

Ergebnisse

hnRNPA3

Identifizierung eines neuen Autoantigens

Im 1D-Immunoblot, auf dem nukleäre Proteine aus HeLa-Zellen mit autoreaktiven RA-Seren detektiert wurden, wurde ein 40kDa großes Protein detektiert, mit dem RA-Seren reagierten. Diese 40kDa Bande befindet sich oberhalb einiger bereits als Autoantigene bekannter hnRNPs.

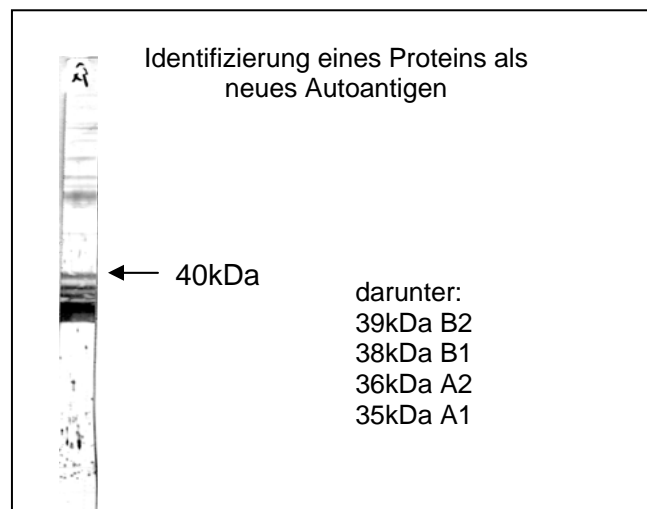


Abb. 5: Immunoblot mit nukleärem Extrakt aus HeLa-Zellen, detektiert mit RA-Serum.

Um dieses Protein identifizieren zu können, wurde derselbe Kernextrakt mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit dem oben verwendeten RA-Serum im Immunoblot detektiert. Die sichtbaren Spots wurden massenspektrometrisch (MALDI-TOF) analysiert und mit Hilfe der MASCOT-Datenbank identifiziert.

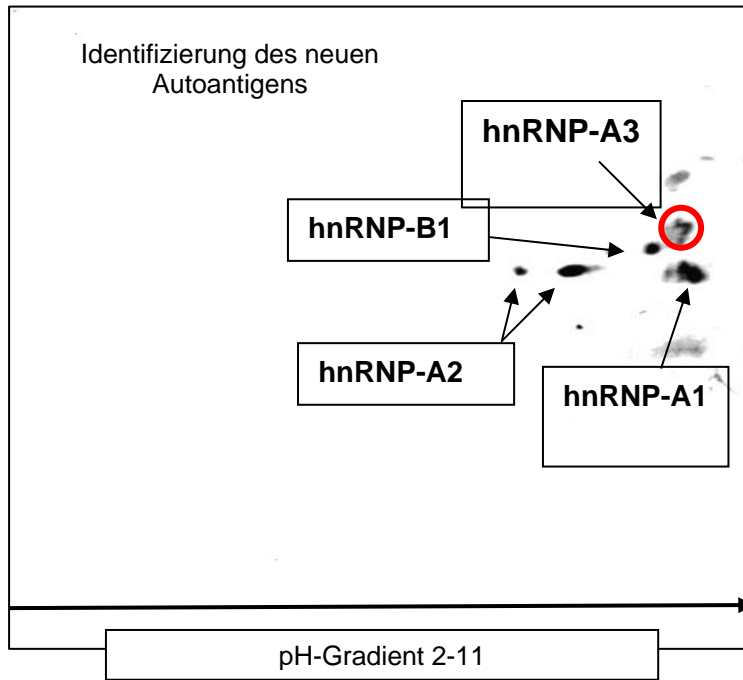


Abb. 6: 2D-Immunoblot mit nukleärem Proteinextrakt aus HeLa-Zellen, detektiert mit einem Serum, das Autoreaktivität gegen alle Proteine des mRNA-Transportkomplexes aufwies.

In der ersten Dimension wurde ein pH-Gradient zwischen pH 2 – pH 11 verwendet. Die hnRNPs befanden sich erwartungsgemäß im basischen Bereich. Das hnRNPA2 lag hier in zwei Splicevarianten vor. Der rot umrandete Spot wurde massenspektrometrisch analysiert und als hnRNPA3 identifiziert.

10	20	30	40	50	60	70	80
MEVKPPPGRP	QPDSGRRRRH	WGEEGHDPKE	PEQLRKLFIG	GLSFETTTDS	LREHFKEWGT	LTDCLVMRDP	QTKRSRGFGF
MEVKPPPGRP	QPDSGRRRRR	RGEEGHDPKE	PEQLRKLFIG	GLSFETTTDS	LREHFKEWGT	LTDCLVMRDP	QTKRSRGFGF
90	100	110	120	130	140	150	160
VTYSCVTEVD	AAMRARPFKV	DGRVVEPKRA	VSREDSVKPG	AHLTVKKIFV	GGIKEDTEEY	NLRDYFEKYG	KIETIEVMED
VTYSCVEEVD	AAMCARPHKV	DGRVVEPKRA	VSREDSVKPG	AHLTVKKIFV	GGIKEDTEEY	NLRDYFEKYG	KIETIEVMED
170	180	190	200	210	220	230	240
RQSGKKRGFA	FVTFDGHDTV	DKIVVQKYHT	INGHNCEVKK	TLKQEMQSA	GSRRRGGGS	GNFMGRGGNF	G
RQSGKKRGFA	FVTFDDHDTV	DKIVVQKYHT	INGHNCEVKK	ALSKQEMQSA	GSQRGGGS	GNFMGRGGNF	GGGGNFGRG
250	260	270	280	290	300	310	320
G	GGGSRGSY	GGDGGYNRF	GGDGGNYSG	PGCSSRGGYG	GGGPGYGNQG	GGYGGGGY-	DYNEGGNFG
GNFGRRGGYG	GGGGSRGSY	GGDGGYNGF	GGDGGNYGG	PGYSSRGGYG	GGGPGYGNQG	GGYGGGGY	DYNEGGNFG
330	340	350	360	370			
GGNYGGGGNY	NDFGNYSGQQ	QSNYGPMKGG	SFGRSSGGP	YGGYGSGGG	SGGYGSRRF	360 (A3a)	
GGNYGGGGNY	NDFGNYSGQQ	QSNYGPMKGG	SFGRSSGSP	YGGYGSGGG	SGGYGSRRF	379 (A3b)	

Abb. 7: Aminosäuresequenzen der beiden massenspektrometrisch identifizierten Varianten von hnRNPA3.

Die unterstrichenen Peptidsequenzen sind diejenigen, die auf dem 2D-Blot mittels Massenspektrometrie und der Mascot-Search-Datenbank als A3 identifiziert wurden. Bei den rot dargestellten Buchstaben handelt es sich um Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen beiden Isoformen. Die beiden oben dargestellten Isoformen von hnRNPA3 konnten außerdem direkt aus Synovialgewebe von RA-Patienten kloniert, über RT-PCR amplifiziert und sequenziert. Die Existenz der klonierten Isoformen wurde durch die massenspektrometrische Analyse bestätigt.

Isolierung von hnRNPA3 aus Zellextrakten

Im Folgenden wurde untersucht, ob hnRNPA3, wie es auch von anderen hnRNPs bekannt ist, die RNA Transportsequenz RTS bindet. Biotinylierte RTS-RNA wurde auf einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte gebunden. Anschließend wurde nukleärer Extrakt aus HeLa-Zellen auf dieser Elisa-Platte inkubiert. Nach einigen Waschschrritten erfolgte die „Elution“ des an die RNA gebundenen Proteins mit erhitztem Laemmli-Puffer und unter mechanischer Einwirkung. Als Kontrolle wurde eine andere RNA-Sequenz verwendet. Die Eluate und Überstände wurden auf ein Gel gegeben und geblottet. Der Blot wurde zunächst mit Ponceau gefärbt und anschließend mit einem Kaninchen-Anti-hnRNPA3-Antikörper (α -PA3) detektiert.

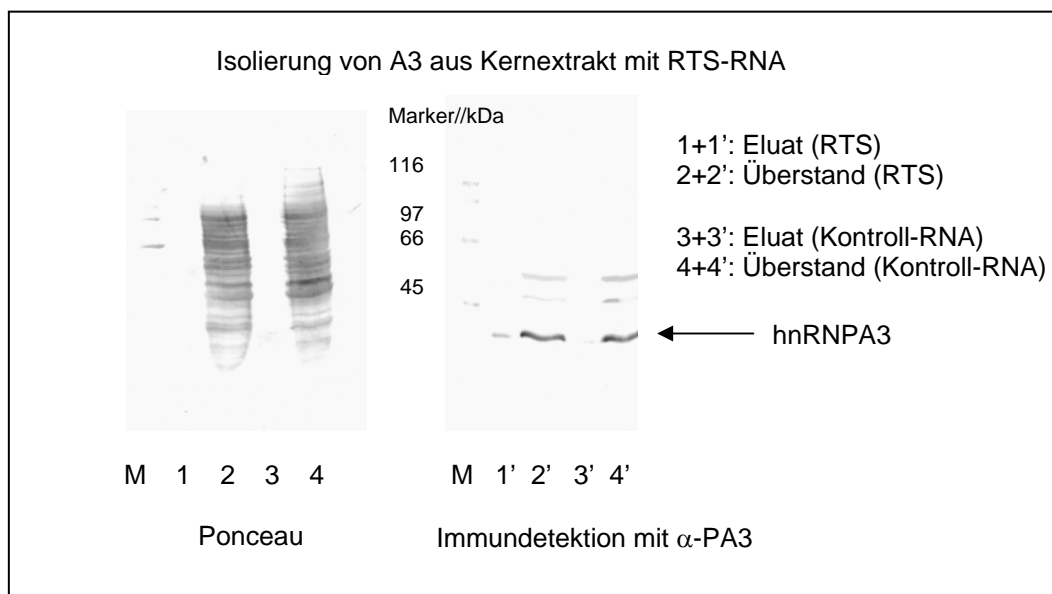


Abb. 8: Nukleärer Proteinextrakt aus HeLa-Zellen, der mit RTS-RNA (Bahnen 1 und 2) und einer Kontroll-RNA (Bahnen 3 und 4) inkubiert wurde. links: Blot mit Ponceau gefärbt; rechts: Detektion mit α -PA3-Antikörper

Die meisten der Proteine aus dem Extrakt befanden sich im Überstand und haben demnach nicht an die RNA in den Kavitäten gebunden (Bahnen 2 und 4). In den Eluaten (Bahnen 1 und 3) konnten keine Proteine mit Ponceau angefärbt werden.

A3 hat an die RTS gebunden und befand sich deshalb im Eluat (Bahn 1'). An die Kontroll-RNA hat A3 kaum gebunden, denn es ist hier im Eluat (Bahn 3') lediglich eine sehr schwache Bande zu sehen. Die eingesetzte Menge an RTS-RNA war jedoch nicht ausreichend, um das gesamte, im Extrakt befindliche, A3 binden zu können, so dass sich im Überstand (Bahn 2') noch A3 war. Kontrollversuche, in denen Streptavidinplatten ohne RNA eingesetzt wurden, zeigten, dass A3 tatsächlich an die RNA und nicht unspezifisch am Kunststoff der Kavitäten gebunden hat (Ergebnisse nicht dargestellt).

hnRNPA3 in Kern- und Zytoplasmafraktionen

Auf einem SDS-Gel wurden Zytoplasma- und Kernextrakte von HeLa-Zellen aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit einem Antikörper gegen A3 (α -PA3) detektiert [Abb. 7]. Die Proteinkonzentrationen der beiden Fraktionen betragen je 10 mg/ml. Bei K1 und K2, sowie Z1 und Z2 handelt es sich um zwei verschiedene Konzentrationen des α -PA3. Z3 und K3 sind Zweit-Antikörperkontrollen. Diese sind negativ.

