

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

DISSERTATION

**„Genexpression der katalytischen Untereinheiten des  
Proteasoms in unterschiedlichen Zellpopulationen des  
Immunsystems beim Sjögren-Syndrom“**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Karsten Lesemann

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. E. Feist

2. Prof. Dr. med. U. Pleyer

3. Prof. Dr. med. univ. M. Aringer

Datum der Promotion: 03. September 2010

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1 Sjögren-Syndrom	7
1.1.1 Pathogenese des Sjögren-Syndroms	8
1.1.2 Klinische Manifestation des Sjögren-Syndroms	10
1.1.3 Klassifikationskriterien des Sjögren-Syndroms	11
1.1.4 Therapie des Sjögren-Syndroms	13
1.2 Das 20S bzw. 26S Proteasom	14
2. Fragestellung	18
3. Patienten, Materialien und Methoden	20
3.1 Patienten und Kontrollen	20
3.2 Blutentnahme	23
3.3 Isolation der zellulären Untereinheiten des Blutes	23
3.3.1 Isolation der mononukleären Zellen aus peripherem Blut	23
3.3.2 Isolation von T- und B- Lymphozyten sowie von Monozyten mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung	25
3.3.3 Isolation der dendritischen Zellen mittels magnetaktivierter Zellsortierung	27
3.4 Gewinnung der RNA	30
3.5 Umschreibung der RNA zu komplementärer DNA	32
3.6 Ansatz und Durchführung der Real-Time PCR	33
3.6.1 Primer Design und Effizienzprüfung	35
3.6.2 Analyse der Daten der Real-Time PCR	38
3.7 Statistik	39
4. Ergebnisse	40
4.1 Ergebnis der Zellisolation aus dem Blut aller Probanden	40
4.2 Ermittlung der Primereffizienz	41
4.3 Ergebnisse der Real-Time PCR	43
4.4 Relative Genexpression der Untereinheiten des Proteasoms	44
4.4.1 Relative Genexpression der konstitutiven Untereinheit $\alpha 3$ (C9) in der Kontrollgruppe	44

4.4.2	Relative Genexpression der konstitutiven Untereinheit $\alpha 3$ (C9) im Patientenkollektiv	45
4.4.3	Vergleich der Genexpression der konstitutiven Untereinheit $\alpha 3$ (C9) zwischen dem Patientenkollektiv und der Kontrollgruppe	46
4.4.4	Relative Genexpression der konstitutiven, katalytischen Unterein- heiten $\beta 1$ (delta), $\beta 2$ (Z) und $\beta 5$ (MB1) in der Kontrollgruppe	47
4.4.5	Relative Genexpression der konstitutiven, katalytischen Unterein- heiten $\beta 1$ (delta), $\beta 2$ (Z) und $\beta 5$ (MB1) im Patientenkollektiv	49
4.4.6	Vergleich der relativen Genexpression der konstitutiven Unterein- heiten $\beta 1$ (delta), $\beta 2$ (Z) und $\beta 5$ (MB1) zwischen dem Patienten- kollektiv und der Kontrollgruppe	51
4.4.7	Relative Genexpression der induzierbaren Untereinheiten $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (MECL1) und $\beta 5i$ (LMP7) in der Kontrollgruppe	53
4.4.8	Relative Genexpression der induzierbaren Untereinheiten $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (MECL1) und $\beta 5i$ (LMP7) im Patientenkollektiv	55
4.4.9	Vergleich der relativen Genexpression der induzierbaren Untereinheiten $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (MECL1) und $\beta 5i$ (LMP7) zwischen dem Patientenkollektiv und der Kontrollgruppe	57
4.5	Mittelwerte, Standardabweichungen und Mediane der Real-Time PCR-Ergebnisse	59
5.	Diskussion	63
6.	Zusammenfassung	68
7.	Referenzen	70
	Erklärung	78
	Danksagung	79
	Lebenslauf	80

## Abkürzungsverzeichnis

Acc.-Nr.	Accession number
AIDS	Acquired Immunodeficient Syndrom
ANA	Antinukleäre Antikörper
APC	Allophycocyanin
BSA	Bovine Serum Albumine, Albumin aus Rinderserum
CCL	Chemokin Ligand
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CTLA	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DC	Dendritic Cells, dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonucleinacid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
FACS	Fluoreszenz Activated Cellsorting, fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanate
FSC	Forward Scatter
HLA	Human Leukocyte Antigen, humanes Leukozyten-Antigen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LMP	Large Molecular Weight Proteasome
MACS	Magnet Activated Cell Sorting, magnetaktivierte Zellsortierung
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
MECL	Multicatalytic Endopeptidase Complex-Like
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika

PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat Buffered Saline Solution
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pSS / sSS	primäres und sekundäres Sjögren-Syndrom
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
RNA/mRNA	Ribonukleinacid/messenger Ribonukleinacid
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SS-A/Ro	Sjögren-Syndrom A / Robert-Antigen (Patientenname)
SS-B/La	Sjögren-Syndrom B / Lane-Antigen (Patientenname)
SSC	Side Scatter
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> -Polymerase
TNF	Tumornekrosefaktor
2-ME	2-Mercaptoethanol

# 1. Einleitung

## 1.1 Sjögren-Syndrom

Das Sjögren-Syndrom ist eine chronisch verlaufende, autoimmune Systemerkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis der Kollagenosen und gehört zu den drei häufigsten systemischen Autoimmunerkrankungen [1, 2]. Die Hauptsymptome sind Keratokonjunktivitis sicca (Bindehautentzündung) und Xerostomie (Mundtrockenheit). Darüber hinaus kommt es regelmäßig zu systemischen Manifestationen mit Beteiligung innerer Organe sowie des muskuloskelettalen Systems.

Man unterscheidet das primäre Sjögren-Syndrom vom sekundären Sjögren-Syndrom. Die primäre Form liegt zumeist als isolierte Erkrankung vor. Das sekundäre Sjögren-Syndrom tritt in Verbindung mit anderen Autoimmunerkrankungen, wie systemischem Lupus erythematodes (SLE), systemischer Sklerose oder rheumatoider Arthritis auf [1, 3, 4]. Die Prävalenz des primären Sjögren-Syndroms liegt weltweit bei 0,5 bis 1,0 Prozent. Außerdem leiden darüber hinaus etwa 30% der Patienten mit einer anderen entzündlich-rheumatischen Erkrankung am sekundären Sjögren-Syndrom. Wie die Verteilung zwischen diesen beiden Formen der Erkrankung aussieht, wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben. Die Prozentangaben für den Anteil des sekundären Sjögren-Syndroms reichen von 10% [5] bis zu 60% [3]. Als charakteristische Organmanifestation beim Sjögren-Syndrom kommt es vor allem zu einer Beteiligung und Zerstörung der exokrinen Drüsen. Hiervon sind im Besonderen die Tränendrüsen und Speicheldrüsen betroffen, wodurch die Hauptsymptome der Erkrankung, die Xerostomie (Mundtrockenheit) und die Keratokonjunktivitis sicca (Bindehautentzündung), bedingt sind. Etwa ein Drittel der Patienten leidet unter systemischen Manifestationen [6]. Da Sicca-Symptome jedoch auch bei einer Vielzahl von anderen Erkrankungen auftreten können, ist die Differentialdiagnostik des Sjögren-Syndroms komplex [3, 7].

Für das Sjögren-Syndrom wird eine bestimmte genetische Prädisposition im Zusammenhang mit dem HLA DR2 und DR3 Genotyp angenommen [5]. Von der Krankheit sind überwiegend Frauen betroffen. Das Verhältnis von betroffenen Frauen zu betroffenen Männern liegt bei 9:1 [1, 3, 5, 6]. Es gibt zwei große Manifestationsgipfel, die zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr sowie nach der Menopause zwischen dem 50.

und 60. Lebensjahr liegen. Das Sjögren-Syndrom kann aber in allen Altersgruppen auftreten, so auch bei Kindern und Jugendlichen [1, 6, 8].

Im Abschnitt 1.1.1 werden nun zunächst die bisher bekannten Fakten der Pathogenese des Sjögren-Syndroms dargelegt. In den folgenden Abschnitten werden dann die klinischen Manifestationen (1.1.2), die Diagnosestellung (1.1.3) und die heutige Therapie (1.1.4) des Sjögren-Syndroms beschrieben.

### **1.1.1 Pathogenese des Sjögren-Syndroms**

Die Pathogenese des Sjögren-Syndroms ist bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt. Daher ist nur eine eher deskriptive Darlegung der pathologischen Veränderungen beim Sjögren-Syndrom möglich. Es scheint aber, dass die Erkrankung und ihre Ausprägung von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst werden, welche hier näher beleuchtet werden sollen. Durch histologische Untersuchungen konnten wichtige Erkenntnisse zu der Infiltration des Gewebes durch immunologische Zellen und die inflammatorische Situation in den betroffenen Drüsen gewonnen werden.

Charakteristisch für das Sjögren-Syndrom ist eine lokale Infiltration des Zielgewebes durch hauptsächlich B- und T-Zellen sowie durch Makrophagen und dendritische Zellen. Von den T-Zellen, die sich in  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -Zellen aufteilen lassen, sind hier die  $CD4^+$ -Zellen wesentlich stärker beteiligt als die  $CD8^+$ -Zellen [9]. 20% der infiltrierenden Zellen sind jedoch B-Zellen [10]. Die starke Aktivierung von B-Zellen, getriggert über  $CD4^+$  T-Helferzellen, geht mit einer Hypergammaglobulinämie und einer Produktion von Autoantikörpern einher [1, 3, 6]. Diese Antikörper teilen sich in organspezifische Antikörper sowie in nicht organspezifische Antikörper auf. Die organspezifischen Antikörper sind hauptsächlich gegen die Ausführungsgänge der Speichel- und Tränen-drüsen gerichtet und in geringerem Umfang auch gegen andere exokrine Drüsen wie die Magenschleimhaut oder das Pankreas. Die nicht organspezifischen Antikörper beinhalten den Rheumafaktor (RF) vom IgM-Typ sowie Antinukleäre Antikörper (ANA), die charakteristischerweise in Antikörper gegen die RNA-Protein-Komplexe SS-A/Ro und SS-B/La differenziert werden können [1, 3, 6, 11].



Die genaue Ursache, die zu dieser Gewebsinfiltration führt, ist noch ungeklärt. Als mögliches auslösendes Ereignis wird eine Infektion diskutiert, wobei nicht klar ist, ob diese viral oder bakteriell bedingt ist [1, 3, 5, 6]. Im Zuge dieses pathologischen Auslösers kommt es dann zu einer lokalen Entzündungsreaktion, die durch die oben beschriebene Infiltration und eine verstärkte Zytokinexpression gekennzeichnet ist.

Bei diesem erhöhtem Zytokinorkommen handelt es sich um eine bis zu 40-fach stärkere Produktion an Boten-RNA (mRNA) von Interleukin (IL)-2, Interferon (IFN)- $\gamma$  und IL-10 in den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen der Speicheldrüsen von Patienten im Vergleich zu peripheren CD4<sup>+</sup>-T-Zellen oder zum Speicheldrüsengewebe von Gesunden. Eine wahrscheinliche Ursache hierfür ist die Präsentation von bestimmten Antigenen über MHC-I Moleküle an der Oberfläche von epithelialen Zellen der Ausführungsgänge [3]. Darüber hinaus konnte in diesen Zellen bei Patienten eine Induktion der mRNA von IL-1 $\alpha$ , IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  nachgewiesen werden. Und ebenso waren die Chemokin Liganden (CCL) CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) und CCL5 (RANTES) im Speicheldrüsengewebe von Patienten signifikant erhöht, was wiederum zu einer verstärkten Einwanderung von Lymphozyten in das Gewebe führt. Diese Erhöhung der CCL konnte insbesondere in den Gangepithelien und vereinzelt in den Azini nachgewiesen werden [12, 13]. Im Speichel der Betroffenen fanden sich ebenfalls erhöhte Werte von IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  [14].

Das Fas/Fas-Ligand (FasL)-System, welches im Zusammenhang mit der Apoptose von Zellen steht, spielt ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese des Sjögren-Syndroms. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA von Fas, FasL, CTLA-4 und PD-1 im Gewebe der Speicheldrüsen von Patienten signifikant erhöht ist [15], was wiederum eine Folge der lokalen Entzündungsreaktion ist, da die Expression von Fas und FasL durch IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  stimuliert wird [16].

Wie man den oben beschriebenen Ergebnissen früherer Arbeiten entnehmen kann, kommt es beim Sjögren-Syndrom, infolge eines pathologischen Ereignisses zu einer starken lokalen Immunantwort des Gewebes. Als wichtiger und früher Schritt dieser Immunantwort ist die Prozessierung und Präsentation von spezifischen Antigenen auf der Zelloberfläche von Epithelzellen der Drüsengänge über die MHC-I Moleküle zu sehen.

Hierdurch wird die Immunantwort getriggert und verstärkt. Daher beschäftigt sich diese Arbeit mit dem für die Präsentation so wichtigen Zellbestandteil, dem Proteasom, welches im Abschnitt 1.2 „Das 20S bzw. 26S Proteasom“ näher vorgestellt wird.

### **1.1.2 Klinische Manifestation des Sjögren-Syndroms**

Die ersten Symptome des Sjögren-Syndroms sind zumeist unspezifisch, wobei unter anderem Müdigkeit, Myalgien, Arthralgien und Raynaud-Symptomatik beschrieben werden. Die Leitsymptome des Sjögren-Syndroms wie Xerostomie und Keratokonjunktivitis sicca entstehen hauptsächlich durch einen fortschreitenden Untergang des Drüsengewebes der exokrinen Drüsen, speziell durch die Zerstörung der Speicheldrüsen und Tränendrüsen. Das Vollbild der Erkrankung bildet sich in der überwiegenden Zahl der Fälle erst nach Jahren aus.

Am Auge kommt es durch die fehlende Tränenflüssigkeit zu einem erhöhten Reibungseffekt und damit zu brennenden Schmerzen, Rötung, Fremdkörpergefühl, Juckreiz und Photosensibilität bis hin zur Zerstörung des Epithels der Kornea (Hornhaut) und der Konjunktiva (Bindehaut). Dies führt dann zum Vollbild der Keratokonjunktivitis sicca [6, 17].

Im Mund entstehen für den Patienten durch die Xerostomie (Mundtrockenheit) Probleme beim Kauen und Schlucken von fester bzw. trockener Nahrung sowie beim Sprechen. Auch entstehen erhebliche Probleme bei der Pflege der Zähne, da die protektive Wirkung des Speichels fehlt. Die Folge für die Patienten ist ein wesentlich erhöhtes Risiko, Karies zu bekommen [1, 2, 6, 18-20]. Auch ist das Auftreten von Infektionen durch *Streptococcus mutans* und Lactobazillen sowie von Candida-Infektionen erhöht [21].

Das Sjögren-Syndrom führt in etwa einem Drittel der Fälle auch zu verschiedenen extraglandulären Manifestationen [3, 22]. Diese werden unterteilt in nicht viszerale Manifestationen wie an der Haut, an den Gelenken oder an der Muskulatur und in viszerale Manifestationen, die zur Beteiligung der Lungen, des Herzens, der Nieren, des Gastrointestinaltraktes, des endokrinen Systems und des zentralen Nervensystems führen können.

Auf Grund der vielen verschiedenen Manifestationsformen, neben der typischen Sicca-Symptomatik, ist eine aufwändige Differentialdiagnostik sehr wichtig. Die extraglandulären Manifestationen ähneln sehr denen von anderen Kollagenosen, wie zum Beispiel dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) [3, 23]. Auf der anderen Seite kann aber auch die Sicca-Symptomatik ohne eine autoimmune Beteiligung auftreten. Des Weiteren ist mit dem Sjögren-Syndrom ein erhöhtes Risiko verbunden an einem B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom zu erkranken [24-28]. Daher sind regelmäßige Kontrolluntersuchungen der Patienten notwendig.

### **1.1.3 Klassifikationskriterien des Sjögren-Syndroms**

Die Differentialdiagnostik des Sjögren-Syndroms ist umfangreich, da die Sicca-Symptomatik medikamenteninduziert sein kann und durch verschiedene Ursachen wie zum Beispiel eine virale Infektion (HCV, HIV), Altersregression, Strahlentherapie, Nephropathien und Vitaminmangel hervorgerufen werden kann. Als international anerkannte Klassifikationskriterien für das Sjögren-Syndrom gelten die von der American-European Consensus Group aufgestellten Kriterien [22]. Die sechs Hauptkriterien sind im Folgenden aufgelistet und ihre Anwendung kurz beschrieben.

1. subjektive okuläre Symptome
2. subjektive orale Symptome
3. objektive okuläre Symptome
4. histologische Befunde der Speicheldrüsenbiopsie
5. objektive orale Symptome
6. serologische Befunde der Antikörperdiagnostik

Die subjektiven Symptome werden durch Befragen der Patienten erhoben. Für die Erfassung der objektiven Symptome stehen verschiedene Tests zur Verfügung. Die okulären Symptome werden mit dem so genannten Schirmer-Test oder mit der Bengalrosafärbung erhoben. Der Schirmer-Test dient der Messung der sezernierten Menge an Tränenflüssigkeit. Mit der Bengalrosafärbung können Ulzerationen auf der Kornea sichtbar gemacht werden.

Die objektive Messung der Funktion der Speicheldrüsen erfolgt über die Messung des unstimulierten Speichelflusses ( $\leq 1,5$  ml in 15 Minuten) oder anhand einer Szintigraphie der Speicheldrüsen. Zusätzlich erfolgt eine histologische Untersuchung von Biopsien aus den gut erreichbaren kleinen Speicheldrüsen im Lippen- und Wangengewebe. In diesen Biopsaten wird dann die Infiltration durch Lymphozyten bestimmt. Die Infiltration der Lymphozyten wird objektiviert, indem man die Beurteilung zum einen durch einen erfahrenen Pathologen durchführen lässt und zum anderen an Hand einer definierten Graduierung bewertet. Der Focus-Score bzw. die Graduierung nach Chisholm und Mason ist in Tabelle 1 wiedergegeben [29]. Ein Focus wurde von Waterhouse und Doniach als eine Ansammlung von ca. 50 Lymphozyten pro  $4 \text{ mm}^2$  definiert [4, 29].

Tabelle 1: Focus-Score/Graduierung nach Chisholm and Mason

<b>Grad</b>	<b>Lymphozyten pro <math>4 \text{ mm}^2</math> in der Speicheldrüsenbiopsie</b>
0	abwesend
1	leichte Infiltration
2	moderate Infiltration oder < 1 Focus
3	ein Focus
4	> ein Focus

Die serologischen Veränderungen beim primären Sjögren-Syndrom sind in bis zu 70 % der Fälle gekennzeichnet durch Antikörper gegen die Proteine SS-A/Ro und SS-B/La, sowie in bis zu 50 % der Fälle durch das Vorhandensein von Rheumafaktor [30].

Für die Diagnose eines primären Sjögren-Syndroms müssen nun vier von diesen sechs Kriterien erfüllt sein, mit der Bedingung, dass entweder ein positiver Nachweis der Antikörper gegen SS-A/Ro bzw. SS-B/La oder ein eindeutiger histologischer Nachweis in den Speicheldrüsen zu finden ist. Als weitere Möglichkeit der Diagnosestellung gilt der positive Nachweis von drei der vier objektiven Kriterien. Die Sensitivität und Spezifität dieser Methoden liegen bei 93,5% bzw. 94% [22]. Das sekundäre Sjögren-Syndrom kann nachgewiesen werden, wenn entweder Kriterium 1 oder 2 vorliegt und

weitere zwei der Kriterien 3, 4 oder 5 erfüllt werden. Hier liegen die Sensitivität bei 85,1% und die Spezifität bei 93,5% [22].

Als Ausschlussbedingungen für die Anwendung dieser Kriterien gelten die Radiotherapie von Kopf oder Hals, eine Hepatitis C-Infektion, AIDS, ein bereits existierendes Lymphom, Sarkoidose, eine Graft-versus-Host-Erkrankung oder die Behandlung mit anticholinergen Medikamenten [22].

#### **1.1.4 Therapie des Sjögren-Syndroms**

In der Behandlung des Sjögren-Syndroms stehen zunächst symptomatische Therapieansätze zur Verfügung. Im Vordergrund der Behandlung stehen Ersatzstoffe für Tränenflüssigkeit und Speichel sowie die Verwendung von sekretionssteigernden Medikamenten (Muskarinagonisten). Bei schwerer Manifestation werden auch autologe Serumtropfen und Cyclosporin-A-Augentropfen eingesetzt. Aber auch allgemeine Maßnahmen wie das Kauen von zuckerfreiem Kaugummi werden empfohlen. Bei akuten Schüben einer Sialadenitis (Speicheldrüsenentzündung), bei einer Beteiligung von inneren Organen oder bei dem Bestehen eines Non-Hodgkin-Lymphoms werden auch Glukokortikoide, Hydroxychloroquin, Methotrexat, Azathioprin oder Rituximab eingesetzt. Kausale Therapiekonzepte liegen zurzeit leider nicht vor, da bisher nicht bekannt ist, welche kausalen Ursachen und welche molekularen Pathomechanismen hinter der Entstehung des Sjögren-Syndroms stehen.

## 1.2 Das 20S bzw. 26S Proteasom

Das 20S Proteasom ist ein ubiquitär im Körper vorkommender, ATP-abhängiger multi-katalytischer Komplex. Dieser Proteinkomplex liegt sowohl im Zytoplasma als auch intranukleär vor. Die Aufgabe des 20S Proteasoms besteht in dem Abbau von Proteinen. Dabei werden polyubiquitinierte Proteine vom 20S Proteasom in kurze Peptide gespalten [31, 32]. Das 20S Proteasom ist hiermit ein wichtiger Bestandteil von essentiellen Vorgängen in der Zelle, wie Transkription, Apoptose, Zelldifferenzierung, Aktivierung und Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B [33] oder eben auch bei der Immunantwort [34-40]. In diesem Zusammenhang kommt dem Proteasom eine besondere Bedeutung bei der Prozessierung von Antigenen zu, die dann für die Beladung des MHC I Moleküls benötigt werden [41-47]. Ein weiterer Beleg hierfür ist, dass bei einer Reihe von Erkrankungen, wie Sepsis, starkem Trauma und Autoimmunerkrankungen die Konzentration an zirkulierendem 20S Proteasom erhöht ist [48-51]. Hingegen konnte auch in mehreren Arbeiten belegt werden, dass unter Verwendung von Proteasominhibitoren die Bildung von Klasse I Antigenen in Zellen reduziert werden kann [52-56].

Das 20S Proteasom baut sich aus vier Ringen mit je sieben Untereinheiten auf. Die Untereinheiten der beiden äußeren Ringe werden als  $\alpha$ -Untereinheiten bezeichnet, die Untereinheiten der beiden inneren Ringe als  $\beta$ -Untereinheiten [57]. An die  $\alpha$ -Ringe binden verschiedene aktivierende und regulierende Proteinkomplexe, wie zum Beispiel die sogenannten 19S Regulationskomplexe, die den Zugang von Substrat für den proteolytischen Abbau bestimmen [58, 59]. Der Komplex aus dem 20S Proteasom und dem 19S Proteasomregulator bildet das 26S Proteasom [31].

