demzufolge auch mit entsprechenden Nebenwirkungen. Das zukünftige Ziel einer erfolgreichen Immuntherapie ist ein spezifisches Eingreifen am richtigen Ort.

Tabelle 1: Verschiedene Auto-/ Antigene bei der RA

Gelenk-spezifische Antigene	Außerhalb des Gelenkes vorkommende Antigene	Ubiquitäre Antigene	Xenogene Antigene
Kollagen Typ II	Filaggrin	RF IgG/IgA	HSP 60 (bakteriell)
HC gp 39	citrullinierte Peptide/Proteine	RF IgM	DnaJ (E.Coli)
CH65	Sa (citr. Vimentin)	RA33 (hnRNPA2)	EBNA-1 (EBV)
		Calpastatin	HSP65 (Mycobakterien)
		Calreticulin	
		verschiedene hsps	
		ANA (anti-nukleäre Antikörper)	

In Tabelle 1 sind einige bereits bekannte Autoantigene mit unterschiedlicher Spezifität und Sensitivität angeführt. Calpastatin ist ein ubiquitäres, zytoplasmatisches Protein mit vier inhibitorischen Domänen für Calpain. Es gibt Hinweise, dass Calpaine direkt an der Gelenkzerstörung beteiligt sind. Calreticulin ist ebenfalls ein ubiquitäres Protein. Es ist im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und an der Kalziumhomöostase beteiligt. Des Weiteren das 50kDa große Sa-Antigen (Vimentin), das scheinbar in Kontakt steht mit Calpain. Einige hsps und hnRNPs, auf die jeweils später noch genauer eingegangen wird sowie nukleäre Bestandteile sind Zielstrukturen des Immunsystems, neben den im Gelenk vorkommenden Antigenen wie Kollagen Typ II, HCgp39 und CH65. Darüber hinaus sind einige Peptide bakteriellen oder viralen Ursprungs bekannt, gegen die sich bei der RA die Immunantwort richtet, darunter hsps, DnaJ, ein bakterielles hsp-Homolog und eine Peptidsequenz des Epstein-Barr-Virus.

Es werden verschiedene Ursachen der Entstehung der Reaktivitäten gegen körpereigene Bestandteile diskutiert. Zum einen sind Kreuzreaktivitäten mit xenogenen Antigenen nach einer Infektion, bedingt durch Sequenzanalogien zwischen fremdem

und eigenem Peptid denkbar. Möglich wäre auch eine Störung in der negativen Selektion der T-Zellen. Im Thymus werden T-Zellen, die eine hohe Affinität zu MHC II Molekülen aufweisen, die körpereigene Peptide präsentieren, selektiert und in Apoptose überführt. Funktioniert dieser Mechanismus nicht, kann es zu Autoreaktivität kommen. Auch Fehler in der peripheren Toleranz werden als mögliche Ursache diskutiert, da Antigene aus dem Gelenk nur sehr ungenügend in die peripheren lymphatischen Organe gelangen, wo ihnen gegenüber Toleranz entwickelt werden könnte.

hsps und das Immunsystem

Hitzeschockproteine (hsps) sind Proteine, die im Falle von Zellstress, wie z.B. erhöhte Temperatur, verstärkt exprimiert werden, um möglichen Schädigungen der Zelle entgegenzuwirken. Ihre Nomenklatur erfolgt entsprechend ihrem Molekulargewicht. hsps sind in unterschiedlichen Kompartimenten der Zellen lokalisiert. Sie fungieren als Chaperone, die an Proteine oder Peptidsequenzen binden, um deren korrekte Faltung, Entfaltung oder Translokation zu gewährleisten und sind zudem an der Oligomerisierung anderer Peptide/Proteine beteiligt.

Hsps spielen eine kritische Rolle im Immunsystem. Sie sind in der Lage, eine humorale, wie auch eine zelluläre Immunantwort auszulösen und können darüber hinaus auch das Komplementsystem aktivieren. Von einigen Hitzeschockproteinen ist bekannt, dass sie eine bedeutende Rolle bei Autoimmunerkrankungen spielen oder möglicherweise sogar eine pathogenetische Bedeutung haben. Ausgehend von der Tatsache, dass hsps und letztlich auch gerade BiP am Zusammenbau von Immunglobulinen, aber auch von MHC-Molekülen beteiligt sind, ist eine immunmodulatorische Bedeutung naheliegend. Außerdem wurden einige hsps als Liganden von Toll-Like Rezeptoren (TLR) identifiziert.

