

JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ



**INSTITUT FÜR PHYSIOLOGISCHE CHEMIE
UND PATHOBIOCHEMIE**

**Untersuchung des murinen, nukleären
pSS- und SLE-Autoantigens La/SS-B
unter physiologischen und
pathophysiologischen Bedingungen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
(*doctor rerum naturalium*; Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie
der
JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT
in Mainz

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Christian Schörner
geb. in München

Mainz, November 2000

[...] In diesen Zeiten Molekularbiologie zu betreiben, ist aufregend. Es bedeutet „Gentechnik“ und „Klonieren“ und hat etwas Göttliches. Beim einen Teil der Bevölkerung wird man, wenn man verrät, womit man seinen lieben langen Arbeitstag verbringt, grenzenlose Bewunderung hervorrufen, beim anderen grenzenlose Ablehnung – man sollte sich daher genauestens überlegen, mit wem man es gerade zu tun hat, bevor man den Mund aufmacht. Am besten, man erwähnt keiner der Gruppen gegenüber, mit wie viel Problemen und Frust man in Wahrheit täglich kämpft, weil der erste Teil dann desillusioniert wäre und der zweite, vielleicht zurecht, unweigerlich die Frage stellen würde: „Wozu machst du das dann überhaupt?“

[...] Molekularbiologie ist vor allem Voodoo – mal klappt alles, meist klappt nix. Über den Ausgang eines Experiments scheinen recht seltsame Parameter zu entscheiden, die eigentlich selbst zum Gegenstand der Forschung gemacht werden sollten.

[...] Wie Hubert Rehm so schön sagt: „Lassen Sie sich [...] nicht entmutigen! Auch die anderen rackern sich erfolglos ab; es ist normal, dass sich erst mal kein Ergebnis blicken lässt. Halten Sie durch! – Oder lernen Sie gleich einen vernünftigen Beruf.“

In diesem Sinne ... Fangen wir an.

(aus: Der Experimentator: Molekularbiologie; Cornel Mülhardt; Gustav Fischer Verlag, 1999)

VERZEICHNISSE

I Inhaltsverzeichnis

VERZEICHNISSE	I
I Inhaltsverzeichnis	I
II Tabellenverzeichnis	IV
III Abbildungsverzeichnis	IV
IV Abkürzungsverzeichnis	V
V Literaturverzeichnis	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 Autoimmunität und Autoimmunerkrankungen	1
1.2 Kollagenosen	1
1.3 Ätiologie von Autoimmunerkrankungen	2
1.4 Das antinukleäre Antikörpersystem und die Ribonukleoproteine	4
1.5 Das humane Autoantigen La/SS-B	5
1.5.1 Genomische Struktur und Entstehung der mRNA-Isoformen	5
1.5.2 Die Transkriptionsstartpunkte der mRNA-Isoformen	7
1.5.3 Struktur und interne Translationsinitiation der mRNA-Isoformen	7
1.5.4 Proteinstruktur	8
1.5.5 Die isoelektrischen Proteinformen	10
1.5.6 Evolutionäre Konservierung	10
1.5.7 Antigene Epitope	11
1.5.8 Monoklonale Antikörper	11
1.5.9 Die <i>hot spot</i> -Region und das putative Neoepitop	12
1.5.10 Zelluläre Lokalisationen	13
1.5.11 Zelluläre Funktionen	14
1.5.11.1 Das La/SS-B-Protein als Transkriptions-/Terminationsfaktor	14
1.5.11.2 Das La/SS-B-Protein als Faktor der internen Translationsinitiation	15
1.5.11.3 Das La/SS-B-Protein als Stabilisator von Histon-Proteinen	16
1.5.11.4 Das La/SS-B-Protein als DNA-RNA-Helikase	17
1.5.11.5 Das La/SS-B-Protein als RNA- <i>chaperone</i>	17
1.5.11.6 Das La/SS-B-Protein als Gegenspieler der Proteinkinase R (PKR)	17
1.5.11.7 Das La/SS-B-Protein als essentieller Faktor in der Embryonalentwicklung	17
1.6 Das murine Autoantigen La/SS-B	18
2 AUFGABENSTELLUNG	19
3 MATERIALIEN	21
3.1 Chemikalien und ihre Abkürzungen	21
3.2 Verbrauchsmaterialien	23
3.3 Geräte und Hilfsmittel	23
3.4 Restriktionsendonukleasen	24
3.5 Kits und deren Zusammensetzung	25
3.6 Puffer, Lösungen und Stammlösungen	26
3.7 Flüssige und feste Medien für Bakterien und eukaryontische Zellen	26
3.8 Zelllinien und Primärzellen	27
3.9 Bakterienstämme	27
3.10 Vektoren und Klone	27
3.11 Genomische DNA	28
3.12 Primärantikörper	28
3.13 Polyklonale Sekundärantikörper	28
3.14 DNA-Molekulargewichtsstandards	28
3.15 RNA-Molekulargewichtsstandards	28
3.16 Protein-Molekulargewichtsstandards	29
3.17 Computerprogramme zur Bearbeitung von Sequenzen	29
3.18 Versuchstiere	29
3.19 Synthetische Peptide und rek. Proteine des humanen La/SS-B	29
3.20 Synthetische Oligonukleotide	30
4 METHODEN	33
A) Molekularbiologische Arbeitsmethoden	33
4.1 Zu beachtende Arbeitsbedingungen bei der Kultivierung von Bakterien	33
4.2 Anlegen bakterieller Über-Nacht-Kulturen auf Agarplatten	33
4.3 Anlegen bakterieller Über-Nacht-Suspensionskulturen	33

4.4 Anlegen bakterieller Glycerin-Kulturen	33
4.5 Schnelle Plasmid-Mini-DNA-Präparation.....	34
4.6 Plasmid-Midi-DNA-Präparation.....	34
4.7 Aufbewahrung von DNA	34
4.8 Saure, ethanolische Fällung von Nukleinsäuren	35
4.9 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	35
4.9.1 DNA-Agarosegele	35
4.9.2 RNA-Agarosegele	36
4.10 Nachweis von Nukleinsäuren in Agarosegelen	36
4.11 Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	37
4.12 Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen.....	37
4.13 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	38
4.14 Ligation von DNA-Molekülen	38
4.14.1 Gerichtete Klonierung	39
4.14.2 T/A-Klonierung von PCR-Fragmenten	39
4.15 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	39
4.16 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	40
4.17 DNA-Sequenzierung.....	40
4.18 Polymerase-Ketten-Reaktion.....	41
4.19 Reinigung von PCR-Produkten.....	42
4.20 RT-PCR	43
4.21 5'-RACE.....	43
4.22 <i>Genome walking</i>	44
4.23 Zu beachtende Arbeitsbedingungen bei Arbeiten mit RNA	45
4.24 RNA-Isolierung aus Zellkulturen und Geweben.....	45
4.25 Northern-Blotting.....	46
B) Zellbiologische Arbeitsmethoden.....	47
4.26 Zu beachtende Arbeitsbedingungen bei Eukaryontenzellen.....	47
4.27 Kultivierung von Eukaryontenzellen.....	47
4.28 Gefrierkonservierung und Auftauen von Eukaryontenzellen	48
4.29 Herstellung von Proteinextrakten aus Eukaryontenzellen	48
4.30 Bestimmung der Zellzahl von Eukaryontenzellen.....	48
4.31 Transiente Transfektion von Eukaryontenzellen	49
4.32 Immunzytochemische Fluoreszenzfärbung	49
4.33 <i>In situ</i> -Hybridisierung	50
4.34 Mikroskopiertechniken.....	51
C) Proteinbiochemische Arbeitsmethoden.....	51
4.35 Bakterielle Expression von His- <i>tag</i> -Fusionsproteinen	51
4.36 Affinitätsreinigung von His- <i>tag</i> -Fusionsproteinen	52
4.37 Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	53
4.38 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	53
4.39 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie-Brillant-Blau	54
4.40 Western-Blotting	54
4.41 Immundetektion von Proteinen.....	54
4.42 Nachweisreaktion mit dem NBT-X-Phosphat-(BCIP-) System.....	55
4.43 Nachweisreaktion mit dem ECL-System	55
4.44 Antikörper-Elution	56
4.45 Hochauflösende, zweidimensionale Gelelektrophorese.....	56
4.46 <i>In vitro</i> -Transkription/-Translation.....	57
4.47 Immunisierung von Mäusen	58
4.48 Gewinnung von Blut aus Mäusen	58
4.49 ELISA.....	59
5 ERGEBNISSE.....	61
A) Untersuchung des murinen La/SS-B-Strukturgens	61
5.1 Sequenzierung des Gens	61
B) Untersuchung der murinen La/SS-B-mRNAs bzw. La/SS-B-cDNAs.....	65
5.2 Northern-Blotting.....	65
5.3 <i>In situ</i> -Hybridisierung	65
5.4 Expressionsanalyse der mRNA-Isoformen.....	67
5.5 Translationsanalyse der mRNA-Isoformen.....	73
5.5.1 Klonierung der eukaryontischen Expressionsvektoren.....	74
5.5.2 Transiente Transfektion	75
5.5.3 <i>In vitro</i> -Transkription/-Translation	76
5.6 Lokalisationsanalyse des murinen La/SS-B-Proteins bei transienter Überexpression.....	78

5.7 Untersuchung der mRNA-Isoformen auf das Vorkommen einer IRES	80
5.7.1 Klonierung der dicistronen Konstrukte	80
5.7.2 Transiente Transfektion und Immuno-Blotting	82
5.8 Suche nach weiteren mRNA-Isoformen	84
5.8.1 Suche nach weiteren alternativen 5'-mRNA-Isoformen durch 5'-RACE	84
5.8.2 Suche nach <i>splice</i> -mRNA-Isoformen durch RT-PCR	84
C) Untersuchung des murinen La/SS-B-Proteins	85
5.9 Bakterielle Expression	85
5.9.1 Klonierung des bakteriellen Expressionvektors	85
5.9.2 Expression und Aufreinigung	85
5.9.3 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung	86
5.9.4 Western-Blotting und Immundetektion	87
5.10 Hochauflösende 2D-Gelelektrophorese	88
5.11 Untersuchung des Einflusses von NO auf das murine La/SS-B-Protein	90
5.11.1 Quantifizierung	90
5.11.2 Lokalisationsanalyse	92
5.12 Induktion von Autoantikörpern durch Immunsierung des humanen neo-La-Epitops	93
5.12.1 Nachweis von Autoantikörpern durch ELISA	94
5.12.2 Nachweis von Autoantikörpern durch Immuno-Blotting	96
5.12.3 Nachweis von Autoantikörpern durch immunzytochemische Färbung	96
5.12.4 Zusammenhang zwischen ANAs und einer zellschädigenden Vorläuferreaktion	97
6 DISKUSSION	99
A) Analyse des murinen La/SS-B auf genomischer Ebene	99
6.1 Allgemeine Merkmale des Strukturgens	99
6.2 Sequenzunterschiede	99
6.3 Die Exons und Introns	100
6.4 Der Basis-Promotor	102
6.5 Der alternative Promotor	105
6.6 Der alternative <i>splice</i> -Mechanismus	107
6.7 Vergleich der alternativen Exon 1 des murinen und humanen La/SS-B-Gens	108
6.8 Die codierende, C-terminale Nukleotidsequenz	108
6.9 Die alternativen Polyadenylierungsstellen	109
6.10 Die <i>hot-spot</i> -Region	110
B) Analyse des murinen La/SS-B auf transkriptionaler und translationaler Ebene	111
6.11 Größenbestimmung der polyadenylierten mRNAs	112
6.12 Suche nach weiteren mRNAs	112
6.13 Ubiquitäre und zellspezifische Expression der mRNAs	114
6.14 Fertig gesplissene und zytoplasmatische mRNAs	117
6.15 Funktionelle mRNAs	117
6.16 Der Translationsmechanismus der mRNAs	118
6.17 Die Lokalisation des Proteins	126
C) Analyse des murinen La/SS-B auf Proteinebene	126
6.18 Das murine La/SS-B-Protein	127
6.18.1 Konservierungen	127
6.18.2 Das RNP-Motiv	127
6.18.3 Das Kernlokalisierungssignal	127
6.18.4 Die <i>linker</i> -Region	128
6.18.5 Die ATP-Bindestelle	128
6.19 Die isoelektrischen Proteinformen	129
6.20 Der Einfluß von NO auf das murine Autoantigen La/SS-B	130
6.20.1 Der Einfluß von NO auf die Expression	132
6.20.2 Der Einfluß von NO auf die Lokalisation	132
6.21 Induktion von ANAs durch Immunsierung des humanen La/SS-B-Neoepitops	133
6.21.1 <i>epitope spreading</i> induzierter ANAs	133
6.21.2 Zellschädigende Vorläuferreaktion induzierter ANAs	136
7 ZUSAMMENFASSUNG	137
8 ANHANG	139
8.1 Genomische Sequenz des humanen La/SS-B	139
8.2 Lage der Primer im murinen La/SS-B-Gen	141
8.3 Lage aller Oligonukleotide in der murinen La/SS-B-cDNA	143
9 ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	145
10 VERÖFFENTLICHUNGEN	147
10.1 Gedruckte Vorträge	147
10.2 Vorträge	147

II Tabellenverzeichnis


Tabelle 1: Primerkombinationen, Größen der PCR-Fragmente und Größen der Introns des murinen La/SS-B-Gen	64
Tabelle 2: Lage und Größe der Exons und Introns im (A) humanen La/SS-B-Gen (GRÖLZ, 1998) und (B) murinen La/SS-B-Gen	101
Tabelle 3: Sequenzen der Exon-Intron- <i>splice</i> -Übergänge im (A) humanen La/SS-B-Gen (GRÖLZ, 1998) und (B) murinen La/SS-B-Gen	102

III Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Model eines humanen Y1-RNP (verändert nach SIMONS <i>et al.</i> , 1996)	4
Abb. 2: Bildung der mRNA-Isoformen des humanen La/SS-B-Gen (verändert nach GRÖLZ, 1998)	6
Abb. 3: Schema des humanen La/SS-B-Proteins (verändert nach SIMONS <i>et al.</i> , 1996)	9
Abb. 4: Agarosegel der genomischen PCR des murinen La/SS-B-Gen	63
Abb. 5: Sequenz des murinen La/SS-B-Gen	65
Abb. 6: Detektion der murinen La/SS-B-mRNA im Northern-Blot	67
Abb. 7: <i>In situ</i> -Hybridisierung der murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen an NIH-3T3-Zellen	68
Abb. 8: Nachweis der murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen in adulten und fetalen Geweben durch RT-PCR	71
Abb. 9: Nachweis der murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen in Zellkultur- und Primärzellen durch RT-PCR	73
Abb. 10: Immuno-Blot zur Untersuchung der drei murinen 5'-cDNA-Isoformen auf deren Expression bei transienter Transfektion in humane HeLa-Zellen	78
Abb. 11: Immuno-Blot zur Untersuchung der drei murinen 5'-cDNA-Isoformen auf deren Expression in der <i>in vitro</i> -Transkription und <i>in vitro</i> -Translation	79
Abb. 12: Grafische Darstellung der densitometrischen Auswertung der murinen La/SS-B-Proteinbanden	79
Abb. 13: Immunzytochemische Fluoreszenzfärbung von La/SS-B nach transienter Transfektion der murinen 5'-cDNA-Isoformen in NIH-3T3-Zellen	82
Abb. 14: Klonierungsschema der murinen dicistronen CAT-La/SS-B-cDNA-Konstrukte	83
Abb. 15: Immuno-Blot zur Untersuchung einer IRES nach transienter Transfektion der drei murinen 5'-cDNA-Isoformen humaner HeLa-Zellen	86
Abb. 16: SDS-Gel zur murinen La/SS-B-Proteinexpression	91
Abb. 17: Immuno-Blot zur murinen La/SS-B-Proteinexpression	92
Abb. 18: Hochauflösende 2D-Gelelektrophorese mit NIH-3T3-Zellextrakt	94
Abb. 19: Hochauflösende 2D-Gelelektrophorese mit rek. murinem La/SS-B-Protein	95
Abb. 20: Hochauflösende 2D-Gelelektrophorese mit HeLa-Zellextrakt	95
Abb. 21: Immuno-Blot zur Stimulation von NIH-3T3-Zellen mit GSNO	97
Abb. 22: Grafische Darstellung der densitometrischen Auswertung der La/SS-B-Proteinbanden	98
Abb. 23: Immunzytochemische Fluoreszenzfärbung von NIH-3T3-Zellen nach Stimulation mit GSNO	99
Abb. 24: Grafische Darstellung der ELISA-Messung der Seren einer Balb/c-Maus	101
Abb. 25: Immunzytochemische Fluoreszenzfärbungen von NIH-3T3-Zellen, gefärbt mit murinen Seren, die nach den Immunisierungen mit SOC-neo-La erhalten wurden	104
Abb. 26: Sequenzabweichungen im Exon 1b und Exon 11 des murinen La/SS-B	100
Abb. 27: Darstellung von TFs im Basis-Promotor des murinen La/SS-B	104
Abb. 28: Darstellung von TFs, die stromaufwärts des Exon 1c im Intron 1 des murinen La/SS-B liegen	106
Abb. 29: Die hypothetische Entstehung der mRNA-Isoformen des murinen La/SS-B	107
Abb. 30: Darstellung der Spezies-spezifischen Insertion bzw. Deletion in der C-terminalen, codierenden Nukleotidsequenz des La/SS-B von Mensch, Rind, Ratte und Maus (verändert nach SEMSEI <i>et al.</i> , 1993)	109
Abb. 31: Vergleich der Polyadenylierungsstellen im 3'-Bereich der La/SS-B-Nukleotidsequenzen von Mensch, Ratte und Maus (verändert nach SEMSEI <i>et al.</i> , 1993)	110
Abb. 32: Darstellung der Poly-(A)-Kassette im Exon 7 des murinen und humanen La/SS-B mit und ohne Mutationen in der <i>hot spot</i> -Region	111
Abb. 33: Vergleich der humanen und murinen AS-Sequenz (verändert nach TOPFER <i>et al.</i> , 1993)	128

