

**„Die Rolle der Autoimmunreaktion gegen das
SLA/LP - Molekül bei
autoimmuner Hepatitis“**

**Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften**

**am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

von
Uta Cheruti
geb. am 30.9.1964 in Gelsenkirchen

Mainz, 2005

Die vorliegende Arbeit wurde an der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz angefertigt.

Tag der mündlichen Prüfung:

10.02.2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Autoimmunität.....	8
1.2	Autoimmune Hepatitis.....	8
1.3	AIH-assoziierte Autoantikörper	9
1.4	Pathogenetische Mechanismen.....	10
1.5	SLA/LP das Ziel-Antigen.....	11
1.6	Tiermodelle der Autoimmunen Hepatitis	16
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	17
2	Material	18
2.1	Bakterienstämme.....	18
2.2	DNA	18
2.2.1	Vektoren.....	18
2.2.2	Oligodesoxynukleotide und cDNA	18
2.2.2.1	PCR-Primer.....	18
2.3	Enzyme und andere Proteine	19
2.4	Standards und Kits	19
2.5	Geräte.....	20
2.6	Chemikalien, Puffer, Medien und Lösungen	22
2.6.1	Chemikalien.....	22
2.6.2	Puffer, Medien und Lösungen	23

3 Methoden	27
3.1 Molekularbiologische Methoden	27
3.1.1 Kultivierung und Aufbewahrung von <i>E. coli</i>	27
3.1.2 Plasmid-DNA-Präparation	28
3.1.2.1 Plasmid-Minipräparation	28
3.1.2.2 Plasmid-DNA-Präparation.....	28
3.1.3 Restriktionsendonukleaseverdau	28
3.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten	29
3.1.5 Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA	29
3.1.6 RNA-Isolierung aus	30
3.1.6.1 Vollblut	30
3.1.6.2 Gewebe, Zellen und Zelllinien.....	30
3.1.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
3.1.8 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	31
3.1.9 Messenger RNA Transkript Quantifizierung (<i>real-time</i> PCR)	32
3.1.10 Agarosegelelektrophorese.....	34
3.1.11 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	34
3.2 Gewinnung rekombinanter Proteine	35
3.2.1 Protein-Überexpression in <i>E. coli</i>	35
3.2.2 Proteinextraktion aus <i>E. coli</i>	36
3.3 Proteinbiochemische Methoden.....	36
3.3.1 Denaturierende Trichloressigsäure Fällung.....	36
3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
3.3.3 Proteintransfer auf eine Membran (Westernblot).....	37

3.3.4	Coomassie Färbung	38
3.3.5	Immunoblotting immobiliser Proteine	38
3.3.6	Multiplex Fluorescent Bead Immunoassay (FBI)	38
3.4	Zellkultur Methoden	40
3.4.1	Zellkulturen	40
3.4.2	Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut	40
3.4.3	Lymphozyten-Isolation aus:	41
3.4.3.1	Muriner Milz	41
3.4.3.2	Murinen Lymphknoten	41
3.4.3.3	Muriner Leber	41
3.4.4	Zellstimulation	42
3.4.4.1	Stimulation humaner peripherer mononukleärer Blutzellen	42
3.4.4.2	Stimulation muriner Lymphozyten aus Milz und Leber	42
3.4.4.3	Stimulation muriner Lymphknotenzellen	42
3.5	Tierexperimentelle Methoden	43
3.5.1	Versuchstiere	43
3.5.2	Anästhesie der Versuchstiere	43
3.5.3	Leberenzyme	43
3.5.4	Paraffinschnitte	43
3.6	Spektroskopische Methoden	44
3.6.1	Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Proben	44
3.6.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	44
3.7	Expressionsanalysen der Spleißvarianten	44
3.7.1	Patienten	45
3.7.1.1	Serum	45
3.7.1.2	Leberbiopsien	46

3.7.2	Expressionsanalyse in Blutlymphozyten	46
3.7.3	Expressionsanalyse in Leberbiopsien	46
3.7.4	Expressionsanalyse in murinem und humanem Gewebe.....	47
3.8	Immunisierung	47
3.8.1	Plasmid-DNA Immunisierung	47
3.8.2	Protein Immunisierung	48
3.8.2.1	Löslicher Leberantigenextrakt S100.....	48
3.8.2.2	Rekombinantes SLA/LP	48
3.9	Expression nativen SLA/LP Proteins	49
3.9.1	Klonierung	50
3.9.2	Proteinexpression.....	50
3.9.3	Proteinaufreinigung	51
3.9.4	Fusionsproteinspaltung	52
4	Ergebnisse	53
4.1	SLA/LP Expressionsanalyse.....	53
4.1.1	Expressionsorte des SLA/LP Moleküls.....	53
4.1.1.1	SLA/LP Expression in murinen Organen	53
4.1.1.2	SLA/LP Expression im Menschen.....	56
4.1.2	Expressionsrate nach Stimulation	59
4.1.2.1	Kinetische Analyse des SLA/LP-mRNA Transkripts	59
4.1.2.2	SLA/LP-mRNA Expression in verschiedenen Zelltypen	60
4.1.3	Aberrante Expression bei Hepatitiden	61
4.1.3.1	L-D.1 und J-D1 Expression in Blutlymphozyten	62
4.1.3.2	L-D.1 und J-D1 Expression in Leberparenchymzellen	64

4.2 Gewinnung nativen SLA/LPs	66
4.3 Experimentelle Hepatitis durch SLA/LP Autoimmunität im Mausmodell	68
4.3.1 Immunisierung mittels eines Expressionsvektors für SLA/LP	68
4.3.2 Protein-Immunisierung	68
4.3.2.1 Immunisierung verschiedener Mausstämme	68
4.3.2.2 Immunisierung IL-10 -/- Mäuse	71
4.3.2.3 Leberinfiltrationen	73
5 Diskussion	75
5.1 Expressionsanalysen und Tiermodell	75
5.2 Expression nativen SLA/LP Proteins	79
6 Zusammenfassung.....	81
7 Literaturverzeichnis	82
8 Abkürzungsverzeichnis	95
9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	101

1 Einleitung

1.1 Autoimmunität

Als Immunsystem werden Organe, Zellen und Proteine zusammengefaßt, die dem Organismus zur Abwehr von pathogenen Organismen (Viren, Bakterien, Parasiten oder Pilzen) und Fremdstoffen dienen. Darüber hinaus besitzt das Immunsystem die Fähigkeit, körpereigene jedoch krankhaft veränderte Zellen zu erkennen und zu bekämpfen (z.B. Tumor). Es wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, die das Immunsystem kontrollieren und regulieren. Diese Mechanismen dienen der Vorbeugung oder Minimierung einer Überreaktion gegenüber Pathogenen und der Autoreaktivität gegenüber körpereigenen Antigenen (O'Garra & Vieira, 2004). Burnet beschrieb 1957 die Vorbeugung der Autoreaktivität als immunologische Toleranz, die der Organismus erst erwerben muß (Burnet, 1959; Lederberg, 2002). Toleranz gegenüber körpereigenem Gewebe wird bei heranreifenden B- und T-Zellen in einem frühen Entwicklungsstadium im Knochenmark (B-Zellen) oder im Thymus (T-Zellen) induziert; B- bzw. T-Zellen, die ubiquitäre körpereigene „Antigene“ erkennen, werden beseitigt (klonale Deletion). Gegenüber körpereigenen „Antigenen“, die nur in bestimmten Organen in der Peripherie vorkommen, gibt es zusätzliche Schutzmechanismen. Toleranz wird hier durch klonale Deletion oder Inaktivierung (klonale Anergie) reifer B- und T-Zellen erreicht (Rose, 1998). Ein Durchbrechen dieser Toleranz gegenüber körpereigenen „Antigenen“ kann zur Ausbildung von Autoimmunkrankheiten führen.

Man unterscheidet zwei Hauptmuster autoimmuner Erkrankungen. Zum einen die organspezifische Autoimmunerkrankung, bei der die Autoimmunität auf ein bestimmtes Organ im Körper beschränkt ist und zum anderen die systemische Autoimmunerkrankung, bei der verschiedene Gewebe oder Organe des Organismus betroffen sind (Theofilopoulos, 1995).

1.2 Autoimmune Hepatitis

Die autoimmune Hepatitis (AIH) wurde erstmals 1952 von dem schwedischen Arzt Jan Waldenström beschrieben. Unter den von ihm behandelten Hepatitispatienten

fand er eine Gruppe mit ungewöhnlich erhöhtem γ -Globulin-Spiegel. Mackay et al. konnten hierzu 1956 einen Zusammenhang mit dem Auftreten von antinukleären Antikörpern (ANA) nachweisen und führten den Namen "lupoide Hepatitis" ein. Diese Form der Hepatitis ist heute als autoimmune Hepatitis Typ 1 bekannt (Vergani & Mieli-Vergani¹, 2004). Die AIH Typ 1 ist eine progressive, inflammatorische Lebererkrankung, die histologisch durch ein dichtes Infiltrat mononukleärer Zellen vom Portalfeld bis ins Parenchym der Leber gekennzeichnet ist. Sie ist außerdem mit einer Schädigung der Hepatozyten assoziiert. Die Entzündung des Leberparenchyms kann auf die periportalen Gebiete begrenzt sein oder sich auf den gesamten Acinus (Leberlappen) erstrecken (Czaja¹, 2005). Serologisch sind für die autoimmune Hepatitis nicht-organspezifische Autoantikörper, erhöhte Transaminasen, Hypergammaglobulinämie und eine Assoziation mit humanen Leukozytenantigenen (HLA) DR3 und DR4 charakteristisch (Alvarez et al., 1999; Zachou et al., 2004).

Die Ätiologie der AIH ist unbekannt und kann dem Erscheinungsbild anderer Lebererkrankungen (Morbus Wilson; chronische Virushepatitis) gleichen (Vergani & Mieli-Vergani², 2004). Die AIH ist weltweit verbreitet und kann in allen Altersgruppen auftreten, allerdings sind die Patienten vorwiegend weiblichen Geschlechts (Czaja², 2005; Hurlburt et al., 2002).

AIH Patienten reagieren gut auf immunsuppressive Behandlung, die sofort eingesetzt werden muss, sobald der Verdacht auf eine autoimmune Hepatitis besteht. Das positive Ansprechen der Patienten auf die immunsuppressive Therapie stellt einen Teil der Diagnose dar (Vergani & Mieli-Vergani², 2004).

1.3 AIH-assoziierte Autoantikörper

Es sind zwei verschiedene Typen der autoimmunen Hepatitis bekannt. Diese werden auf Grund verschiedener serologischer Marker unterschieden. Typ 1 AIH ist gekennzeichnet durch das Auftreten von Antikörpern gegen glatte Muskulatur (SMA; *smooth muscle antigen*) und/oder antinukleäre Antigene (ANA), begleitet von perinukleären antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (p-ANCA). Dagegen sind Antikörper gegen Leber- und Nierenmikrosomen (LKM; *Liver Kidney Microsome*) und/oder antimitochondriale Antikörper (AMA) charakteristisch für eine Typ 2 AIH (Czaja, 1995; Alvarez et al., 1999; Zachou et al., 2004; Czaja¹, 2005).

Des Weiteren wurden Patienten mit Autoantikörpern gegen lösliche Leberantigene (SLA) (Manns et al., 1987) und ein Leber-Pankreas-Antigen (LP) (Stechemesser et al., 1993) beschrieben.

Wies et al. konnten 2000 zeigen, dass es sich hierbei nicht um zwei verschiedene Antigene (SLA und LP), sondern um das gleiche Protein handelt (Wies et al., 2000). Die Arbeitsgruppe hatte durch Immunoscreening zweier verschiedener cDNA-Banken (einer aus aktivierten Jurkat-Lymphomzellen und einer aus primären Hepatozyten) das Autoantigen, gegen welches SLA und LP Autoantikörper gerichtet sind, identifiziert und kloniert. Die Antikörper wurden somit unter dem Namen SLA/LP Autoantikörper zusammengefasst. Die Arbeitsgruppe zeigte weiterhin, dass das Autoantigen in zwei unterschiedlichen Spleißvarianten vorlag. Entsprechend ihrer Herkunft erhielt die aus einer Jurkat Lymphomzelllinie isolierte Variante die Bezeichnung J-D.1 und die Variante isoliert aus humanen Leberzellen die Bezeichnung L-D.1 (Abb. 1.1). Es wurde vorgeschlagen, das Auftreten der Antikörper gegen SLA/LP als einen zusätzlichen Typ der AIH (Typ 3 Autoimmune Hepatitis) zu klassifizieren (Strassburg & Manns, 2002). Diese zusätzliche Unterteilung wird jedoch nicht weltweit akzeptiert, da es keine wesentlichen klinischen Unterschiede zwischen SLA/LP Antikörper positiven - bzw. negativen Patienten gibt (Baeres et al., 2002).

Etwa 20% der AIH Patienten besitzen SLA/LP Antikörper. Nur in Japan ist die Häufigkeit geringer (Baeres et al., 2002; Boberg, 2002; Miyakawa, 2003).

1.4 Pathogenetische Mechanismen

Die pathogenetischen Mechanismen der autoimmunen Hepatitis sind unbekannt. Als populärste Hypothese gilt die Kombination auslösender Agenzien und eine genetische Prädisposition (Czaja¹, 2005). Als auslösende Faktoren gelten bestimmte Viren (Hepatitis A,B,C und Masern), Medikamente (Nitrofurantoin, Minocycline) und Toxine (Czaja, 2001). Die verschiedenen Auslöser besitzen Epitope, welche körpereigenen Antigenen ähnlich sind und so die eigene Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen durchbrechen (Rose, 2004).

Im Verlaufe einer bakteriellen Infektion kann molekulares Mimikry (Oldstone, 1998; Van de Water et al., 2001) zwischen Autoantigenen und homologen bakteriellen Proteinen Autoimmunität initiieren (Coppel & Gerschwin, 1995; Bachmaier et al.,

1999). Herkel et al. (2002) zeigten, dass Proteine des humanen Herpesvirus 6 und des humanen Papillomavirus Homologie zu der antigenen Region des SLA/LP Moleküls aufweisen. Allerdings wurden Peptide von diesen bakteriellen Proteinen nicht von SLA/LP Autoantikörpern erkannt. Ähnliche Ergebnisse erzielte dieselbe Arbeitsgruppe mit einem Peptid des Archaeobakteriums *Methanococcus jannaschii* (Genbank Accession Nummer: MJ0610), dem bisher einzig bekannten homologen, prokaryotischen Protein. Hier konnte nur eine sehr schwache Reaktivität nachgewiesen werden. Bisher gibt es keine Beweise für molekulares Mimikry als Auslöser der Autoimmunität gegen das SLA/LP Molekül.

Verschiedene Arbeitsgruppen (Donaldson et al., 1991 und 1994; Czaja¹ et al., 2002) zeigten, dass Typ 1 AIH und Typ 2 AIH mit bestimmten Haplotypen humaner Leukozyten Antigene (HLA) assoziiert sind, so z.B Typ 1 AIH mit HLA DR3 und DR4 bzw. Typ 2 AIH mit HLA DR3 und DR7. Andere genetische Faktoren, wie Punktmutationen des Thyrosin Phosphatase CD45 Gens, wurden ebenfalls mit dem Auftreten einer AIH assoziiert (Vogel et al., 2003).

Die Mechanismen, die eine Produktion von Autoantikörpern initiieren und aufrechterhalten, sind bisher nicht klar definiert, ihr Vorkommen scheint allerdings mit dem HLA Typ DR3 assoziiert zu sein (Czaja¹ et al., 2002).

Die Autoantikörperantwort gegen SLA/LP scheint nicht zufällig, da sie eine ungewöhnlich hohe Uniformität aufweist. Diese Autoantikörper gehören alle dem Subtyp IgG1 an und erkennen bei allen Patienten dasselbe dominante Epitop in der Nähe des Carboxyterminus des SLA/LP Moleküls (Herkel et al., 2002) (Abb. 1.1). Außerdem ist das Auftreten von SLA/LP Antikörpern hochspezifisch für eine autoimmune Hepatitis. Sie konnten bisher nur bei Patienten mit AIH gefunden werden (Baeres et al., 2002; Ballot et al., 2000). Es wurden mehr als 1000 Patientenserum mit dem rekombinanten J-D.1 Protein getestet, wobei die strikte Spezifität der SLA/LP Antikörper gegen das J-D.1 gezeigt werden konnte (Baeres et al., 2002).

1.5 SLA/LP das Ziel-Antigen

Wie bereits erwähnt, sind zwei verschiedene Formen des SLA/LP Moleküls beschrieben worden. Die längere Variante (L-D.1), mit einem offenen Leseraster von 1370 Basenpaaren, wurde von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen gleichzeitig

beschrieben und besitzt die Genbank Accession Nummern AJ277541 (Wies et al., 2000) und AJ238617 (Costa et al., 2000). Die Sequenz kodiert ein Protein aus 441 Aminosäuren, mit einem theoretischen Molekulargewicht von 48,8 kDa und einem theoretischen pI von 8,64. Die zweite Form (J-D.1), eine aminoterminaler Spleißvariante mit der Genbank Accession Nummer AF146396 (Wies et al., 2000) besitzt eine offene Leserastersequenz von 1269 Basenpaaren, die für ein Protein von 422 Aminosäuren kodiert. Dieses Protein hat ein theoretisches Molekulargewicht von 46,9 kDa und einen theoretischen pI von 8,52.

Die 48,8 kDa und 46,9 kDa Varianten scheinen für das typische Doppelbandenmuster in der Leberprotein-Westernblotanalyse mit Patientenserum verantwortlich zu sein (Wies et al., 2000). Abbildung 1.1 zeigt die cDNA-Sequenzen der beiden Spleißvarianten, die sich nur durch eine kurze Insertion unterscheiden.

Die Funktion des Antigens konnte bisher nicht geklärt werden. Verschiedene indirekte Hinweise lassen vermuten, dass dieses Molekül, wie andere wichtige Autoantigene (Transglutaminase in Zöliakie (Dietrich et al., 1997, Ciccocioppo et al., 2005)) auch, ein Enzym ist (Wies et al., 2000):

- a) es ist ein lösliches zytosolisches Protein, dessen Expression in aktivierten T-Zellen merklich hochreguliert wird während es in ruhenden kaum nachweisbar ist (Wies et al., 2002);
- b) es wurde mit dem UGA Serin tRNA-Proteinkomplex (tRNA(Ser)Sec) (Costa et al., 2000) - eine spezielle tRNA, die zunächst mit Serin beladen wird, eine Seryl-tRNASec bildet und dann enzymatisch in eine Selenocysteyl-tRNA umgebaut wird (Gelpi et al., 1992) - in Zusammenhang gebracht;
- c) bei toxischen Hepatitiden findet die Auslösung einer Immunantwort gegen Enzym-Autoantigene der Leber in der Regel dadurch statt, dass reaktive Metabolite, die durch die Aktivität des Enzyms entstehen, an das jeweilige Enzym binden. Die so entstandene Enzym-Metabolitenaddukte fungieren als Neoantigene, die eine leberschädigende Immunantwort auslösen können (Robin et al., 1996; Dansette et al., 1998).

Herkel et al. (2002) konnten anhand eines Exonukleaseverdau des J-D.1 Moleküls das dominante Epitop identifizieren. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass diese carboxyterminale, von SLA/LP Autoantikörpern erkannte Region, aus 39 Aminosäuren besteht (Abb. 1.1).

Abb. 1.1: L-D.1 und J-D.1 cDNA Sequenz

```

1          30          60
ATG AGC ACC TCA TAC GGC TGC TTC TGG AGA AGG GGC AAG TGT CCA GAG AAT GGC TGG GAT GAA AGT ACA CTT GAA
M  S  T  S  Y  G  C  F  W  R  R  G  K  C  P  E  N  G  W  D  E  S  T  L  E
          90          120          150
CTC TTT TTA CAT GAA CTT GCA ATC ATG GAC AGC AAC AAT TTC TTA GGC AAT TGT GGT GTG GGA GAA AGG GAA GGG
L  F  L  H  E  L  A  I  M  D  S  N  N  F  L  G  N  C  G  V  G  E  R  E  G
          180          210          240
AGA GTG GCA TCC GCA CTG GTT GCT CGT CGT CAT TAC AGG TTC ATT CAT GGC ATT GGA CGA TCC GGT GAT ATT TCT
R  V  A  S  A  L  V  A  R  R  H  Y  R  F  I  H  G  I  G  R  S  G  D  I  S
          270          300          330
GCT GTG CAA CCA AAA GCT GCA GGC TCT AGC CTT TTG AAC AAA ATT ACC AAT TCT TTG GTC CTG GAC ATT ATA AAG
A  V  Q  P  K  A  A  G  S  S  L  L  N  K  I  T  N  S  L  V  L  D  I  I  K
          360          390          420
CTG GCT GGT GTC CAT ACA GTA GCC AAC TGC TTT GTA GTT CCT ATG GCA ACT GGT ATG AGT CTA ACT CTG TGT TTC
L  A  G  V  H  T  V  A  N  C  F  V  V  P  M  A  T  G  M  S  L  T  L  C  F
          450          480          510
TTA ACA TTA CGA CAC AAA AGA CCA AAG GCA AAG TAT ATT ATA TGG CCA CGA ATA GAC CAG AAG TCC TGC TTT AAA
L  T  L  R  H  K  R  P  K  A  K  Y  I  I  W  P  R  I  D  Q  K  S  C  F  K
          540          570          600
TCC ATG ATC ACT GCA GGT TTT GAG CCT GTG GTG ATA GAA AAT GTT TTG GAA GGT GAC GAG CTG CGT ACA GAC CTG
S  M  I  T  A  G  F  E  P  V  V  I  E  N  V  L  E  G  D  E  L  R  T  D  L
          630          660          690
AAA GCA GTG GAG GCT AAA GTC CAG GAA CTT GGG CCT GAT TGC ATT CTG TGT ATT CAT TCT ACT ACA TCC TGT TTT
K  A  V  E  A  K  V  Q  E  L  G  P  D  C  I  L  C  I  H  S  T  T  S  C  F
          720          750          780
GCT CCA AGG GTG CCT GAT AGA TTA GAA GAA CTG GCT GTG ATT TGT GCT AAT TAT GAC ATT CCA CAT ATA GTT AAT
A  P  R  V  P  D  R  L  E  E  L  G  A  V  I  C  A  N  Y  D  I  P  H  I  V  N
          810          840          870
AAT GCT TAT GGA GTG CAG TCT TCA AAG TGT ATG CAT CTC ATT CAG CAG GGG GCT CGA GTT GGT AGA ATA GAT GCT
N  A  Y  G  V  Q  S  S  K  C  M  H  L  I  Q  Q  G  A  R  V  G  R  I  D  A
          880          910          940
TTT GTT CAG AGC TTG GAC AAA AAT TTT ATG GTT CCA GTA GGT GGT GCT ATA ATT GCT GGC TTT AAT GAT TCA TTC
F  V  Q  S  L  D  K  N  F  M  V  P  V  G  G  A  I  I  A  G  F  N  D  S  F
          970          1000          1030
ATT CAG GAA ATC AGC AAG ATG TAT CCA GGA AGA GCT TCA GCT TCA CCT TCT TTA GAT GTC CTT ATT ACT TTA TTG
I  Q  E  I  S  K  M  Y  P  G  R  A  S  A  S  P  S  L  D  V  L  I  T  L  L
          1060          1090          1120
TCA CTT GGA TCA AAT GGC TAT AAG AAG CTA CTA AAA GAA AGA AAG GAA ATG TTT TCA TAT TTG TCC AAC CAA ATA
S  L  G  S  N  G  Y  K  K  L  L  K  E  R  K  E  M  F  S  Y  L  S  N  Q  I
          1150          1180          1210
AAG AAG TTG TCA GAA GCC TAC AAT GAA AGA CTG TTG CAT ACA CCT CAC AAT CCC ATA TCT GTC ACT CAG CTT GGC
K  K  L  S  E  A  Y  N  E  R  L  L  H  T  P  H  N  P  I  S  V  T  Q  L  G
          1240          1270          1300
TCG ATG CTT TTT ACC AAA CAG GTT TCT GGA GCC AGG GTT GTG CCT CTT GGG TCC ATG CAA ACT GTG AGT GGC TAT
S  M  L  F  T  K  Q  V  S  G  A  R  V  V  P  L  G  S  M  Q  T  V  S  G  Y
          1330          1360          1390
ACT TTC AGA GGC TTT ATG TCA CAT ACA AAT AAT TAC CCT TGT GCT TAC CTC AAT GCT GCA TCA GCC ATC GGA ATG
T  F  R  G  F  M  S  H  T  N  N  Y  P  C  A  Y  L  N  A  A  S  A  I  G  M
          1420          1450          1480
AAG ATG CAG GAT GTG GAC CTG TTC ATA AAC AGA CTT GAC AGG TGT TTA AAG GCA GTA AGA AAA GAA CGA AGT AAA
K  M  Q  D  V  D  L  F  I  N  R  L  D  R  C  L  K  A  V  R  K  E  R  S  K
          1510          1540          1570
GAG AGT GAT GAC AAT TAT GAC AAA ACT GAA GAT GTG GAT ATT GAA GAA ATG GCT TTA AAA CTA GAT AAT GTA CTT
E  S  D  D  N  Y  D  K  T  E  D  V  D  I  E  E  M  A  L  K  L  D  N  V  L
          1600          1630          1660
CTT GAC ACA TAC CAG GAT GCT TCT TCA TGA
L  D  T  Y  Q  D  A  S  S  *

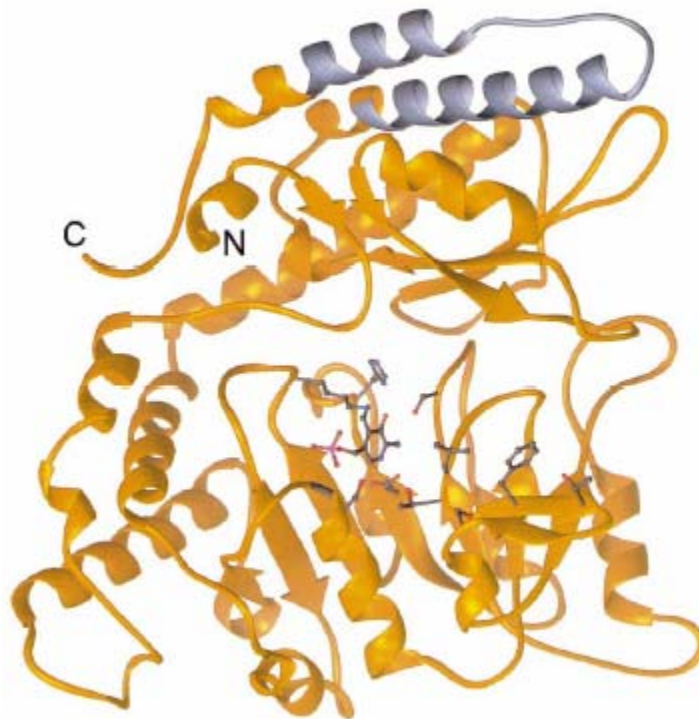
```

Die cDNA beider Klone ist identisch, bis auf eine 156 bp lange Insertion zwischen Basen 111 und 112 der J-D.1 Sequenz für die L-D.1 Sequenz (rot hervorgehoben) (Wies et al., 2000). Das dominante Epitop (Herkel et al., 2002) liegt zwischen Base 1222 und 1330 (grün hervorgehoben).