GP96, das unter normalen Umständen aus nekrotischen Zellen freigesetzt wird, ist in der Lage, gleichzeitig das angeborene und das adaptive Immunsystem zu stimulieren [20]. Antigen präsentierende Zellen (APC) wie Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen, aber nicht T-Zellen, können über einen Rezeptor GP96 binden, über MHC I präsentieren und somit zytotoxische T-Zellen aktivieren [20].

Es wird diskutiert, ob es zu Kreuzreaktivitäten zwischen bakteriellen und humanen Proteinen aufgrund des hohen Konservierungszustandes der hsps und somit zur Autoreaktivität kommt. Infektionen mit *Chlamydia pneumoniae* werden in Zusammenhang mit der Pathogenese der Arteriosklerose gebracht. HSP60 aus

Clamidia wurde akkumuliert in arteriosklerosen Läsionen gefunden und, interessanter Weise, daneben auch humanes hsp60. Beide halten den entzündlichen Prozess aufrecht [20]. Eine Kreuzreaktivität zwischen bakteriellem und humanem hsp60 scheint hier nahe liegend.

Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung wurden Antikörper gegen humanes hsp60 und hsp65 gefunden, aber nicht gegen hsp70, obwohl dies stark exprimiert ist in arteriosklerösen Bereichen [21]. Bei der Immunthrombozytopenie, einer Autoimmunerkrankung, konnten hohe Titer an Antikörpern gegen hsp60 und hsp71 festgestellt werden [22].

Auch bei Patienten mit RA wurden Autoantikörper gegen hsps, z.B. hsp70 und hsp90 gefunden [23, 24]. Hsp60 und hsp65 wurden als häufige Autoantigene bei Patienten mit Juveniler Arthritis identifiziert [25, 27] sowie hsp60 bei RA und Osteoarthrose [26].

BiP wurde als RA-spezifisches Autoantigen von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben [23].

Somit stellen hsps häufige und wichtige Autoantigene bei verschiedenen Erkrankungen dar.

Heavy chain binding protein BiP / glucose regulated protein 78 / heat shock protein 78

BiP (Heavy chain binding protein), auch als GRP78 (glucose-regulated protein) oder hsp78 bekannt, ist ein Hitzeschockprotein (hsp) und gehört mit seiner Größe von 78kDa und 654 Aminosäuren zur hochkonservierten hsp70-Familie. Wie die anderen hsp70-Mitglieder hat es zwei Hauptdomänen, eine ATP-Bindungsstelle am N-Terminus und eine Peptidbindungs-stelle am C-Terminus. BiP hat eine schwache ATPase-Aktivität, die durch die Bindung von Peptiden am C-Terminus beeinflusst wird [6]. Die Bindung von BiP an Peptide oder Proteine erfolgt an hydrophoben Bereichen dieser Proteine. Diese sind im nativen Zustand normalerweise im Inneren des Proteins verborgen, so dass sie nur im denaturierten Zustand dem Chaperon zugänglich sind [7, 19]. Sein theoretischer isoelektrischer Punkt (IP) liegt bei 5,07.

BiP ist ein ubiquitäres, molekulares Chaperone, lokalisiert im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER), das sekretorische Proteine, die ins ER transportiert werden, bei der Faltung und ggf. bei der Oligomerisierung unterstützt [4,5]. Die Lokalisierung im ER wird durch eine KDEL-Sequenz am C-Terminus gewährleistet. Verschiedene Stressfaktoren, wie Schwermetallionen oder ein Ungleichgewicht des

Glukose- oder Kalziumspiegels, die die korrekte Faltung von Proteinen verhindern, induzieren die erhöhte Expression von BiP. Dies geschieht über einen Signaltransduktionsweg „unfolded protein response“ UPR. Das ER kann als Protein-Fabrik bezeichnet werden, die eine Vielzahl von Chaperonen und Enzymen, die die korrekte Faltung von Proteinen beeinflussen, beinhaltet. BiP und Enzyme kooperieren synergisch, um den „Zusammenbau“ oder die Oligomerisierung anderer Proteine zu gewährleisten. So bindet BiP in vitro beispielsweise an Fab-Fragmente von unvollständig zusammen gebauten Antikörpern und präsentiert diese Peptidketten in der entsprechenden Konformation, dass Cysteine dem Enzym Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) gut zugänglich sind [11].

