

Diskussion

hnRNPA3

Identifizierung eines neuen Autoantigens

Von einigen hnRNPs ist bekannt, dass sie Autoantigene bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen darstellen. So stellt beispielsweise das hnRNPA2 (RA33) einen diagnostischen Marker bei SLE, RA und MCTD dar. Darüber hinaus wurden Antikörper gegen A2 aber auch bei Patienten mit juveniler RA festgestellt (eigene Daten, hier nicht gezeigt). In einem Immunoblot wurde eine Bande bei 40kDa [Abb. 4] von RA-Seren detektiert, die sich oberhalb einiger bereits als Autoantigene bekannter hnRNPs befand. Nach zweidimensionaler Auftrennung von HeLa-Proteinextrakt wurden die Proteine voneinander getrennt und mittels Detektion mit RA-Seren und einem Antikörper gegen hnRNPA2 konnten die gekennzeichneten Spots [Abb. 5] sichtbar gemacht werden. Der Spot oberhalb der übrigen hnRNPs wurde massenspektrometrisch analysiert und mittels der Mascot Search als hnRNPA3 identifiziert. Es wurden hier jedoch zwei Isoformen des Proteins mit unterschiedlicher Größe und wenigen Sequenzunterschieden im basischen Bereich des Gels identifiziert. Die nicht homogene Form des Spots ließ bereits vermuten, dass es sich um mehr als eine Isoform handelt. Dies wird auch bestätigt durch die verschiedenen Varianten, die auf dem Blot mit den humanen Gewebeextrakten detektiert wurden. Welche der Formen jedoch die autoantigene Form darstellt, war zunächst unklar. In den Datenbanken von Expasy und PubMed sind zwei Varianten von A3 enthalten, eine mit 378 Aminosäuren und eine Isoform mit nur 356 Aminosäuren. Eine weitere Variante mit 296 Aminosäuren wurde bereits früher von der Arbeitsgruppe um Josef Smolen identifiziert.

Parallel wurden zwei Isoformen von hnRNPA3 aus Synovialgewebe von RA-Patienten mittels RT-PCR kloniert und sequenziert [Abb. 6]. Die in der Abbildung unterstrichenen Peptidsequenzen wurden im HeLa-Extrakt identifiziert und decken sich mit den Isoformen, die aus Synovialgewebe kloniert wurden. Das bedeutet, dass die beiden klonierten Formen tatsächlich exprimiert werden. Die Sequenzen der aus Synovia klonierten Proteine decken sich nahezu mit den beiden Varianten aus den Datenbanken. Da die Sequenz jedoch auch in HeLa-Zellen nachgewiesen wurde, handelt es sich hier nicht um eine RA-spezifische Expression eines Proteins. Dennoch

scheint es, als ob verschiedene Varianten in unterschiedlich aktivierten Zellen/Geweben vorhanden sind. Diese Varianten gehen vermutlich auf ein einziges Gen zurück. Es sind vier Gene bekannt, die für das gesamte Repertoire an hnRNPs aus der A/B Familie codieren [36], so dass die Vielfalt an hnRNPs dieser Subgruppe auf alternatives Splicen zurückzuführen ist.

Isolierung von hnRNPA3 aus Zellextrakten

Hier konnte gezeigt werden, dass A3 wie andere hnRNPs auch an die RTS-RNA des Myelin-basic-proteins (MBP) bindet. Diese Transportsequenz ermöglicht den Shuttle der mRNA aus dem Dendrit ins Axon, wo die Translation des Proteins stattfindet.

Da hnRNPs häufig als Verbund an RNA binden, ist es gut nachvollziehbar, dass auch A3, neben anderen hnRNPs an diese Transportsequenz bindet. Zu sehen sind hier allerdings auch zwei Banden oberhalb 45kDa, die an die RTS-RNA gebunden haben. Da sich der zur Detektion verwendete Antikörper jedoch gegen eine sehr kleine Sequenz am N-Terminus des Proteins richtet, ist nicht davon auszugehen, dass es sich hier um eine Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen, sondern um weitere, bislang unbekannte Isoformen von hnRNPA3 handelt, wie in o.g. Publikation [36] bereits erwähnt. Denkbar wäre auch eine dimere Form. An die Kontroll-RNA hat A3 nur sehr schwach gebunden. Es ist aber grundsätzlich nicht verwunderlich, dass A3 entsprechend seiner biologischen Funktion auch andere RNAs bindet. Spezifische RNAs werden von hnRNPs jedoch stärker gebunden, wie Splicing-sites, Telomersequenzen etc., so dass auch eine Beteiligung beim Splicing und bei der Telomerverlängerung sicher ist [40]. Bewiesen wurde hier, dass A3 ebenfalls an die RTS bindet. Somit ist eine Beteiligung am Transport der mRNA von MBP wahrscheinlich.

hnRNPA3 in Kern- und Zytoplasmafraktionen

In diesem Experiment, in dem Proteinextrakte aus Kern- und Zytoplasmafraktionen von HeLa-Zellen gelelektrophoretisch getrennt und auf ihren Gehalt an A3 hin untersucht wurden, konnte gezeigt werden, dass sich A3 sowohl im Kern- als auch im Zytoplasmaextrakt befindet. Das hnRNPA1 besitzt eine M9-Sequenz, das dem Protein, das vorwiegend kernständig ist, den Export ins Zytoplasma ermöglicht, gleiches gilt für A2. Die Immunfluoreszenzfärbung von HeLa-Zellen zeigte eine verstärkte Färbung des

Zellkerns mit Ausnahme der Nukleoli. Eine verstärkte granuläre Färbung im Zellkern konnte um die Nukleoli ausgemacht werden [39].

Betrachtet man die Aminosäuresequenz von A3, so findet man zwischen den Aminosäuren 338 und 364 eine große Übereinstimmung zur M9-Sequenz des hnRNPA2 (308-347) und auch zur M9-Sequenz des hnRNPA1 (319-356).

A1: DFGNYN NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGYGGS
A2: DFGNYN QQPSNYGPMKSGNFGGSRNMGGPYGGGNYGPGSSGGSGGYGGR
A3: DFGNYSG QQQSNYGPMKGGSFGRSSGSPYGGGYGSG

Abb. 34: Sequenzhomologien von hnRNPs in der M9-Region

Die Übereinstimmung der Sequenzen von A2 und A3 in dieser Region beträgt 74 % in 27 Residuen. Dies steht in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, die zeigen, dass sich A3 in Kern- und Zytoplasmaextrakten befindet. So ist davon auszugehen, dass es sich bei der Region zwischen 339 und 364 tatsächlich um eine funktionelle Domäne handelt, die den Shuttle zwischen Kern und Zytoplasma gewährleistet. A3 ist also, ebenso wie einige andere hnRNPs in der Lage, sich zwischen Kern und Zytoplasma zu bewegen. Dies steht in Einklang mit seiner Beteiligung an Vorgängen, die die Reifung, Prozessierung und nicht zuletzt den Transport (z.B. bei der RTS-RNA von MBP) von mRNA betreffen.

Beim Vergleich der Transportsequenzen dieser drei Proteine, wird deutlich, dass neben den RNA-bindenden Domänen auch diese funktionelle Sequenz stark konserviert ist. Dies wiederum geht vermutlich auf die Tatsache zurück, dass diese große Gruppe von Proteinen von wenigen Genen kodiert wird, die ihrerseits auf Genduplikation [28] zurückgehen.

Die stärkere Expression in der Kernfraktion bei äquivalenter Proteinmenge ist darauf zurückzuführen, dass sich A3, wie auch A1 und A2 vorwiegend im Kern befindet. Es wäre sogar ein noch deutlicherer Unterschied in der Intensität der Expression zwischen Kern- und Zytoplasmafraktion zu erwarten gewesen, betrachtet man sich die immunhistologischen Färbungen, wo sich A3 tatsächlich in den meisten Fällen im Kern befindet. Da sich aber die Verteilung des A3 von Gewebe zu Gewebe, sowie von Zelltyp zu Zelltyp unterscheidet, wäre es möglich, dass die Expression im Zytoplasma in HeLa-Zellen höher ist als in anderen Zellen oder dass sie lediglich unter den hier gegebenen Voraussetzungen (Kultivierungsbedingungen etc.) stärker ist. Auf dem Blot waren

allerdings noch zwei weitere Banden, davon eine sehr schwach, oberhalb der 40 kDa Bande zu sehen. Da wir Kreuzreaktivitäten des Antikörpers mit anderen Proteinen ausschließen können, handelt es sich um weitere Varianten von A3 oder um oligomerisierte Domänen von A3. Betrachtet man den Immunblot mit den Proteinextrakten verschiedener Gewebe, so wird deutlich, dass es verschiedene Varianten des Proteins gibt. Im Gewebelot haben wir eine Variante detektiert, die größer ist als 40kDa, während wir hier zwei Varianten größer als 40kDa gefunden haben. Denkbar wäre natürlich, dass es im HeLa-Extrakt eine weitere Variante gibt, wahrscheinlicher scheint allerdings, dass es sich um ein durch die Methodik bedingtes Artefakt handelt.