Es konnte ein dreidimensionales Modell (Abb. 1.2) des Moleküls erstellt werden, welches einer Pyridoxalphosphat abhängigen Transferase ähnlich ist. Dieses Modell lässt die Annahme zu, dass das SLA/LP Molekül zu der Unterfamilie der Serin-Hydroxymethyltransferasen gehört (Kernebeck et al., 2001). Bislang konnte diese Annahme allerdings noch nicht bestätigt werden.

Der kürzeren 46,9 kDa Variante, welche von einer Jurkatzelllinie isoliert und kloniert wurde (J-D.1), konnte bis jetzt keine Funktion als Transferase zugeschrieben werden. Ihre Funktion ist unklar.

Abb. 1.2: Dreidimensionales Modell des SLA/LP Moleküls



Das dominante Epitop ist grau gekennzeichnet (aus Kernebeck et al., 2001).

Das SLA/LP Molekül ist evolutionär hoch konserviert. So finden sich Sequenzen mit einer sehr hohen Homologie zu SLA/LP bei verschiedenen Spezies, einschließlich Mensch, Maus, Ratte, Fruchtfliege, *C. elegans* (Nematode) und *Methanococcus jannaschii* (Archaea) (Wang et al., 2005 in press). Abbildung 1.3 zeigt eine Gegenüberstellung der Proteinsequenzen verschiedener Spezies. Die hohe Konservierung ließ den Schluss zu, dass molekulares Mimikry zwischen dem SLA/LP

Molekül und homologen bakteriellen Proteinen die Autoimmunantwort gegen das SLA/LP Molekül während bakterieller Infektionen auslösen und vorantreiben kann. Diese Hypothese konnte bisher allerdings nicht bestätigt werden.

SLA/LP wird in vielen verschiedenen Säugetiergeweben exprimiert, wobei die Expression in Leber, Pankreas, Lunge und Nieren am stärksten ist (Stechemesser et al., 1993).

Abb. 1.3: Alignment der Aminosäuresequenz des SLA/LP Moleküls verschiedener Spezies

Mensch	----
Mus musculus	----MDSNNFLGNCVGEREGRVASALVARRHYRF IHGIGRSGDISAVQPKAAGSSLLNK
Drosophila	MLASLDSNNYPHKVGLGEREAR IACKLVARRHYNFHGIGRSGDLEAQPKAAGSTLLAR
C. elegans	-----MIPVGAGEREGRVLTPLVQRLHSNLTHGIGRSGNLEIQPKALGSSMLAC
Methanococcus j.	----MDTDKDPNVVQIGEREARVYTKLQRDGVDFCHGVGRSGNLIDPQPKAPGASVMYK
Mensch	ITNSLVLDI IKLAGVHTVANCFFVPMATGMSLTLCFLTLRHKRPKAKYI IWPRIDQKSCF
Mus musculus	ITNSLVLVNIKLAGVHVSASCFFVPMATGMSLTLCFLTLRHKRPKAKYI IWPRIDQKSCF
Drosophila	LTNALILDLRIGLPSACGFLVPMCTGMTLTLCLQSLRKRPPGARYVLSRIDQKSCF
C. elegans	LSNEFAKHALHLGLHAVKSCIVVPLCTGMSLSLCMTSWRRRRPKAKYVWLRIDQKSSL
Methanococcus j.	LTNKLLESFLKALGLK--VNAIATPVATGMSLALCLSA-ARKKYNNSVVIYPYAAHKSPI
Mensch	KSMITAGFEPVVIENVLEGDELRTDLKAVEAKVQ-ELGPDCILCIHSTTSCFAPRVPDRL
Mus musculus	KSMVTAGFEPVVIENVLEGDELRTDLKAVEAKIQ-ELGPEHILCLHSTTACFAPRVPDRL
Drosophila	KAITATGLVPVVIPCLIKGESLNTNVDLFRKIK-SLGVDSLCLYTTTSCFAPRNSDDI
C. elegans	KSIYHAGFEPVIVEPIRDRDSLITDVETVNR IIE-QRG-EEILCVMTTSCFAPRSPDNV
Methanococcus j.	KATSFIGMRMLVETVLGDIVKVEVSDIEDAIRKEINENNNPVVLTSTLTFPPRKSDDI
Mensch	EELAVICANYDIPHI VNNAYGVQSSKCMHLIQQGARVGRIDAFVQSLDKNFMVPGGAI I
Mus musculus	EELAVICANYDIPHVNNAYGLQSSKCMHLIQQGARVGRIDAFVQSLDKNFMVPGGAI I
Drosophila	AEVSKLSKQWQIPHLVNNAYGLQAKEIVNQLECANRVGRIDYFVQSSDKNLLVPVGS AIV
C. elegans	EAI SAICAAHDVPHLVNNAYGLQSEETIRKIAAAHECGRVDAVVQSLDKNFQVPGGAVI
Methanococcus j.	KEIAKICQDYDIPHI INGAYA IQNFYIEKLLKALKY-RIDAVVSSDKNLFPTIGGGII
Mensch	AGFNDSFIQEISKMYPGRASASPSLDVLTLLSLGSGNGYKLLKERKEMFSYLSNQIKKL
Mus musculus	AGFNEPFIQDISKMYPGRASASPSLDVLTLLSLGCSGYRLLKERKEMFVYLSTQLKKL
Drosophila	ASFNESVLHDVASTYAGRASGSQSLDVLMTLLSLGRNGFRLLFDQRGENFNYLRENLRKF
C. elegans	AAFQNHIIQSIAQSYPRASSVPSRDLVLTLLYQGSFAFLEPFQKQKQMF LKMRRKLISF
Methanococcus j.	YTKDESFLKEISLTYPGRASANP I VNILISLLAIGTKDYLNLMKEQKECKLLNELLEDL
Mensch	SEAYNERLLHTPHNPISLAMTLKTLDEHRDKAVTQLGSM LFTFQVSGARVVPLGSMQT-V
Mus musculus	AEAHRERLLQTPHNPISLAMTLKTIDGHDKAVTQLGSM LFTFQVSGARAVPLGNVQT-V
Drosophila	AEPRGEIVIDSRFNISLAITLTLATLAGDQMKSI TKLGSMLHMRGVSGARVIVPQNKNT-I
C. elegans	AENIGECVYEVENEISSAMT LSTIPPAKQ---TLFGSILFAKITGARVVTSSQSKTTI
Methanococcus j.	AKKKGEKVLNV-ENPISSCITTK-----KDPLDVAGKLYNLRVTGPRGVRND-----
Mensch	SGYTFRGMFSHTNYP CAYLNAASAI GMKMQDV DLF IKRLDRCLKAVRKERSKES---DD
Mus musculus	SGHTFRGMFSHADNYP CAYLNAAAAIGMKMQDV DLF IKRLDKCLNIVRKEQTRASVVSGA
Drosophila	DGHEFLGK-----
C. elegans	EGCEF INFGSHTTEQHGGYLNIA CSVGMTDHELEELFTRLTSSYAKFVRELAKED---ER
Methanococcus j.	-----KFGTCYLKEYPYDYIVVNSAIGVKKEDIYKVI EKLDDEVL-----
Mensch	NYDKTEDVDIEEMALKLDNVLLD TYQDASS
Mus musculus	DRNKAEDADIEEMALKLDDVLDVGDVGGPAL
Drosophila	-----
C. elegans	INSSGRRIPINE-SFDMEND-----
Methanococcus j.	-----

Die evolutionär hoch konservierte Sequenz des SLA/LP Proteins in verschiedenen Spezies.

1.6 Tiermodelle der Autoimmunen Hepatitis

Autoimmune Hepatitis kann im Menschen nur schwer erforscht werden, da die Diagnose erst in einem relativ späten Stadium erstellt werden kann, die Patienten einen heterogenen genetischen Hintergrund besitzen und es an Gewebepräparaten mangelt. Daher wird schon seit Jahren versucht, ein repräsentatives Tiermodell zu entwickeln (Jaeckel, 2002). Bisher konnte noch kein Standardmodell für eine autoimmune Hepatitis geschaffen werden. Scheiffarth et al. (1967) und Warnatz et al. (1975) waren die ersten, die eine experimentelle Hepatitis in Mäusen hervorrufen konnten. Sie immunisierten Inzuchtmäuse mit allogenen Leberhomogenat und Komplettem Freund's Adjuvans (CFA). Scheiffarth et al. konnten nach der Immunisierung periportale Infiltrate mit einer Nekrose des Leberparenchyms nachweisen. Gleichzeitig gelang der adoptive Transfer der Erkrankung mit Milzzellen und Lymphknotenzellen in syngene Empfänger. Dies verdeutlicht, dass eine zellvermittelte Immunität für die Entstehung einer Experimentellen Autoimmunen Hepatitis (EAH) verantwortlich ist.

Andere Arbeitsgruppen benutzten zur Immunisierung den Überstand eines Leberhomogenats nach Zentrifugation bei 100.000g (S100) (Mori et al., 1985^{1,2}; Araki et al., 1987). Durch intramuskuläre Injektion dieses Leberhomogenats (S100) in Mäuse, zusammen mit CFA, konnten sie eine EAH induzieren. Die Erkrankung konnte, durch Injektion von Milzzellen dieser behandelten Tiere in syngene Empfänger, auf diese übertragen werden. Allerdings konnte nicht eindeutig bewiesen werden, ob dieser Transfer mit spezifischen, reaktiven T-Zellen zusammenhängt, da Milzzellen unbehandelter Mäuse ähnlich auf leberspezifische Proteine reagierten, wie Milzzellen behandelter Tiere. Es wurde gezeigt, dass der Mausstamm C57BL/6 im Vergleich zu den Mausstämmen BALB/c und C3H/He der empfänglichste für eine EAH ist (Lohse et al., 1990).

Lohse et al. (1990) modifizierten die vorhandenen Protokolle dahingehend, dass sie durch einmalige intraperitoneale Injektion von S100 in CFA eine länger andauernde EAH (6 Monate), vor allem in C57BL/6 Mäusen, induzierten. Die Arbeitsgruppe konnte eine proliferative T-Zell Antwort nach spezifischer Stimulation von Milzzellen mit einer Subfraktion des S100 zeigen. Zusätzlich konnten sie die induzierte Hepatitis anhand ConA stimulierter Milzzellen aus S100 immunisierten C57BL/6 Mäusen auf syngene Empfängertiere adoptiv transferieren.

Die Tatsache, dass die Induktion einer EAH stammabhängig ist, weist auf die Bedeutung des genetischen Hintergrundes für die Durchbrechung der leberspezifischen Toleranz und der damit verbundenen Empfänglichkeit für die Erkrankung hin. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass der Serumspiegel von Alanin Aminotransferase (ALT) als Marker einer Hepatozytenschädigung erhöht war, bevor es zu histologischen Veränderungen kam. Charakteristische Autoantikörper traten erst einige Wochen nach Induktion der Erkrankung auf und blieben auch nach Abklingen histologischer und biochemischer Anzeichen erhalten (Lohse et al., 1992).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war, die Rolle des SLA/LP Moleküls in der Pathogenese der autoimmunen Hepatitis und die Auslösung der Immunantwort gegen SLA/LP zu untersuchen.

Da die Funktion des SLA/LP Moleküls unbekannt ist, war ein weiterer Ansatz, rekombinantes SLA/LP nativ herzustellen, um so die potentielle enzymatische Aktivität von SLA/LP untersuchen zu können.

Eine zentrale Frage war, ob das Auslösen der Autoimmunreaktion gegen SLA/LP mit der Funktion des SLA/LP Moleküls in Zusammenhang steht. Es war daher wichtig, Expressionsorte und Expressionsraten von SLA/LP zu definieren. Weiter sollte untersucht werden, ob bei AIH Patienten eine aberrante Expression des Antigens vorliegt. Da zwei verschiedene Varianten des Antigens nachgewiesen wurden, mußten die Expressionsanalysen beide Varianten differenzieren können. Die Expression sollte in Lymphozyten und Hepatozyten untersucht werden.

Um zu klären, ob die Autoimmunreaktion gegen SLA/LP an der AIH-Pathogenese beteiligt ist, sollte versucht werden, ein Tiermodell einer experimentellen, SLA/LP-vermittelten, autoimmunen Hepatitis zu entwickeln.

2 Material

2.1 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> XL10-Gold Ultrakompetente Zellen	Stratagene, Heidelberg
<i>E. coli</i> BL21(DE3) Ultrakompetente Zellen	Stratagene, Heidelberg

2.2 DNA

2.2.1 Vektoren

pcDNA3.1 (+) Vektor	Invitrogen, Karlsruhe
pET-30a(+) Vektor	Novagen/Merck, Darmstadt
pIVEX MBP Fusionsvektor	Roche Diagnostics, Mannheim

2.2.2 Oligodesoxynukleotide und cDNA

Oligodesoxynukleotide wurden von Metabion, Planegg-Martinsried bezogen. Sie wurden entsalzt geliefert.

Humane und murine cDNA, MTC Panel (Multiple Tissue cDNA) wurden von BD Biosciences (Heidelberg) bezogen. Das MTC Panel ist ein Set normalisierter *first strand* cDNA, erzeugt aus RNA verschiedener Zellen bzw. Gewebe.

2.2.2.1 PCR-Primer

PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel und durch Sequenzierung verifiziert.

<i>β-Aktin</i>	(Produkt: 70bp)
sense	5'- gaa gtc cct cac cct ccc aa -3'
antisense	5'- ggc atg gac gcg acc a -3'

<i>β-2-Mikroglobulin</i>	(Produkt: 282 bp)
sense	5'- gtg ctc gcg cta ctc tct ct -3'
antisense	5'- cgg cag gca tac tca tct tt -3'

<i>GAPDH</i>	(Produkt: 480 bp)
<i>sense</i>	5'- gcc atg gag ct ccc gtt ca -3'
<i>antisense</i>	5'- ccc atc acc atc ttc cag gag cg -3'
<i>J.D-1 human</i>	(Produkt: 227 bp)
<i>sense</i>	5'- ctg gag aag gtt cat -3'
<i>antisense</i>	5'- gcc ttt ggt ctt ttg tgt cg -3'
<i>L.D-1 human</i>	(Produkt: 156 bp)
<i>sense</i>	5'- caa gtg tcc aga gaa tgg ctg gg -3'
<i>antisense</i>	5'- cct gta atg acg acg agc aac c -3'
<i>SLA/LP (murin)</i>	(Produkt: 260)
<i>sense</i>	5'- ccc gat aga tta gaa gaa ctg gc -3'
<i>antisense</i>	5'- acg gcg agg ctg agg ctc ttc c -3'

2.3 Enzyme und andere Proteine

Falls nicht anders vermerkt, wurden Enzyme der Firma New England Biolabs (Schwalbach) verwendet.

Benzonase Nuklease	Novagen/Merck, Darmstadt
Collagenase IV	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DNase	Roche Diagnostics, Mannheim
Lysozym	Calbiochem-Behring, La Jolla, USA
Rekombinante Enterokinase	Novagen/Merck, Darmstadt
Rinderserum-Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg

2.4 Standards und Kits

DNA Längenstandard	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinmarker	Bio-Rad Laboratories, München
<i>Coomassie brilliant blue G-250</i>	Bio-Rad Laboratories, München

DAB Substrate Kit
 DNA-Ligations-Kit
 FlowCytomix Multiplex

MasterPlus SYBR Green I
 cDNA Synthesis Kit (AMV)
 Plasmid Midi-und Maxikit
 Qiamp RNA Blood Mini Kit
 RTS 500 *E. coli* HY Kit

Roche Diagnostics, Mannheim
 TaKaRa Biomedicals, Japan
 Bender MedSystems GmbH,
 Wien Österreich
 Roche Diagnostics, Mannheim
 Roche Diagnostics, Mannheim
 Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden
 Roche Diagnostics, Mannheim

2.5 Geräte

Bakterienschüttler Certomat
 Dialyseschläuche*
 Dialyseverschlussklammern
 Eigel eye image capture
 EDTA-Monovetten
 Einmalküvetten
 Elektrophoresekammer (Agarose)
 Eppendorfreaktionsgefäße
 Begasungsbrutschrank
 FastPrep Instrument
 Gelrockner
 Genequant RNA/DNA Kalkulator
 Inkubator Zellstar
 Kodak Biomax MR Film
 LightCycler 1.5 Instrument
 Lysing-Matrix-D Gefäß
 Masterflex Perfusionspumpe
 Microplate Reader MRX II
 Mikrotiterplatten 96 well, Zellkultur
 Mikrotiterplatten 96 well, Maxisorp
 MiniProtean II Elektrophorese System

B. Braun, Melsungen
 Serva, Heidelberg
 Roth, Karlsruhe
 Bio-Rad Laboratories, München
 Sarstedt, Nürnberg
 Ratiolab, Dreieich-Buchsschlag
 Hybaid, Heidelberg
 Eppendorf, Hamburg
 Heraeus, Hanau
 Qbiogene, Heidelberg
 Bio-Rad Laboratories, München
 Pharmacia, England
 Nunc, Wiesbaden
 Sigma Aldrich, Taufkirchen
 Roche Diagnostics, Mannheim
 Qbiogene, Heidelberg
 Cole Parmer, USA
 Dynex Technologies, USA
 Nalge Nunc, Wiesbaden
 Nalge Nunc, Wiesbaden
 Bio-Rad Laboratories, München

Mini Trans Blot Transfer cell	Bio-Rad Laboratories, München
Neubauer Zählkammer	Hecht-ASSISTENT, Sondheim
Parafilm	Brand GmbH, Wertheim
Petrischalen	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Photoprinter XLS 8600PS	Kodak, Rochester, USA
Potter Homogenisiergerät	Braun, Melsungen
Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
Quarzglas-Küvetten	Hellma GmbH & Co., Müllheim
RTS Proteo Master Instrument	Roche Diagnostics, Mannheim
Slide-A-Lyzer Dialyse Produkte	Pierce Biotechnology, Rockford
Spektrophotometer	Pharmacia, England
Stereomikroskop MZ-APO	Leica, Bensheim
Stereomikroskop SZ 40	Olympus, Hamburg
Sterilbank Microflow	Nunc, Wiesbaden
T520 Printer	Lexmark, Kentucky, USA
Transfer Membran, PVDF	Biotrace Pall Corporation, Pensacola, USA
Transilluminator	Stratagene, Heidelberg
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Überkopfmischer Reax 2	Heidolph Instruments, Schwal- bach
Varioklav Dampfdestillator	H+P Labortechnik, München
Vortex-Schüttler	Jankel & Kunkel Labortechnik, Staufen
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg Heraeus, Hanau Sorvall Du Pont, Bad Homburg
Zentrifugenflaschen	Beckmann, Kalifornien Nalgene Company, Rochester

***Dialyseschläuche**

Vor dem Benutzen müssen die Dialyseschläuche in 2% NaHCO₃, 1 mM EDTA pH 8 für 10 min auf 100°C erhitzt werden. Danach werden sie mit H₂O gespült, nochmals in einer Lösung 1 mM EDTA für 10 min auf 100°C erhitzt und in TBE bei 4°C aufbewahrt.

2.6 Chemikalien, Puffer, Medien und Lösungen**2.6.1 Chemikalien**

Falls nicht anders vermerkt, wurden die Chemikalien von den Firmen DAKO (Hamburg), Difco (Detroit, USA), VWR (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma Aldrich (Taufkirchen) und Riedel-de Haen (Seelze) bezogen.

Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Amylose Resin	New England Biolabs, Frankfurt
Avertin (2,2,2-Tribromoethanol)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Bio-Rad Protein assay	Bio-Rad Laboratories, München
Bacto-Agar	Difco, Detroit, MI, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, MI, USA
Bacto-Yeast Extract	Difco, Detroit, MI, USA
Concanavalin A (ConA),	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Glucose GlutaMax-I	Invitrogen, Karlsruhe
Glycin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Hefeextrakt-B	Qbiogene, Heidelberg
OptiPrep	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Phytohemagglutinin (PHA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Pyridoxalphosphat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Pyruvate (Gibco, Invitrogen)	Invitrogen, Karlsruhe
RedTaq Ready Mix PCR Reaktion Mix	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Sodium dodecyl sulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tryptone-B	Qbiogene, Heidelberg

2.6.2 Puffer, Medien und Lösungen

Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Factor Xa Cleavage Reagent	Novagen/Merck, Darmstadt
Fetal calf serum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Ficoll	Biochrom, Berlin
Gey's buffered saline solution (GBSS)	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)	Invitrogen, Karlsruhe
Nickel-NTA-Agarose,	Qiagen, Hilden
RedTaq PCR Reaktion Mix	Sigma Aldrich, Taufkirchen
RPMI 1640	Cambrex, Verviers
TRI Reagent	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	Biochrom AG, Berlin
TWEEN	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Western Lightning	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim

ACK-Lyse Puffer

8 g Ammoniumchlorid, 1 g Kaliumhydrogencarbonat, 0,04 g EDTA, ad 1 L mit H₂O, pH 7,4

Antibiotika-Stammlösungen

Ampicillin 50 mg/ml in H₂O

Tetracyclin 10 mg/ml in Ethanol

Kanamycin 10 mg/ml in H₂O

Die sterilfiltrierten, aliquotierten Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert und 1/1000 verdünnt mit Kulturmedium eingesetzt.

Coomassie Entfärbelösung

400 ml Methanol, 200 ml Eisessig, 1400 ml H₂O

Coomassie Färbelösung

0,25% Coomassie G-250, 20% Methanol, 10% Eisessig

DEPC Wasser

0,1 ml Diethylpyrocarbonate, 100 ml H₂O

DNA Probenpuffer (10x konzentriert)

30% Ficoll, 100 mM EDTA, 1% SDS, 25 mM Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, in H₂O

ELISA Stopplösung

28 ml H₂SO₄, ad 500 ml H₂O

ELISA Substratlösung

20 ml Substratpuffer, 1 ml TMB, 25 µl H₂O₂

ELISA Substratpuffer

6.3 g Citronensäure Monohydrat, 1 L H₂O, pH 4.1 mit KOH einstellen

FACS-Puffer

0,5% BSA, 4 mM EDTA, in PBS, pH 8,0 einstellen

LB-Medium

10 g Bacto Trypton, 10 g NaCl, 5 g Bacto Yeast Extract, ad 1 L mit H₂O, pH 7,5 einstellen; vor Gebrauch wurde das Medium mit dem entsprechendem Antibiotikum versetzt:

Ampicillin 50 µg/ml, Tetracyclin 10 µg/ml, Kanamycin 10 µg/ml

LB-Petrischalen

10 g Bacto Trypton, 10 g NaCl, 5 g Bacto Yeast Extract, 20 g Bacto-Agar, pH 7,5 einstellen

MBP Elutionspuffer

10 mM Tris/HCl, 10 mM Maltose, pH 7,2

MBP Equilibrierpuffer

10 mM Tris/HCl, pH 7,2

MBP Waschpuffer

10 mM Tris/HCl, 1M NaCl, pH 7,2

PBS

8,0 g NaCl, 1,3 g Na₂HPO₄, 0,2 g KCl, 0,2 g KH₂PO₄, ad 1 L H₂O

PBS-Tween

PBS, 0,1% TWEEN

Protein-Elektrophorese 12% Gel (Bio-Rad Mini-Gele)**1. Trenngel**

3.3 ml H₂O, 4 ml Rotiphorese Gel 30, 2,5 ml 1.5 M Tris (pH 8.8), 100 µl SDS (10%), 100 µl APS (10%), 4 µl TEMED

2. Sammelgel

680 µl H₂O, 170 µl Rotiphorese Gel 30, 130 µl 1 M Tris (pH 6.8), 10 µl SDS 10%, 10 µl APS 10%, 1 µl TEMED

3. Laufpuffer

72 g Glycin, 15 g Tris Base, 20 ml 10%ige SDS Lösung, ad 5 L H₂O

4. Laufbedingungen

15 min 75 V, 300 mA, dann 60 min 150 V, 300 mA

Proteinladepuffer denaturierend (2x konzentriert)

20 ml 10%iges SDS, 5 ml 2-β-Mercaptoethanol, 10 ml Glycerin, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 1 ng Bromphenolblau

TE-Buffer

10 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA

TBE Puffer

90 mM Tris, 90 mM Boric acid, 20 mM EDTA, in H₂O

TENS-Puffer

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1 N NaOH, 0,5% SDS, pH 8,0

TMB-Lösung

200 mg Tetramethylbenzidin in 10 ml Ethanol/Dimethylsulfoxid 1:1 (v/v), vor Gebrauch schütteln

Western Blot**1. Transfer Buffer**

3 g Tris, 14,4 g Glycin, 100 ml Methanol, ad 1 L H₂O, 4°C

2. Transferbedingungen

1 h, 300 V, 150 mA

YT-Medium

16 g Tryptone-B, 10 g Hefeextrakt-B, 5 g NaCl

Zellkultur-Medium

DMEM Medium + 4500 mg/L Glucose GlutaMax-I + Pyruvate, 1% Penicillin/
Streptomycin, 10% FCS

3 Methoden

Kulturmedien wurden bei Invitrogen oder Cambrex käuflich erworben. Sämtliche Puffer und Lösungen wurden grundsätzlich immer mit deionisiertem Wasser angesetzt. Mischungsverhältnisse sind für flüssige Substanzen als Volumen pro Volumen (v/v) und für Lösungen fester Stoffe als Gewicht pro Volumen (w/v) angegeben. Molekularbiologische Arbeiten wurden mit sterilen Medien und Gefäßen durchgeführt. Nach Benutzung wurden alle mit Bakterien kontaminierten Geräte und Flüssigkeiten autoklaviert. Für Arbeiten mit RNA wurden RNase-freie Plastikwaren und Chemikalien benutzt.

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung und Aufbewahrung von *E. coli*

Im Falle von *E. coli* Flüssigkulturen wurde dem Luria-Bertani-Medium (LB), je nach Resistenz des zu selektierenden, transfizierten Plasmids, ein entsprechendes Antibiotikum zugesetzt. Nach Animpfen mit einer Einzelkolonie wurde, soweit nicht anders angegeben, für ca. 16 h mit 250 rpm bei 37°C geschüttelt. Die Zelldichte wurde über die optische Dichte bei 600 nm (OD 600) verfolgt. Zur längerfristigen Aufbewahrung von *E. coli*-Stämmen sind Glycerinkulturen angelegt worden. Hierzu wurden 1200 µl einer Übernachtskultur mit 300 µl sterilem 87%igen Glycerin in einem 2 ml Einfrierröhrchen (*Nunc cryo vial*) gemischt und bei -80°C gelagert. Einzelkolonien wurden durch einen Verdünnungsausstrich auf 2% Agarose-LB Kulturplatten, je nach Stamm und Plasmid, mit den entsprechenden Antibiotika versetzt, kultiviert und für 16 h bei 37°C inkubiert. Kulturplatten wurden generell, wegen der Kondenswasserbildung, auf dem Deckel liegend bei 4°C aufbewahrt.