BiP liegt als Oligomer (nicht gestresste Zelle) oder als Monomer vor, wobei von der oligomeren Form bekannt ist, dass sie post-translational phosphoryliert und ADP-ribosyliert ist. Während Freiden et al. postulieren, dass nur die monomere Form an denaturierte, ungefaltete und/oder unvollständig zusammengebaute Peptide bindet [13] und die oligomere Form andere biologische Funktionen übernimmt, haben Elguindi et al. demonstriert, dass auch die oligomeren Formen Peptide binden und dies zur Auflösung der Oligomere und zu einem Rückgang der Modifizierungen führt [12], so dass die oligomere Form quasi als Reservoir fungiert [4]. Ein Anstieg von ungefalteten/unvollständigen Peptiden im Lumen des ER führt zur Abnahme von modifiziertem BiP und zu einem Anstieg der monomeren Form und induziert die ATP-ase-Aktivität. Die Hydrolyse der ATP wiederum führt zur Freigabe der Polypeptide. Nach dem Absenken der Peptidkonzentration im ER kommt es erneut zur Modifizierung von BiP, die wiederum zur Oligomerisierung führt.

BiP ist nicht glykosiliert. Während verschiedener Zeitpunkte einer Batch-Fermentation von einer Myeloma-Zelllinie konnten aber vier verschiedene Isoformen des Proteins auf einer hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese ausgemacht werden [16]. ADP-ribosyliertes BiP konnte in Hepatomzellen von Mäusen nachgewiesen werden, die einen Mangel an Aminosäuren oder Glukose erfuhren [17].

Des Weiteren ist beschrieben, dass BiP am Zusammenbau von Immunglobulinen beteiligt ist. Es bindet schwere Ketten von IgG [5], bis diese mit leichten Ketten assoziiert sind, um den Zusammenbau der schweren Ketten miteinander zu verhindern. BiP bindet auch stabil leichte Ketten, sofern diese nicht sekretiert sind, während sekretierte leichte Ketten nur transient gebunden werden.

BiP ist an der Maturation von MHC I Klasse Molekülen beteiligt [19]. Somit spielt es auch eine Rolle im Immunsystem.

Unter bestimmten Bedingungen wurde BiP auch im Zellkern und sogar auf der Zelloberfläche nachgewiesen [9]. Einigen anderen Stressproteinen werden aufgrund der Tatsache, dass sie auf Zelloberflächen vorhanden sind (hsp70 und hsp90), auch immun-modulatorische Eigenschaften zugeschrieben. Da sie aber selber keine Transmembrandomänen besitzen, geht man davon aus, dass sie gemeinsam mit Peptiden, an die BiP bindet und die Transmembrandomänen besitzen, an die Oberfläche gelangen [14, 15].