Lokalisation des RTS-Partikels in humanem Hirn

Im Paraffinschnitt von humanem Hirn konnte A3 mit dem α -PA3-Antikörper in Nervenzellen nachgewiesen werden. Einerseits wurde A3 im Dendrit aber auch im Axonhügel in Purkinje-Zellen detektiert. Da zudem unsere vorhergegangenen Versuche gezeigt haben, dass auch A3, neben anderen hnRNPs, die RTS des MBP bindet, kann man davon ausgehen, dass diese Gruppe von Proteinen einen gemeinsamen Komplex um die RTS bilden und eben als Komplex den Transport der RTS hinaus aus dem Dendriten ins Axon gewährleistet, wo die Translation des Myelin-Basic-Proteins erfolgt. hnRNPs bilden also gemeinsam Komplexe und fungieren als Gesamtapparat.

hnRNPA3-Expression in verschiedenen Geweben

Es wurden einerseits immunhistologische Färbungen von Paraffinschnitten humaner Gewebe und andererseits Immunoblots von Proteinextrakten unterschiedlicher humaner Gewebe angefertigt, um die Expression von A3 zu überprüfen. Ziel war die Analyse, in welchen Geweben A3 vorhanden ist und ob es Unterschiede in den Expressionsraten in verschiedenen Geweben gibt sowie in welchen Zellen eines Gewebes sich A3 befindet. Darüber hinaus war von Interesse, ob A3 im Kern oder Zytoplasma lokalisiert ist. Anhand des Immunoblots sollte anhand des Molekulargewichtes überprüft werden, ob es ggf. mehrere Varianten des Proteins gibt und in welchen Extrakten welche Varianten vorhanden sind.

Die Daten aus Blot und histologischen Färbungen wichen leicht voneinander ab, was teilweise auf die unterschiedliche Sensitivität der Methoden und andererseits auf die

Subjektivität des Betrachters zurückzuführen ist. Auf dem Blot konnten einige sehr deutliche Banden, aber auch einige sehr schwache Banden ausgemacht werden.

In Bahn 1 des Immunoblots, einem Hirnextrakt, wurden zwei schwache Banden, eine mit einer Größe von ca. 36kDa und eine mit einer Größe um 40kDa sichtbar. Diese entsprechen vermutlich den beiden massenspektrometrisch identifizierten Isoformen von A3. Die immunhistologische Färbung von humanem Hirn zeigte ebenfalls, allerdings eine sehr eindeutige, A3-Expression in diesem Gewebe. Da auch weitere Färbungen von anderen Teilen des Hirns durchgeführt wurden, und sich, nahezu in allen Schnitten, eine intensive Expression in den Zellen des Hirns zeigte, kann man davon ausgehen, dass tatsächlich viel A3 in den Hirnzellen, vorwiegend in den Kernen, vorhanden ist. Ausgenommen hiervon sind die Zellen der Markscheiden. Hier war überhaupt keine Braunfärbung zu verzeichnen. Die Ursache für die verhältnismäßig schwachen Banden dieses Gewebes im Immunoblot mag in der Methodik der Aufarbeitung des Gewebes liegen.

In den Proteinextrakten von Herz und Dünndarm befindet sich jeweils eine sehr schwache, bis grenzwertig sichtbare, Bande bei 31kDa, während in der immunhistologischen Färbung des Schnitts des Herzens keine Expression von A3 und im Dünndarm, in der glatten Muskulatur sowie in den Saumzellen, jeweils im Kern, eine schwache Expression nachgewiesen werden konnte.

Sowohl in der Proteinfraction von Nierengewebe als auch im Paraffinschnitt der Niere war eine sehr starke Expression von A3 nachweisbar. Auf dem Blot sieht man, dass es sich hierbei um die 31kDa große Variante handelte. Die Färbung erfolgte in den Epithelzellen des Tubulussystems, insbesondere im distalen Tubulus und hier auch im Zytoplasma. Von hnRNPA1 ist bekannt, dass es unter Bedingungen osmotischen Stresses erhöht im Zytoplasma exprimiert wird [44]. Im distalen Tubulus herrschen solche Bedingungen vor, so dass die hier ansässigen Zellen osmotischem Stress unterliegen. Dies legt den Schluss nahe, dass auch A3 unter Osmosestress überexprimiert wird, zumal im proximalen Tubulus lediglich eine geringe bis normale Expression im Zytoplasma vorlag. Hier unterliegen die Zellen auch keinem osmotischen Stress.

Auf dem Immunoblot konnten in den Extrakten von Leber wieder eine kaum detektierbare Bande bei 31kDa festgestellt werden, während in diesem Gewebe im Schnitt gar kein Protein nachweisbar war.

Im Lungengewebe war mit beiden Methoden kein Protein auszumachen. Im Skelettmuskel konnte eine eindeutige Bande, die bei ca. 50kDa lag, detektiert werden, und auch der Schnitt zeigte eine deutliche Färbung der Kerne der Zellen der quergestreiften Muskulatur und der Kerne der Satellitenzellen. Diese Variante mit einer Größe von 50kDa konnten wir auch in Kernextrakten von HeLa-Zellen nachweisen, als wir mit RTS-RNA A3 aus Proteinextrakten isolierten. Ansonsten war nirgendwo A3 mit einem Molekulargewicht von 50kDa zu finden. Auf dem Blot war in der Pankreasfraktion lediglich eine sehr schwache Bande bei 31kDa, auf dem Schnitt wiederum gar keine Färbung nachzuweisen. Im Proteinextrakt der Milz wurden zwei Banden, eine bei 31kDa und eine noch kleinere sichtbar, allerdings war im Schnitt keine Färbung nachweisbar. Die stärksten Banden waren auf dem Blot im Ovarialextrakt zu finden. Hier detektierten wir zwei sehr starke Banden, eine bei 40kDa, hierbei dürfte es sich der Größe nach um die von uns massenspektrometrisch identifizierte Isoform (Variante b) handeln, die zweite mit einer Größe von 31kDa, die in den meisten Fraktionen zu finden war. Unterhalb der 40kDa-Bande ist noch eine weitere Bande zu sehen, hierbei handelt es sich allerdings mit großer Wahrscheinlichkeit um einen „Schatten“ der 40kDa-Bande, da diese eine große Menge an Protein zu beinhalten scheint. Auch im Schnitt gab es eine positive Färbung. A3 ist hier sehr gleichmäßig in den Zellen verteilt bei mittlerer Intensität. Im Proteinextrakt von Hoden konnte eine schwache Bande bei 31kDa nachgewiesen werden, während die immunhistologische Färbung eine sehr starke Expression von A3 zeigte. Hier findet man A3 in den Kernen der Spermatozyten 1. und 2. Ordnung sowie in Leydig-Zellen, jedoch nicht in Spermien. A3 ist hier also vorwiegend in Zellen exprimiert, die sich noch aktiv teilen.