3.1.2 Plasmid-DNA-Präparation

3.1.2.1 Plasmid-Minipräparation

Ein 2 ml Aliquot einer Übernacht-Flüssigkultur eines plasmidtragendem *E. coli* Stammes wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 15 min bei 20.000 rzb und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Zellsediment wurde in 300 µl TENS-Puffer resuspendiert, mit 150 µl Natriumacetat (3M, pH 4,8) gemischt und nochmals zentrifugiert (20.000 rzb, 4°C). Der Überstand enthält die Plasmid-DNA und wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach anschließender Zentrifugation bei 20.000 rzb und 4°C wurden 900 µl kaltes Ethanol (EtOH) abzugegeben und die DNA bei -70°C für 10 min gefällt. Nach Waschen mit 70%igem EtOH und 30 min Zentrifugation bei 20.000 rzb wurde das getrocknete Sediment in 30 µl H₂O aufgenommen, die Konzentration bestimmt und die DNA bei -20°C gelagert. Die so isolierte DNA ist stark durch Proteine verunreinigt, allerdings ist dieser Reinheitsgrad für die Anwendungen in analytischen Restriktionsverdau ausreichend.

3.1.2.2 Plasmid-DNA Präparation

Die Plasmid Präparation erfolgte je nach Bedarf mit dem „Plasmid Purification Kit“ der Firma Qiagen. Hier wurden *E. coli* Bakterien durch alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979) aufgeschlossen und so die enthaltene Plasmid-DNA freigesetzt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe eines Anionenaustauschers aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit Isopropanol gefällt, mit EtOH gewaschen, getrocknet und in sterilem PBS aufgenommen. DNA, die bei spektrophotometrischer Analyse eine 260/280 nm Ratio von $\geq 1,80$ ergab, wurde bis zur Weiterverwendung bei -20°C eingefroren.

3.1.3 Restriktionsendonukleaseverdau

Um ein Plasmid zu linearisieren, oder eine Ligation bzw. das korrekte Einfügen eines DNA Fragments zu überprüfen, ist ein Restriktionsverdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen durchgeführt worden. Die Restriktionsenzyme wurden gemäß den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen verwendet. Bei einem Doppelverdau mit unterschiedlichen Enzymen, für die der Hersteller keinen gemeinsamen

Reaktionspuffer empfiehlt, wird die DNA zunächst mit dem Enzym geschnitten, welches eine niedrigere Salzkonzentrationen benötigt. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms, meist 20 min bei 65°C, wurden die Pufferbedingungen angeglichen und die DNA mit dem zweiten Enzym verdaut. Folgender Ansatz wurde dazu zusammengegeben: Zu etwa 1 µg Plasmid-DNA wurden 0,5 µl der entsprechenden Restriktionsendonukleasen (1 U), 2 µl des empfohlenen zehnfach konzentrierten (10x) Reaktionspuffers und, je nach Enzym, 1 µl einer BSA-Lösung (1 mg/ml, Endkonzentration 100 µg/ml) gegeben. Der Ansatz wurde mit sterilem Wasser auf 20 µl aufgefüllt und 1-16 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Die entstandenen Fragmente wurden mit 10x DNA Probenpuffer versetzt, in einem 1%igem Ethidiumbromid-Agarosegel aufgetrennt und im UV-Licht (360 nm) sichtbar gemacht. Danach wurde die entsprechende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel extrahiert.

3.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von Plasmiden und DNA Fragmenten wurde das Ligationskit der Firma TaKaRa, „DNA Ligation Kit“, benutzt. Der Vektor wurde nach Restriktion, vor der Ligation durch die Zugabe von Alkalischer Phosphatase (AP) (0.2 U/µg Vektor) dephosphoryliert, um eine Eigenligation zu verhindern. Die Ligation mit der im Kit enthaltenen T4-Ligase wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Als Kontrolle diente ein Legationsansatz mit Vektor-DNA ohne DNA Zusatz.

3.1.5 Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA

Zur Transformation wurde ein Aliquot (50 µl) kompetenter *E. coli* in Eiswasser aufgetaut und mit 1 µl 2-β-Mercaptoethanol für 10 min gemischt. Etwa 10 µl des Legationsansatzes wurden mit 50 µl kompetenter *E. coli* vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Um zwischen 10 bis 100 Kulturen zu erhalten, lag die eingesetzte Plasmid-DNA Menge bei 0.1 ng für *E. coli* XL10-Gold bzw. 10 ng für *E. coli* BL21(DE3) kompetente Zellen. Nach der Inkubation, in der sich die Plasmid-DNA an die Zellen anlagert, wird sie durch einen Hitzeschock (45 sec) bei 42°C in

die Zelle transformiert. Anschließend wurde das Gemisch 2 min lang auf Eis gekühlt und dann für 1 h bei 37°C und 250 rpm in 900 µl SOC Medium ohne selektierendes Antibiotikum im Bakterieneschüttler inkubiert. Nachfolgend wurden 200 µl des Ansatzes auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C ÜN im Brutschrank inkubiert.

3.1.6 RNA-Isolierung aus:

3.1.6.1 Vollblut

Die RNA-Isolierung aus Vollblut fand mit Hilfe des „Qiamp RNA Blood Mini Kit“ gemäß den Angaben des Herstellers statt. Für die Extraktion der RNA aus Vollblut wurde EDTA als Antikoagulans eingesetzt, da Heparin bei der Aufreinigung mit der im Kit enthaltenen Säule störend wirken kann.

Nach Erythrozytenlyse mit dem im Kit enthaltenen EL-Puffer ist das erhaltene Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C aufbewahrt worden. Bei der Weiterverarbeitung wurde das Pellet im RLT-Puffer (im Kit enthalten) 10 min bei 37°C inkubiert um sicher zu stellen, dass alle Salze gelöst waren. Alle weiteren Schritte wurden bei 24°C durchgeführt. Die Konzentration und die Reinheit der isolierten RNA wurde im „GeneQuant“ bestimmt.

3.1.6.2 Gewebe, Zellen und Zelllinien

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus Gewebe und Zellen mittels „Tri Reagent“ basiert auf der Methode nach Chomczynski & Sacchi (1987). Hierzu wurde ein Gewebestück in 1 ml „Tri Reagent“ aufgenommen und in ein „Lysing Matrix D“ Gefäß überführt. Für 30 sec wurde das Gewebe in einem *FastPrep Instrument* bei einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s für 45 sec zerkleinert. Kultivierte Zellen wurden mittels Pipette aus der Kulturplatte gesammelt und bei 1000g in einem Eppendorfreaktionsgefäß abzentrifugiert. Das entstandene Zellsediment wurde in 1 ml „Tri Reagent“ resuspendiert, gevortext und so die Zellen lysiert. Hiernach wurde die RNA laut Protokoll des Herstellers für „Tri Reagent“ extrahiert und in RNase freiem H₂O aufgenommen. Konzentration und Reinheit der RNA wurden im „Genen Quant“ bestimmt und die Qualität mit einem herkömmlichen 1%igem Agarosegel überprüft. Gelagert wurde die gelöste RNA bei -80°C.

3.1.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der enzymatischen DNA-Synthese imitiert den in jeder Zelle stattfindenden Zellteilungszyklus. Die Methode zur *in vitro*-Amplifizierung von DNA-Fragmenten, *polymerase chain reaction* (PCR), wurde von Saiki et al. im Jahre 1985 entwickelt. Zunächst werden kleine Oligonukleotide (*Primer*) als genomische Sonden in den Bereich des interessierenden DNA-Abschnittes gelegt. Die *Primer* sind dem aufgetrennten DNA-Abschnitt komplementär, ihre Lage bestimmt nachher die Größe des DNA-Amplifikates. Die Polymerase katalysiert die Produktion von DNA aus einzelnen Nukleotiden nach dem Code des DNA-Vorlagenstrangs, auch Matrize (Template) genannt. Sie bindet an die Enden der *Primer* und synthetisiert aus den beigefügten Nukleotiden einen dem DNA-Template komplementären Strang.

Allgemein werden die Schritte, Denaturierung der DNA bei 95°C, Anlagerung der *Primer* an den komplementären DNA-Strang und die Verlängerung der *Primer* zyklisch mehrere Male wiederholt. Ein Zyklus der PCR umfaßt alle drei Schritte, wobei die meisten PCR-Programme insgesamt 30 Zyklen beinhalten. Dem Reaktionsansatz wurden *Primer*, und im Überschuß DNA Fragment, welches die Matrize darstellt, sowie „RedTaq Ready PCR Reaktion Mix“ zugesetzt. Um mögliche Kontaminationen der Reaktionsansätze mit Fremd-DNA zu erkennen, wird immer eine Negativkontrolle mitgeführt, die anstatt DNA lediglich H₂O enthält. Damit Kontaminationen des Reaktionsansatzes mit Fremd-DNA oder Plasmiden vermieden werden, sind vor dem Ansetzen die Pipetten und Pipettenspitzen 15 min mit UV-Licht bestrahlt worden. Insbesondere Plasmide neigen dazu, in der Luft Aërosole zu bilden und sich dann an Geräten und Reagenzien festzusetzen.

3.1.8 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Isolierte RNA wurde mit oligo-dt-*Primern*, die spezifisch nur an die poly-A Sequenz der mRNA binden, des First strand cDNA Synthesis Kit der Firma Roche nach Angaben des Herstellers in cDNA transkribiert. Allgemein wurde 1 µg RNA in die RT-PCR Reaktion eingesetzt. Konzentration und Reinheit der erhaltenen cDNA wurde im GeneQuant bestimmt, gelagert wurde sie bei -20°C.

3.1.9 Messenger RNA Transkript Quantifizierung (*real-time PCR*)

Gesamt RNA wurde isoliert und cDNA (wie oben beschrieben) synthetisiert, um anschließend im „LightCycler Instrument“ quantifiziert zu werden. Die Quantifikation erfolgt durch Fluoreszenzmessungen von DNA bindenden Fluorochrom bei der generellen Detektion doppelsträngiger DNA. Das Fluorochrom „SybrGreen“ ist ein sequenzunspezifischer Farbstoff, der nur an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet. Die Emission von Fluoreszenz wird durch Interkalierung mit doppelsträngiger DNA verstärkt; somit ist die Menge an Fluoreszenz von der vorhandenen Konzentration an dsDNA abhängig. Sie verstärkt sich im Laufe des PCR-Prozesses.

Ein an das „LightCycler Instrument“ angeschlossener Computer zeichnet die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zahl der erfolgten PCR-Zyklen auf und wandelt sie in eine Graphik um. Die Vermehrung der DNA-Fragmente verläuft ab einer bestimmten Zykluszahl exponentiell. An ihrem Maximum angelangt, stagniert die Vermehrung. Durch logarithmische Auftragung werden die typischen, sigmaförmigen Kurven festgehalten, die in späteren Zyklen in ein Plateau auslaufen. Je nach vorhandener Menge findet bei einer hohen Konzentration an DNA das exponentielle Wachstum der Kurven schon zu einem frühen Zeitpunkt der Reaktion statt, oder später, wenn wenig DNA in der Probe vorhanden ist. An den linearen Bereich der Kurve wird nun eine Gerade angelegt. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der x-Achse wird als *crossing point* bezeichnet.

Um zwischen spezifischen und unspezifischen Produkten unterscheiden zu können, wird am Ende der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Schmelzkurve eines jeden Produktes ist von seiner Länge und seiner Sequenz abhängig. Wird ein DNA Fragment auf 95°C erhitzt, so wird die Fluoreszenz bei Erreichen des für ihn spezifischen Schmelzpunktes, welcher mit seinem Zerfall in Einzelstränge gleichzusetzen ist, rapide abnehmen. Es entsteht ein scharfer Knick in der Fluoreszenzkurve. Unspezifische Produkte hingegen weisen einen flachen Kurvenverlauf auf und ihr Schmelzpunkt ist bei einer niedrigeren Temperatur erreicht. Zur relativen Quantifizierung wurde die Expression der Zielgene mit der eines nicht regulierten Haushaltsgens (Hhg) normalisiert. Dabei wurden nicht die absoluten Startkopienzahlen oder -konzentrationen bestimmt, sondern die Expression des zu untersuchenden Gens auf ein zweites, homogen exprimiertes Gen bezogen. Durch diese Verfahrensweise wird die Varianz der Expressionsergebnisse, bedingt durch

unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienz sowie Fehler bei der RT-PCR innerhalb einer experimentellen Probe reduziert, da das Zielgen und das Hhg gleichermaßen betroffen sind. Nachfolgende Berechnungen des Expressionsunterschiedes heben diese individuellen Probeneffekte wieder auf. Als Hhg dienten hier GAPDH, β -Aktin oder β -2-Mikroglobulin.

Da nicht davon ausgegangen werden kann, dass sich die DNA-Menge in jedem Zyklus verdoppelt, wurde zunächst die Effizienz der jeweiligen PCR mit ihren spezifischen *Primern* an Hand einer Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen erstellt. Aus der Steigung dieser Standardkurve wurde die *real-time* PCR Effizienz (ϵ) bestimmt (Bernard & Wittwer, 2002). Die wirkliche Effizienz der *real-time* PCR bewegte sich unter optimierten Reaktionsbedingungen im Bereich von 1,8 bis 2. Da geringste Schwankungen in der Effizienz von Zielgen zu Referenzgen zu enormen Differenzen in den Expressionsunterschieden führen, sind Berechnungsmodelle entwickelt worden, die der unterschiedlichen Effizienz in den experimentellen Proben Rechnung tragen (Pfaffl, 2001).

Für die *real-time* PCR Reaktion wurden spezifische 5'-3' und 3'-5' *Primer* bei der Firma Metabion erworben, die vorzugsweise ein Produkt < 250 bp ergaben. Die Reaktion wurde mit dem „LightCycler FastStart DNA Master^{Plus} Kit“ der Firma Roche in einem „LightCycler Instrument“ entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Für jede cDNA Probe wurden separat identische Reaktionen mit *Primern* für das Hhg und *Primern* für das zu untersuchende Hhg angesetzt. Es wurden stets Duplikate angefertigt. Bei Abweichungen zwischen den Duplikaten von > 0,2% wurde die Reaktion wiederholt.

Die PCR Bedingungen waren beispielsweise, abhängig von den *Primerpaaren* wie folgt:

Ein Zyklus: 10 min bei 95°C

45 Zyklen: 10 sec 95°C, je nach *Primer* 5 sec bei 60-65°C und 10 sec bei 72°C
oder als *touch down* PCR, um die Spezifität zu erhöhen:

Ein Zyklus: 10 min bei 95°C

6 Zyklen: 10 sec bei 95°C, 5 sec bei 68°C bis 63°C (je Zyklus -
1°C) sinkend, 10 sec bei 72°C

40 Zyklen: 10 sec 95°C, 5 sec 62°C und 10 sec 72°C

Die Schmelzkurve des entstandenen Produkts wurde kontinuierlich von 65°C bis 99°C gemessen. Die Fluoreszenz wurde in Kanal 1 bei 530 nm gemessen. Die Spezifität des Produktes wurde an Hand der Schmelzkurve und mit einem 1%igen Agarosegel nachgewiesen. „LightCycler software“ errechnete die Schnittpunkte (*crossing points (Cp)*) der einzelnen Produkte.

Die Ratio wurde gemäß folgender Formel berechnet: $\varepsilon^{\text{Cp Referenzgen}} / \varepsilon^{\text{Cp Produkt}}$

3.1.10 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung bzw. Beschreibung von DNA-Fragmenten <500 bp wurde ein 2%iges, für größere Fragmente ein 1%iges Agarosegel verwendet. Zur Herstellung von Agarosegelen ist die Agarose in entsprechender Menge TBE in einem Mikrowellenherd aufgekocht, abgekühlt auf ca. 50°C und dann mit 1/10000 Vol. des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidium Bromid (10 mg/ml) versetzt worden. Dieser Farbstoff übernimmt die von der DNA absorbierte Energie von 260 nm und strahlt sie bei 590 nm im rot-orange Bereich ab. Das Gel wurde nun auf einen Gelträger gegossen und in eine mit 0,5 fach konzentriertem TBE Puffer gefüllten Elektrophoresekammer überführt. Die DNA Proben wurden mit ca. 1µl 10 fach konzentrierter DNA Ladepuffer gemischt, in Geltaschen gefüllt und bei einer Spannung von 150 Volt und 300 mA im Gel aufgetrennt. Ein DNA Längenstandard wurde stets mit eingesetzt. Die verschiedenen Banden sind mit einem „Eagle Eye image capture“ unter UV-Licht überprüft und photographisch dokumentiert worden.

3.1.11 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Aus Agarosegelen wurden die Banden von Interesse mit einem Skalpell vorsichtig ausgeschnitten und die DNA aus den Agarosestücken durch Dialyse wiedergewonnen. Dazu wurde das ausgeschnittene Gelstück in einen Dialyseschlauch gelegt, der mit wenig 0,5 fach konzentriertem TBE Puffer gefüllt und an den Enden mit passenden Klammern geschlossen wurde. Die Dialyseschläuche wurden dann in eine mit 0,5 fach konzentriertem TBE Puffer (ca. 700 µl) gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und die DNA für 2 h bei einer konstanten Stromstärke

von 300 V und 150 mA aus dem Gel in den Puffer überführt. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde die DNA enthaltende Lösung mit Natriumacetat (10 µl/100 µl Puffer, 3M, pH 4,8) und 2 Vol EtOH abs gemischt und für 10 min bei -70°C gekühlt. Die so ausgefällte DNA wurde nun bei 20.000 rzb für 30 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet einige Male mit 1 ml 70% EtOH (4°C) gewaschen, zentrifugiert und bei 24°C bis 45°C vollständig getrocknet.

3.2 Gewinnung rekombinanter Proteine

3.2.1 Protein-Überexpression in *E. coli*

Für die Überexpression wurde das jeweilige Zielgen in den Expressionsvektor pET-30a(+) (Novagen) kloniert. Das Zielgen steht somit unter der Kontrolle eines starken T7-Promotors. Dieser Promotor besteht aus dem Transkriptions- und Translationssignal des Bakteriophagen T7-Promotors und der lac-Operator-Sequenz (Dubendorff & Studier, 1991). Der pET-30a(+)-Vektor trägt außerdem den Promotor und die kodierende Sequenz für den lac-Repressor (*lacI*), so dass eine unerwünschte Aktivierung des T7-lac-Promotors und somit die Expression des Zielgens blockiert wird (Dubendorff & Studier, 1991). Plasmidinstabilität und die damit verbundene Expression des eventuell toxischen Proteins in Rechnung genommen, wurde das Expressionskonstrukt zunächst in den *E. coli* Stamm XL10-Gold kloniert, der kein T7-RNA-Polymerase-Gen enthält. Nach Etablierung des Expressionsplasmids in dem nicht-exprimierenden Wirt, kam es nach Transfer in den *E. coli* Expressionswirt BL21(DE3), welcher das T7-RNA-Polymerase-Gen unter lacUV5-Kontrolle besitzt, durch Zugabe von IPTG zur Induktion des Zielgens. IPTG diffundiert in die Bakterien und verhindert durch die Bindung an den lacZ-Repressor die Repression des lacZ-Operatorgens. Die Inhibition wird aufgehoben und das rekombinante Protein wird exprimiert. Die exprimierten Proteine können löslich oder unlöslich als Einschlußkörper (*Inclusion Bodies*) vorliegen. In einem typischen Versuchsansatz wurde zunächst eine Übernachtskultur des plasmidenthaltenden Bakterienstammes mit LB 1:10 verdünnt und als Vorkultur im Bakterieneschüttler bei 37°C, 250 rpm inkubiert. Nach ca. 2 h haben die Zellen eine OD 600 von 0.8 erreicht und die Expression der T7-Polymerase wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert.

Dieser Kulturansatz wurde 4h im Bakterienschüttler bei 37°C inkubiert, anschließend bei 4000g für 20 min abzentrifugiert, der Überstand sorgfältig dekantiert, das feuchte Bakterienpellet (etwa 3-5 g pro l Kultur) gewogen und das erhaltene Bakterienpellet bei -80°C bis zur nachfolgenden Proteinaufreinigung aufgehoben.

3.2.2 Proteinextraktion aus *E. coli*

Die Extraktion der in *E. coli* rekombinant exprimierten Proteine wurde mit dem „Bug Buster Protein Extraction Reagent“ gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit diesem Reagens können sowohl die löslichen als auch die aggregierten Proteine, welche als Einschlußkörper vorliegen, aus den Bakterienzellen gewonnen werden.

Das gewonnene Proteinsediment wurde in PBS aufgenommen.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Denaturierende Trichloressigsäure Fällung

Zur Konzentrierung von Proben für die Gelelektrophorese wurden Proteine aus Lösungen mit 10%iger Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt. Mit dieser Methode können Proteine mit einer Konzentration von >5 µg/ml ausgefällt werden. Unter ständigem Mischen am Vortex-Schüttler wurde die Probe tropfenweise mit soviel 10%iger Trichloressigsäure versetzt, bis eine erste, bleibende Trübung sichtbar wurde. Danach wurde der Ansatz 10 min bei 4°C inkubiert und anschließend für 10 min bei 16.000g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und TCA Reste im Pellet durch mehrmaliges Waschen mit kaltem, 80%igem Aceton entfernt. Anschließend wurde das Präzipitat 10 min bei 24°C offen getrocknet und dann in 1 ml PBS gelöst. Zur vollständigen Auflösung war eine kurzzeitige Inkubation bei 50°C sowie kräftiges vortexen notwendig, da denaturierte Proteine schwerlich in Lösung gehen.

Das Präzipitat wurde im gewünschten Puffer nach Einstellen des pH Wertes weiterverwendet.

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Untersuchung von Proteinen dienen diskontinuierliche, vertikale SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli, 1970). In diesem System wird Glycin den Proben zugesetzt und dient als Trägersubstanz. Der Einsatz von SDS dient der Entfaltung, Solubilisierung und Ladungsneutralisierung der Proteine. Der SDS Einsatz gewährleistet somit eine Trennung der Proteine nach Größe und nicht nach Ladung oder Faltung. Grundsätzlich wurde das Minigelsystem mit Sammel- und Trenngel eingesetzt. Der Aufbau und die Ausstattung der Gelapparatur erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die SDS-PAGE wurde unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen hergestellt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:2 mit 2-fach konzentriertem, denaturierendem Proteinladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C gekocht. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 150 V und 300 mA. Als Größenstandard diente der „Kaleidoscope Prestained Standard“ der Firma Bio-Rad. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Färbung der Proteine im Gel nach *Coomassie* oder ihres Transfers auf eine PVDF Membran (Westernblot-Methode).

3.3.3 Proteintransfer auf eine Membran (Westernblot)

Bei dieser von Towbin et al. (1979) beschriebenen Methode werden die in einem Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Verwendet wurden die Blotapparaturen der Firma Bio-Rad. Nach der Elektrophorese wurde das Gel luftblasenfrei auf eine Transfermembran gelegt und nachfolgend als Sandwich, mit Filtern und Fiberpads, in die Blotkassette gelegt. Der Transfer wurde bei 4°C und einer konstanten Stromstärke von 300 V und 150 mA über einen Zeitraum von 60 min durchgeführt.

3.3.4 Coomassie Färbung

Die Gele wurden 20 min in der *Coomassie*-Färbelösung bei 24°C inkubiert. Dadurch wurden die Proteinbanden in der Gelmatrix gefärbt und durch die in der Färbelösung vorhandene Essigsäure und Methanol fixiert. Anschließend wurden die Gele in der *Coomassie*-Entfärbelösung gewaschen und dann auf Filterpapier in einem Gelrockner getrocknet.

3.3.5 Immunoblotting immobilierter Proteine

Der Nachweis des Transfers spezifischer Proteine von einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte durch Färbung der Proteine mit dem DAB Substrat Kit oder der Chemilumineszenz. Hierzu wurde die Membran mit 2%igem Magermilchpulver in PBS-Tween für 1 h bei 24°C geblockt. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS-Tween erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (1:1000 verdünnt) ÜN bei 4°C. Anschließend wurde die Membran mehrere Male für 10 min mit PBS-Tween gewaschen und dann mit dem zweiten, peroxidasegekoppelten Antikörper (1:2000 verdünnt) für 1 h bei 24°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde die Membran mit einem Papiertuch getrocknet und alternativ mit dem DAB Substrat Kit gefärbt oder einem Chemilumineszenz Reagens zugesetzt. Dazu wurde die Membran zuerst für kurze Zeit in der „Western Lightning Lösung“ (PerkinElmer) entsprechend den Angaben des Herstellers geschwenkt, dann in eine Folie gelegt und für 5 sec bis 2 min einem Röntgenfilm exponiert, der anschließend in einer Entwicklungsapparatur entwickelt wurde. Nach Bedarf konnte die Membran anschließend, nach kurzem Waschen mit PBS, mit dem DAB Substrat Kit gefärbt werden (gemäß den Angaben des Herstellers).

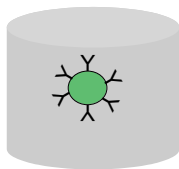
3.3.6 Multiplex Fluorescent Bead Immunoassay (FBI)

Quantitative Bestimmung der Zytokinkonzentration in Zellkulturüberständen, wurde mit dem „FlowCytomix Multiplex Kit“ (Bender MedSystems) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt (Swartzman, 1999). Mit diesem Kit ließen sich folgende, verschiedene Zytokine nachweisen: Interferon- γ (IFN γ), Interleukin-1 (IL-1),

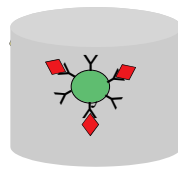
Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-17 (IL-17), Tumor Necrosis Factor α (TNF α) und Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor (GM-CSF).

Das „FlowCytomix Kit“ besteht aus Mikrospheren (*beads*) zwei verschiedener Größen, beschichtet mit Antikörpern, die jeweils spezifisch für die zu untersuchenden Zytokine sind (Abb. 3.1). Nach Zugabe des zweiten Antikörpers und Streptavidin-Phycoerythrin, wurde das fluoreszierende Signal im „Fluorescence Activated Cell Sorter“ (FACS) gemessen. Das „FlowCytomix Kit“ erlaubt die simultane Quantifizierung 10 verschiedener Zytokine.