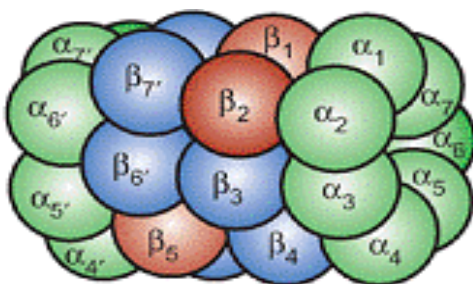


Abbildung 1: Darstellung des 20S Proteasoms. Außen in grün die  $\alpha$ -Ringe mit ihren sieben Untereinheiten und in der Mitte in blau/rot die  $\beta$ -Ringe. Die drei katalytisch aktiven Untereinheiten sind in rot dargestellt.

Die  $\alpha$ -Untereinheiten der beiden äußeren Ringe sind katalytisch nicht aktiv. Von den je sieben  $\beta$ -Untereinheiten der beiden inneren Ringe sind jeweils drei Untereinheiten katalytisch aktiv. Diese drei aktiven, konstitutiven Untereinheiten heißen  $\beta 1$  (delta),  $\beta 2$  (Z) und  $\beta 5$  (MB1) [31, 60-62].

Wird der Proteasomkomplex nun durch Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) stimuliert, können die aktiven Untereinheiten  $\beta 1$  (delta),  $\beta 2$  (Z) und  $\beta 5$  (MB1) durch drei alternative, ebenfalls katalytisch aktive, induzierbare Untereinheiten  $\beta 1i$  (LMP2),  $\beta 2i$  (MECL1) und  $\beta 5i$  (LMP7) ersetzt werden [63-70]. Ein solchermaßen veränderter, aktivierter 20S Proteasomkomplex wird auch Immunoproteasom genannt [71, 72]. Die Untereinheiten  $\beta 1i$  (LMP2) und  $\beta 5i$  (LMP7) sind auf Chromosom 6 in der Region des MHC II kodiert [73-76], während die Untereinheit  $\beta 2i$  (MECL1) auf Chromosom 16 in einem Cluster nicht verwandter Gene verschlüsselt ist [77]. Der Einbau dieser induzierbaren Untereinheiten, speziell von  $\beta 5i$  (LMP7) erfolgt wesentlich schneller als der von konstitutiven Einheiten. Allerdings ist auch die Halbwertszeit des Immunoproteasoms kürzer als die des normalen Proteasoms. Auf diese Weise kann der Organismus gut auf akute Infektionen reagieren [78]. Durch den Einbau dieser Untereinheiten wird die Prozessierung von Antigenen und damit die Beladung der MHC I Moleküle beschleunigt, was folglich zu einer Optimierung der Präsentation dieser Antigene führt [79]. Die Effektivität der Immunantwort wird also erhöht [72]. Es konnte gezeigt werden, dass durch INF- $\gamma$  Exposition die Schnittaktivität der LMP-Untereinheiten verändert [80] und über diesen Mechanismus die Peptidpräsentation über MHC I verstärkt wird [81]. Auch zeigten Gewebe mit einem höheren Anteil an Immunoproteasom eine gesteigerte Effizienz bei der Produktion von MHC I Epitopen als Gewebe mit den konstitutiven katalytischen Untereinheiten [82, 83].

Der Einbau der induzierbaren Untereinheiten des Immunoproteasoms folgt gewissen Regeln [71]. Als erstes wird zumeist die Untereinheit  $\beta 1i$  (LMP2) eingebaut. Diese Untereinheit kann selbstständig und unabhängig von anderen Untereinheiten eingebaut werden. Danach folgt der Einbau von  $\beta 2i$  (MECL1). Der Einbau von  $\beta 2i$  (MECL1) ist abhängig von  $\beta 1i$  (LMP2) und kann nur erfolgen, wenn eben diese Untereinheit schon vorhanden ist. Relativ spät erfolgt dann der Einbau von  $\beta 5i$  (LMP7) in den Enzymkomplex. Diese Einheit ist aber essentiell für die Funktion und Effektivität des Immuno-

proteasoms.  $\beta 5i$  (LMP7) kann darüber hinaus nur eingebaut werden, wenn  $\beta 1i$  (LMP2) und  $\beta 2i$  (MECL1) bereits eingebaut wurden [71].

Zusätzlich gibt es einen wichtigen Proteasom aktivierenden Faktor PA28, der ebenfalls durch Interferon- $\gamma$  induziert wird [84]. Durch Bindung an die äußeren Ringe des 26S Proteasoms wird über diesen Hybridkomplex die Produktion von einigen MHC I Antigenen nochmals gesteigert [85-88]. PA28 bildet eine Ringstruktur aus sieben Untereinheiten, die mit dem Proteasom interagiert und darüber den Ein- und Austritt von Peptiden beeinflusst [89-91]. Die Bindung von PA28 führt zu einer erhöhten Vielfalt an präsentierten MHC I Antigenen [46]. Es ist jedoch noch unklar über welchen exakten Weg dies umgesetzt wird.

Diese entscheidende Rolle in der Antigenprozessierung und damit in der Beladung des MHC-I Moleküls macht den Proteasomkomplex immunologisch interessant. Dieser Mechanismus spielt relativ früh eine Rolle im Ablauf der Immunantwort. Wenn es in diesem Bereich zu einer Fehlregulation der Peptidpräsentation kommt, kann das dazu führen, dass die folgende Immunantwort gar nicht oder zu stark getriggert wird. Außerdem begründen die Einflüsse des Proteasoms auf weitere wichtige Vorgänge der Zelle, nicht zuletzt auch auf die Apoptose, das gesteigerte Interesse an diesem Proteinkomplex.

Der erste Hinweis auf die Beteiligung des Proteasomkomplexes an dem Entstehen autoimmuner Erkrankungen kam durch die Entdeckung von Antikörpern, die gegen Teile des Proteasomkomplexes gerichtet sind [92-95]. Dies war zum Beispiel bei Patienten mit Multipler Sklerose (MS) [96] sowie bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ I [97] der Fall. Ebenso wurden Antikörper gegen Untereinheiten des Proteasom aktivierenden Faktors PA28 bei systemischem Lupus erythematodes und beim Sjögren-Syndrom gefunden [98].

In anderen Arbeiten konnten weitere Hinweise auf die Involvierung des Proteasoms in das Geschehen von Autoimmunerkrankungen gefunden werden. So konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass sich die relative Expression der induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms bei Sjögren-Patienten von der bei gesunden Menschen in den peripheren mononuklearen Zellen (PBMCs) unterscheidet [99, 100]. S. Krause konnte



in ihrer Arbeit von 2006 [100], in der ebenfalls PBMCs von gesunden Kontrollen, Sjögren-Patienten und Patienten mit verschiedenen anderen rheumatischen Erkrankungen untersucht wurden, zeigen, dass die Expression der Untereinheiten  $\beta 1i$  (LMP2) und  $\beta 2i$  (MECL1) auf mRNA Ebene bei Sjögren-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht war. Im Gegensatz dazu wurde für  $\beta 5i$  (LMP7) keine Steigerung der Expression auf mRNA Ebene gefunden. Gleichzeitig war aber die Untereinheit  $\beta 1i$  (LMP2) auf Proteinebene in der Gruppe der Sjögren-Patienten deutlich herunterreguliert. Es wurde nun vermutet, dass dies (a) an einem post-transkriptionalen Defekt, (b) an einem gestörten Translationsprozess oder (c) an einer verringerten Stabilität des  $\beta 1i$  (LMP2) Proteins liegt. Dieses Phänomen wurde allerdings für keine weitere Untereinheit gefunden. Als Einschränkung wurden in dieser Arbeit die PBMCs als eine heterogene Gruppe zusammengefasst und nicht in die einzelnen Untergruppen unterteilt. Es kann also nicht gesagt werden, ob diese beschriebenen Ergebnisse nur in bestimmten Zellgruppen der PBMCs vorkommen oder in allen PBMCs zu finden sind.

In einer weiteren Arbeit von T. Egerer 2006 [99] wurden Ergebnisse veröffentlicht, die ebenfalls eine veränderte Expression von Untereinheiten des Proteasomsystems auf mRNA Ebene bei Sjögren-Patienten zeigen. In dieser Arbeit wurde Speicheldrüsengewebe untersucht und die Expression der Untereinheiten im Gewebe analysiert. Hier zeigte sich eine signifikante Hochregulation der Expression von  $\beta 5i$  (LMP7) im Speicheldrüsengewebe von Sjögren-Patienten im Vergleich zu Patienten mit Sicca-Symptomatik ohne autoimmune Sialadenitis. Doch auch in dieser Arbeit wurden keine einzelnen Zelltypen untersucht, sondern es wurde eine heterogene Gruppe von Zellen zusammengefasst analysiert.

Aufbauend auf diese Ergebnisse werden in der vorliegenden Arbeit nun die PBMCs in  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen,  $CD19^+$  B-Zellen, Monozyten und dendritische Zellen aufgeteilt und es wird die Genexpression der Untereinheiten des Proteasomsystems in den einzelnen Gruppen untersucht.

## 2. Fragestellung

Das 20S Proteasomsystem spielt in der Regulation von Entzündungsprozessen und bei der Prozessierung von antigenen Peptiden für die Beladung der MHC I Moleküle eine entscheidende Rolle. Es wurde in mehreren Studien gezeigt, dass durch Veränderungen im Aufbau des Proteasoms eine Veränderung der Prozessierung von Antigenen der MHC Klasse I hervorgerufen wird [41-47]. Über diesen Mechanismus leistet das Proteasomsystem einen wichtigen Beitrag zur Erkennung der körpereigenen Zellen durch das Immunsystem. Eine Fehlregulation in diesem System kann einen Einfluss auf das Zusammenspiel von Körperzellen und Immunsystem haben. Daher ist dieser Multienzymkomplex von besonderem Interesse in der Erforschung der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen. Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung des Proteasoms bei Autoimmunerkrankungen war die Entdeckung von Antikörpern, die gegen Untereinheiten dieses Multienzymkomplexes gerichtet sind [92-95]. Jedoch sind die genaue Regulation und der Aufbau dieses komplexen Systems bei Autoimmunerkrankungen noch wenig untersucht.

In früheren Arbeiten wurden erste Erkenntnisse über die Expression des Proteasomsystems bei Autoimmunerkrankungen gewonnen [99, 100]. Dabei konnte unter anderem gezeigt werden, dass es zu einer Fehlregulation einer Untereinheit des Immunoproteasoms beim primären Sjögren-Syndrom kommt. Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass es bei Patienten mit Sjögren-Syndrom zu einer Hochregulation der mRNA für die katalytische Untereinheit LMP2 kommt [100]. Auf Proteinebene fand sich demgegenüber eine Defizienz der Untereinheiten, die auf eine Dysregulation hinweist. Jedoch wurden in der Arbeit nicht einzelne Zellpopulationen der in den PBMCs enthaltenen Zellen getrennt untersucht, sondern alle PBMCs als eine Gruppe behandelt.

Es ist allerdings bekannt, dass die Aktivität des Proteasomsystems in verschiedenen Geweben und Zelltypen sehr unterschiedlich ist [31]. So ist die Aktivität dieses Enzymkomplexes in Geweben mit einem hohen Proteinumsatz, wie zum Beispiel in Leberzellen, wesentlich höher als beispielsweise in Muskelzellen. Da auch bei einer Entzündungsreaktion nicht alle immunologisch aktiven Zellen gleichermaßen aktiviert sind,

sollten im Rahmen dieser Arbeit die PBMCs in ihre verschiedenen Untergruppen aufgetrennt werden, um so ein genaueres und aussagekräftiges Bild zu bekommen.

Des Weiteren ist auf die Arbeit von T. Egerer 2006 hinzuweisen, in der ebenfalls das Proteasomsystem im Zusammenhang mit dem Sjögren-Syndrom untersucht wird. Hier konnte ebenfalls eine Dysregulation in der Expression von einzelnen Untereinheiten des Immunoproteasoms nachgewiesen werden. Hier wurde allerdings eine Veränderung in der Untereinheit LMP7 festgestellt. Diese wurde hauptsächlich im Gewebe der Speicheldrüsen nachgewiesen. Doch auch hier wurden nicht die einzelnen immunologisch aktiven Zellen betrachtet, sondern alle infiltrierenden und gewebeständigen Zellen zusammen als eine heterogene Gruppe analysiert.

Daher war es das Ziel dieser Arbeit, die Genexpression der verschiedenen Untereinheiten des Proteasoms in Zusammenhang mit dem Sjögren-Syndrom näher zu untersuchen. Es wurde im Ansatz darauf geachtet, die einzelnen an der Immunreaktion beteiligten Zellen aufzutrennen und miteinander zu vergleichen. Hierdurch ist es möglich zu untersuchen, welche Zellen eine Dysregulation in der Genexpression dieser Untereinheiten aufweisen. Dieses Muster kann dann wiederum mit den Erkenntnissen über die aktivierten Zellen im entzündeten Gewebe beim Sjögren-Syndrom verglichen werden. Hierdurch könnte ein weiterer Baustein im Verständnis der Pathogenese des Sjögren-Syndroms gefunden werden.

### **3. Patienten, Materialien und Methoden**

#### **3.1 Patienten und Kontrollen**

In die Studie wurden insgesamt 14 Patienten mit Sjögren-Syndrom und 13 gesunde Kontrollen aufgenommen. Von den 14 Patienten wurde bei 12 Personen die Diagnose eines primären Sjögren-Syndroms gestellt und bei zwei Personen die Diagnose eines sekundären Sjögren-Syndroms. Alle Patienten erfüllten die Klassifikationskriterien der American-European Consensus Group für das Sjögren-Syndrom [22]. Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme in der Abteilung für Rheumatologie und klinische Immunologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin in Behandlung und wurden von hier rekrutiert. Die zuständige Ethikkommission hatte die Studie genehmigt und es lag vor Blutentnahme eine schriftliche Einverständniserklärung aller Teilnehmer vor.

Unter den 14 untersuchten Patienten befanden sich 12 Frauen und 2 Männer. Das durchschnittliche Lebensalter der Patienten betrug 57 Jahre (Standardabweichung (SD)  $\pm 12,5$ ). Die 13 gesunden Kontrollen setzten sich aus 12 Frauen und einem Mann zusammen. Hier lag das durchschnittliche Lebensalter bei 47 Jahren (SD  $\pm 7,7$ ).

Einige der Patienten zeigten nicht nur die Diagnose primäres oder sekundäres Sjögren-Syndrom sondern auch andere Begleit- bzw. Hauptdiagnosen, die im Folgenden aufgezählt sind: Systemischer Lupus erythematodes (SLE) bei einer Patientin, undifferenzierte Kollagenose bei einer Patientin, Osteoarthritis (= Polyarthrosis deformans) bei einer Patientin, kutanes Immunozytom bei einem Patienten, kurierter Brustkrebs und Zervixkarzinom bei einer Patientin, arterieller Hypertonus bei zwei Patientinnen, metabolisches Syndrom bei einer Patientin, Diabetes mellitus Typ II bei zwei Patientinnen und Osteoporose bei einer Patientin. Drei Patienten wiesen keinerlei Nebendiagnosen auf. Weitere Erkrankungen waren zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt. Von den gesunden Kontrollen wies zum Zeitpunkt dieser Arbeit niemand eine akute oder chronische Erkrankung auf.

Insgesamt fünf Patienten wurden zum Zeitpunkt der Studie mit niedrig dosiertem Prednisolon behandelt (Dosis  $\leq 7,5$  mg/d). Weitere systemische Therapien bestanden

unter anderem bei einer Patientin aus L-Thyroxin, Clomifen, Choriongonadotropin und Progesteron, bei einer weiteren Patientin aus Furosemid und ASS sowie bei einigen weiteren ebenfalls aus NSAR. Es ist nicht bekannt, ob diese Medikamente in den vorliegenden Dosierungen Einfluss auf die Expression oder die Aktivität der untersuchten Untereinheiten des Proteasomkomplexes haben. In der Tabelle 2 sind alle Patienten mit Geschlecht, Alter, Diagnose, Nebendiagnose und Therapie aufgelistet.

Tabelle 2: Übersicht über alle Patienten

Patient Nr.	Geschlecht M / W	Alter	Diagnose pSS / sSS	Nebendiagnosen	Therapie
1	W	67	pSS	Metabolisches Syndrom, Osteoporose,	Isosorbiddinitrat; ASS; Furosemid; Allopurinol; Verapamil; ACC log; Formoterol; Budesonid; Risedronsäure; Calcinogen; Spironolacton; Hydroxychloroquinsulfat; Ivofibrat; Oxycodon; Prednisolon; Panthenol; Esomeprazol; Diclofenac; Magnesium;
2	M	49	pSS	keine	keine
3	W	71	pSS	Polyneuropathie	keine
4	W	52	sSS	undifferenzierte Kollagenose, Z.n. Lyme Borreliose, Antiphospholipidsyndrom	Subreum; ASS; Etoricoxib b.B.
5	W	49	pSS	keine	Pilocarpin; Pantoprazol; Levothyroxin; Azahtioprin
6	W	66	pSS	Diabetes mellitus Typ 2	Hydroxychloroquinsulfat; Pilocarpin; Prednisolon; Hypromellose Augentropfen; Repaglinid; Metformin
7	W	33	sSS	DD Systemischer Lupus Erythematodes,	Ibuprofen; Levothyroxin, Hormone: Clomifen, Choriongonadotropin und Progesteron
8	M	43	pSS	kutanes Immunozytom	Azathioprin; Methylprednisolon; Carbomer; Hypromellose
9	W	52	pSS	keine	Prednisolon; Saliva (Mundspray); Augentropfen; Blutdrucktab.
10	W	74	pSS	keine	keine
11	W	44	pSS	keine	Hydroxychloroquinsulfat; Prednisolon
12	W	63	pSS	Z.n. Mamma-Carzinom, Zervix-Carzinom	L-Thyroxin; Clonidin; Systane Benetzungstropfen n.B.; Diclofenac; Omeprazol;
13	W	75	pSS	Lymphozytopenie	Prednisolon; Celecoxib; Tramadol; Amitriptylin; Lorsartan; Pankreatin; Calcium-Ion; Pantoprazol; Carbomer Augengel;
14	W	52	pSS	keine	Alendronsäure; Pilocarpin; Ranitidin; Levothyroxin

## **3.2 Blutentnahme**

Von allen Patienten sowie den Kontrollen wurden je ca. 60 ml Blut entnommen. Die Entnahme wurde mit Heparin beschichteten Röhrchen (Vacutainer<sup>®</sup>, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Nach der Entnahme wurden die Blutproben - bis zur Weiterbearbeitung - bei Raumtemperatur belassen. Die Liegedauer bzw. die Transportdauer zwischen der Abnahme des Blutes und der weiteren Aufbereitung im Labor betrug maximal 30 Minuten.

## **3.3 Isolation der zellulären Untereinheiten des Blutes**

### **3.3.1 Isolation der mononukleären Zellen aus peripherem Blut**

Die Bearbeitung der Blutproben und die Isolierung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) wurden unter einer Laminar-Box (Glasvitrine mit laminarer Luftströmung) durchgeführt. Aus dem Blut wurden die PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Zu diesem Zweck wurde das Blut auf zwei 50 ml Falcon Tube (Falcon, Oxnard USA) verteilt und mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) auf jeweils insgesamt 35 ml aufgefüllt.

Danach wurde dieses Blut-PBS-Gemisch wiederum in je ein 50 ml Falcon Tube mit Filterscheibe (Falcon, Oxnard USA) umgefüllt. Diese wurden vorab mit 15 ml Trennflüssigkeit („Ficoll lymphocyte isolation solution“, GE Healthcare Bio-Science, München, Deutschland) und durch kurzes Zentrifugieren bei 2000 rpm vorbereitet.

Nun wurden die Röhrchen für 20 Minuten bei 2000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren haben sich die PBMC über dem Ficoll und der Filterscheibe angesammelt. Zuerst wurde das Plasma/PBS-Gemisch, welches sich noch über den PBMC befand, entnommen. Die Interphase mit den PBMC wurde im Anschluss vorsichtig von oben her mit einer Pasteurpipette abpipettiert. Die PBMC wurden in je ein neues 50 ml Falcon Tube gegeben. Hier wurden die Zellen in einem Gesamtvolumen von 50ml mit PBS, versetzt mit 0,5% Albumin aus Rinderserum (BSA) (PBS/BSA, Sigma, Taufkirchen, Deutschland), durch Zentrifugieren gewaschen.

Insgesamt wurden die PBMC dreimal für je 10 Minuten gewaschen. Der erste Waschgang erfolgte mit 1600 rpm. Der zweite und dritte Waschgang erfolgten dann mit je

1000 rpm, um die mitgenommenen Thrombozyten auszuwaschen und die Reinheit der PMBC zu erhöhen.

Nach der Isolation der Zellen wurden diese manuell mit der Neubauer Zählkammer (Fein-Optik, Bad Blankenburg, Deutschland) gezählt. Es wurden aus jedem Röhrchen 10 µl entnommen und mit 990 µl PBS verdünnt. Dies ergab eine Verdünnung von 1:100. Für jeden Probanden wurden nun vier Quadranten der Zählkammer ausgezählt. Aus diesen vier Werten wurde der Mittelwert gebildet und in folgende Formel eingesetzt:

absolute Zellzahl = (Mittelwert der Quadranten) x  $10^4$  x Verdünnung (100) x Proben-  
volumen in ml

Die eine Hälfte der Zellen - von jedem Patienten bzw. jeder Kontrolle - wurde für die Isolation der dendritischen Zellen mittels magnetaktivierter Zellsortierung ("Magnet Activated Cell Sorting" - MACS) benutzt. Die andere Hälfte wurde zur Isolierung der T- und B-Lymphozyten sowie der Monozyten mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung („Fluoreszens Activated Cell Sorting“ - FACS) verwendet.

Nach der Isolierung der PBMC wurden diese während und zwischen der weiteren Bearbeitung immer auf Eis gekühlt.



### 3.3.2 Isolation von T- und B- Lymphozyten sowie von Monozyten mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung

Um die T- und B-Lymphozyten sowie die Monozyten von den übrigen Zellen mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS) zu separieren, wurden zunächst die unspezifischen Bindungsstellen mittels eines anti-Fc Antikörpers (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) blockiert. Anschließend wurden die PBMCs bei 4° C für 20 Minuten mit den folgenden Antikörpern inkubiert, die gegen spezifische Oberflächenmoleküle gerichtet und mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind:

1. Antikörper gegen CD3, markiert mit allophycocyanin -APC- (Klon SK 7),
2. Antikörper gegen CD14, markiert mit fluorescein-isothiocyanate –FITC (Klon MØP9),
3. Antikörper gegen CD19, markiert mit phycoerithrin -PE- (Klon SJ25C1)  
(alle drei Antikörper von Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland),
4. Antikörper gegen CD4, markiert mit PE-Cy5 (Klon S3.5),
5. Antikörper gegen CD8, markiert mit PE-Cy7 (Klon 3B5) ,  
(beide Antikörper von CALTAG Laboratories, Hamburg, Deutschland, heute Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

Um tote Zellen auszusortieren, wurde 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI, Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) direkt vor der Sortierung zu den einzelnen Proben zugegeben.