In beinahe allen Proteinfractionen, mit Ausnahme von Hirn und Skelettmuskel –wobei es sich hier auch um mangelnde Sensitivität handeln könnte- wurde eine 31kDa große Variante von A3 nachgewiesen, bei der es sich um die Variante mit 296 Aminosäuren handelt, die bislang in den Datenbanken von Expasy, PubMed nicht verzeichnet ist. Da sich der verwendete Antikörper gegen eine sehr kurze, 13 Aminosäuren umfassende Sequenz am N-Terminus richtet und bislang keine Kreuzreaktivitäten mit anderen Proteinen auftraten, kann man davon ausgehen, dass es sich bei der 31kDa großen Variante auch tatsächlich um eine Variante von A3 und nicht um eine falsch positive Färbung handelt. So wurde beispielsweise auf verschiedenen Immunoblots mit einerseits Gesamtproteinextrakten aus HeLa-, Jurkat- und Cos7-Zellen wie auch in Proteinfractionen von Kern- und Zytoplasmafraktionen besagter Zellen lediglich eine

40kDa große Bande und eine schwächere Bande unterhalb von 40kDa detektiert werden. Die uns bekannte, 40kDa große Variante konnte lediglich im Hirn- und Eierstockextrakt, nachgewiesen werden. Die 36kDa-Variante, bei der es sich vermutlich um die Variante a handelt, war nur im Hirnextrakt nachweisbar. Wir haben also auf dem Blot mit den humanen Proteinextrakten verschiedener Organe drei neue Varianten entdecken können, eine mit weniger als 31kDa, eine mit 31kDa und eine um die 50kDa. Zwei Proteine mit einem höheren Molekulargewicht als 40kDa konnten auch bei der Extraktion von A3 aus HeLa-Zellextrakten mittels RTS-RNA nachgewiesen werden. Diese Varianten werden zukünftig noch sequenziert und näher analysiert. Es scheint, als ob in unterschiedlichen Geweben verschiedene Isoformen mit vermutlich differentiellen Funktionen benötigt und auch exprimiert werden. Auffällig sind außerdem die Unterschiede der Expressionsraten in verschiedenen Geweben. Davon ausgehend, dass die Gesamtproteinkonzentration in allen Fraktionen gleich groß war, sind die Intensitäten in den Expressionsraten doch sehr beachtlich. Es ist dabei unwahrscheinlich, dass die Varianten vom Antikörper unterschiedlich gut erkannt werden, denn die stets sehr schwach detektierte 31kDa Bande, wird im Extrakt aus Eierstock ausgesprochen stark erkannt. Kamma et al. haben bei ihren Untersuchungen verschiedener Gewebe von Ratten die Expression von hnRNPA2 und B1 untersucht, wobei es sich bei B1 um eine Splicevariante von A2 handelt, die sich lediglich durch 12 Aminosäuren in der RBD1 unterscheidet [39]. Auch hier wurden einerseits Proteinextrakte auf der SDS-PAGE aufgetrennt und immunhistochemisch analysiert und andererseits Färbungen von Gewebeschnitten angefertigt. Die immunhistologischen Untersuchungen zeigten eine unterschiedliche Expression von A2 und B1 in verschiedenen Geweben. A2 ist im Vergleich zu B1 deutlich stärker exprimiert in der Nebenniere sowie im Hirn und deutlich schwächer exprimiert in Herz, Lunge und Darm, während nur eine schwache Bande von A3 im Hirn in unserem Blot nachweisbar war. In der Niere sind sowohl A2, B1 und auch A3 stark exprimiert. Eine sehr geringe bzw. gar keine Rate an A2 und A3 war im Gewebe von Lunge zu finden. Insgesamt lässt sich jedoch zusammenfassen, dass alle drei hnRNPs in beinahe allen Geweben sowohl in der Ratte als auch im humanen System nachweisbar waren. Hinzuzufügen ist allerdings, dass die Färbung von Gewebeschnitten sowohl in der Arbeit von Kamma et al. als auch in unseren Ergebnissen zeigte, dass jeweils nur bestimmte Zellen in einem Gewebe angefärbt sind. So zeigten im Schnitt von Hirn (Ratte) Purkinje-Zellen im Vergleich zu den benachbarten Gliazellen eine sehr viel stärkere Färbung [39]. Dies

wirft weitere Fragen über die genaue Funktion des Proteins auf. Seine Beteiligung an Vorgängen, die die Reifung und Prozessierung von mRNA betreffen, scheint unumstritten, auch eine Rolle einiger hnRNPs bei der Zellproliferation wurde bereits durch Versuche, bei denen die Expression einzelner hnRNPs in Zellen herunterreguliert wurde, bestätigt [40]. Von einigen hnRNPs wiederum ist bekannt, dass sie bei der Regulation der Telomere eine Rolle spielen, da wir zeigen konnten, dass auch A3 an eine poly-U-RNA, wie sie für Telomere charakteristisch ist, bindet, und somit auch eine Bedeutung an der Telomerverlängerung nahe liegt. Jedoch bleibt bis dato unklar welche Rolle die einzelnen hnRNPs der A/B Gruppe neben ihren verschiedenen Varianten und Spliceformen in unterschiedlichen Zelltypen spielen. Wir konnten also fünf Varianten von A3 in elf verschiedenen humanen Geweben nachweisen. Da bekannt ist, dass nur vier Gene für die gesamten hnRNPs der hnRNPA/B-Gruppe codieren, liegt der Schluss nahe, dass die verschiedenen Varianten von A3 auf ein Gen zurückzuführen sind und die Varianten durch Splicing entstanden sind.

Die Tatsache, dass innerhalb eines Gewebes einige Zellen angefärbt sind und einige nicht, mag darauf zurückgehen, dass sich die Zellen in unterschiedlichen Phasen befinden. Betrachtet man beispielsweise die Entwicklung der Spermien, so kann man bei den Spermatozyten 1. und 2. Ordnung eine sehr starke Expression von A3 feststellen, während die Spermien selbst keine A3-Expression aufweisen. Über die Spermatiden kann man keine zuverlässige Aussage machen, da sich die Zellen nur kurzzeitig in diesem Stadium befinden und infolgedessen, diese Zellen auf dem Gewebeschnitt nicht in ausreichender Zahl zu beobachten waren. Im Stratum basale der Haut waren ca. 80% der Zellen braun angefärbt. Zieht man nun die Zeiten der einzelnen Phasen des Zellzyklus in Betracht, so macht die G2-Phase einen relativ kleinen Zeitraum innerhalb des Zellzyklus aus. Möglicherweise handelt es sich bei den Zellen, die keine A3-Expression aufweisen um Zellen, die sich gerade in der G2-Phase befinden. Es konnten auch sich teilende Zellen festgestellt werden, die A3-Expression zeigten, so dass die Mitosephase als „A3-freie“-Phase ausscheidet.

Untersuchungen zu Modifizierungen von A3 in Kern- und Zytoplasmaextrakten

Die Untersuchungen der häufigsten Modifizierungen, wie Glykosilierung, Phosphorylierung und auch Citrullinierung erfolgte aus HeLa-Zellextrakten, also aus nativen Proteinextrakten, da in Bakterien rekombinant exprimierte Proteine nicht, wie in eukariotischen Zellen, modifiziert werden. Dennoch kann es hier aufgrund der nicht schonenden Proteintrennung auf einem SDS-Gel zum Verlust von Modifikationen kommen. Des Weiteren ist die Sensitivität auf dem Blot eingeschränkt. Die Methylierung von hnRNPs wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen [41]. Hier konnten S-Phosphorylierungen in Kern- und Zytoplasmafraktionen nachgewiesen werden, aber keine Phosphorylierungen am Threonin. Phosphorylierungen spielen für hnRNPs insofern eine Rolle, da die RNA-Bindungs-fähigkeit durch diese Modifikation beeinflusst wird. Citrullinierungen konnten ebenso nicht nachgewiesen werden, aber Glykosilierungen, insbesondere O-Glykosilierungen wurden im Zytoplasma nachgewiesen. Es muss hier aber erwähnt werden, dass es sich um Zellextrakte aus Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase handelt, und Modifizierungen häufig nur unter bestimmten Bedingungen vollzogen werden, wie beispielsweise Stress. In zukünftigen Versuchen soll A3 mittels RTS-RNA isoliert und dann auf Modifikationen hin untersucht werden, um eine noch eindeutigere Identifizierung zu gewährleisten, da die Zuordnung der detektierten Modifikationen zu den entsprechenden Banden schwieriger ist als erwartet. Die Auswirkung verschiedener Modifizierungen auf seine Spezifität als Autoantigen wird auch zukünftig untersucht, da gerade Citrullinierungen oft eine Rolle spielen, was die Reaktivität von Patientenserum gegen ein Protein betrifft. Zunächst waren Citrullinierungen beziehungsweise Reaktivitäten gegen Citrullinierungen nur im Gelenk bekannt. Inzwischen wurden Antikörper gegen Citrullinierungen im Serum nachgewiesen. Antikörper gegen citrullinierte Peptide kommen allerdings auch bei Gesunden vor. Von einigen Antigenen ist bekannt, dass sie nur in bestimmten modifizierten Zuständen antigen wirken.