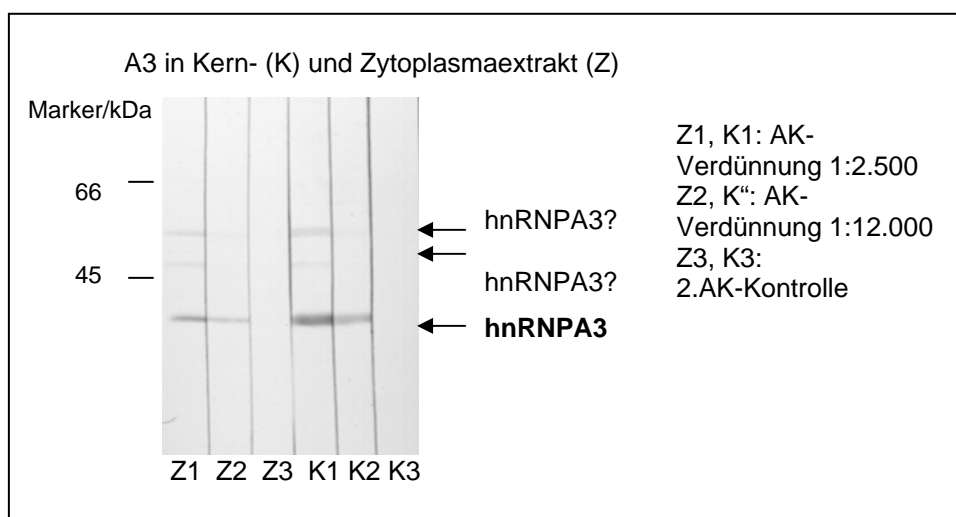


Abb. 9: Blot mit Zytoplasma- und Kernfraktionen aus HeLa-Zellen; detektiert mit α -PA3-Antikörper bei equivalenten Mengen an Gesamtprotein

Sowohl in der Zytoplasmafraktion (Z1 und Z2) als auch im Kernextrakt (K1 und K2) konnte hnRNPA3 nachgewiesen werden. Im Kernextrakt lagen allerdings höhere

Konzentrationen an A3 vor. Die Bande im Kernextrakt war intensiver als die im Zytoplasmaextrakt; eine quantitative Aussage lässt sich mit dieser Methode jedoch nicht machen. Es wurden, wenn auch deutlich schwächer, zwei Banden oberhalb der 40kDa-Bande detektiert.

Lokalisation des RNA-Transport-Partikels in humanem Hirn

Ein Parafinschnitt von humanem Hirn wurde mit α -PA3-Antikörper und einem Kaninchen-Zweitantikörper inkubiert. A3 ist hier braun angefärbt, die Detektion erfolgte mit HRP und DAB als Substrat.

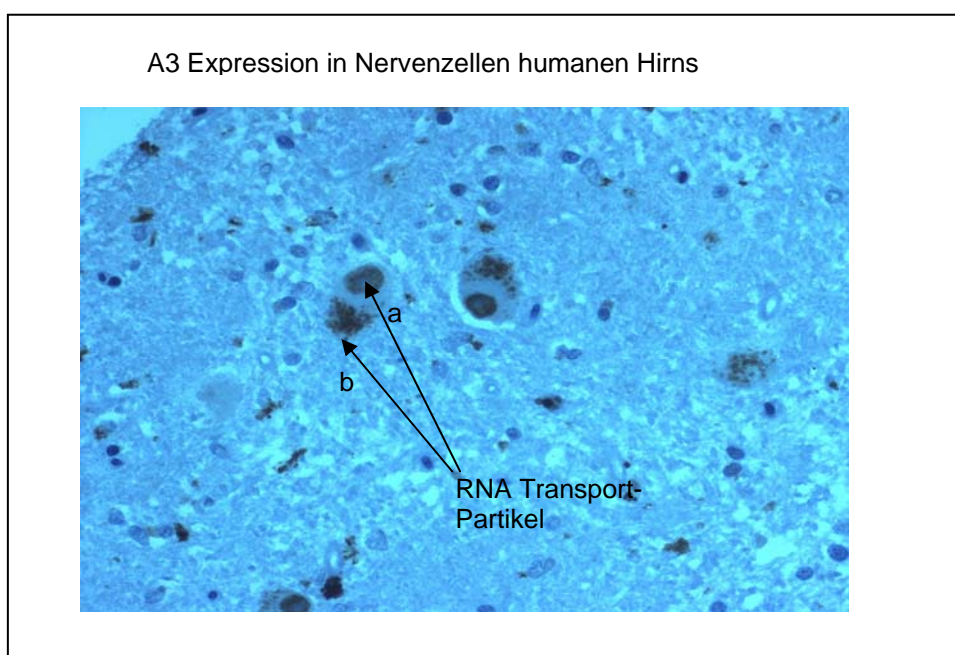


Abb. 10: Immunhistologische Färbung von humanem Hirn mit α -PA3. A3-Expression in Dendriten

Da gezeigt werden konnte, dass neben anderen hnRNPs auch A3 an die RNA von MBP bindet, sollte dies mit der immunhistologischen Färbung eines Schnittes von Hirn bestätigt werden. Auf oben dargestelltem Schnitt sieht man deutlich die Färbung einer Nervenzelle. A3 konnte einerseits im Dendriten (a) als auch im Axonhügel (b) von Purkinje-Zellen nachgewiesen werden.

hnRNPA3 Expression in verschiedenen Geweben

Ein Blot mit Proteinextrakten von unterschiedlichen humanen Geweben wurde mit dem α -PA3 detektiert, um einerseits zu prüfen, in welchen Geweben A3 und andererseits in welchem Maße A3 dort exprimiert wird. Darüber hinaus sollten mögliche Varianten von A3 identifiziert werden. Es wurde ein Kaninchen-Antikörper (α -PA3) gegen eine sehr kurze Peptidsequenz am N-Terminus des Proteins verwendet. Dieser Antikörper ist hoch spezifisch, da die ausgesuchte Sequenz keinerlei Homologien zu anderen Proteinen aufweist. So konnten wir auch keine Kreuzreaktivitäten mit anderen Proteinen entdecken. Die Detektion erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörper und ECL.

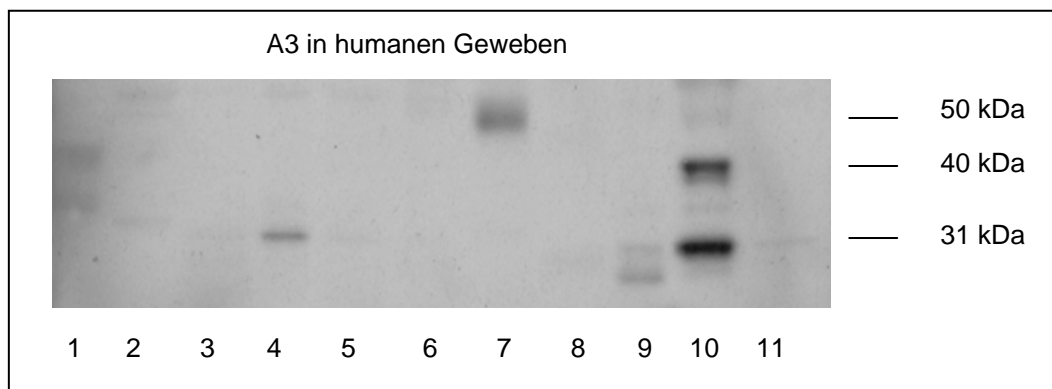


Abb. 11: Blot mit 11 verschiedenen humanen Geweben, die mit α -PA3 und ECL detektiert wurden.

Es fanden sich hier fünf verschiedene Varianten von A3 mit unterschiedlichen Molekulargewichten. Eine kleiner als 31kDa, eine mit 31kDa, eine mit ca. 36kDa, eine mit 40kDa und sogar eine mit 50kDa. Diese verschiedenen Varianten wurden in unterschiedlichen Geweben exprimiert. Die Zweitantikörperkontrollen (hier nicht dargestellt) zeigten keine Banden.

Besonders starke Banden fanden wir im Gewebe von Eierstock bei 31kDa und bei 41kDa, im Skelettmuskel (50kDa) und in der Niere (31kDa). Schwächere Banden in der Milz (>31kDa) sowie im Extrakt aus Hirn (ca. 36kDa und 40kDa) und noch einige grenzwertig sichtbare Banden in den übrigen Geweben.

Tab. 2: Verteilung der verschieden großen Varianten von A3 in den unterschiedlichen Geweben. Mit einem kleinen (x) gekennzeichnet sind sehr schwache, grenzwertige Banden.

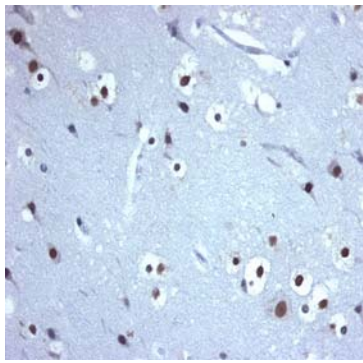
		< 31kDa	31kDa	ca. 36kDa	40kDa	< 40kDa
1	Hirn			X	X	
2	Herz		x			
3	Dünndarm		x			
4	Niere		X			
5	Leber		x			
6	Lunge					
7	Skelettmuskel					X
8	Pankreas		x			
9	Milz	X	x			
10	Eierstöcke		X		X	x
11	Hoden		x			

Die stärkste Expression von A3 war in der Niere und im Eierstock zu erkennen. Die einzigen Varianten, die eine Größe von 40kDa haben, waren im Gewebe von Eierstock und Hirn zu finden. Am häufigsten war die Variante mit einer Größe von 31kDa vertreten. Hierbei handelt es sich um die Variante mit 296 Aminosäuren, die bereits aus HeLa-Zellen kloniert und über Real-Time-PCR amplifiziert werden konnte. Die kleinste Form mit weniger als 31kDa wurde lediglich in der Milz detektiert, während eine andere Form von ca. 50kDa nur im Skelettmuskel gefunden wurde.

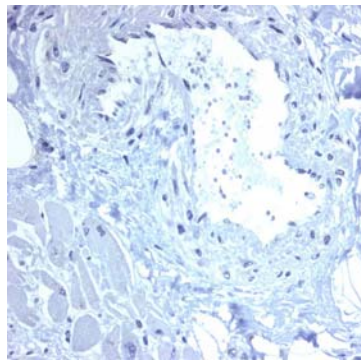
Immunhistologische Färbungen von Gewebeschnitten

Parallel dazu wurden immunhistologische Färbungen von verschiedenen Gewebeschnitten angefertigt. Verwendet wurden Paraffinschnitte. Es handelt sich um Gewebe von gesunden Spendern.

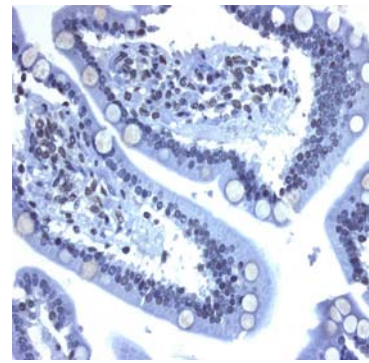
Immunhistologische Färbungen von humanen Gewebeschnitten



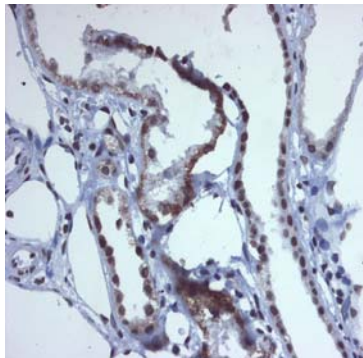
Hirn



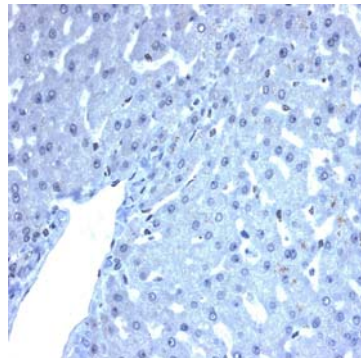
Herz



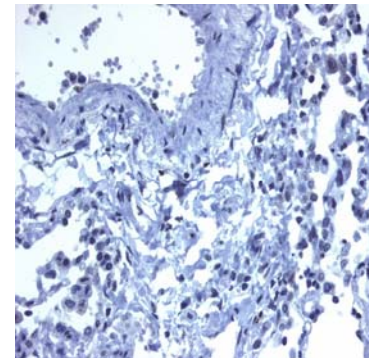
Dünndarm



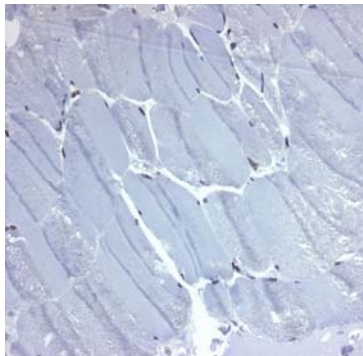
Niere



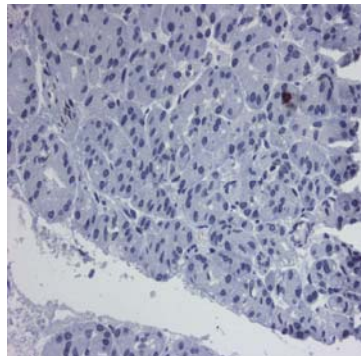
Leber



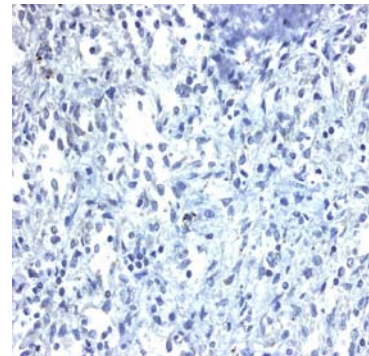
Lunge



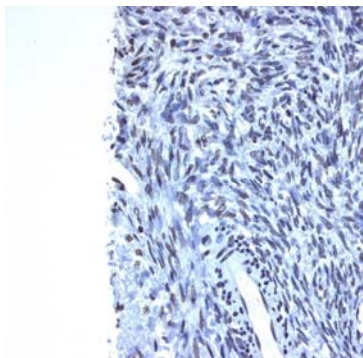
Skelettmuskel



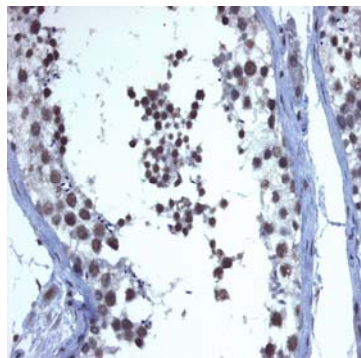
Pankreas



Milz



Eierstock



Hoden

Abb. 12: Schnitte von verschiedenen Geweben mit α -PA3 und einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper und DAB-Substrat angefärbt (braun) bei einer Vergrößerung von 1:400.