IV Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
<i>A. albopictus</i>	<i>Aedes albopictus</i>
AAP	<i>abridged anchor primer</i> des 5'-RACE Kits
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AK	Antikörper
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
ANA	antinukleärer Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
AP1	Adapter Primer des GenomeWalker Kits
AP2	<i>nested</i> Adapter Primer des GenomeWalker Kits
APC	<i>antigen presenting cell</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>aqua dest.</i>	<i>aqua destillata</i>
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATCC	<i>american type culture collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AUAP	<i>abridged universal amplification primer</i> des 5'-RACE Kits
b	Base(n)
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-4-Toluidinsalz (= X-Phosphat)
BiP	<i>immunoglobulin heavy chain binding protein</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
B-Zelle	<i>bone</i> -Zelle
C	Cytosin, Cystein
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CD	<i>cluster of determination, cluster of differentiation</i>
cFa	<i>Freundsch` s adjuvans complete</i>
CHB	congenitaler Herzblock
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Cytomegalo-Virus (-Promotor)
CSPD	<i>chemiluminescent substrate for alkaline phosphatase</i>
Cys	Cystein
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat (siehe auch unter „N“)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxigenin
DISK-SDS-PAGE	diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA /ss-, ds-, c-	<i>desoxyribonucleic acid /singlestranded, doublestranded, copy</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat (siehe auch unter „N“)
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
EBV	<i>Epstein-Barr-Virus</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	<i>epidermis growth factor</i>
EGTA	Ethylenglycol-Bis (β-Aminoethylether)-N, N, N', N'-Tetracetat
eIF	eukaryontischer Initiationsfaktor

ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMBL	<i>european molecular biology laboratory</i>
ENA	extrahierbares nukleäres Antigen
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
F	Phenylalanin
F _{ab}	<i>fragment antigen binding</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FKS	fetales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung, Gramm
G	Guanosin, Glycin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
gp	Glykoprotein
GSNO	S-Nitroso-L-Glutathion
GTC	Guanidinthiocyanat
GTFs	generelle Transkriptionsfaktoren
h	Stunde, human
H	Histidin
HCl	Salzsäure
HBV	<i>Hepatitis-B-Virus</i>
HCV	<i>Hepatitis-C-Virus</i>
His	Histidin
HIS	sechs Histidin-Resten in Folge
His-tag	sechs Histidin-Resten in Folge
HIV	humanes <i>Immundefizienz-Virus</i>
HLA	humane Leukozyten-Antigene
hLa/SS-B	humanes La/SS-B
hnRNA	heterogene nukleäre DNA
hnRNP	heterogenes nukleäres RNP
HSP	Hitzeschockprotein
HTLV	humanes <i>T-lymphotropes-Virus</i>
I	Isoleucin
ICG	Interchromatingranula
IEF	isoelektrischen Fokussierung
IFA	<i>Freundsch`'s adjuvans incomplete</i>
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
Ile	Isoleucin
	Intron
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
IRES	Interne-Ribosomen-Eintrittsstelle
IV	<i>inverted repeats</i>
K	Lysin
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
L	Leucin
LacZ	β-Galactosidase
LAH1	La/SS-B Homolog Nummer 1
h/m/bLa/SS-B	humanes/murines/bovines La/SS-B
LB	Luria Bertani
Leu	Leucin
LHP1	La/SS-B-homologes Protein 1
LMW-Marker	<i>low molecular weight-Marker</i>
LMP-Agarose	<i>low melting point-Agarose</i>
Lsg.	Lösung
Lys	Lysin
µg	Mikrogramm

µl	Mikroliter
m	murin
M	molar, mol/l, Methionin
m ⁷ Gppp-Kappe	7-Methylguanosin-Kappe
mA	Milliampère
mAK	monoklonaler Antikörper
MCS	<i>multiple cloning site</i>
Met	Methionin
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mmol	Millimol
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
mLa/SS-B	murines La/SS-B
N	Asparagin
n.b.	nicht bekannt
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
NCR	nicht-codierende Region
neo-La	neo-La-Peptid
NES	Kernexportsignal
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	<i>nitric oxide synthases</i>
NTA	Nitrilo-Essigsäure
OAc	Acetat
OD	Optische Dichte
Oligo(dT)	Oligo(dT)-Primer zur RT aller mRNAs mit einem Poly(A)-Trakt am 3'-Bereich
OPD	o-Phenylendiamin
ORF	<i>open reading frame</i>
%	Prozent
P	Prolin
PBL	peripheren Blut-Lymphozyten
PBS	<i>phosphaet buffer saline</i>
PBT	PBS-BSA-Tween 20
PCF	Perichromatin-Fibrillen
PCG	Perichromatin-Granula
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PEST	PEST-Region = proteasesentiver Bereich; der Name stammt von dem gehäuften Auftreten der AS Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T)
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
Phe	Phenylalanin
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure)
PKR	Proteinkinase R
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
Pol	RNA-Polymerase
Poly(A)	Poly(A)-Trakt am 3'-Ende der mRNA
Pro	Prolin
PTB	Polypyrimidintract-Bindeprotein
PTW	PBS-Tween 20
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q	Glutamin
R	Arginin
RACE	<i>rapid amplification of cDNA</i>
rek.	rekombinant
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

RNA /m-, ss-, r-	<i>ribonucleic acid /messenger, singlestranded, ribosomal</i>
RNP	Ribonukleoprotein
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RRM	<i>rna recognition motif</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
S	Serin
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
scRNA	<i>small cytoplasmatic RNA</i>
scRNP	<i>small cytoplasmatic RNP</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
Ser	Serin
SLE	systemischer <i>Lupus erythematodes</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
snRNP	<i>small nuclear RNP</i>
SOC	<i>sequential oligopeptide carrier</i>
SOC-neo-La	neo-La-Peptid, gekoppelt an den <i>sequential oligopeptide carrier</i>
SS /p-, s-	Sjögren Syndrom /primäres-, sekundäres-
SS-A/B	Sjögren Syndrom assoziiertes Antigen A/B
T	Thymin, Threonin
T7	T7-Promotor
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAFs	TATA-Box-Bindeprotein assoziierte Faktoren
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	TATA-Box-Bindeprotein
TBS(T)	<i>Tris buffered saline</i> (Tween 20)
TCR	<i>T cell receptor</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Temp.	Temperatur
TF	Transkriptionsfaktor
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TH1-/TH2-Zelle	Thymus-Helfer-Zelle Typ 1/2
Thr	Threonin
TI-Antigene	<i>thymus independent</i> -Antigene
Tris/HCl	Tris-Hydroxyethylaminomethan/HCl
Triton-X-100	Polyethylenglykol-4-tert.-octylphenylether
Trp	Tryptophan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (mit -myristat, -palmitat, -stearat)
Tyr	Tyrosin
T-Zelle	Thymus-Zelle
U	Uracil, <i>unit(s)</i>
u.a.	unter anderem
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt, Valin
Val	Valin
[v/v]	<i>volume per volume</i>
W	Tryptophan, Watt
[w/v]	<i>weight per volume</i>
X	beliebige AS
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
X-Phosphat	siehe BCIP
Y	Tyrosin
ZNS	zentrales Nervensystem

V Literaturverzeichnis

ABBAS, K.A., LICHTMAN, A.H. and JORDAN, S.P.:
Cellular and molecular immunology.
First Edition, W.B., Saunders Company (1991)

ALI, N. and SIDDIQUI, A.:
The La antigen binds 5'noncoding region of the *hepatitis C* virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site mediated translation.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **94**: 2249-2254 (1997)

ALI, N., PRUIJN, G.J.M., KENAN, D.J., KEENE, J. and SIDDIQUI, A.:
Human La antigen is required for the *hepatitis C* virus internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation.
J Biol Chem: in press; published online ahead of print (2000)

ANDREWS, A.T.:
Electrophoresis; theory, techniques and biochemical and clinical applications.
Second Edition, Clarendon Press, Oxford (1986)

ATKINSON, M.A. and MACLAREN, N.K.:
Islet cell autoantigens in insulin-dependent diabetes.
J. Clin. Invest. **92**: 1608-1616 (1993)

AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A. and STRUHL, K. (Hrsg.):
Current protocols in molecular biology.
John Wiley & Sons Inc., New York, 1987 - 1996 (jährliche Aktualisierungen)

BABOONIAN, C., VENABLES, P.J.W., BOOTH, J., WILLIAMS, D.J., ROFFE, L.M. and MAINI, R.N.:
Virus infection induces redistribution and membrane localization of the nuclear antigen La(SS-B): a possible mechanism for autoimmunity.
Clin. Exp. Immunol. **78**: 454-459 (1989)

BACH, J.-F.:
Organ-specific autoimmunity.
Immunology Today **16**: 353-355 (1995)

BACHMANN, M., KURIEN, B.T., SCHÖRNER, C., GROSS, J., GROSS, T., JAMES, J., SCOFIELD, R.H. and HARLEY, J.B.:
Does the nuclear autoantigen La/SS-B function by binding/chelating divalent cations?
5th Dresden Symposium on Autoantibodies (2000)

BACHMANN, M., SCHÖRNER, C., DRATHEN, U., LAUBINGER, J., PAUTZ, A., SCHWANTES, A., GRÖLZ, D.:
Forschungsbericht für die Jahre '98/'99 des Arbeitskreises Prof. Bachmann am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie der Universität Mainz.
in press (1999)

BACHMANN, M., DEISTER, H., PAUTZ, A., LAUBINGER, J., SCHMITZ, M., FALKE, D., PODLECH, J. and GRÖLZ, D.:
The human autoantigen La/SS-B accelerates *Herpes simplex* virus type 1 replication in transfected mouse 3T3 cells.
Clin. Exp. Immunol **112**: 482-489 (1998)

BACHMANN, M., GRÖLZ, D., BARTSCH, H., KLEIN, R. and TRÖSTER, H.:
Analysis of expression of an alternative La (SS-B) cDNA and localization of the encoded N- and C-terminal peptides.
BBA **1356**: 53-63 (1997)

- BACHMANN, M., HILKER, H., GRÖLZ, D., TELLMANN, G., HAKE, U., KATER, L., DE WILDE, P. and TRÖSTER, H.:
Different La/SS-B mRNA isoforms are expressed in salivary gland tissue of patients with primary Sjögren's Syndrome.
J. Autoimmun. **9**: 757-766 (1996a)
- BACHMANN, M., TRÖSTER, H., BARTSCH, H. and GRÖLZ, D.:
A frame shift mutation in a *hot spot* region of the nuclear autoantigen La (SS-B).
J. Autoimmun. **9**: 747-756 (1996b)
- BACHMANN, M., ZAUBITZER, T. and MÜLLER, W.E.G.:
The autoantigen La/SSB: detection on and uptake by mitotic cells.
Exp. Cell Res. **201**: 387-398 (1992a)
- BACHMANN, M., ALTHOFF, H., TRÖSTER, H., SELENKA, C., FALKE, D. and MÜLLER, W.E.G.:
Translocation of the nuclear autoantigen La to the cell surface of *Herpes simplex* virus type I infected cells.
Autoimmunity **12**: 37-45 (1992b)
- BACHMANN, M., CHANG, S.H., BERND, A., MAYET, W., MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, K.-H. and MÜLLER, W.E.G.:
Translocation of the nuclear autoantigen La to cell surface: assembly and disassembly with the extracellular matrix.
Autoimmunity **9**: 99-107 (1991)
- BACHMANN, M., FALKE, D. and MÜLLER, W.E.G.:
Is La protein involved in autoimmunization and inflammatory events during disease: characterization of La protein as an unwinding enzyme.
Mol. Biol. Rep. **14**: 49-50 (1990a)
- BACHMANN, M., CHANG, S., SLOR, H., KUKULIES, J. and MÜLLER, W.E.G.:
Shuttling of the autoantigen La between nucleus and cell surface after UV irradiation of human keratinocytes.
Exp. Cell Res. **191**: 171-180 (1990b)
- BACHMANN, M., PFEIFER, K., SCHRÖDER, H.C. and MÜLLER, W.E.G.:
Characterization of the autoantigen La as a nucleic acid dependent ATPase/dATPase with melting properties.
Cell **60**: 85-93 (1990c)
- BACHMANN, M., SCHRÖDER, H.C., FALKE, D. and MÜLLER, W.E.G.:
Alteration of the intracellular localization of the La-protein compared with the localization of U snRNPs.
Cell Biol. Int. Rep. **12**: 765-789 (1989a)
- BACHMANN, M., PFEIFER, K., SCHRÖDER, H.C. and MÜLLER, W.E.G.:
The La antigen shuttles between the nucleus and the cytoplasm in CV-1 cells.
Mol. Cell. Biochem. **85**: 103-114 (1989b)
- BACHMANN, M., FALKE, D., SCHRÖDER, H.C. and MÜLLER, W.E.G.:
Intracellular distribution of La-antigen in CV-1 cells after *Herpes simplex* virus type 1 infection compared with localization of U small nuclear ribonucleoprotein particles.
J. Gen. Virol. **70**: 881-891 (1989c)
- BACHMANN, M., SCHRÖDER, H.C., FALKE, D. and MÜLLER, W.E.G.:
Alteration of the intracellular localisation of the La antigen in CV-1 cells.
Mol. Biol. Rep. **12**: 239-240 (1988)
- BACHMANN, M., PFEIFER, K., SCHRÖDER, H.C. and MÜLLER, W.E.G.:
The nucleocytoplasmic shuttling of the La protein in CV-1 cells.
Mol. Biol. Rep. **12**: 239-240 (1987)

- BACHMANN, M., MAYET, W.J., SCHRÖDER, H.C., PFEIFER, K., MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, K.-H. and MÜLLER, W.E.G.:
Association of La and Ro antigens with intracellular structures in HEp-2 carcinoma cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **83**: 7770-7774 (1986a)
- BACHMANN, M., FALKE, D., PREUHS, J., SCHRÖDER, H.C., PFEIFFER, K. and MÜLLER, W.E.G.:
Occurrence of novel small RNAs with concomitant inhibition of host cellular U small nuclear RNA synthesis in Vero cells infected with *Herpes simplex virus* type 1.
J. gen. Virol. **67**: 2587-2594 (1986b)
- BACHMANN, M., SCHRÖDER, H.C., WAGNER, K.G., MAYET, W.J., PFEIFER, K. and MÜLLER, W.E.G.:
Purification and characterization of Ro and La antigens. Modulation of their binding affinity to poly(U) by phosphorylation and the presence of ATP.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler **367**: 671-680 (1986c)
- BAI, C. and TOLIAS, P.P.:
Genetic analysis of La homolog in *Drosophila melanogaster*.
Nucleic Acids Research **28 (5)**: 1078-1084 (2000)
- BAI, C., LI, Z. and TOLIAS, P.P.:
Developmental characterization of a *Drosophila* RNA-binding protein homologous to the human systemic lupus erythematosus-associated La/SS-B autoantigen.
Mol. Cell. Biol. **14**: 5123-5129 (1994)
- BARTSCH, H.:
Charakterisierung der genomischen, zum humanen *Lupus*-Autoantigen La/SS-B homologen Pseudogen-Regionen.
Dissertation im Arbeitskreis Prof. Dr. Bachmann, Universität Mainz (1997)
- BAUM, H., BUTLER, P., DAVIES, H., STERNBERG, M.J.E. and BURROUGHS, A.K.:
Autoimmune disease and molecular mimicry: An hypothesis.
TIBS **18**: 140-144 (1993)
- BELMONT, H.M., LEVARTOVSKY, D., GOEL, A., AMIN, A., GIORNO, R., REDISKE, J., SKOVRON, M.L. and ABRAMSON, S.B.:
Increased nitric oxide production accompanied by the up-regulation of inducible nitric oxide synthase in vascular endothelium from patients with systemic lupus erythematosus.
Arthritis Rheum. **40(19)**: 1810-1816 (1998)
- BELSHAM, G.J. and SONENBERG, N.:
RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation.
Microbiol. Rev. **60**: 499-511 (1996)
- BELSHAM, G.J., SONENBERG, N. and SVITKIN, Y.V.:
The role of the La autoantigen in internal initiation in cap-independent translation.
ed. Sarnow P.
Springer Heidelberg: 85-98 (1995)
- BEN-CHETRIT, E., CHAN, E.K., SULLIVAN, K.F. and TAN, E.M.:
A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle.
J. Exp. Med. **167**: 1560-1571 (1988)
- BERG, P.A.:
Diagnose der Kollagenkrankheiten: Klinische and immunologische Leitsymptome.
Internist **25**: 37-50 (1984)
- BITTNER, M., KUPFERER, P. and MORRIS, C.F.:
Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzoyloxymethyl cellulose or nitro cellulose sheets.
Anal. Biochem. **102**: 459-471 (1980)