Epitopmapping der Serumantikörperbindungsstelle an A3

Um die Bindungsstelle der Serumantikörper an A3 ermitteln zu können, wurden verschiedene Fragmente, die die funktionellen Domänen des Proteins abdecken, rekombinant exprimiert. Von allen A3-positiven Seren wurde das Fragment, das beide RBDs beinhaltet und das Fragment, das die RBD2 und die Gly-reiche Region enthält,

erkannt. Die RBD1 alleine wurde noch von einem Großteil der Seren, jedoch nur sehr schwach erkannt und wurde deshalb nicht als positiv gewertet. Die RBD2 alleine wurde nur noch von zwei Seren und die Gly-reiche Region allein gar nicht mehr detektiert. Obwohl die RBDs hoch konserviert sind, gibt es kleine Unterschiede in der Reaktivität zwischen den beiden RBDs. Trotz der Homologie der beiden Domänen ist bekannt, dass sie auch unterschiedliche Funktionen oder Bindungseigenschaften gegenüber RNA/DNA aufweisen [33]. Die Tatsache, dass das Fragment, das die RBD2 plus Gly-reiche Region beinhaltet auch von allen Seren erkannt wird, ist jedoch ein Hinweis, dass das erkannte Epitop abhängig ist von der Konformation des Proteins, denn obwohl die RBD2 in beiden Epitopen enthalten ist, stellt sie alleine kein Epitop dar.

In folgender Abbildung sind die Epitope von A3 im Vergleich zu anderen hnRNPs, wie A1 und A2 dargestellt. Bemerkenswert ist, dass sich, obwohl A3 und A2 eine sehr homologe Struktur aufweisen, die Epitope unterscheiden.

Dennoch wird deutlich, dass es sich bei den Hauptepitopen aller drei hnRNPs jeweils um die funktionellen RNA-bindenden Domänen handelt. Denkbar wäre deshalb, dass eine ursprüngliche Immunität gegen nicht methylierte (virale/bakterielle) RNA oder DNA, die Komplexe mit hnRNPs bilden, über TLR B-Zellen aktivieren. Somit wäre die Autoimmunität gegen hnRNPs also Folge von Epitopspeaking von einem berechtigterweise immunogenen, fremden Molekül auf ein körpereigenes Protein.

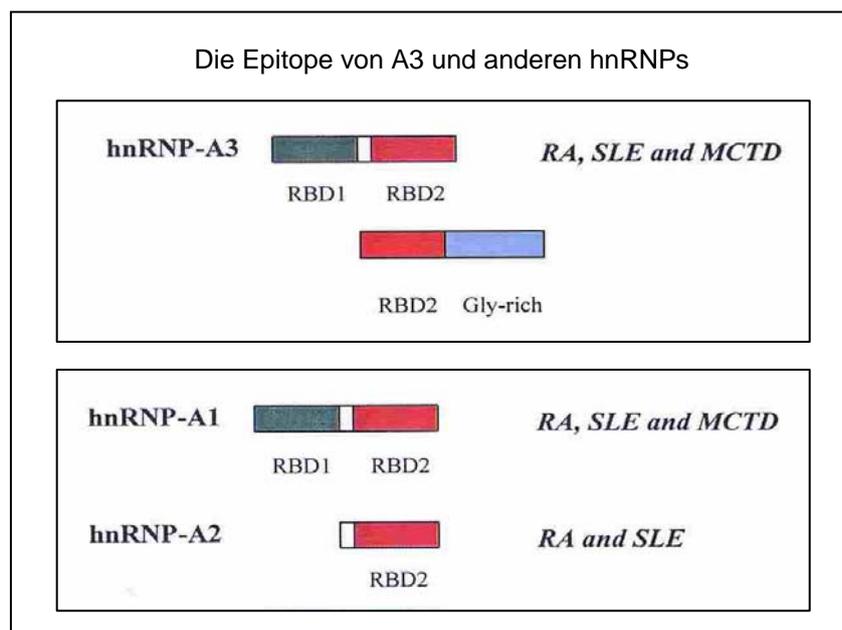


Abb. 35: Die Zielstrukturen von A3 und anderen hnRNPs für Serumantikörper.

Die Tatsache, dass die RBDs der hnRNPs jeweils die Epitope der Autoantikörper darstellen, kann auf zweierlei Wegen erklärt werden. Zum einen ist eine Kreuzreaktivität zwischen den hoch konservierten und homologen RBDs der verschiedenen hnRNPs denkbar, so dass sich eine Reaktivität gegen ein hnRNP bzw. dessen RBD unweigerlich, homologiebedingt auch gegen die RBD anderer hnRNPs richtet. Es kann sich also lediglich um Kreuzreaktivität handeln. Eine weitere mögliche Ursache dafür, dass die RBDs die Hauptepitope sind, könnte darin liegen, dass hnRNPs gemeinsam als so genannter Partikel, an RNA/DNA binden, so dass Epitopspreeding von viralen Nukleinsäuren auf die damit assoziierten hnRNPs nicht nur ein Protein (hnRNP) betrifft, sondern gleich den ganzen Partikel. Dies steht in Übereinstimmung mit der Partikelhypothese von Tan, die besagt, dass es zwischen Molekülen, die miteinander assoziiert sind oder die Komplexe bilden, mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zu Epitopspreeding kommt.

Um eine genauere Aussagen machen zu können was die Verteilung der Autoimmunität gegen die hnRNPs betrifft, sollten größere Patientenkohorten gegen die gesamte hnRNPA/B-Gruppe hin untersucht werden, um zu analysieren, wo die stärksten und intensivsten Reaktivitäten liegen. Derzeit befindet sich ein Epitopmapping auf Peptidebene in Arbeit. Dies wird weiteren Aufschluss geben, ob Epitope auf Peptidebene vorhanden sind.

Bindung von hnRNPA3 an eine poly-U-reiche Oligoribonukleotidsequenz

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass A3 in der Lage ist, diese poly-U-reiche Oligoribonukleotidsequenz zu binden. Diese Nukleotidsequenz kommt in den Bereichen von Telomeren und vor allem in viraler RNA vor. Löst virale DNA eine Immunantwort aus und binden hnRNPs an dieser DNA, so könnte es indirekt zu einer Immunität bzw. Autoimmunität gegen hnRNPs kommen. Neben dem vollständigen A3 war auch das Fragment, das beide RBDs enthält, in der Lage, dieses Oligonukleotid zu binden. Auch die RBD1 alleine konnte, wenn auch etwas schwächer binden, nicht aber die RBD2, die Gly-reiche Region und auch nicht das Fragment, das RBD2 und Gly-reiche Region enthält. Die RBD1 scheint also die entscheidende Domäne zur Bindung dieses Oligonukleotids zu sein. Es ist bemerkenswert, dass trotz der strukturellen und sequentiellen Homologien dieser beiden RNA-Bindungsdomänen derart unterschiedliche Bindungskapazitäten zu verzeichnen sind. Dies entspricht aber auch

den Ergebnissen der Arbeit von Mayeda et al., die zeigen konnten, dass diese modular nahezu homologen Domänen unterschiedliche Funktionen erfüllen [33]. Die Ergebnisse dieses Bindungsversuches stimmten weitgehend mit den Ergebnissen des Epitopmappings der Serumantikörperbindungsstelle überein, mit Ausnahme des Fragmentes, das die RBD2 plus Gly-reiche Region enthält, dieses Fragment ist nicht in der Lage, diese spezifische Oligoribonukleotidsequenz zu binden.

Dieses Ergebnis stützt weiterhin die These, die beim Epitopmapping der Serumantikörperbindungsstelle bereits erwähnt wurde, dass gerade die funktionellen, nukleotidbindenden Domänen die Zielstruktur des Immunsystems darstellen. Wie bereits erwähnt, könnte sich die Immunität ursächlich gegen fremde RNA gerichtet haben und dann als Folge von Epitopsreading auf die RNA-Bindungsdomäne übergegangen sein. In noch folgenden Versuchen soll untersucht werden, ob durch die Bindung der Serumantikörper an A3 die Bindung des Proteins an RNA inhibiert wird.

A3-Expression in gestressten HeLa-Zellen

In diesem Versuch wurden HeLa-Zellen, die über verschiedene Zeiträume mit Sauerstoff unterversorgt waren und bei nur 32°C kultiviert wurden, auf ihre Expressionsrate an A3 hin untersucht. Daneben wurde untersucht, ob möglicherweise andere Varianten exprimiert werden. Es scheint, als wäre A3 kein durch Thermo- oder hypoxischen Stress induzierbares Protein, da die Banden auf den Blots bei äquivalenter, eingesetzter Proteinmenge nahezu gleich intensiv waren. Auch andere Varianten von A3 wie wir sie beispielsweise in verschiedenen Geweben nachweisen konnten, konnten hier nicht gezeigt werden. Dies kann sich allerdings in anderen Zellen sehr unterschiedlich verhalten. Man kann daher nicht endgültig den Schluss ziehen, dass Stressbedingungen grundsätzlich keine Varianten / Splicevarianten oder geschnittene Varianten von A3 hervorbringen.