Das verwendete Gerät war der FACS DiVa Flow Cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Dieser wurde mit der entsprechenden FACS DiVa Software der Firma bedient.

Für die gleichzeitige Sortierung von den verschiedenen Subpopulationen wurde folgende Strategie (Abbildung 2) angewendet: Im ersten Fenster werden die Zellen nach Größe und Granularität dargestellt. Im zweiten Fenster erfolgte die Trennung nach lebenden und toten Zellen sowie nach CD3<sup>+</sup> und CD3<sup>-</sup> Zellen. Für das dritte und vierte Fenster wurden dann nur die lebenden Zellen verwendet. Die CD3<sup>-</sup> Zellen wurden im dritten Fenster in CD14<sup>+</sup> Monozyten und CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten aufgetrennt und aus den CD3<sup>+</sup> Zellen wurden im vierten Fenster die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten-

Subpopulationen isoliert. Die verschiedenen hier isolierten Subpopulationen wurden noch im FACS-Zytometer auf ihre Reinheit geprüft und anschließend gezählt.

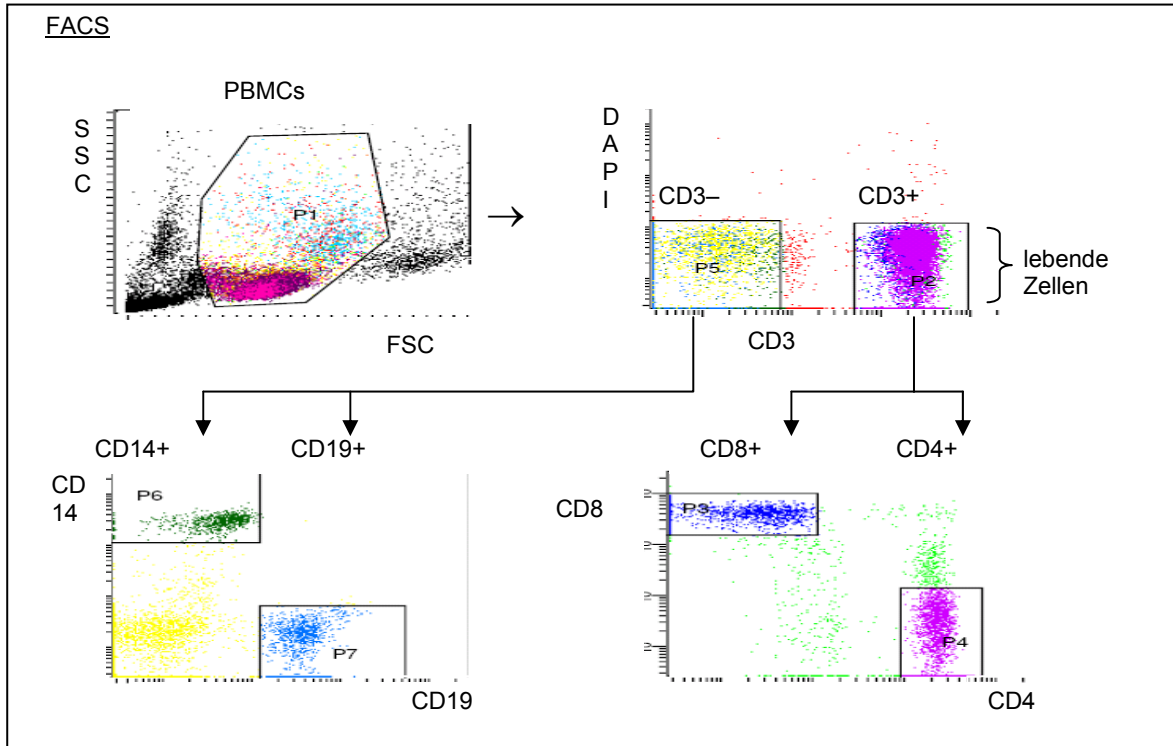


Abbildung 2: Hier ist die gleichzeitige Auftrennung der PBMC in die verschiedenen Subpopulationen mittels FACS nach der oben genannten Strategie gezeigt. Das erste Fenster zeigt die Auftrennung nach Granularität und Größe (SSC, FSC). Im zweiten Fenster, oben rechts, ist dann gezeigt, wie die Zellen in lebende CD3<sup>+</sup>- und lebende CD3<sup>-</sup>-Zellen aufgeteilt werden und die toten Zellen aussortiert werden. Die Fenster drei und vier geben die Trennung der CD3<sup>-</sup>-Zellen in CD14<sup>+</sup>- bzw. CD19<sup>+</sup>-Zellen und die Trennung der CD3<sup>+</sup>-Zellen in CD8<sup>+</sup>- bzw. CD4<sup>+</sup>-Zellen wieder.

Nachdem die vier verschiedenen Zellsubpopulationen isoliert wurden, wurden diese sofort mit RLT-Lysepuffer (Qiagen, Hildesheim, Deutschland) versetzt mit 2-Mercaptoethanol (2-ME) (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) lysiert. Im Anschluss wurde direkt mit der RNA-Extraktion fortgefahren oder das Zelllysate bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

### **3.3.3 Isolation der dendritischen Zellen mittels magnetaktivierter Zellsortierung**

Die dendritischen Zellen wurden mittels magnetaktivierter Zellsortierung (MACS) aus dem Blut der Probanden isoliert. Zu diesem Zweck wurde das „Blood Dendritic Cell Isolation Kit II“ (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Alle im Folgenden erwähnten Reagenzien, bis auf den PBS/BSA-Puffer (Sigma, Taufkirchen, Deutschland), sind in diesem Kit enthalten. Auch die verwendeten Säulen (LD und LS Säulen) wurden von Miltenyi Biotec hergestellt und bezogen. Bei der Durchführung wurde nach den entsprechenden Protokollen der Firma vorgegangen. Für die negative Selektion wurden LD Säulen und für die positive Selektion LS Säulen verwendet.

Die Selektion der dendritischen Zellen erfolgte über zwei Schritte. Im ersten Schritt wurden durch positive Selektion die CD14<sup>+</sup> Monozyten und die CD19<sup>+</sup> B-Zellen aussortiert. Der erste Schritt ist notwendig, da auf der Oberfläche der B-Lymphozyten das Oberflächenmolekül CD1c (BDCA-1) und auf den Monozyten BDCA-3 exprimiert wird. Da diese aber für die Selektion der dendritischen Zellen als Marker benötigt werden, müssen solche Zellen vorab aussortiert werden, um die Reinheit der dendritischen Zellen zu gewährleisten. Dies wird durch den Non-DC Depletion Cocktail ermöglicht, in dem Antikörper enthalten sind, die CD14<sup>+</sup> Monozyten und CD19<sup>+</sup> B-Zellen mit kleinen metallischen Partikeln markieren, so dass diese beim Fließen durch ein Magnetfeld festgehalten werden. Des Weiteren ist ein Antikörper enthalten, der die CD1c<sup>+</sup> (BDCA-1<sup>+</sup>) dendritischen Zellen mit Biotin markiert, was für den zweiten Schritt von Bedeutung ist. Im zweiten Schritt wurde dann mit Hilfe des DC Enrichment Cocktail eine positive Selektion der dendritischen Zellen durchgeführt. In diesem DC Enrichment Cocktail sind Antikörper gegen die jeweils spezifischen Oberflächenmoleküle enthalten, so dass die BDCA-4<sup>+</sup> (Neuropilin-1<sup>+</sup>) plasmatischen dendritischen Zellen, die BDCA-3<sup>+</sup> myeloischen dendritischen Zellen und die im ersten Schritt mit Biotin markierten CD1c<sup>+</sup> (BDCA-1<sup>+</sup>) myeloischen dendritischen Zellen mit kleinen metallischen Partikeln markiert und im Magnetfeld isoliert werden.

Im Anschluss wurden die gewonnen dendritischen Zellen manuell mit der Neubauer Zählkammer (Fein-Optik, Bad Blankenburg, Deutschland) gezählt.

Die einzelnen Schritte des MACS sind in Tabelle 3 dargestellt. Ein Beispiel der anschließenden Analyse von den sortierten Zellen bietet Abbildung 3.

Tabelle. 3: Durchführung der magnetaktivierten Zellsortierung

<b>Reagenz</b>	<b>Menge</b>	<b>Zeitprotokoll</b>
FcR Blocking Reagent, Non-DC Depletion Cocktail	je 100 µl	15 Minuten inkubiert bei 4°C
PBS/BSA	5-10 ml	10 Minuten zentrifugiert bei 1400 rpm, Überstand verworfen
PBS/BSA	500 µl	Pellet resuspendiert
Suspension, PBS/BSA	2x 1 ml	Suspension durch LD Column laufen lassen, Säule mit PBS/BSA gewaschen, Durchfluss mit DZ's auffangen
Durchfluss		10 Minuten zentrifugiert bei 1400 rpm, Überstand verworfen
PBS/BSA	400 µl	Pellet resuspendiert
DC Enrichment Cocktail	100 µl	15 Minuten inkubiert bei 4°C
PBS/BSA	5-10 ml	10 Minuten zentrifugiert bei 1400 rpm, Überstand verworfen
PBS/BSA	500 µl	Pellet resuspendiert
Suspension, PBS/BSA	3x 3 ml	Suspension durch LS Column laufengelassen, Säule mit PBS/BSA gewaschen, Durchfluss verworfen
		LS Column ausgedrückt und DZ's aufgefangen

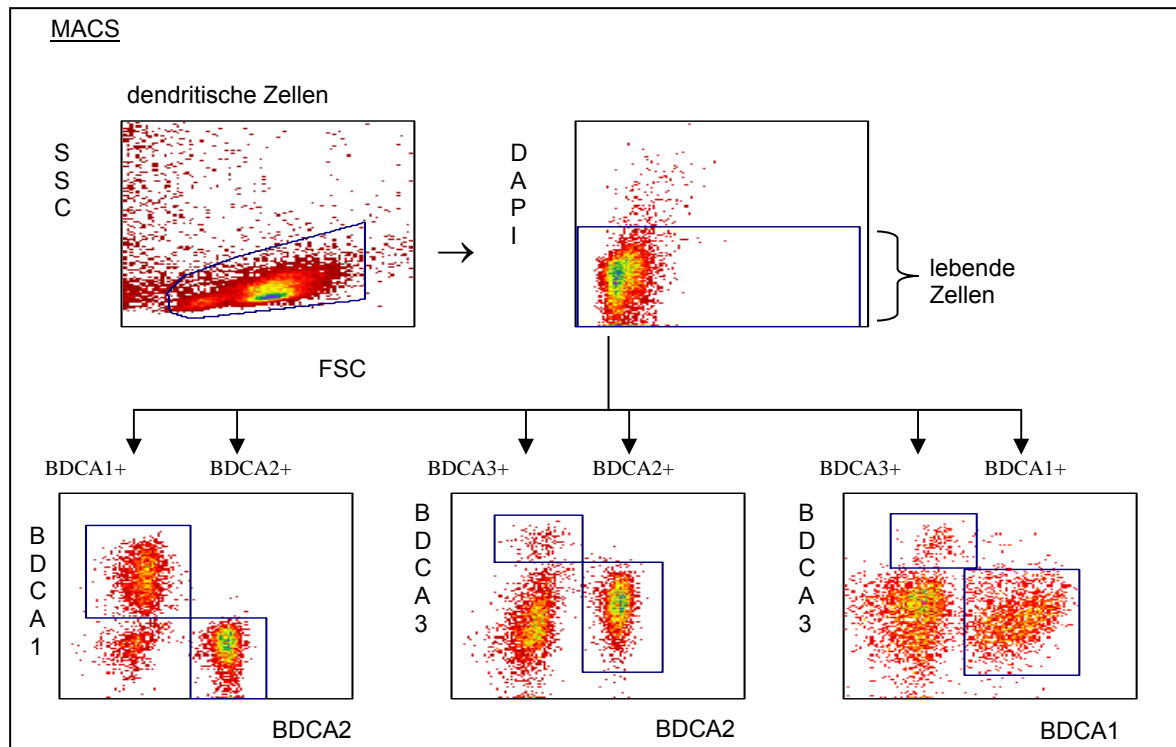


Abbildung 3: FACS-Kontrollanalyse der sortierten Zellen nach magnetaktivierter Zellsortierung. Im ersten Fenster wurden die PBMCs wieder nach Granularität und Größe definiert (SSC, FSC). Im zweiten erfolgte die Auftrennung von lebenden und toten Zellen. Danach wurden in den nächsten drei Fenstern die Subpopulationen der dendritischen Zellen kontrolliert nach deren Oberflächenmarkern BDCA1<sup>+</sup>, BDCA2<sup>+</sup>, und BDCA3<sup>+</sup>. Die einzelnen Populationen sind der Beschriftung zu entnehmen.

Auch die dendritischen Zellen wurden nach der Präparation direkt mit RTL-Lysepuffer, versetzt mit 2-ME (Sigma, Taufkirchen, Deutschland), lysiert. Im Anschluss wurde sofort mit der RNA-Extraktion fortgefahren oder das Zelllysat bei -80°C eingefroren.

### **3.4 Gewinnung der RNA**

Die RNA-Gewinnung erfolgte wie oben erwähnt direkt im Anschluss an die Sortierung der PBMC in die einzelnen Zellfraktionen oder nach einer kurzen Zwischenlagerung bei -80°C. Die Zellen wurden mit RLT-Lysepuffer (Qiagen, Hildesheim, Deutschland) versetzt mit 2-ME (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) lysiert und auf Eis gekühlt, um eine Degradierung der RNA zu verhindern.

Zur Durchführung der RNA-Gewinnung wurde das RNeasy Kit (Qiagen, Hildesheim, Deutschland) verwendet. Es wurde strikt nach der Anleitung des Herstellers gearbeitet. Die einzelnen Schritte der RNA-Gewinnung sind in Tabelle 4 wiedergegeben. Ergänzend wurde noch DNase I (Qiagen, Hildesheim, Deutschland) eingesetzt, um die DNA zu degradieren und die Reinheit der RNA zu erhöhen. Der RLT-Lysepuffer wurde vorab mit 2-ME versetzt, wobei je 10 µl 2-ME zu 1 ml RLT-Puffer gegeben wurden. Das Lysat wurde dann mit einer Spritze und einer 20 G Nadel homogenisiert. Im Anschluss wurde das homogenisierte Lysat mit 70% Ethanol versetzt und auf eine RNeasy mini Säule gegeben.

Im Anschluss an die Präparation wurde die Integrität der isolierten RNA mit Hilfe des Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent, Waldbronn, Deutschland) kontrolliert. Gemessen wurden RNA-Konzentration, rRNA-Ratio (28s/18s) und RNA Integrität (RIN). Der Bioanalyzer 2100 misst die auf einen Chip aufgetragenen RNA-Proben anhand von laserinduzierter Fluoreszenz. Dies wird durch einen Farbstoff ermöglicht, der mit dem Gel vermischt in die Kanäle des Chips gebracht wird und sich direkt an die RNA anlagert. Das Ergebnis dieser Messung wird dann, wie in Abbildung 4 zu sehen, entweder in einem Diagramm oder in einer Elektrophoresedarstellung wiedergegeben. Gemessen wird die ribosomale RNA. Wenn diese RNA nachgewiesen werden kann und nicht degradiert ist, ist dies ein Beleg dafür, dass auch die Boten- (messenger-) RNA intakt ist. Die so gewonnene RNA wurde dann bei -80°C gelagert.

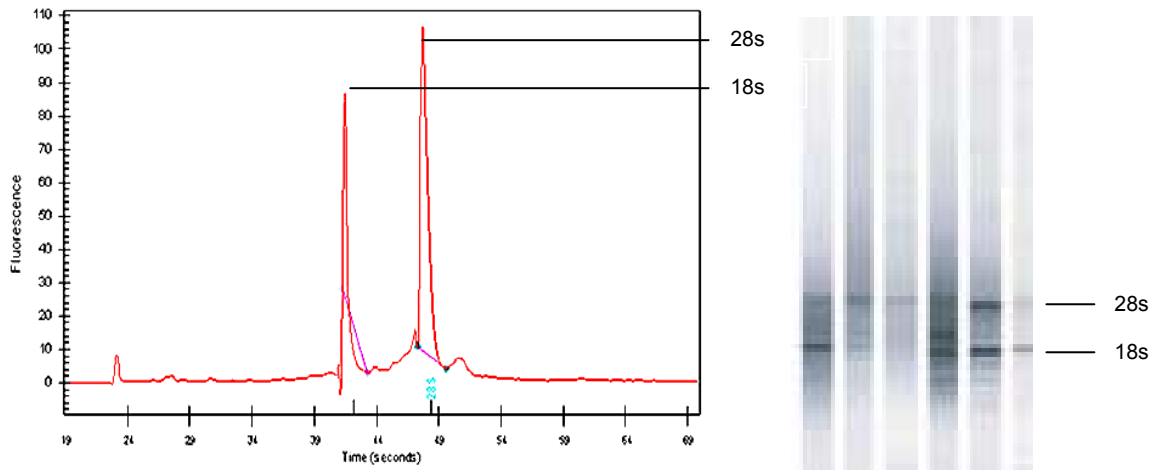


Abbildung 4: Beispielhafte Darstellung eines Ergebnisses des Agilent 2100 Bioanalyser. Links die graphische Darstellung der Messung der Fluoreszenz und rechts daneben die Elektrophoresedarstellung. Jeweils markiert ist die ribosomale RNA.

Tabelle 4: Vorgehen bei der RNA-Isolierung

Reagenz	Menge	Protokoll
Lysat	700 µl	Säule bei 11000 rpm 15 s zentrifugiert, Durchfluss verworfen
RW1 Waschpuffer	350 µl	11000 rpm 15 s zentrifugiert, Durchfluss verworfen
DNase I- incubation mix	80 µl	15 min bei Raumtemperatur inkubiert
RW1 Waschpuffer	350 µl	11000 rpm 15 s zentrifugiert, Durchfluss verworfen
RPE Puffer	500 µl	11000 rpm 15 s zentrifugiert, Durchfluss verworfen
RPE Puffer	500 µl	11000 rpm 2 Min zentrifugiert, Durchfluss verworfen
		11000 rpm 1 Min zentrifugiert, Trocknen
RNase-free water	30 µl	11000 rpm 1 Min zentrifugiert, eluierte RNA aufgefangen

### 3.5 Umschreibung der RNA zu komplementärer DNA

Um die RNA später in der PCR näher zu untersuchen, ist in diesem Zusammenhang eine Umschreibung der RNA in komplementäre DNA (cDNA) notwendig. RNA liegt immer nur in einzelnen Strängen vor. Da man aber in der real time PCR die Fluoreszenz eines Farbstoffes misst, der sich zwischen Doppelstränge lagert, kann RNA mit dieser Methode nicht gemessen werden. Daher ist die Umschreibung in cDNA erforderlich.

Diese Umschreibung der RNA wird mit Hilfe einer reversen Transcriptase durchgeführt. In diesem Fall wurde Superscript II RT (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Des Weiteren benötigt man für die Umschreibung oligo(dT) Primer, welche am Poly(A)-Schwanz der mRNA am 3'-Ende binden. Auch die verwendeten oligo(dT) Primer sowie alle weiteren Reagenzien wurden über Invitrogen bezogen. Für die Umschreibung wurde das Protokoll von Invitrogen angewendet. Die einzelnen Schritte sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Tabelle 5: RNA-Umschreibung in cDNA

Komponente	Menge	Konzentration	Protokoll
RNA-Suspension	22 µl	abhängig von der Präparation	alle Komponenten gemischt, 5 Min auf 65°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert
Oligo(dt) Primer	2 µl	500 µg/ml	
dNTP Mix	2 µl	jeweils 10 nM	
5x First-Strand Buffer	8 µl		alle Komponenten zum Ansatz hinzugegeben, 2 Min bei 42°C inkubiert
DTT	4 µl	0,1 M	
RNaseOut	2 µl	80 units	
Superscript II RT	2 µl	400 units	zum Ansatz hinzugegeben, 50 Min bei 42°C
			die Reaktion gestoppt durch Erhitzen auf 75°C für 15 Min



### 3.6 Ansatz und Durchführung Real-Time PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Methode, mit der es möglich ist, Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA) zu vervielfältigen. Das Prinzip der PCR beruht auf einer exponentiellen Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnittes. Dies wird ermöglicht durch ein wiederholtes Durchlaufen eines definierten Zyklus, in dem immer wieder die Kopien aus dem vorhergehenden Zyklus zusätzlich als neues Ausgangsmaterial verwendet werden.

Das besondere an der Real-Time PCR besteht darin, dass nach jedem Zyklus die amplifizierte Menge an Doppelstrang-DNA (dsDNA) gemessen wird. Dies wird ermöglicht durch Substanzen wie SYBR Green, die sich in Doppelstrang-DNA einlagern und dann fluoreszieren. Mit zunehmender Menge des Produktes steigt somit auch die messbare Fluoreszenz. Diese Zunahme an Fluoreszenz wird detektiert und in einem Kurvendiagramm dargestellt. Dieses System setzt allerdings voraus, dass dsDNA gebildet wird. Daher kann hier, wie oben erwähnt, keine RNA gemessen werden.

Am Anfang der Real-Time PCR erfolgte eine längere Phase der Denaturierung von 10 Minuten, um wirklich alle dsDNA zu denaturieren. Nach dieser anfänglichen Denaturierung wird ein vorher definierter Zyklus wiederholt durchlaufen.

Jeder Zyklus besteht aus drei Phasen: Denaturierung, Anlagerung der Primer an die DNA (Annealing) und Aufbau eines komplementären Stranges (Elongation). Die Denaturierung bezeichnet das Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Doppelsträngen und findet bei ca. 95°C statt. Beim Annealing handelt es sich um die Bindung des Primers an die nun einzeln vorliegenden Stränge der DNA. Dies geschieht am effektivsten bei einer Temperatur, die ca. 2°C unter der Schmelztemperatur des Primers liegt. Hier ist die Bindungsfähigkeit des Primers am besten. Bei der Elongation wird nun von den Primern ausgehend der DNA-Strang repliziert. Dies geschieht mit Hilfe einer hitzebeständigen Polymerase. Die hier verwendete Taq-Polymerase arbeitet bei einer Temperatur von 72°C am effektivsten.

Am Ende der Real-Time PCR, wenn die gewünschte Zykluszahl durchlaufen war, wurde ein Dissoziationsprotokoll durchgeführt. Hierbei wurde das Produkt langsam erhitzt und der Schmelzpunkt ermittelt. Jedes Produkt hat, je nach Länge und Sequenz, einen

eigenen Schmelzpunkt. Man kann so feststellen ob wirklich nur das gewünschte Produkt amplifiziert wurde.