- BJÖRKLUND, S. and KIM, Y.-J.:
Mediator of transcriptional regulation.
TIBS **21**: 335-337 (1996)
- BLAKE, M.S., JOHNSTON, K.H., RUSSEL-JONES, G.J. and GOTSCHLICH, E.C.:
A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots.
Anal. Biochem. **136**: 175-179 (1984)
- BOGDAN, C.:
The multiplex function of nitric oxide in (auto)immunity.
J. Exp. Med. **187(9)**: 1361-1365 (1998)
- BOGDAN, C.:
Of microbes, macrophages and NO.
Behring Inst. Res. Commun. **99**: 58-72 (1997)
- BOGENHAGEN, D.F. and BROWN, D.D.:
Nucleotide sequences in *Xenopus* 5S DNA required for transcription termination.
Cell **24**: 261-270 (1981)
- BONNEAU, A.M. and SONENBERG, N.:
Involvement of the 24kd cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis.
J. Biol. Chem. **262**: 11134-11139 (1987)
- BRENNAN, C.A., DOMBROSKI, A.J. and JEANTEUR, P.:
Transcription termination factor rho is an RNA-DNA helicase.
Cell **48**: 945-952 (1987)
- BRENNER, T., BROCKE, S., SZAFER, F., SOBEL, R.A., PARKINSON, J.F., PEREZ, D.H., and STEINMAN, L.:
Inhibition of nitric oxide synthase for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis.
J. Neuroimmunol. **158**: 2940-2946 (1996)
- BROEKHUIS, C., NEUBAUER, G., VAN DER HEIJDEN, A., MANN, M., PROUD, C.G., VAN VENROOIJ, W.J. and PRUIJN, G.J.M.:
Detailed analysis of the phosphorylation of the human La (SS-B) autoantigen. (De)phosphorylation does not affect its subcellular distribution.
Biochemistry **39**: 3023-3033 (2000)
- BRUNDIN, L., SVENUNGSSON, E., MORCOS, E., ANDERSSON, M., OLSSON, T., LUNDBERG, I. and WIKLUND, N.P.:
Central nervous system nitric oxide formation in cerebral systemic lupus erythematosus.
Ann. Neurol. **44(4)**: 704-706 (1998)
- BULLOCK, W.O., FERNANDEZ, J.M. and SHORT, J.M.:
XL-1 Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *E. coli* strain with β -Galactosidase selection.
Biotech. **5**: 376-379 (1987)
- BURD, C.G. and DREYFUSS, G.:
Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins.
Science **265**: 615-618 (1994)
- BURATOWSKI, S.:
The basics of basal transcription by RNA polymerase II.
Cell **77**: 1-3 (1994)
- BURNETTE, W.N.:
„Western blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.
Anal. Biochem. **112**: 195-203 (1981)

- CARMO-FONSECA, M., PFEIFER, K., SCHRÖDER, H.C., VAZ, M.F., FONSECA, J.E., MÜLLER, W.E.G. and BACHMANN, M.:
Identification of La ribonucleoproteins as a component of interchromatin granules.
Exp. Cell Res. **185**: 73-85 (1989)
- CARTER, S. and SARNOW, P.:
Distinct mRNAs that encode La autoantigen are differentially expressed and contain internal ribosome entry sites.
J. Biol. Chem. **275 (36)**: 28301-28307 (2000)
- CASTRO, A., FAURA, M., AGELL, N., RENAU-PIQUERAS, J. and BACHS, O.:
The autoantigen La/SS-B is a calmodulin-binding protein.
Cell Calcium **20**: 493-500 (1996)
- CATT, K., and TREGGAR, G.W.:
Solid-phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes.
Science **153**: 1570-1572 (1967)
- CHA, R.S. and THILLY, W.G.:
Specificity, efficiency, and fidelity of PCR.
PCR Methods Applic. **3**: 18-29 (1993)
- CHAMBERS, J.C., KENAN, D., MARTIN, B.J. and KEENE, J.D.:
Genomic structure and amino acid sequence domains of La autoantigen.
J. Biol. Chem. **263**: 18043-18051 (1988)
- CHAMBERS, J.C., KURILLA, M.G. and KEENE, J.D.:
Association between the 7S RNA and the *Lupus* La Protein varies among cell types.
J. Biol. Chem. **258**: 11438-11441 (1983)
- CHAN, E.K.L., DI DONATO, F., HAMEL, J.C., TSENG, C.-E. and BUYON, J.P.:
52-kD SS-A/Ro: Genomic structure and identification of an alternatively spliced transcript encoding a novel leucine zipper-minus autoantigen expressed in fetal and adult heart.
J. Exp. Med. **182**: 983-992 (1995)
- CHAN, E.K.L., SULLIVAN, K.F., FOX, R.I. and TAN, E.M.:
Sjögren's Syndrome nuclear antigen B (La): cDNA cloning, structural domains, and autoepitopes.
J. Autoimmun. **2**: 321-327 (1989a)
- CHAN, E.K.L., SULLIVAN, K.F. and TAN, E.M.:
Ribonucleoprotein SS-B/La belongs to a protein family with consensus sequences for RNA-binding.
Nucl. Acids Res. **17**: 2233-2244 (1989b)
- CHAN, E.K.L. and TAN, E.M.:
Human autoantibody-reactive epitopes of SS-B/La are highly conserved in comparison with epitopes recognized by murine monoclonal antibodies.
J. Exp. Med. **166**: 1627-1640 (1987)
- CHAN, E.K.L., FRANCOEUR, A. and TAN, E.M.:
Epitopes, structural domains, and asymmetry of amino acid residues in SS-B/La nuclear protein.
J. Immunol. **136**: 3744-3749 (1986)
- CHANG, S.H., HUH, M.S., KIM, H.R., KIM, I.S., KIM, S., LEE, J.S., SEMSEI, I., GRÖLZ, D. and BACHMANN, M.:
Cross-reactivity of antibodies immunoadsorbed to Laminin with recombinant human La (SS-B) protein
Journal of Autoimmunity **11**: 163-167 (1998)
- CHANG, Y.N., KENAN, D.J., KEENE, J.D., GATIGNOL, A. and JEANG, K.T.:
Direct interactions between autoantigen La and human immunodeficiency virus leader RNA.
J. Virol. **69**: 618-619 (1995)
- CHOMCZYNSKI, P. and SACCHI, N.:
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal. Biochem. **162 (1)**: 156-159 (1987)

- CHURCH, G. M. and GILBERT, W.:
Genomic sequencing.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **81**: 1991-1995 (1984)
- CLEMENS, M.J.:
The small RNAs of *Epstein-Barr* virus.
Mol. Biol. Rep. **17**: 81-92 (1993)
- COHEN, S., CHANG, A.C.Y., BOYER, H.W. and HELLING, R.B.:
Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **70/11**: 3240-3244 (1973)
- COHEN, S., CHANG, A.C.Y. and HSU, L.:
Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **69**: 2110-2114 (1972)
- CRAIG, A.W.B., SVITKIN, V.Y., LEE, H.S., BELSHAM, G.J. and SONENBERG, N.:
The La Autoantigen contains a dimerization domain that is essential for enhancing translation.
Mol. Cell. Biol. **17**: 163-169 (1997)
- CRAWFORD, L.V. and WARING, M.J.:
Supercoiling of *Polyoma* virus DNA measured by its interaction with ethidium bromide.
J. Mol. Biol. **25**: 23-30 (1967)
- CROSS, A.H., MISKO, T.P., LIN, R.F., HICKEY, W.F., TROTTER, J.L. and TILTON, R.G.:
Aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis.
J. Clin. Invest. **93**: 2684-2690 (1994)
- DAVIES, J.L., KAWAGUCHI, Y., BENNETT, S.T., COPEMAN, J.B., CORDELL, H.J., PRITCHARD, L.E., REED, P.W., GOUGH, S.C., JENKINS, S.C. and PALMER, S.M.:
A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes.
Nature **371 (6493)**: 130-136 (1994)
- DENG, J.S. and TAN, E.M.:
Effect of actinomycin D on the expression of nuclear antigen SS-B/La.
J. Invest. Dermatol. **84**: 225-228 (1985)
- DENG, J.S., TAKASAKI, Y. and TAN, E.M.:
Nonhistone nuclear antigens reactive with autoantibodies. Immunofluorescent studies of distribution in synchronized cells.
J. Cell Biol. **91**: 654-665 (1981)
- DEODHAR S.D.:
Autoimmune diseases: Overview and current concepts of pathogenesis.
Clin. Biochem. **25**: 181-185 (1992)
- DEUTSCHER, S.L., HARLEY, J.B. and KEENE, J.D.:
Molecular analysis of the 60kDa human Ro ribonucleoprotein.
Proc. Acad. Sci. USA **85**: 9479-9483 (1988)
- DINGWALL, C. and LASKEY, R.A.:
Nuclear targeting sequences - a consensus?
Trends Biochem. Sci. **16**: 478-481 (1991)
- DRATHEN, U.:
Immunreaktivitäten gegen das Autoantigen La/SS-B.
Diplomarbeit im Arbeitskreis Prof. Dr. Bachmann, Universität Mainz (1997)
- DREYFUSS, G., SWANSON, M.S. and PINOL-ROMA, S.:
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation.
TIBS **13**: 86-91 (1988)

- DU, H., ROY, A.L. and ROEDER, R.G.:
Human transcription factor USF stimulates transcription through the initiator elements of the HIV-1 and the Ad-ML promoters.
EMBO **12**: 501-511 (1993)
- DUENAS-GONZALEZ, A., ISALES, C.M., DEL MAR ABAD-HERNANDEZ, M., GONZALEZ-SARMIENTO, R., SANGUEZA, O. and RODRIGUEZ-COMMES, J.:
Expression of inducible nitric oxide synthase in breast cancer correlates with metastatic disease.
Mod. Pathol. **10**: 645-649 (1997)
- DYNAN, W.S. and TJIAN, R.:
The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter.
Cell **35**: 79-87 (1983)
- ENGVALL, E., and PERLMANN, P.:
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), quantitative assay of immunoglobulin G.
Immunochemistry **8**: 871-879 (1971)
- EHRENFELD, E. and SEMLER, B.L.:
Anatomy of the Poliovirus internal ribosome entry site.
in *Cap-Independent translation*, ed. Sarnow P., Springer Heidelberg: 85-98 (1995)
- FAN, H., SAKULICH, A.L., GOODIER, J.L., ZHANG, X., QIN, J. and MARAIA, R.J.:
Phosphorylation of the human La antigen on serine 366 can regulate recycling of RNA polymerase III transcription complexes.
Cell **88**: 707-715 (1997)
- FANG, F.C.:
Mechanism of nitric oxide-related antimicrobial activity.
J. Clin. Invest. **99**: 2818-2825
- FOX, R.I., LUPPI, M., PISA, P. and KANG, H.L.:
Potential role of *Epstein-Barr* virus in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis.
J. Rheumatol **19**: 18-24 (1992)
- FOX, R.I., PEARSON, G. and VAUGHAN, J.H.:
Detection of *Epstein-Barr* virus-associated antigens and DNA in salivary gland biopsies from patients with Sjögren's syndrome.
J. Immunol. **137**: 3162-3168 (1986)
- FRANCOEUR, A.M., CHAN, E.K.L., GARRELS, J.I. and MATHEWS, M.B.:
Characterization and purification of *lupus* antigen La, an RNA-binding protein.
Mol. Cell. Biol. **5**: 586-590 (1985)
- FURUKAWA, F., LYONS, M.B., LEE, L.A., COULTER, S.N. and NORRIS, D.A.:
Estradiol enhances binding to cultured human keratinocytes of antibodies specific for SS-A/Ro and SS-B/La. Another possible mechanism for estradiol influence of *lupus erythematosus*.
J. Immunol. **5**: 1480-1488 (1988)
- GAN, W. and RHOADS, R.E.:
Internal initiation of translation directed by the 5'-untranslated region of the mRNA for eIF4G, a factor involved in the *Picornavirus*-induced switch from cap-dependent to internal initiation.
J. Biol. Chem. **12**: 623-626 (1996)
- GORG, A., OBERMAIER, C., BOGUTH, G., HARDER, A., SCHEIBE, B., WILDGRUBER, R. and WEISS, W.:
The current state of two-dimensional electrophoresis with the immobilized pH gradients.
Electrophoresis **6**: 1037-1053 (2000)
- GOTTLIEB, E. and STEITZ, J.A.:
Function of the mammalian La protein: Evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III.
EMBO J. **8**: 851-861 (1989a)

GOTTLIEB, E. and STEITZ, J.A.:

The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription *in vitro*.

EMBO J. **8**: 841-850 (1989b)

GRAUS, F., CORDON-CARDO, C., BONFA, E. and ELKON, K.B.:

Immunohistochemical localization of La nuclear antigen in brain. Selective concentration of the La protein in neuronal nucleoli.

J. Neuroimmunol **9** (5): 307-319 (1985)

GRÖLZ, D.:

Charakterisierung der alternativen mRNA-Isoformen des nukleären Autoantigens La/SS-B als funktionelle mRNAs.

Dissertation im Arbeitskreis Prof. Dr. Bachmann, Universität Mainz (1998)

GRÖLZ, D., TRÖSTER, H., SEMSEI, I. and BACHMANN, M.:

Analysis of expression of the gene encoding for the nuclear autoantigen La/SS-B using reporter gene constructs.

Biochim. Biophys. **13**: 178-293 (1998)

GRÖLZ, D. and BACHMANN, M.:

The nuclear autoantigen La/SS-B-associated antigen B: one gene, three functional mRNAs.

Biochem. J. **323**: 151-158 (1997a)

GRÖLZ, D., LAUBINGER, J., WILMER, F., TRÖSTER, H. and BACHMANN, M.:

Transfection analysis of expression of mRNA isoforms encoding the nuclear autoantigen La/SS-B.

J. Biol. Chem. **18**: 12076-12082 (1997b)

GRÖLZ, D., BARTSCH, H., TRÖSTER, H. and BACHMANN, M.:

The nuclear autoantigen La/SS-B: Mapping and sequencing of the gene and the three retropseudogenes.

Gene **191**: 23-29 (1997c)

GRÖLZ, D. and BACHMANN, M.:

An altered intracellular distribution of the autoantigen La/SS-B when translated from a La mRNA isoform.

Experimental Cell Research **234**: 329-335 (1997e)

GRÖLZ, D. and BACHMANN, M.:

Alternative transcripts of the nuclear autoantigen La/SS-B in mice.

Unpublished (1997d)

GUTIERREZ-ESCOLANO, L. and DEL ANGEL, R.M.:

Nuclear proteins bind to *Poliovirus* 5'-untranslated region.

Archives of Medical Research **27**: 413-419 (1996)

HAAHEIM, L.R., HALSE, A.K., KVAKESTAD, R., STERN, B., NORMANN, O. and JONSSON, R.:

Serum antibodies from patients with primary Sjögren's Syndrome and systemic *lupus erythematosus* recognize multiple epitopes on the La(SS-B) autoantigen resembling viral protein sequences.

Scand. J. Immunol. **43**: 115-121 (1996)

HARLOW, E. and LANE, D.:

Antibodies, a laboratory manual.

Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988)

HELLEN, C.U.T. and WIMMER, E.:

Translation of *encephalomyocarditis* virus RNA by internal ribosomal entry.

in *Cap-Independent Translation*, ed. Sarnow P., Springer Heidelberg: 85-98 (1995)

HENDRICK, J.P., WOLIN, S.L., RINKE, J., LERNER, M.R. and STEITZ, J.A.:

Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins: further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells.