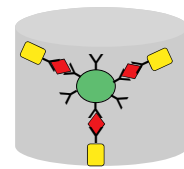
Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Zytokin-Bestimmung



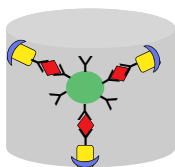
Eine mit spezifischen Antikörpern beschichtete, fluoreszierende Mikrosphäre (*microbead*) ist durch ihre Größe und ihren eigenen Spektralbereich definiert.



Das spezifische Zytokin bindet an die Antikörper, die an die *microbeads* gebunden sind.



Ein biotinkonjugierter, spezifischer zweiter Antikörper bindet an das Zytokin.



Streptavidin-Phycoerythrin bindet an das Biotin und seine Fluoreszenz wird im Durchflusszytometer („Fluorescence Activated Cell Sorter“ (FACS)) gemessen.



Zytokin



biotinylierter Antikörper



Streptavidin-Phycoerythrin (PE)

3.4 Zellkultur-Methoden

3.4.1 Zellkulturen

Als Kulturmedium diente „Dulbecco`s Modifiziertes Eagle`s Medium“ (DMEM Glutamax) mit zusätzlich 5-10% Fetal Calf Serum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die Zellkulturen der Hepatomzelllinie HepG2 wurden unter konstanten Bedingungen mit einem Gemisch aus 95% Luft und 5% CO₂ bei 37°C belüftet. Alle 4 Tage war das Nährmedium zu erneuern. Sobald die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurden sie nach der Trypsin-EDTA-Methode passagiert. Die Zellen wurden dabei aus ihrem Zellverband isoliert, dann auf mehrere neue Kulturflaschen (200.000 Zellen/ml) aufgeteilt und von neuem im Brutschrank kultiviert. Die Zellen konnten nach der 3. bis 7. Passage für die Versuche verwendet werden.

3.4.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Die Abnahme des Patientenspenderblutes erfolgte freundlicherweise in der Leberambulanz des Universitätsklinikums Mainz. Entnommen wurde das Blut mit EDTA-Monovetten.

Periphere mononukleäre Zellen (B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen, Thrombozyten) können mit Hilfe eines Ficollgradienten von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen getrennt werden. Ficoll ist ein ungeladenes Saccharose Polymer. Auf Grund seiner Dichte können Erythrozyten und tote Zellen die Ficollschicht passieren, Granulozyten in sie eindringen, während Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten sich in der Interphase sammeln. EDTA-Vollblut wurde mit sterilem PBS im Verhältnis 1:2 gemischt und 30 ml des Gemisches auf einen Ficollgradienten (12 ml, 24°C) geschichtet. Nach Zentrifugation bei 800 g (ohne Bremse) wurde die Interphase abgenommen, zweimal mit sterilem PBS gewaschen und die Zellzahl an Hand einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Bis zur Weiterbehandlung waren die Zellen bei 4°C in DMEM mit 5% FCS zu lagern.

3.4.3 Lymphozyten-Isolation aus:

3.4.3.1 Muriner Milz

Die Milz wurde den Mäusen steril entnommen, in PBS überführt, zur Aufschließung der Zellen mittels eines Stempels durch ein Sieb gedrückt und das entstandene Zellysat bei 800g abzentrifugiert. Zur Erythrozytenlyse wurde das entstandene Zellpellet in 2 ml ACK Puffer aufgenommen und für 2 min bei 24°C inkubiert. Anschließend wurden 50 ml PBS dazu gegeben und das Gemisch bei 800g über einen Zeitraum von 10 min zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS konnten die Zellen in DMEM und 5% FCS aufgenommen und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt werden.

3.4.3.2 Murinen Lymphknoten

Die poplitealen Lymphknoten wurden aus den Hinterbeinen der Versuchstiere steril entnommen und in PBS überführt. Zur Aufschließung der Zellen wurden die Lymphknoten anhand eines Stempels durch ein Sieb gedrückt und das entstandene Zellysat für 5 min bei 800g abzentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in DMEM und 5% FCS aufgenommen und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.4.3.3 Muriner Leber

Die Versuchstiere wurden anästhesiert und die Leber mit 0.05% collagenasehaltigem „Gey's buffered saline solution“ (GBSS) perfundiert. Danach wurde die Leber entnommen und mechanisch zerkleinert. Das erhaltenen Zellysat wurde für 30 min und 37°C in 0.05%iger Collagenase, 10% FCS und 0.1 mg DNase enthaltendem DMEM bei 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein steriles Metallsieb geleitet und nach zweimaligem Waschen mit PBS für 5 min bei 1600 rpm zentrifugiert. Die im Pellet lokalisierten nicht-parenchymatischen Zellen wurden in 10 ml DMEM, 2% FCS und 4 ml Optiprep aufgenommen und unter 2 ml DMEM geschichtet. Nach 15 min Zentrifugation bei 1500 rpm wurden die Lymphozyten, welche sich in dem entstandenem Ring befanden, in DMEM resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.4.4 Zellstimulation

3.4.4.1 Stimulation humaner peripherer mononukleärer Blutzellen

Humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro well in eine 96-well Rundbodenplatte ausplattiert und mit $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert. Die Zellen wurden bei 37°C , 100% Luftfeuchtigkeit und einem CO_2 Gehalt von 5% für 72 h inkubiert. Aliquots wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen, die Zellen abzentrifugiert und als Pellet bei -20°C bis zur nachfolgenden RNA-Isolierung aufbewahrt.

3.4.4.2 Stimulation muriner Lymphozyten aus Milz und Leber

Zur Stimulierung von Leukozyten mit Concanavalin A (ConA) oder rekombinantem SLA/LP wurden die Zellen in DMEM aufgenommen, auf eine Dichte von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt und entweder mit $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ConA oder $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ SLA/LP bei 37°C in einer Rundboden Mikrotiterplatte ($200 \mu\text{l}/\text{well}$) kultiviert. Für die quantitative PCR wurden zu verschiedenen Zeitpunkten die Zellen abzentrifugiert (10 min, 225 g) und als Pellets bis zur RNA-Isolation, cDNA Synthese und anschließender quantitativer PCR, bei -20°C gelagert. Im Falle des Proliferationstests erfolgt die Proliferationsmessung der Lymphozyten durch Einbau von ^3H -Thymidin in die zelluläre DNA nach Stimulation der Proliferation mit ConA oder SLA/LP. ^3H -Thymidin ($0.25 \mu\text{Ci}/\text{well}$) Zugabe erfolgte für die letzten 20 h einer 96 h Zellkultur. Die inkorporierte Radioaktivität wurde mit dem Szintillationszähler gemessen.

3.4.4.3 Stimulation muriner Lymphknotenzellen

Isolierte Lymphknotenzellen (1×10^6 Zellen/Well) wurden in einer Rundboden Mikrotiterplatte in DMEM und 5% FCS bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. ConA ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) und rekombinantes SLA/LP ($3 \mu\text{g}/\text{ml}$) wurden zu Beginn der Kultur zugegeben. Nach 72 h Kultur wurden die Überstände bei -20°C gelagert.

3.5 Tierexperimentelle Methoden

3.5.1 Versuchstiere

Die für die Immunisierung verwendeten Mäusestämme (FVB/NHSD, BALB/c, C57BL/6, B10.PL und Interleukin 10 defiziente C57BL/6 (IL-10 -/-)) entstammen der Zucht des Tierstalls der klinischen, theoretischen Institute der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Es wurden acht Wochen alte Mäuse unterschiedlichen Geschlechts immunisiert.

3.5.2 Anästhesie der Versuchstiere

Vor Herzpunktion und Entnahme der Leber wurde den Tieren, je nach Gewicht, zwischen 500 µl und 700 µl Avertin (2.5%) i.p. mit einer sterilen Kanüle (30 G^{1/2}) gespritzt. Die Betäubung der Tiere setzte nach ca. 5 min ein.

3.5.3 Leberenzyme

GOT und GPT wurden unter Standardbedingungen freundlicherweise im Zentrallabor der Mainzer Universitätsklinik bestimmt.

3.5.4 Paraffinschnitte

Falls nicht anders vermerkt, wurden Leberbiopsien in 2% Formalin aufbewahrt. Paraffinschnitte und histologische Hämatoxylin und Eosin (HE) Färbung wurden anschließend freundlicherweise vom pathologischen Routinelabor der Universitätsklinik Mainz angefertigt.

3.6 Spektroskopische Methoden

3.6.1 Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Proben

Die Konzentrationsbestimmung von DNA- bzw. RNA-Proben erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm in einer 100 µl Quarzglas-Mikroküvette im GeneQuant RNA/DNA Kalkulator. Zur Kontrolle einer möglichen Verunreinigung der Probe mit Proteinen, mißt das Gerät außerdem die Absorption bei 280 nm. Die im Verlaufe der Untersuchungen präparierte DNA sollte ein Verhältnis der Absorptionswerte bei 260/280 nm zwischen 1.8 und 2.0 haben.

3.6.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

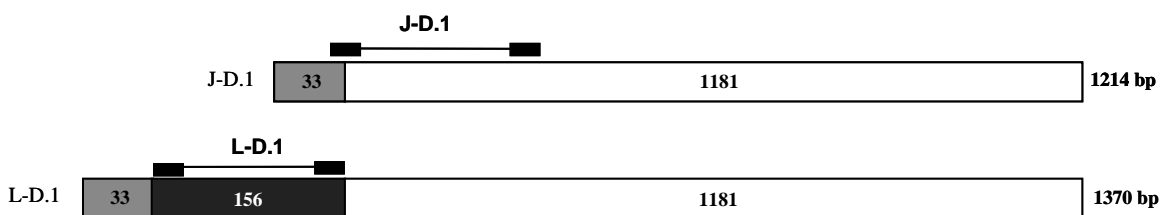
Die Proteinkonzentration verschiedener Proben wurde mit einem Farbreagenz der Firma Bio-Rad („Bio-Rad Protein Assay“), basierend auf der von Bradford (1976) etablierten Methode, bestimmt. Hierbei wird durch die Bindung von „Coomassie brilliant blue G-250“ an Proteine im sauren Milieu das Absorptionsmaximum der Farbe verschoben. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Zur Messung des Proteingehalts wurden zwischen 1 µl und 5 µl der Probe mit 1 ml der 1:5 mit H₂O verdünnten Farbstofflösung gemischt und für 10 min bei 24°C bis zur Ausbildung stabiler Farbstoff-Protein-Komplexe inkubiert. Die Extinktion wurde im Spektrophotometer in Einmalküvetten bei 595 nm gegen einen Leerwert gemessen. Die Proteinkonzentration wurde über eine BSA-Eichreihe errechnet.

3.7 Expressionsanalysen der Spleißvarianten

Wie bereits gezeigt wurde (Wies et al., 2000), liegt das SLA/LP Protein als längere (L-D.1) oder kürzere (J-D.1) Variante vor. Um die Varianten in der quantitativen *real-time* PCR unterscheiden zu können, wurde das *Primerpaar* für den Expressionsnachweis von L-D.1 so gewählt, dass ein Fragment von 156 bp amplifiziert wird, welches nur in der L-D.1 Variante vorkommt. Im Falle des zweiten *Primerpaars* für die Amplifizierung der J-D.1 Variante, wurde ein *Primer* so gewählt,

dass er exakt auf der Insertionsstelle für die L-D.1 Variante liegt und somit nur ein Produkt ergibt, wenn dieser Einschub (*Insert*) nicht vorhanden ist, also die J-D.1 Variante exprimiert ist. Die Korrektheit der hier erhaltenen Produkte wurde durch Sequenzierung verifiziert (Abb. 3.2).

Abb. 3.2: Amplifizierungsstrategie der SLA/LP-Varianten cDNA



Sense bzw. *antisense Primer* (■) für die Amplifizierung der Teilprodukte des J-D.1 Moleküls oder des L-D.1 Moleküls. Der *sense Primer* für die J-D.1 Variante ist so gewählt, dass er exakt auf der Stelle liegt, in die die L-D.1 Insertion eingefügt ist. Dementsprechend kann er nur an die cDNA binden, wenn das J-D.1 Template vorliegt.

3.7.1 Patienten

3.7.1.1 Serum

In diese Studie wurden im Zeitraum von September 2003 bis Dezember 2004 AIH Patienten (n=26), Patienten mit anderen autoimmunen Verdauungstrakterkrankungen (PBC und PSC, n=32), und Patienten mit viraler Lebererkrankung (HCV und HBV, n=10) aufgenommen, die sich in der Leberambulanz der 1. Medizinischen Klinik der Universitätsklinik Mainz vorgestellt haben (eine Zustimmung der Ethikkommission lag vor). Die Diagnose der AIH Patienten war durch den Nachweis eines oder mehrerer Autoantikörper gegen LKM1, SLA/LP, ANA oder AMA seit mehreren Jahren gefestigt.

Als Kontrolle dienten Gesundprobanden (n=10), die ein Jahr vor und nach der Blutentnahme keine Krankheitssymptome bzw. erhöhte GOT- oder GPT-Werte aufwiesen.

3.7.1.2. Leberbiopsien

Die Stanzbiopsien stammen aus demselben Patientenkollektiv, wie bereits in Abschnitt 3.7.1.1 beschrieben (eine Zustimmung der Ethikkommission lag vor). Allerdings wurde hier auf ein Material zurückgegriffen, das gesammelt in der Stanzbiopsienbank der Universitätsklinik Mainz vorliegt. Die Leberbiopsien sind in der Endoskopie der Universitätsklinik Mainz den Patienten entnommen worden. Sie waren als ca. 1 cm große Stanzbiopsien bei -80°C gelagert und wurden uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

In die Studie sind 17 AIH Patienten, 30 Patienten mit anderen autoimmunen Verdauungstrakterkrankungen (PBC und PSC), 9 mit nicht autoimmuner Lebererkrankung, 10 mit viraler Hepatitis und 9 Patienten, die sich neu in der Leberambulanz vorstellten und bei denen Verdacht auf AIH bestand, aufgenommen worden. Als Kontrolle dienten Patienten (n=11) mit Lebermetastasen, bei denen eine Biopsie aus dem tumorfreien Teil der Leber entnommen wurde.

3.7.2 Expressionsanalyse in Blutlymphozyten

Mit EDTA-Monovetten wurde den Patienten in der Leberambulanz der 1. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Mainz 10 ml Blut entnommen. Die RNA wurde mit dem „Qiamp RNA Blood Mini Kit“ isoliert, mit dem „cDNA Synthesis Kit“ in cDNA umgeschrieben und mit der quantitativen *real-time* PCR analysiert.

3.7.3 Expressionsanalyse in Leberbiopsien

Die RNA wurde aus Stanzbiopsien mit „Tri Reagent“, wie unter 3.1.6.2 beschrieben, isoliert, mit dem „cDNA Synthesis Kit“ in cDNA umgeschrieben und mit der quantitativen *real-time* PCR analysiert.

3.7.4 Expressionsanalyse in murinem und humanem Gewebe

Versuchstiere der Mausstämme BALB/c und B10.PL wurden anästhesiert und die verschiedenen Organe präparativ entfernt. RNA wurde isoliert, cDNA synthetisiert und quantitativ analysiert, wie bereits beschrieben. Als humane cDNA wurden „MTC Panel“ der Firma BD Biosciences verwendet.

3.8 Immunisierung

3.8.1 Plasmid-DNA Immunisierung

Die vollständige DNA des humanen SLA/LP Gens lag einkloniert im pcDNA3.1(+) Vektor, unter der Kontrolle des CMV Promotors, vor (Wies et al., 2000).

Die Plasmid Präparation wurde, wie beschrieben, mit dem „Plasmid Purification Kit“ der Firma Qiagen durchgeführt. Die DNA wurde in H₂O gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

Acht Wochen alten C57BL/6-Weibchen wurden 100 µl (1 µg/µl) der beschriebenen DNA oder des leeren Vektors als Kontrolle gespritzt. Gemäß dem Protokoll von Quintana et al. (2000) wurde das Vakzin in den *Tibialis anterior* Muskel mit einer sterilen Nadel injiziert. Sieben, 14 und 25 Tage später wurden die Versuchstiere abermals mit der DNA oder dem Plasmid gemäß diesem Protokoll gespritzt. Sechs Monate nach der letzten Injektion wurde den Versuchstieren Blut aus der Schwanzvene entnommen und GOT bzw. GPT freundlicherweise im Zentrallabor der Mainzer Universitätsklinik bestimmt. Nach weiteren sechs Monaten erfolgte bei den anästhesierten Versuchstieren eine Blut- und eine Leberentnahme.

Es erfolgte die Bestimmung von GOT und GPT sowie die Anfertigung von Paraffinschnitten der Leber mit anschließender HE-Färbung.

3.8.2 Protein Immunisierung

3.8.2.1 Löslicher Leberantigenextrakt S100

S100 ist ein Proteinextrakt, das man nach Ultrazentrifugation homogenisierter Leber erhält. Es wurde gezeigt (Lohse et al., 1990), dass dieser Proteinextrakt entzündliche Veränderungen an der Leber bestimmter Mausstämme auslösen kann.

Um dieses Proteinextrakt zu erhalten, muß die Leber den Versuchstieren (hier: FVB Mäuse) steril entnommen, in PBS in kleine Stücke geschnitten und danach homogenisiert werden. Um die nukleäre Fraktion zu entfernen, erfolgte dann das Zentrifugieren des Zellextrakts bei 150g für 10 min und 4°C. Der Überstand wurde anschließend bei 100.000g für 1 h, 4°C ultrazentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wird S100 genannt.

S100 wurde mit CFA im Verhältnis 1:2 gemischt und davon 200 µl (30 µg S100/Maus) den Versuchstieren i.p. mit einer sterilen Nadel injiziert.

3.8.2.2 Rekombinantes SLA/LP

Das SLA/LP Gen lag einkloniert im pET-30a(+) Vektor in dem Bakterienstamm BL21(DE3) in einem Glycerolstock bei -80°C vor. Das Protein wurde rekombinant in *E. coli* Bakterien, wie unter 3.2.1 beschrieben, exprimiert. Mit Hilfe des „Bug Buster Extraction Kit“ erfolgte die Extrahierung und die Aufreinigung des Proteins über eine Ni-Säule. Das im Eluat enthaltene Protein wurde mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt und in PBS mit 0,2% SDS gelöst.

a) Intraperitoneale (i.p.) Vakzinierung

SLA/LP wurde wie S100 mit CFA im Verhältnis 1:2 gemischt und 200 µl (30 µg SLA/LP per Maus) den Versuchstieren i.p. mit einer sterilen Nadel gespritzt.

Eine Gruppe von Kontroll-Versuchstieren erhielt eine Injektion von 200 µl CFA mit PBS injiziert.

Allgemein galt folgendes Immunisierungsprotokoll:

Acht Wochen alte Versuchstiere erhielten im Abstand von 14 Tagen ein Gemisch von CFA und Protein i.p. oder CFA und PBS als Kontrolle injiziert. Blut- und Leberentnahmen von den anästhesierten Tieren erfolgte zehn Tage nach der letzten

Injektion. GOT- und GPT- Bestimmung, sowie Anfertigung von Paraffinschnitten der Lebern mit anschließender HE-Färbung, geschah danach.

b) Fußballen Vakzinierung

Eine Mischung von SLA/LP mit CFA im Verhältnis 1:1 erhielten 2-3 Monate alte Mäuse in die Fußsohlen der Hinterläufe injiziert. Jede Maus bekam eine einmalige Injektion (50 μ l/Fußballen) eines Gemisches aus entweder PBS-CFA (Kontrolle) oder SLA/LP (15 μ g)-CFA. Zehn Tage nach erhaltener Injektion erfolgte die Anästhesierung der Versuchstiere und die Entnahme der poplitealen Lymphknoten aus den hinteren Beinen. Die Injektion erhielten jeweils 3 Tiere pro Versuchsgruppe.

Für die Immunisierungen lag eine Genehmigung vor: Tierversuchsgenehmigung 177-07/021-5

3.9 Expression nativen SLA/LP Proteins

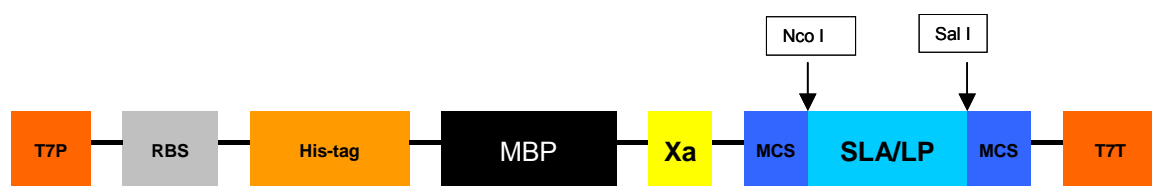
Die Herstellung rekombinanter Proteine ermöglicht eine höchst reine Aufreinigung des exprimierten Zielproteins. Es gibt verschiedene Epitope, Peptide oder Proteine, die bei der Überexpression rekombinanter Proteine helfen. Diese Epitope werden unter dem Begriff der Affinitätstags zusammengefaßt (Terpe, 2003). Bisher war die Aufreinigung des SLA/LP unzureichend und die Löslichkeit des Proteins stellt ein großes Problem dar. Der Einsatz großer Peptide bzw. Proteine als Fusionspartner kann die Löslichkeit des Zielproteins positiv beeinflussen (Terpe, 2003). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit das 40 kDa Maltose-Binde-Protein (MBP) als Fusionspartner gewählt. Vektoren, welche die Expression und Aufreinigung fremder Proteine in *E. coli* durch Fusion mit dem MBP erlauben, haben Di Guan et al. (1988) beschrieben. Die fusionierten Proteine können über eine Einschnitt-Affinitäts-Chromatographie mit einer quervernetzten Amylose aufgereinigt werden.

Expressionsvektor war der pIVEX Vektor, der alle regulatorischen Elemente, wichtig für die *in vitro* Proteinexpression im zellfreien System, besitzt. Die Expression im zellfreien System ermöglicht eine hohe Ausbeute an exprimiertem Zielgen. Die Fusionsproteine werden anschließend mittels Faktor Xa gespalten.

3.9.1 Klonierung

Das SLA/LP Gen lag im pET-30a(+) Vektor vor. Der Plasmid-Vektor pIVEX mit der kodierenden Sequenz eines Maltosebindeproteins (MBP) und der pET-30a(+) Vektor mit dem SLA/LP-Fragment (jeweils ca. 2-10 µg) wurden mit den Restriktionsenzymen Nco I und Sal I bei 37°C für 16h verdaut (Abb. 3.3). Sowohl DNA Gewinnung, Ligation und Transformation kompetenter Zellen des *E. coli* Bakterienstammes XL10-Gold als auch anschließende DNA Extraktion, erfolgten wie unter 3.1.2 - 3.1.5 beschrieben. Die codierende Sequenz des SLA/LP wurde in den Vektor durch Ligation so fusioniert, dass ein einziger Leserahmen mit dem MBP entstand. Zur Überprüfung der Ligation wurde ein Restriktionsprobeverdauer mit den Enzymen Ban II und Nco I über 16 h bei 37°C angesetzt und der Mix auf einem 1%igen Agarosegel überprüft. Die erhaltenen Banden entsprachen den erwarteten.

Abb. 3.3: Klonierungsschema des pIVEX Vektors mit der SLA/LP cDNA



T7P: phage T7 promoter; **RBS:** ribosomal binding site; **His-tag:** 6 His epitope tag; **MBP:** maltose-binding protein; **Xa:** factor Xa restriction protease cleavage site; **MCS:** multiple cloning site; offener Leserahmen SLA/LP; **T7T:** phage T7 polymerase terminator sequence.

3.9.2 Proteinexpression

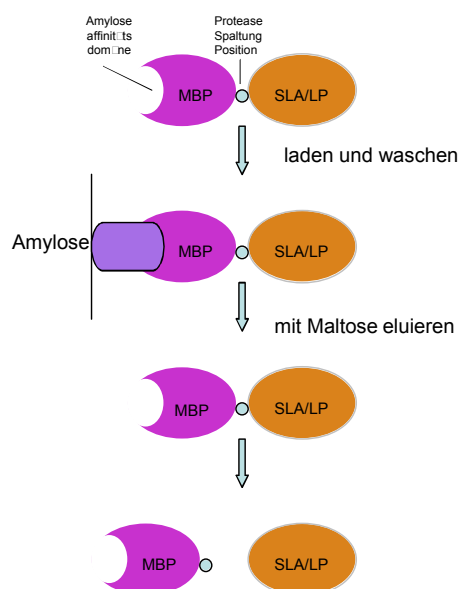
Die Proteinexpression des Fusionsproteins (SLA/LP-MBP) erfolgte mit dem „RTS 500 *E. coli* HY Kit“, im „ProteoMaster Instrument“ der Firma Roche. Das Fusionsprotein wurde in einem zellfreien System exprimiert. Zur Expression wurden 12 µg DNA des SLA/LP Fragments und 10 µM Pyridoxal-5-Phosphat (Endkonzen-

trationen) mit den Reagenzien des Kits gemischt. Die 24 h Expressionsbedingungen erfolgten laut Angaben des Herstellers.

3.9.3 Proteinaufreinigung

Ein „Amylose Resin“ (New England Biolabs) besorgte die Aufreinigung des SLA/LP-MBP Fusionsproteins (Abb. 3.4). 400 µl des Amylose Resin wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt und für 20 min bei 4°C auf einem Überkopfmischer mit 1600 µl MBP Equilibrierpuffer gemischt und nachfolgend bei 18.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 500 µg Protein aufgetragen. Nach 16 h bei 4°C auf einem Überkopfmischer und anschließender 18.000g Zentrifugation konnte der Überstand verworfen und das Amylose Resin einige Male mit MBP Waschpuffer gewaschen werden. Die anschließende Elution des Proteins erfolgte mit dem MBP Elutionspuffer. Die verschiedenen Fraktionen wurden mit SDS-PAGE und Westernblot überprüft. Der Westernblot wurde mit Patientenseren durchgeführt, die ausschließlich SLA/LP positiv waren und keine anderen AIH bekannten Antikörper wie ANA, SMA, Anti-LKM1 aufwiesen. Abbildung 3.4 verdeutlicht die Aufreinigung des Fusionsproteins anhand des Amyloseresin, an die es über die Maltoseaffinitätsdomäne bindet, sowie seine Spaltung.

Abb. 3.4: MBP Fusionsproteinaufreinigung (Schema)



Das exprimierte Fusionsprotein wurde über Affinitätschromatographie mit einer Amylosematrix (Maina et al., 1988) aufgereinigt. Das MBP, verbunden über einen kurzen Linker mit dem N-Terminus des SLA/LP Proteins, bindet an die Amylosematrix. Das Fusionsprotein wurde durch kompetitiven Austausch mit Maltose eluiert. Anschließend wurden die Proteine mit Faktor Xa Protease gespalten.