Tabelle 6: Darstellung des verwendeten PCR-Programms

PCR-Programm						Dissoziationsprotokoll
Wiederholung	1 Zyklus		40 Zyklen			1 Zyklus
Temperatur	50°C	95°C	95°C	63°C	72°C	Start bei 60°C
Zeit	2 Min	10 Min	15 s	30 s	30 s	20 Min

Für diese Arbeit wurde das ABI Prism 5700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die Proben wurden in 8-Well-Streifen (8-well reaction optical tubes/strips, PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) mit einem Volumen von jeweils 25 µl angesetzt. Jeder Ansatz setzt sich zusammen aus 12,5 µl SYBR Green PCR Master Mix (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland), 0,5 µl reverse Primer, 0,5 µl forward Primer (alle Primer von TIB MOLBIOL, Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland), 4 µl cDNA und 7,5 µl sterilem Wasser. Die genaue Zusammensetzung eines 25 µl Ansatzes ist noch einmal in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: PCR Ansatz

PCR Ansatz 25 µl	
Komponente	Menge in µl
SYBR Green PCR Master Mix	12,5
forward Primer (0,1µM)	0,5
reverse Primer (0,1µM)	0,5
cDNA	4
steriles Wasser	7,5

Die Proben wurden während der ganzen Zeit der Vorbereitung auf Eis gestellt, um eine Degradierung der DNA zu verhindern. Zuerst wurden die Primer zusammen mit dem SYBR Green Mastermix in einem 10x Ansatz gemischt und anschließend mit der cDNA versetzt. Dann wurde dieser Ansatz auf die entsprechenden Wells verteilt. Alle Proben wurden in Dreierbestimmungen gemessen. Bei jedem Lauf lief für jeden Primer eine positiv und eine negativ Kontrolle mit. Die Wells wurden mit durchsichtigen Deckeln (optical caps, PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) versehen und kurz zentrifugiert, um Blasen zu entfernen und evtl. am Rand haftende Tropfen nach unten ins Well zu bekommen.

Zur Beurteilung der relativen Expression der mRNA wird ein so genanntes Haushaltsgen benötigt. Man geht davon aus, dass diese Haushaltsgene weitestgehend unreguliert abgelesen werden und so das Produkt in immer gleicher Konzentration in einem Gewebe oder einer Zelle exprimiert wird. Somit kann die Expression anderer Gene in Relation zu der Expression dieser Haushaltsgene gesetzt werden. Bei der Wahl des Haushaltsgens kommt es darauf an, aus welchem Gewebe die Probe gewonnen wurde. In diesem Fall wurde das untersuchte Material aus PBMC isoliert. Hierfür hat sich  $\beta$ -Actin als gutes Haushaltsgen erwiesen [101].

### **3.6.1 Primerdesign und Effizienzprüfung**

Die Primer wurden alle mit der Software Primer Version 0.5 (Whitehead Institute for Biomedical Research) mit strengen Parametern entworfen. Es wurde darauf geachtet, dass die Primer intronübergreifend sind, um sicher zu stellen, dass sie nur an cDNA binden können. Weitere Vorgaben für die Auswahl der Primer war die Produktgröße, die zwischen 170 und 220 bp liegen sollte, sowie die Schmelztemperatur, die für alle Primer bei  $60^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  festgelegt wurde. Alle verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Bevor die Primer in der PCR verwendet wurden, wurde deren Effizienz ermittelt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe angelegt und ein logarithmisches Kurvendiagramm anhand der Ct-Werte erstellt. Der Ct-Wert stellt die Anzahl der durchlaufenen Zyklen dar, bis die Menge der detektierten Fluoreszenz eine definierte Schwelle durchbricht. Die Verdünnungsreihe startete mit einer Verdünnung der cDNA von 1:4 und ging dann

über 1:40 und 1:400 bis 1:4000. Mit Hilfe dieser Kurve konnte dann die Effizienz für jeden Primer mit folgender Formel errechnet werden:

$$E = 10^{1/\text{Steigung}}$$

Mit Steigung ist hier der Anstieg der Kurve der nachweisbaren dsDNA im Laufe der PCR gemeint. Der Wert für die Effizienz sollte nach Möglichkeit 2,00 erreichen. Dies würde bedeuten, dass sich die Menge der dsDNA pro Zyklus verdoppelt. In diesem Fall würde die PCR optimal arbeiten. Das heißt aber auch, dass rein theoretisch keine Effizienz über 2,00 existieren kann. Auf Grund von Messungenauigkeiten kann dies aber vorkommen. Es wurde demzufolge ein Wert von 2,00 ( $\pm 0,1$ ) angestrebt.

Im durchgeführten Dissoziationsprotokoll konnte für jeden Primer überprüft werden, ob wirklich nur ein Gipfel zu sehen war und damit auch nur ein Produkt vorhanden war. Wenn mehrere Produkte zu erkennen waren, musste die Sequenz dieses Primers geändert werden.

Tabelle 8: Darstellung der Primersequenzen und Effizienzen sowie die Gen Datenbank Acc.-Nr.

<b>Untereinheit/ Gen Daten- Bank Acc. Nr.</b>	<b>Primersequenz (5' – 3')</b>	<b>Größe des erwarteten Produktes (bp)</b>
<b>β1 (Delta)/ NM_002798</b>	F: CAA_GCT_GAC_ACC_TAT_TCA_CGA_C R: CGG_TAT_CGG_TAA_CAC_ATC_TCC_T	177
<b>β2 (Z)/ NM_002799</b>	F: ATC_GCT_GGG_GTG_GTC_TAT_AAG R: AAG_AAA_TGA_GCT_GGG_TTG_TCA_T	176
<b>β5 (MB1)/ NM_02797</b>	F: GGC_AAT_GTC_GAA_TCT_ATG_AGC R: GTT_CCC_TTC_ACT_GTC_CAC_GTA	176
<b>β1i (LMP2) / U01025</b>	F: CAA_CGT_GAA_GGA_GGT_CAG_GTA R: AGA_GCA_ATA_GCG_TCT_GTG_GTG	170
<b>β2i (MECL1)/ Y13640</b>	F: AAT_GTG_GAC_GCA_TGT_GTG_AT R: CAT_AGC_CTG_CAC_AGT_TTC_CTC	180
<b>β5i (LMP7)/ U17497.</b>	F: CAC_GGG_TAG_TGG_GAA_CAC_TTA R: ACT_TTC_ACC_CAA_CCA_TCT_TCC	180
<b>a3(C9)/ NM_002789</b>	F: GGA_GCC_AAT_ACC_TTG_TGA_GC R: CAT_CCC_CCG_TAA_TTT_CCA_C	171
<b>β-Actin BC002409</b>	F: CTG_GAC_TTC_GAG_CAA_GAG_ATG R: TGA_AGG_TAG_TTT_CGT_GGA_TGC	178

### 3.6.2 Analyse der Daten der Real-Time PCR

Zunächst wurden im Dissoziationsprotokoll die Schmelzpunkte der PCR Produkte und somit deren Reinheit kontrolliert. Wie schon bei den Primern erwähnt, darf nur ein großer Gipfel in der Kurve zu sehen sein. Wenn mehrere Gipfel zu sehen sind, spricht dies für mehrere Produkte und damit für eine Verunreinigung der Probe.

Die Messung der Fluoreszenz der PCR Produkte wurde in einem Kurvendiagramm dargestellt. Hier musste dann ein sogenannter Schwellenwert (Threshold) gesetzt werden, der im Bereich des linearen Anstieges der Kurve zu positionieren ist. In diesem Bereich arbeitet die PCR optimal. An der Stelle, an der dann die Kurve den Threshold kreuzt, ist der entsprechende Ct-Wert zu dieser Probe abzulesen. Der Ct-Wert gibt die Zahl der Zyklen an, die benötigt wurden, bis die Kurve diese Schwelle überschritten hat. Dies ist dann ein relatives Maß für die Menge an cDNA, die zu Anfang der PCR in der Probe war. Je höher der Ct-Wert, desto mehr Zyklen wurden benötigt, um eine bestimmte Menge an dsDNA zu produzieren, und desto weniger cDNA war zu Beginn der PCR in der Probe. Das Programm listete dann alle Ct-Werte in einer Tabelle auf, so dass diese zur Weiterbearbeitung in das Programm Microsoft Excel exportiert werden konnten. Hier wurden zuerst die Ct-Werte der einzelnen Dreierbestimmungen verglichen und dann wurde ein Mittelwert gebildet. Die Ct-Werte durften hierfür nicht mehr als 0,5 Zyklen voneinander abweichen. Falls dies doch der Fall war, durften diese nicht mehr zur weiteren Analyse genutzt werden.

Die Berechnung der relativen Expression der Untereinheiten erfolgte nun nach der  $\Delta$ Ct-Methode. Da man die Expression sowohl für  $\beta$ -Actin als auch für alle untersuchten Untereinheiten aus demselben Zelllysate bestimmt, kann hier die  $\Delta$ Ct-Methode angewendet werden [102]. Dies geschieht, indem man den Ct-Wert des Haushaltsgens von dem Ct-Wert des Zielgens - in diesem Fall der gebildete Mittelwert - subtrahiert ( $Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{(Haushaltsgen)}} = \Delta$ Ct) und anschließend in folgende Formel einsetzt:

$$2^{-\Delta Ct} = \text{relative Genexpression}$$

So wird die Genexpression der beobachteten Untereinheiten in Relation zur Genexpression des Haushaltsgens  $\beta$ -Actin bestimmt.

### **3.7 Statistik**

Die relative Expression der verschiedenen Gene wurde nun gruppenweise verglichen. Hierfür wurden Mittelwerte, Standardabweichungen und P-Werte mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism Version 3.03 berechnet. Zur Berechnung der Werte wurde der nichtparametrische Mann Whitney U-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % angewendet. Es wurde ein nichtparametrischer Test ausgewählt, da die Anzahl der Probanden relativ gering war und somit nicht zwangsläufig von einer Gaus-Normalverteilung ausgegangen werden konnte.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Ergebnis der Zellisolation aus dem Blut aller Probanden

Die durchschnittlichen Zellzahlen, die aus 30 ml Blut eines jeden Probanden mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung gewonnen wurden, sind in Tabelle 9 aufgeführt:

Tabelle 9: Durchschnittliche Zellzahlen nach fluoreszenzaktivierter Zellsortierung

<b>Population</b>	<b>Zellzahl (x 10<sup>6</sup>)</b>	<b>± Standardabweichung (x 10<sup>6</sup>)</b>
CD4+	4,4	2,2
CD8+	1,6	1,0
CD14+	1,2	0,6
CD 19+	0,9	0,7

Die durchschnittliche Zellzahl der mittels magnetaktivierter Zellsortierung aus 30 ml Blut eines jeden Probanden isolierten dendritischen Zellen ist in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Durchschnittliche Zellzahl nach magnetaktivierter Zellsortierung

<b>Population</b>	<b>Zellzahl (x 10<sup>6</sup>)</b>	<b>± Standardabweichung (x 10<sup>6</sup>)</b>
DZ	0,3	0,2



## 4.2 Ermittlung der Primereffizienz

Die Effizienzen der Primer wurden wie im Methodenteil dargestellt ermittelt. Alle verwendeten Primer zeigten eine Effizienz von 1,91 bis 2,10. In Tabelle 11 sind alle Primerpaare mit den ermittelten Effizienzen aufgeführt. Als Beispiel wird hier in Abbildung 5 das Ergebnis für die Effizienzprüfung von  $\beta$ -Actin gezeigt.

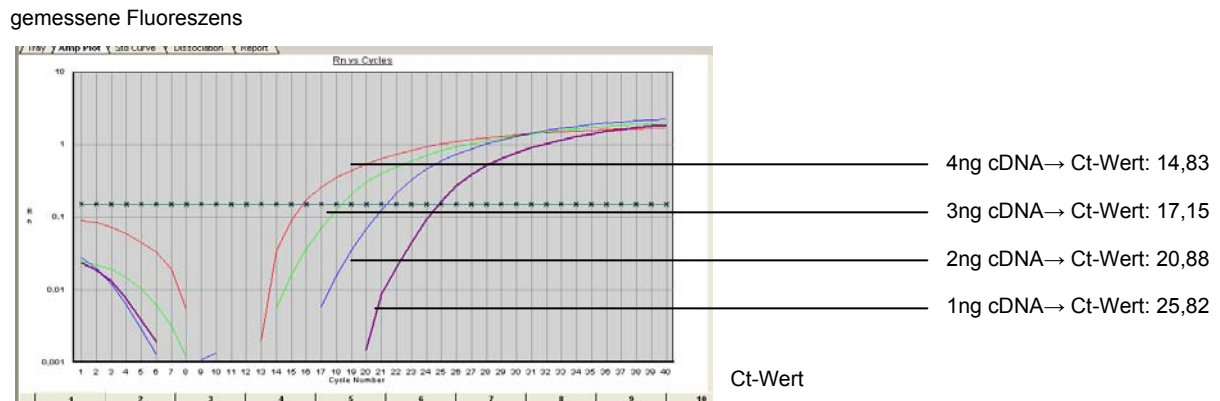


Abbildung 5: Beispiel für die Darstellung der PCR-Amplifikation bei der Effizienzprüfung der verwendeten  $\beta$ -Actin Primer. Auf der X-Achse sind die Ct-Werte und auf der Y-Achse sind die gemessenen Fluoreszenzen aufgetragen. Zu sehen ist ein deutlicher Anstieg der Ct-Werte mit abnehmender Menge an cDNA.

An diesem Beispiel kann man deutlich sehen, wie der Ct Wert für die unterschiedlichen Konzentrationen mit abnehmender Menge an cDNA antiproportional zunimmt. Im Diagramm (Abbildung 6) stellt sich dies dann als lineare Abhängigkeit zwischen Ct-Wert und Konzentration dar.

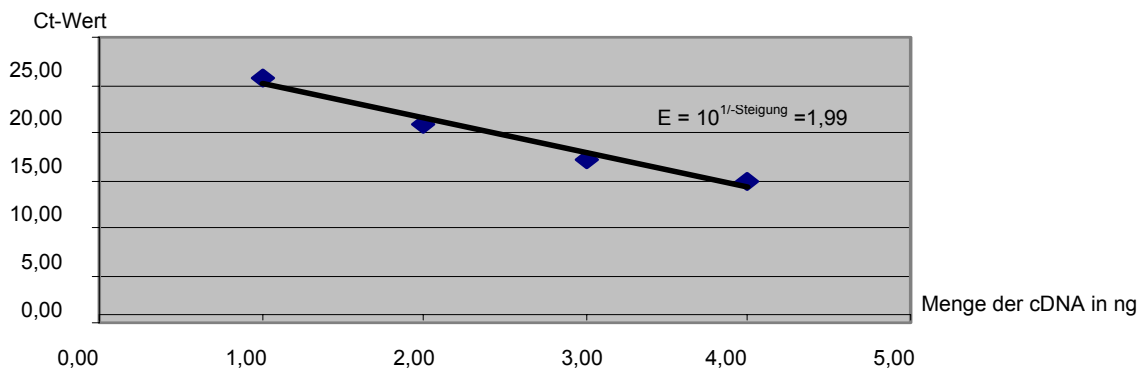


Abbildung 6: Beispiel für die Ermittlung der Effizienz der verwendeten  $\beta$ -Actin Primer. Auf der Y-Achse sind die Ct-Werte aufgetragen und auf der X-Achse ist die eingesetzte Menge an cDNA (umgerechnet aus der Menge an RNA) in ng abgebildet. Berechnet wurde die Effizienz nach der Formel:  $E = 10^{1/-Steigung}$ .

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Güte der Primer zeigt das Dissoziationsprotokoll in Abbildung 7 (wiederum stellvertretend  $\beta$ -Actin). Wenn im Dissoziationsprotokoll nur ein Gipfel zu sehen ist, ist die Reinheit des amplifizierten Produktes gegeben.

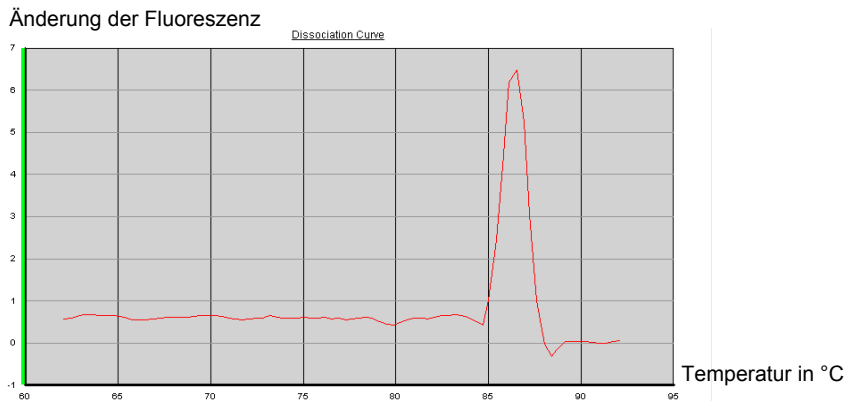


Abbildung 7: Beispiel für ein Dissoziationsprotokoll nach Amplifikation eines 178 bp langen Fragmentes aus dem  $\beta$ -Actin Transcript. Auf der X-Achse ist die Temperatur aufgetragen. Auf der Y-Achse die Ableitung der Fluoreszenzveränderung. Der Gipfel der Kurve zeigt die Schmelztemperatur des Produktes. Dass hier nur ein Gipfel zu sehen ist, lässt darauf schließen, dass nur das gewünschte Produkt amplifiziert wurde.

Tabelle 11: Ermittelte Primereffizienzen für alle verwendeten Primerpaare

Primerpaar	Effizienz	Primer	Effizienz
$\beta$ 1 (delta)	1,99	$\beta$ 1i (LMP2)	2,05
$\beta$ 2 (Z)	2,00	$\beta$ 2i (MECL1)	2,10
$\beta$ 5 (MB1)	1,99	$\beta$ 5i (LMP7)	1,91
$\alpha$ 3 (C9)	1,97	$\beta$ -Actin	1,99

### 4.3 Ergebnisse der Real-Time PCR

Die Ergebnisse der Real-Time PCR wurden ebenfalls, wie im Methodenteil beschrieben, ausgewertet und interpretiert. In Abbildung 8 dargestellt ist das Ergebnis für die Real-Time PCR, welches, beispielhaft für alle Proben, die Darstellung eines Kurvendia-gramms des gemessenen dsDNA- bzw. Fluoreszenzzuwachses zeigt. Die gemessene Probe stammt in diesem Fall von Patient Nr. 4. Bei den analysierten Zellen und verwendeten Primerpaaren handelt es sich um die CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten und die Primerpaare für die Untereinheit  $\beta$ i (LMP2) sowie das Haushaltsgen  $\beta$ -Actin.

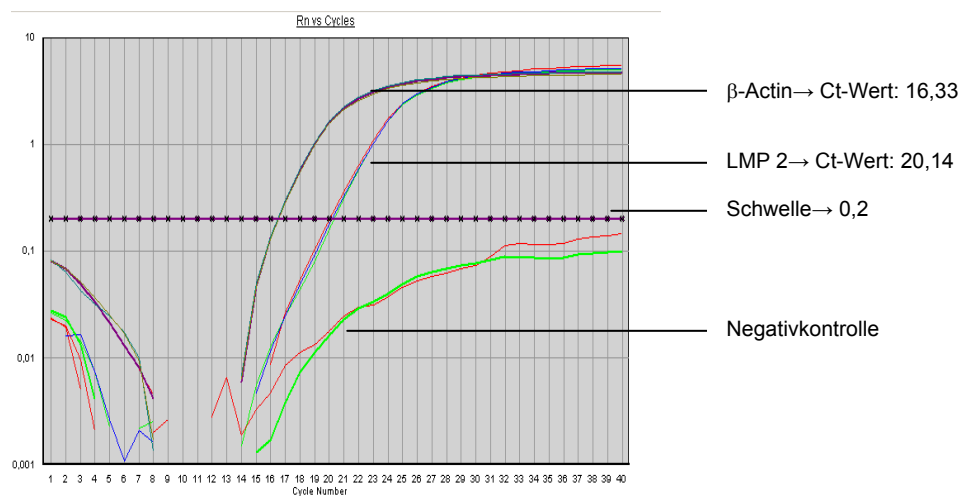


Abbildung 8: Beispielhafte Darstellung der dsDNA Amplifizierung in der Real-Time PCR. Auf der X-Achse sind die Ct-Werte und auf der Y-Achse ist die Fluoreszenz aufgetragen. Dargestellt ist die Messung der cDNA, die aus CD8<sup>+</sup> Zellen gewonnen wurde. Stellvertretend wurden die Primerpaare für die Untereinheit LMP2 und das Haushaltsgen  $\beta$ -Actin ausgewählt. Darüber hinaus ist die gewählte Schwelle zu sehen, deren Schnittpunkt mit den Messkurven die Ct-Werte ergibt. Die Messkurven der Negativkontrollen überschreiten den Schwellenwert nicht.

#### 4.4 Relative Genexpression der Untereinheiten des Proteasoms

##### 4.4.1 Relative Genexpression der konstitutiven Untereinheit $\alpha 3$ (C9) in der Kontrollgruppe

Zuerst wurde die relative Genexpression einer konstitutiven, nicht austauschbaren Untereinheit gemessen. In der Kontrollgruppe war die relative Expression dieser Untereinheit  $\alpha 3$  (C9) in allen analysierten Zellpopulationen auf einem ähnlichen Niveau. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 9).

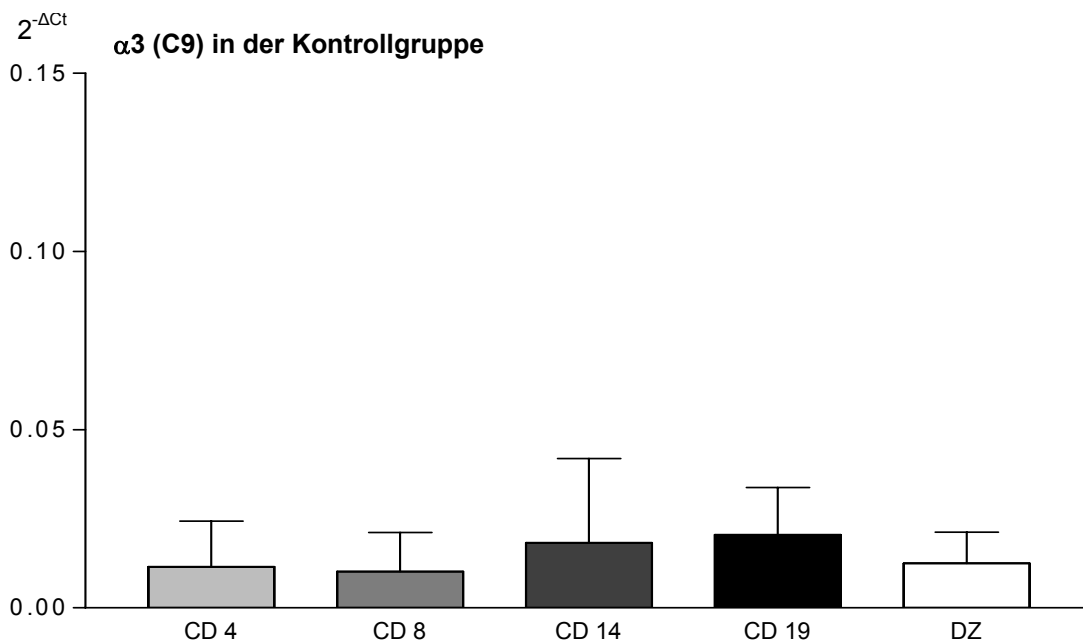


Abbildung 9: Darstellung der relativen Genexpression der konstitutiven Untereinheit des Proteasoms in der Kontrollgruppe. Die Y-Achse zeigt die relative Genexpression ( $2^{-\Delta Ct}$ ) und auf der X-Achse sind die Subpopulationen der analysierten Zellen aufgetragen. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellpopulationen zu ermitteln. Zur Erstellung des Balkendiagramms wurden der Mittelwert und die Standardabweichung verwendet.

