

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

DISSERTATION

Charakterisierung von spezifischen Autoantigenen bei der
Rheumatoiden Arthritis

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Kerstin Adolph

aus München

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. G.-R. Burmester

2. Prof. Dr. med. B. Manger

3. Prof. Dr. med. E. Märker-Hermann

Datum der Promotion: 17. Juli 2006

Erklärung

„Ich, Kerstin Adolph, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Charakterisierung von spezifischen Autoantigenen bei der Rheumatoiden Arthritis“ 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.“

Datum

Unterschrift

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	7
Rheumatoide Arthritis.....	7
Diagnostik	8
Serologische Parameter	9
Morphologie, Pathogenese und Krankheitsverlauf	9
RA und Autoreaktivität.....	11
hsps und das Immunsystem	14
Heavy chain binding protein BiP / glucose regulated protein 78 / heat shock protein 78.....	15
Heterogene Ribonukleoproteine hnRNPs.....	18
Heterogenes Ribonukleoprotein A3 (hnRNP A3).....	18
AUFGABENSTELLUNG	21
ANGLIZISMEN UND ABKÜRZUNGEN	22
MATERIAL UND METHODEN	24
Material	24
Puffer und Lösungen	28
Methoden.....	31
Zellkultur.....	31
Gesamtproteinextraktion aus HeLa-Zellen	31
Gewinnung von Kern- und Zytoplasmaextrakten	31
Gelelektrophorese	31
2D-Gelelektrophorese	32
Blotten / Proteintransfer	32
Immunoblots	32
ELISA	33
Herstellung eines Antiserums gegen hnRNPA3	33
Immunhistologie.....	33
Doppelfärbung	34

Proteinbestimmung	35
Kompetente Zellen	35
Klonierung BiP.....	35
Ligation.....	36
Transformation	37
Agarosegel	37
Expression	37
Proteinaufreinigung	38
Apoptose	38
ERGEBNISSE	39
hnRNPA3	39
Identifizierung eines neuen Autoantigens	39
Isolierung von hnRNPA3 aus Zellextrakten.....	41
hnRNPA3 in Kern- und Zytoplasmafraktionen	42
Lokalisation des RNA-Transport-Partikels in humanem Hirn.....	43
hnRNPA3 Expression in verschiedenen Geweben.....	44
Immunhistologische Färbungen von Gewebeschnitten	45
Untersuchungen zur Modifizierung von A3 in Kern- und Zytoplasmaextrakten	48
Epitopmapping der Serumantikörperbindungsstelle an A3	49
Bindung von A3 und Fragmenten an eine poly-U-reiche Oligoribo-nukleotidsequenz.....	50
A3-Expression in gestressten HeLa-Zellen	51
hnRNPA3 und Apoptose.....	51
Bindungsfähigkeit von rekombinant exprimiertem A3 an die RTS.....	53
Inhibierung der Bindung von A3 an die RTS durch Serum-Antikörper	54
A3 Expression in Synovialgewebe	56
hnRNPA3-Expression in Gewebe von Patienten mit Lungenkrebs	57
A3 – Autoreaktivitätsprofil.....	58
Reaktivität gegen A3 im Immunoblot	59
Reaktivität gegen A3 im Immunoblot	60

Vergleich der Reaktivitäten erosiver RA-Seren gegen A3 im Blot und im ELISA.....	61
Serum-Reaktivität gegen BiP aus HeLa-Zellen im Immunoblot.....	62
Reaktivität gegen rekombinant exprimiertes, humanes BiP.....	63
Serumreaktivität gegen rekombinant exprimiertes humanes BiP im ELISA.....	63
Epitopmapping der Serumantikörperbindungsstelle	64
Homologie zwischen BiP und hsc71 (hsp7C).....	68
Serumreaktivität gegen citrulliniertes und nicht-citrulliniertes BiP.....	69
Detektion anderer hsps mit BiP-reaktivem Serum.....	70
DISKUSSION	71
hnRNPA3	71
Identifizierung eines neuen Autoantigens	71
Isolierung von hnRNPA3 aus Zellextrakten.....	72
hnRNPA3 in Kern- und Zytoplasmafraktionen	72
Lokalisation des RTS-Partikels in humanem Hirn	74
hnRNPA3-Expression in verschiedenen Geweben.....	74
Untersuchungen zu Modifizierungen von A3 in Kern- und Zytoplasmaextrakten.....	79
Epitopmapping der Serumantikörperbindungsstelle an A3	79
Bindung von hnRNPA3 an eine poly-U-reiche Oligoribonukleotidsequenz.....	81
A3-Expression in gestressten HeLa-Zellen	82
A3 und Apoptose.....	82
Bindungsfähigkeit von rekombinant exprimiertem A3 an RNA.....	83
Inhibierung der Bindung von A3 an die RTS durch Serumantikörper	83
A3 Expression in Synovialgewebe	84
A3-Expression in Gewebe von Patienten mit Lungenkarzinom	85
A3-Autoreaktivitätsprofil.....	85
Hypothese	88
BIP	90
Serum-Reaktivität gegen BiP	90
Epitopmapping der Serumantikörperbindungsstelle	92

Serumreaktivität gegen citrulliniertes und nicht-citrulliniertes BiP	93
Detektion anderer hsps mit BiP-reaktivem Serum.....	93
Ausblick.....	94
ZUSAMMENFASSUNG	95
LITERATUR	97