3.9.4 Fusionsproteinspaltung

Zur Spaltung der Fusionsproteine MBP (40 kDa) und SLA/LP (50 kDa) wurde das „Factor Xa Cleavage Reagent“ der Firma Novagen eingesetzt. Die Enzymangriffsstelle hat die Sequenz IleGluGlyArg. Die Spaltung erfolgt laut Angaben des Herstellers. Kurz: 10 µg des Zielproteins wurde einer Verdünnungsreihe des Faktor Xa (0.1, 0.2, 0.3 U/µl) zugegeben. Nach 2 h Inkubation bei 20°C wurden 10 µl dieses 50 µl Reaktionsansatzes mit 2x Proteinladepuffer gemischt, bei 95°C 7 min aufgekocht und dann in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zwei identische Gele waren angesetzt. Die Proteinbanden wurden in einem Gel mit Hilfe der *Coomassie* Färbung deutlich gemacht und das zweite Gel in einem Westernblot mit anschließender Chemilumineszenz und Färbung mit dem DAB Substrat Kit eingesetzt. Ein SLA/LP spezifischer Antikörper war zur Bestimmung der spezifischen Banden benutzt.

4 Ergebnisse

4.1 SLA/LP Expressionsanalyse

Da das SLA/LP Molekül bisher das einzig bekannte spezifische Autoantigen der Autoimmunen Hepatitis (AIH) ist (Herkel et al., 2002), sollte untersucht werden, wodurch die Immunreaktion gegen SLA/LP ausgelöst werden kann. Dazu wurde quantitativ, mittels *real-time* PCR, untersucht, ob eine aberrante Lokalisation bzw. Expression des SLA/LP Moleküls bei AIH Patienten vorliegt. Die Expression von SLA/LP wurde quantitativ in verschiedenen Geweben des humanen und murinen Organismus untersucht. Da im humanen Organismus zwei Spleißvarianten des Moleküls nachgewiesen wurden (Wies et al., 2000), ist die Expression differenziert nach diesen Varianten (L-D.1 und J-D.1) untersucht worden. Im murinen Organismus wurden keine Varianten unterschieden, da es in der Maus keinen Nachweis für das Auftreten verschiedener Varianten gibt. Zusätzlich wurde die fötale Expression mit der im adulten Organismus verglichen.

4.1.1 Expressionsorte des SLA/LP Moleküls

4.1.1.1 SLA/LP Expression in murinen Organen

Die quantitative *real-time* PCR wurde mit Primern durchgeführt, die spezifisch für murines SLA/LP sind und ein Produkt mit einer Größe von 260 bp ergeben (Abb. 4.1).

Abb. 4.1: Agarosegel zur Überprüfung der murinen SLA/LP-cDNA Amplifizierung



Die *real-time* PCR wurde mit *Primern* spezifisch für murines SLA/LP durchgeführt. Die Abbildung zeigt das spezifische PCR Produkt (260 bp) der *real-time* PCR und einen Größenstandard.

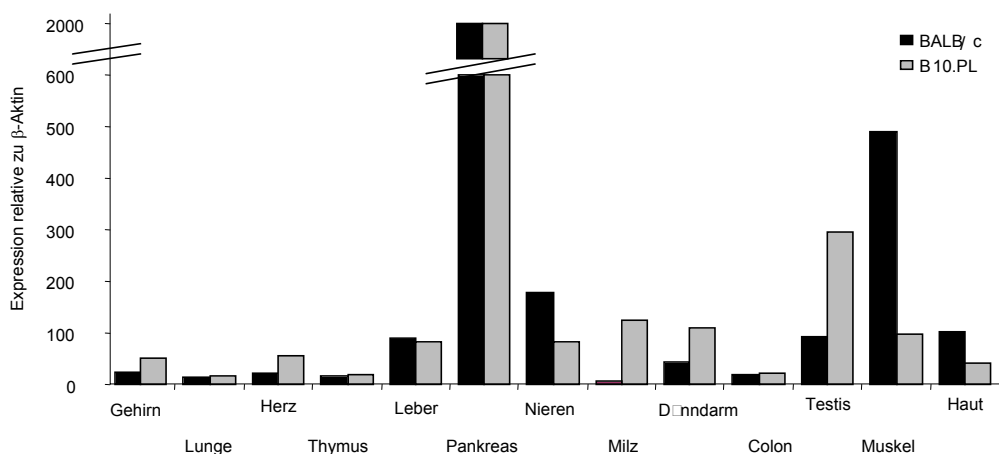
a) Adulter Organismus (Maus)

Um die Expressionsorte des SLA/LP Moleküls zu definieren, wurden Organe aus jeweils zwei Mäusen der Mausstämme BALB/c und B10.PL präpariert, aus diesen mRNA isoliert und die hieraus synthetisierte cDNA mit der *real-time* PCR quantifiziert.

Zu den untersuchten Organen gehörten Gehirn, Lunge, Herz, Thymus, Leber, Pankreas, Niere, Milz, Dünndarm, Colon, Testis und Muskel. Eine Expression des SLA/LP Moleküls konnte in allen untersuchten, murinen Geweben gezeigt werden (Abb. 4.2).

Die höchste Expression ließ sich für beide Mausstämme im Pankreas nachweisen. Die Expressionsrate des SLA/LPs in der Leber ist niedriger als die im Pankreas. Die Expression in Muskel, Testis und Milz weist Unterschiede zwischen den Mausstämmen auf. Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression des SLA/LP Proteins in der Maus nicht leberspezifisch ist. In allen untersuchten Organen konnte SLA/LP spezifische mRNA nachgewiesen werden, wobei das Pankreas das bevorzugte Organ darstellt.

Abb. 4.2: Expression des SLA/LP Moleküls in verschiedenen Geweben der Maus

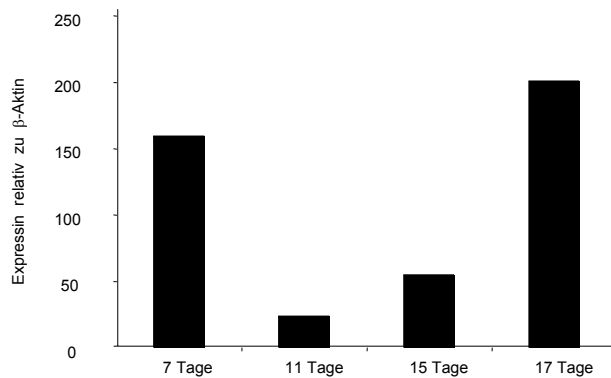


Aus jeweils 2 Mäusen der Stämme BALB/c und B10.PL wurden Organe isoliert. Die jeweiligen Organe der 2 Versuchstiere wurden vereinigt, die RNA isoliert, umgeschrieben in cDNA und in der *real-time* PCR untersucht. Dargestellt sind die Ergebnisse relativ zu dem Referenzgen β-Aktin und stellen Triplikate dar, die weniger als 5% voneinander abweichen. SLA/LP wird in allen Organen exprimiert. Im Pankreas wird SLA/LP am höchsten exprimiert.

b) Embryonaler Organismus (Maus)

Um zu evaluieren, wann die Expression von SLA/LP beginnt, wurde cDNA (BD Biosciences) von Mausembryonen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Befruchtung (7, 11, 15 und 17 Tage) untersucht (Abb. 4.3). Es zeigte sich, dass SLA/LP schon sehr früh in der Embryonalentwicklung exprimiert wird. In 7 und 17 Tage alten Embryonen ist die SLA/LP Expression erhöht, in 11 und 15 Tage alten Embryonen niedriger, aber gut nachweisbar.

Abb. 4.3: Expression des SLA/LP Moleküls in Mausembryonen



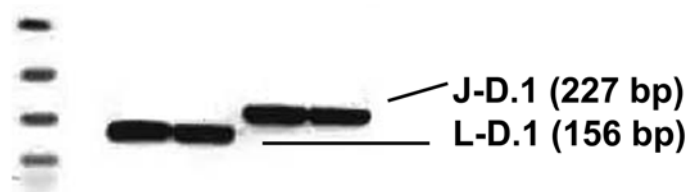
Die embryonale cDNA verschiedener Mausstämme wurde zu den angegebenen Zeitpunkten vereinigt.

Die *real-time* PCR Untersuchung der embryonalen cDNA zeigt Expression des SLA/LP Proteins zu jedem Zeitpunkt, erhöht an Tag 7 und 17.

4.1.1.2 SLA/LP Expression im Menschen

Als humane cDNA verschiedener Organe diente cDNA der Firma BD Biosciences („Human MTC Panel“). Die *real-time* PCR wurde mit zwei verschiedenen SLA/LP spezifischen Primerpaaren durchgeführt. Ein Primerpaar war spezifisch für die lange Spleißvariante (L-D.1; Produktgröße: 156 bp), ein zweites für die kürzere Spleißvariante von (J-D.1; Produktgröße: 227 bp) (Abb. 4.4).

Abb. 4.4: Agarosegel zur Überprüfung der humanen SLA/LP Varianten-cDNA Amplifizierung



Agarosegel zur Überprüfung der *real-time* PCR Produkte. Die *real-time* PCR wurde mit *Primern* spezifisch für humanes L-D.1 oder J-D.1 durchgeführt.

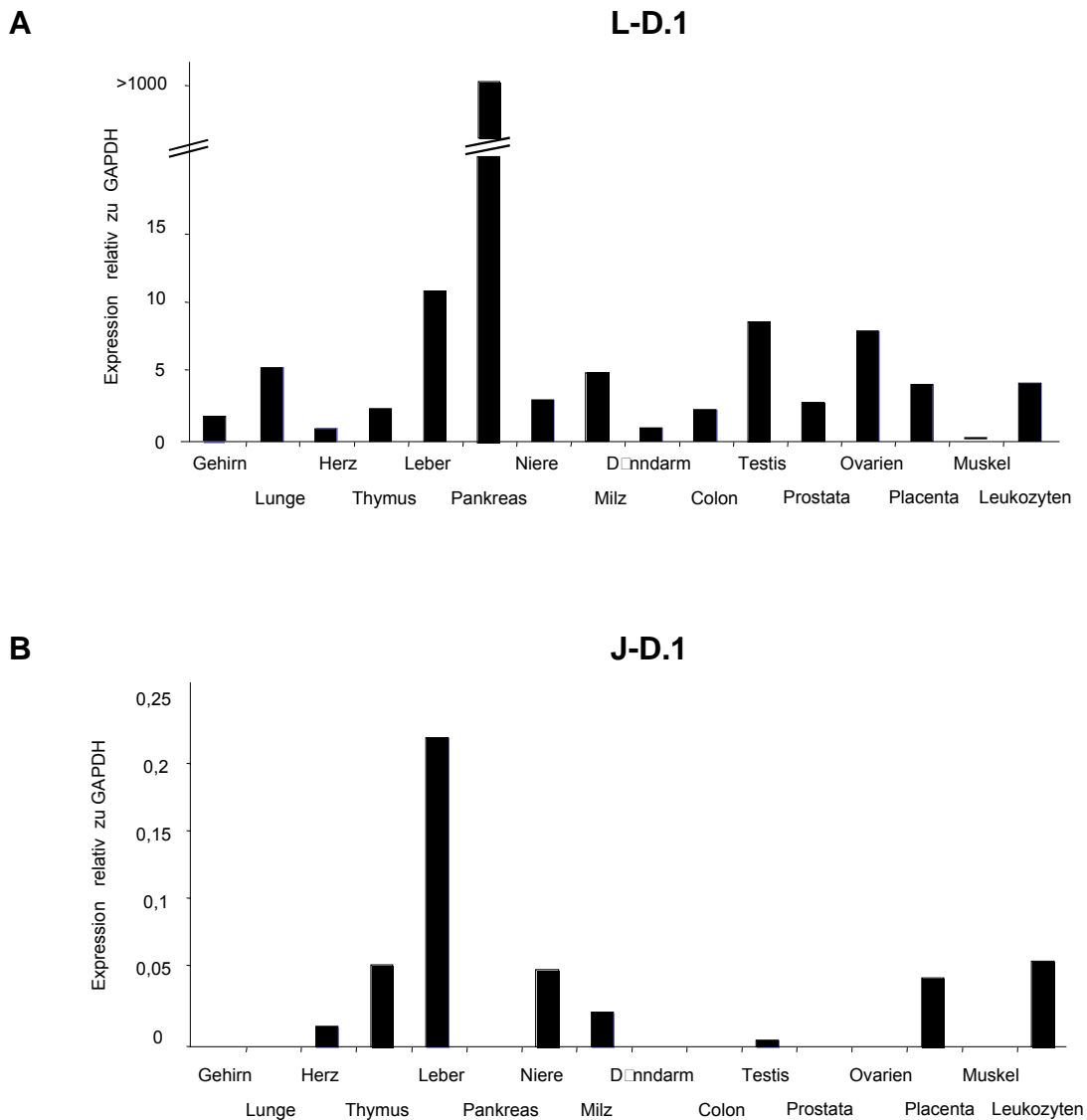
a) Adulter Organismus (Mensch)

Die Expression der beiden Spleißvarianten zeigte deutliche Unterschiede. L-D.1 wird in allen Organen exprimiert (Abb. 4.5 (A)), wohingegen J-D.1 in vielen Organen überhaupt nicht, oder nur sehr schwach exprimiert wird (Abb. 4.5 (B)).

L-D.1 wird in allen untersuchten Organen exprimiert. Das Pankreas ist das Organ, in dem L-D.1 am höchsten exprimiert wird. Die Expression in Lunge, Leber, Milz, Pankreas, Testis und Ovarien ist im Vergleich zu der Expression in den anderen Organen erhöht. Im Muskel liegt die Expression der L-D.1 Variante an der Nachweisgrenze. Wie im murinen Organismus, wird im humanen Organismus die lange Variante des SLA/LPs in allen untersuchten Organen exprimiert. Die kürzere Variante des J-D.1 wird nicht in allen Organen und im Vergleich zu L-D.1 bedeutend niedriger exprimiert. Die höchste Expression von J-D.1 konnte in der Leber nachgewiesen werden. Exprimiert wird die kürzere Variante aber auch in Herz,

Thymus, Nieren, Milz, Testis und Leukozyten. In Pankreas, Gehirn, Lunge, Dünndarm, Colon, Prostata, Ovarien und Muskel ist eine Expression von J-D.1 nicht nachweisbar (Abb. 4.5 (B)).

Abb. 4.5: Expressionsquantifizierung der SLA/LP Varianten in adulten, humanen Geweben

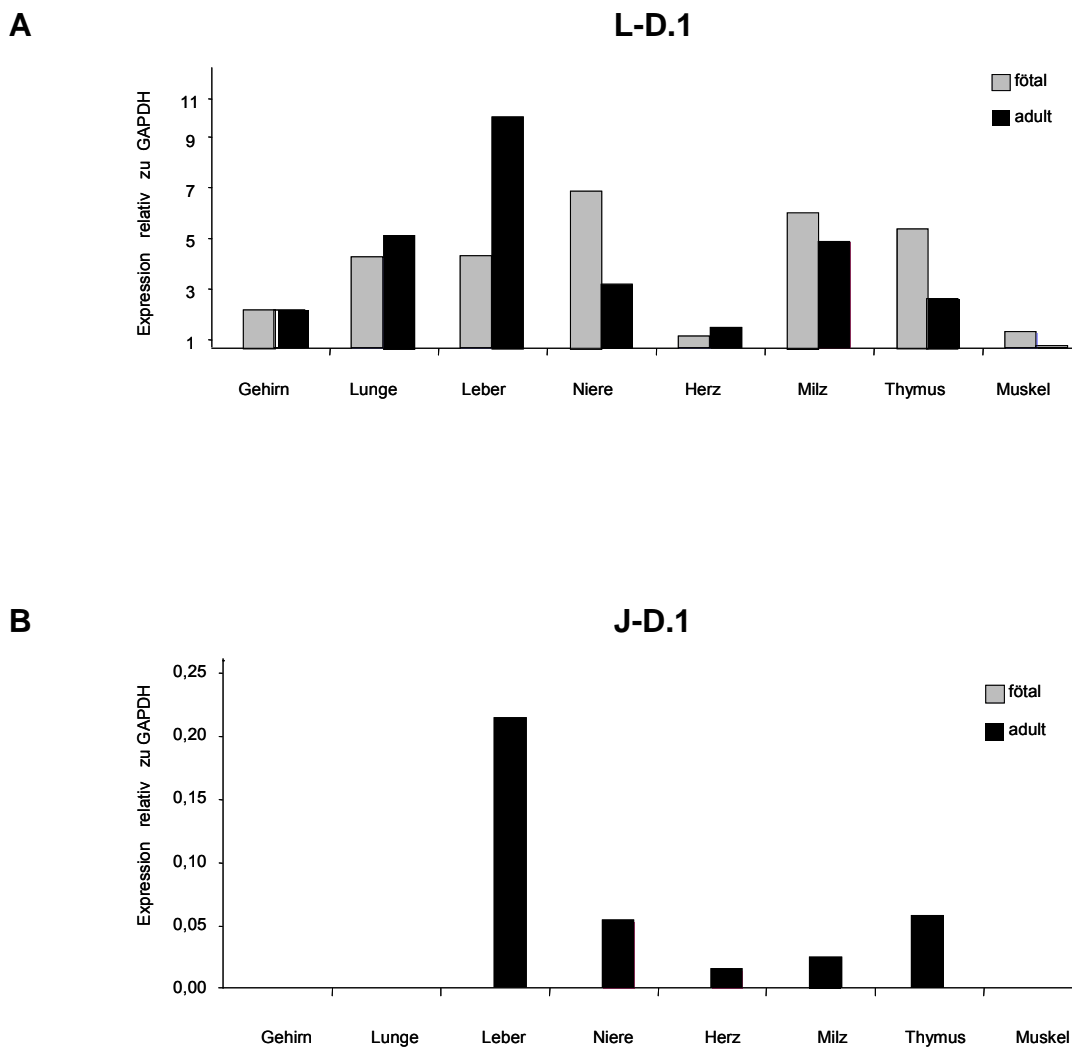


Die Abbildungen zeigen die quantitative Expression der langen Variante L-D.1 (A) und der kurzen Variante J-D.1 (B) (die cDNA stammt von der Firma Biosciences) relativ zu dem Referenzgen GAPDH. Die lange Variante wird in allen Organen exprimiert. Eine erhöhte Expression ist im Pankreas zu finden. Die Expression der L-D.1 Variante ist in Leber, Testis und Ovarien gegenüber der Expression in anderen Organen erhöht. Die Variante J-D.1 wird sehr schwach und nicht in allen Organen exprimiert.

b) Embryonaler Organismus (Mensch)

Es konnte gezeigt werden, dass L-D.1 physiologischerweise sowohl im adulten als auch im fötalen Organismus exprimiert wird (Abb. 4.6 (A)). J-D.1 wird nur im adulten Organismus exprimiert (Abb. 4.6 (B)).

Abb. 4.6: Expressionsvergleich der SLA/LP Expression in humanen Geweben (adult : embryonal)



Die cDNA stammte von BD Biosciences und stellte für jedes Organ einen Zusammenschluß extrahierter RNA von 16 - 45 verschiedenen kaukasischen Spendern sowohl männlichen als auch weiblichen Geschlechts. Das Alter der Spender lag zwischen 14 und 61 Jahren (adulten Organismus) bzw. 21–30 Wochen (fötalen Organismus).

4.1.2 Expression nach Stimulation

Frühere Westernblot-Untersuchungen Phytohämagglutinin (PHA) stimulierter peripherer Blutlymphozyten (PBMC) zeigten im Vergleich zu unstimulierten PBMCs eine deutlich erhöhte Expression von SLA/LP (Wies et al., 2000).

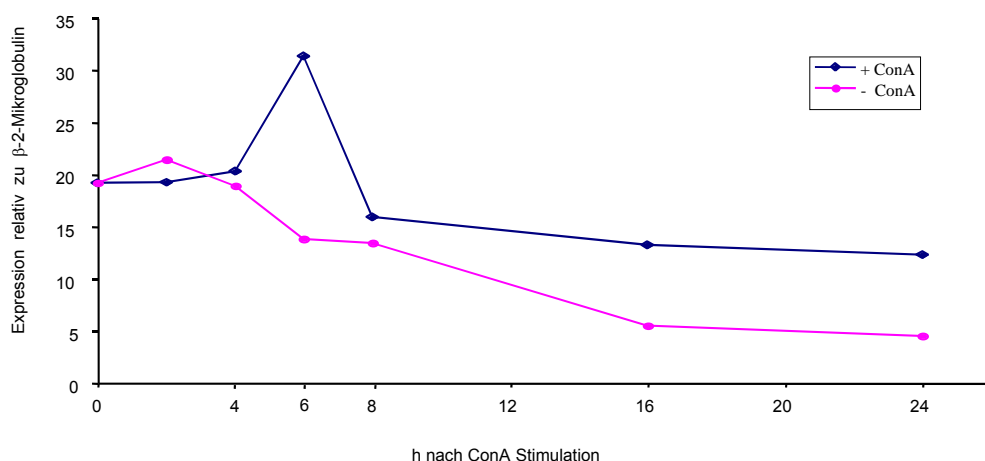
Dieser Befund sollte hier bestätigt werden, indem die Expression der SLA/LP mRNA nach Lymphozytenstimulation mittels *real-time* PCR untersucht wurde.

Anschließend sollte die Expression des SLA/LPs in den verschiedenen Lymphozytenpopulationen quantifiziert werden.

4.1.2.1 Kinetische Analyse des SLA/LP-mRNA Transkripts

Zur Ermittlung der SLA/LP mRNA Expression in Lymphozyten nach Stimulation wurden Lymphozyten aus Milzen des Mausstammes FVB isoliert, kultiviert und mit ConA stimuliert. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt, hieraus RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde in der *real-time* PCR quantifiziert. 4h nach der Stimulation ließ sich ein Anstieg der für SLA/LP spezifischen mRNA nachweisen. Die Expression erreichte nach 6h ihr Maximum und nahm nach 8h wieder ab (Abb. 4.7).

Abb. 4.7: SLA/LP Expression in stimulierten Milzzellen der Maus



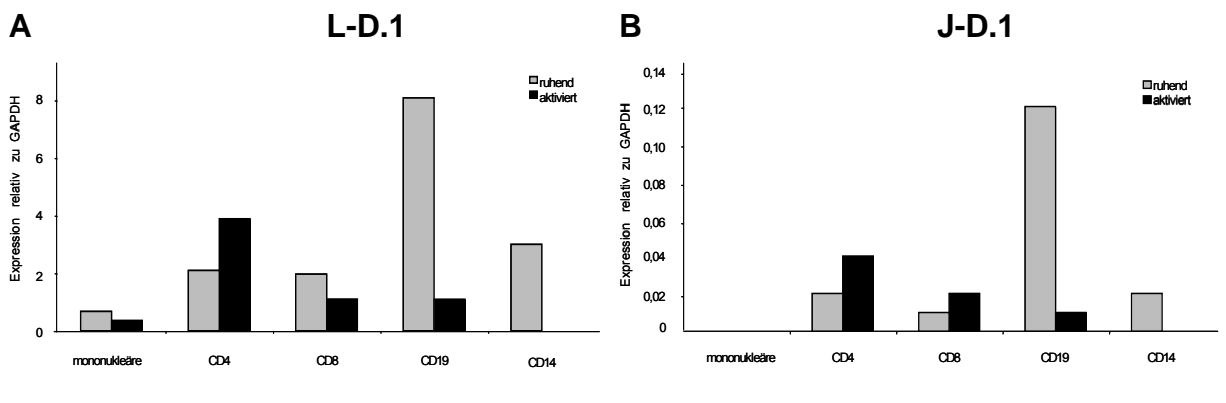
Zwei FVB Mäusen (8-10 Wochen alt) wurde die Milz entnommen, Lymphozyten isoliert und kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten, nach unspezifischer Stimulation mit ConA, wurden die Lymphozyten geerntet und die RNA isoliert. Die RNA aus beiden Versuche wurde vereinigt, in cDNA umgeschrieben und quantitativ mittels *real-time* PCR überprüft.

4.1.2.2 SLA/LP-mRNA Expression in verschiedenen Zelltypen

Um die Zelltypen zu definieren, die verantwortlich für die erhöhte SLA/LP Expression sind, wurden SLA/LP-mRNA Transkripte in T-Helferzellen (CD4+), zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8+), B-Lymphozyten (CD19+), Monozyten und Makrophagen (CD14+) quantifiziert. Hierzu wurde humane cDNA stimulierter (PHA oder ConA) und unstimulierter Zellen der Firma BD Biosciences verwendet. Die Quantifizierung erfolgte mittels *real-time* PCR. Es wurden die cDNAs der langen und der kurzen Variante, L-D.1 und J-D.1, untersucht (Abb. 4.8 (A) und (B)).

In CD14+ Zellen wurde L-D.1 nur in ruhenden und nicht in aktivierten Zellen exprimiert. CD19+ Zellen exprimierten L-D.1 verstärkt im ruhenden Zustand, reduzierten die Expression jedoch stark im aktivierten Stadium. Eine Hochregulierung des mRNA Transkripts von L-D.1 nach Aktivierung ließ sich nur in CD4+ Zellen nachweisen. J-D.1 wurde in aktivierten CD4+ und CD8+ erhöht exprimiert. Eine J-D.1-Expression ließ sich allerdings in der vollständigen, unaufgetrennten Fraktion der mononukleären Zellen nicht nachweisen. J-D.1 wird schwächer als L-D.1 exprimiert.

Abb. 4.8: Expressionsquantifizierung der SLA/LP Varianten in humanen mononukleären Zellen



Dargestellt sind die Ergebnisse der *real-time* PCR: T-Helfer (CD4+), zytotoxische T-Lymphozyten (CD8+), B-Lymphozyten (CD19+) und Makrophagen (CD14+). Die cDNA stammt von der Firma BD Biosciences; die Zellen wurden, laut Angaben des Herstellers, über 3 Tage mit einem unspezifischen Mitogen stimuliert und die cDNA verschiedener Maustämme vereinigt.

4.1.3 Aberrante Expression bei Hepatitiden

Um zu testen, ob bei AIH-Patienten in Leberparenchymzellen oder in Blutlymphozyten eine aberrante Expression von SLA/LP vorliegt, wurde die Expression der Varianten L-D.1 und J-D.1 mittels *real-time* PCR untersucht.