Tab. 3: Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten mit α -PA3.

Gewebe	Färbung	Zellen
Hirn	++	Dendriten (++) , Neuriten (++)
Herz	-	
Dünndarm	+	Glatte Muskulatur, Saumzellen
Niere	++	distal:Kern (+++), Zyto(+), proximal: Zyto(+), Sammelrohr: Kern(++); Intermediärtubuli: Kern(+)
Leber	-	
Lunge	-	
Skelettmuskel	+	Kern, Satellitenzellen
Pankreas	-	
Milz	-	
Eierstock	+	Primärfolikel: Kern
Hoden	++	Spermatozyten 1.+2. Ordnung: Kern (+++); Leydig-Zellen: Kern (+) Spermien (-)

Die Färbungen erfolgten mit demselben Antikörper wie auf dem Immunoblot. Die Kernfärbung erfolgte nach Mayer mit Hämatoxylin. A3 ist braun angefärbt, zur Detektion wurde ein Kaninchenantikörper gekoppelt an HRP und DAB als Substrat verwendet.

Die immunhistologischen Färbungen zeigten nahezu die gleichen Ergebnisse wie der Immunoblot. In erster Linie waren hier Färbungen in den Kernen vorhanden.

In den Schnitten von Herz, Leber, Lunge, Pankreas und Milz konnte hier allerdings keine Expression von A3 festgestellt werden, während auf dem Blot sehr schwache Banden zu sehen waren. Im Schnitt von Hirn war eine intensive Braunfärbung in den Kernen zu verzeichnen. Auch in weiteren Schnitten von Hirn (hier nicht dargestellt) konnten wir in allen Bereichen eine starke A3-Expression im Kern beobachten, bis auf die Markscheide, hier gab es keine Braunfärbung. Auch in Hirnschnitten von Mäusen, MRL/lpr Mäusen, so wie gesunden Tieren war eine intensive Färbung in den Kernen sichtbar, bei gesunden und erkrankten Tieren gleichermaßen.

Untersuchungen zur Modifizierung von A3 in Kern- und Zytoplasmaextrakten

Es wurden Proteinfractionen aus HeLa-Zellen gewonnen, auf einem SDS-Gel getrennt und geblottet. Verschiedene Modifizierungen wurden auf diesen Blots untersucht (Phosphorylierung am Serin und am Threonin, Glykosylierungen, insbesondere O-Glykosylierungen). Da citrullinierte Peptide bei der RA nach jüngeren Erkenntnissen eine immer größere Rolle zu spielen scheinen, wurde A3 auch auf mögliche Citrullinierungen hin untersucht. Bei der Citrullinierung handelt es sich um eine Deiminierung der Aminosäure Arginin durch das Enzym Peptidyl-Deiminase.

Tab. 4: Unterschiedliche Modifizierungen von hnRNPA3 in Kern- und Zytoplasmafraktionen von HeLa-Zellen

Modifizierung	Kern	Zytoplasma
S-Phosphorylierung	+	+
T-Phosphorylierung	-	-
Citrullinierung	-	-
Glykosylierung	-	+
O-Glykosylierung	-	+

Sowohl in der Kern- als auch in der Zytoplasmafraktion konnten S-Phosphorylierungen festgestellt werden, jedoch keine Phosphorylierungen am Threonin. Es konnte darüber hinaus keine Citrullinierung detektiert werden. O-Glykosylierungen sowie Glykosylierung im Allgemeinen konnten nur im Zytoplasma nachgewiesen werden.

Epitopmapping der Serumantikörperbindungsstelle an A3

Rekombinant exprimierte Fragmente von A3 wurden in pET30 Vektoren kloniert, in E. coli exprimiert und über NTA-Säulen aufgereinigt. Diese Fragmente wurden auf ein SDS-Gel gegeben und auf Nitrocellulose geblottet. Nun wurden die Fragmente mit Serumantikörpern von A3⁺-RA-Seren auf dem Blot inkubiert.

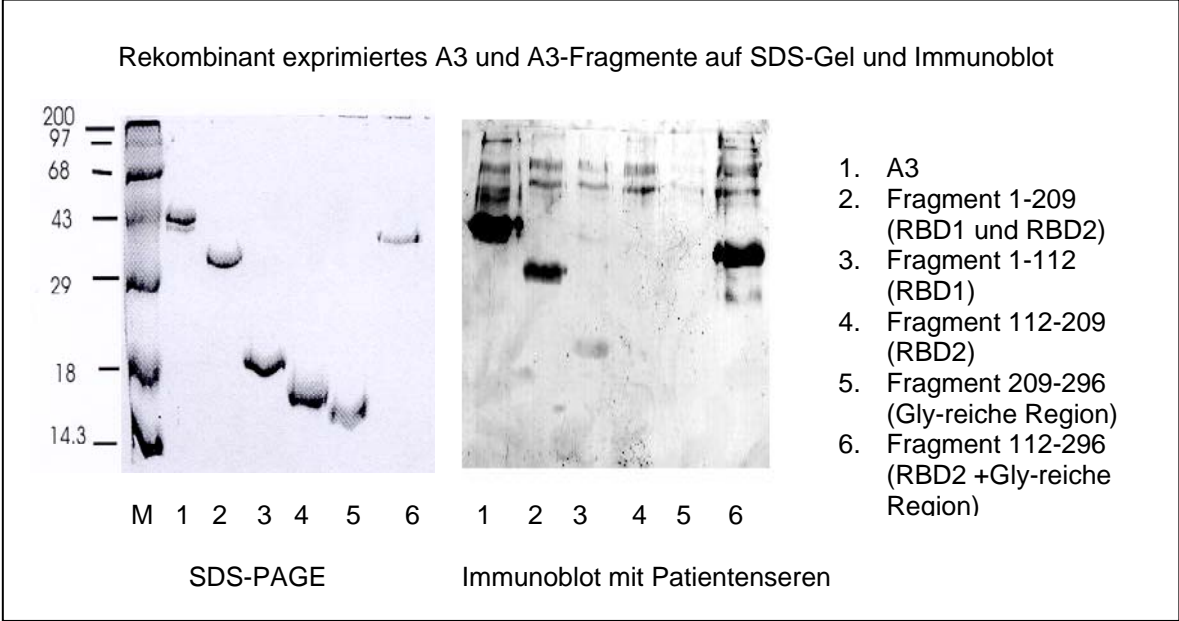


Abb. 13: 10% SDS-PAGE mit A3 und Fragmenten von A3

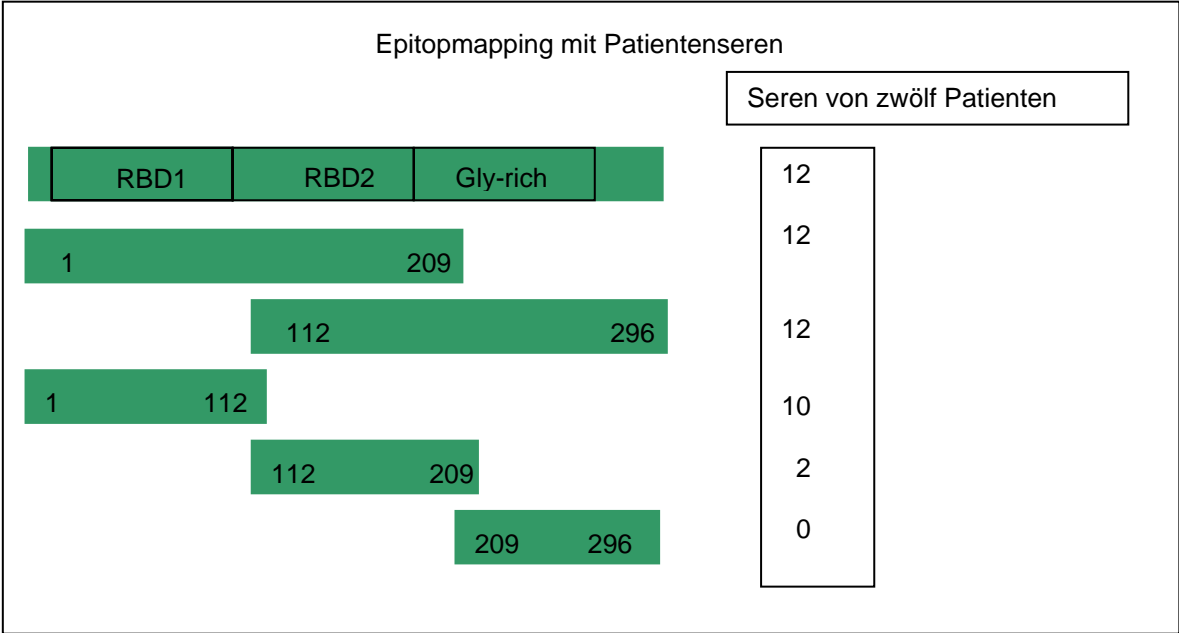


Abb. 14: Ergebnisse des Epitopmappings mit der 31kDa-Variante von A3

Alle Seren, die mit A3 reaktiv waren, reagierten auch mit dem Fragment 1-209, das beide RNA-Bindungsdomänen enthält. Ebenfalls alle Seren reagierten mit dem Fragment 112-296, das die RBD2 und die Gly-reiche Region enthält. Immer noch 10 Seren reagierten mit der RBD1 alleine, während an die RBD2 nur noch zwei Seren gebunden haben. Die Gly-reiche Region alleine wurde von keinem Serum erkannt.

Bindung von A3 und Fragmenten an eine poly-U-reiche Oligoribonukleotidsequenz

A3 sowie Fragmente von A3 wurden mit einem radioaktiv markierten Oligoribonukleotid inkubiert und anschließend auf ein SDS-Gel gegeben.

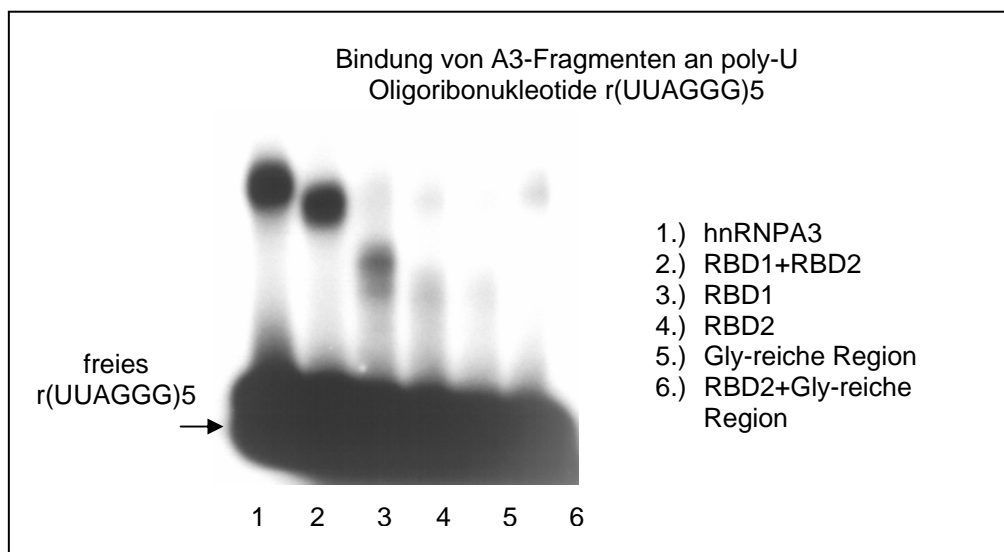


Abb. 15: SDS-PAGE mit A3 und Fragmenten von A3, die vorher mit radioaktiv markierten Oligoribonukleotiden inkubiert wurden.