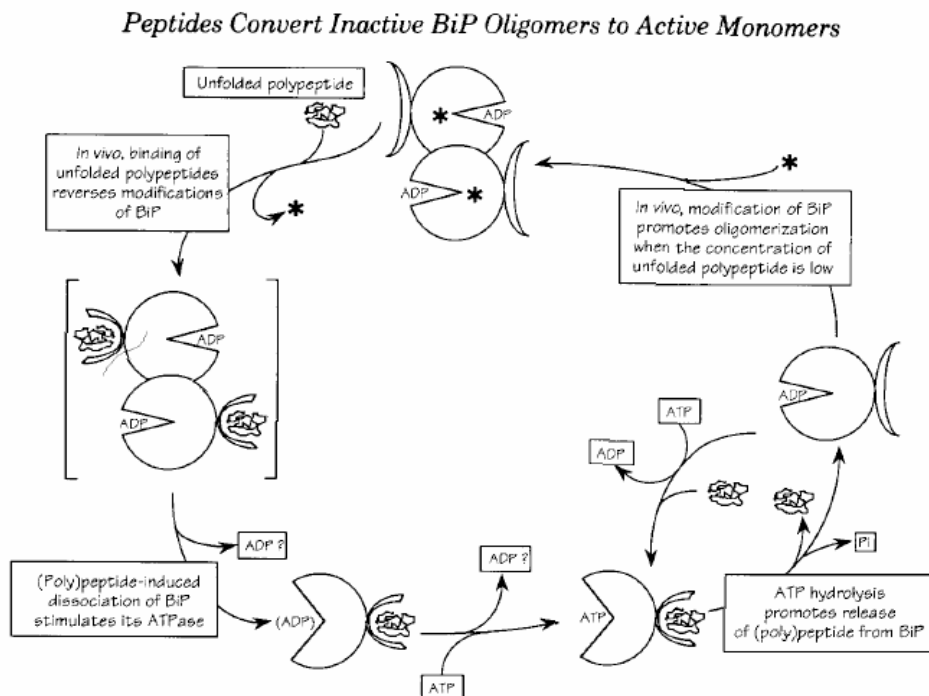


Abb. 2: Modell für die Oligomerisierung/Monomerisierung von BiP vor/nach Kontakt mit denaturierten Peptiden und unter Berücksichtigung des ATP-Stoffwechsels.

Aus „Peptide-dependent Stimulation of the ATP-ase Activity of the Molecular Chaperone BiP is the result of Conversion of Oligomers to Active Monomers“ Blond-Eleguindi S., Fourie M., Sambrook J.F., Gething M.J. The Journal of Biological Chemistry 1993 (vol. 268, No.17)

Heterogene Ribonukleoproteine hnRNPs

Bei den heterogenen Ribonukleoproteinen (hnRNPs) handelt es sich um eine große Familie von Proteinen, die in Gruppen und Subgruppen klassifiziert werden abhängig von ihren strukturellen und funktionellen Eigenschaften. HnRNPs binden Nukleinsäuren. Einige davon binden am 40s Ribosom. Während sich verschiedene Mitglieder ausschließlich im Nukleus befinden, sind andere in der Lage, sich zwischen Nukleus und Zytoplasma hin und her zu bewegen (hnRNPA1 und A2/B1), was durch eine M9-Sequenz nahe dem C-Terminus gewährleistet wird. Offenkundig spielen sie eine Rolle bei der Reifung und Prozessierung von pre-mRNA. Es wird angenommen, dass das Splicing und die Reifung der mRNA durch einem Komplex vieler Komponenten erfolgen. Beteiligt daran sind small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs), Splicing-Faktoren und hnRNPs. Die genaue Rolle, die hnRNPs dabei spielen, ist jedoch noch nicht geklärt. Einige Arbeiten deuten darauf hin, dass hnRNPs die m-RNA in einer Art und Weise binden, dass andere Komponenten des Splicing-Apparates das Transkript als eine einzige Einheit erkennen [29, 30]. Andere Arbeiten gehen von einer spezifischeren Rolle einiger hnRNPs beim Splicing aus [31].

Außerdem wird einigen Mitgliedern der hnRNPs eine Beteiligung an der Organisation der Telomere und der Regulation der Telomerasen nachgesagt. Entscheidend ist hier die einzelsträngige Sequenz d(TTAGGG)_n. Die entsprechende Sequenz auf RNA-Ebene r(UUAGG)_n wird jedoch noch deutlich stärker gebunden [32].

Heterogenes Ribonukleoprotein A3 (hnRNP A3)

hnRNPA3 gehört zu der hnRNPA/B Subgruppe. Diese weisen die gleiche molekulare Struktur auf. Sie besitzen eine hoch konservierte Region am N-Terminus und eine „individuellere“, Glycin-reiche Region am C-Terminus. Am N-terminalen Ende befinden sich zwei hoch konservierte RNA-Bindungsdomänen (RBD1 und RBD2) mit einer Länge von jeweils ca. 80 Aminosäuren, die direkt beteiligt sind bei der RNA-Bindung. Obwohl beide RBDs für das RNA-Splicing notwendig sind, erfüllen sie jedoch unterschiedliche Aufgaben. Dies ist besonders bemerkenswert, da beide RBDs sehr ähnliche Strukturen und Aminosäuresequenzen aufweisen [33]. Vermutlich ist die Diversität in der Glycin-reichen Region für die funktionellen Unterschiede der einzelnen Mitglieder der hnRNPA/B-Familie verantwortlich. Biamonti et al. konnten bei zwei Mitgliedern der hnRNPA/B-Familie, A2 und A1, zeigen, dass die hohe Konservierung der beiden