Untersucht wurden Patienten mit folgenden Erkrankungen:

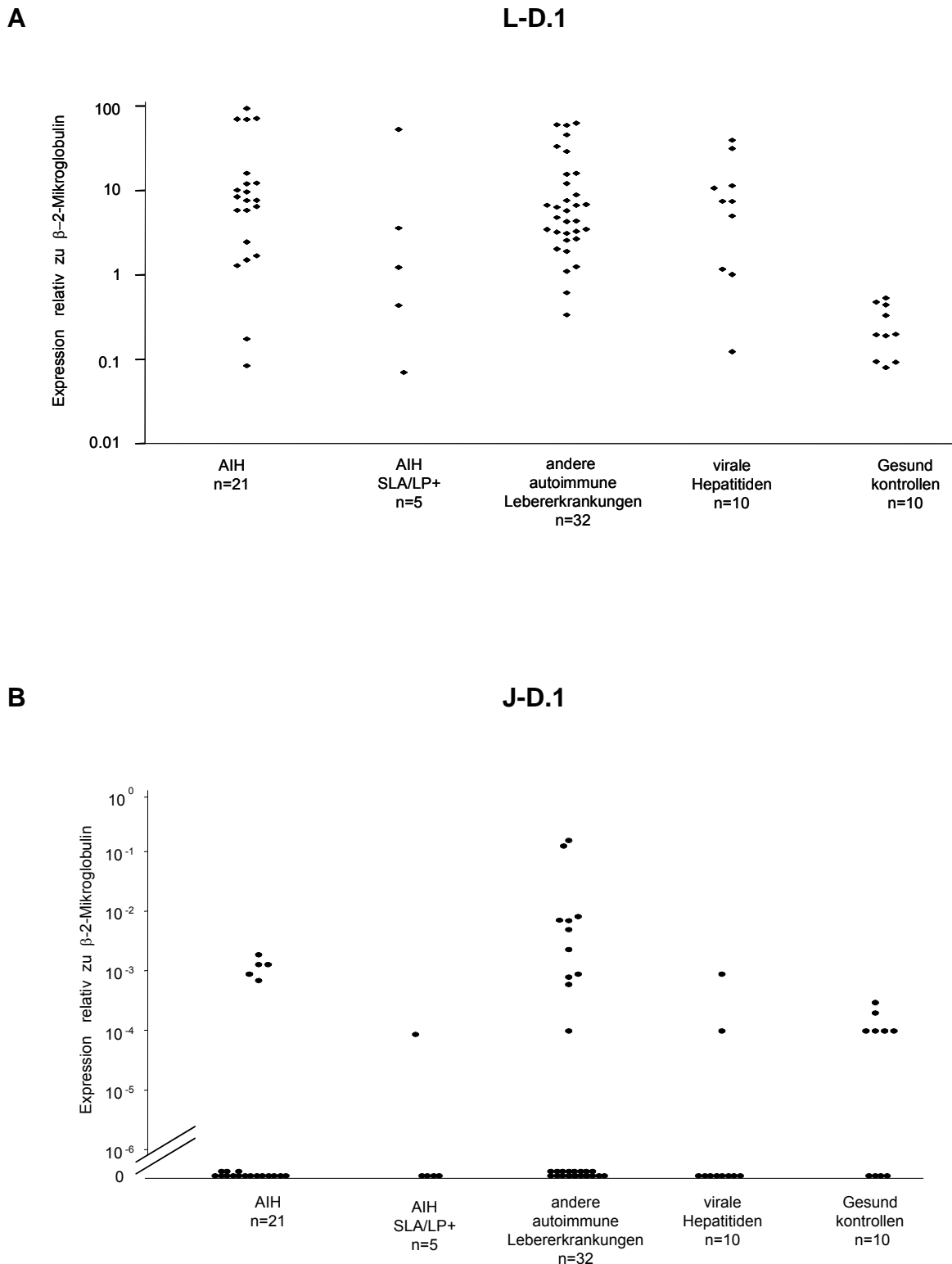
Tab. 1: Auf abberante SLA/LP-Expression untersuchte Patientengruppen

Bezeichnung	Erkrankung
AIH	Patienten mit autoimmuner Hepatitis: ANA, AMA und SMA positive Patienten, die bereits eine immunsuppressive Behandlung erhalten
AIH ohne Behandlung	Patienten mit autoimmuner Hepatitis: ANA, AMA und SMA positive Patienten, die noch keine immunsuppressive Behandlung erhalten haben
AIH SLA/LP(+)	Patienten mit autoimmuner Hepatitis: SLA/LP Antikörper positive Patienten
andere autoimmune Lebererkrankungen	PBC (primär biliäre Zirrhose) und PSC (primär sklerosierende Cholangitis) Patienten
virale Hepatitiden	Patienten mit einer viralen B oder C Hepatitis
Steatohepatitiden	Patienten mit einer alkoholischen oder nicht-alkoholischen Fettleber
Gesundkontrolle	a) PBMC: gesunder Personen b) Leberparenchym: aus tumorfreiem Bereich von Tumorresektaten

4.1.3.1 L-D.1 und J-D.1 Expression in Blutlymphozyten

Bei Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen, die sich regelmäßig in der Leberambulanz der Universitätsklinik Mainz vorstellen, erfolgte eine Blutabnahme in EDTA-Monovetten. Die Lymphozyten wurden über einen Ficollgradienten aufgereinigt und aus diesen RNA isoliert, die mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben wurden. Anschließend wurde quantitativ mittels *real-time* PCR die L-D.1 bzw. J-D.1 Expression bestimmt. Abb. 4.9 veranschaulicht die L-D.1 (A) und J-D.1 (B) Expression in Lymphozyten von Patienten mit AIH (mit und ohne Behandlung), anderen autoimmunen Lebererkrankungen und viralen Hepatitiden gegenüber gesunden Menschen als Kontrolle. Die Ergebnisse zeigen, unabhängig von der zugrunde liegenden Lebererkrankung, eine breite Streuung der L-D.1 Expression. Unabhängig vom Typ der Lebererkrankung war die L-D.1 Expression in Lymphozyten der Patienten gegenüber den gesunden Personen erhöht (Abb. 4.9 A). Die J-D.1 Expression in den Blutlymphozyten von Patienten mit unterschiedlichen Hepatitiden ist gering bis nicht nachweisbar. Neunzehn von 68 Patienten (27% der Patienten) mit hepatischer Erkrankung exprimieren J-D.1 in Blutlymphozyten. Im Falle der Gesundkontrollen lässt sich in 6 von 10 Proben (60%) eine J-D.1 Expression in den Blutlymphozyten nachweisen.

Abb. 4.9: SLA/LP Expressionsanalysen in PBMC aus Hepatitis Patienten



Patientenblut wurde in EDTA Monovetten gesammelt und aus den Lymphozyten RNA isoliert. Nach reverser Transkription wurde quantitativ die (A) L-D.1 und (B) J-D.1 Expression in PBMC verschiedener Hepatitispatienten untersucht. Dargestellt sind Einzelwerte.

4.1.3.2 L-D.1 und J-D.1 Expression in Leberparenchymzellen

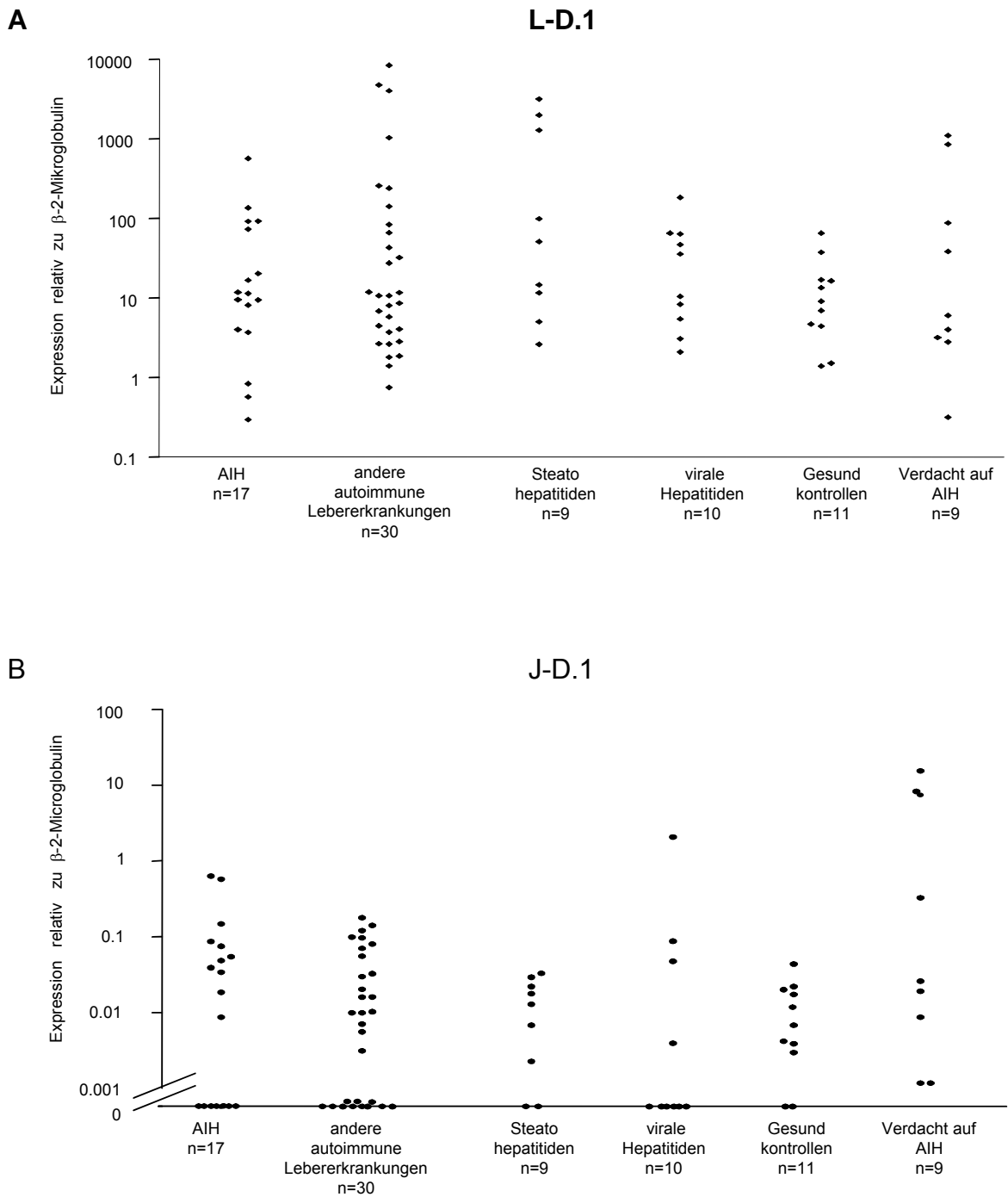
Wie bei PBMCs wurde auch bei Leberzellen die Expression der beiden Spleißvarianten von SLA/LP bei unterschiedlichen, hepatischen Erkrankungen untersucht und verglichen: Patienten mit AIH (mit oder ohne Behandlung), anderen autoimmunen Lebererkrankungen, viralen Hepatitiden und Steatohepatitiden.

Als Untersuchungsmaterial wurden den Patienten mit unterschiedlichen Hepatitiden Stanzbiopsien entnommen. Als Kontrolle dienten tumorfreie Randbereiche von Tumorresektaten. Die mRNA der Leberparenchymzellen wurde mittels reverser Transkriptionstechnik in cDNA umgeschrieben und die Expression von L-D.1 und J-D.1 mittels *real-time* PCR quantitativ bestimmt.

In allen Patientengruppen war die Streuung der L-D.1 und J-D.1 Expression breit. Die Ergebnisse zeigen keine einheitlich erhöhte Expression von L-D.1 und J-D.1 in den Leberparenchymzellen der sechs Patientengruppen gegenüber den Leberparenchymzellen aus gesunden Bereichen der Leber von Tumorpatienten (Abb. 4.10 (A) und (B)). Ebenso war die J-D.1 Expression bei keiner Patientengruppe deutlich erhöht (Abb. 4.10 (B)).

Wie schon in den PBMCs von Patienten mit unterschiedlichen Lebererkrankungen beobachtet, wird J-D.1 auch in den Leberparenchymzellen der Patienten nicht immer exprimiert. Einundfünfzig von 75 Patienten (66% der Patienten) mit hepatischer Erkrankung exprimieren J-D.1 in Leberparenchymzellen. Bei den Kontrollen, ließ sich in 9 von 11 Proben (81%) eine J-D.1 Expression in den Leberparenchymzellen nachweisen.

Abb. 4.10: SLA/LP Expressionsanalysen in Leberparenchymzellen aus Hepatitis Patienten



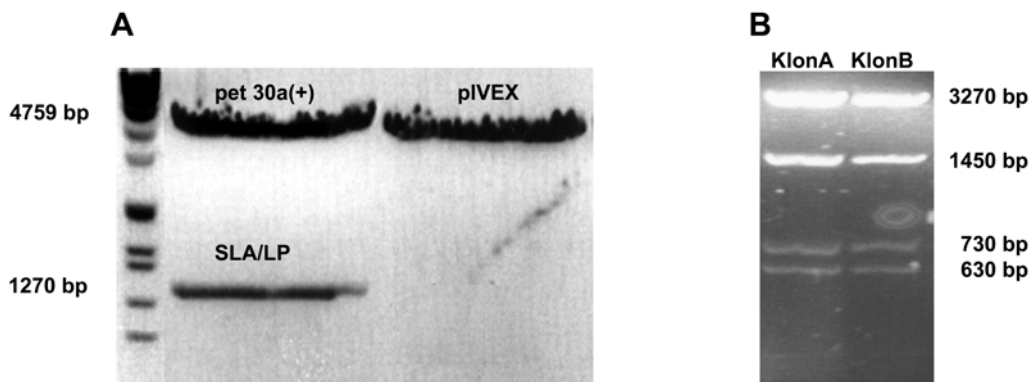
Aus 86 Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen wurden Leberbiopsien entnommen, die RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und (A) L-D.1 und (B) J-D.1. Expression quantitativ mittels *real-time* PCR überprüft. In der Abbildung sind Einzelwerte dargestellt. Nicht alle Patienten exprimieren J-D.1 in den Leberparenchymzellen (B).

4.2 Gewinnung nativen SLA/LPs

Um die potentielle enzymatische Aktivität des SLA/LP-Moleküls zu untersuchen, sind in unserem Labor bisher verschiedene Ansätze zur Aufreinigung nativen SLA/LP Proteins unternommen worden. Eine Aufreinigung nativen SLA/LP Proteins aus Gewebe ist bislang nicht gelungen, da die Proteinmenge in der Leber zu gering ist, um eine saubere Präparation zu gewährleisten. Bakteriell exprimiertes, rekombinantes SLA/LP Protein konnte nur unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt werden, da das Protein als Einschlußkörper (*inclusion bodies*) abgelagert wurde (unveröffentlichte Daten).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das SLA/LP (47 kDa) Protein und das maltosebindende Protein (MBP) (43 kDa) als Fusionsprotein exprimiert (Maina et al., 1988). Hierfür wurde die für das SLA/LP Protein kodierende Sequenz, welche in einem pET-30a(+) Plasmid einkloniert war, in den pIVEX-Vektor umkloniert (Abb. 4.11). Dieser Vektor stellt die Sequenz für das MBP zur Verfügung.

Abb. 4.11: Agarosegele zum Nachweis der Restriktionsverdau

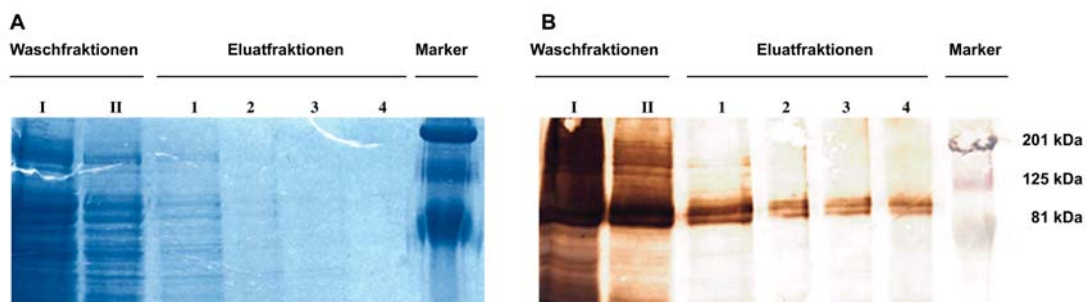


Plasmid DNA (A) Restriktionsverdau des Vectors pIVEX (4759 bp) und des pet-30a(+) (5422 bp) mit SLA/LP (1270 bp) Insert mit den Restriktionsenzymen Sal I und Nco I , (B) Restriktionsprobeverdau der Ligation des SLA/LPs mit dem pIVEX Vector mit den Restriktionsenzymen NCO I und Ban II.

Das Fusionsprotein (90 kDa) wurde in einem zellfreien prokaryotischen Proteinexpressionssystem (in vitro-Translation) hergestellt. Da es sich bei dem SLA/LP vermutlich um eine pyridoxalphosphatabhängige Transferase handelt, war dem Expressionsgemisch Pyridoxalphosphat zugesetzt. Die Aufreinigung des Fusionsproteins erfolgte über eine Amylosesäule. Anschließende Spaltung des Fusionsproteins in SLA/LP und MBP erfolgte über Faktor Xa.

Die Analyse der Proteinexpression erfolgte nach Aufreinigung anhand der Amylosesäule über SDS-PAGE mit anschließender *Coomassie* Färbung und Westernblot (Abb. 4.12). Das Fusionsprotein war im Eluat mittels *Coomassie* Färbung (Nachweisgrenze: 1 µg bis 0,1 µg) nicht nachzuweisen (Abb. 4.12 (A)). Der mit SLA/LP Autoantikörpern positiven Patientenseren durchgeführte Westernblot, ist in Abb. 4.12 (B) dargestellt. Nach Spaltung des MBP und des SLA/LP Proteins dieser Fraktionen konnte kein Protein im Westernblot nachgewiesen werden.

Abb. 4.12: SDS-PAGE und Westernblot zur Überprüfung der Expression des MBP Fusionsproteins



Eluatfraktionen der Amylosematrix: (A) SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) *Coomassie* gefärbt; (B) Westernblot mit SLA/LP positivem Patientenserum gefärbt mit dem DAB Substrate Kit. Reihe I und II: Waschfraktionen der Amylosematrix. Reihen 1, 2, 3, 4: Elutionsfraktionen nach stufenweiser Erniedrigung des pH Wertes.

4.3 Experimentelle Hepatitis durch SLA/LP Autoimmunität im Mausmodell

Um die Fragestellung zu klären, ob die Autoimmunreaktion gegen SLA/LP an der AIH-Pathogenese beteiligt sein könnte, wurde ein Tiermodell einer experimentellen SLA/LP-vermittelten autoimmunen Hepatitis entwickelt.

Hierzu wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Zum einen die Immunisierung mittels eines eukaryotischen Expressionsvektors für SLA/LP, zum andern die Immunisierung mit rekombinantem SLA/LP Protein.

4.3.1 Immunisierung mittels eines Expressionsvektors für SLA/LP

Mäuse des Stammes C57BL/6 (ein Stamm, der für eine experimentelle autoimmune Hepatitis (EAH) empfänglich ist (Lohse et al., 1990)), wurden mit einem Expressionsvektor für SLA/LP intramuskulär immunisiert (Quintana et al., 2000). Dieses Immunisierungsprotokoll führte zu keinen entzündlichen Veränderungen der Leber. Es konnten weder erhöhte Serumtransaminasen noch zelluläre Infiltrate in der Leber gefunden werden.

4.3.2 Protein-Immunisierung

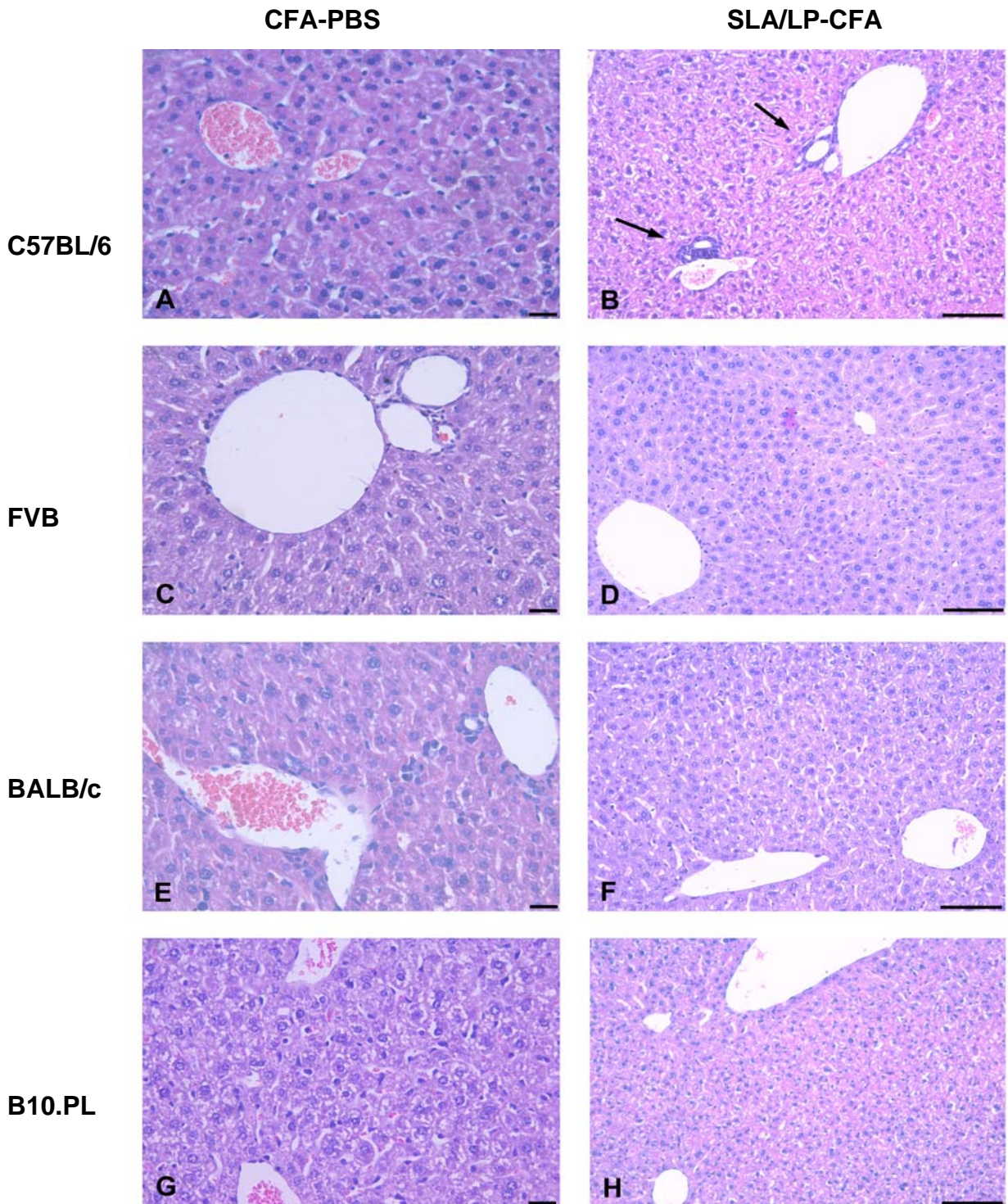
4.3.2.1 Immunisierung verschiedener Mausstämme

Lohse et al. (1990) injizierten verschiedenen Mausstämmen ein Leberhomogenat, bezeichnet als S100, in „Komplettem Freund's Adjuvans“ (CFA). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Mäuse des Mausstammes C57BL/6, im Gegensatz zu anderen Stämmen, suszeptibel für eine auf diese Art induzierte Leberschädigung sind.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob SLA/LP, ein Bestandteil des Leberhomogenats S100 einen ähnlichen Effekt nach Administration in Mäusen erzielen kann, wie das S100. Dazu wurden Versuchstieren der Stämme C57BL/6, BALB/c, FVB und B10.PL (5 Tiere je Stamm) 200 µl eines Gemisches aus rekombinantem SLA/LP Protein (30 µg/Maus) und CFA intraperitoneal (i.p.) 2x im

Abstand von 2 Wochen injiziert. Als Kontrolle erhielten Mäuse dieser Stämme 200 μ l eines Gemisches aus PBS und CFA auf die selbe Weise injiziert. Die Versuchstiere wurden 10 Tage nach der 2. Injektion geopfert und die Lebern entnommen. Zur Untersuchung der Leberhistologie wurden Paraffinschnitte von den entnommenen Lebern angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. In den Lebern der Mausstämme FVB, BALB/c und B10.PL konnte keine Infiltration der Leber mit mononukleären Zellen gefunden werden (Abb. 4.13 D, F, H). Im Gegensatz dazu waren in den Mäusen des Stammes C57BL/6 leichte periportale entzündliche Infiltrate zu erkennen (Abb. 4.13 B).

Abb. 4.13: Leberhistologien immunisierter Mäuse verschiedener Mausstämme



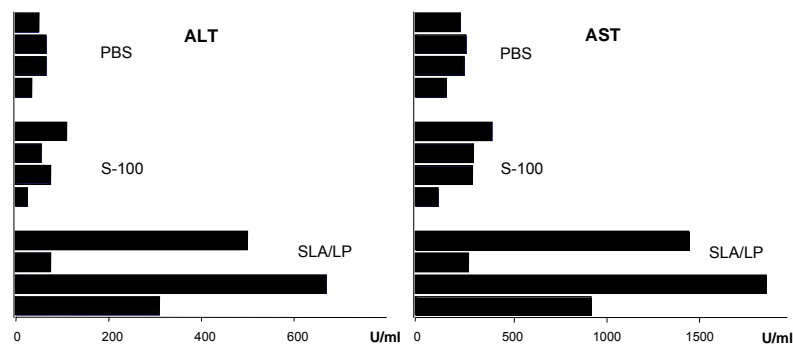
Im Abstand von 14 Tagen erhielten die Mäuse der verschiedenen Stämme (5 Versuchstiere/Gruppe) 2 x 200 μ l entweder rekombinantes SLA/LP Protein (30 μ g)-CFA Gemisch (SLA/LP-CFA) oder ein PBS-CFA Gemisch intraperitoneal injiziert. Leberschnitte von vakzinierter Mäuse wurden mit HE gefärbt und histologisch untersucht. In den Leberschnitten der C57BL/6 Mäuse (B) sind nach SLA/LP-CFA Vakzinierung entzündliche Infiltrate nachzuweisen (durch Pfeile markiert). Der Balken entspricht 0.1 mm.

4.3.2.2 Immunisierung IL-10 -/- Mäuse

Da bekannt ist, dass Interleukin 10 (IL-10), ein antiinflammatorisches Zytokin, kritisch für die Ausbildung von Leberentzündungen ist (Kato et al., 2001), wurden IL-10 -/- und Wildtyp (wt) Mäuse des Stammes C57BL/6 mit SLA/LP Protein immunisiert. Als Vergleich diente ein Leberhomogenat (S100), welches in Mäusen des Mausstammes C57BL/6 zu Leberschädigung geführt hat (Lohse et al., 1990).