Mol. Cell. Biol. **1**: 1138-1149 (1981)

HIERHOLZER, K. and SCHMIDT, R.F. (Hrsg):
Pathophysiologie des Menschen.
VCH Weinheim (1991)

HILKER, M., TRÖSTER, H., GRÖLZ, D., HAKE, U. and BACHMANN M.:
The autoantigen La/SS-B: Analysis of the expression of alternatively spliced La mRNA isoforms.
Cell Tissue Res. **284**: 383-389 (1996)

HOCHULI, E., BANNWARTH, W., DÖBELI, H., GENTZ, R. and STÜBER, D.:
Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent.
Bio/Technology: 1321-1325 (1988)

HOCHULI, E., DÖBELI, H. and SCHACHER, A.:
New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues.
J. Chromatography **411**: 177-184 (1987)

HOEY, S., GRABOWSKI, P.S., RALSTON, S.H., FORRESTER, J.V. and LIVERSIDGE, J.:
Nitric oxide accelerates the onset and increases the severity of experimental autoimmune uveoretinitis through an IFN- γ -dependent mechanism
J. Neuroimmunol. **159**: 5132-5142 (1996)

HOLCIK, M. and KORNELUK, R.G.:
Functional characterisation of the X-Linked inhibitor of apoptosis (XIAP) internal ribosomal entry site element: Role of La autoantigen in XIAP translation.
Mol Cell Biol **20(13)**: 4648-4657 (2000)

HORSFALL, A.C. and ROSE, L.M.:
Cross-reactive maternal autoantibodies and congenital heart block.
J. Autoimmun. **5**: 479-493 (1992)

HUANG, D.-H., HORIKOSHI, M. and ROEDER, R.G.:
Activation of the Adenovirus E1a late promotor by a single-point mutation which enhances binding of transcription factor IID.
J. Biol. Chem. **263**: 12596-12601 (1988)

HÜHN, P., PRUIJN, G.J.M., VAN VENROOIJ, W.J. and BACHMANN, M.:
Characterization of the autoantigen La (SS-B) as a dsRNA unwinding enzyme.
Nucl. Acid Res. **25**: 410-416 (1997)

JACKSON, R.J., HUNT, S.L., REYNOLDS, J.E. and KAMINSKI, A.:
Cap-dependent and cap-independent translation: Operational distinctions and mechanistic interpretations in *cap-independent translation*.
ed. Sarnow P., Springer Heidelberg: 85-98 (1995)

JAMES, M.C., JEFFREY, I.W., PRUIJN, G.J.M., THIJSSSEN, J.P.H. and CLEMENS, M.J.:
Translational control by the La antigen: Structure requirements for rescue of the double-stranded RNA-mediated inhibition of protein synthesis.
Eur. J. Biochem. **266**: 151-162 (1999)

JANEWAY, C.A. and TRAVERS, P.:
Immunobiology.
Current Biology Ltd, Garland, Blackwell, London and New York (1994)

KAISER, K. and MEISTERERNST, M.:
The human general co-factors.
TIBS **21**: 342-345 (1996)

KALB, V.F. and BERNLOHR, R.W.:
A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts.
Anal. Biochem. **82**: S. 362 - 371 (1977)

- KAMINSKI, A., HUNT, S.L., GIBBS, C.L. and JACKSON, R.J.:
Internal initiation of mRNA translation in eukaryotes.
Setlow J. (ed) Genetic engineering: principles and methods, vol. **16** Plenum New York, 115-155
- KENAN, D.J., QUERY, C.C. and KEENE, J.D.:
RNA recognition: towards identifying determinants of specificity.
Trends Biochem. Sci. **16**: 214-220 (1991)
- JENKINS, D.C., CHARLES, I.C., THOMSEN, L.L., MOSS, D.W., HOLMES, L.S., BAYLIS, S.A., RHODES, P., WESTMORE, K., EMSON, P.C. and MONCADA, S.:
Roles of nitric oxide in tumor growth.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **92**: 4392-4396 (1995)
- KNIPPERS, R.:
Molekulare Genetik.
7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1997)
- KOHSAKA, H., YAMAMOTO, K., FUJII, H., MIURA, H., MIYASAKA, N., NISHIOKA, K. and MIYAMOTO, T.:
Fine epitope mapping of the human SS-B/La protein.
J. Clin. Invest. **85**: 1566-1574 (1990)
- KOLESKE, A.J. and YOUNG, R.A.:
The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation.
TIBS **20**: 113-116 (1995)
- KOONIN, E.V., BORK, P. and SANDER, C.:
Yeast chromosome-III-new gene functions.
EMBO J **13**: 493-503 (1994)
- KORNBERG, R.D.:
RNA polymerase II transcription control.
TIBS **21**: 325-326 (1996)
- KOZAK, M.:
Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **92**: 2662-2666 (1995)
- KOZAK, M.:
Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation.
J. Biol. Chem. **30**: 19867-19870 (1991a)
- KOZAK, M.:
An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control.
J. Cell Biol. **115**: 887-903 (1991b)
- KOZAK, M.:
The scanning model for translation: An update.
J. Cell Biol. **108**: 229-241 (1989)
- KOZAK, M.:
An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs.
Nucl. Acic. Res. **20**: 8125-8148 (1987)
- KOZAK, M.:
Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **83**: 2850-2854 (1986)
- KOZAK, M.:
How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA?
Cell **15**: 1109-1123 (1978)

- KREMERSKOTHEN, J., NETTERMANN, A., OP DE BEKKE, A., BACHMANN, M. and BROSIUS, J.:
Identification of human autoantigen La/SS-B as BC1/BC200 RNA-binding protein.
DNA and Cell Biology **17**: 751-759 (1998)
- KURILLA, M.G., CABRADILLA, C.D., COLLOWAY, B.P. and KEENE, J.D.:
Nucleotide sequence and host La protein interactions of rabies leader RNA.
J. Virol. **50**: 773-778 (1984)
- KYHSE-ANDERSEN, J.:
Electroblotting of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.
J. Biochem. Biophys. Methods **10**: 203-209 (1984)
- LAEMMLI, U.K.:
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**: 680-685 (1970)
- LANZAVECCHIA, A.:
How can cryptic epitopes trigger autoimmunity?
J. Exp. Med. **181**: 1945-1948 (1995)
- LAWLEY, W., DOHERTY, A., DENNISS, S., CHAUHAN, D., PRUIJN, G., VAN VENROOIJ, W.J.,
LUNEC, J. and HERBERT, K.:
Rapid lupus autoantigen relocation and reactive oxygen species accumulation following ultraviolet irradiation of human keratinocytes.
Rheumatology (Oxford) **39(3)**: 253-261 (2000)
- LE, S.-Y. and MAIZEL, JR. J.V.:
A common RNA structural motif involved in the internal initiation of translation of cellular mRNAs.
Nucl. Acid Res. **25**: 362-369 (1997)
- LEHMANN, P.V., FORSTHUBER, T., MILLER, A. and SERCARZ, E.E.:
Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen.
Nature **385**: 155-157 (1992)
- LEHMANN, P.V., SERCARZ, E.E., FORSTHUBER, T., DAYAN, C.M. and GAMMON, G.:
Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T-cell repertoire.
Immunol. Today **14**: 203-208 (1993)
- LEONARD, N.J., MCDONALD, J.J. and REICHMANN, M.E.:
Reaction of diethyl pyrocarbonate with nucleic acid components, I. Adenine.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) **67**: 93 (1970)
- LERNER, M.R. and STEITZ, J.A.:
Snurps and scyrps.
Cell **2**: 298-300 (1981)
- LERNER, M.R., BOYLE, J.A., HARDIN, J.A. and STEITZ, J.A.:
Two novel class of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with *lupus erythematosus*.
Science **211**: 400-402 (1981a)
- LERNER, M.R., ANDREWS, N.C., MILLER, G. and STEITZ, J.A.:
Two small RNAs encoded by *Epstein-Barr* virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic *lupus erythematosus*.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **78**: 805-809 (1981b)
- LI, J.M., HORSFALL, A.C. and MAINI, R.M.:
Anti-La/SS-B but not anti-Ro52/SS-A antibodies crossreact with Laminin – a role in the pathogenesis of congenital heart block?
Cli. Exp. Immunol. **99**: 316-324 (1995)

- LINDER, P., LASKO, P.F., ASHBURNER, M., LEROY, P., NIELSEN, P.J., NISHI, K., SCHNIER, J. and SLONIMSKY, P.P.:
Birth of the D-E-A-D box.
Nature **337**: 121-122 (1989)
- LIN-MARQ, N. and CLARKSON, S.G.:
A yeast RNA binding protein that resembles the human autoantigen La.
J. Mol. Biol. **245**: 81-85 (1995)
- LOU, Y. and TUNG, K.S.K.:
T cell peptide of a self-protein elicits autoantibody to the protein antigen.
J. Immunol. **151**: 5790-5799 (1993)
- LOWE, T., SHAREFKIN, J., YANG, S.Q. and DIEFFENBACH, C.W.:
A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reactions.
Nucleic Acids Res. **18(7)**: 1757-1761 (1990)
- MACEJAK, D.G. and SARNOW, P.:
Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA.
Nature **353**: 90-94 (1991)
- MACMICKING, J., XIE, Q.-W. and NATHAN, C.:
Nitric oxide and macrophage function.
Annu. Rev. Immunol. **15**: 323-350
- MADORE, S.J., WIEBEN, E.D. and PEDERSON, T.:
Eukaryotic small ribonucleoproteins: Anti-La human autoantibodies react with U1 RNA-protein complexes.
J. Biol. Chem. **259**: 1929-1933 (1984)
- MAMULA, M.J., SILVERMAN, E.D., LAXER, R.M., BENTUR, L., ISACOVICS, B. and HARDIN, J.A.:
Human monoclonal anti-La antibodies. The La protein resides on a subset of Ro particles.
J. Immunol. **143**: 2923-2928 (1989)
- MARAIA, R.J.:
Transcription termination factor La is also an initiation factor for RNA polymerase III.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **93**: 3383-3387 (1996)
- MARIETTE, X., GOZLAN, J., CLERC, D., BISSON, M. and MORINET, F.:
Detection of *Epstein-Barr* virus DNA by *in situ*-hybridization and polymerase chain reaction in salivary gland biopsy specimens from patients with Sjögrens's syndrome.
Am. J. Med. **90**: 283-285 (1991)
- MASSEGEFF, R.F., ALBERT, W.H. and STAINES, N.A.:
Methods of immunological analysis.
VCH Verlag, Weinheim (1993)
- MATHEWS, M.B. and FRANCOEUR, A.M.:
La antigen recognizes and binds to the 3'-oligouridylate tail of small RNA.
Mol. Cell Biol. **4**: 1134-1140 (1984)
- MATTIOLI, M. and REICHLIN, M.:
Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic *lupus erythematosus*. Description of a cytoplasmatic nonribosomal antigen.
Arthritis Rheum. **17**: 421-429 (1974)
- MCCARTNEY-FRANCIS, N., ALLEN, J.B., MITZEL, D.E., ALBINA, J.E., XIE, Q.-W., NATHAN, C.F. and WAHL, S.M.:
Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase.
J. Exp. Med. **178**: 749-754 (1993)

- MCCLUSKEY, J., FARRIS, A.D., KEECH, C.L., PURCELL, A.W., RISCHMUELLER, M., KINOSHITA, G., REYNOLDS, P. and GORDON, T.P.:
Determinant spreading: lessons from animal models and human disease.
Immunol. Rev. **164**: 209-229 (1998)
- MCLAREN, R.S., CARUCCIO, N. and ROSS, J.:
Human La protein: A stabilizer of histone mRNA.
Mol. Cell. Biol. **17**: 3028-3036 (1997)
- MCNEILAGE, L.J., UMAPATHYSIVAM, K., MACMILLAN, E., GUIDOLIN, A., WHITTINGHAM, S. and GORDON, T.:
Definition of a discontinuous immunodominant epitope at the NH₂ terminus of the La/SS-B ribonucleoprotein autoantigen.
J. Clin. Invest. **89**: 1652-1656 (1992)
- MCNEILAGE, L.J., MACMILLAN, E.M. and WHITTINGHAM, S.F.:
Mapping of epitopes on the La(SS-B) autoantigen of primary Sjögren's syndrome: Identification of a cross-reactive epitope.
J. Immunol. **145**: 3829-3835 (1990)
- MEEROVITCH, K., SVITKIN, Y.V., LEE, H.S., LEIBKOWICZ, F., KENAN, D., CHAN, E.K.L., AGOL, V.I., KEENE, J.D. and SONENBERG, N.:
La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of *polio* virus RNA in reticulocyte lysate.
J. Virol. **67**: 3798-3807 (1993)
- MEEROVITCH, K., PELLETIER, J. and SONENBERG, N.:
A cellular protein that binds to the 5'-non-coding region of *polio* virus RNA: Implications for internal translation initiation.
Genes and Dev. **3**: 1026-1034 (1989)
- MELTON, D.W., MCEWAN, C., MCKIE, A.B. and REID, A.M.:
Expression of the mouse HPRT gene: Deletional analysis of the promoter region of an X-chromosome linked housekeeping gene.
Cell **44**: 319-328 (1986)
- MICHEL, T. and FERON, O.:
Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?
J. Clin. Invest. **100**: 2146-2152 (1997)
- MULLIS, K.B., FALOONA, F.A., SCHARF, S.J., SAIKI, R.K., HORN, G.T. and ERLICH, H.A.:
Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction.
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **51**: 263-273 (1986)
- NATHAN, C.:
Inducible nitric oxide synthase: what differences does it make?
J. Clin. Invest. **100**: 2417-2423 (1997)
- NICHOLAS, K.B. and NICHOLAS, H.B. jr.:
GENEDOC: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments.
Zu beziehen über anonymous ftp: <ftp://ftp.uam.edu/pub/mirror/molbio/ibmpc> (Freeware). (1996)
- NYMAN, U., HALLMAN, H., HADLACZKY, G., PETTERSON, I., SHARP, G. and RINGERTZ, N.R.:
Intranuclear localisation of snRNP antigens.
J. Cell Biol. **102**: 127-145 (1986)
- O'BRIEN, C.A., MARGELOT, K. and WOLIN, S.L.:
Xenopus Ro RNPs: Members of an evolutionarily conserved class of cytoplasmic ribonucleoproteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **90**: 7250-7254 (1993)
- OH, S.K., SCOTT, M.P. and SARNOW, P.:
Homeotic gene *Antennapedia* mRNA contains 5'-noncoding sequences that confer translational initiation by internal ribosome binding.
Genes & Development **6**: 1643-1653 (1992)

OLDSTONE, M.B.A.:

Molecular mimicry and autoimmune disease.

Cell **50**: 819-820 (1987)

ORNSTEIN, L.:

Disc electrophoresis-background and theory.

Ann. N. Y. Acad. Sci. **121**: 321-349 (1964)

PARDIGON, N. and STRAUSS, J.H.:

Mosquito homolog of the La autoantigen binds to *Sindbis* virus RNA.

J. Virol. **70**: 1173-1181 (1996)

PARK, Y.W. and KATZE, M.G.:

Translational control by *Influenza* virus.

J. Biol. Chem. **270**: 28433-28439 (1995)

PAUTZ, A.:

Vergleichende Studien zur Translation alternativer mRNA-Formen, kodierend für das nukleäre *Lupus Erythematodes*-Autoantigen-La/SS-B.

Diplomarbeit im Arbeitskreis Prof. Dr. Bachmann, Universität Mainz (1998)

PEEK, R., WESTPHAL, J.R., PRUIJN, G.J., VAN DER KEMP, A.J. and VAN VENROOIJ, W.J.:

Adeno virus infection induces loss of HLA class I and CD3 antigens, but does not induce cell surface presentation of the La (SS-B) autoantigen.

Clin. Exp. Immunol. **96**: 395-402 (1994)

PEEK, R., PRUIJN, G.J., VAN DER KEMP, A.J. and VAN VENROOIJ, W.J.:

Subcellular distribution of Ro ribonucleoprotein complexes and their constituents.

J. Cell Sci. **106**: 929-935 (1993)

PELHAM, H.R.B. and JACKSON, R.J.:

An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates.

Eur. J. Biochem. **67**: 247 (1976)

PELLETIER, J. and SONENBERG, N.:

Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from *polio* virus RNA.

Nature **334**: 320-325 (1988)

PFEIFLE, J., ANDERER, F.A. and FRANKE, M.:

Multiple phosphorylation of human SS-B/La autoantigen and its effect on poly(U) and autoantibody binding.

Biochim. Biophys. Acta **928**: 217-226 (1987)

PIZER, L.I., DENG, J.-S., STENBERG, R.M. and TAN, E.M.:

Characterization of a phosphoprotein associated with the SS-B/La nuclear antigen in *Adeno* virus-infected and uninfected KB cells.

Mol. Cell. Biol. **3**: 1235-1245 (1983)

PRUIJN, G.J.M., THIJSSSEN, J.P.H., SMITH, P.R., WILLIAMS, D.G. and VAN VENROOIJ, W.J.:

Anti-La monoclonal antibodies recognizing epitopes within the RNA-binding domain of the La protein show differential capacities to immunoprecipitate RNA-associated La protein.

Eur. J. Biochem. **232**: 611-619 (1995)

PRUIJN, G.J.M.:

The La(SS-B) antigen. In manual of biological markers of disease.

W.J. Van Venrooij and R.N. Maini, eds. (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp. B4.2/1-B4.2/14 (1994)

PRUIJN, G.J.M., SLOBBE, R.L. and VAN VENROOIJ, W.J.:

Analysis of protein-RNA interactions within Ro ribonucleoprotein complexes.