Proteine auf nahezu homologe Gene, die Intron/Exon-Organisation betreffend, zurückzuführen sind. Ursächlich für diese Homologie ist wahrscheinlich die Duplikation eines der beiden Gene [28]. Codiert wird die hnRNPA/B Familie von nur vier Genen; die große Anzahl an hnRNPs kommt lediglich durch Splicevarianten zustande [36].

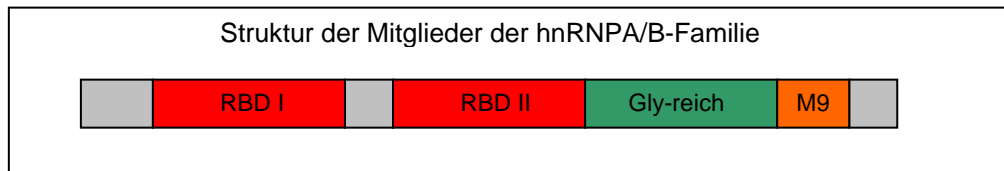


Abb. 3: Struktur der hnRNP A/B Familie mit seinen zwei RNA-Bindungsdomänen, der Glycin-reichen Region und der M9-Sequenz am C-Terminus, die für den Rezeptor-vermittelten Transport in den Nukleus von Bedeutung ist.

Ma et al. identifizierten 2002 neben A2 noch weitere Proteine, die am hnRNPA2 cis-acting response element (A2RE) binden. Neben hnRNPA1 und hnRNPA1 fanden sie auch vier Isoformen von hnRNPA3 [35]. So wurde erstmals A3 als A2RE bindendes Protein identifiziert.

Das Molekulargewicht der Mitglieder der hnRNPA/B-Gruppe bewegt sich um die 40 kDa und ihr isoelektrischer Punkt (IP) liegt im basischen Bereich. hnRNPA3 hat einen IP von 9,1. Die Bindung der hnRNPA/B-Proteine an RNA erfolgt am 3' untranslatierten Ende. Von A2 ist bekannt, dass es die mRNA-Transportsequenz RTS des Myelin Basic Proteins (MBP) bindet, womit der Transport des Proteins zum Axon und die dort stattfindende Translation gewährleistet wird.

Neben anderen hnRNPs wurde eine Beteiligung der hnRNPA/B-Familie, so auch von hnRNPA3 an der Fas-induzierten Apoptose festgestellt [34].

Apoptose, der programmierte Zelltod, spielt eine bedeutende Rolle bei Autoimmun- und bei Tumorerkrankungen, aber auch bei viralen und bakteriellen Infektionen. Die Tatsache, dass hnRNPs bei apoptotischen Vorgängen beteiligt sind, legt den Schluss nahe, dass auch sie eine entscheidende Rolle bei diesen Krankheitsbildern einnehmen. Darüber hinaus ist bekannt, dass 15% aller genetischen Erkrankungen auf Mutationen, die das RNA-splicing betreffen, zurückzuführen sind. Die Expression alternativ gesplinter mRNAs, die die Expression anderer Proteine nach sich zieht, steht im Zusammenhang mit der Tumorgenese und dem Fortschreiten eines Tumors. Reguliert wird das RNA-Splicing, wie auch andere mRNA-Vorgänge durch RNA-bindende Proteine. Von über 20 hnRNPs ist bekannt, dass sie an mRNA binden und sich

zwischen Kern und Zytoplasma bewegen. Am besten charakterisiert ist der 40s Ribonukleoprotein-Core-Complex, bei dem drei verschiedene Heterotetramere in einer bestimmten Facon an der mRNA binden. Es fehlt allerdings bis jetzt der Beweis, dass hnRNPs tatsächlich an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen beteiligt sind und welche Rolle sie hier genau spielen.