Ungebundene Nukleotide wanderten schneller und befanden sich hier im unteren Bereich des Gels. Das vollständige Protein band an die Nukleotidsequenz, ebenso das Fragment, das die RBD1 und die RBD2 enthält. Etwas schwächer hat die RBD1 alleine gebunden, während die Nukleotide weder von der RBD2 alleine noch von der Gly-reichen Region und auch nicht von der RBD2+Gly-reichen Region gebunden wurden. Folglich ist die RBD1 für die Bindung dieses Oligos maßgeblich, dennoch ist die RBD2 in hohem Maße mit daran beteiligt.

A3-Expression in gestressten HeLa-Zellen

Auf einem Blot wurden die Extrakte von unterschiedlich behandelten Zellen aufgetragen und mit dem α -PA3-Antikörper überprüft, ob sich hierdurch Unterschiede in der Expressionsrate oder sogar neue Varianten finden.

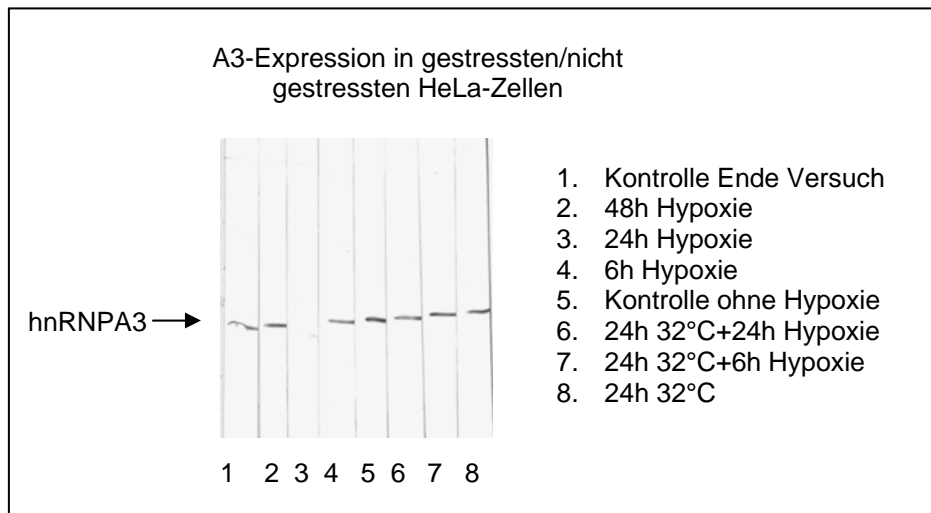


Abb. 16: Blot mit HeLa-Zellen nach zunehmender Inkubationszeit unter hypoxischen Bedingungen und bei Thermostress.

Es waren alle Banden gleich stark sichtbar bei gleicher Gesamtproteinkonzentration mit Ausnahme der Bahn 3, wobei es sich hier wohl eher um ein methodisches Problem gehandelt haben dürfte, da nach 6 Stunden (bahn 4) und nach 48 Stunden (Bahn 2) deutlich Banden sichtbar waren. Außerdem sind keine geschnittenen Varianten detektierbar. Das gleiche Ergebnis wurde bei weiteren Versuchen in anderen Zellen, z.B. Fibroblasten, erzielt.

hnRNPA3 und Apoptose

Da in der Literatur beschrieben ist, dass Mitglieder der hnRNPA/B-Familie an der Fas-induzierten Apoptose beteiligt sind [34], sollte überprüft werden, ob es Unterschiede in der Expressionsrate zwischen apoptotischen und nicht apoptotischen Zellen gibt. Hierzu wurden Zellextrakte von HeLa- und Jurkat-Zellen 1D- bzw. 2D-aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern detektiert.

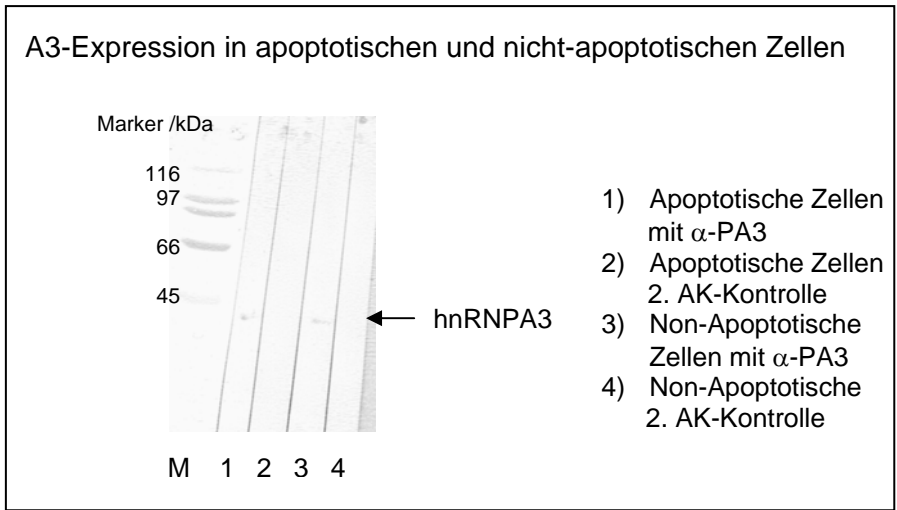


Abb. 17: Immunoblot; HL60 Leukämiezellen mit (chemisch) induzierter Apoptose (1 und 2) und ohne Apoptose (3 und 4). Detektiert mit α -PA3.

Beide Zweit-Antikörperkontrollen waren negativ. Schwache Banden waren sowohl im apoptotischen als auch im nicht-apoptotischen Extrakt in etwa gleicher Intensität zu finden.

Nachfolgende Abbildung zeigt Immunoblots mit Jurkat Zellysaten. Die Apoptose wurde hier über den Fas-Liganden induziert.

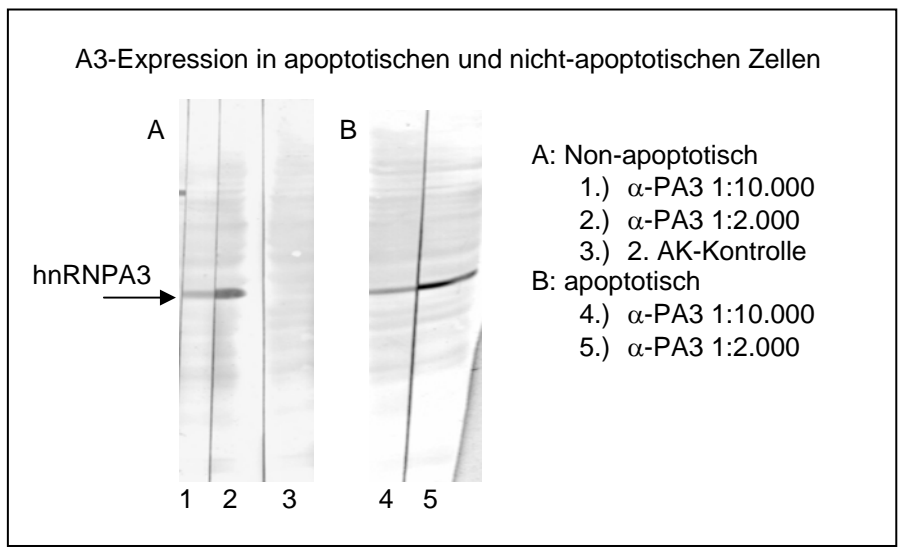


Abb. 18: Immunoblot mit A: Non-apoptotischen und B: apoptotischen (über Fas-Ligand induziert) Jurkat-Zellen. Detektiert mit α -PA3.

Es gibt auch hier keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsrate zwischen apoptotischen und non-apoptotischen Jurkat-Zellen.

Bindungsfähigkeit von rekombinant exprimiertem A3 an die RTS

Nach der rekombinanten Expression von A3 in *E. coli* wurde überprüft, ob die rekombinante Variante auch noch seine Funktionen übernimmt und beispielsweise an RTS-RNA bindet.

Hierzu wurde die RTS-RNA an magnetische Partikel (Microbeads) gekoppelt und diese in einer Säule mittels eines Magnetfeldes gebunden. Auf diese Säule wurde das aufgereinigte Protein gegeben, die Säule zweimal gewaschen und das Protein eluiert. Auf dem Blot wurden der Durchlauf, zwei Waschfraktionen und das Eluat in vier Fraktionen aufgetragen.

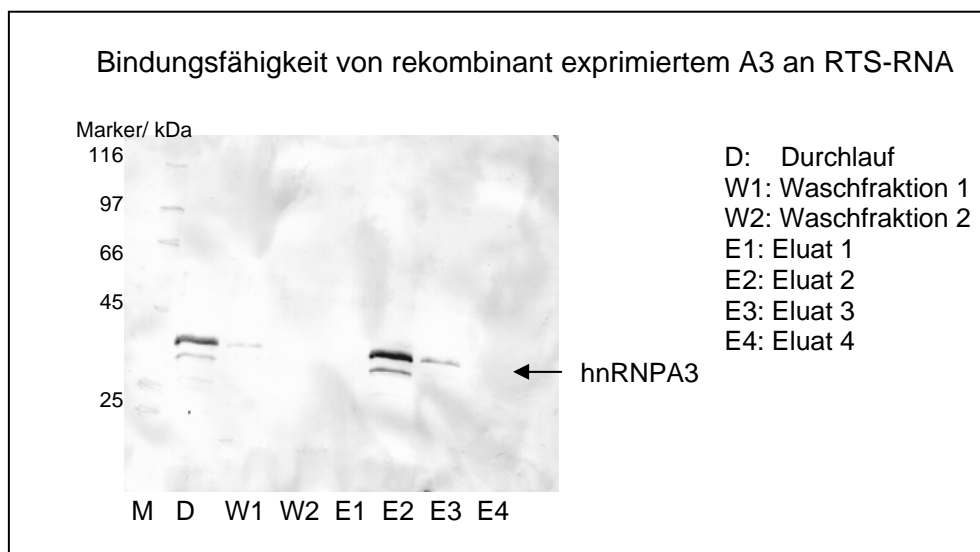


Abb. 19: Blot mit Fraktionen nach Bindungsversuch von rekombinantem A3 an RTS-RNA mit Microbeads.

Im Durchlauf war noch reichlich A3, da die RTS-Menge nicht ausreichte, um alles A3 zu binden. In den Waschfraktionen W1 und W2 befand sich kaum, bzw. gar kein A3, ebenso nicht im ersten Eluat. Die größte Ausbeute war im Eluat 2 und noch eine kleinere Menge im Eluat 3 zu finden, jedoch nichts mehr im Eluat 4. Die starke Bande in E2 zeigte jedoch, dass der Großteil des Proteins an die RNA gebunden hat. Deutlich sichtbar ist jedoch noch eine zweite Bande unterhalb der eigentlichen 40 kDa-Bande im Durchlauf sowie im Eluat 2.

Inhibierung der Bindung von A3 an die RTS durch Serum-Antikörper

Der Schluss liegt nahe, dass die Bindung der Autoantikörper an hnRNPs deren biologische Funktion, also die Bindung an RNA inhibiert. Dazu wurde in Vorversuchen, Serum von Patienten in unterschiedlichen Konzentrationen mit A3 inkubiert und anschließend dieses Gemisch auf mit RTS-RNA beschichtete Streptavidinplatten inkubiert. Um sicherzustellen, dass die RNA nicht durch Serumkomponenten degradiert wird, wurde in einem Vorversuch RTS-RNA mit Serum inkubiert und nach verschiedenen Waschschritten die RNA-Konzentration und Bindungsfähigkeit getestet. Die Eluate wurden auf einem Gel aufgetragen, geblottet und mit α -PA3 detektiert.