Nucleic Acid Res. **19**: 5173-5180 (1991)

- RAUH, A.J.G., HORNIG, H. and LÜHRMANN, R.:
At least three distinct B cell epitopes reside in the C-terminal half of La protein, as determined by a recombinant DNA approach.
Eur. J. Immunol. **18**: 2049-2057 (1988)
- RAYMOND, S. and WEINTRAUB, L.:
Acrylamid gel as a supporting medium for zone electrophoresis.
Science **130**: 711 (1959)
- REYNOLDS, J.E., KAMINSKI, A., KETTINEN, H.J., GRACE, K., CLARKE, B.E., CARROLL, A.R., ROWLANDS, D.J. and JACKSON R.J.:
Unique features of internal initiation of *hepatitis C* virus RNA translation.
EMBO J. **14**: 6010-6020 (1995)
- REISER, J. and WARDALE, J.:
Immunological detection of specific proteins in total cell extracts by fractionation in gels and transfer to diazophenylthioether paper.
Eur. J. Biochem. **114**: 569-575 (1981)
- RHOADS, R.E. and LAMPHEAR, B.J.:
Cap-independent translation of heat shock messenger RNAs.
in *Cap-Independent Translation*, ed. Sarnow P., Springer Heidelberg, 85-98 (1995)
- RIEDE, U.N., SCHÄFER, H.E. and WEHNER, H.:
Allgemeine and spezielle Pathologie.
2. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1989)
- RINKE, J. and STEITZ, J.A.:
Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNA are bound by a cellular protein reactive with anti-La *lupus* antibodies.
Cell **29**: 149-159 (1982)
- ROEDER, R.G.:
The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II.
TIBS **21**: 327-335 (1996)
- ROGERS, S., WELLS, R. and RECHSTEINER, M.:
Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: The PEST hypothesis.
Science **234**: 364-368 (1986)
- ROITT, I.M., BROSTOFF, J. and MALE, D.K.:
Kurzes Lehrbuch der Immunologie.
2. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1991)
- ROSA, M.D., GOTTLIEB, E., LERNER, M.R. and STEITZ, J.A.:
Striking similarities are exhibited by two small *Epstein-Barr* Virus-encoded ribonucleic acids and the *Adeno* virus-associated ribonucleic acids VAI and VAII.
Mol. Cell. Biol. **1**: 785-796 (1981)
- ROSWELL, D.F. and WHITE, E.H.:
The chemiluminescence of luminol and related hydrazides.
Methods Enzymol. **57**: 409-423 (1978)
- RUTJES, S.A., UTZ, P.J., VAN DER HEIJDEN, A., BROEKHUIS, C., VAN VENROOIJ, W.J. and PRUIJN, G.J.:
The La (SS-B) autoantigen, a key protein in RNA biogenesis, is dephosphorylated and cleaved early during apoptosis.
Cell Death Differ **6(10)**: 976-986 (1999)
- SACHS, A.B., SARNOW, P. and HENTZE, M.W.:
Starting at the beginning, middle, and end: Translation initiation in eukaryotes.
Cell **89**: 831-838 (1997)

- SAIKI, R. K., SCHARF, S.J., FALOONA, F., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A. and ARNHEIM, N.:
Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.
Science **230**: 1350-1354 (1985)
- SAKARELLOS-DIATSIOTIS, M., TSIKARIS, V., SAKARELLOS, C., TZIOUFAS, A.G., VLACHOYIANNOPOULOS, P.G. and MOUTSOPOULOS, H.M.:
A new helicoid-type wsequential oligopeptide carrier (SOC(n)) for developing potent antigens and immunogens.
Vaccine **18(3-4)**: 302-310 (1999)
- SALEMI, S., CAPOROSSI, A.P., BOFFA, L., LONGOBARDI, M.G. and BARNABA, V.:
HIV-gp120 activates autoreactive CD4-specific T cell responses by unveiling of hidden CD4 peptides during processing.
J. Exp. Med. **181**: 2253-2257 (1995)
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T.:
Molecular cloning, a laboratory manual.
Second Edition 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
- SANGER, F., NICKLEN, S. and COULSON, A.R.:
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. **12**: 5463-5467 (1977)
- SCHERLY, D., STUTZ, F., LIN MARQ, N. and CLARKSON, S.G.:
La proteins from *X. laevis*: cDNA cloning and developmental expression.
J. Mol. Biol. **231**: 196-204 (1993)
- SCHÖRNER, C.:
Expression des Autoantigens La/SS-B und zweier N-terminaler Proteinfragmente von La/SS-B im Baculo-Sf9-Expressionssystem.
Diplomarbeit im Arbeitskreis Prof. Dr. Bachmann, Universität Mainz (1999)
- SCHRÖDER, J.O. and EULER, H.H.:
Systemischer *Lupus erythematoses*.
Internist **34**: 351-361 (1993)
- SEMSEI, I., TRÖSTER, H., BARTSCH, H., SCHWEMMLE, M., IGLOI, G.L. and BACHMANN, M.:
Isolation of rat cDNA clones coding for the autoantigen SS-B/La: Detection of species specific variations.
Gene **126**: 265-268 (1993)
- SERCARZ, E.E., LEHMANN, P.V., AMETANI, A., BENICHO, G., MILLER, A. and MOUDGIL, K.:
Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants.
Annu. Rev. Immunol. **11**: 729-766 (1993)
- SHIROKI, K., ISOYAMA, T., KUGE, S., ISHII, T., OHMI, S., HATA, S., SUZUKI, K., TAKASAKI, Y. and NOMOTO, A.:
Intracellular redistribution of truncated La protein produced by *polio* virus 3C^{pro}-mediated cleavage.
Journal of Virology **73**: 2193-2200 (1999)
- SIEGENTHALER, W., KAUFMANN, W., HORNBOSTEL, H. and WALLER, H.D.:
Lehrbuch der inneren Medizin.
3. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1992)
- SIMONS, F.H.M., VAN DER KEMP, A.J.W., VAN VENROOIJ, W.J. and PRUIJN G.J.M.:
Assembly and nucleocytoplasmic transport of Ro RNPs: Nucleocytoplasmic shuttling and heat-induced redistribution of La (SS-B).
CIP-Data Koninklijke Bibliotheek, Den Haag (1996)
- SIMONS, F.H.M., PRUIJN, G.J.M. and VAN VENROOIJ, W.J.:
Analysis of the intracellular localization and assembly of Ro ribonucleoprotein particles by microinjection into *X. laevis* oocytes.
J. Cell. Biol. **125**: 981-988 (1994)

- SING, V.K., MEHROTRA, S., NARAYAN, P., PANDEY, C.M. and AGARWAL, S.S.:
Modulation of autoimmune disease by nitric oxide.
Immunol. Res. **22(1)**: 1-19 (2000)
- SLOBBE, R.L., PLUK, W., VAN VENROOIJ, W.J., PRUIJN, G.J.M.:
Ro ribonucleoprotein assembly *in vitro*. Identification of RNA-protein and protein-protein interactions.
Mol. Biol. **227**: 361-366 (1992)
- SMALE, S.T. and BALTIMORE, D.:
The „initiator“ as a transcription control element.
Cell **57**: 103-113 (1989)
- SMITH, P.R., WILLIAMS, D.W., VENABLES, P.J. and MAINI, R.N.:
Monoclonal antibodies to the Sjögren's syndrome associated antigen SS-B (La).
J. Immunol. Methods **77**: 63-67 (1985)
- ST. CLAIR, E.W., KENAN, D., BURCH, J.A., KEENE, J.D. and PISETSKY, D.S.:
Anti-La antibody production by MRL-lpr/lpr mice – analysis of fine specificity.
J. Immunol. **146**: 1885 (1991)
- ST. CLAIR, E.W., PISETSKY, D.S., REICH, C.F. and KEENE, J.D.:
Analysis of autoantibody binding to different regions of the human La antigen expressed in recombinant fusion proteins.
J. Immunol. **141**: 4173-4180 (1988)
- STEFANO, J.E.:
Purified *Lupus* antigen La recognizes an oligouridylylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts.
Cell **36**: 145-154 (1984)
- STEINMAN, L.:
Escape from „horror autotoxicus“: Pathogenesis and treatment of autoimmune disease.
Cell **80**: 7-10 (1995)
- STEITZ, J.A., WOLIN, S.L., RINKE, J., PETTERSON, I., MOUNT, S.M., LERNER, U.A.,
HINTERBERGER, M. and GOTTLIEB, E.:
Small ribonucleoproteins from eukaryotes: Structures and roles in RNA biogenesis.
Cold Spring Harbour Symp. on Quant. Biol. **47**: 893-900 (1983)
- STRYER, L.:
Biochemie.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, New York (1991)
- STURGESS, A.D., PETERSON, M.G., MC NEILAGE, L.J., WITTINGHAM, S. and COPPEL, R.L.:
Characteristics and epitope mapping of a cloned human autoantigen La.
J. Immunol. **140**: 3212-3218 (1988)
- SVITKIN, Y.V., MEEROVITCH, K., LEE, H.S., DHOLAKIA, J.N., KENAN, D.J., AGOL, V.I. and
SONENBERG, N.:
Internal translation initiation on poliovirus RNA: further characterization of La function in poliovirus
translation *in vitro*
J. Virol. **68**: 1544-1550 (1994)
- TALAL, N., FLESCHER, E. and DANG, H.:
Are endogenous retroviruses involved in human autoimmune disease?
J. Autoimmunity **5**, Suppl. A: 61-66 (1992)
- TAN, E.M., CHAN, E.K.L., SULLIVAN, K.F. and RUBIN, R.L.:
Antinuclear antibodies (ANAs): Diagnostically specific immune markers and clues toward the
understanding of systemic autoimmunity.
Clin. Immunol. Immunopathol. **47**: 121-141 (1988)

TAN, E.M.:

Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine.
Adv. Immunol. **33**: 167-240 (1982)

TARNOWKA, M.A. and BAGLIONI, C.:

Regulation of protein synthesis in mitotic Hela cells.
J. Cell Physiol. **99**: 359-368 (1979)

THEIN, S. L. and WALLACE, R.B.:

The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders.

Human genetic diseases: A practical approach

ed. K. E. Davis

IRL Press, Herndon, Virginia: 33-50 (1986)

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. and GIBSON, T. J.:

CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positive specific gap penalties and weight matrix choice.

Nucl. Acids. Res. **22**: 4673-4680.

Zu beziehen über anonymous ftp: <ftp://ftp.uam.edu/pub/mirror/molbio/ibmpc> (Freeware). (1994)

TISCH, R., YAND, X.-D., SINGER, S.M., LIDLAU, R.S., FUGGER, L. and MC DEVITT, H.O.:

Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice.

Nature **366**: 72-75 (1993)

TISELIUS, A.:

A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures.

Transactions of the Faraday Society **33**: 524-531 (1937)

TJIAN, R. and MANIATIS, T.:

Transcriptional activation: A complex puzzle with few easy pieces.

Cell **77**: 5-8 (1994)

TOPFER, F., GORDON, T. and MCCLUSKEY, J.:

Intra- and intermolecular spreading of autoimmunity involving the nuclear self-antigen La (SS-B) and Ro (SS-A).

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **92**: 875-879 (1995)

TOPFER, F., GORDON, T. and MCCLUSKEY, J.:

Characterization of the mouse autoantigen La (SS-B). Identification of conserved RNA-binding motifs, a putative ATP binding site and reactivity of recombinant protein with poly(U) and human autoantibodies.

J. Immunol. **150**: 3091-3100 (1993)

TOWBIN, H., STAHELIN, T. and GORDON, J.:

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.

Proc. Natl. Acad. Sci. **76,9**: 4350-4354 (1979)

TRÖSTER, H., BARTSCH, H., KLEIN, R., METZGER, E.T., POLLAK, G., SEMSEI, I., SCHWEMMLE, M., PRUIJN, G.J.M., VAN VENROOIJ, W.J. and BACHMANN, M.:

Activation of a murine autoreactive B cell by immunization with human recombinant autoantigen La/SS-B: Characterization of the autoepitope .

J. Autoimmun. **8**: 825-842 (1995)

TRÖSTER, H., METZGER, T., SEMSEI, I., SCHWEMMLE, M., WINTERPACHT, A., ZABEL, B. and BACHMANN, M.:

One Gene, two transcripts: Isolation of an alternative transcript encoding for the autoantigen La/SS-B from a cDNA library of a patient with primary Sjögrens' Syndrome.

J. Exp. Med. **180**: 2059-2067 (1994)

TSENG, C.E., CHAN, E.K.L., MIRANDA, E., GROSS, M., DIDONATO, F. and BUYON J.P.:

The 52 KD protein as a target of intermolecular spreading of the immune response to components of the SS A/Ro SS B/La complex.

Arthritis Rheum. **40**: 936-944 (1997)

- TSUKIYAMA-KOHARA, K., LIZUKA, N., KOHARA, M. and NOMOTO, A.:
Internal ribosome entry site within *hepatitis C virus* RNA.
J. Virol. **66**: 1476-1483 (1992)
- ULLMANN, A., JACOB, F. and MONOD, J.:
Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *E. coli*.
J. Mol. Biol. **24**: 339 (1967)
- URBAN and SCHWARZENBERG (Hrsg.)
Roche Lexikon Medizin.
München, Wien, Baltimore (1985)
- VAGNER, S., GENSAC, M.C., MARET, A., BAYARD, F., AMALRIC, F., PRATS, H. and PRATS, A.C.:
Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes.
Mol. Cell. Biol. **15**: 35-44 (1995)
- VANDERLUGT, C.J. and MILLER, S.D.:
Epitope spreading.
Current Opinion in Immunology **8**: 831-836 (1996)
- VAN VENROOIJ, W.J., SLOBBE, R.L. and PRUIJN, G.J.M.:
Structure and function of La and Ro RNPs.
Mol. Biol. Rep. **18**: 113-119 (1993)
- VAN WEEMEN, B.K., and SCHUURS, A.H.W.M.:
Immunoassay using antigen-enzyme conjugates.
FEBS Lett. **15**: 232-236 (1971)
- VELDHOVEN, C.H.A., PRUIJN, G.J.M., MEILOF, J.F., THIJSSSEN, J.P.H., VAN DER KEMP, A.W.C.M., VAN VENROOIJ, W.J. and SMEENK, R.J.T.:
Characterization of murine monoclonal antibodies against 60 kDa Ro/SS-A and La/SS-B autoantigens.
Clin. Exp. Immunol. **101**: 45-55 (1995)
- VENABLES, P. and BROOKES, S.:
Retroviruses: Potential aetiological agents in autoimmune rheumatic disease.
Br. J. Rheumatol. **12**: 841-846 (1992)
- VERRIJZER, C.P. and TJIAN, R.:
TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity.
TIBS **21**: 338-342 (1996)
- VIHINEN, T., MÄÄTTÄ, A., JAAKKOLA, P., AUVINEN, P. and JALKANEN, M.:
Functional characterization of mouse syndecan-1 promoter.
J. Biol. Chem. **271**: 12532-12541 (1996)
- VOGELSTEIN, B. and GILLESPIE, D.:
Preparative and analytical purification of DNA for agarose.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **76**: 615-617 (1979)
- VOLLER, A., BIDWELL, D.E. and BARTLETT, A.:
The enzyme linked immunosorbent assay ELISA: A guide with abstracts of microplate applications.
Dynatech Laboratories, Alexandria, Virginia (1979)
- WALKER, J.E., SARASTE, M., RUNSWICK, M.J. and GAY, N.J.:
Distantly related sequences in the a- and b-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold.
EMBO J. **1**: 945-950 (1982)
- WANCHU, A., KHULLAR, M., DEODHAR, S.D., BAMBERY, P. and SUD, A.:
Nitric oxide synthesis is increased in patients with systemic lupus erythematosus.
Rheumatol. Int. **18(2)**: 41-43 (1998)