#### 4.4.2 Relative Genexpression der konstitutiven Untereinheit $\alpha 3$ (C9) im Patientenkollektiv

Im Gegensatz zu der Kontrollgruppe wurde im Patientenkollektiv eine signifikante Induktion der relativen Genexpression von der konstitutiven Untereinheit  $\alpha 3$  (C9) in CD19<sup>+</sup> B-Zellen im Vergleich zu den dendritischen Zellen ( $P < 0,01$ ) sowie zu CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ) nachgewiesen (Abbildung 10).

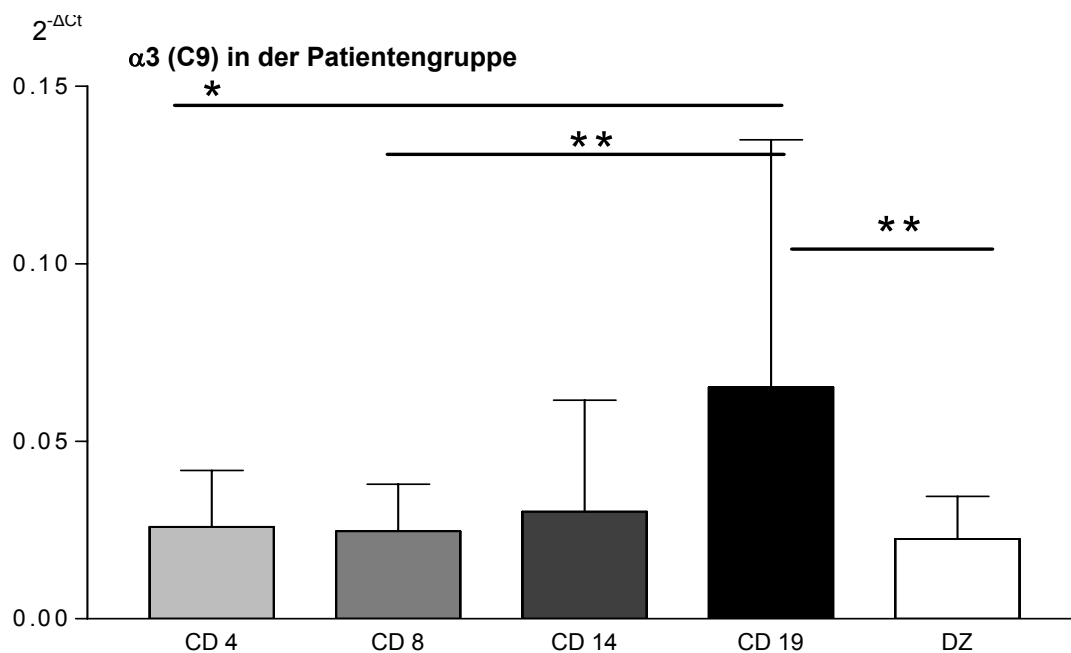


Abbildung 10: Darstellung der relativen Genexpression der konstitutiven Untereinheit des Proteasoms in der Patientengruppe. Die Y-Achse zeigt die relative Genexpression ( $2^{-\Delta Ct}$ ) und auf der X-Achse sind die Subpopulationen der analysierten Zellen aufgetragen. Die signifikanten Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet, wobei \* = P-Wert < 0,05, \*\* = P-Wert < 0,01, \*\*\* = P-Wert < 0,001. Zur Erstellung des Balkendiagramms wurden der Mittelwert und die Standardabweichung verwendet.

#### 4.4.3 Vergleich der Genexpression der konstitutiven Untereinheit $\alpha 3$ (C9) zwischen dem Patientenkollektiv und der Kontrollgruppe

Beim Vergleich der relativen Genexpression der konstitutiven Untereinheit  $\alpha 3$  (C9) zwischen den Patienten- und den Kontrollgruppen konnte dann festgestellt werden, dass die relative Genexpression der Untereinheit  $\alpha 3$  (C9) im Patientenkollektiv in den CD19<sup>+</sup> B-Zellen ( $P < 0,01$ ), den dendritischen Zellen ( $P < 0,05$ ) und den CD8<sup>+</sup> T-Zellen ( $P < 0,05$ ) signifikant hoch reguliert war (Abbildung 11). Es ist anzumerken, dass auch hier die CD19<sup>+</sup> B-Zellen den deutlichsten signifikanten Unterschied zwischen den Patienten und Kontrollen aufwiesen.

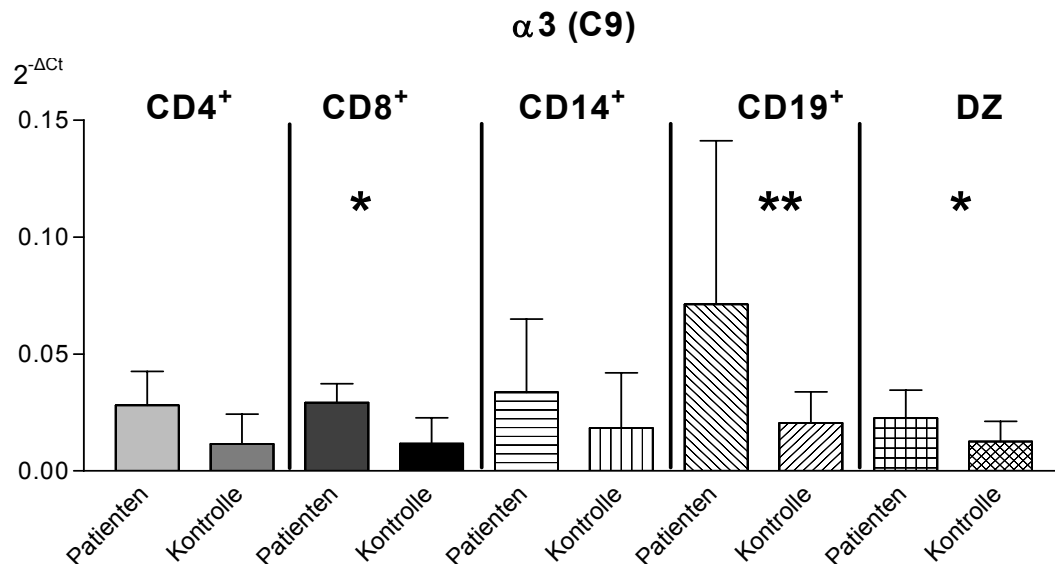


Abbildung 11: Darstellung der relativen Genexpression der konstitutiven Untereinheit  $\alpha 3$  (C9) des Proteasoms im Vergleich zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe. Auf der Y-Achse ist die relative Genexpression ( $2^{-\Delta Ct}$ ) aufgetragen und auf der X-Achse die Gruppen bzw. Subpopulationen der isolierten Zellen. Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet, wobei \* = P-Wert < 0,05, \*\* = P-Wert < 0,01 und \*\*\* = P-Wert < 0,001. Zur Erstellung des Balkendiagramms wurden der Mittelwert und die Standardabweichung verwendet.

#### **4.4.4 Relative Genexpression der konstitutiven, katalytischen Untereinheiten $\beta 1$ (delta), $\beta 2$ (Z) und $\beta 5$ (MB1) in der Kontrollgruppe**

Im Anschluss wurde die relative Genexpression der konstitutiven, katalytischen Untereinheiten  $\beta 1$  (delta),  $\beta 2$  (Z) und  $\beta 5$  (MB1) zwischen den analysierten Zellpopulationen innerhalb der Kontrollgruppe verglichen. Die Genexpression der verschiedenen Untereinheiten lag in allen Zellpopulationen auf einem vergleichbaren Niveau. Dennoch gab es signifikante Unterschiede zwischen den Zellpopulationen, welche insbesondere bei den CD19<sup>+</sup> B-Zellen zu beobachten waren. Hier waren die konstitutiven Untereinheiten im Vergleich zu den anderen untersuchten Zellpopulationen auf einem höheren Niveau exprimiert (Abbildung 11 a-c).

Die Untereinheit  $\beta 1$  (delta) war in den CD19<sup>+</sup> B-Zellen gegenüber den dendritischen Zellen signifikant hoch reguliert ( $P < 0,01$ ). In den anderen Zellpopulationen zeigte sich keine Erhöhung der relativen Genexpression auf mRNA-Ebene (Abbildung 11 a).

Auch  $\beta 2$  (Z) war in den CD19<sup>+</sup> B-Zellen hoch reguliert, wenn man diese mit den dendritischen Zellen ( $P < 0,01$ ), den CD14<sup>+</sup> Monozyten ( $P < 0,01$ ) oder den CD8<sup>+</sup> T-Zellen ( $P < 0,05$ ) vergleicht (Abbildung 11 b).

Die relative Genexpression von  $\beta 5$  (MB1) war ebenfalls in den CD19<sup>+</sup> B-Zellen erhöht ( $P < 0,05$ ) im Vergleich zu CD14<sup>+</sup> Monozyten. Tendenziell kann allerdings für  $\beta 5$  (MB1) eher ein relativ niedriges Niveau der Genexpression, im Vergleich zu den anderen Untereinheiten, beschrieben werden (Abbildung 11 a-c). Es waren also einzelne Unterschiede zwischen den konstitutiven katalytischen Einheiten zu erkennen, welche sich zumeist auf die CD19<sup>+</sup> B-Zellen bezogen.

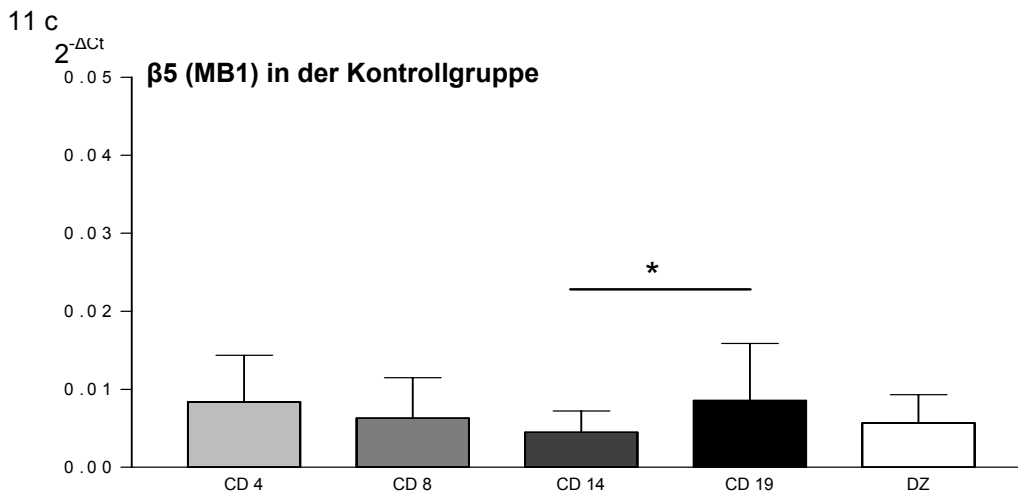
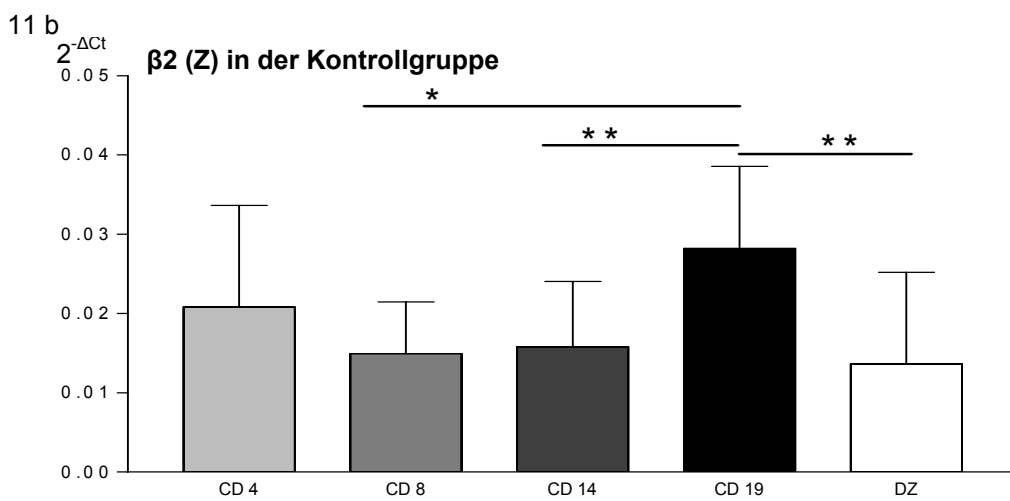
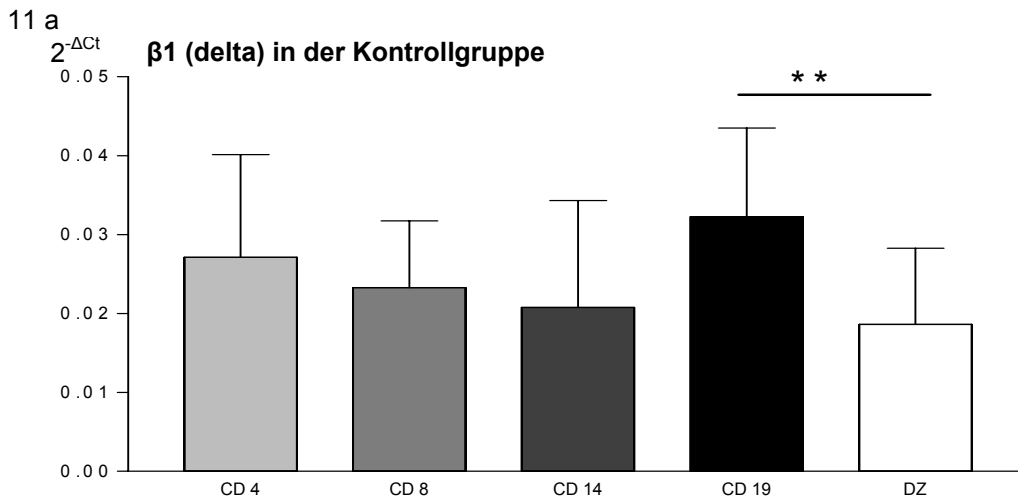


Abbildung 11 a-c: Darstellung der relativen Genexpression der drei konstitutiven Untereinheiten des Proteasoms in der Kontrollgruppe. Auf der Y-Achse ist die relative Genexpression ( $2^{-\Delta Ct}$ ) aufgetragen und auf der X-Achse die Subpopulationen der isolierten Zellen ( $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Lymphozyten,  $CD14^+$  Monozyten,  $CD19^+$  B-Lymphozyten und dendritische Zellen). Das Signifikanzniveau wurde durch Sternchen gekennzeichnet: \* = P-Wert < 0,05, \*\* = P-Wert < 0,01, \*\*\* = P-Wert < 0,001. Zur Erstellung des Balkendiagramms wurden, wie in allen folgenden Abbildungen, der Mittelwert und die Standardabweichung verwendet.



#### **4.4.5 Relative Genexpression der konstitutiven, katalytischen Untereinheiten $\beta$ 1 (delta), $\beta$ 2 (Z) und $\beta$ 5 (MB1) im Patientenkollektiv**

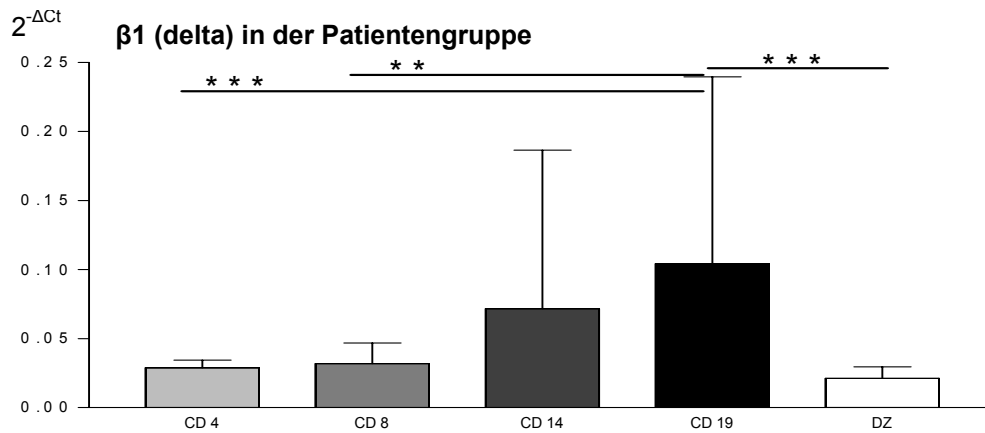
Auch in der Patientengruppe wurde die Genexpression der konstitutiven Untereinheiten bei den verschiedenen Zellpopulationen verglichen (Abbildung 12 a-c). Im Ergebnis war die relative Genexpression der konstitutiven Untereinheiten in den CD19<sup>+</sup> B-Zellen signifikant höher als in anderen analysierten Zellen. Die relative Genexpression auf mRNA-Ebene der drei Untereinheiten  $\beta$ 1 (delta),  $\beta$ 2 (Z) und  $\beta$ 5 (MB1) bei Patienten mit Sjögren-Syndrom stellte sich im Detail wie folgt dar.

Die Untereinheit  $\beta$ 1 (delta) war wie bei der Kontrollgruppe in CD19<sup>+</sup> B-Zellen signifikant höher exprimiert - im Vergleich zu den dendritischen Zellen ( $P < 0,0001$ ). Bei der Patientengruppe, anders als bei der Kontrollgruppe, aber zusätzlich auch im Vergleich zu den CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen ( $P < 0,01$  und  $P < 0,001$ ) (Abbildung 12 a).

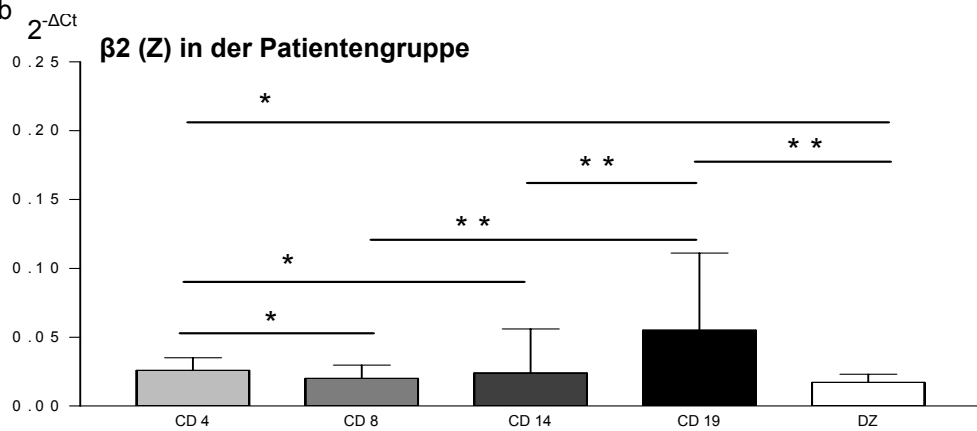
Der relative Genexpressionslevel der Untereinheit  $\beta$ 2 (Z) war sowohl in CD19<sup>+</sup> B-Zellen als auch in CD4<sup>+</sup> T-Zellen erhöht (Abbildung 12 b). In den CD19<sup>+</sup> B-Zellen war die mRNA Expression von  $\beta$ 2 (Z) verglichen mit dendritischen Zellen ( $P < 0,01$ ) sowie verglichen mit den CD14<sup>+</sup> Monozyten ( $P < 0,01$ ) und den CD8<sup>+</sup> T-Zellen ( $P < 0,01$ ) signifikant erhöht. In den CD4<sup>+</sup> T-Zellen war die Expression von  $\beta$ 2 (Z) gegenüber den CD8<sup>+</sup> T-Zellen ( $P < 0,05$ ), den CD14<sup>+</sup> Monozyten ( $P < 0,05$ ) und den dendritischen Zellen ( $P < 0,05$ ) signifikant erhöht.

Im Vergleich zu den dendritischen Zellen war auch die relative Genexpression in den CD19<sup>+</sup> B-Zellen ( $P < 0,05$ ) und den CD4<sup>+</sup> T-Zellen ( $P < 0,01$ ) von  $\beta$ 5 (MB1) signifikant erhöht (Abbildung 12 c). Interessant ist auch hier, wie in der Kontrollgruppe, dass die Untereinheit  $\beta$ 5 (MB1) tendenziell niedriger exprimiert wurde als die anderen beiden konstitutiven Untereinheiten (Abbildung 12 a-c).

12 a



12 b



12 c

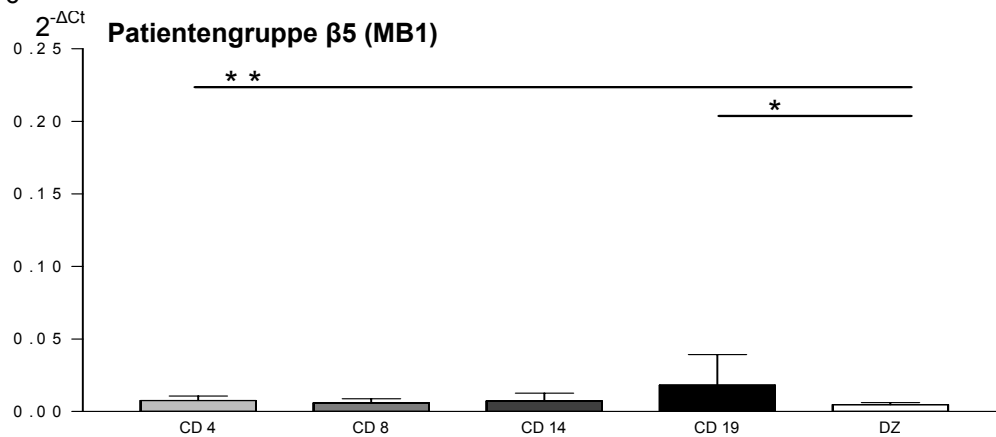


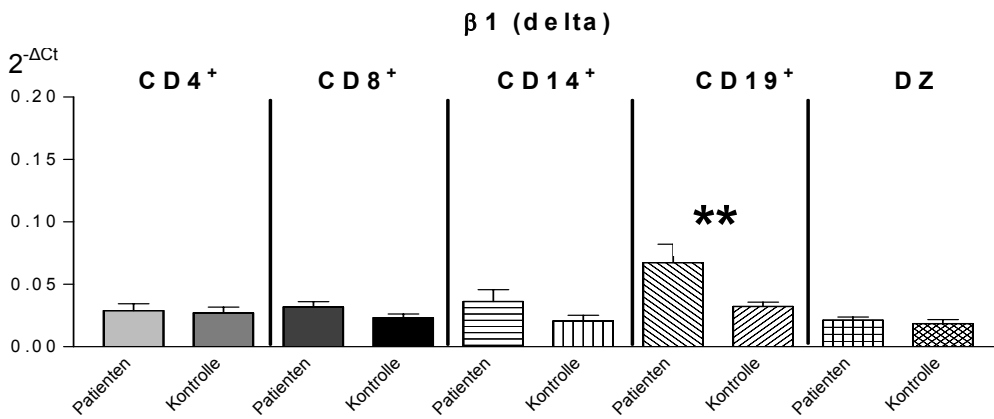
Abbildung 12 a-c: Darstellung der relativen Genexpression der konstitutiven Untereinheiten des Proteasoms in der Patientengruppe. Auf der Y-Achse ist die relative Genexpression ( $2^{-\Delta Ct}$ ) aufgetragen und auf der X-Achse sind die Gruppen bzw. Subpopulationen der PBMCs aufgetragen. Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet, wobei \* = P-Wert < 0,05, \*\* = P-Wert < 0,01 und \*\*\* = P-Wert < 0,001. Die Skala der Y-Achse ist zum besseren Vergleich einheitlich gewählt. Zur Erstellung des Balkendiagramms wurden der Mittelwert und die Standardabweichung verwendet.