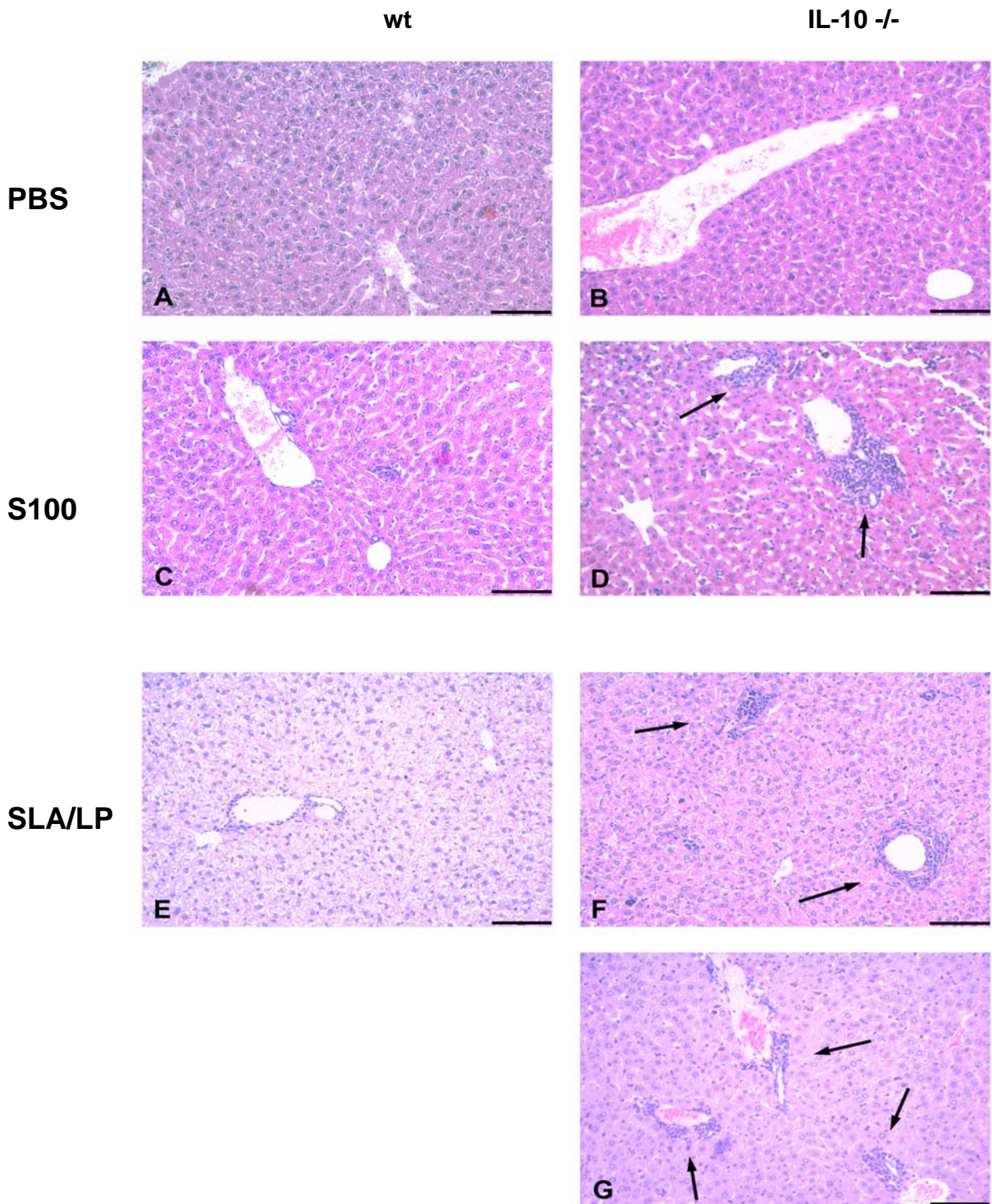
Die Mäuse der Versuchsgruppen (4 Mäuse/Gruppe) erhielten zweimal im Abstand von 2 Wochen eine intraperitoneale Injektion (200 µl/Maus) entweder eines SLA/LP (30 µg)-CFA Gemisches oder eines S100 (30 µg)-CFA Gemisches oder PBS-CFA. Die Tiere wurden 10 Tage nach letzter Injektion geopfert, Blut gesammelt und Lebern entnommen. Im Serum der SLA/LP immunisierten Mäuse ließ sich, im Gegensatz zu S100 immunisierten Mäusen und zur PBS-Kontrolle, eine starke Erhöhung von Serumtransaminasen, Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST), nachweisen (Abb. 4.14). Dies lässt auf eine Leberschädigung schließen. Zur Untersuchung der Leberhistologie wurden Paraffinschnitte von den entnommenen Lebern angefertigt und mit HE gefärbt (Abb. 4.15). In den Lebern der IL-10 defizienten Mäuse zeigen sich deutlich entzündliche Infiltrate (Abb. 4.15 D, F, G). In C57BL/6 Wildtyp-Mäusen (wt) konnten Infiltrate nur nach Injektion mit SLA/LP (Abb. 4.15 E) und nicht nach Injektion mit S100 nachgewiesen werden (Abb. 4.15 C).

Abb. 4.14: Serumtransaminasen (ALT und AST) SLA/LP bzw. S100 immunisierter Mäuse



Transaminasenerhöhung nach zweimaliger Vakzinierung (im Abstand von 14 Tagen) der IL-10 -/- Versuchstiere des Mausstammes C57BL/6 mit einem Gemisch aus entweder S100-CFA, SLA/LP-CFA oder, als Kontrolle, PBS. Blutproben wurden 10 Tage nach 2. Vakzinierung entnommen.

Abb. 4.15: Leberhistologien immunisierter Mäuse des Mausstammes C57BL/6



Wildtyp Mäusen (wt) und IL-10^{-/-} Mäusen wurden im Abstand von 14 Tagen 2 x 200 µl entweder ein Gemisch aus rekombinantem SLA/LP Protein (30 µg)-CFA, S100 (30 µg)-CFA oder PBS-CFA intraperitoneal injiziert. Die Leberschnitte sind HE gefärbt und histologisch untersucht. Die Lebern der wt Mäuse zeigen gering entzündliche Infiltrate nach S100 oder SLA/LP Immunisierung, die in IL-10^{-/-} Mäusen stärker sind (Pfeil). Der Balken entspricht 0.1 mm.

4.3.2.3 Leberinfiltrationen

Um zu überprüfen, ob das Fehlen von Infiltraten nach Immunisierung bei BALB/c, FVB und B10.PL Mäusen an einer fehlenden Erkennung des SLA/LPs durch Lymphozyten liegen könnte, erhielten BALB/c, C57BL/6 und C57BL/6 IL-10 ^{-/-}, eine einmalige Injektion (50 µl/Fußballen) des SLA/LP (15 µg) -CFA Gemisches.

Zehn Tage nach der Injektion wurden die drainierenden poplitealen Lymphknoten entnommen und die Lymphknotenzellen mit rekombinantem SLA/LP oder ConA für 96 h stimuliert.

a) Lymphozytenproliferation

Den stimulierten Lymphknotenzellen wurde in den letzten 18h der 96h Kultur ³H-Thymidin zugegeben. Anhand des Einbaus des radioaktiv markierten Thymidins konnte die Proliferationsrate der T-Zellen bestimmt werden. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede in der SLA/LP stimulierten Proliferation bei den verschiedenen Stämmen, die alle spezifisch auf SLA/LP Stimulation reagierten (Tab. 2).

Tab. 2: Evaluierung der T-Zell Proliferation basierend auf dem ³H Thymidin Einbau kultivierter Lymphozyten verschiedener Mausstämmen

Mausstamm	Stimulationsindex	
	ConA	SLA/LP
BALB/c	73.82	8.61
C57BL/6	95.24	4.94
IL-10 ^{-/-}	43.84	6.33

Lymphknoten wurden 10 Tage nach Immunisierung mit SLA/LP entnommen, Lymphozyten isoliert und mit ConA (1 µg/ml) oder SLA/LP (3 µg/well) für 72 h kultiviert. ³H Thymidin Zugabe erfolgte für die letzten 18 h. Dargestellt ist der Stimulationsindex (SI): ³H Thymidin Einbau (cpm) der wells mit SLA/LP bzw. ConA / ³H Thymidin Einbau (cpm) der wells ohne SLA/LP bzw. ConA.

b) Zytokinsekretion

Neben der Proliferation wurde auch die Zytokinsekretion der Lymphknotenzellen nach SLA/LP Stimulation untersucht. Dazu wurden die für 96h mit ConA oder SLA/LP stimulierten Lymphknotenzellen auf IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, GMCSF, TNF α und INF γ Sekretion, mit dem FlowCytomix Multiplex untersucht. Die Ergebnisse zeigten, mit Ausnahme bei den Zytokinen IL-6 und IL-17, keine unterschiedliche Zytokinsekretion in den stimulierten Lymphknotenzellen der jeweiligen Mausstämme. Die Sekretion von IL-6 und IL-17 durch Lymphozyten immunisierter IL-10 -/- war dagegen deutlich höher als diejenige immunisierter C57BL/6 und BALB/c Mäuse (Tab. 3).

Tab. 3: Zytokinsekretion der Lymphozyten verschiedener Mausstämme

Mausstamm	Stimulation					
	ConA		SLA/LP		Kontrolle	
	IL-17	IL-6	IL-17	IL-6	IL-17	IL-6
BALB/c	2781	442	1414	351	NN	30
C57BL/6	358	159	NN	75	NN	26
IL-10 -/-	5442	766	2874	2030	22	28

Versuchstiere verschiedener Stämme erhielten eine Injektion in die Fußballen mit SLA/LP-CFA. Die Lymphknotenzellen wurden, nach Isolation, spezifisch mit SLA/LP oder unspezifisch mit ConA stimuliert. Dargestellt sind die Zytokinkonzentrationen (pg/ml), NN: nicht nachweisbar.

5 Diskussion

5.1 Expressionsanalysen und Tiermodell

Die SLA/LP spezifische Autoimmunantwort bei AIH Patienten hat die Frage aufgeworfen, ob das Auftreten der Autoantikörper nur ein Epiphänomen darstellt, oder ob ein kausaler Zusammenhang zwischen dem SLA/LP Molekül und der Auslösung der Immunantwort besteht. Verschiedene Annahmen zur möglichen Auslösung der SLA/LP Immunantwort konnten bisher widerlegt werden. Dazu gehört molekulares Mimikri und Genpolymorphismus.

Molekulare Mimikri, konnte als mögliche Ursache für die Bildung von LKM1 Autoantikörpern nachgewiesen werden (Kerkar et al., 2003). LKM1 Autoantikörper richten sich gegen ein katalytisches Leberenzym des endoplasmatischen Retikulums, Cytochrom P450 2D6. Dieses Enzym besitzt homologe Sequenzen zum Hepatitis C Virus. LKM1 Antikörper kreuzreagieren mit HCV und Cytochrom 2D6 (Manns et al., 1991). Die Hypothese des molekularen Mimikris wurde auch für das SLA/LP Molekül untersucht, konnte jedoch eher widerlegt werden (Herkele et al., 2002).

Untersucht wurde auch die Hypothese des Genpolymorphismus. In anderen autoimmunen Erkrankungen, wie z.B. Systemische Lupus Erythematosus, konnte Genpolymorphismus in der Promotorregion eines Rezeptors für B7-Moleküle (kostimulatorisches Molekül für T-Zellen) auf T-Zellen (CTLA-4; CD 152) nachgewiesen werden (Hudson et al. 2002). Ebenso wurde die autoimmune Erkrankung Alopecia areata, die zu kreisrundem Haarausfall führt, mit einem Genpolymorphismus in Intron 6 des MX1 Gens, welches für das Interferon-induzierte p78 Protein codiert, in Zusammenhang gebracht (Tazi-Ahnini et al., 2000). Untersuchungen von Dr. T. Höhler (Universitätsklinik Mainz) erbrachten jedoch keinerlei Hinweis auf ein Vorliegen eines Genpolymorphismus im SLA/LP Gen.

Als weitere Hypothese gilt eine aberrante Expression des Moleküls als Auslöser der Autoimmunität.

In der vorliegenden Arbeit sollte diese Hypothese einer aberranten Expression des SLA/LP Moleküls bei Patienten mit autoimmuner Hepatitis überprüft werden.

Zur Beantwortung dieser Frage sollte im ersten Schritt versucht werden zu verstehen, wo SLA/LP im Körper exprimiert wird.

Bisherige Untersuchungen anhand des Komplement-Fixationstestes hatten darauf hingedeutet, dass SLA/LP in verschiedenen Organen exprimiert wird, mit erhöhter Expression in Leber und Pankreas (Stechemesser et al., 1993).

In dieser Arbeit bestätigten die Ergebnisse der quantitativen Expressionsanalysen muriner und humaner cDNA diese Vermutungen und zeigten, dass SLA/LP nicht nur in der Leber und im Pankreas, sondern in allen untersuchten Organen exprimiert wird.

Es konnte, mittels cDNA-Quantifizierung, gezeigt werden, dass sowohl im murinen als auch im humanen Organismus das Pankreas das Organ mit der weitaus höchsten Expression ist. In der Leber, wie auch in Testis, Ovar, Lunge und Milz zeigte sich eine hohe Expressionsrate.

In dieser Arbeit konnte die differentielle Expression der L-D.1 und J-D.1 Varianten, die sich nur durch eine 156 bp lange Insertion unterscheiden, im Menschen untersucht werden.

Hierbei ergaben sich deutliche Unterschiede. Im Pankreas, dem Organ mit der höchsten L-D.1 Expression, konnte die J-D.1 Variante nicht nachgewiesen werden. J-D.1 wird im Gegensatz zu L-D.1 nicht in allen Organen exprimiert. Auch ist die Menge an exprimierten J-D.1 so gering, dass sich die Frage stellt, ob es funktionell wichtig ist. Laut persönlicher Mitteilung von Dr. Joachim Grötzinger (Biochemisches Institut der Universität Kiel), der ein 3D-Modell des SLA/LP Moleküls entwickelte (Kernebeck et al., 2001), stellt die J-D.1 Variante eine nicht aktive Form des SLA/LPs dar. Die lange Variante scheint die Hauptvariante zu sein. Da die Leber nicht das einzige Organ der SLA/LP Expression ist, und das Pankreas die weitaus höchste Expression aufweist, stellt sich die Frage, weshalb es bei AIH Patienten nur zu einer Hepatitis und nicht auch zu einer Pankreatitis kommt, wenn man davon ausgeht, dass die Entzündung durch SLA/LP Autoimmunität bedingt ist. Demnach könnte es sein, dass SLA/LP Autoimmunität nicht an der AIH Pathogenese beteiligt ist. Es könnte aber sein, dass leberspezifische Faktoren eine SLA/LP-induzierte Entzündung dort begünstigen.

Es stellte sich also die Frage, ob bei AIH Patienten eine aberrante Expression des SLA/LP Moleküls auftritt. Expressionsanalysen in Patienten mit Lebererkrankungen sollten Aufschluss darüber geben, ob sie im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen abweichen.

In Patienten mit Leberkrankungen konnte im Vergleich zu gesundem Gewebe keine Hochregulierung des L-D.1 in Leberparenchymzellen gezeigt werden. Auch der Vergleich zwischen AIH und anderen Lebererkrankungen zeigte keine unterschiedliche SLA/LP Expression. Dagegen wurde L-D.1 in PBMCs der Patienten mit einer Lebererkrankung tendenziell hochreguliert. Jedoch war dies nicht krankheitsspezifisch, da sich ein allgemeiner Anstieg der SLA/LP Expression auch bei anderen Leberkrankungen zeigte. Da die SLA/LP Expression auch in ConA stimulierten Lymphozyten anstieg, könnte dies ein Marker für aktivierte Lymphozyten im Rahmen der Entzündung sein. Die Ergebnisse deuten eher daraufhin, dass eine aberrante Expression des SLA/LP Moleküls in der Leber nicht für die Auslösung der Immunantwort gegen SLA/LP ursächlich ist.

Die prinzipielle Möglichkeit, dass eine Immunantwort gegen SLA/LP eine Hepatitis auslösen kann, sollte durch Immunisierung mit SLA/LP in verschiedenen Mausstämmen untersucht werden. Hierbei zeigte sich, dass unter gewissen Umständen eine Entzündung in der Leber ausgelöst wird.

In C57BL/6 Mäusen, im Gegensatz zu anderen Maustämmen, konnte nach intraperitonealer Injektion rekombinanten SLA/LP Proteins, eine Infiltration entzündlicher Zellen nachgewiesen werden. Die Infiltration war verstärkt in C57BL/6 IL-10 defizienten Mäusen zu sehen.

Eine Leberschädigung, die anhand von Transaminasen im Serum gemessen wurde, ließ sich jedoch nur bei den C57BL/6 IL-10 $-/-$ Mäusen nachweisen.

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass ein bestimmtes immunologisches Milieu und eine genetische Prädisposition die Ausbildung der Krankheit unterstützen.

Die Lymphozytenproliferation nach SLA/LP-spezifischer Restimulation wies keine Unterschiede zwischen C57BL/6 IL-10 $-/-$, C57BL/6 Wildtyp und BALB/c Mäusen auf. Die unterschiedliche Empfindlichkeit dieser Stämme eine SLA/LP induzierte Hepatitis zu entwickeln, liegt also anscheinend nicht darin, dass SLA/LP von den BALB/c Mäusen nicht erkannt oder präsentiert wird, sondern vermutlich eher in einem unterschiedlichen Typ der Immunantwort gegen SLA/LP. IL-10 ist ein Zytokin, das vor allem von Monozyten, aber auch von Lymphozyten produziert wird (Knolle et al., 1998). Es inhibiert die Expression bestimmter T-Zell Zytokine, MHC II Moleküle und kostimulatorischer Moleküle auf Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen. Es erhöht B-Zell Proliferation und Antikörperbildung (Moore et al., 2001). IL-10

defiziente Mäuse entwickeln eine chronische Enterocolitis, bedingt durch die fehlende Kontrolle der normalen Immunantwort des Darms gegen enterische Antigene. Dies führt zu einer chronischen Entzündung durch die ständige Überproduktion inflammatorischer Zytokine und die erhöhte Expression der MHC II Moleküle und Antigenpräsentation.

Da IL-10 die MHC II Expression inhibiert, könnte es sein, dass eine erhöhte MHC II Expression auf Antigen-präsentierenden Zellen in IL-10 $-/-$ Mäusen zu einer ständigen Präsentation des SLA/LPs führt und somit zu einem Durchbrechen der Toleranz führt. Einen Hinweis auf die Wichtigkeit von IL-10 lieferten Czaja et al., die in Patienten mit einer AIH Typ 1 eine Abnahme der IL-10 Konzentration im Serum mit der Remission der Erkrankung in Verbindung bringen konnten (Czaja et al, 2000).

Um zu überprüfen, ob IL10 $-/-$ Mäuse mit SLA/LP-induzierter Hepatitis eine andere Immunreaktion gegen SLA/LP zeigen als Mäuse, die keine Hepatitis entwickelten, wurden die Mäuse mit SLA/LP immunisiert und die Lymphozyten der drainierenden Lymphknoten in vitro mit SLA/LP restimuliert. Anschließend wurden die gebildeten Zytokine mit einem Zytokin-Bead Assay bestimmt. Hierbei zeigte sich bei den meisten Zytokinen kein Unterschied, jedoch war eine deutlich erhöhte Sekretion von IL-6 und IL-17 durch IL10 $-/-$ Lymphozyten zu finden. Die Expression des Interleukin 17 ist mit verschiedenen Autoimmunenerkrankungen und Entzündungserkrankungen in Verbindung gebracht worden. Dazu gehören entzündliche Darmerkrankungen (Fujino et al., 2003), Rheumatoide-Arthritis (Chabaud et al., 2003; Lubberts, 2003) und Multiple Sklerose (Lock et al., 2002). IL-17 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das durch Induktion von Chemokinen Entzündungsreaktionen auszulösen scheint (Park et al., 2005). IL-17 produzierende CD4⁺ T-Zellen scheinen einen distinkten Effektorzelltyp darzustellen, deren Differenzierung durch IL-23 induziert zu sein scheint (Park et al., 2005; Harrington et al., 2005). Der IL-17-Rezeptor wird auf Zellen vieler verschiedener Organe exprimiert, auch in der Leber (Yao et al., 1995). Es konnte hier gezeigt werden, dass die Expression von IL-17 in der SLA/LP induzierten experimentellen Hepatitis in IL-10 $-/-$ Mäusen erhöht ist. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass IL-17 in der Pathophysiologie in diesem System eine gewisse Rolle spielt.

IL-6 scheint ebenfalls an Entzündungsreaktionen bei einer Reihe entzündlicher Erkrankungen beteiligt zu sein (Jones et al, 2005). Es erscheint daher gut vorstellbar, dass die Kombination der entzündlichen Zytokine IL-17 und IL-6 bei der Immunantwort

von IL10 -/- Mäusen gegen SLA/LP dazu führt, dass in diesen Mäusen eine SLA/LP-induzierte Hepatitis und Leberschädigung induziert werden kann. Die mögliche Beteiligung dieser Zytokine bei autoimmuner Leberentzündung sollte deshalb auch in AIH Patienten überprüft werden.

5.2 Expression nativen SLA/LP Proteins

Um die bisherige Vermutung der enzymatischen Funktion des SLA/LP Proteins zu bestätigen, wurde versucht das Protein nativ aufzureinigen, um es dann funktionell untersuchen zu können.

Eine native Aufreinigung des SLA/LP Proteins aus Gewebe ist bislang nicht gelungen, da die Proteinmenge in den verschiedenen Geweben, selbst in der Leber, zu gering ist. In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits in der Vergangenheit versucht, bakteriell exprimiertes SLA/LP Protein nativ aufzureinigen. Dies erwies sich allerdings als schwierig, da eine saubere Aufreinigung, auch nach Austestung verschiedener Protokolle, nur unter denaturierenden Bedingungen möglich war.

Weil die Überexpression bei diesem Protein in Bakterien zu Aggregation und Bildung von Einschlusskörpern führt, wurde in der vorliegenden Arbeit das SLA/LP Molekül mit dem Maltosebindenden Protein (MBP) als Fusionsprotein exprimiert. Das MBP gilt als passender Fusionspartner für Proteine, die zur Aggregation neigen. MBP-Fusionsproteine können in hoher Ausbeute, löslich und korrekt gefaltet wiedergewonnen werden (Butt et al., 1989; Kapust und Waugh, 1999; Sachdev & Chirgwin, 1999). Die Expression des SLA/LPs als Fusionsprotein erfolgte nach Einklonierung in den pIVEX-Vektor, in einem zellfreien *in vitro*-Translationssystem. Der Fusionspartner MBP wurde nach der Aufreinigung abgespalten.

Diese Strategie der Expression als Fusionsprotein führte nicht zu dem gewünschten Erfolg. Ein Ansatz, eine native Aufreinigung des SLA/LP Proteins zu erzielen, ist die Austestung anderer Fusionsproteine als dem MBP. Zum Beispiel kann das Calmodulin-Bindende-Peptid (CBP) von 3 kDa, und ein Thioredoxin (TrxA) von 12 kDa, mit dem SLA/LP Molekül exprimiert werden. Das CBP unterstützt aufgrund seiner hohen Affinität zu Calmodulin ein effektives Aufreinigen des Proteins (Zheng et al., 1997; Egorov et al., 2004). Das TrxA unterstützt sehr effektiv die Löslichkeit des Passagierproteins (Dyson et al., 2004). Ein so exprimiertes Fusionsprotein

könnte die notwendigen Voraussetzungen – Löslichkeit und native Aufreinigung – für die erfolgreiche Herstellung des SLA/LP Moleküls bieten.

Ein weiterer, jedoch aufwendiger Ansatz zur Funktionsaufklärung des SLA/LP Proteins, ist die Generierung einer SLA/LP defizienten (knock-out) Maus, an der man die Funktion des Proteins untersuchen könnte. In embryonalen Stammzellen kann das SLA/LP Gen durch homologe Rekombination mit einem Konstrukt, das die flankierenden genomischen Sequenzen, nicht aber das SLA/LP Gen selbst enthält deletiert werden. Diese embryonale Stammzelle wird in eine Blastocyste eingebracht, die wiederum in eine scheinchwangere Maus implantiert wird. Auf diese Weise entstehen Chimären, bei denen einige Körperzellen das knock-out Allel tragen. Bei Vorliegen des knock-out Allels in der Keimbahn entstehen heterozygote SLA/LP-defiziente Nachkommen, die, untereinander verpaart, homozygote knock-out Tiere liefern können. Anhand dieser knock-out Mäuse lässt sich dann untersuchen, welche Folgen der Ausfall des SLA/LP Gens hat – was wiederum auf seine Funktion schließen lässt.

Da die Generierung von knock-out Mäusen sehr aufwendig ist, könnte der Einsatz der RNA-Interferenz (RNAi) Technologie eine alternative Möglichkeit der Funktionsanalyse (Fire et al., 1998) sein. Die Technologie basiert auf der Stilllegung (silencing) spezifischer mRNA Transkripte anhand von Doppelstrang RNA (dsRNA). Die Anwesenheit nur weniger dsRNA Moleküle kann genügen, um die Expression eines Gens spezifisch und beinahe vollständig auszuschalten (knock-down). Diese Methode ermöglicht eine erheblich schnellere Funktionsanalyse des Zielantigens, als die sehr zeitaufwendige Generierung Gen-defizienter Mäuse; jedoch ist der knock-down nur transient.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des SLA/LP Proteins bei der autoimmunen Hepatitis untersucht.

Zum einen sollte die Hypothese einer aberranten Expression des SLA/LP Moleküls als Auslöser der Autoimmunreaktion gegen SLA/LP überprüft werden. Hierzu wurde die Expression des SLA/LP Moleküls in Leber und Lymphozyten von Patienten mit verschiedenen hepatischen Erkrankungen und bei gesunden Personen bestimmt.

Die quantitativen Expressionsanalysen wurden mittels *real-time* PCR unter Einsatz SLA/LP-spezifischer Oligonukleotide durchgeführt.

Es zeigte sich, dass SLA/LP ubiquitär im Körper exprimiert wird, mit erhöhter Expression im Pankreas. Die Ergebnisse der SLA/LP Expressionsanalysen in peripheren mononukleären Blutzellen und Leberparenchymzellen von Patienten mit einer autoimmunen Hepatitis ergaben keine Hinweise auf eine aberrante Expression des SLA/LPs. Es konnte gezeigt werden, dass SLA/LP im Leberparenchym der Patienten tendenziell eher erhöht exprimiert wird, doch war kein Unterschied zwischen unterschiedlichen hepatischen Erkrankungen nachweisbar. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine aberrante Expression nicht für die Auslösung der Erkrankung zuständig ist.

Zum andern sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob eine Autoimmunreaktion gegen SLA/LP zu einer Entzündung in der Leber führen kann.