A3 und Apoptose

Auf den Blots konnte in den Lysaten apoptotischer wie nicht-apoptotischer Zellen hnRNPA3 detektiert werden. Trotz gleicher Proteinmenge in den Bahnen ergeben sich hier keine Unterschiede in der Bandenintensität. Dies trifft sowohl auf HL60-Zellen, wie auch auf Jurkat-Zellen zu. Es wurden hier auch keine durch Proteasen abgebauten A3-Varianten detektiert. Ursache hierfür könnte allerdings methodische Ursachen haben,

da möglicherweise der von uns verwendete Antikörper sich gegen eine kurze Sequenz am N-Terminus richtet, die abgeschnitten sein worden könnte, so dass der Antikörper die geschnittenen Varianten nicht erkennt. In der Literatur [34] wurden in apoptotischen Jurkat-Zellen neben hnRNPA3 auch geschnittene Varianten festgestellt. Dies könnte jedoch auch abhängig sein von der verwendeten Zelllinie. Alternativ könnten zu geringe Mengen der geschnittenen Varianten auf dem Blot ebenso ursächlich sein. In künftigen Versuchen könnten mögliche Modifikationen bei apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen verglichen werden.

Bindungsfähigkeit von rekombinant exprimiertem A3 an RNA

Da posttranslationale Modifikationen fehlen, erfüllen rekombinante Proteine häufig nicht mehr ihre ursprünglichen Funktionen. In diesem Versuch sollte geprüft werden, ob rekombinant exprimiertes A3 in der Lage ist, die RTS zu binden.

In den Eluaten E2 und E3 war A3 zu finden. Dies bedeutet, dass Modifikationen, die von prokariotischen Zellen nicht durchgeführt werden, für die Bindung an RTS nicht erforderlich sind, wobei die Phosphorylierung von hnRNPs für die Bindung an RNA bekanntermaßen von Bedeutung ist.

Inhibierung der Bindung von A3 an die RTS durch Serumantikörper

In diesem Versuch sollte gezeigt werden, ob die Bindung der Antikörper aus dem Serum die Bindung des Proteins an die RTS beeinflusst. Da gezeigt werden konnte, dass sich das Epitop der Serumantikörper mit den funktionellen Domänen der RNA-Bindung weitgehend deckt, stand zur Diskussion, dass die Serumantikörper die Bindung an RNA behindern, indem sie mit der RNA um die Bindungsstelle am Protein in Konkurrenz stehen. Es konnte hier gezeigt werden, dass die Bindung des Proteins an die RNA mit abnehmender Serumkonzentration zunimmt. Als Kontrolle diente ein Serum, das nicht mit A3 reaktiv war. Auch hier war eine leichte Inhibierung der Bindung des Proteins an RTS zu verzeichnen. Andere Serumkomponenten scheinen also auch eine Rolle zu spielen. Denkbar wäre allerdings auch, dass sich im Serum von RA-Patienten grundsätzlich mehr RNA/DNA befindet, so dass das vorhandene A3 an die im Serum befindlichen Nukleinsäuren bindet, anstatt ausschließlich an die vorgelegte RTS. Es kann also lediglich zusammengefasst werden, dass die Serumkonzentration die Bindung beeinflusst, wobei das auch bei A3-negativem Serum der Fall war. Dennoch

war bei äquivalenter Menge an Protein, RNA und Serum der Einfluss auf die Bindung des Proteins an RTS von A3-negativem Serum deutlich geringer. Hier sollten in zukünftigen Versuchen affinitätsgereinigte Serumantikörper aus A3+Serum verwendet werden, um den Einfluss anderer Serumkomponenten auszuschließen.

A3 Expression in Synovialgewebe

Bei den Färbungen der Synovialgewebe wird deutlich, dass A3 in der Synovialmembranen von RA-Patienten deutlich stärker exprimiert wird als in der Synovialmembran eines OA-Patienten und vor allem eines gesunden Spenders. Da A3 also im entzündlichen Gelenk unter inflammatorischen Bedingungen erhöht anzufinden war, wäre es denkbar, dass hier in den aktivierten Zellen des entzündlichen Gewebes die Autoreaktivität ursächlich entsteht, bis sie schließlich im Serum detektierbar ist.

Bei den Doppelfärbungen mit einem Makrophagenmarker (anti-CD68) wurde sichtbar, dass A3 auch in den synovialen Makrophagen in der entzündlichen Membran exprimiert wird. Die Zellkerne sind mit Hämatoxylin blau gegengefärbt, so wird sichtbar, dass sich A3 in erster Linie im Kern aufhält. Es sind jedoch nicht alle Kerne angefärbt. Mitunter waren auch die Kerne nur partiell gefärbt, so als ob A3 nur in bestimmten Bereichen des Kerns exprimiert würde. A3 Expression im Zytoplasma war auch zu finden, jedoch sehr viel weniger als im Kern. Dies entspricht nicht den Blotdaten, die gezeigt haben, dass A3 sowohl im Kern als auch im Zytoplasma von HeLa-Zellen exprimiert wurde. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz mag darin liegen, dass es sich um verschiedene biologische Materialien oder um eine andere Methodik mit unterschiedlicher Sensitivität handelt. Es gab keine Korrelation zwischen Kern- und Zytoplasmafärbung und Herkunft (kranker oder gesunder Spender) der Synovialmembran.

A3-Expression in Gewebe von Patienten mit Lungenkarzinom

Daneben konnten wir bei immunhistologischen Färbungen von Tumorgewebe eine deutlich erhöhte Expression von A3 in verschiedenen Lungengewebe von Lungenkrebspatienten nachweisen, so dass A3 in mitotisch aktiven Zellen wie im entzündlichen Synovialgewebe ebenso wie im Gewebe von o.g. Karzinompatienten verstärkt exprimiert zu sein scheint. Dies wiederum steht im Einklang mit der Tatsache, dass A3 an die Telomersequenz UUAGG bindet, da hnRNPs eine besondere Rolle bei verschiedenen Krebserkrankungen zuzukommen scheint. Andererseits haben wir festgestellt, dass andere Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe keine bzw. keine sehr stark erhöhte Expression von A3 aufweisen. Eine Ausnahme stellte hier noch Tumorpankreasgewebe dar, hier konnte im Vergleich zum gesunden Gewebe, das keine A3-Expression aufwies, ein starker Anstieg an A3 in den Kernen verzeichnet werden. hnRNPB1 wird beispielsweise als früher Lungenkrebsmarker herangezogen, während A2, das vom gleichen Gen codiert wird und sich lediglich durch wenige Aminosäuren unterscheidet, hier nicht als signifikanter Marker dienlich gilt [42].

Größere Kohorten von Lungenkrebspatienten werden in der Zukunft analysiert und die Färbung mit dem Krankheitsverlauf korreliert. Die Behandlung von mitotisch aktiven Zellen mit RNAs soll zeigen, ob die A3-Expression und möglicherweise die Zellproliferation so erniedrigt werden kann. Darüber hinaus ist geplant, Knock-in Mäuse, die A3 überexprimieren herzustellen, um zu überprüfen wie sich diese Überexpression phänotypisch auswirkt, da einzelne hnRNPs einerseits sehr viele unterschiedliche Aufgaben erfüllen -man denke an ihre Rolle beim Splicen, bei der Telomerverlängerung, beim Shuttle von mRNA- andererseits scheinen sie aber auch in der Lage zu sein, Aufgaben anderer hnRNPs zu übernehmen. Dies konnte gezeigt werden in einer Arbeit von Shi et al. [43], bei der die regulatorische Funktion von hnRNPA1 bei der RNA-Synthese durch andere, nahe verwandte hnRNPs übernommen werden konnte.

A3-Autoreaktivitätsprofil

Da zunächst einige RA-Seren identifiziert werden konnten, die mit einem 40kDa großen Protein reagierten, was dann als hnRNPA3 identifiziert werden konnte, wurden die identifizierten Varianten in E. coli exprimiert und zunächst auf dem Blot die Reaktivität einiger Seren gegen diese rekombinanten Proteine getestet. Bei den Patienten mit MCTD und PSS gab es keinen Unterschied in der Reaktivität zwischen den beiden

Varianten. Signifikante Unterschiede zeigten sich jedoch bei den Seren von Patienten mit RA und SLE. Patienten mit anderen Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis und gesunde Spender reagierten mit beiden Varianten nicht. Wie wir bei der Expression von A3 in verschiedenen humanen Geweben beobachten konnten, scheint es noch weitere Formen von A3 zu geben. So scheint es sinnvoll, zukünftig diese Formen zu klonieren und die Spezifität von Patientenserum gegenüber diesen Formen zu untersuchen und mit den bereits getesteten Varianten zu vergleichen. So wäre beispielsweise denkbar, dass eine davon eine besonders hohe Spezifität für RA-Patienten hat. Sinnvoll wäre es dabei, mit den Varianten anzufangen, die besonders in Geweben, die bei systemischen rheumatischen Erkrankungen, wie beispielsweise SLE, RA etc. betroffen sind, exprimiert sind.