- WANG, S., BROWNING, K.S. and MILLER, W.A.:
A viral sequence in the 3'-untranslated region mimics a 5' cap in facilitating translation of uncapped mRNA.
EMBO J. **13**: 4107-4116 (1997)
- WEBER, K. and OSBORN, M.:
The reliability of molecular weight determinations by dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. **244**: 4406-4412 (1969)
- WEINBERG, J.B., GRANGER, D.L., PISETSKY, D.S., SELDIN, M.F., MISUKONIS, M.A., MASON, S.N., PIPPEN, A.M., RUIZ, P., WOOD, E.R. and GILKESON, G.S.:
The role of nitric oxide in the pathogenesis of spontaneous murine autoimmune disease: increased nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in MRL-lpr/lpr mice, and reduction of spontaneous glomerulonephritis and arthritis by orally administered N^G-monomethyl-L-arginin.
J. Exp. Med. **179**: 651-660 (1994)
- WENG, Y.M., MCNEILAGE, J., TOPFER, F., MCCLUSKEY, J. and GORDON, T.:
Identification of a human-specific epitope in a conserved region of the La/SS-B autoantigen.
J. Clin. Invest. **92**: 1104-1108 (1993)
- WINSHIP P.R.:
An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide.
Nucl. Acids Res. **17**: 1266 (1989)
- WOLIN, S.L. and STEITZ, J.A.:
The Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins: Identification of the antigenic protein and its binding site on the Ro RNAs.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **81**: 1996-2000 (1984)
- XIAO, Q., SHARP, T.V., JEFFREY, I.W., JAMES, M.C., PRUIJN, G.J.M., VAN VENROOIJ, W.J. and CLEMENS, M.J.:
The La antigen inhibits the activation of the interferon-inducible protein kinase PKR by sequestering and unwinding double-stranded RNA.
Nucl. Acids Res. **22**: 2512-2518 (1994)
- XIE, K., DONG, Z. and FIDLER, I.J.:
Activation of nitric oxide gene for inhibition of cancer metastasis.
J. Leukocyte Biol. **797**: 797-803 (1996)
- YE, X., FONG, P., NARUSHI, I., CHOATE, D. and CAVENER, D.R.:
Ultrabithorax and *antennapedia* 5' untranslated regions promote developmentally regulated internal translation initiation
Mol. Cell. Biol. **17**: 1714-1721 (1997)
- YOO, C.J. and WOLIN, S.L.:
The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors.
Cell **89**: 393-402 (1997)
- YOO, C.J. and WOLIN, S.L.:
La proteins from *D. melanogaster* and *S. cerevisiae*: A yeast homologue of the La autoantigen is dispensable for growth.
Mol. Cell. Biol. **14**: 5412-5424 (1994)
- ZHAO, W., TILTON, R.G., CORBERT, J.A., MCDANIEL, M.L., MISKO, T.P., WILLIAMSON, J.R. and HICKEY, W.F.:
Experimental allergic encephalomyelitis in the rat is inhibited by aminoguanidine, an inhibitor of nitric oxide synthase.
J. Neuroimmunol. **64**: 123-133 (1996)
- ZUKER, M. and STIEGLER, P.:
Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information.
Nucl. Acids Res. **9**: 133-148 (1981)

1 EINLEITUNG

1.1 Autoimmunität und Autoimmunerkrankungen

An Autoimmunerkrankungen leiden weltweit mehr als 20 Millionen Menschen. Sie beeinträchtigen das Leben der Patienten sehr stark und können letztlich auch zum Tode führen. Um den Krankheitsschüben vorzubeugen, müssen die Patienten lebenslang medizinisch behandelt werden (BACHMANN *et al.*, 1999). Eine kausale Therapie ist nicht möglich, sondern kann nur durch Linderung der Symptome erfolgen (SCHRÖDER und EULER, 1993). Autoimmunität tritt auf, wenn die Mechanismen der Selbsttoleranz durchbrochen werden und sich das Immunsystem gegen den eigenen Körper richtet, was große Schäden an Geweben und Organen zur Folge haben kann (HIERHOLZER und SCHMIDT, 1991). Die Schwere des Krankheitsverlaufs hängt von der Beteiligung lebenswichtiger Organe ab.

Charakteristisch für systemische Autoimmunerkrankungen, insbesondere Kollagenosen, ist das Auftreten von organunspezifischen, antinukleären Antikörpern (ANAs) gegen ubiquitär vorkommende, zellkernspezifische Antigene. Eines der Zielantigene der ANAs bei Patienten mit Kollagenosen, insbesondere beim systemischen *Lupus erythematoses* (SLE) sowie beim Sjögren Syndrom (SS), ist das nukleäre Autoantigen La/SS-B. Daneben existieren noch eine Vielzahl anderer Autoantigene, wie z.B. Ro52/SS-A, Ro60/SS-A oder Sm (STEITZ *et al.*, 1983). Die Namensgebung der Autoantigene ging in den meisten Fällen auf die Anfangsbuchstaben der Nachnamen der Patienten zurück, bei denen die entsprechenden Autoantikörper zum ersten Mal gefunden wurden. Zusätzlich werden die Proteine Ro und La als Sjögren Syndrom assoziierte Antigene A und B mit Ro/SS-A und La/SS-B bezeichnet.

Über die Mechanismen, die zur Bildung der Autoantikörper und somit zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen, ist nur sehr wenig bekannt. Am Autoantigen La/SS-B wird exemplarisch versucht, die molekularen Mechanismen zu entschlüsseln, die zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen. Dabei steht im Zentrum die Analyse der Genexpression und die Funktions- und Strukturanalyse des Autoantigens La/SS-B.

1.2 Kollagenosen

Das Kennzeichen von systemischen, organunspezifischen Autoimmunerkrankungen (Typ III-Überempfindlichkeitsreaktionen) ist das Vorhandensein von Autoantikörpern des Typs IgG (ROITT *et al.*, 1991), die gegen körpereigene Antigene gerichtet sind, die häufig und nicht lokal begrenzt vorkommen. Dadurch sind zahlreiche Organe und Gewebe von den autoaggressiven Vorgängen betroffen. Das Krankheitsbild ist nicht einheitlich, sondern sehr

variabel mit unterschiedlichen Manifestationen (HIERHOLZER und SCHMIDT, 1991). Schäden an Organen oder Geweben entstehen entweder direkt durch die Autoantikörper oder durch die Ablagerung von Immunkomplexen. Sowohl die Autoantikörper als auch die Immunkomplexe lösen systemische *Läsionen* und Entzündungsreaktionen aus (JANEWAY und TRAVERS, 1994; ROITT *et al.*, 1991; ABBAS *et al.*, 1991).

Zu den systemischen, organunspezifischen Autoimmunerkrankungen zählen u.a. die Kollagenosen (SIEGENTHALER *et al.*, 1992). Sie gehören zu den Krankheiten des rheumatoiden Formenkreises, speziell zu den entzündlichen, rheumatischen Erkrankungen mit einem chronischen Verlauf, bei denen sich neben *Vasculopathien* (Gefäßstörungen) fibrinoide Nekrosen (Verquellung des Kollagens) im Gewebe finden (SIEGENTHALER *et al.*, 1992). Die entzündlichen Reaktionen des Bindegewebes spielen sich vor allem im Bereich der Gelenke und der sie umgebenden Weichteile ab (BERG, 1984). Zu den Kollagenosen zählen u.a. der systemische *Lupus erythematoses* (SLE) und das Sjögren Syndrom (SS) (SIEGENTHALER *et al.*, 1992). Bei diesen beiden Krankheiten spielt das Autoantigen La/SS-B eine wichtige Rolle.

1.3 Ätiologie von Autoimmunerkrankungen

Eine einheitliche Hypothese, wie die Toleranzmechanismen des Immunsystems gegen Selbstantigene durchbrochen werden und dadurch Autoimmunität entstehen kann, existiert nicht. Vermutlich spielen verschiedene Faktoren eine je nach Erkrankung unterschiedlich wichtige Rolle (HAAHEIM *et al.*, 1996; TALAL *et al.*, 1992; VENABLES und BROOKES, 1992; OLDSTONE, 1987; URBAN und SCHWARZENBERG, 1985). Die gängigsten Theorien zur Entstehung von Autoimmunität sollen im Folgenden kurz beschrieben werden:

Freilegung von kryptischen Epitopen:

- ⇒ Bei kryptischen Epitopen handelt es sich um dem Immunsystem bisher verborgene Selbstantigene. Dabei können dies Strukturmotive sein, die sich normalerweise im Inneren eines Proteins befinden und durch Konformationsveränderungen an die Proteinoberfläche verlagert werden.
- ⇒ Intrazelluläre Proteine, die auf Grund ihrer Lokalisation innerhalb einer Zelle dem Immunsystem nicht zugänglich sind, können durch eine Translokation auf die Zelloberfläche oder einer Freisetzung aus der Zelle kryptische Epitope darstellen. Dies konnte bei Infektionen mit *Herpes-Viren* und *Retro-Viren*, inklusive endogener *Retro-Viren*, gezeigt werden (SERCARZ *et al.*, 1993).
- ⇒ Kryptische Epitope können im Verlauf einer Immunantwort in größerem Umfang präsentiert werden. Dies kann durch eine verstärkte Aufnahme von Antigenen, ein verändertes Zurechtschneiden des Antigens in den Endosomen oder die vermehrte

Expression von *major histocompatibility complex*- (MHC-) Klasse II-Molekülen und/oder Adhäsionsmolekülen mit kostimulierender Wirkung verursacht werden (LANZAVECCHIA, 1995; SALEMI *et al.*, 1995).

- ⇒ Strukturelle Homologien zwischen fremden und eigenen Proteinen können im Zuge der Immunantwort gegen einen Erreger zu einer Sensibilisierung gegen kryptische Epitope auf Selbstantigene führen (molekulare *mimikry*-Hypothese) (STEINMAN, 1995; BAUM *et al.*, 1993; OLDSTONE, 1987).

Unspezifische Aktivierung von autoreaktiven Immunzellen:

- ⇒ Anergie, autoreaktive Immunzellen können durch bestimmte Antigene unspezifisch und polyklonal aktiviert werden, so z.B. T-Zellen durch Superantigene und B-Zellen durch TI-Antigene (JANEWAY und TRAVERS, 1994)

Exogene Faktoren:

- ⇒ Als Faktoren mit *trigger*-Funktion werden in der Literatur immer wieder bestimmte Chemikalien, Arzneimittel und vor allem UV-Licht-Expositionen genannt.

Endogene Faktoren:

- ⇒ Eine Beteiligung von Östrogenen ist sehr wahrscheinlich, da zwei Drittel aller Autoimmunpatienten Frauen sind (STEINMAN, 1995).
- ⇒ Familiäre Häufungen von Autoimmunerkrankungen weisen eindeutig auf eine genetische Prädisposition hin. Zwischen bestimmten Allelen, insbesondere der humanen Leukozyten-Antigene (HLA), und dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen besteht eine relativ enge Korrelation. Auch vom MHC-Komplex unabhängige Gene können die Entstehung von Autoimmunität beeinflussen (DAVIES *et al.*, 1994).
- ⇒ T-Zellen lassen sich in Subpopulationen mit einem unterschiedlichen Repertoire an Zytokinen einteilen. Viele Autoimmunerkrankungen gehen mit einem veränderten Verhältnis dieser T-Zell-Subpopulationen einher, was ein verändertes Verhältnis der Zytokine zur Folge hat. Dadurch kann das Durchbrechen der Toleranz begünstigt werden (STEINMAN, 1995; BACH, 1995; DEODHAR, 1992).
- ⇒ Nach einer ersten Immunreaktion gegen ein Epitop auf einem Selbstantigen kann es nach dem Konzept der Ausweitung von antigenen Epitopen (*epitope spreading*) (LEHMANN *et al.*, 1992) zu einer Ausweitung der Immunantwort kommen. Die Ausweitung erstreckt sich zunächst auf andere Epitope auf dem gleichen Protein. Nach diesem intramolekularen *spreading* kann sich die Immunantwort auch durch intermolekulares *spreading* auf andere Proteine ausdehnen. *Epitope spreading* wurde bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen nachgewiesen (STEINMAN, 1995; ATKINSON und MACLAREN, 1993; TISCH *et al.*, 1993). Insbesondere konnte ein *epitope spreading*

STEITZ, 1984; HENDRICK *et al.*, 1981) (Abb. 1). Die Bindestelle für das La/SS-B-Protein an eine hY-RNA sind 3-5 Oligo(U)-Reste an deren 3'-Ende (PRUIJN *et al.*, 1991). Zur Bindung der hY-RNA an das Ro60/SS-A-Protein kommt es über das Ro60/SS-A-RNP1-Motiv (STEFANO, 1984). Die Bindung ist ATP-unabhängig und wird durch die Anwesenheit von Magnesium verstärkt (DEUTSCHER *et al.*, 1988). Die Proteine Ro60/SS-A und La/SS-B binden direkt an die hY-RNAs (PRUIJN *et al.*, 1991), wohingegen das Ro52/SS-A-Protein über den Leucin-Zipper-Bereich eine Protein-Protein-Interaktion mit dem Ro60/SS-A-Protein an die Ro-RNPs assoziiert ist (SLOBBE *et al.*, 1992) (Abb. 1). Einem Modell zufolge (PEEK *et al.*, 1993) bindet das La/SS-B-Protein während der Transkription einer hY-RNA an diese. Dort bleibt es gebunden, da der 3'-Oligo(U)-Strang nicht wie bei anderen Transkripten der RNA-Polymerase III (RNA-Pol III) posttranskriptional durch Prozessierung entfernt wird (O'BRIEN *et al.*, 1993; MAMULA *et al.*, 1989). Nach Assoziation der Proteine Ro52/SS-A und Ro60/SS-A an den Komplex wandert das Ro-RNP in das Zytoplasma.

1.5 Das humane Autoantigen La/SS-B

Die meisten Untersuchungen werden am humanen La/SS-B durchgeführt, da das Autoantigen La/SS-B bei Autoimmunerkrankungen des Menschen eine wichtige Rolle spielt. Daher beziehen sich die folgenden Aussagen meistens auf das La/SS-B des Menschen.

1.5.1 Genomische Struktur und Entstehung der mRNA-Isoformen

Das humane La/SS-B-Strukturgen liegt auf dem Chromosom 2 (PRUIJN, 1994; CHAMBERS *et al.*, 1988) und codiert für 13 Exons. Die Exons 2-11 enthalten den codierenden Leserahmen. Das eigentliche Start-AUG befindet sich im Exon 2. Neben dem klassischen Exon 1 wurde von TRÖSTER *et al.* (1994) ein alternatives Exon 1' gefunden, das sich im Intron 1 70 Nukleotide stromabwärts des klassischen Exon 1 befand (Abb. 2). Von BACHMANN *et al.* (1997) wurde ein weiteres alternatives Exon 1'' entdeckt. Dieses Exon 1'' ist mit dem Exon 1' in Bezug auf die Lage im Gen und in der Nukleotidsequenz identisch, nur dass es an seinem 3'-Ende um vier Nukleotide verlängert ist (Abb. 2). Bedingt durch die drei verschiedenen Exon 1 existieren somit auch drei verschiedene La/SS-B-mRNA-Isoformen, die sich nur in ihrem jeweiligen Exon 1 unterscheiden. Das Exon 1, 1' oder 1'' stellt jeweils die 5'-nicht codierende Region (5'-UTR) der mRNA-Isoformen dar.

GRÖLZ (1998) fand neben dem klassischen Promotor, der sich stromaufwärts des klassischen Exon 1 befand, einen zweiten, alternativen Promotor zwischen dem klassischen Exon 1 und dem alternativen Exon 1' bzw. Exon 1'' (Abb. 2). Ein Teil dieses alternativen Promotors dehnt sich bis in das alternative Exon 1' bzw. Exon 1'' hinein aus. Somit besitzt das

humane La/SS-B-Gen zwei verschiedene Promotoren, von denen aus die Transkription starten kann (GRÖLZ, 1998). Vermutlich entsteht die klassische Exon 1-mRNA und die alternative Exon 1'-mRNA bzw. Exon 1''-mRNA durch die jeweilige Verwendung einer der beiden Promotoren in Kombination mit alternativem *splicing* (Abb. 2). Die Exon 1''-mRNA entsteht durch die Verwendung einer zum Exon 1' alternativen, vier Nukleotide stromabwärts gelegenen 5'-*splice*-Stelle des Exon 1'.

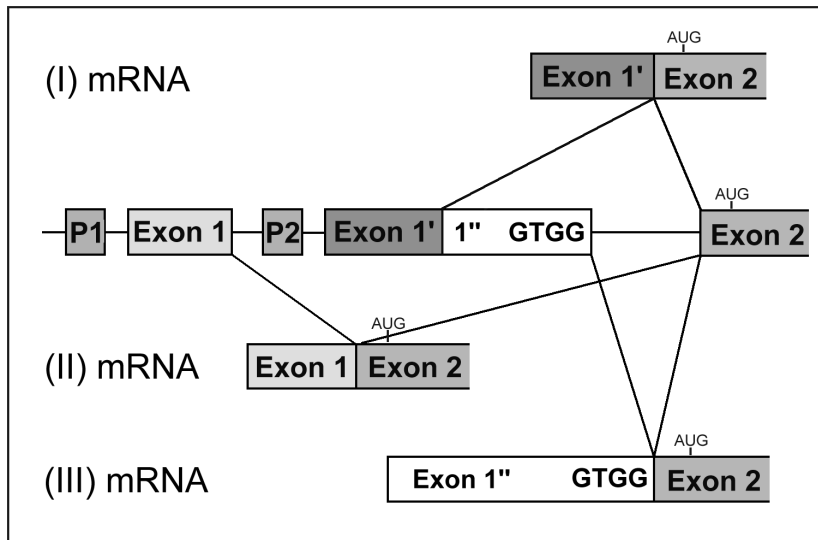


Abb. 2: Bildung der mRNA-Isoformen des humanen La/SS-B-Gens (verändert nach GRÖLZ, 1998)

Mitte: Das Gen mit dem klassischen Promotor P1, dem alternativen Promotor P2, dem Exon 1, Exon 1' bzw. 1'' und dem Exon 2

(I) alternative mRNA mit dem Exon 1'

(II) klassische mRNA mit dem Exon 1

(III) alternative mRNA mit dem Exon 1''

Die Struktur des klassischen Promotors, die Abwesenheit einer für unter einer Regulation stehenden Gene typischen TATA-Box und das gleichzeitige Vorhandensein einer für Haushaltsgene typischen GC-reichen Region sprechen dafür, dass das humane La/SS-B-Gen permanent exprimiert wird (CHAMBERS *et al.*, 1988). Im alternativen Promotor findet sich eine von der TATA-Box-Konsensussequenz abweichende TACAAA-Sequenz. Diese Sequenz könnte im Falle der alternativen Exon 1'- bzw. Exon 1''-mRNA das *core*-Promotor-Element darstellen (GRÖLZ, 1998).