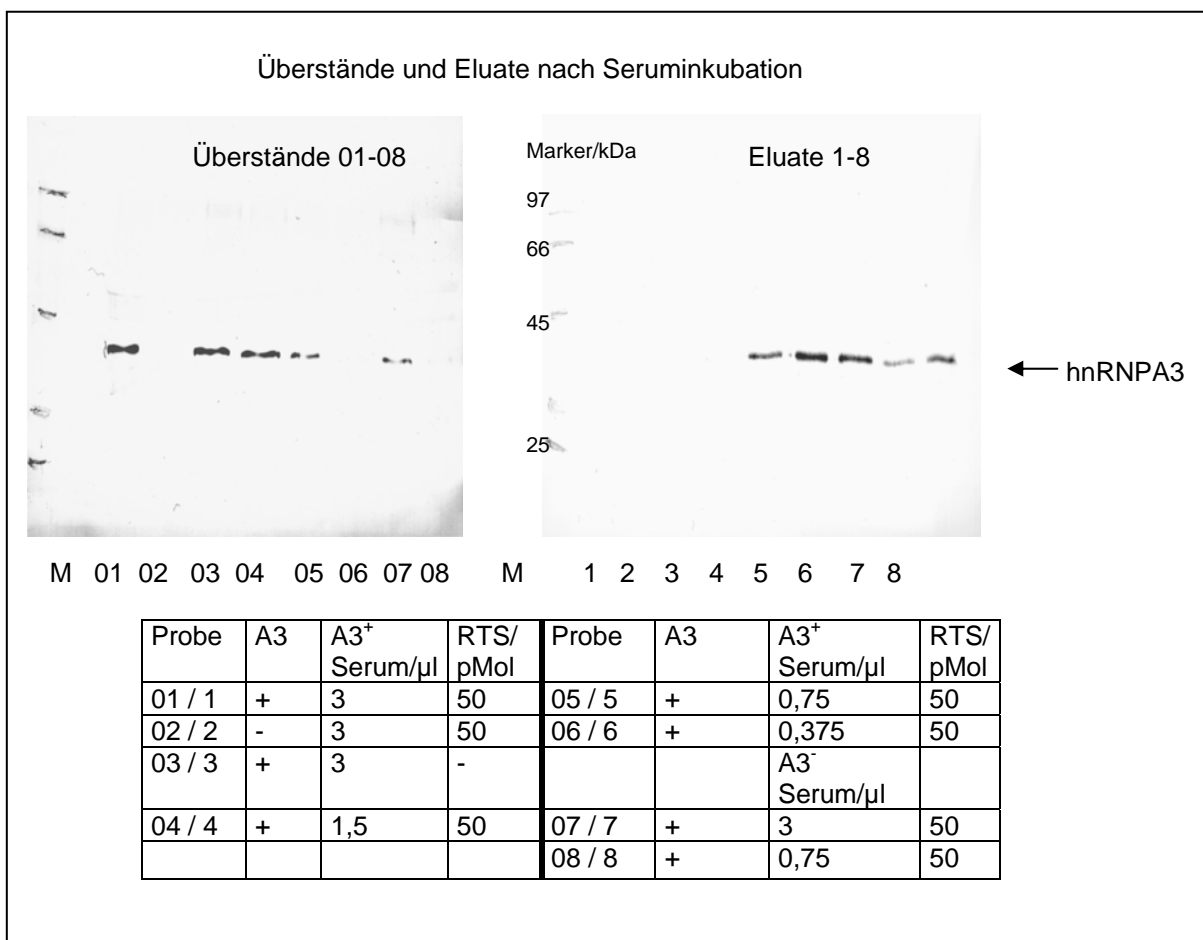


Abb. 20: Immunblot, detektiert mit α -PA3;

A: Überstände nach Inkubation (Proben 01-08); B: Eluate nach Inkubation (Proben 1-8)

Bahnen 01 / 1

Bei der höchsten Menge an eingesetztem Serum befand sich kein A3 im Eluat, die gesamte eingesetzte Menge an A3 war im Überstand. A3 hat nicht an die RNA gebunden.

Bahnen 02 / 2

Bei dieser Kontrolle wurde kein Protein eingesetzt, es ist also auch keine Bande zu erwarten.

Bahnen 03 / 3

Hier erfolgte eine Kontrolle mit A3, jedoch ohne RNA. Die gesamte Menge an A3 war im Überstand, A3 hat nicht an die Platte oder an das Streptavidin gebunden.

Bahnen 04 / 4

Hier wurde die Hälfte der Serummenge von 02 / 2 eingesetzt. Es befand sich zwar noch A3 im Überstand, ein anderer Teil der Proteinmenge hat allerdings an die Platte gebunden und konnte im Eluat detektiert werden.

Bahnen 05 / 5

Nach nochmaligem Halbieren der Serumkonzentration war deutlich weniger A3 im Überstand und deutlich mehr A3 im Eluat detektierbar.

Bahnen 06 / 6

Im Überstand war nach weiterem Verdünnen des Serums kein A3 mehr zu finden, das eingesetzte A3 befand sich nun vollständig im Eluat.

Bahnen 07 / 7

Als Kontrolle wurde ein Serum, das nicht mit A3 reagierte, verwendet. A3 war im Überstand detektierbar, wie auch im Eluat. Verglichen mit der äquivalenten Menge an A3⁺-Serum (Bahnen 01 / 1) befand sich aber mehr A3 im Eluat. Es hat hier also mehr A3 an RNA gebunden.

Bahnen 08 / 8

Auch hier stieg die Bindungsfähigkeit des hnRNPA3 mit abnehmender Serummenge. Insgesamt band mehr A3 an RNA als beim Einsatz mit A3⁺-Serum.

Mit sinkender Menge an Serum stieg die Bindung des hnRNPA3 an die RTS-RNA.

A3 Expression in Synovialgewebe

In folgenden immunhistologischen Färbungen sollte die Expression von A3 in Synovialgeweben von RA- und OA-Patienten, sowie von gesunden Spendern (keine Gelenkerkrankung) überprüft und miteinander verglichen werden. Es handelte sich um Paraffinschnitte, die mit dem α -PA3 angefärbt wurden, der auch bei den übrigen Gewebeschnitten und in diversen Immunoblots verwendet wurde. In den Abbildungen B und C wurde eine Doppelfärbung durchgeführt, braun angefärbt sind Makrophagen. Die Kernfärbungen erfolgten auch hier nach Meyer mit Hämatoxylin.

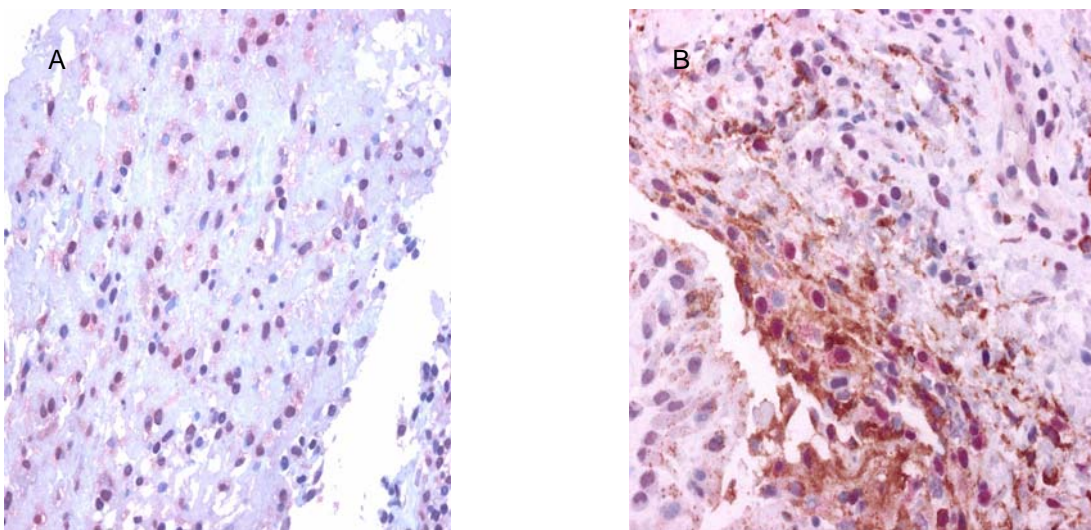


Abb. 21: Immunhistologische Färbungen von Schnitten des Synovialgewebes von RA-Patienten, angefärbt mit α -PA3 (rot) und einem Makrophagenantikörper (rechts) α -CD68 (braun). Zellkerne sind blau gefärbt.

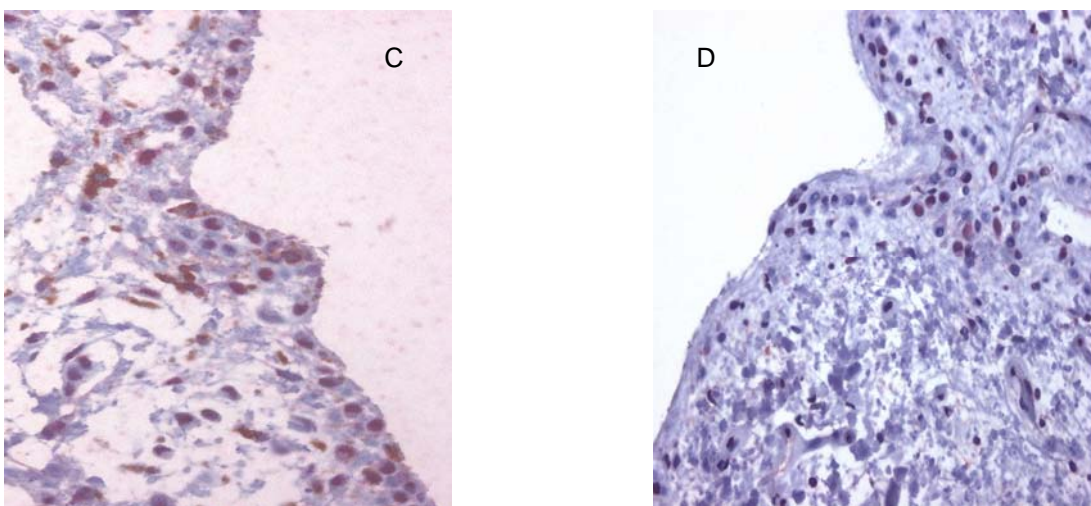
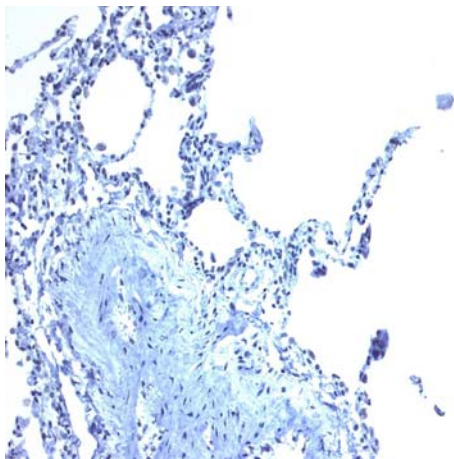


Abb. 22: Immunhistologische Färbungen von Schnitten des Synovialgewebes von einem OA-Patienten (links) und einem gesunden Spender (rechts), angefärbt mit α -PA3 (rot) und einem Makrophagenantikörper α -CD68 (braun) in Bild C. Zellkerne sind blau gefärbt.

A3 ist hier rot (Fuchsin-Farbstoff), Makrophagen braun dargestellt. Auf dem Bild A war deutlich die Anwesenheit von A3 in den Fibrinablagerungen einer entzündlichen Synovialmembran eines RA-Patienten erkennbar. Auf dem Bild B wurde deutlich, dass A3 auch im Kern von Makrophagen exprimiert wird. Auf Bild C ist die Synovialmembran eines OA-Patienten. Auch hier war A3, wenn auch nur in geringem Maße, detektierbar. Auf dem Bild D ist die Synovialmembran eines Gesunden, also nicht an einer Gelenkentzündung erkrankt, mit einer sehr schwachen Expression von A3.

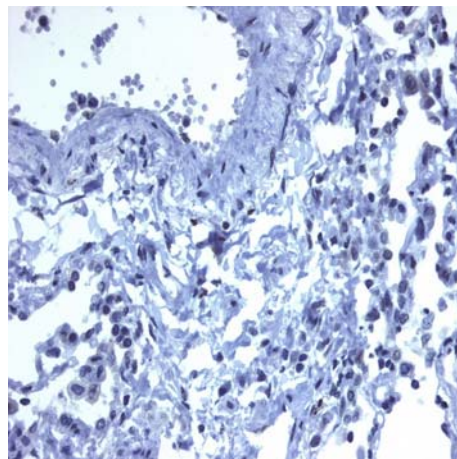
hnRNPA3-Expression in Gewebe von Patienten mit Lungenkrebs

Die immunhistologischen Färbungen erfolgten entsprechend den anderen Gewebefärbungen.