Daneben wurden auch neun Seren von MRL/lpr-Mäusen auf Reaktivität gegen A3 getestet. Diese Mäuse vereinigen die Symptomatiken von SLE und RA und gehören daher zu den nützlichsten Tiermodellen bei der Erforschung von Krankheiten aus dem rheumatischen Formenkreis. Von diesen neun Mäusen haben sieben eindeutig mit A3 reagiert. Die Ergebnisse sind hier nicht dargestellt. Das bedeutet, dass im Unterschied zum Patienten, der an RA oder SLE erkrankt ist, eine deutlich höhere Reaktivität vorliegt, wobei im Mausmodell auch beide Krankheitsbilder vereint sind.

Die Reaktivität gegen A3 im Immunoblot ist insgesamt niedriger als nach den Vorversuchen zu erwarten gewesen wäre. Nach dem Testen einer Kohorte von rund 200 Seren zeigte sich, dass lediglich 13% der RA-Patienten mit A3 reagierten. Da hier die Variante a eingesetzt wurde, in den meisten Geweben jedoch die Variante von 31kDa zu finden war, wäre es interessant herauszufinden, welche Variante es war, die wir in den Synovialmembranen der Patienten detektiert haben. Möglicherweise wäre diese Variante reaktiver. Von den SLE-Patienten reagierten auch 11% mit dem Protein. Hier könnte es sich um Überschneidungen mit snRNPs oder auch DNA/RNA handeln, gegen die SLE-Seren häufig reagieren. Rund 9% der Sklerodermiepatienten reagierten ebenso mit A3. Dies kann noch nicht als signifikant eingeordnet werden. Die Reaktivitäten gegen A3 liegen bei SLE, Sklerodermie und RA ungefähr auf gleichem Niveau, womit eine Differentialdiagnostik zwischen diesen Krankheitsbildern auf jeden Fall ausscheidet. Unerwartet hoch lag die Sensitivität bei MCTD-Patienten. Hier konnten 27% erreicht werden, obwohl diese Gruppe ausgangs als Kontrollgruppe eingeplant war. Nun scheint es, als könnte A3 besonders als MCTD-Marker geeignet sein. Patienten mit anderen Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis, wie

PM/DM, Sjögren's Syndrom, PsA und OA, haben nicht oder nur sehr schwach –2% der Reaktiven Arthritis- reagiert, jedoch 4% der gesunden Kontrollen. Dies ist umso erstaunlicher, da so zumindest die gleiche Reaktivitätsrate bei anderen Erkrankungen zu erwarten gewesen wäre. Die Auswertung ist bei der Blotmethode allerdings ausgesprochen schwierig, da die Betrachtung, ob ein Streifen positiv zu werten ist oder nicht, sehr subjektiv ist. Es gibt keinen objektiven Cut-Off-Wert wie beim ELISA. Wir haben hier in dieser Auswertung keine grenzwertigen Befundungen mit einbezogen, das heißt es wurden nur eindeutig positive Testergebnisse gewertet. Beim Einbeziehen grenzwertiger Ergebnisse, hätte das Gesamtergebnis eine höhere Reaktivität gezeigt. Es ergäbe sich beispielsweise für die RA eine Reaktivität von 17%, für SLE sogar 28% und für MCTD 61%. Auch die Behandlung der Blots, Inkubationszeiten, Puffer, Detektionssystem spielen eine enorme Rolle.

Etwas anders verhalten sich die Ergebnisse des ELISA. Hier konnte für die RA eine Reaktivität von 22%, für SLE 21% und für MCTD 32% ermittelt werden. Die Reaktivität liegt also insgesamt etwas höher als im Immunoblot, wobei Gesunde hier gar nicht reagiert haben. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass das Protein im ELISA mehr in seiner natürlichen Konformation vorliegt als auf dem Blot, wo Proteine denaturiert vorliegen. Ein weiteres Indiz dafür, dass „nativ“ vorliegendes A3 von den Autoimmunseren besser erkannt wird, ist das Ergebnis aus den Studien des Epitopmappings, die gezeigt haben, dass es sich wahrscheinlich bei der Serumantikörperbindungsstelle um ein Konformationsepitop handelt.

Natürlich ist auch die Wahl des Cut-Off-Wertes z.T. arbiträr und damit einer gewissen Subjektivität überlassen. Die große Schwierigkeit bei diesem ELISA lag in der sehr schlechten Löslichkeit des Proteins. Durch das Ausfallen des Proteins kann bei der Beschickung des ELISAs unter Umständen nicht mehr eine gleichmäßige Verteilung des Proteins über alle Kavitäten hinweg gewährleistet werden. So konnte nicht jede Charge verwendet werden. Auch aus der Literatur ist bekannt, dass andere hnRNPs ausgesprochen schlecht in Lösung bleiben.

Besonders wichtig war, dass ein hoher Prozentsatz an RA-Seren mit erosiven Erscheinungen mit A3 reaktiv war, da hier möglicherweise ein Prädiktor für eine erosive RA vorliegt.

Parallel zur Identifizierung von Autoantigenen zur Diagnostik von Autoimmunerkrankungen und vor allem Rheuma, also zur Diagnostik auf Proteinebene

werden Genexpressionsraten zur Diagnose verwendet. Charakteristische Gene werden hoch exprimiert bei verschiedenen Erkrankungen. Jedoch fehlt bislang der Beweis, ob es tatsächlich auch zur vollständigen Translation kommt, ob also das Protein tatsächlich exprimiert und verstärkt exprimiert wird. Sinnvoll könnte also sein, die hoch regulierten Gene und die dazugehörigen Proteine zu identifizieren, um letztlich zu überprüfen, ob diese Proteine im Patienten erhöht vorliegen und ob es Korrelationen zwischen hoch regulierten Genen und Autoreaktivitäten gibt.

Insgesamt ist festzustellen, dass die Reaktivität gegen A3 zur alleinigen Diagnose einer RA nicht ausreicht. Bislang konnte generell noch kein Antigen allein zur Diagnose identifiziert werden. Es mangelt entweder an der fehlenden Spezifität oder Sensitivität. Die Strategie geht vielmehr dahin, spezifische Muster aus der Kombination mehrerer Antigene zur Diagnose heranzuziehen. Daher ist es unbedingt notwendig, autoreaktive Proteine zu identifizieren und zu analysieren.

Hypothese

Für hnRNPs gibt es verschiedene Wege, B-Zellen zur Produktion von Antikörpern zu aktivieren. Zum einen über Immunkomplexe, in denen RNA-bindende Proteine enthalten sind, die mit RNA oder DNA assoziiert vorliegen. Immunkomplexe spielen eine große Rolle bei der RA, ihnen wird auch eine Beteiligung bei der RF-Produktion zugeschrieben [1]. Zum anderen können RNA-bindende Proteine mit/ohne RNA oder DNA B-Zellen direkt stimulieren oder indirekt über T-Zellen, die die von MHC-Molekülen präsentierten Peptidsequenzen erkennen. Als weitere Möglichkeit zur Aktivierung von B-Zellen wäre die Aktivierung über die Toll-like-Rezeptor-9-Familie denkbar. Wie alle Toll-like-Rezeptoren (TLR) ist die TLR9-Familie ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Zur TLR-9-Familie gehören die Mitglieder TLR7, TLR8 und TLR9, die in der Lage sind unterschiedliche doppel- und einzelsträngige RNA/DNA sowie virale und bakterielle RNA/DNA zu binden und der B-Zelle zuzuführen. Somit könnte, trotz Abwesenheit von Proteinen oder Peptiden, über die TLRs eine humorale Immunantwort ausgelöst werden. So gäbe es folglich für hnRNPs zwei Wege, wie es zur Autoreaktivität kommt; zum einen über eine Peptid-/Proteinsequenz und zum anderen über Nukleinsäuren, mit denen sie Komplexe eingehen.