Die erste vollständige humane cDNA des La/SS-B, die das klassische Exon 1 beinhaltet, wurde von CHAMBERS *et al.* (1988) veröffentlicht. Sie besitzt vom Beginn bis zur Polyadenylierungsstelle eine Länge von 1,54 kb. Im Northern-Blot erscheint eine Bande von etwa 1,8 kb (CHAN *et al.*, 1989a; CHAMBERS *et al.*, 1988).

Im humanen Genom existieren drei Pseudogene von La/SS-B (BARTSCH, 1997; GRÖLZ *et al.*, 1997c) (*accession No.* X91336, X91337 und X91338). Diese enthalten keine Intron-Sequenzen und sind eingerahmt von invertierten Sequenzwiederholungen (IV). Es handelt sich somit um Retropseudogene, die wahrscheinlich durch reverse Transkription der La/SS-B-mRNAs entstanden sind. Innerhalb des Exon 7 sind in den Pseudogenen Insertionen von 4, 16 und 24 Adenin-Nukleotiden vorhanden, wobei das evolutionär älteste Pseudogen die längste Insertion enthält und das jüngste Pseudogen die kürzeste (GRÖLZ *et al.*, 1997c). Die Pseudogene 1 und 3 leiten sich von der klassischen Exon 1-mRNA (CHAMBERS *et al.*, 1988), das Pseudogen 2 von der alternativen Exon 1'-mRNA ab (BARTSCH, 1997; GRÖLZ *et al.*, 1997c). Im Pseudogen 3 fehlt das Exon 3 (GRÖLZ *et al.*, 1997c).

1.5.2 Die Transkriptionsstartpunkte der mRNA-Isoformen

Die Transkriptionsstartpunkte der klassischen Exon 1-mRNA-Isoform des humanen La/SS-B bestimmten CHAMBERS *et al.* (1988) mit der *primer extension*-Technik. Die Transkription beginnt in einem Bereich von 19 Nukleotiden an drei Stellen. Ein variabler Transkriptionsstart ist für Haushaltsgene typisch (MELTON *et al.*, 1986).

Die Anfänge der beiden alternativen Exon 1'- und Exon 1''-mRNA-Isoformen wurden mit der Technik des 5'-RACE bestimmt (GRÖLZ *et al.*, 1997a; GRÖLZ *et al.*, 1997b; TRÖSTER *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu der klassischen Exon 1-mRNA variieren die Anfänge der beiden alternativen Exon 1'- und Exon 1''-mRNAs stark. So finden sich in humanem Lebergewebe überwiegend Transkripte mit einem 450-500 bp langen Exon 1' bzw. Exon 1''. Aus humanen peripheren Blut-Lymphozyten (PBLs) können Transkripte mit einem etwa 300 bp, 220 bp und 150 bp langen Exon 1' bzw. Exon 1'' isoliert werden.

1.5.3 Struktur und interne Translationsinitiation der mRNA-Isoformen

Die Struktur der 5'-UTR der klassischen Exon 1-mRNA entspricht nach den Kriterien von KOZAK (1991a, 1991b, 1986), der einer gut translatierbaren mRNA. Es finden sich keine zusätzlichen AUGs auf der 5'-Seite des Start-AUG im Exon 2. Auch sind keine GC-reichen Regionen oder Sekundärstrukturen enthalten. Das klassische Exon 1-Transkript besitzt eine 5'-UTR von etwa 100 bp und wird von einem Haushaltsgenpromotor reguliert (GRÖLZ, 1998).

Dagegen finden sich in der 5'-UTR der alternativen Exon 1'- bzw. Exon 1''-mRNA drei zusätzlichen Start-AUGs mit offenen Leserahmen (ORF-1 bis 3) auf der 5'-Seite des Start-AUG im Exon 2. Außerdem sind GC-reiche Regionen, ausgedehnte Sekundärstrukturen und eine Oligo(U)₂₃-Sequenz enthalten. Das alternative Exon 1' bzw. Exon 1'' besitzt Länge von ca. 500 bp. Solche in 5'-UTRs finden sich auch bei anderen Haushaltsgenen, (Proto-)Onkogenen, Wachstumsfaktorrezeptoren und Zytokinen (GRÖLZ und BACHMANN, 1997e). Die beiden alternativen Transkripte werden von einem alternativen Promotor transkribiert, der eine TATA-Box-ähnliche Sequenz aufweist.

Wendet man das *scanning*- und das *leaky scanning*-Modell von KOZAK (1991a, 1991b, 1986) auf die alternative Exon 1'- bzw. Exon 1''-mRNA an, so sollte die Initiation der Translation stark reduziert oder gänzlich unmöglich sein. GRÖLZ (1998) konnte aber zeigen, dass die alternative Exon 1'- bzw. Exon 1''-mRNA gut translatierbar war. Nach GRÖLZ (1998) erfolgt die Initiation der Translation durch den internen Eintritt des Ribosoms am Start-AUG im Exon 2. An den drei stromaufwärts gelegenen AUGs der alternativen Exon 1'- bzw. Exon 1''-mRNA findet keine Translationsinitiation statt (GRÖLZ *et al.*, 1998). Die Initiation der Translation erfolgt durch eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES). Wahrscheinlich befindet sich die IRES im Exon 2, wobei aber ein Einfluß der 3'-UTR nicht auszuschließen ist (PAUTZ, 1998). Die genaue

Lokalisation oder die Nukleotidsequenz einer IRES ist noch nicht geklärt. Andere mRNAs, deren 5'-UTRs ähnlich aufgebaut sind, wie z.B. die der *Polio*-Virus-mRNA, besitzen ebenfalls eine IRES (1.5.11). Überraschenderweise erfolgt auch die Translation der klassischen Exon 1-mRNA durch die interne Initiation der Translation (GRÖLZ, 1998; PAUTZ, 1998). Die von GRÖLZ (1998) und PAUTZ (1998) ermittelten Ergebnisse konnten größtenteils von CARTER und SARNOW (2000) bestätigt werden.

Infolge der internen Translationsinitiation liefern alle mRNAs La/SS-B-Protein. Da die Translation immer am Start-AUG im Exon 2 initialisiert wird, stimmen die Proteinsequenzen vollständig überein. Die Bedeutung der drei mRNA-Isoformen ist unklar, vermutet wird aber eine regulatorische Funktion (BACHMANN *et al.*, 1997). Die alternative Exon 1'- bzw. Exon 1''-mRNA werden, wie die klassische Exon 1-mRNA, in das Zytoplasma transportiert und gemeinsam hoch- und herunterreguliert. Das Verhältnis von klassischer Exon 1-mRNA und alternativer Exon 1'- bzw. Exon 1''-mRNA liegt zwischen 1:1 und 5:1. (BACHMANN *et al.*, 1997; HILKER *et al.*, 1996). Signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit Autoimmunerkrankungen und Gesunden sind nicht feststellbar.

1.5.4 Proteinstruktur

Das von MATTIOLI und REICHLIN (1974) erstmals beschriebene humane Phosphoprotein La/SS-B besteht aus 408 AS und besitzt ein theoretisches MW von 46,8 kDa (CHAN *et al.* 1989b). Im SDS-Gel wandert es auf einer Höhe von ca. 50 kDa (PRUIJN, 1994).

Das humane La/SS-B-Protein lässt sich in eine N-terminale Domäne (X-Domäne) mit einem MW von 29 kDa und in eine C-terminale Domäne (Y-Domäne) mit einem MW von 24 kDa einteilen (Abb. 3). Beide Domänen sind durch eine 130 AS umfassende, alphahelikale *linker*-Region verbunden (CHAMBERS *et al.*, 1988) (Abb. 3).

In der N-terminalen Domäne befindet sich ein hoch konserviertes RNP-Bindemotiv. Auf Grund seiner Länge von ca. 80 AS wird es als RNP-80- (Ribonucleoprotein-80-) Motiv oder als RRM (*RNA recognition motif*) bezeichnet (BURD und DREYFUSS, 1994) (Abb. 3). Es besteht aus zwei 6 bzw. 8 AS langen Konsensussequenzen, die mit RNP2 und RNP1 bezeichnet werden (CHAN *et al.*, 1989b; CHAMBERS *et al.*, 1988) (Abb. 3). Diese sind durch einen 30 AS langen Abschnitt voneinander getrennt (DREYFUSS *et al.*, 1988) (Abb. 3). Die Funktion des RNP-80-Motivs als RNA-Bindestelle konnte von MATHEWS und FRANCOEUR (1984) demonstriert werden. Zur RNA-Bindung werden aber noch weitere N-terminal gelegene AS benötigt (PRUIJN *et al.*, 1991; KENAN *et al.*, 1991) (Abb. 3).

In der C-terminalen Domäne, die nach der *linker*-Region mit dem Methionin 223 (M223) beginnt, liegen verschiedene Struktur motive. So finden sich zwei zur Interferon-induzierbaren Proteinkinase R (PKR) homologe Doppelstrang-RNA- (dsRNA) -Bindemotive (XIAO *et al.*, 1994; CLEMENS, 1993) und ein der DEAD- oder DEXH-Box-ähnliches Helikase-Motiv (HÜHN

et al., 1997; LINDER *et al.*, 1989) (Abb. 3). Des weiteren liegen in dieser Domäne ein putatives Dimerisierungssignal (CRAIG *et al.*, 1997) und eine ATP-Bindestelle (TRÖSTER *et al.*, 1995; TOPFER *et al.*, 1993) mit der Konsensussequenz G/AXXXGK (Abb. 3). Diese Sequenz wird auch als Walker-Motiv bezeichnet (WALKER *et al.*, 1982). Außerdem soll ein nicht näher beschriebenes Calmodulin-Bindemotiv existieren. Calmodulin verstärkt in Anwesenheit von Ca^{2+} die Bindeeigenschaften des La/SS-B-Proteins an DNA (CASTRO *et al.*, 1996).

Außerdem liegen in der C-terminalen Domäne ein putatives Kernlokalisierungssignal (NLS), ein mutmaßliches Kernretentionssignal (NRS) und ein putatives Kernexportsignal (NES) (Abb. 3). Das NLS ist für den Transport des neusynthetisierten, prozessierten Proteins durch die Kernporen in den Zellkern verantwortlich (SIMONS *et al.*, 1996; DINGWALL und LASKEY, 1991). Das NRS sorgt für die Rückhaltung des humanen La/SS-B-Proteins im Zellkern (SIMONS *et al.*, 1996). Vermittelt durch das NES kann das La/SS-B-Protein durch einen energieabhängigen Prozeß aus dem Zellkern in das Zytoplasma transport werden (SIMONS *et al.*, 1996). Nach BACHMANN *et al.* (1997) ist für den Export nicht nur das NES, sondern die gesamte C-terminale Domäne vorantwortlich.

Des weiteren finden sich in der C-terminalen Domäne zwei direkt aneinandergrenzende PEST-Motive (Abb. 3). Ein weiteres PEST-Motiv liegt in der *linker*-Region (Abb. 3). Ihren Namen erhalten PEST-Motive auf Grund des gehäuften Auftretens der AS Prolin, Glutaminsäure, Serin und Threonin. Allerdings kann auch in geringerem Maße Asparaginsäure vorkommen (CHAN *et al.*, 1989a; ROGERS *et al.*, 1986). PEST-Regionen sind besonders bei schnell degradierenden Proteinen zu finden. Diese drei PEST-Motive stellen den Grund für die Sensitivität des La/SS-B-Proteins gegenüber Proteasen dar (CHAN *et al.*, 1989b). Sie sind für die bei Gelelektrophoresen häufig auftauchenden Degradationsbanden mit MW von 43 kDa, 29 kDa und 24 kDa verantwortlich (CHAN *et al.*, 1989a; CHAN *et al.*, 1986).

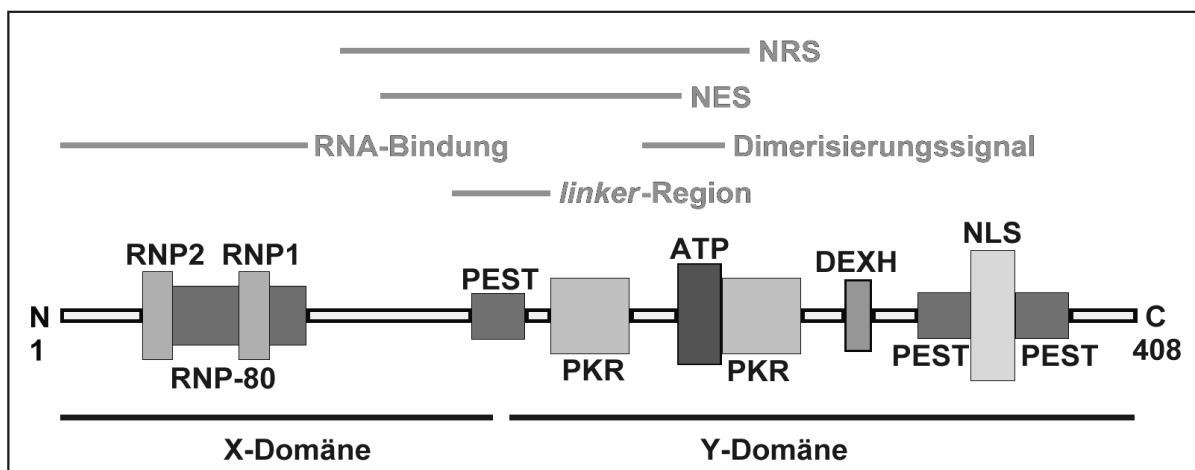


Abb. 3: Schema des humanen La/SS-B-Proteins (verändert nach SIMONS *et al.*, 1996)

ATP: ATP-Binder-Motiv

DEXH: DEXH-Box Helikase-Motiv

RNP-80: RNP-80-Motiv (RNP1 und RNP2)

PEST: proteasesensitiver Bereich

1: AS 1 (N-Terminus)

408: AS 408 (C-Terminus)

N: N-terminale X-Domäne

C: C-terminale Y-Domäne

NES: Kernexportsignal

NLS: Kernlokalisierungssignal

NRS: Kernretentionssignal

PKR: dsRNA-Bindemotiv der PKR

1.5.5 Die isoelektrischen Proteinformen

In der 2D-Gelelektrophorese lassen sich bis zu acht isoelektrische Proteinformen des humanen La/SS-B mit einem pI zwischen 6 und 7,5 detektieren. Dabei sollen diese überwiegend durch *in vivo*-Phosphorylierungen an den frei zugänglichen Serin-Resten zustande kommen (CHAMBERS *et al.*, 1988; FRANCOEUR, 1985; PIZER *et al.*, 1983). Threonin-Phosphorylierungen durch die Caseinkinase II sollen nach PFEIFLE *et al.* (1987) und PIZER *et al.* (1983) *in vitro*-Artefakte darstellen. Nach CHAN *et al.* (1986) sollen alle Phosphorylierungsstellen in der C-terminalen Proteindomäne enthalten sein.

BROEKHUIS *et al.* (2000) fanden mittels der hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese 14 isoelektrische, humane La/SS-B-Proteinformen mit einem pI zwischen 6 und 7,5. Nur vier davon lassen sich auf Phosphorylierungen zurückführen. Als Phosphorylierungsstellen kommen Thr-302, Ser-325, Thr-362 und Ser-366 in Frage. Eine (De)Phosphorylierung beeinflusst den Autoren zufolge die nukleäre Lokalisation des Proteins nicht. Die Bedeutung der isoelektrischen Proteinformen bleibt unklar.

1.5.6 Evolutionäre Konservierung

Mit humanen Patientenseren konnte das La/SS-B-Protein bisher in *S. cerevisiae* (LIN-MARQ und CLARKSON, 1995; YOO und WOLIN, 1994), *D. melanogaster* (YOO und WOLIN, 1994; BAI *et al.*, 1994), *A. albopictus* (PARDIGON und STRAUSS, 1996), *X. laevis* (SCHERLY *et al.*, 1993), *M. musculus* (TOPFER *et al.*, 1993), *R. norvegicus* (SEMSEI *et al.*, 1993), Rind (PRUIJN, 1994) und Mensch (TRÖSTER *et al.*, 1994; CHAN *et al.*, 1989a; CHAMBERS *et al.*, 1988) nachgewiesen werden (PRUIJN, 1994; ST. CLAIR *et al.*, 1991).