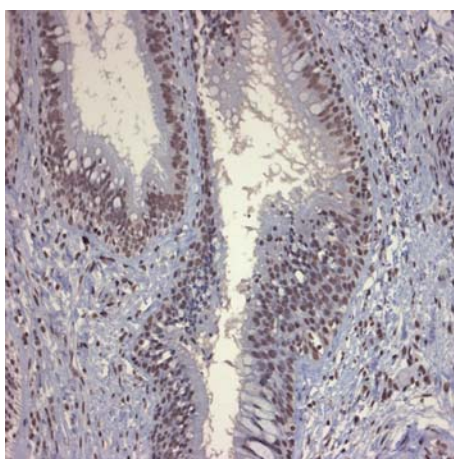


Lunge gesund

1:200

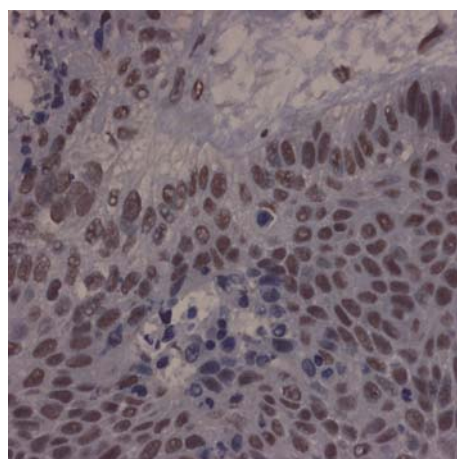


1:400



Lunge SCC

1:200



1:400

Abb 23.: Immunhistologische Färbung von Lungengewebeschnitten mit α -PA3 inkubiert und angefärbt. Oben: Gesunder Spender; unten: Patient mit Lungenkrebs (SCC)

Deutlich zu sehen ist hier, dass es keinerlei A3-Expression im Gewebe der Lunge eines gesunden Spenders gab, während das Gewebe eines Patienten mit Lungenkarzinom eine deutliche Expression von A3, in erster Linie im Kern, zeigte. Nur wenige Zellen wiesen keine Braunfärbung auf. Auffällig war außerdem, dass die Zellkerne größer waren als im gesunden Gewebe.

A3 – Autoreaktivitätsprofil

In verschiedenen Blot- und ELISA-Untersuchungen wurde die Reaktivität von Seren unterschiedlicher Patienten mit Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis, aber auch mit anderen Autoimmunerkrankungen ermittelt. Hierzu wurde rekombinant exprimiertes A3 auf einem SDS-Gel aufgetragen, das Gel auf Nitrocellulose geblottet und mit Seren inkubiert. Für die Untersuchungen im ELISA wurden Maxisorbplatten mit o.g. A3 beschichtet und mit Patientenserum inkubiert. Im Vorversuch wurden die unterschiedlichen Reaktivitäten der beiden Isoformen ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die Variante a bei Patienten mit RA und SLE, nicht jedoch bei Patienten mit anderen Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis wie MCTD und Sklerodermie, eine höhere Reaktivität aufwies als die Variante b. So wurde in folgenden Versuchen die Variante a verwendet.

Reaktivität gegen A3 im Immunoblot

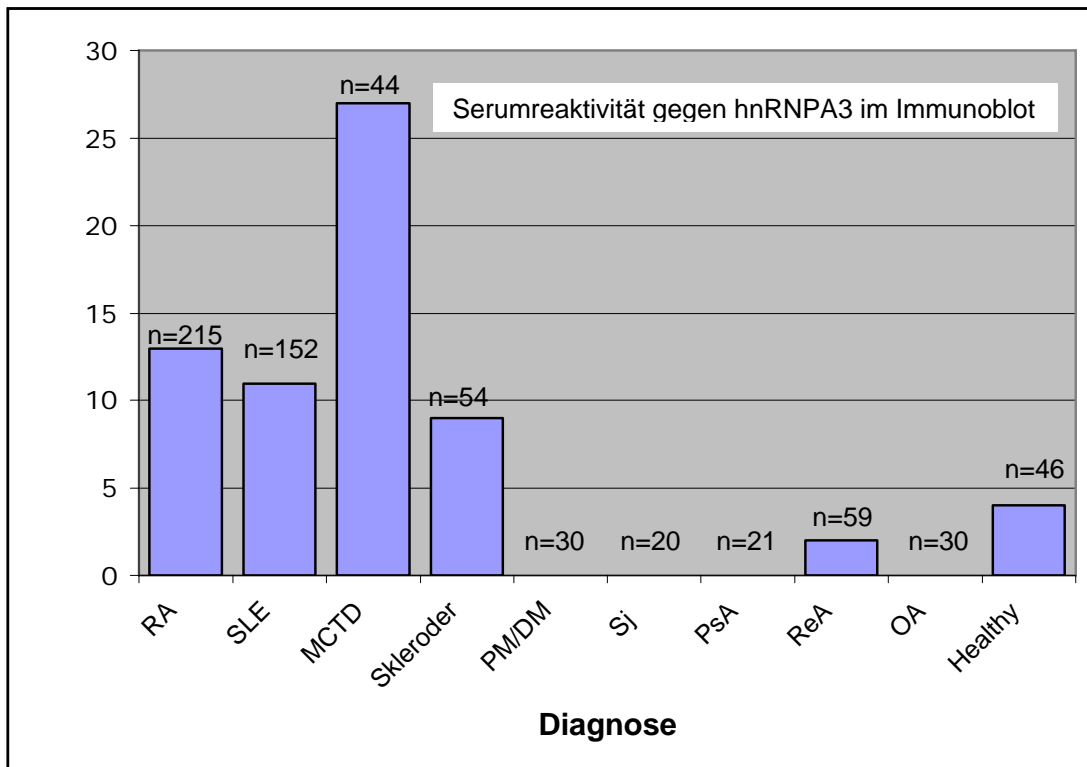


Abb. 24: Reaktivität von Patientenseren mit/ohne systemische rheumatische Erkrankungen auf dem Immunoblot

Die Reaktivitäten verschiedener Erkrankungen gegen hnRNPA3 sind in obigem Diagramm dargestellt. 11% der Patienten mit SLE, 9% der Patienten mit Sklerodermie und lediglich 13% der RA-Patienten reagierten im Immunoblot mit dem Protein. Am stärksten reagierte die Kohorte mit MCTD, hier waren es 27% der Seren. Nur 2% der reaktiven Arthritiden, aber 4% der gesunden Kontrollen waren positiv. Es konnten jedoch keine Seren mit PM/DM, Sjögren`Syndrom und Osteoarthritis gefunden werden, die mit A3 reaktiv gewesen wären.

Reaktivität gegen A3 im ELISA

Weitere Patienten wurden im ELISA mit der Variante a des hnRNPA3 als Antigen getestet. Hierzu wurden Maxisorbplatten der Firma NUNC mit hnRNPA3 beschichtet. Die Proteinkonzentration lag bei ca. 10 µg/ml.

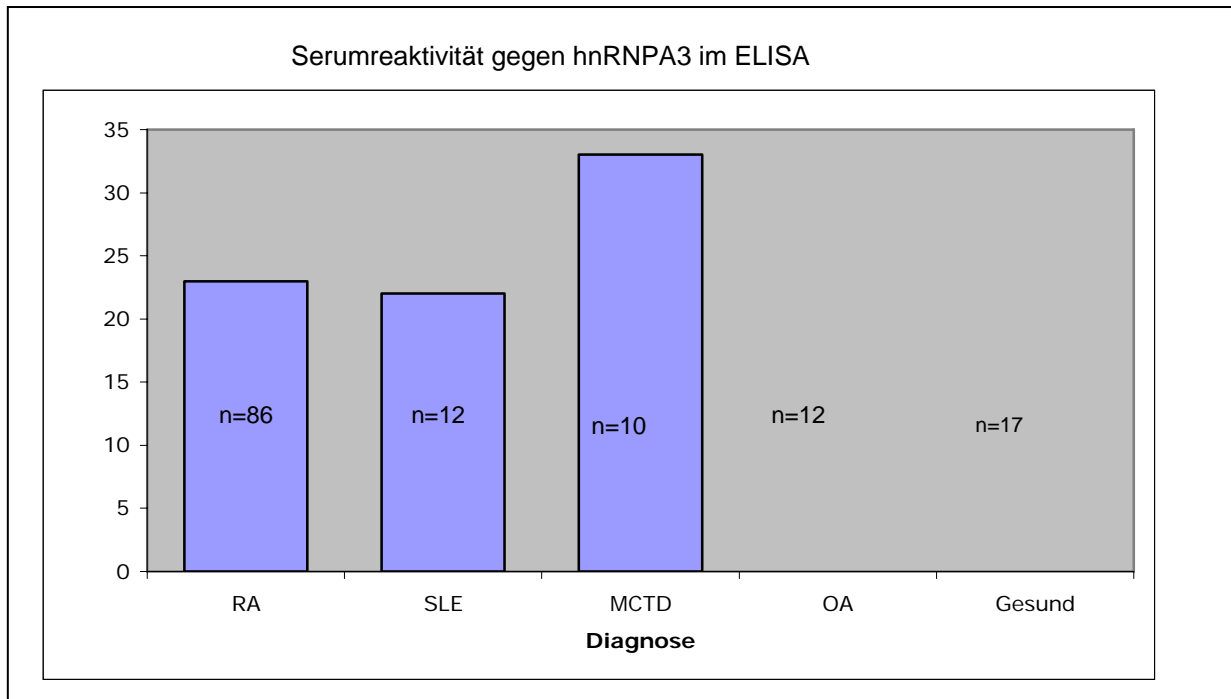


Abb. 25: Reaktivität von Patientenseren mit hnRNPA3 im ELISA.

Im ELISA reagierten noch ca. 22% der RA-Seren, 21% der SLE-Seren und 32% der MCTD-Seren mit hnRNPA3. Es reagierten keine gesunden Probanden und keine Patienten mit Osteoarthritis. Insgesamt war die Reaktivität gegenüber den Blutversuchen höher bei Patienten mit RA und SLE und MCTD-Patienten. Es müssen hier allerdings noch größere Patientenkohorten untersucht werden.

Unter den getesteten RA-Patienten befanden sich auch erosive Formen. Diese sollten hier noch einmal gesondert betrachtet werden.

Vergleich der Reaktivitäten erosiver RA-Seren gegen A3 im Blot und im ELISA

Hier wurden erosive und non-erosive RA-Patienten auf dem Immunoblot sowie auf einem ELISA gegen A3 getestet und die Ergebnisse miteinander verglichen.

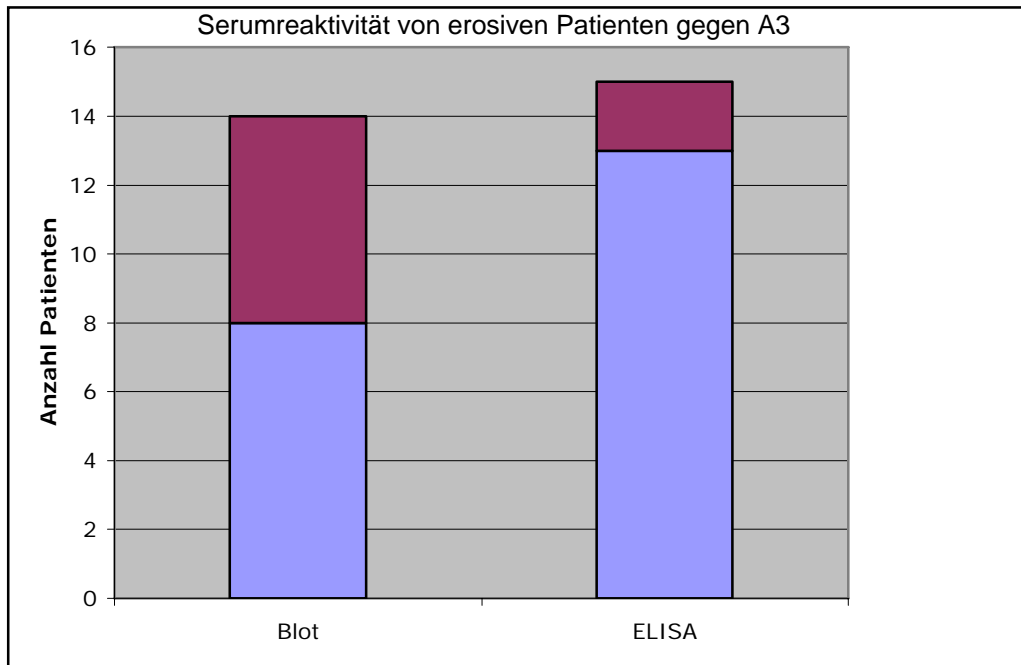


Abb. 26: Sensitivität von erosiven RA-Seren mit A3 im Blot und im ELISA.