Hypothese zur B-Zellstimulation durch hnRNPs

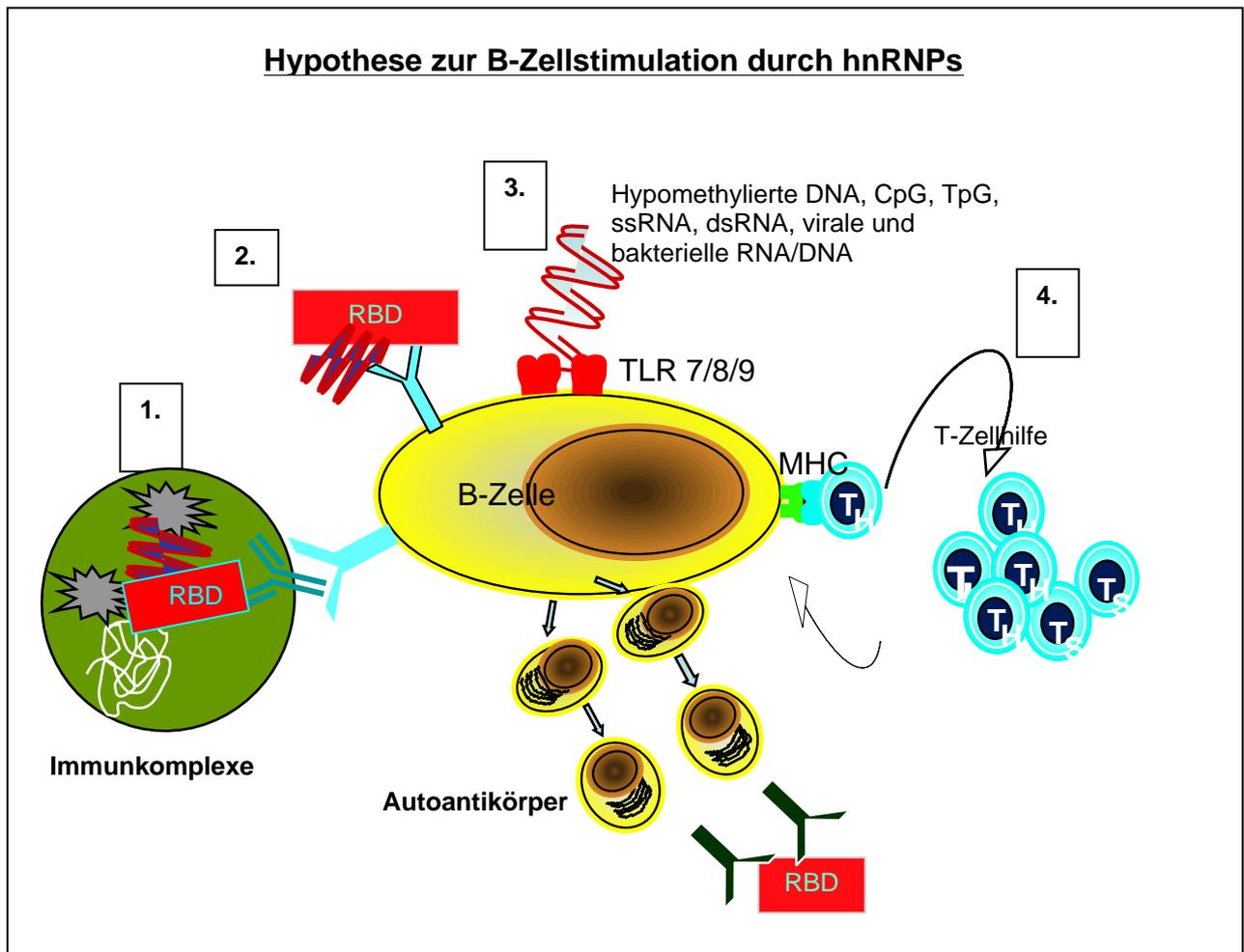


Abb. 36: Hypothese zur Stimulation von B-Zellen zur Produktion von Autoantikörpern durch hnRNPs.

BiP

Serum-Reaktivität gegen BiP

Wie in der Einleitung dargestellt, sind einige hsp's bereits als Autoantigene bei verschiedenen (Autoimmun)-erkrankungen bekannt. Auch BiP wurde bereits als Autoantigen bei der RA von unserer Arbeitsgruppe und von anderen Wissenschaftlern beschrieben [23, 46]. Jedoch herrscht nach wie vor Uneinigkeit über die tatsächliche Bedeutung von BiP als Autoantigen bei der RA. In weiteren Studien unserer Arbeitsgruppe wurden zusätzliche Patientenkohorten auf ihre Sensitivität und Spezifität von BiP hin untersucht. Hierzu wurde einerseits natives BiP aus HeLa-Zellysaten, natives BiP aus Kaninchenleber isoliert und vor allem rekombinant hergestelltes humanes BiP verwendet. Die mit letzterer Methodik gewonnenen Proteine haben den Vorteil der sehr guten Verfügbarkeit, andererseits fehlen Modifikationen, da diese von prokaryotischen Zellen nicht gebildet werden. Die Bestimmung der Serum-Reaktivität erfolgte sowohl mit Immunoblots als auch mit ELISA. Zunächst wurden ca. 300 Seren mit Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis, mit anderen Erkrankungen und auch mit fünf gesunden Kontrollen auf ihre Reaktivität gegen BiP aus HeLa-Zelle auf dem Immunoblot getestet. Die gelelektrophoretische Auftrennung durch zwei Gele sollte gewährleisten, dass das Protein möglichst rein vorliegt. Die Sensitivität von RA-Patienten für das Protein ist verhältnismäßig hoch mit 64%, dies entspricht in etwa der Sensitivität des RF, allerdings haben auch andere Patientengruppen sehr stark mit BiP reagiert. Die Reaktivität der Kontroll-Patienten mit Kollagenose mit 48% unterscheidet sich lediglich um 16% von der der RA-Patienten. Eine differentielle Diagnostik der beiden Erkrankungen wäre somit serologisch nicht möglich. Auch die unter „Sonstige“ zusammengefasste Gruppe hat mit 42% Reaktivität sehr stark reagiert. Da auch eine von fünf gesunden Kontrollen an BiP gebunden hat, ist davon auszugehen, dass es sich bei BiP vermutlich um ein Protein handelt, das von verschiedenen Seren unspezifisch gebunden wird. Die mangelnde Spezifität ist vermutlich auch darauf zurückzuführen, dass es ohnehin Autoimmunantworten auf verschiedene hsp's gibt und es möglicherweise zu Kreuzreaktivitäten kommt -nicht zuletzt auch deshalb, da Kreuzreaktivitäten gegen bakterielle hsp's bekannt sind. Beim Einsatz von BiP aus Kaninchenleber reagierten nur noch 30% der RA-Patienten mit dem Protein. Hier muss allerdings angemerkt werden, dass sich die Aufarbeitung und Aufreinigung des Proteins aus der Kaninchenleber von der aus HeLa-Lysaten grundsätzlich unterschieden hat. Im

einen Fall lagen kultivierte Zellen vor, im anderen Fall musste das Protein aus Gewebe isoliert werden.

Wegen der besseren Verfügbarkeit wurde BiP rekombinant in E.coli kloniert und exprimiert. Auf dem Immunoblot wurden Seren mit dem rekombinanten Protein getestet. Es zeigte sich, dass die Reaktivität gegen das rekombinante Protein erheblich geringer ist als die des „nativen“ humanen Proteins. Eine nahe liegende Erklärung hierfür schien, dass dem in Bakterien produzierten Protein Modifikationen fehlen, die die autoantigene Wirkung des Proteins verursachen oder zumindest beeinflussen.

Parallel zu den Blotversuchen sollte ein BiP-ELISA etabliert werden. Ein ELISA hat grundsätzlich den Vorteil, dass große Serenkohorten bei kürzeren Inkubationszeiten getestet werden können. Außerdem entfallen die subjektiven Bewertungen eines Immunblots durch einen definierten Cut-off, einem festgelegten Wert, oberhalb dessen ein Serum als positiv eingestuft werden kann. Üblicherweise wählt man einen Cut-Off, der 2-3fach höher liegt als die Extinktion, die Seren aufweisen, die als nicht reaktiv gelten. Im ELISA hatten wir allerdings abermals einen Verlust der Reaktivität zu verzeichnen. Hatten wir im Immunoblot mit dem rekombinant exprimierten Protein eine Sensitivität der RA-Patienten von 20%, so fiel diese nun ab auf 16%. Auf der anderen Seite reagierten im ELISA 22% der übrigen Erkrankungen, also 6% mehr als die RA-Seren. Auffällig war allerdings, dass von sechs Psoriasis-Patienten, die sich unter der Rubrik „Sonstige“ befanden, drei positiv mit BiP reagierten. Es werden hier in Zukunft noch weitere Seren getestet. Unter den RA-Patienten waren 26, die RF-positiv waren und 23, die RF-negativ waren. Unter den positiven befanden sich vier, die mit BiP reagierten, unter den RF-negativen waren es fünf, die BiP gebunden haben. Es gibt folglich keine Korrelation zwischen Anti-IgG-Antikörpern (RF) und Anti-BiP-Antikörpern. Von elf erosiven RA-Verläufen wiesen lediglich zwei Seren Antikörper gegen BiP auf, bei den nicht-erosiven keines. Soweit die geringe Anzahl an Seren überhaupt eine Beurteilung zulässt, liegt auch hier keine Korrelation zwischen erosiven/nicht-erosiven Verläufen und Antikörpern gegen BiP vor. Anders verhielt es sich bei den Antikörpern gegen A3, wo es einen deutlichen Zusammenhang zwischen A3-Antikörpern und Erosivität gab.