#### **4.4.6 Vergleich der relativen Genexpression der konstitutiven Untereinheiten $\beta 1$ (delta), $\beta 2$ (Z) und $\beta 5$ (MB1) zwischen dem Patientenkollektiv und der Kontrollgruppe**

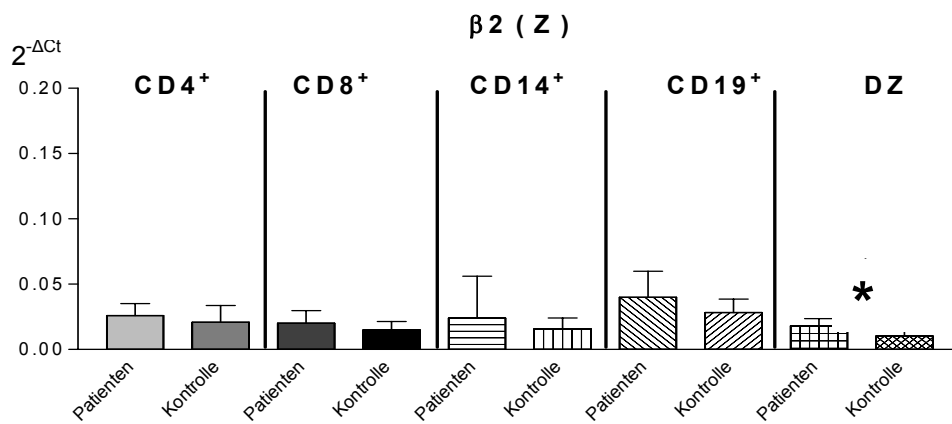
Wenn man nun die einzelnen Level der relativen Genexpression bei Patienten und Kontrollen miteinander vergleicht, zeigen sich auch hier signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Von den drei konstitutiven, katalytischen Untereinheiten konnte für zwei ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen Patienten und Kontrollen nachgewiesen werden. Dabei waren die Untereinheiten  $\beta 1$  (delta) und  $\beta 2$  (Z) in der Patientengruppe erhöht exprimiert (Abbildung 13 a+b). Dies konnte für  $\beta 1$  (delta) in den CD19<sup>+</sup> B-Zellen ( $P < 0,01$ ) (Abbildung 13 a) und für  $\beta 2$  (Z) in den dendritischen Zellen ( $P < 0,05$ ) (Abbildung 13 b) nachgewiesen werden.

Im Bezug auf die konstitutiven Untereinheiten war im Allgemeinen festzustellen, dass die Genexpression auf einem vergleichbaren Niveau erfolgte, wobei keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen auszumachen waren. Eine Ausnahme stellten jedoch die CD19<sup>+</sup> B-Zellen dar, wobei die relative Genexpression aller drei konstitutiven Untereinheiten in den CD19<sup>+</sup> Zellen der Patienten tendenziell höher ausfiel als in der Kontrollgruppe. Die relative Genexpression der Untereinheit  $\beta 5$  (MB1) war dabei im Vergleich zu den anderen beiden konstitutiven Untereinheiten erniedrigt.

13 a



13 b



13 c

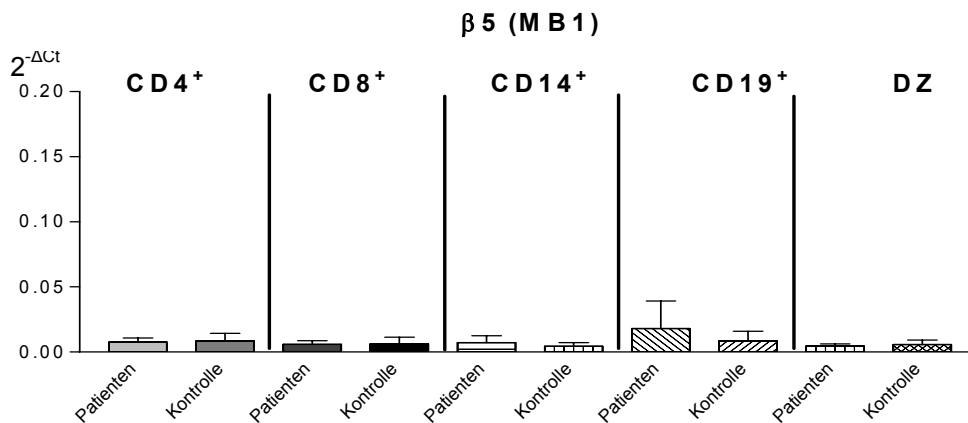


Abbildung 13 a-c: Darstellung der relativen Genexpression der konstitutiven Untereinheiten des Proteasoms im Vergleich zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe. Auf der Y-Achse ist die relative Genexpression ( $2^{-\Delta Ct}$ ) aufgetragen und auf der X-Achse sind die Gruppen bzw. Subpopulationen der PBMCs sichtbar. Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet, wobei \* = P-Wert < 0,05, \*\* = P-Wert < 0,01 und \*\*\* = P-Wert < 0,001. Die Skala der Y-Achse ist zum besseren Vergleich einheitlich gewählt. Zur Erstellung des Balkendiagramms wurden der Mittelwert und die Standardabweichung verwendet.

#### **4.4.7 Relative Genexpression der induzierbaren Untereinheiten $\beta$ 1i (LMP2), $\beta$ 2i (MECL1) und $\beta$ 5i (LMP7) in der Kontrollgruppe**

Die Genexpression der induzierbaren Untereinheiten,  $\beta$ 1i (LMP2),  $\beta$ 2i (MECL1) und  $\beta$ 5i (LMP7) wurden analog zu den konstitutiven Untereinheiten in der Kontrollgruppe untersucht und zwischen den verschiedenen Zellpopulationen miteinander verglichen (Abbildung 14 a-c).

Im Ergebnis konnte gezeigt werden, dass die relative Genexpression der induzierbaren Untereinheit  $\beta$ 1i (LMP2) in den  $CD14^+$  Monozyten verglichen mit den  $CD19^+$  B-Zellen ( $P < 0,05$ ) und gegenüber der  $CD8^+$  T-Zellen ( $P < 0,05$ ) signifikant erhöht war. Des Weiteren konnte eine Erhöhung der relativen Genexpression für  $\beta$ 1i (LMP2) in  $CD8^+$  ( $P < 0,001$ ) und  $CD4^+$  ( $P < 0,05$ ) T-Zellen sowie in  $CD19^+$  B-Zellen ( $P < 0,01$ ) im Vergleich zu den dendritischen Zellen festgestellt werden (Abbildung 14 a).

Die relative Genexpression von  $\beta$ 2i (MECL1) zeigte sich in der Kontrollgruppe als stabil. Hier gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zellpopulationen (Abbildung 14 b).

Im Gegensatz dazu war die Untereinheit  $\beta$ 5i (LMP7) in den  $CD19^+$  B-Zellen signifikant hoch reguliert, verglichen mit den dendritischen Zellen ( $P < 0,05$ ) sowie mit den  $CD8^+$  T-Zellen ( $P < 0,05$ ). Interessanterweise war auch hier wieder die relative Genexpression von  $\beta$ 5i (LMP7) tendenziell niedriger im Vergleich zu den anderen beiden Untereinheiten. Dies entspricht den Beobachtungen, die auch bei dem konstitutiven Gegenstück  $\beta$ 5 (MB1) gemacht werden konnten (Abbildung 14 c).

Als weitere Besonderheit - im Vergleich zu den konstitutiven Untereinheiten - ist neben der hohen relativen Genexpression der drei induzierbaren Untereinheiten in den  $CD19^+$  B-Zellen auch die relative Genexpression der Untereinheiten  $\beta$ 1i (LMP2) und  $\beta$ 2i (MECL1) in den  $CD14^+$  Monozyten gegenüber allen anderen Zellpopulationen erhöht. Hier ergibt sich jedoch zu anderen Zellpopulationen kein statistisch signifikanter Unterschied (Abbildung 14 a+b).

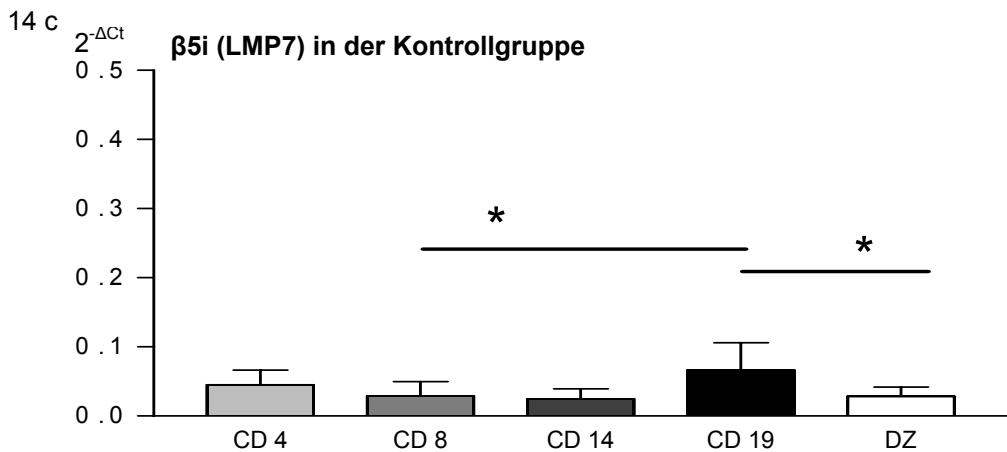
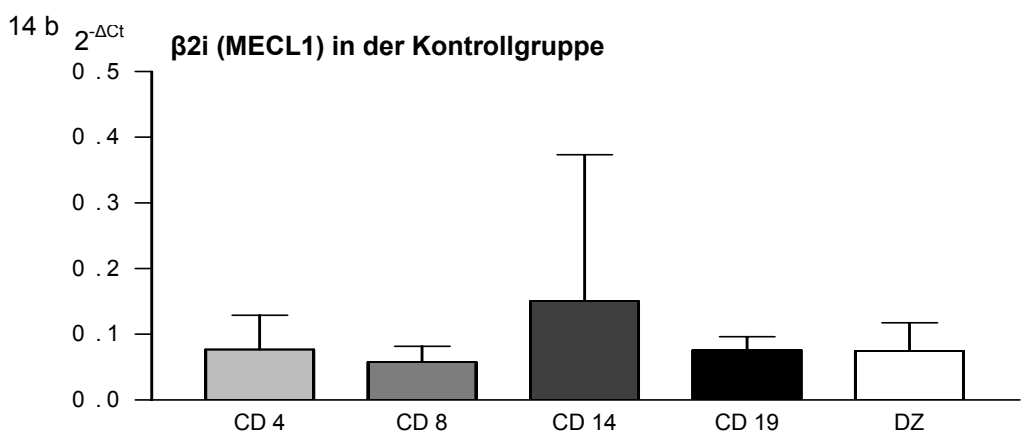
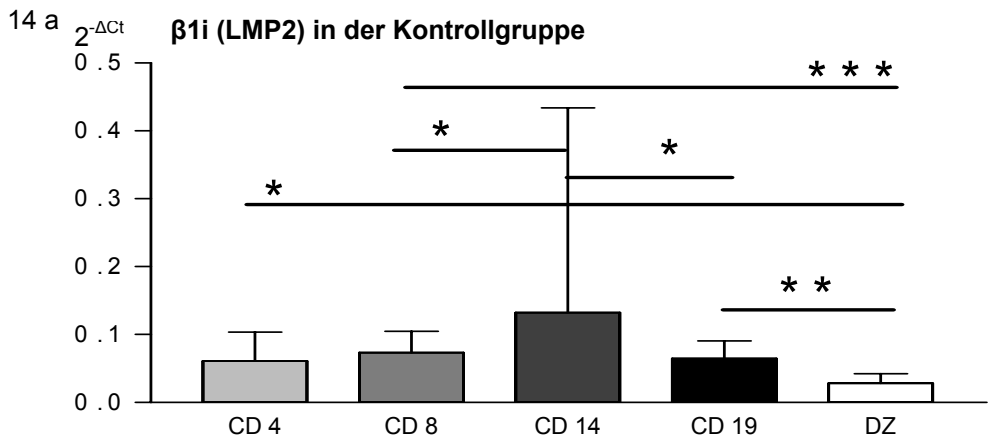


Abbildung 14 a-c: Darstellung der relativen Genexpression der drei induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms in der Kontrollgruppe. Auf der Y-Achse ist die relative Genexpression ( $2^{-\Delta Ct}$ ) aufgetragen und auf der X-Achse die Subpopulationen der isolierten Zellen ( $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Lymphozyten,  $CD14^+$  Monozyten,  $CD19^+$  B-Lymphozyten und dendritische Zellen). Das Signifikanzniveau wurde durch Sternchen gekennzeichnet: \* = P-Wert < 0,05, \*\* = P-Wert < 0,01, \*\*\* = P-Wert < 0,001. Zur Erstellung des Balkendiagramms wurden der Mittelwert und die Standardabweichung verwendet.

#### **4.4.8 Relative Genexpression der induzierbaren Untereinheiten $\beta$ 1i (LMP2), $\beta$ 2i (MECL1) und $\beta$ 5i (LMP7) im Patientenkollektiv**

Innerhalb der Patientengruppe ergaben sich beim Vergleich der Genexpression der induzierbaren Untereinheiten signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellpopulationen (Abbildung 15 a-c).

Die Untereinheit  $\beta$ 1i (LMP2) wurde in den CD19<sup>+</sup> B-Zellen sowie in den CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf einem signifikant höheren Level exprimiert als in den dendritischen Zellen ( $P < 0,001$ ,  $P < 0,01$ ,  $P < 0,01$ ). In den CD19<sup>+</sup> B-Zellen war die relative Genexpression von  $\beta$ 1i (LMP2) auch gegenüber den CD4<sup>+</sup> T-Zellen ( $P < 0,01$ ) erhöht (Abbildung 15 a).

Die relative Genexpression der Untereinheiten  $\beta$ 2i (MECL1) und  $\beta$ 5i (LMP7) war in den CD19<sup>+</sup> B-Zellen der Patienten gegenüber den dendritischen Zellen und den CD4<sup>+</sup> T-Zellen (beide  $P < 0,05$ ) signifikant erhöht (Abbildung 15 b+c).

Die Untereinheit  $\beta$ 5i (LMP7) wies darüber hinaus auch in den CD14<sup>+</sup> Monozyten im Vergleich zu den dendritischen Zellen ( $P < 0,05$ ) eine höhere relative Genexpression auf (Abbildung 15 c).

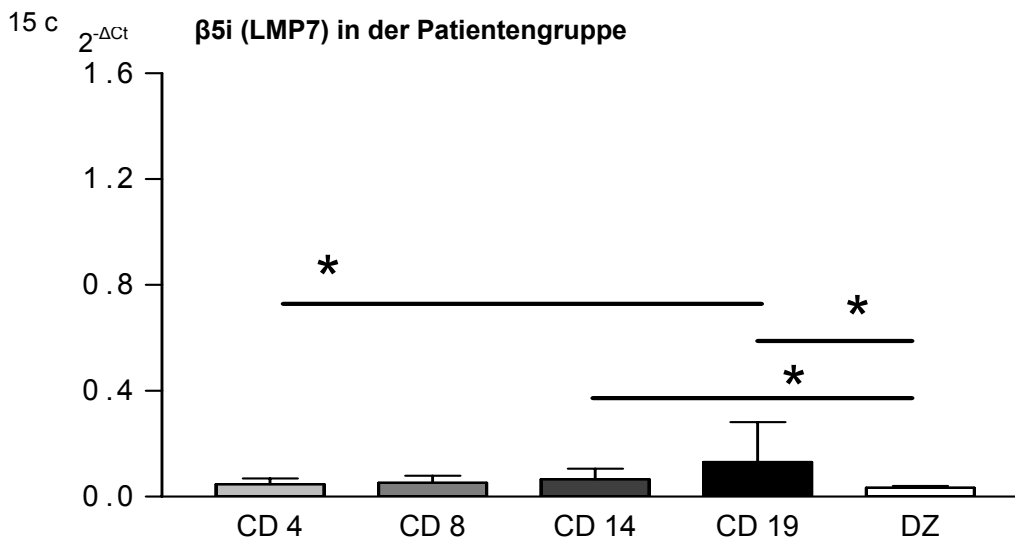
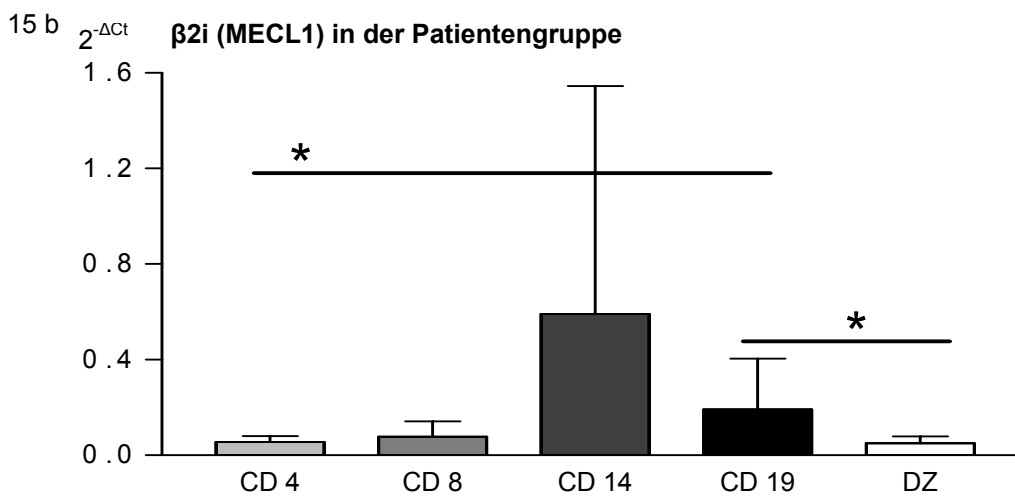
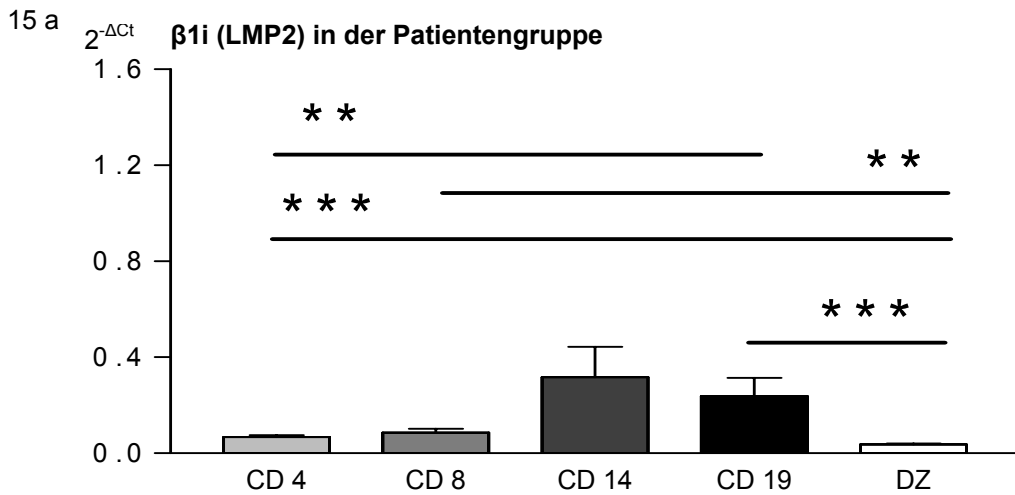


Abbildung 15 a-c: Darstellung der relativen Genexpression der drei induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms in der Patientengruppe. Auf der Y-Achse ist die relative Genexpression ( $2^{-\Delta Ct}$ ) aufgetragen und auf der X-Achse sind die Subpopulationen der isolierten Zellen ( $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Lymphozyten,  $CD14^+$  Monozyten,  $CD19^+$  B-Lymphozyten und dendritische Zellen) aufgetragen. Das Signifikanzniveau wurde durch Sternchen gekennzeichnet: \* = P-Wert < 0,05, \*\* = P-Wert < 0,01, \*\*\* = P-Wert < 0,001. Zur Erstellung des Balkendiagramms wurden der Mittelwert und die Standardabweichung verwendet.



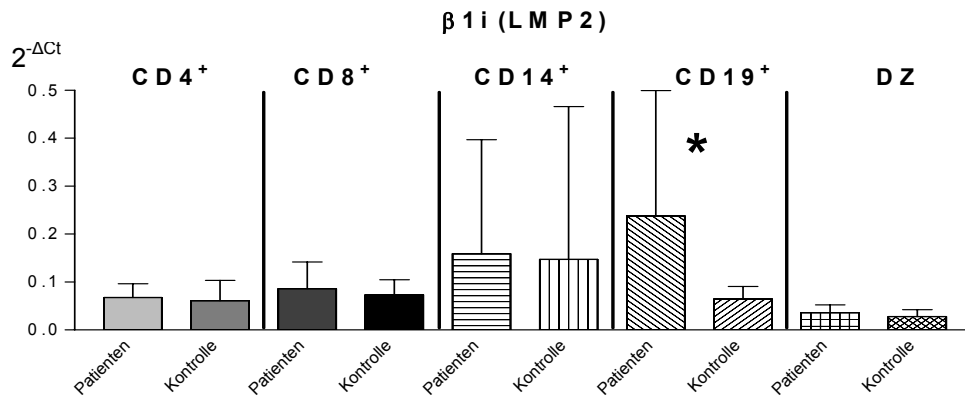
#### **4.4.9 Vergleich der relativen Genexpression der induzierbaren Untereinheiten $\beta$ 1i (LMP2), $\beta$ 2i (MECL1) und $\beta$ 5i (LMP7) zwischen dem Patientenkollektiv und der Kontrollgruppe**

Bei der anschließenden Untersuchung der relativen Genexpression der induzierbaren Untereinheiten im Vergleich von Patientenkollektiv und Kontrollkollektiv ergaben sich interessante Unterschiede. Insbesondere war die Genexpression von Proteasomuntereinheiten in CD19<sup>+</sup> B-Zellen auffällig verändert, wobei vor allem die induzierbare Untereinheit  $\beta$ 5i (LMP7) deutliche Unterschiede aufwies.