Hierzu wurden Mäuse unterschiedlicher Stämme mit SLA/LP Protein in komplettem Freund's Adjuvans immunisiert und auf Leberschädigung und Leberentzündung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass SLA/LP-Autoimmunität Leberentzündung und Leberschädigung auslösen kann. Die Auslösung der Hepatitis war aber vom Mausstamm und der Defizienz von Interleukin 10 abhängig. Somit scheint unter bestimmten immunologischen Bedingungen eine Immunreaktion gegen SLA/LP zu einer Leberentzündung und Leberschädigung zu führen.

7 Literaturverzeichnis

Alvarez, F., Berg, P.A., Bianchi, F.B., Bianchi, L., Burroughs, A.K., Cancado, E.L., Chapman, R.W., Cooksley, W.G., Czaja, A.J., Desmet, V.J., Donaldson, P.T., Eddleston, A.L., Fainboim, L., Heathcote, J., Homberg, J.C., Hoofnagle, J.H., Kakumu, S., Krawitt, E.L., Mackay, I.R., MacSween, R.N., Maddrey, W.C., Manns, M.P., McFarlane, I.G., Meyer zum Buschenfelde, K.H., Zeniya, M. (1999). "International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis." *J Hepatol* **31**(5):929-38.

Araki K., Yamamoto H., Fujimoto S. "Studies on the pathogenesis of murine experimental autoimmune active hepatitis: sensitized T cell involvement in its induction." *Clin Exp Immunol* **67**(2):326-34.

Bachmaier, K., Neu, N., de la Maza, L.M., Pal, S., Hessel, A., Penninger, J.M. (1999). "Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry." *Science* **283**:1335-1339.

Baeres, M., Herkel, J., Czaja, A.J., Wies, I., Kanzler, S., Cancado, E.L., Porta, G., Nishioka, M., Simon, T., Daehrich, C., Schlumberger, W., Galle, P.R., Lohse, A.W. (2002). "Establishment of standardised SLA/LP immunoassays: specificity for autoimmune hepatitis, worldwide occurrence, and clinical characteristics." *Gut* **51**(2):259-64.

Ballot E., Homberg J.C., Johanet C. (2000). "Antibodies to soluble liver antigen: an additional marker in type 1 auto-immune hepatitis." *J Hepatol* **33**(2):208-15.

Bernard, P.S., Wittwer, C.T. (2002). "Real-time PCR technology for cancer diagnostics." *Clin Chem* **48**(8):1178-85.

- Birnboim, H.C., Doly, J.** (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6):1513-23.
- Boberg, K.M.** (2002). "Prevalence and epidemiology of autoimmune hepatitis." *Clin Liver Dis* **6**(3):347-59.
- Bradford, M.M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**:248-54.
- Burnet, F. M.** (1959). "The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity." Cambridge University Press, Cambridge.
- Butt, T.R., Jonnalagadda, S., Monia, B.P., Sternberg, E.J., Marsh, J.A., Stadel, J.M., Ecker, D.J., Crooke, S.T.** (1989). "Ubiquitin fusion augments the yield of cloned gene products in Escherichia coli." *Proc Natl Acad Sci USA* **86**(8):2540-4.
- Chabaud M., Garnero, P., Dayer, J.M., Guerne, P.A., Fossiez, F., Miossec, P.** (2000) "Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis." *Cytokine*. **12**(7):1092-9
- Cadwell, R.C., Joyce, G.F.** (1992). "Randomization of genes by PCR mutagenesis." *PCR Methods Appl* **2**(1):28-33.
- Chomczynski, P., Sacchi, N.** (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1):156-9.
- Ciccocioppo, R., Di Sabatino, A., Corazza, G. R.** (2005) "The immune recognition of gluten in coeliac disease." *Clin Exp Immunol* **140**(3):408-16.
- Coppel, R.L., Gershwin, M.E.** (1995). "Primary biliary cirrhosis: the molecule and the mimic." *Immunol Rev* **144**:17-49.

- Costa, M., Rodriguez-Sanchez, J.L., Czaja A.J., Gelpi, C.** (2000). "Isolation and characterization of cDNA encoding the antigenic protein of the human tRNP(Ser)Sec complex recognized by autoantibodies from patients with type-1 autoimmune hepatitis." *Clin Exp Immunol* **121**(2):364-74.
- Czaja, A.J., Manns, M.P.** (1995). "The validity and importance of subtypes in autoimmune hepatitis: a point of view." *Am J Gastroenterol* **90**(8):1206-11.
- Czaja, A.J., Sievers, C., Zein, N.N.** (2000) "Nature and behavior of serum cytokines in type 1 autoimmune hepatitis." *Dig Dis Sci.* **45**(5):1028-35.
- Czaja, A.J.** (2001). "Understanding the pathogenesis of autoimmune hepatitis." *Am J Gastroenterol* **96**(4):1224-31.
- Czaja¹, A.J., Donaldson, P.T., Lohse, A.W.** (2002). "Antibodies to soluble liver antigen/liver pancreas and HLA risk factors for type 1 autoimmune hepatitis." *Am J Gastroenterol* **97**(2):413-9.
- Czaja², A.J., Souto E.O., Bittencourt P.L., Cancado E.L., Porta G., Goldberg A.C., Donaldson P.T.** (2002). "Clinical distinctions and pathogenic implications of type 1 autoimmune hepatitis in Brazil and the United States." *J Hepatol* **37**(3):302-8.
- Czaja¹, A.J.** (2005). "Current concepts in autoimmune hepatitis." *Ann Hepatol* **4**(1):6-24.
- Czaja², A.J.** (2005). "Autoimmune liver disease." *Curr Opin Gastroenterol* **21**(3):293-9.
- Dansette, P.M., Bonierbale, E., Minoletti, C., Beaune, P.H., Pessayre, D., Mansuy, D.** (1998). "Drug-induced immunotoxicity." *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **23**(4):443-51.

- di Guan, C., Li P., Riggs, P.D., Inouye, H.** "Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein." *Gene* **15;67(1):21-30.**
- Dietrich, W., Ehnis, T., Bauer, M.** (1997). "Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease." *Nat Med* **3: 797–801.**
- Donaldson, P.T., Doherty, D.G., Hayllar, K.M., McFarlane, I.G., Johnson. P.J., Williams, R.** (1991). "Susceptibility to autoimmune chronic active hepatitis: human leukocyte antigens DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factors." *Hepatology* **13(4):701-6.**
- Donaldson, P., Doherty, D., Underhill, J., Williams, R.** (1994). "The molecular genetics of autoimmune liver disease." *Hepatology* **20(1 Pt 1):225-39.**
- Dubendorff, J.W., Studier, F.W.** (1991). "Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor." *J Mol Biol* **5;219(1):45-59.**
- Duplay, P., Bedouelle, H., Fowler, A., Zabin, I., Saurin, W., Hofnung, M.** (1984). "Sequences of the malE gene and of its product, the maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12." *J Biol Chem* **259(16):10606-13.**
- Dyson, M.R., Shadbolt, S.P., Vincent, K.J., Perera, R.L., McCafferty, J.** (2004). "Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: identification of protein features that correlate with successful expression." *BMC Biotechnol* **14;4(1):32.**
- Egorov, M.V., Tigerstrom, A., Pestov, N.B., Korneenko, T.V., Kostina, M.B., Shakhparonov, M.I., Rydstrom, J.** (2004). "Purification of a recombinant membrane protein tagged with a calmodulin-binding domain: properties of chimeras of the *Escherichia coli* nicotinamide nucleotide transhydrogenase

and the C-terminus of human plasma membrane Ca²⁺-ATPase." *Protein Expr Purif* **36**(1):31-9.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.

Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., Fujiyama, Y. (2003) "Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease." *Gut* **52**(1):65-70.

Gelpi, C., Sontheimer, E.J., Rodriguez-Sanchez, J.L. (1992). "Autoantibodies against a serine tRNA-protein complex implicated in cotranslational selenocysteine insertion." *Proc Natl Acad Sci USA* **89**(20):9739-43.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Weaver C.T. (2005). "Interleukin 17-producing CD4(+) effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." *Nat Immunol.* **6**(11):1123-32.

Herkel, J., Heidrich, B., Nieraad, N., Wies, I., Rother, M., Lohse, A.W. (2002). "Fine specificity of autoantibodies to soluble liver antigen and liver/pancreas." *Hepatology* **35**(2):403-8.

Hudson, L.L., Rocca, K., Song, Y.W., Pandey, J.P. (2002). "CTLA-4 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a highly significant association with a determinant in the promoter region." *Hum Genet* **111**(4-5):452-5.

Hurlburt, K.J., McMahon, B.J., Deubner, H., Hsu-Trawinski, B., Williams, J.L., Kowdley, K.V. (2002). "Prevalence of autoimmune liver disease in Alaska Natives." *Am J Gastroenterol* **97**(9):2402-7.

Jaeckel, E. (2002). "Animal models of autoimmune hepatitis." *Semin Liver Dis*

22(4):325-38.

Jones, S.A., Richards, P.J., Scheller, J., Rose-John, S. (2005). "IL-6 transsignaling: the in vivo consequences." *J Interferon Cytokine Res* 25(5):241-53.

Kammer, A.R., van der Burg, S.H., Grabscheid, B., Hunziker, I.P., Kwappenberg, K.M., Reichen, J., Melief, C.J., Cerny, A. (1999). "Molecular mimicry of human cytochrome P450 by hepatitis C virus at the level of cytotoxic T cell recognition." *J Exp Med* 190(2):169-76.

Kapust, R.B., Waugh, D.S. (1999). "Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused." *Protein Sci* 8(8):1668-74.

Kerkar, N., Choudhuri, K., Ma, Y., Mahmoud, A., Bogdanos, D.P., Muratori, L., Bianchi, F., Williams, R., Mieli-Vergani, G., Vergani, D. (2003). "Cytochrome P4502D6(193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease." *J Immunol* 170(3):1481-9.

Kernebeck, T., Lohse, A.W., Grotzinger, J. (2001). "A bioinformatical approach suggests the function of the autoimmune hepatitis target antigen soluble liver antigen/liver pancreas." *Hepatology* 34(2):230-3.

Knolle, P.A., Uhrig, A., Hegenbarth, S., Loser, E., Schmitt, E., Gerken, G., Lohse, A.W. (1998). "IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules." *Clin Exp Immunol* 14(3):427-33.

Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259):680-5.

- Lederberg, J.** (2002). "Instructive selection and immunological theory." *Immunol Rev* **185**:50-3.
- Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., Langer-Gould, A., Strober, S., Cannella, B., Allard, J., Klonowski, P., Austin, A., Lad, N., Kaminski, N., Galli, S.J., Oksenberg, J.R., Raine, C.S., Heller, R., Steinman, L.** (2002). "Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis." *Nat Med* **8**(5):500-8.
- Lohse, A.W., Manns, M., Dienes, H.P., Meyer zum Buschenfelde, K.H., Cohen, I.R.** (1990). "Experimental autoimmune hepatitis: disease induction, time course and T-cell reactivity." *Hepatology* **11**(1):24-30.
- Lohse, A.W., Brunner, S., Kyriatsoulis, A., Manns, M., Meyer zum Buschenfelde, K.H.** (1992). "Autoantibodies in experimental autoimmune hepatitis." *J Hepatol* **14**(1):48-53
- Lohse, A.W., Gerken, G., Mohr, H., Lohr, H.F., Treichel, U., Dienes, H.P., Meyer zum Buschenfelde, K.H.** (1995). "Relation between autoimmune liver diseases and viral hepatitis: clinical and serological characteristics in 859 patients." *Z Gastroenterol* **33**(9):527-33.
- Lohse, A.W., Obermayer-Straub, P., Gerken, G., Brunner, S., Altes, U., Dienes, H.P., Manns, M.P., Meyer zum Buschenfelde, K.H.** (1999). "Development of cytochrome P450 2D6-specific LKM-autoantibodies following liver transplantation for Wilson's disease - possible association with a steroid-resistant transplant rejection episode." *J Hepatol* **31**(1):149-55.
- Lubberts, E.** (2003) "The role of IL-17 and family members in the pathogenesis of arthritis." *Curr Opin Investig Drugs* **4**(5):572-7.

- Maina, C.V., Riggs, P.D., Grandea. A.G., Slatko, B.E., Moran, L.S., Tagliamonte, J.A., McReynolds, L.A., Guan, C.D.** (1988). "An Escherichia coli vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein." *Gene* **74**(2):365-73.
- Manns, M., Gerken, G., Kyriatsoulis, A., Staritz, M., Meyer zum Buschenfelde, K.H.** (1987). "Characterisation of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen." *Lancet* **1**(8528):292-4.
- Manns, M.P., Griffin, K.J., Sullivan, K.F., Johnson, E.F.** (1991). "Free in PMC LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase." *J Clin Invest* **88**(4):1370-8.
- Mackay, I.R., Cowling, D.C., Taft, L.I.** (1956). "Lupoid hepatitis." *Lancet* **271**(6957):1323-6.
- Miyakawa, H., Kawashima, Y., Kitazawa, E., Kawaguchi, N., Kato, T., Kikuchi, K., Imai, E., Fujikawa, H., Hashimoto, E., Schlumberger, W.** (2003). "Low frequency of anti-SLA/LP autoantibody in Japanese adult patients with autoimmune liver diseases: analysis with recombinant antigen assay." *J Autoimmun* **21**(1):77-82.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O'Garra A.** (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." *Annu Rev Immunol* **19**:683-765.
- Mori, T., Mori, Y., Yoshida, H., Ueda, S., Ogawa, M., Iesato, K., Wakashin, Y., Wakashin, M., Okuda, K.¹** (1985). "Cell-mediated cytotoxicity of sensitized spleen cells against target liver cells-in vivo and in vitro study with a mouse model of experimental autoimmune hepatitis." *Hepatology* **5**(5):770-7.
- Mori, Y., Mori, T., Ueda, S., Yoshida, H., Iesato, K., Wakashin, Y.,**

- Wakashin, M., Okuda, K.**² (1985). "Study of cellular immunity in experimental autoimmune hepatitis in mice: transfer of spleen cells sensitized with liver proteins." *Clin Exp Immunol* **61**(3):577-84.
- O'Garra, A., Vieira, P.** (2004). "Regulatory T cells and mechanisms of immune system control." *Nat Med* **10**(8):801-5.
- Oldstone, M.B.** (1998). "Molecular mimicry and immune-mediated diseases." *FASEB* **12**(13):1255-65.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., Dong, C.** (2005) "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." *Nat Immunol.* **6**(11):1133-41.
- Pfaffl, M.W.** (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **29**(9):45.
- Quintana, F.J., Rotem, A., Carmi, P., Cohen, I.R.** (2000). "Vaccination with empty plasmid DNA or CpG oligonucleotide inhibits diabetes in nonobese diabetic mice: modulation of spontaneous 60-kDa heat shock protein autoimmunity." *J Immunol* **165**(11):6148-55.
- Quintana, F.J., Carmi, P., Cohen, I.R.** (2002). "DNA vaccination with heat shock protein 60 inhibits cyclophosphamide-accelerated diabetes." *J Immunol* **169**(10):6030-5.
- Robin, M.A., Maratrat, M., Le Roy, M., Le Breton, F.P., Bonierbale, E., Dansette, P., Ballet, F., Mansuy, D., Pessayre, D.** (1996). "Antigenic targets in tienilic acid hepatitis. Both cytochrome P450 2C11 and 2C11-tienilic acid adducts are transported to the plasma membrane of rat hepatocytes and recognized by human sera." *J Clin Invest* **98**(6):1471-80.
- Rose, N.R.** (1998) "The role of infection in the pathogenesis of autoimmune disease."

Semin Immunol **10**(1):5-13.

Rose, N.R. (2004). "Autoimmune disease 2002: an overview." *J Investig Dermatol Symp Proc* **9**(1):1-4.

Sauer, B., Henderson, N. (1988). "Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1." *Proc Natl Acad Sci USA* **85**(14):5166-70.

Sachdev, D., Chirgwin, J.M.¹ (1998). "Solubility of proteins isolated from inclusion bodies is enhanced by fusion to maltose-binding protein or thioredoxin." *Protein Expr Purif* **12**(1):122-32.

Sachdev, D., Chirgwin, J.M.² (1998). "Order of fusions between bacterial and mammalian proteins can determine solubility in *Escherichia coli*." *Biochem Biophys Res Commun* **244**(3):933-7.

Sachdev, D., Chirgwin, J.M. (1999) "Properties of soluble fusions between mammalian aspartic proteinases and bacterial maltose-binding protein." *J Protein Chem* **18**(1):127-36.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* **230**(4732):1350-4.

Scheiffarth, F., Warnatz, H., Mayer, K. (1967). "Studies concerning the importance of mononuclear cells in the development of experimental hepatitis." *J Immunol* **98**(2):396-401.

Swartzman, E.E., Miraglia, S.J., Mellentin-Michelotti, J., Evangelista, L., Yuan, P.-M. (1999). "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology." *Anal Biochem* **271**(2):143-51.

- Stechemesser, E., Klein, R., Berg, P.A.** (1993). "Characterization and clinical relevance of liver-pancreas antibodies in autoimmune hepatitis." *Hepatology* **18**(1):1-9.
- Strassburg, C.P., Manns, M.P.** (2002). "Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis." *Semin Liver Dis* **22**(4):339-52.
- Tazi-Ahnini, R., di Giovine, F.S., McDonagh, A.J., Messenger, A.G., Amadou, C., Cox, A., Duff, G.W., Cork, M.J.** (2000). "Structure and polymorphism of the human gene for the interferon-induced p78 protein (MX1): evidence of association with alopecia areata in the Down syndrome region" *Hum Genet* **106**(6):639-45.
- Terpe, K.** (2003). "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." *Appl Microbiol Biotechnol* **60**(5):523-33.
- Theofilopoulos, A.N.** (1995). "The basis of autoimmunity: Part I. Mechanisms of aberrant self-recognition." *Immunol Today* **16**(2):90-8.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.** (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci USA* **76**(9):4350-4.
- Van de Water, J., Ishibashi, H., Coppel, R.L., Gershwin, M.E.** (2001). "Molecular mimicry and primary biliary cirrhosis: premises not promises." *Hepatology* **33**(4):771-5.
- Vergani, D., Mieli-Vergani, G.¹** (2004). "Autoimmune hepatitis." *Minerva Gastroenterol Dietol* **50**(2):113-23.
- Vergani, D., Mieli-Vergani, G.²** (2004). "Mechanisms of autoimmune hepatitis." *Pediatr Transplantation* **8**:589-593.

- Vogel, A., Strassburg, C.P., Manns, M.P.** (2003). "77 C/G mutation in the tyrosine phosphatase CD45 gene and autoimmune hepatitis: evidence for a genetic link." *Genes Immun* **4**(1):79-81.
- Wachter, B., Kyriatsoulis, A., Lohse, A.W., Gerken, G., Meyer zum Buschenfelde, K.H., Manns, M.** (1990). "Characterization of liver cytokeratin as a major target antigen of anti-SLA antibodies." *J Hepatol* **11**(2):232-9.
- Waldenstrom, J.** (1952). "Liver, blood proteins and food proteins." *Dtsch Z Verdau Stoffwechselkr* **12**:113-21.
- Wang, C., Teufel, A., Cheruti, U., Grotzinger, J., Galle, P.R., Lohse, A.W., Herkel, J.** (2005) "Characterisation of human gene encoding SLA/LP autoantigen and its conserved homologues in mouse, fish, fly and worm." *World J Gastroenterol*; in press.
- Warford, A., Howat, W., McCafferty, J.** (2004). "Expression profiling by high-throughput immunohistochemistry." *J Immunol Methods* **290**(1-2):81-92.
- Warnatz, H., Scheiffarth, F., Schmeissner, R.** (1975). "Studies on the cytotoxic effect of in vivo and in vitro immunized lymphocytes on liver target cells." *Clin Exp Immunol* **21**(2):250-8.
- Wies, I., Brunner, S., Henninger, J., Herkel, J., Kanzler, S., Meyer zum Buschenfelde, K.H., Lohse, A.W.** (2000). "Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis." *Lancet* **29**;355(9214):1510-5.
- Yao, Z., Fanslow, W.C., Seldin, M.F., Rousseau, A.M., Painter, S.L., Comeau M.R., Cohen, J.I., Spriggs M.K.** (1995). "Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor." *Immunity*. **3**(6):811-21.

Zachou, K., Rigopoulou, E., Dalekos, G.N. (2004). "Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease." *J Autoimmune Dis* **15**;1(1):2.

Zheng, C.F., Simcox, T., Xu, L., Vaillancourt, P. (1997). "A new expression vector for high level protein production, one step purification and direct isotopic labeling of calmodulin-binding peptide fusion proteins." *Gene* **186**(1):55-60.

8 Abkürzungsverzeichnis

A280	Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
abs	absolut
ACK	Erythrozyten-Lysebuffer (Ammoniumchlorid Kaliumbicarbonat)
AIH	Autoimmune Hepatitis
ALT	Alanin Aminotransferase
AMA	antimitochondriale Antikörper
AMP	Ampicillin
ANA	antinukleäre Antikörper
ANCA	Anti-Neutrophilen-Zytoplasma Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Anti-LKM1	<i>Liver kidney microsomal antibody</i> Typ 1
B-Zellen	B-Lymphozyten
BALB/c	congenischer Mausstamm
Ban II	ein Restriktionsenzym
BL21 (DE3)	kompetente Zellen (<i>E.coli</i>) für Protein- expression
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
C57BL/6	Inzucht Mausstamm
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFA	komplettes Freund's Adjuvans
Ci	Curie
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
Cp	crossing point
DAB	Diaminobenzidine
DEPC	Diethylpyrocarbonat

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleicacid)
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreit
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EAH	experimentelle autoimmune Hepatitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GBSS	Gey's buffered saline solution
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalazetat-Transferase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
GST	Glutathione S-Transferase
h	Stunde
H ₂ O _{dest}	deionisiertes Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis C Virus
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hep G2	Hepatomazellen aus einem humanen Hepatoblastom
Hhg	Haushaltsgen
His-tag	Histidinereste - Affinitäts -Tag
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HRP	Meerrettich Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulinklasse

IL	Interleukin
IL-10 -/-	Interleukin 10 defiziente Mäuse
IM	intramuskulär
IMAC	Immobilisierte Metallionen Affinitäts- chromatographie
IFN γ	Interferon γ
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
J-D.1	SLA/LP Variante aus einer Jurkat Lymphom zelllinie kloniert
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	Liter
lacI	lac-Repressor
LacZ	Genabschnitt der für β -Galaktosidase codiert
LB	Luria-Bertani-Medium
L-D.1	SLA/LP Variante aus Leberzellen kloniert
LKM	<i>Liver Kidney Microsome</i>
LP	Leber Pankreas
mA	Milliampere
MBP	Maltose Bindeprotein
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
Nco I	ein Restriktionsenzyme

Ni-NTA	<i>Nickel-Nitrilotriacetic Acid Chelat</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
°C	Grad Celsius
OD	optische Dichte
PE	Streptavidin-Phycoerythrin
PBC	primär biliäre Zirrhose
pBK-CMV	Expressio nsvektor (für prokaryoti sche und eukaryotis che Zellen)
PBMC	periphere Blut mononukleäre Zellen
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pET-30a	Expressionsvektor (für prokaryotische Zellen)
pH	Maß für die basische Wirkung einer Lösung
PHA	Phytohemagglutinin
pI	isoelektrischer Punkt
pIVEX	Vektor für <i>in vitro</i> Expression
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
PVDF	Plyvinylidifluorid
rcb	Relative zentrifugal e Beschleun igung (<i>relative centrifugat ion force</i>)

Red Taq	Taq DNA Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Roswell-Park-Memorial-Institute-Medium
RT	Reverse-Transkriptase
RTS	<i>rapid translation system</i>
rzf	Relative zentrifugale Beschleunigung
S100	Leberhomogenat nach Zentrifugation bei 100.000g
SI	Stimulationsindex
Sal I	ein Restriktionsenzym
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodiumdodecylsulfate</i>)
SDS-page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
SLA	<i>soluble liver antigen</i>
SLA/LP	<i>soluble liver antigen/liver pancreas</i>
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SMA	<i>smooth muscle antigen</i>
Tab.	Tabelle
T-Zellen	T - Lymphozyten (periphere, mononukleäre Zellen)
T7	ein Promotor
TBE	Tris Borate EDTA Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
U	Units
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
v/v	Volume pro Volumen

Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
XL10	Bakterienstamm kompetenter Zellen
β -ME	β -Mercaptoethanol
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1.1 L-D.1 und J-D.1 cDNA Sequenz
- Abb. 1.2 Dreidimensionales Modell des SLA/LP Moleküls
- Abb. 1.3 Alignment der Aminosäuresequenz des SLA/LP Moleküls verschiedener Spezies
- Abb. 3.1 Schematische Darstellung der Zytokin-Bestimmung
- Abb. 3.2 Amplifizierungsstrategie der SLA/LP-Varianten cDNA
- Abb. 3.3 Klonierungsschema des pIVEX Vektors mit der SLA/LP cDNA
- Abb. 3.4 MBP Fusionsproteinaufreinigung (Schema)
- Abb. 4.1 Agarosegel zur Überprüfung der murinen SLA/LP-cDNA Amplifizierung
- Abb. 4.2 Expression des SLA/LP Moleküls in verschiedenen Geweben der Maus
- Abb. 4.3 Expression des SLA/LP Moleküls im murinen Embryonen
- Abb. 4.4 Agarosegel zur Überprüfung der humanen SLA/LP Varianten-cDNA Amplifizierung
- Abb. 4.5 Expressionsquantifizierung der SLA/LP Varianten in adulten, humanen Geweben
- Abb. 4.6 Expressionsvergleich der SLA/LP Expression in humanen Geweben (adult : embryonal)
- Abb. 4.7 SLA/LP Expression in stimulierten Milzzellen der Maus
- Abb. 4.8 Expressionsquantifizierung der SLA/LP Varianten in humanen mononukleären Zellen
- Abb. 4.9 SLA/LP Expressionsanalysen in PBMC aus Hepatitis Patienten
- Abb. 4.10 SLA/LP Expressionsanalysen in Leberparenchymzellen aus Hepatitis Patienten
- Abb. 4.11 Agarosegele zum Nachweis der Restriktionsverdauung
- Abb. 4.12 SDS-PAGE und Westernblot zur Überprüfung der Expression des MBP Fusionsproteins
- Abb. 4.13 Leberhistologien immunisierter Mäuse verschiedener Mausstämme

Abb. 4.14 Serumtransaminasen (ALT und AST) SLA/LP bzw. S100 immunisierter Mäuse

Abb. 4.15 Leberhistologien immunisierter Mäuse des Mausstammes C57BL/6

Tab. 1: Auf abberante SLA/LP-Expression untersuchte Patientengruppen

Tab. 2: Evaluierung der T-Zell Proliferation basierend auf dem ^3H Thymidin Einbau kultivierter Lymphozyten verschiedener Mausstämme

Tab. 3: Zytokinsekretion der Lymphozyten verschiedener Mausstämme