Die beiden Methoden Blot und ELISA unterscheiden sich unter anderem in der Präsentation des Proteins oder Antigens. Während das Protein auf der Nitrocellulosemembran denaturiert und ungefaltet, also linear vorliegt, hat es abhängig von der Oberflächenbeschaffenheit der ELISA-Platte die Möglichkeit in seiner gefalteten

Struktur vorzuliegen. Handelt es sich bei der Antikörperbindungsstelle an das Protein um ein Epitop, welches abhängig ist von der Konformation des Proteins, so sind ggf. mit dem ELISA bessere Ergebnisse zu erzielen als mit dem Blot. Handelt es sich allerdings um ein Epitop, das eine Peptid-Sequenz aus der Aminosäurekette darstellt, so liegt dieses Epitop frei zugänglich für die Antikörper und nicht durch die Tertiärstruktur des Proteins verdeckt auf der Membran vor. Unter anderem aus diesen Gründen decken sich ELISA- und Blotdaten häufig nicht, eine Tendenz sollte jedoch stets erkennbar sein. Weiterhin besitzt BiP eine Kalzium-Bindungsstelle. Die Anwesenheit von Kalzium wiederum beeinträchtigt in hohem Maße die Detektion mit Alkalischer Phosphatase. So spielt es prinzipiell auch eine Rolle, wie die Seren vorbehandelt wurden, z.B. ob es als Vollblut vorher bereits in EDTA-Röhrchen gelagert wurde. Das heißt bereits das Abnehmen der Blutprobe etc. müsste unter sehr definierten Bedingungen erfolgen. Dies ist aber in Alltagssituationen in der Routinediagnostik kaum realisierbar.

Epitopmapping der Serumantikörperbindungsstelle

Ebenfalls in E.coli wurden Fragmente des humanen BiP rekombinant hergestellt und über eine His-Tag/NiNTA aufgereinigt. RA-Seren, die bereits in vorher durchgeführten Versuchen mit BiP reagiert haben, wurden gegen diese Fragmente getestet. Fünf der acht RA-Seren wurden abermals auf BiP-Reaktivität getestet und nochmals als BiP-positiv befunden. Alle Seren, die mit BiP reagiert haben, haben auch das Fragment 1-509 gebunden. In weiteren Versuchen zeigte sich sogar, dass dieses Fragment reaktiver war als das ganze Protein. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass dieses Fragment hohe Sequenzhomologien zu anderen Proteinen aufweist. So wurde die Sequenz in verschiedenen Datenbanken auf Homologien mit anderen Proteinen getestet. Allein aus dem humanen Bereich gab es zahlreiche Proteine (Hitzeschockproteine) die große Homologien aufwiesen, so z.B. das Hsp7C, das in 485 Residuen zu 71% mit unserem Fragment homolog war. Das bedeutet also, dass Kreuzreaktivitäten mit anderen Hitzeschockproteinen sehr wahrscheinlich sind und es nicht immer eindeutig ist, ob es sich im Einzelfall tatsächlich um eine Reaktivität gegen BiP oder möglicherweise gegen ein anderes hsp handelt, da Antikörper gegen verschiedene hsp bei unterschiedlichen Erkrankungen, aber auch bei gesunden Spendern auftreten. Da hsp hoch konserviert sind, kann es vor allem auch zu Kreuzreaktivitäten mit bakteriellen hsp kommen. Gerade diese hohe

Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Kreuzreaktivitäten macht BiP zu keinem zuverlässigen diagnostischem Marker.

Das Fragment 1-391 wurde nur noch von zwei der acht Seren erkannt, das Fragment 1-200 nur noch von einem Serum, das auch sehr stark mit dem Protein und den übrigen beiden Fragmenten reagierte. Von den gesunden Kontrollen, die auch nicht mit BiP reaktiv waren, reagierte auch keines mit den Fragmenten.

Serumreaktivität gegen citrulliniertes und nicht-citrulliniertes BiP

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, haben citrullinierte Proteine in der Diagnostik der RA in jüngster Zeit eine hervorragende Bedeutung erlangt. Von Fibrinogen und Fibrinektin ist bekannt, dass die Sensitivität von RA-Seren gegenüber diesen Proteinen durch die Citrullinierung erhöht wird. Bei der Citrullinierung handelt es sich um die Deiminierung eines Arginins durch das Enzym Peptidyl-Arginin-Deiminase. Die Fragestellung in diesem Versuch war, ob die Citrullinierung von BiP die Sensitivität der RA-Seren erhöht. Die Auswertung war durch die unterschiedliche Bandenintensität erschwert. Es lässt sich jedoch feststellen, dass es keinen Unterschied in der Sensitivität durch die Deiminierung von BiP gab. Der Erfolg der Citrullinierung wurde mit einem Kit nachgewiesen. Durch die Deiminierung konnte somit die Sensitivität der Seren für BiP nicht erhöht werden.

Detektion anderer hsps mit BiP-reaktivem Serum

Die Proteinfraction eines HeLa-Zellysates wurde 2D-gelelektrophoretisch getrennt mit einem pH-Gradienten von 4 –6,5 und die aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose geblottet. Seren, die sich in Vorversuchen als Bip-positiv (HeLa-BiP) erwiesen, wurden auf dem 2D-Blot inkubiert. An der Stelle, an der BiP erwartet wurde, reagierten die Seren auch mit drei Spots, die BiP und Isoformen von BiP zu sein schienen. Nach einer weiteren Detektion mit einem monoklonalen Anti-BiP-Antikörper zeigte sich jedoch, dass BiP an anderer Stelle lokalisiert war. Die Seren reagierten somit nicht mit dem eigentlichen BiP. So ließen wir drei von den Seren erkannten Spots massenspektrometrisch untersuchen. Es handelte sich hierbei um zwei Isoformen des hsp75 und um hsc71 (hsp7C). Beim Epitopmapping konnten wir schon die große Homologie zwischen dem sehr stark reaktiven Fragment 1-509 und dem hsp7C feststellen. In diesem Versuch zeigt sich, dass die starke Reaktivität gegen das

Fragment tatsächlich auf eine Kreuzreaktivität gegen ein weiteres hsp zurückgeht. Gleiches gilt auch für das hsp75, wenn auch hier die Homologien nicht ganz so hoch sind wie mit dem hsp7C. Zwischen dem Fragment 1-509 und hsp75 gibt es bis zu 58% Sequenzhomologie in 486 Residuen. Diese Ergebnisse decken auf, dass es sich bei der ursprünglich als 64% Sensitivität, die mit Proteinextrakt aus HeLa-Zellen erzielt werden konnten, möglicherweise um falsch positive Seren handelt, da sie auf dem 2D-Blot nicht mehr mit BiP reagiert haben, sondern mit anderen hsp. Es ist zu vermuten, dass sich andere hsps mit in der „BiP“-Bande im Gel befunden haben und so ein falsch positives Signal hervorgerufen haben. Alternativ handelte es sich tatsächlich um die Bindung an die Sequenz 1-509, da sich die eigentliche Reaktivität gegen ein anderes hsp richtete, so dass es sich um eine Kreuzreaktivität handelte.

Ausblick

Mit der Identifizierung eines neuen Autoantigens, dem heterogenen Ribonukleoprotein A3, das bei Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis eine Rolle spielt, konnte ein neuer Baustein in der Diagnostik der RA gefunden werden.

Durch die Entwicklung eines Teststreifens, auf dem eine große Anzahl unterschiedlicher Proteine, die als Antigene fungieren, aufgebracht sind und der auch mit A3 bestückt wird, soll zukünftig eine verbesserte, serologische Diagnose erfolgen können.

Mit einer rechtzeitigen Erkennung der Krankheit und einer damit verbundenen frühzeitigen Therapie können irreversiblen Schäden vorgebeugt und die Lebensqualität des Patienten erheblich verbessert werden.

Zudem kommt man mit der Identifizierung neuer Autoantigene der Aufklärung des Pathomechanismus der Rheumatoiden Arthritis jeweils ein Stück näher.