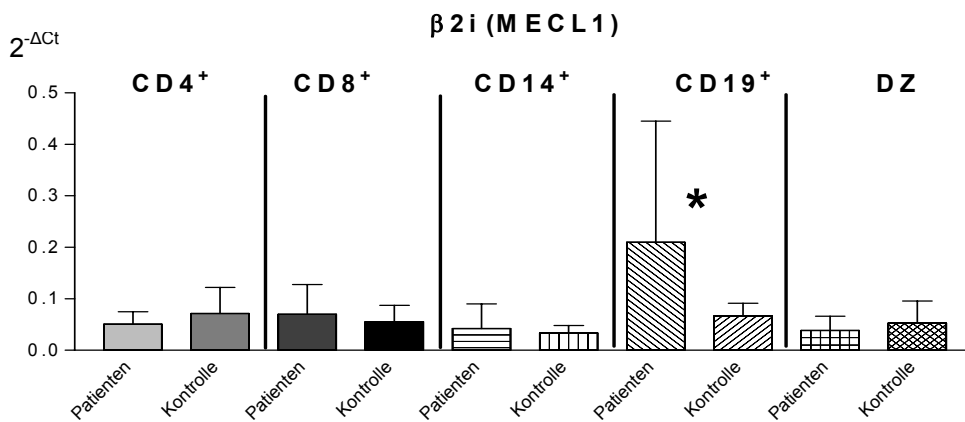
Die drei induzierbaren Untereinheiten  $\beta$ 1i (LMP2),  $\beta$ 2i (MECL1) und  $\beta$ 5i (LMP7) wurden in den CD19<sup>+</sup> B-Zellen der Patientengruppe signifikant höher exprimiert (alle  $P < 0,05$ ) als in der Kontrollgruppe (Abbildung 16 a-c). Somit waren alle Untereinheiten, die zur Assemblierung des Immunoproteasoms erforderlich sind, bei Patienten signifikant höher exprimiert.

Die relative Genexpression der Untereinheit  $\beta$ 5i (LMP7) war darüber hinaus noch in den dendritischen Zellen ( $P < 0,01$ ), den CD8<sup>+</sup> T-Zellen ( $P < 0,05$ ) und den CD14<sup>+</sup> Monozyten ( $P < 0,01$ ) gegenüber der Vergleichsgruppe signifikant erhöht (Abbildung 16 c). Somit war  $\beta$ 5i (LMP7) in allen Zellpopulationen der Patientengruppe bis auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellen hoch reguliert.

16 a



16 b



16 c

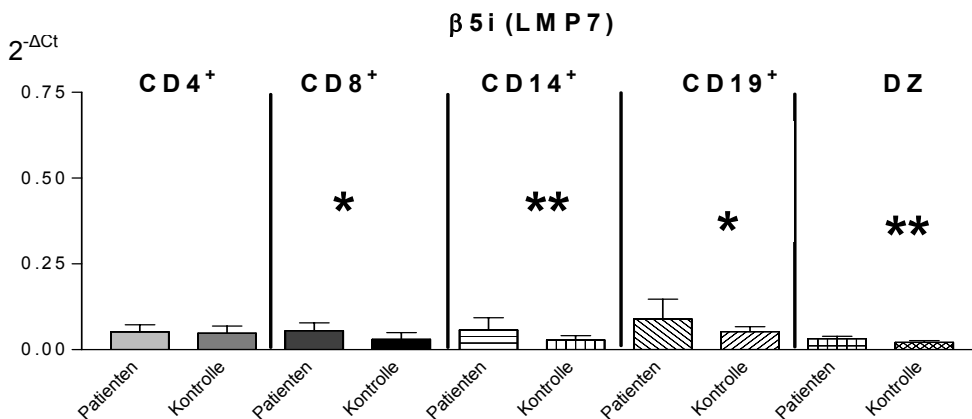


Abbildung 16 a-c: Darstellung der relativen Genexpression der induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms im Vergleich zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe. Auf der Y-Achse ist die relative Genexpression ( $2^{-\Delta Ct}$ ) aufgetragen und auf der X-Achse sind die Gruppen bzw. Subpopulationen der PBMCs zu sehen. Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet, wobei \* = P-Wert < 0,05, \*\* = P-Wert < 0,01 und \*\*\* = P-Wert < 0,001. Die Skala der Y-Achse wurde hier zur besseren Darstellung in Abbildung 16 b anders gewählt als in den Abbildungen 16 a+c. Zur Erstellung des Balkendiagramms wurden der Mittelwert und die Standardabweichung verwendet.

#### **4.5 Zusammenfassung der Real-Time PCR-Ergebnisse**

Alle verwendeten Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen (SD) sind in Tabelle 12 a und 12 b dargestellt. In den Abbildungen (Balkendiagrammen) sind jeweils die Mediane mit den SD für die Erstellung der Balken verwendet worden. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Untereinheit  $\beta 5i$  (LMP7) die deutlichsten Unterschiede in der Genexpression aufwies, da diese in allen untersuchten Zellpopulationen bis auf die  $CD4^+$  T-Zellen erhöht war. Bei den  $CD19^+$  B-Zellen war für alle induzierbaren Untereinheiten eine signifikante Hochregulation festzustellen.

In Tabelle 13 a und 13 b ist die x-fache Genexpression der einzelnen Untereinheiten des Proteasoms in der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt. Besonders auffällig war hier die Untereinheit  $\beta 1i$  (LMP2), die in der Patientengruppe in den  $CD14^+$  Monozyten und in den  $CD19^+$  B-Zellen um mehr als das 2,5 fache höher exprimiert wurde als in der Kontrollgruppe. Bei der Interpretation der x-fachen Genexpression ist zu beachten, dass der Proteasomkomplex alleine 1 % der Gesamtmenge an Protein einer Zelle ausmacht.

Tabelle 12 a: Darstellung der Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen aller Untereinheiten in der Patientengruppe

Gruppe	Untereinheit	Zelltyp	Mittelwert	Median	SD
Patienten	$\beta 1$ (delta)	CD4	0,006	0,027	0,029
		CD8	0,015	0,029	0,032
		CD14	0,028	0,022	0,036
		CD19	0,135	0,047	0,104
		DZ	0,008	0,023	0,021
	$\beta 2$ ( Z )	CD4	0,009	0,028	0,026
		CD8	0,010	0,020	0,020
		CD14	0,032	0,014	0,024
		CD19	0,020	0,037	0,040
		DZ	0,006	0,017	0,018
	$\beta 5$ (MB1)	CD4	0,003	0,008	0,008
		CD8	0,003	0,006	0,006
		CD14	0,005	0,004	0,007
		CD19	0,021	0,012	0,018
		DZ	0,002	0,004	0,005
	$\beta 1i$ (LMP2)	CD4	0,028	0,057	0,068
		CD8	0,055	0,073	0,086
		CD14	0,306	0,035	0,229
		CD19	0,262	0,120	0,238
		DZ	0,016	0,032	0,036
	$\beta 2i$ (MECL1)	CD4	0,026	0,051	0,055
		CD8	0,064	0,071	0,077
		CD14	0,056	0,024	0,050
		CD19	0,213	0,104	0,192
		DZ	0,028	0,042	0,050
	$\beta 5i$ (LMP7)	CD4	0,021	0,053	0,048
		CD8	0,026	0,055	0,052
		CD14	0,041	0,048	0,066
		CD19	0,065	0,070	0,082
		DZ	0,008	0,031	0,034
	$\alpha 3$ (C9)	CD4	0,016	0,030	0,026
		CD8	0,013	0,026	0,025
		CD14	0,031	0,019	0,030
CD19		0,070	0,042	0,065	
DZ		0,012	0,020	0,023	

Tabelle 12 b: Darstellung der Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen aller Untereinheiten in der Kontrollgruppe

Gruppe	Untereinheit	Zelltyp	Mittelwert	Median	SD
Kontrollen	$\beta 1$ (delta)	CD4	0,013	0,025	0,027
		CD8	0,008	0,021	0,023
		CD14	0,014	0,014	0,021
		CD19	0,011	0,029	0,032
		DZ	0,010	0,015	0,019
	$\beta 2$ ( Z )	CD4	0,013	0,021	0,021
		CD8	0,007	0,013	0,015
		CD14	0,008	0,014	0,016
		CD19	0,010	0,026	0,028
		DZ	0,004	0,011	0,010
	$\beta 5$ (MB1)	CD4	0,006	0,007	0,008
		CD8	0,005	0,005	0,006
		CD14	0,003	0,004	0,004
		CD19	0,007	0,006	0,009
		DZ	0,004	0,005	0,006
	$\beta 1i$ (LMP2)	CD4	0,043	0,048	0,061
		CD8	0,031	0,062	0,073
		CD14	0,319	0,027	0,147
		CD19	0,026	0,067	0,065
		DZ	0,014	0,024	0,028
	$\beta 2i$ (MECL1)	CD4	0,052	0,068	0,077
		CD8	0,024	0,052	0,058
		CD14	0,223	0,026	0,151
		CD19	0,021	0,078	0,076
		DZ	0,043	0,070	0,075
	$\beta 5i$ (LMP7)	CD4	0,022	0,040	0,045
		CD8	0,021	0,025	0,029
		CD14	0,014	0,024	0,025
		CD19	0,040	0,054	0,066
		DZ	0,006	0,025	0,023
	$\alpha 3$ (C9)	CD4	0,013	0,009	0,012
CD8		0,011	0,009	0,010	
CD14		0,024	0,010	0,018	
CD19		0,013	0,019	0,021	
DZ		0,009	0,011	0,013	

Tabelle 13 a: X-fache Expression auf mRNA-Ebene der konstitutiven Untereinheiten des Proteasoms in der Patientengruppe im Verhältnis zur Kontrollgruppe.

<b>X-fache Expression in der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe</b>			
	<b><math>\beta 1</math></b>	<b><math>\beta 2</math></b>	<b><math>\beta 5</math></b>
<b>CD4</b>	1,1	1,0	1,3
<b>CD8</b>	1,3	1,1	1,0
<b>CD14</b>	2,1	1,5	1,1
<b>CD19</b>	2,2	1,2	1,5
<b>DZ</b>	1,2	0,9	1,6

Tabelle 13 b: X-fache Expression auf mRNA-Ebene der induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms in der Patientengruppe im Verhältnis zur Kontrollgruppe.

<b>X-fache Expression in der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe</b>			
	<b><math>\beta 1i</math></b>	<b><math>\beta 2i</math></b>	<b><math>\beta 5i</math></b>
<b>CD4</b>	1,2	0,7	0,9
<b>CD8</b>	1,1	1,1	2,2
<b>CD14</b>	3,0	1,9	2,6
<b>CD19</b>	2,5	1,7	1,2
<b>DZ</b>	1,3	0,7	0,1

## 5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal die Genexpression der drei konstitutiven katalytischen Untereinheiten des Proteasoms und der alternativen, induzierbaren Untereinheiten in B- und T-Lymphozyten, Monozyten und dendritischen Zellen bei Patienten mit Sjögren-Syndrom im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen untersucht. Dabei sollte geklärt werden, ob eine vorhandene Hochregulation der Genexpression im Proteasomkomplex beim Sjögren-Syndrom vorliegt. Bisher war nur bekannt, dass das konstitutive 20S Proteasom sowie das Immunoproteasom eine entscheidende Rolle in der Modulation der Immunantwort spielen [71, 72]. Durch die Aktivierung des 20S Proteasomkomplexes wird die Zusammensetzung und Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems modifiziert. Diese Umwandlung des Proteasoms zum Immunoproteasom wird durch Mediatoren wie  $\text{INF-}\gamma$  induziert. In der Folge kommt es zu einer effektiveren Präsentation von Antigenfragmenten über die MHC-I Moleküle [66, 71, 72]. Darüber hinaus spielt das Proteasom aber auch eine entscheidende Rolle in anderen Vorgängen der Zelle, wie zum Beispiel der Zelldifferenzierung und der Apoptose [38, 39]. Es ist bekannt, dass durch Proteasominhibitoren eine Zelle in einem bestimmten Zellzyklus gehalten werden kann, und dass durch solche Inhibitoren Apoptose eingeleitet, aber auch verhindert werden kann [38, 39, 58, 103-106]. Wenn Fehler in diesen Systemen durch ein strukturell und funktionell verändertes Proteasom auftreten, kann es zu erheblichen Folgen für den intrazellulären Stoffwechsel aber auch für die Immunantwort kommen. Hier kann möglicherweise ein Einfluss auf die Pathogenese des Sjögren-Syndroms und auch anderer Autoimmunerkrankungen vermutet werden.

Bei der Untersuchung der konstitutiven Untereinheiten,  $\beta 1$  (delta),  $\beta 5$  (MB1) und  $\beta 2$  (Z), innerhalb einer Probandengruppe, sind keine wesentlichen Unterschiede aufgefallen. Die relative Genexpression der genannten Untereinheiten lag insgesamt auf einem vergleichbaren Niveau (Abbildung 7 a-c und 8 a-c im Kapitel Ergebnisse). Diese Untereinheiten des nicht aktivierten 20S Proteasoms zeigten in der jeweiligen Gruppe nur in den B-Zellen eine erhöhte relative Genexpression gegenüber den anderen Zellpopulationen. Diese Veränderung war sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der Patientengruppe festzustellen. Demnach fanden sich auch im Vergleich der Patientengruppe mit der Kontrollgruppe wenige statistisch signifikante Unterschiede in der

Genexpression der konstitutiven Untereinheiten. Dabei war eine deutliche Tendenz zu einer Induktion von Proteasomuntereinheiten in der Patientengruppe erkennbar. Für  $\beta 1$  (delta) und  $\beta 2$  (Z) ergab die statistische Auswertung einen signifikanten Unterschied in der Expression.  $\beta 1$  (delta) war in der Patientengruppe in den B-Zellen und  $\beta 2$  (Z) in den dendritischen Zellen verstärkt exprimiert. Einschränkend muss auf die relativ kleine Gruppengröße hingewiesen werden, die im Rahmen dieser Arbeit ausgewertet wurde. Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass sowohl bei Patienten mit Sjögren-Syndrom als auch bei gesunden Individuen die Genexpression des konstitutiven Proteasomkomplexes in der jeweiligen Gruppe auf einem ähnlichen Niveau liegt. Dabei war die relative Genexpression in der Patientengruppe tendenziell auf einem höheren Niveau als in der Kontrollgruppe. Dies wird auch durch das Ergebnis der Analyse der konsekutiven Untereinheit  $\alpha 3$  (C9) bestätigt. Diese Untereinheit gehört zu den äußeren  $\alpha$ -Ringen und wird durch INF- $\gamma$  nicht in seiner Expression beeinflusst [107]. Dennoch wurde für diese Untereinheit eine erhöhte Genexpression auch in den B-Zellen im Gegensatz zu anderen immunologischen Zellen nachgewiesen.

Für die Regulation der Immunantwort ist das aktivierte 20S Proteasom, das sogenannte Immunoproteasom, von besonderem Interesse. Beim Vergleich zwischen den beiden Gruppen konnte eine deutliche Aktivierung in der Patientengruppe nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte eine Induktion von einzelnen Proteasomuntereinheiten, vor allem in den B-Zellen beobachtet werden. Die Genexpression der drei aktiven, induzierbaren Untereinheiten [ $\beta 1i$  (LMP2),  $\beta 5i$  (LMP7) und  $\beta 2i$  (MECL1)] des Immunoproteasoms war in den B-Zellen der Patienten – im Vergleich zum Kontrollkollektiv - signifikant hoch reguliert. Diese Beobachtung ist mit der bekannten B-Zell-Aktivierung beim Sjögren-Syndrom vereinbar. Diese Überaktivierung der B-Zellen ist belegt durch die Tatsachen, dass die Patienten eine Hypergammaglobulinämie aufweisen und Autoantikörper bilden [1, 3, 6]. Darüber hinaus spricht auch die Tatsache, dass bis zu 20 % der infiltrierenden Zellen B-Zellen sind [3], für eine große Bedeutung der B-Zellen in der Pathogenese des Sjögren-Syndroms.

In Analogie zu den B-Zellen würde man auch in den antigenpräsentierenden Zellen wie Monozyten und dendritischen Zellen eine verstärkte Aktivierung des Immunoproteasoms erwarten. Überraschenderweise war aber die gemessene relative Expression der



induzierbaren Untereinheiten in den CD14<sup>+</sup> Monozyten und den dendritischen Zellen im Vergleich zu den B-Zellen relativ gering. Im Vergleich der CD14<sup>+</sup> Monozyten zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe war jedoch eine deutlich erhöhte relative Genexpression der induzierbaren Untereinheiten in der Patientengruppe zu sehen. In diesem Zusammenhang muss berücksichtigt werden, dass bei der Zellsortierung die dendritischen Zellen nicht in ihre verschiedenen Subpopulationen aufgetrennt wurden, sondern als gesamte Masse gemessen wurden. Auf Grund dieser Tatsache kann die vorliegende Arbeit keine Aussage zu den Subpopulationen der dendritischen Zellen als antigenpräsentierende Zellen treffen. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die aktivierten dendritischen Zellen primär in den sekundären Lymphorganen für die Antigenpräsentation zuständig sind und daher im peripheren Blut evtl. nicht adäquat repräsentiert sind.

Ein weiterer interessanter Aspekt aus den vorliegenden Ergebnissen ist die in fast allen untersuchten Zellpopulationen nachgewiesene erhöhte Genexpression der Untereinheit  $\beta 5i$  (LMP7) bei Patienten mit Sjögren-Syndrom gegenüber der Kontrollgruppe. Eine Besonderheit ergab sich dabei in den B-Zellen, in denen auch die anderen beiden induzierbaren Untereinheiten  $\beta 1i$  (LMP2) und  $\beta 2i$  (MECL1) verstärkt exprimiert wurden. Daraus könnte eine insbesondere in den B-Zellen zu erwartende erhöhte Menge an funktionellem, aktiviertem Immunoproteasom resultieren. Da  $\beta 5i$  (LMP7) essentiell für die Funktion des Enzymkomplexes ist [71], und die Expression dieser Untereinheit in CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten nicht signifikant höher war als in der Kontrollgruppe, kann für diese Zellpopulation eine geringere Menge an Immunoproteasom angenommen werden. Es ist bisher bekannt, dass es eine gewebeabhängige Erhöhung von  $\beta 5i$  (LMP7) gibt, die charakteristisch für das Sjögren-Syndrom ist [99]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dies auch in den CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, den B-Zellen, den Monozyten und den dendritischen Zellen aus dem peripheren Blut der Fall ist.

Diese Ergebnisse für die induzierbare Untereinheit  $\beta 5i$  (LMP7) sind deshalb von besonderem Interesse, weil sie eine zentrale Rolle in der Funktion und Effektivität des Immunoproteasoms spielt. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass der Einbau der induzierbaren Untereinheiten des Immunoproteasoms bestimmten Regeln folgt [71, 108]. So ist

für den Einbau der Untereinheit  $\beta 5i$  (LMP7) in den Proteasomkomplex die Anwesenheit der Untereinheiten  $\beta 1i$  (LMP2) und  $\beta 2i$  (MECL1) eine notwendige Voraussetzung. Des Weiteren wird die Untereinheit  $\beta 5i$  (LMP7) erst sehr spät in den Proteasomkomplex eingebaut. Dies könnte erklären, warum  $\beta 5i$  (LMP7) in der jeweiligen Probandengruppe eine tendenziell eher niedrige Expression gegenüber den übrigen induzierbaren Untereinheiten aufwies. In diesem Kontext ist es dann auch verwunderlich, dass  $\beta 5i$  (LMP7) in den Zellen des Patientenkollektivs in vier von fünf Subpopulationen eine signifikante Erhöhung der relativen Genexpression aufwies, während die beiden anderen induzierbaren Untereinheiten  $\beta 1i$  (LMP2) und  $\beta 2i$  (MECL1) nur in den B-Zellen signifikant höhere Werte aufwiesen. Trotz des späten Einbaus und der Abhängigkeit von den beiden anderen induzierbaren Untereinheiten, ist aber gleichzeitig der Einbau von  $\beta 5i$  (LMP7) für die Funktionalität und die Effektivität des Immunproteasoms von entscheidender Bedeutung [71, 108, 109]. Erst mit dem Einbau der Untereinheit  $\beta 5i$  (LMP7) wird das Proteasom zum Immunproteasom und damit auch als solches katalytisch aktiv [71].

Allgemein kann gesagt werden, dass die hier beobachtete Regulation der Expression bestimmter Gene des Proteasomsystems mit der bisherigen etablierten Vorstellung der Aktivierungswege des Proteasoms übereinstimmen [72, 107-109]. Infolge der Aktivierung von Lymphozyten und Makrophagen werden proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  oder Interferon (INF)- $\gamma$  in hohem Maße bei Autoimmunerkrankungen freigesetzt. Diese Zytokine induzieren dann den Umbau des Proteasoms zum so genannten Immunproteasom [72, 107]. Hierbei ist die erwähnte Tatsache überraschend, dass anscheinend die B-Zellen in wesentlich höherem Maße beeinflusst werden als andere immunologische Zellen, obwohl zu vermuten wäre, dass besonders die antigenpräsentierenden Zellen eine Erhöhung der relativen Genexpression zeigen würden. Warum besonders B-Zellen im Vergleich zu anderen Zellen beeinflusst werden und welche molekularen Mechanismen hinter dieser Beobachtung stehen, ist zurzeit nicht bekannt und bietet damit ein interessantes Thema für weitere Forschungsprojekte.

Es ist also festzuhalten, dass in der von uns untersuchten Kohorte von Patienten mit Sjögren-Syndrom das 20S Proteasom stärker aktiviert war als bei Gesunden. Diese Tatsache kann unter Berücksichtigung der autoimmunen Entzündungsprozesse erklärt

werden, da beim Sjögren-Syndrom eine spezielle Interferonsignatur im betroffenen Gewebe vorliegt [110]. Diese Erkenntnisse bestätigen auch schon früher erhobene Daten in Bezug auf die Genexpression der verschiedenen Untereinheiten des Proteasomsystems bei Autoimmunerkrankungen. In diesen Studien wurde zum einen die relative Expression im Gewebe gemessen [99, 111] und zum anderen in den gesamten PBMCs [100], und es konnte gezeigt werden, dass einzelne, induzierbare Untereinheiten des Proteasoms verstärkt exprimiert werden. Als neues Erkenntnis aus der vorliegenden Arbeit ergibt sich eine wesentliche Beeinflussung von B-Zellen auf Proteasomebene. Die Details dieser Regulationsvorgänge sollen in weiteren Studien genauer untersucht werden, bevor hieraus weitere Rückschlüsse auf die Proteasomregulation gezogen werden können. Auch müsste noch mal genau untersucht werden, ob nicht die Medikamente, die die Probanden eingenommen haben, einen Einfluss auf die Genexpression des Proteasomsystems haben.