Unter 14 erosiven RA-Seren waren im Blot nur sechs, die nicht mit A3 reagierten und acht, die mit A3 reagierten. So haben wir im Blot eine Sensitivität für erosive RA von 57%. Beim ELISA wird dieses Ergebnis noch übertroffen, von 15 Seren mit erosiven Verläufen, reagierten 13 positiv, das bedeutet 87% Sensitivität.

Serum-Reaktivität gegen BiP aus HeLa-Zellen im Immunoblot

Auf einem SDS-Gel wurde HeLa-Proteinextrakt aufgetragen, die Banden, in denen BiP detektiert werden konnte, wurden ausgeschnitten und erneut auf ein Gel (Gradientengel) aufgetragen. Die Proteine dieses Gels wurden dann im Anschluss auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, diese in Streifen geschnitten und die einzelnen Streifen mit Serum von Patienten und gesunden Kontrollen inkubiert.

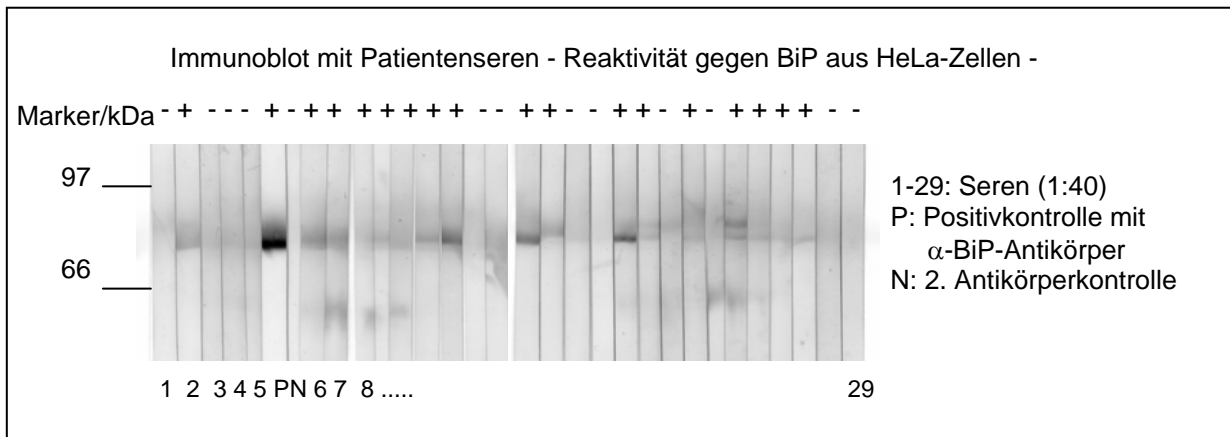


Abb. 27: Immunoblot mit Patientenseren (1:40) und mit α -BiP-Antikörper; detektiert mit Alkalischer Phosphatase und BCIP/NBT als Substrat.

Tabelle 5: Reaktivität von Patientenseren mit BiP (HeLa)

Diagnose	Anzahl (n)	Reaktivität (%)
RA	148	64
KGL	63	48
SPO	30	23
SONSTIGE	33	42
Gesund	5	20

Im Immunoblot waren knapp zwei Drittel der RA-Patienten, ca. die Hälfte der Kollagenose-Patienten und ein knappes Viertel der Spondylarthropathien reaktiv mit BiP aus HeLa-Lysaten. Eine unter „Sonstige“ zusammengefasste Gruppe an Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis reagierte zu 42% mit dem Protein. Allerdings reagierte auch einer von fünf gesunden Kontrollen positiv.

Reaktivität gegen rekombinant exprimiertes, humanes BiP

Um die mühsame Aufarbeitung des Proteins aus HeLa-Zellextrakten zu ersparen, wurde BiP rekombinant in E.coli kloniert und exprimiert und für weitere Immunoblots verwendet. BiP wurde mit einem His-Tag versehen und über NiNTA-Säulen aufgereinigt. Die Immunoblots wurden ebenso wie die mit dem humanen BiP aus HeLa-Zellen durchgeführt.

Tabelle 6 : Serum-Reaktivität mit rekombinantem BiP

Patienten/ Diagnose	Anzahl (n) Patienten	BiP rekombinant %
RA	30	20
Frühe RA	17	6
OA	22	36
ReA	9	22
SLE	12	17
Gesund	10	0

Der Einsatz von rekombinant exprimiertem BiP hatte einen erheblichen Verlust (mehr als 40%) der Reaktivität der Seren zur Folge, wie der oben abgebildeten Tabelle zu entnehmen ist. Der Einsatz von nativem BiP aus Kaninchenleber, das weit gehend homolog ist zum humanen Protein, zeigte eine Sensitivität von rund 30% bei RA-Patienten. Es handelt sich also um eine Abnahme der Reaktivität von 34% gegenüber dem humanen („nativen“) BiP.

Serumreaktivität gegen rekombinant exprimiertes humanes BiP im ELISA

Parallel zu den Immunoblots wurden noch zahlreiche Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis wie auch Seren von Patienten mit anderen Erkrankungen, zusammengefasst unter „Sonstige“, im ELISA auf ihre Reaktivität gegen humanes, jedoch rekombinant hergestelltes BiP getestet. BiP wurde in einer Konzentration von 30µg/ml eingesetzt und die Kavitäten der Maxisorbplatten wurden mit 100µl dieser Lösung beschickt. Die Proteinbestimmung

erfolgte nach der Bradford-Methode. Nach langwierigen Vorversuchen erwies sich eine Serenverdünnung von 1:100 als günstig.

Als positiv wurden Seren gewertet, deren Extinktion im ELISA 2,5fach höher lag als der Durchschnitt der gesunden Kontrollgruppen, wobei Ausreißer unter den gesunden Kontrollen nicht mit in die Ermittlung des Durchschnittswertes eingegangen sind.

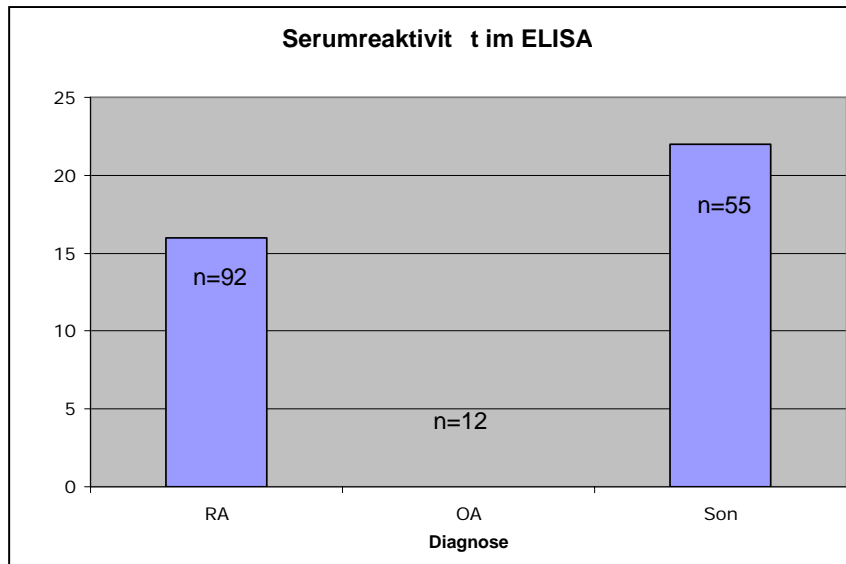


Abb. 28: Sensitivität von Patientenserum mit BiP als Antigen im ELISA.

Von knapp einhundert RA-Patienten, RF-positive wie auch RF-negative, reagierten lediglich 14 Seren mit BiP. Das bedeutet 16% waren BiP-positiv, während aus der Gruppe „Sonstige“ 12 Seren, also 22%, an das Protein gebunden haben. Von den 12 Osteoarthrose-Seren war keines reaktiv mit BiP. Es gab keine Unterschiede zwischen RF-positiven und RF-negativen Patienten. Antikörper gegen RF korrelierten also nicht mit Antikörpern gegen BiP. Da nur zwei von elf erosiven RA-Patienten mit BiP reagierten, gibt es auch hier keinen Zusammenhang. Allerdings haben drei von insgesamt sechs Psoriasis-Patienten mit BiP reagiert. Die Reaktivität gegen BiP im ELISA ist gegenüber der Reaktivität im Blot nochmals um 4% gesunken.

Epitopmapping der Serumantikörperbindungsstelle

Hierzu wurden Fragmente des Proteins rekombinant (mit His-TAG versehen) hergestellt, über NiNTA-Säulen gereinigt, auf 10% SDS-Gele aufgetragen und auf Nitrocellulose geblottet. Mittels Sequenzierung wurde sichergestellt, dass es sich

tatsächlich um die richtigen Fragmente handelte. Der verwendete Sekundärantikörper (α -Maus) hat an keines der Fragmente gebunden.

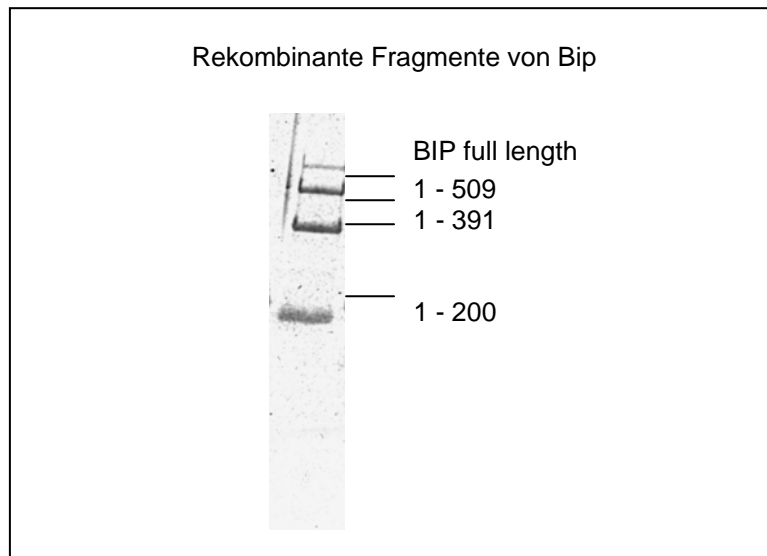


Abb. 29: Rekombinant exprimierte Fragmente von BiP auf Nitrocellulose geblottet.

Mit den oben abgebildeten Fragmenten wurden BiP-positive Seren inkubiert, um das Epitop der Autoantikörper eingrenzen zu können.

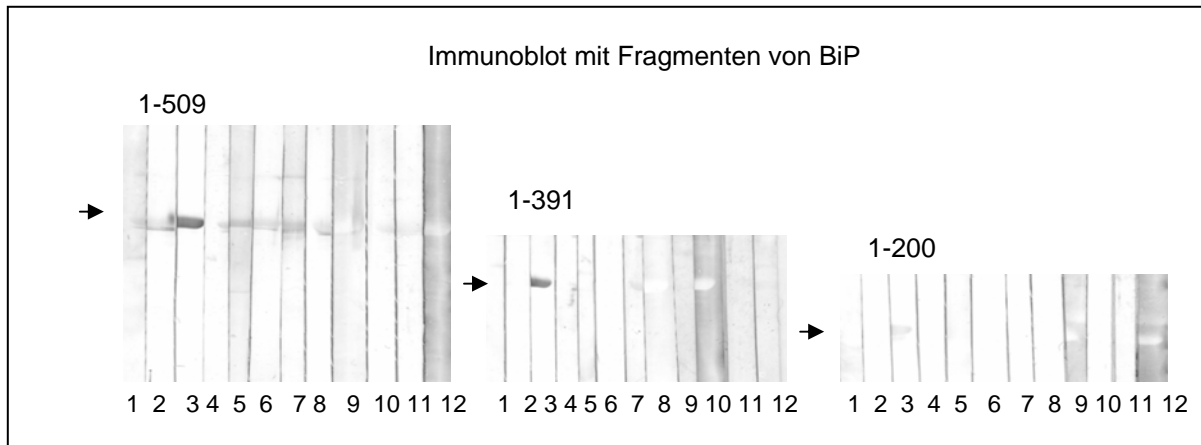


Abb. 30: Immunoblot mit Fragmenten von BiP, inkubiert mit Patientenserum und gesunden Kontrollen (1:40). Die Detektion erfolgte mit Alkalischer Phosphatase und BCIP/NBT als Substrat.

Es zeigte sich, dass alle Patienten, die mit BiP reaktiv waren, auch mit dem Fragment 1-509 reagierten, während nur noch zwei Seren das Fragment 1-391 gebunden haben. Ein einziger Patient reagierte schwach mit dem Fragment 1-200. Dieser Patient reagierte aber auch besonders stark mit BiP und den anderen beiden Fragmenten. Die gesunden Kontrollen, bei denen es sich um Kollegen aus dem Labor handelte, die nicht mit BiP reaktiv waren, haben auch keines der Fragmente gebunden.

Tabelle 7: Reaktivität von RA-Patienten und gesunden Kontrollen mit rekombinant exprimierten Fragmenten von BiP.

Serum	BiPrek.	Fragment 1-509	Fragment 1-391	Fragment 1-200
RA-Patienten				
1	++	+	-	-
2	0	+	-	-
3	++	++	++	+
4	+	+	-	-
5	+	++	-	-
6	0	++	-	-
7	0	+	+	-
8	+	+	-	-
gesunde Kontrollen				
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	0	-	-	-
12	0	-	-	-

Es wurde eine Vielzahl weiterer Patienten mit den Fragmenten im Immunoblot getestet und die oben dargestellten Ergebnisse konnten bestätigt werden. Wobei die Epitope sich bei Seren mit anderen Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis nicht von den Epitopen, die RA-Patienten erkannten, unterscheiden haben.

Weitere Versuche mit Patientenserum zeigten, dass das Fragment 1-509 mitunter reaktiver war als BiP selbst. Einige Patienten reagierten ausschließlich mit dem Fragment 1-509 und nicht mit BiP.

Tabelle 8 : Serum-Reaktivität mit rekombinatem BiP und dem Fragment 1-509

Patienten/ Diagnose	Anzahl (n) Patienten	BiP rekombinant %	Fragment 1- 509 %
RA	30	20	37
Frühe RA	17	6	--
OA	22	36	54
ReA	9	22	55
SLE	12	17	25
Gesund	10	0	0

In der Tabelle wird deutlich, dass ein größerer Anteil an Seren mit dem Fragment 1-509 interagiert als mit dem rekombinant hergestellten, humanen BiP. Unten abgebildet ist die Sequenz des Fragments 1-509.

Homologie zwischen BiP und hsc71 (hsp7C)

Aufgrund der Tatsache, dass das Fragment 1-509 reaktiver war als das gesamte Protein, wurden Sequenzhomologien in Datenbanken (Expasy, NCBI) gesucht. Große Homologien gab es beispielsweise zum hsp7C. Unten dargestellt sind die Bereiche, in denen bis zu 71% Sequenzhomologien in 485 Residuen zu finden waren.

Homologievergleich BiP (Fragment 1-509) und hsp7C	
1-509	28 GTVVGIDLGTTYSCVGVFKNGRVEIIANDQGNRITPSYVAFTPEGERLIGDAAKNQLTSN
Hsp7C	4 GPAVGIDLGTTYSCVGVFQHKGVEIIANDQGNRTTTPSYVAFT-DTERLIGDAAKNQVAMN
	* ***** * ***** * ***** * ***** *
	88 PENTVFDAKRLIGRTWNDPSVQQDIKFLPFKVVKKTKPYIQVDIGGGQTKTFAPPEEISA
	63 PTNTVFDAKRLIGRRFDDAVVQSDMKHWPFMVVNDAGRPKVQVEYKG-ETKSFYPEEVSS
	* ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
	148 MVLTKMKETAAYLGGKVTAVVTVPAYFNDAQRQATKDAGTIAGLNVMRI INEPTAAAI
	122 MVLTKMKEIAEAYLGKTVTNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNVLRI INEPTAAAI
	***** ***** * * ***** ***** ***** ***** *****
	208 AYGLDKREG-EKNILVFDLGGGTFDVSLLTIDNGVFEVVATNGDTHLGGEDFDQVRMEHF
	182 AYGLDKKVGAEARNVLI FDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHF
	***** * * * * * ***** * * * * * * ***** * * * *
	267 IKLYKKKTGKDVRKDNRAVQKLRREVEKAKRALSSQHQARIEIESFYEGEDFSETLTRAK
	242 IAEFKRKHKKDISENKRAVRLRTACERAKRTLSSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITRAR
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
	327 FEELNMDLFRSTMKPVQKVLSDLDKSDIDEIVLVGGSTRIPKIQQLVKEFFNGKEPSR
	302 FEELNADLFRGTLDPVEKALRDAKLDKSIHDIIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFFNGKELNK
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
	387 GINPDEAVAYGAAVQAGVLSGD--QDTGDLVLLDVCPLTLGIETVGGVMTKLI PRNTVVP
	362 SINPDEAVAYGAAVQAAI LSGDKSENVQDLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIKRNTTIP
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
	445 TKKSQIFSTASDNQPTVTIKVYEGERPLTKDNHLLGTFDLTGIPPAPRGVPQIEVTFEID
	422 TKQTQFTTYSNQPGLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPAPRGVPQIEVTFDID
	** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
	505 VNGIL
	482 ANGIL

Abb. 31: Aminosäuresequenz des BiP-Fragments 1-509 und des hsp7C

Kreuzreaktivitäten von Seren zwischen diesen Hitzeschockproteinen sind also durchaus anzunehmen. Weitere, nicht unerhebliche Sequenzhomologien teilen das Heat shock 70kDa Protein 8, hsp72 Heat shock related 70kDa protein 2 und einige mehr.

Serumreaktivität gegen citrulliniertes und nicht-citrulliniertes BiP

Da Antikörper gegen citrullinierte Proteine bzw. Peptide symptomatisch für die RA sind, wurde in diesem Versuch rekombinantes, humanes BiP mit dem Enzym Peptidyl-Arginin-Deiminase deiminiert (citrulliniert). Im Immunoblot wurde anschließend getestet, ob sich durch diese Modifizierung die Reaktivität der Seren gegen BiP ändert.

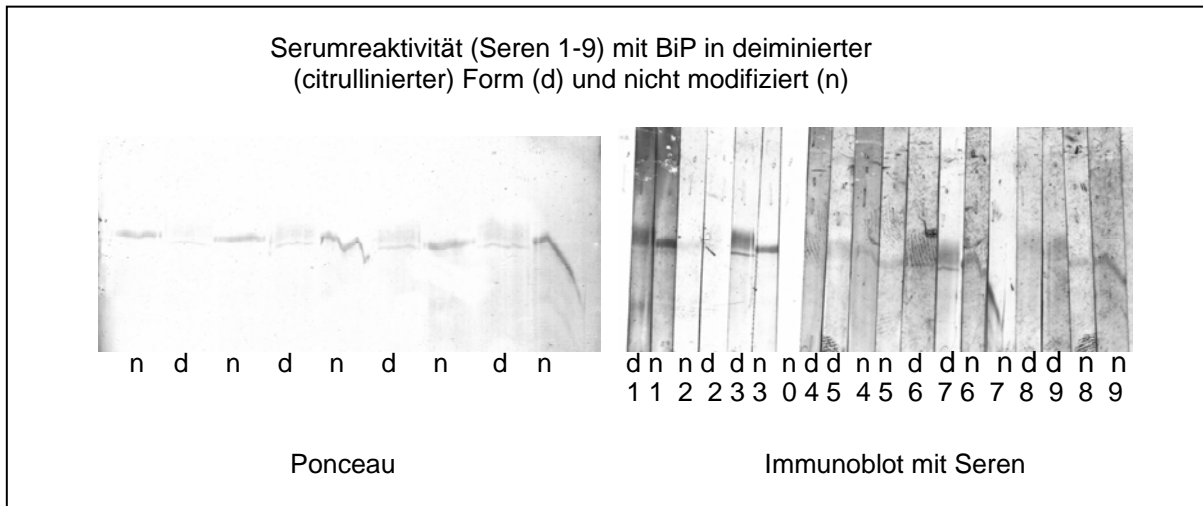


Abb. 32: Blot und Immunoblot mit BiP, das mit Peptidyl-Arginin-Deiminase deiminiert wurde und mit nicht-modifiziertem BiP. Inkubation mit Patientenserum.

Tabelle 8: Ergebnisse des Immunblots mit deiminiertem (d) und nicht-deiminiertem (n) BiP.

Patientennr.:	BiP-Reaktivität	d	n
1	+	+	+
2	+	-	-
3	+	+	+
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	+	+
7	+	+	+
8	-	+/-	+
9	+	+/-	+

Die Reaktivität der Seren gegenüber BiP wurde durch die Citrullinierung nicht erhöht. Es wurden entweder beide Formen vom Serum erkannt oder beide nicht. Grenzwertig verhält es sich mit den Seren 8 und 9; eine Auswertung ist hier schwierig, da die Bande

der citrullinierten Form nicht klar, sondern schwach und verschwommen ist im Vergleich zur nicht-citrullinierten Form. Der Erfolg der Citrullinierung wurde mit dem Anti-Citrulline-(modified)-Detektion Kit der Firma Upstate nachgewiesen.

Detektion anderer hsps mit BiP-reaktivem Serum

Aus einem HeLa-Zellysat wurde die Proteinfraction isoliert, 2D-gelelektrophoretisch mit einem pH-Gradienten von 4 - 6,5 aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulose gebロットet. BiP-reaktive Seren (HeLa) wurden auf diesem Blot inkubiert, um BiP und seine möglichen, reaktiven Isoformen sichtbar zu machen.

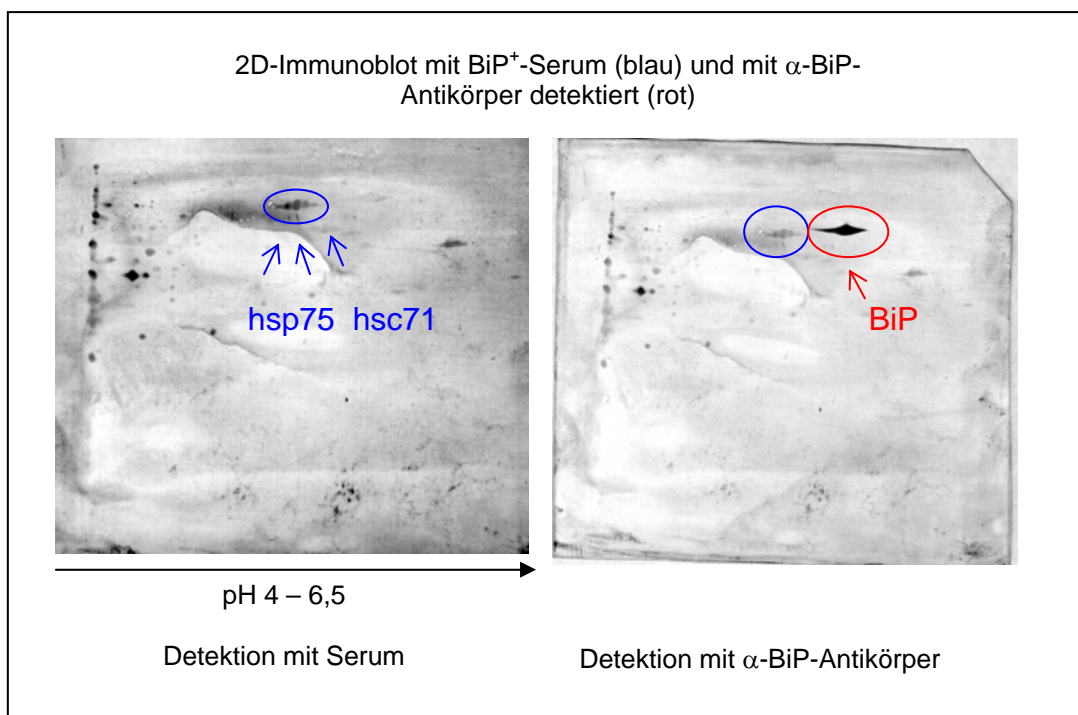


Abb. 33: 2D-Immunoblot mit HeLa-Gesamtprotein; inkubiert mit einem BiP⁺-Serum (links) und anschließend mit α -BiP-Antikörper (rechts).

Das als BiP-reaktiv beschriebene Serum reagierte im 2D-Immunoblot mit Proteinen, die sich im ungefähren IP-Bereich von BiP befanden und ein ähnliches Molekulargewicht aufwiesen. Nach einer zweiten Detektion des Blots mit einem monoklonalen Maus anti-BiP-Antikörper zeigte sich jedoch, dass sich BiP knapp neben den vom Serum detektierten Spots befand. Die vom Serum detektierten Spots wurden massenspektrometrisch analysiert und mittels Mascot-Search analysiert. Es zeigte sich, dass es sich hierbei um zwei Isoformen von hsp75 und um das hsc71 handelte. Das heißt, dass die Seren tatsächlich gar nicht mit BiP-reaktiv waren, sondern mit anderen hsps interagiert haben.