Generell muss gesagt werden, dass die Ergebnisse dieser Arbeit lediglich die Genexpression auf mRNA-Ebene widerspiegeln und nicht ohne weiteres auf die Proteinebene übertragen werden können. Die oben genannten Ergebnisse der erhöhten relativen Genexpression zeigten sich in anderen Autoimmunerkrankungen auch auf der Proteinebene wieder. Interessanterweise war dies für  $\beta 1i$  (LMP2) bei einigen Patienten mit Sjögren-Syndrom nicht der Fall [100]. Dabei wurde bei einer erhöhten Genexpression dieser Untereinheit eine reduzierte Nachweisbarkeit auf Proteinebene festgestellt [100, 111]. Dieser Umstand könnte einen weiteren wichtigen Schritt zum Verständnis der Pathogenese des Sjögren-Syndroms darstellen.

Diese Annahmen bedürfen einer experimentellen Überprüfung und könnten Ausgangspunkt für weitere Forschungsprojekte sein. Bei unserem gegenwärtig limitierten Kenntnisstand bleibt jedoch unklar, ob das Proteasomsystem durch die Erkrankung des Patienten verändert ist, oder ob dies durch die Aktivierung im Immunsystem im Rahmen des Autoimmunprozesses bedingt ist. Eine Differenzierung dieser Zusammenhänge ist jedoch durch den schleichend progredienten Verlauf eines Sjögren-Syndroms erschwert und erfordert Untersuchungen im Frühstadium der Erkrankung.

## 6. Zusammenfassung

Das Sjögren-Syndrom ist eine chronisch verlaufende, autoimmune Systemerkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis der Kollagenosen und gehört mit zu den drei häufigsten autoimmunen Systemerkrankungen [1, 2].

Die Pathogenese dieser Erkrankung ist noch weitestgehend ungeklärt. Doch es gibt einige Hinweise, dass das 20S Proteasom eine Rolle in der Entstehung dieser Krankheit spielt [99, 100].

In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass eine Dysregulation im 20S Proteasomkomplex beim Sjögren-Syndrom vorliegen kann [99, 100, 111]. Im Rahmen meiner Arbeit wurden nun zum ersten mal die PBMCs von Sjögren-Patienten und gesunden Kontrollen in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, CD14<sup>+</sup> Monozyten, CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten und dendritische Zellen aufgetrennt, separat analysiert und miteinander verglichen. In diesen Zellen wurde dann die Genexpression von den drei enzymatisch aktiven Untereinheiten  $\beta 1$  (delta),  $\beta 2$  (Z), und  $\beta 5$  (MB1) und deren durch INF- $\gamma$  induzierbaren Gegenstücken  $\beta 1i$  (LMP2),  $\beta 2i$  (MECL1),  $\beta 5i$  (LMP7) untersucht sowie von der enzymatisch nicht aktiven, konstitutiven Untereinheit  $\alpha 3$  (C9).

Die Genexpression der enzymatisch aktiven, konstitutiven Untereinheiten des 20S Proteasoms war auf mRNA-Ebene in beiden untersuchten Gruppen auf einem ähnlichen Niveau. Jedoch ist zu bemerken, dass die relative Expression der konstitutiven Untereinheit  $\alpha 3$  (C9) in den CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, den dendritischen Zellen und am stärksten in den CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten der Sjögren-Patienten signifikant erhöht ist. Diese Untereinheit ist gleichermaßen im konstitutiven Proteasom wie im Immunoproteasom vertreten.

Die Genexpression der induzierbaren, katalytisch aktiven Untereinheiten zeigte jedoch signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen und Zellpopulationen. Am deutlichsten war dies aber für die induzierbaren Untereinheiten des Proteasomsystems in den B-Zellen nachzuweisen, da deren Genexpression signifikant höher war als in den B-Zellen der Kontrollgruppe. Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Aktivität

des 20S Proteasomsystems in den B-Zellen der Sjögren-Patienten gegenüber der Kontrollgruppe erhöht war. Bemerkenswerterweise war die Genexpression der induzierbaren Untereinheiten in den klassischen antigenpräsentierenden Zellen gegenüber der Genexpression in anderen Zellpopulationen nicht signifikant erhöht. Jedoch findet sich im Vergleich zwischen Sjögren-Patienten und der Kontrollgruppe für einige induzierbare Untereinheiten eine signifikant erhöhte Genexpression.

Darüber hinaus kann eine signifikante Erhöhung der relativen Genexpression der induzierbaren Untereinheit  $\beta 5i$  (LMP7) in  $CD8^+$  T-Lymphozyten,  $CD14^+$  Monozyten,  $CD19^+$  B-Lymphozyten und dendritischen Zellen in der Patientengruppe gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden. Dies ist ein interessantes Detail, da diese Untereinheit für die Effektivität des Immunoproteasoms von großer Bedeutung ist.

Die Zellpopulation der  $CD19^+$  B-Zellen war die einzige der untersuchten Zellpopulationen, in der ein signifikanter Unterschied in der relativen Expression aller drei induzierbaren Untereinheiten auf mRNA-Ebene nachzuweisen war. Diese war in der Patientengruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Dieses Ergebnis spricht für eine besondere Einbeziehung der B-Zellen in die Pathogenese des Sjögren-Syndroms.

Anhand der vorgestellten Ergebnisse kann eine deutliche Aktivierung des Proteasomsystems bei Patienten mit Sjögren-Syndrom und hier in besonderem Maße in den B-Zellen angenommen werden. Es bleibt gegenwärtig jedoch noch unklar, ob diese Ergebnisse mit der Proteinexpression korrelieren, da in dieser Arbeit lediglich die Genexpression auf mRNA-Ebene untersucht wurde. Eine mögliche Erklärung für die erhobenen Ergebnisse könnte die Interferonsignatur beim Sjögren-Syndrom ergeben, da diese zur Aktivierung des Proteasomsystems beiträgt. In weiterführenden Forschungsprojekten sollte geklärt werden, warum sich dies insbesondere in einigen Zellpopulationen widerspiegelt und auf welche Weise diese Proteasomaktivierung in der Pathogenese des Sjögren-Syndroms einbezogen ist.

## 7. Referenzen

1. Fox RI Sjögren's syndrome. *Lancet* 366; 321-31.
2. Fox PC Autoimmune diseases and Sjogren's syndrome: an autoimmune exocrinopathy. *Ann N Y Acad Sci* 1098; 15-21.
3. Kassan SS, Moutsopoulos HM Clinical manifestations and early diagnosis of Sjögren syndrome. *Arch Intern Med* 164; 1275-84.
4. Waterhouse JP, Doniach I Post-mortem prevalence of focal lymphocytic adenitis of the submandibular salivary gland. *J Pathol Bacteriol* 91; 53-64.
5. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Georg Thieme Verlag, 2004.
6. Moutsopoulos HM Sjögren-Syndrom. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M, eds. *Harrisons Innere Medizin: ABW Wissenschaftsverlag*, 2008: 2139-41.
7. Manthorpe R, Asmussen K, Oxholm P Primary Sjögren's syndrome: diagnostic criteria, clinical features, and disease activity. *J Rheumatol Suppl* 50; 8-11.
8. Singer NG, Tomanova-Soltys I, Lowe R Sjögren's syndrome in childhood. *Curr Rheumatol Rep* 10; 147-55.
9. Fox RI, Kang HI Pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 18; 517-38.
10. Tengnér P, Halse AK, Haga HJ, Jonsson R, Wahren-Herlenius M Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 41; 2238-48.
11. Strand V, Talal N Advances in the diagnosis and concept of Sjögren's syndrome (autoimmune exocrinopathy). *Bull Rheum Dis* 30; 1046-52.
12. Cuello C, Palladinetti P, Tedla N *et al.* Chemokine expression and leucocyte infiltration in Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol* 37; 779-83.
13. Wang F, Wang ZG, Tang FL . Expression of chemokine in the labial glands of patients with Sjogren's syndrome. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 83[3], 220-223. 10-2-2003.  
Ref Type: Abstract
14. Fox RI, Kang HI, Ando D, Abrams J, Pisa E Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. *J Immunol* 152; 5532-9.
15. Blolstad AI, Eiken HG, Rosenlund B, Alarcón-Riquelme ME, Jonsson R Increased salivary gland tissue expression of Fas, Fas ligand, cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, and programmed cell death 1 in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 48; 174-85.

16. Matsumura R, Umemiya K, Goto T *et al.* Interferon gamma and tumor necrosis factor alpha induce Fas expression and anti-Fas mediated apoptosis in a salivary ductal cell line. *Clin Exp Rheumatol* 18; 311-8.
17. Al-Hashimi I, Khuder S, Haghghat N, Zipp M Frequency and predictive value of the clinical manifestations in Sjögren's syndrome. *J Oral Pathol Med* 30; 1-6.
18. Ravald N, List T Caries and periodontal conditions in patients with primary Sjögren's syndrome. *Swed Dent J* 22; 97-103.
19. Scully C Sjögren's syndrome: clinical and laboratory features, immunopathogenesis, and management. *Oral Surg Oral Med Pathol* 62; 510-23.
20. Fox PC, Atkinson JC, Macynski AA *et al.* Pilocarpine treatment of salivary gland hypofunction and dry mouth (xerostomia). *Arch Intern Med* 151; 1149-52.
21. Almståhl A, Kroneld U, Tarkowski A, Wikström M Oral microbial flora in Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 26; 110-4.
22. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R *et al.* Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002 61; 554-8.
23. Manoussakis MN, Georgopoulou C, Zintzaras E *et al.* Sjögren's syndrome associated with systemic lupus erythematosus: clinical and laboratory profiles and comparison with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 50; 882-91.
24. Zintzaras E, Voulgarelis M, Moutsopoulos HM The risk of lymphoma development in autoimmune diseases: a meta-analysis. *Arch Intern Med* 165; 2337-44.
25. Adamson TC 3rd, Fox RI, Frisman DM, Howell FV Immunohistologic analysis of lymphoid infiltrates in primary Sjogren's syndrome using monoclonal antibodies. *J Immunol* 130; 203-8.
26. Smedby KE, Hjalgrim H, Askling J *et al.* Autoimmune and chronic inflammatory disorders and risk of non-Hodgkin lymphoma by subtype. *J Natl Cancer Inst* 98; 51-60.
27. Theander E, Henriksson G, Ljungberg O, Mandl T, Manthorpe R, Jacobsson LT Lymphoma and other malignancies in primary Sjögren's syndrome: a cohort study on cancer incidence and lymphoma predictors. *Ann Rheum Dis* 65; 796-803.
28. Engels EA, Cerhan JR, Linet MS *et al.* Immune-related conditions and immune-modulating medications as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma: a case-control study. *Am J Epidemiol* 162; 1153-61.
29. Chisholm DM, Mason DK Labial salivary gland biopsy in Sjögren's disease. *J Clin Pathol* 21; 656-60.
30. Herold G *Rheumatologie*. In: Herold G, ed. *Innere Medizin*. Köln, 2007: 587-615.

31. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65; 801-47.
32. Hiller MM, Finger A, Schweiger M, Wolf DH ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273; 1725-8.
33. Chen Z, Hagler J, Palombella VJ *et al.* Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 9; 1586-97.
34. Seufert W, Jentsch S In vivo function of the proteasome in the ubiquitin pathway. *EMBO J* 11; 3077-80.
35. Cohen S, Lahav-Baratz S, Ciechanover A Two distinct ubiquitin-dependent mechanisms are involved in NF-kappaB p105 proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 345; 7-13.
36. Groettrup M, Soza A, Kuckelkorn U, Kloetzel PM Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. *Immunol Today* 17; 429-35.
37. Moorthy AK, Savinova OV, Ho JQ, Wang VY, Vu D, Ghosh G The 20S proteasome processes NF-kappaB1 p105 into p50 in a translation-independent manner. *EMBO J* 25; 1945-56.
38. Naujokat C, Hoffmann S Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest* 82; 965-80.
39. Murata S, Sasaki K, Kishimoto T *et al.* Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* 316; 1291-2.
40. Kloetzel PM, Ossendorp F Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 16; 76-81.
41. Rock KL, Goldberg AL Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 17; 739-79.
42. Rock KL, Gramm C, Rothstein L *et al.* Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78; 761-71.
43. Schmidtke G, Eggers M, Ruppert T, Groettrup M, Koszinowski UH, Kloetzel PM Inactivation of a defined active site in the mouse 20S proteasome complex enhances major histocompatibility complex class I antigen presentation of a murine cytomegalovirus protein. *J Exp Med* 187; 1641-6.
44. 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* 182; 1865-70.
45. Baumeister W, Walz J, Zühl F, Seemüller E The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92; 367-80.



46. Goldberg AL, Cascio P, Saric T, Rock KL The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol* 39; 147-64.
47. Hershko A, Ciechanover A The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67; 425-79.
48. Egerer K, Kuckelkorn U, Rudolph PE *et al.* Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases. *J Rheumatol* 29; 2045-52.
49. Roth GA, Moser B, Krenn C *et al.* Heightened levels of circulating 20S proteasome in critically ill patients. *Eur J Clin Invest* 35; 399-403.
50. Wada M, Kosaka M, Saito S, Sano T, Tanaka K, Ichihara A Serum concentration and localization in tumor cells of proteasomes in patients with hematologic malignancy and their pathophysiologic significance. *J Lab Clin Med* 121; 215-23.
51. Zoeger A, Blau M, Egerer K, Feist E, Dahlmann B Circulating proteasomes are functional and have a subtype pattern distinct from 20S proteasomes in major blood cells. *Clin Chem* 52; 2079-86.
52. Craiu A, Gaczynska M, Akopian T *et al.* Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J Biol Chem* 272; 13437-45.
53. Adams J, Behnke M, Chen S *et al.* Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett* 8; 333-8.
54. Gardner RC, Assinder SJ, Christie G *et al.* Characterization of peptidyl boronic acid inhibitors of mammalian 20 S and 26 S proteasomes and their inhibition of proteasomes in cultured cells. *Biochem J* 346; 447-54.
55. Bogyo M, McMaster JS, Gaczynska M, Tortorella D, Goldberg AL, Ploegh H Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the *Escherichia coli* homolog HsIV by a new class of inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94; 6629-34.
56. Schwarz K, de Giuli R, Schmidtke G *et al.* The selective proteasome inhibitors lactacystin and epoxomicin can be used to either up- or down-regulate antigen presentation at nontoxic doses. *J Immunol* 164; 6147-57.
57. Kopp F, Dahlmann B, Hendil KB Evidence indicating that the human proteasome is a complex dimer. *J Mol Biol* 229; 14-9.
58. Machiels BM, Henfling ME, Gerards WL *et al.* Detailed analysis of cell cycle kinetics upon proteasome inhibition. *Cytometry* 28; 243-52.
59. Dubiel W, Ferrell K, Rechsteiner M Subunits of the regulatory complex of the 26S protease. *Mol Biol Rep* 21; 27-34.

60. Rechsteiner M, Hoffman L, Dubiel W The multicatalytic and 26 S proteases. *J Biol Chem* 268; 6065-8.
61. Groll M, Ditzel L, Löwe J *et al.* Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386; 437-8.
62. Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, Stachon U, Wolf DH The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem* 272; 25200-9.
63. Aki M, Shimbara N, Takashina M *et al.* Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem* 115; 257-69.
64. Hallermalm K, Seki K, Wei C *et al.* Tumor necrosis factor-alpha induces coordinated changes in major histocompatibility class I presentation pathway, resulting in increased stability of class I complexes at the cell surface. *Blood* 98; 1108-15.
65. Boes B, Hengel H, Ruppert T, Multhaupt G, Koszinowski UH, Kloetzel PM Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J Exp Med* 179; 901-9.
66. Kuckelkorn U, Frentzel S, Kraft R, Kostka S, Groettrup M, Kloetzel PM Incorporation of major histocompatibility complex--encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma. *Eur J Immunol* 25; 2605-11.
67. Rivett AJ, Mason GG, Murray RZ, Reidlinger J Regulation of proteasome structure and function. *Mol Biol Rep* 24; 99-102.
68. Ahn JY, Tanahashi N, Akiyama K *et al.* Primary structures of two homologous subunits of PA28, a gamma-interferon-inducible protein activator of the 20S proteasome. *FEBS Lett* 366; 37-42.
69. Nandi D, Woodward E, Ginsburg DB, Monaco JJ Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. *EMBO J* 16; 5363-75.
70. Schmidt M, Kloetzel PM Biogenesis of eukaryotic 20S proteasomes: the complex maturation pathway of a complex enzyme. *FASEB J* 11; 1235-43.
71. De M, Jayarapu K, Elenich L, Monaco JJ, Colbert RA, Griffin TA Beta 2 subunit propeptides influence cooperative proteasome assembly. *J Biol Chem* 278; 6153-9.
72. Kloetzel PM. The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim Biophys Acta* 1695; 225-33.
73. Brown MG, Driscoll J, Monaco JJ Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature* 353; 355-7.

74. Glynn R, Powis SH, Beck S, Kelly A, Kerr LA, Trowsdale J A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* 353; 300-1.
75. Martinez CK, Monaco JJ Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene. *Nature* 353; 664-7.
76. Ortiz-Navarrete V, Seelig A, Gernold M, Frentzel S, Kloetzel PM, Hämmerling GJ Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature* 353; 662-4.
77. Larsen F, Solheim J, Kristensen T, Kosto AB, Prydz H A tight cluster of five unrelated human genes on chromosome 16q22.1. *Hum Mol Genet* 2; 1589-95.
78. Heink S, Ludwig D, Kloetzel PM, Krüger E IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102; 9241-6.
79. Kloetzel PM Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol* 5; 661-9.
80. Cascio P, Hilton C, Kisselev AF, Rock KL, Goldberg AL 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J* 20; 2357-66.
81. Gaczynska M, Rock KL, Goldberg AL Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* 365; 264-7.
82. Kuckelkorn U, Ruppert T, Strehl B *et al.* Link between organ-specific antigen processing by 20S proteasomes and CD8(+) T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med* 195; 983-90.
83. Groettrup M, Kahn S, Schwarz K, Schmidtke G Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why? *Biochimie* 83; 367-72.
84. Rechsteiner M, Realini C, Ustrell V The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem J* 345; 1-15.
85. Rechsteiner M, Hill CP Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol* 15; 27-33.
86. Ma CP, Slaughter CA, DeMartino GN Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain). *J Biol Chem* 267; 10515-23.
87. Groettrup M, Soza A, Eggers M *et al.* A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature* 381; 166-8.
88. Murata S, Udonon H, Tanahashi N *et al.* Immunoproteasome assembly and antigen presentation in mice lacking both PA28alpha and PA28beta. *EMBO J* 20; 5898-907.

89. Knowlton JR, Johnston SC, Whitby FG *et al.* Structure of the proteasome activator REGalpha (PA28alpha). *Nature* 390; 639-43.
90. Köhler A, Cascio P, Leggett DS, Woo KM, Goldberg AL, Finley D The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell* 7; 1143-52.
91. Whitby FG, Masters EI, Kramer L *et al.* Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* 408; 115-20.
92. Feist E, Dörner T, Kuckelkorn U *et al.* Proteasome alpha-type subunit C9 is a primary target of autoantibodies in sera of patients with myositis and systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 184; 1313-8.
93. Feist E, Dörner T, Kuckelkorn U, Scheffler S, Burmester GR, Kloetzel PM Diagnostic importance of anti-proteasome antibodies. *Int Arch Allergy Immunol* 123; 92-7.
94. 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* 173; 423-7.
95. Feist E, Kuckelkorn U, Dörner T *et al.* Autoantibodies in primary Sjögren's syndrome are directed against proteasomal subunits of the alpha and beta type. *Arthritis Rheum* 42; 697-702.
96. Mayo I, Arribas J, Villoslada P *et al.* The proteasome is a major autoantigen in multiple sclerosis. *Brain* 125; 2658-67.
97. Kordonouri O, Meyer K, Egerer K *et al.* Prevalence of 20S proteasome, anti-nuclear and thyroid antibodies in young patients at onset of type 1 diabetes mellitus and the risk of autoimmune thyroiditis. *J Pediatr Endocrinol Metab* 17; 975-81.
98. Matsushita M, Takasaki Y, Takeuchi K, Yamada H, Matsudaira R, Hashimoto H Autoimmune response to proteasome activator 28alpha in patients with connective tissue diseases. *J Rheumatol* 31; 252-9.
99. Egerer T, Martinez-Gamboa L, Feist E, Dörner T Tissue-Specific Up-Regulation of the Proteasome Subunit  $\beta 5i$  (LMP7) in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum* 54; 1501-8.
100. Krause S, Kuckelkorn U, Dörner T, Burmester GR, Feist E, Kloetzel PM Immunoproteasome subunit LMP2 expression is deregulated in Sjogren's syndrome but not in other autoimmune disorders. *Ann Rheum Dis* 65; 1021-7.
101. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol research* 0034 3; 1-11.
102. Livak KJ, Schmittgen TD Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25; 402-8.

103. Kumeda SI, Deguchi A, Toi M, Omura S, Umezawa K Induction of G1 arrest and selective growth inhibition by lactacystin in human umbilical vein endothelial cells. *Anticancer Res* 19; 3961-8.
104. Wójcik C, Schroeter D, Stoehr M, Wilk S, Paweletz N An inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the multicatalytic proteinase complex (20S proteasome) induces arrest in G2-phase and metaphase in HeLa cells. *Eur J Cell Biol* 70; 172-8.
105. An B, Goldfarb RH, Siman R, Dou QP Novel dipeptidyl proteasome inhibitors overcome Bcl-2 protective function and selectively accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and induce apoptosis in transformed, but not normal, human fibroblasts. *Cell Death Differ* 5; 1062-75.
106. Wójcik C Regulation of apoptosis by the ubiquitin and proteasome pathway. *J Cell Mol Med* 6; 25-48.
107. Kloetzel PM. Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2; 179-87.
108. Groettrup M, Standera S, Stohwasser R, Kloetzel PM The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94; 8970-5.
109. Griffin TA, Nandi D, Cruz M *et al.* Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J Exp Med* 187; 97-104.
110. Meyer O Interferons and autoimmune disorders. *Joint Bone Spine* 76; 464-73.
111. Morawietz L, Martinez-Gamboa L, Scheffler S *et al.* Expression of Proteasomal Immunosubunit  $\beta$ 1i Is Dysregulated in Inflammatory Infiltrates of Minor Salivary Glands in Sjogren's Syndrome. *J Rheumatol* [Epub ahead of print].

## **Erklärung**

Ich, Karsten Lesemann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Genexpression der katalytischen Untereinheiten des Proteasoms in unterschiedlichen Zellpopulationen des Immunsystems beim Sjögren-Syndrom“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

## **Danksagung**

Für die Verwirklichung meiner Doktorarbeit schulde ich vielen Menschen Dank. Insbesondere bedanke ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. E. Feist, der immer ein offenes Ohr für mich hatte, mit konstruktiver Kritik meine Arbeit voran brachte und jeder Zeit motivierende Worte fand. Des Weiteren danke ich meiner Betreuerin Frau L. Martinez-Gamboa, die stets Zeit für mich hatte und bei der Lösung von Problemen gerne beratend zur Seite stand. Darüber hinaus gilt meinen Eltern großer Dank, ohne die mein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich gewesen wären, und die immer unterstützend hinter mir standen. Nicht zuletzt bedanke ich mich auch bei meiner Lebensgefährtin Mandy Hardel, die immer Verständnis für mich hatte und bei Problemen und Sorgen für mich da war.

## **Curriculum Vitae**

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