Der Vergleich des La/SS-B-Proteins aus Mensch und anderen Vertebraten ergibt, dass das Protein hoch konserviert ist. Die gefundenen Homologien zum Menschen reichen von 26% bei *D. melanogaster* (YOO und WOLIN, 1994), über 60% bei *X. laevis* (PRUIJN, 1994), bis zu 95% beim Rind (PRUIJN, 1994). *X. laevis* enthält zwei verschiedene La/SS-B-Proteine, LaA und LaB, die 91% Homologie zueinander aufweisen (SCHERLY *et al.*, 1993).

Das La/SS-B-Protein aus *S. cerevisiae*, bezeichnet als LHP1 (YOO und WOLIN, 1994) oder LAH1 (LIN-MARQ und CLARKSON, 1995), weist zu dem aus *D. melanogaster* noch 23% Identität auf, ist jedoch, verglichen mit dem humanen La/SS-B-Protein, am C-Terminus ca. 150 AS kürzer. Darüber hinaus zeigen das Protein YCL37c aus *S. cerevisiae* und das Protein 0570A aus der Reispflanze ausschließlich Homologien zur N-terminalen Region des humanen La/SS-B-Proteins (KOONIN *et al.*, 1994; YOO und WOLIN, 1994).

1.5.7 Antigene Epitope

Nach CHAN *et al.* (1986) existiert im humanen La/SS-B-Protein auf jeder Domäne ein antigenes Epitop. Diese Epitope sind unter den Säugetierspezies konserviert (CHAN *et al.*, 1986). Bei dem Epitop auf der N-terminalen Domäne handelt es sich um ein immundominantes Konformationsepitop (MCNEILAGE *et al.*, 1992). Des weiteren existieren noch mehrere speziesspezifische Epitope (SEMSEI *et al.*, 1993; WENG *et al.*, 1993).

Bei der Untersuchung von Patientenseren entdeckten MCNEILAGE *et al.* (1990), dass die Antikörperantwort zunächst gegen das immundominante N-terminale Epitop gerichtet war und später durch intramolekulares *epitope spreading* auf kryptische Epitope der C-terminalen Region überging (SERCARZ *et al.*, 1993; LEHMANN *et al.*, 1993). Intramolekulares *epitope spreading* wurde bereits bei anderen Autoimmunerkrankungen beschrieben (VANDERLUGT und MILLER, 1996; TISCH *et al.*, 1993; LOU und TUNG, 1993). HAAHEIM *et al.* (1996) kommen zu dem Schluß, dass die erkannten Epitope für jedes Patientenserum individuell und verschieden sind und dass es keine typischen Muster für das SS und den SLE gibt.

Einige Epitope des humanen La/SS-B-Proteins, gegen die am häufigsten Autoantikörper von SS-Patienten reagieren, ähneln nach HAAHEIM *et al.* (1996) Proteinsequenzen von *Herpes-*, *Hepatitis-B-* und *Polyoma-Viren*. KOHSAKA *et al.* (1990) beschrieben ein Epitop, das eine hohe Homologie zum *retro-viralen gag-Protein* besaß und gegen das alle von ihnen untersuchten anti-La/SS-B-positiven Patientenseren reaktiv waren.

CHANG *et al.* (1997) isolierten aus Patientenseren anti-La/SS-B-Antikörper, die mit murinem B1-Laminin kreuzreagierten. Solche kreuzreagierenden Antikörper könnten, wenn sie plazentagängig sind, eine wichtige Rolle bei der Entstehung des congenitalen Herzblocks (CHB) spielen (LI *et al.*, 1995; HORSFALL *et al.*, 1992), einer irreversiblen Herzschädigung bei Feten, deren Mütter an SLE oder pSS erkrankt sind.

1.5.8 Monoklonale Antikörper

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden monoklonale Antikörper (mAK) gegen das La/SS-B-Protein entwickelt (VELDHOVEN *et al.*, 1995; TRÖSTER *et al.*, 1995; BACHMANN *et al.*, 1990b; MAMULA *et al.*, 1989; CHAN und TAN, 1987; BACHMANN *et al.*, 1986a; SMITH *et al.*, 1985). Im Folgenden sind die am meisten verwendeten mAK aufgeführt.

Das Epitop des mAK 4B6 stellt die ATP-Bindestelle in der C-terminalen Domäne des La/SS-B-Proteins dar. ATP konkurriert im Immuno-Blot mit dem mAK 4B6 um die Bindestelle (TRÖSTER *et al.*, 1995). Da der mAK 4B6 sowohl mit humanen La/SS-B-Protein als auch schwach mit dem aus Maus (TRÖSTER *et al.*, 1995), Ratte, Affe und Hamster reagiert, ist vermutlich die dreidimensionale Struktur der ATP-Bindestelle konserviert (STURGESS *et al.*, 1988; RAUH *et al.*, 1988; CHAMBERS *et al.*, 1988; ST. CLAIR *et al.*, 1988). Da das Epitop im

Immuno-Blot denaturiert wird, ist die Detektion des La/SS-B-Proteins mit dem mAK 4B6 hier meist nicht möglich (SEMSEI *et al.*, 1993).

Der mAK SW5 erkennt ein Epitop im RNP-80-Motiv und reagiert mit La/SS-B-Protein aus Mensch, Affen und Rind, nicht aber mit dem aus Maus und Ratte (PRUIJN *et al.*, 1995).

Das Epitop des mAK 5B9 (DRATHEN, 1997) liegt in der N-terminalen Domäne (SCHÖRNER, 2000; unveröffentlicht; DRATHEN, 1997). Dabei muss ein konserviertes Epitop erkannt werden, da La/SS-B-Protein aus Mensch, Maus, Ratte, Affe, Hamster (DRATHEN, 1997), Kaninchen und Katze (SCHÖRNER, 2000; unveröffentlicht) detektiert wird.

1.5.9 Die *hot spot*-Region und das putative Neoepitop

Bei der Untersuchung einer cDNA-Bank aus PBLs einer autoimmunen pSS-Patientin wurde eine La/SS-B-cDNA mit einer Deletion eines Adenin-Nukleotids im Exon 7 gefunden (BACHMANN *et al.*, 1996a). Wahrscheinlich handelte es sich um eine Punktmutation, die von der Patientin im Laufe ihres Lebens erworben wurde. Unabhängig davon fand sich in einer cDNA-Bibliothek aus menschlichem Tumor-Lebergewebe eine La/SS-B-cDNA, die an derselben Stelle eine Insertion eines Adenin-Nukleotids enthielt. Die Mutationen lagen in einer Region, die als *hot spot*-Region charakterisiert werden konnte (GRÖLZ *et al.*, 1997c) und die die *linker*-Region zwischen dem La/SS-B-N- und La/SS-B-C-Terminus darstellte. Im humanen La/SS-B-Gen liegt in dieser *hot spot*-Region eine Kasette mit acht aufeinanderfolgenden Adeninen. Die Patienten-cDNA enthält hier sieben, die Leber-cDNA neun Adenine.

Bei der Insertionsmutation entsteht ein neues Stop-Codon gleich nach der Punktmutation, was zur Folge hat, dass die Translation abbricht. Hierbei fehlt die C-terminale Domäne und somit auch das NLS, so dass Transfektionsstudien erwartungsgemäß eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation des verkürzten La/SS-B-Proteins ergeben (BACHMANN *et al.*, 1997). Auch im Fall der Deletionsmutation wird nur ein N-terminales Fragment gebildet, dem das NLS fehlt. Jedoch weicht die AS-Sequenz unterhalb der Rasterschubmutation von der nativen Sequenz ab, da, bedingt durch die Mutation, 12 neue AS entstehen (BACHMANN *et al.*, 1996b). Dann unterbricht ein Stop-Codon die weitere Translation. Die durch die Mutationen gebildeten N-terminalen La/SS-B-Fragmente werden als La/SS-B-N(9A) (Insertionsmutation) und La/SS-B-N(7A) (Deletionsmutation) bezeichnet.

Die 7A-Mutation in dieser kritischen Region, von der durch *epitope mapping* gezeigt wurde, dass sie eines der Hauptautoepitope des humanen La/SS-B-Proteins beinhaltet, führte zur Bildung eines 12 AS langen Neoepitops, das im Protein normalerweise nicht vorkam (BACHMANN *et al.*, 1996b), wodurch die Immunantwort wahrscheinlich *getriggert* wurde. Dies deutet darauf hin, dass die Entstehung von ANAs zumindest teilweise durch einen Autoantigen-getriebenen Mechanismus erfolgt (BACHMANN *et al.*, 1996b).

Das Neoepitop ist reich an basischen AS. Es zeigt im Sequenzvergleich Homologie zu

einer Reihe anderer Autoantigenen, wie der Topoisomerase I (bekannt als Autoantigen SCL70), den RNA-Polymerasen, der reversen Transkriptase und einer Vielzahl von DNA-bindenden Proteinen. Außerdem zeigt es auch Homologie zu der nativen humanen und murinen La/SS-B-AS-Sequenz (BACHMANN *et al.*, 1996a). Damit könnte es sowohl für ein Selbst-*mimikry* als auch für das *epitope spreading* verantwortlich sein. Somit wäre die B-Zell-Autoimmunität die Folge einer fehlerhaften Proteinexpression eines Autoantigens.

1.5.10 Zelluläre Lokalisationen

Säugetierzellen enthalten ca. $1,5 \times 10^7$ La/SS-B-Protein-Moleküle (GOTTLIEB und STEITZ, 1989a; GOTTLIEB und STEITZ, 1989b). Die Lokalisation des La/SS-B-Proteins, ursprünglich als zytoplasmatisches Protein beschrieben (MATTIOLI und REICHLIN, 1974), wird heute weitestgehend als nukleär angesehen (BACHMANN *et al.*, 1986a).

Immunzytochemische Färbungen mit Patientenseren oder mAKs gegen das La/SS-B-Protein liefern homogene (NYMAN *et al.*, 1986) oder gesprenkelte (*speckled*) Kernfärbungen (BACHMANN *et al.*, 1990b; CHAN und TAN, 1987; BACHMANN *et al.*, 1986a). Auch nukleoläre Färbungen werden beobachtet (DENG *et al.*, 1981). GRAUS *et al.* (1985) fanden das La/SS-B-Protein in einigen Neuronen des ZNS ausschließlich im Nukleolus.

Die gesprenkelte, nukleäre Färbung beruht auf einer Anfärbung der Interchromatingranula (ICG), welche eine Speicherregion für inaktives, nukleäres Material darstellen (CARMO-FONSECA *et al.*, 1989). Das La/SS-B-Protein liegt in den ICGs mit U1-snRNPs kolokalisiert vor (BACHMANN *et al.*, 1989a). Neben dieser Lokalisation findet sich noch eine fein-granuläre Verteilung des La/SS-B-Proteins innerhalb des Zellkerns und eine Assoziation mit Perichromatin-Fibrillen (PCF) und -Granula (PCG). Diese Zellkernstrukturen gelten als Orte der Transkription und der anschließenden Prozessierung von RNA. Wird die RNA-Synthese, die hauptsächlich im Bereich der Nukleoli und der Perichromatingranula stattfindet, durch Actinomycin D gehemmt, so verschwindet dort die La/SS-B-spezifische Färbung (DENG und TAN, 1985). Die unterschiedlichen Kernfärbemuster spiegeln wahrscheinlich die verschiedenen Lokalisationen des La/SS-B-Proteins in Abhängigkeit seiner Aktivität wieder (BACHMANN *et al.*, 1990a; BACHMANN *et al.*, 1990b).

Nach Zellfraktionierungen fanden PEEK *et al.* (1994 und 1993) humanes La/SS-B-Protein hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert vor, was den immunzytochemischen Farbeergebnissen scheinbar widersprach. Eine Möglichkeit für eine Translokation des La/SS-B-Proteins in das Zytoplasma besteht über die transiente Bindung an den 3'-Oligo(U)-Teil von RNA-Pol III-Transkripten, wie z.B. die 4,5S-RNA und die hY-RNAs. Bei der zytoplasmatischen Lokalisation ist humanes La/SS-B-Protein mit dem endoplasmatischen Reticulum (ER) und dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) assoziiert (BACHMANN *et al.*, 1988).

Eine Umverteilung (*shuttling*) und eine Akkumulation (BACHMANN *et al.*, 1989b;

BACHMANN *et al.*, 1988; BACHMANN *et al.*, 1987) des La/SS-B-Proteins aus dem Zellkern in das Zytoplasma bis hin zur Translokation an die Zelloberfläche findet sich nach Einwirkungen von verschiedenen Stressfaktoren. Dazu zählen UV-Bestrahlung (BACHMANN *et al.*, 1990b), *Herpes*- und *Polio*-Virusinfektionen (MEEROVITCH *et al.*, 1993; BACHMANN *et al.*, 1992b; BACHMANN *et al.*, 1989c; BABOONIAN *et al.*, 1989), Behandlung mit Glykosylierungshemmstoffen (BACHMANN *et al.*, 1990b), Behandlung mit Östradiol (FURUKAWA *et al.*, 1988), Stimulierung hungernder Zellen mit 10%igem fetalem Kälberserum (BACHMANN *et al.*, 1991) und Behandlung mit Transkriptioninhibitoren (BACHMANN *et al.*, 1989a; BACHMANN *et al.*, 1987). Des Weiteren wird eine seltene zytoplasmatische Lokalisation des La/SS-B-Proteins in mitotischen Zellen beobachtet (BACHMANN *et al.*, 1992a). Nach Infektion mit *Herpes*-Viren (*Herpes simplex* Typ 1) kann neben einer zytoplasmatischen Lokalisation (BACHMANN *et al.*, 1998; BACHMANN *et al.*, 1991) sogar ein Transport des La/SS-B-Proteins auf die Zelloberfläche beobachtet werden, wo es mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und Clathrin kolokalisiert vorliegt (BACHMANN *et al.*, 1991; BACHMANN *et al.*, 1989a). Somit führen pathophysiologische Faktoren, die bei Patienten einen Krankheitsschub auslösen, zu einer Umverteilung des La/SS-B-Proteins, so dass den ANAs eine direkte pathogene Funktion zukommt. (PEEK *et al.*, 1994; VENABLES und BROOKES, 1992; BABOONIAN *et al.*, 1989).

1.5.11 Zelluläre Funktionen

Die Aufgaben, die das La/SS-B-Protein in der Zelle übernimmt, sind nicht vollständig geklärt. Die Funktion des Proteins wurde und wird äußerst kontrovers diskutiert. Das La/SS-B-Protein scheint in Abhängigkeit von seiner Lokalisation in einer Vielzahl von nukleären und zytoplasmatischen Prozessen involviert zu sein.

1.5.11.1 Das La/SS-B-Protein als Transkriptions-/Terminationsfaktor

GOTTLIEB und STEITZ (1989a, 1989b) beschrieben das humane La/SS-B-Protein als einen Transkriptions-/Terminationsfaktor der RNA-Pol III. MARAIA (1996) fand, dass humanes La/SS-B-Protein *in vitro* für eine effiziente Transkription und eine effiziente Reinitiation des Pol III-Transkriptionskomplexes benötigt wurde.

Über das RNP-80-Motiv bindet das La/SS-B-Protein an die 3'-Oligo(U)-Sequenz von neu synthetisierten RNA-Pol III-Transkripten (GOTTLIEB und STEITZ, 1989a; GOTTLIEB und STEITZ, 1989b). Die Bindungsstelle des humanen La/SS-B-Proteins sind drei oder mehr Uridin-Reste am 3'-Ende der RNAs (STEFANO, 1984; MATHEWS und FRANCOEUR, 1984). Diese Sequenz entspricht dem Transkriptions-/Terminationssignal von Pol III-Genen

(BOGENHAGEN und BROWN, 1981). Nachgewiesen werden konnte eine Bindung des La/SS-B-Proteins an die 5S-rRNA (RINKE und STEITZ, 1982), die 7S-L-RNA (CHAMBERS *et al.*, 1983), die Maus-4,5S-rRNA (HENDRICK *et al.*, 1981), die U6-RNA (PRUIJN, 1994), die hY-RNAs (HENDRICK *et al.*, 1981) und an alle prä-tRNAs. Die Assoziation mit den Pol III-Transkripten ist nur vorübergehend und kann nach dem Prozessieren der Transkripte, mit Ausnahme der hY-RNAs, nicht mehr detektiert werden (RINKE und STEITZ, 1982). Des Weiteren lässt sich das La/SS-B-Protein in Assoziation mit der von der RNA-Pol II transkribierten U1-snRNA detektieren (BACHMANN *et al.*, 1986b; MADORE *et al.*, 1984). Humanes La/SS-B-Protein bindet auch an das 3'-Ende der *small cytoplasmic non-mRNAs* BC1 (von Nagern) und BC200 (von Primaten) (KREMERSKOTHEN *et al.*, 1998). Vermutet wird, dass das La/SS-B-Protein in Assoziation mit BC1 und BC200 an der Kontrolle der Translation beteiligt ist. Die Bedeutung dieser RNP-Komplexbildung ist ungeklärt.

Auch kleine RNAs, wie die VAI- und VAII-RNA des *Adeno-Virus* (LERNER *et al.*, 1981a; ROSA *et al.*, 1981) oder die EBER1- und EBER2-RNAs des *Epstein-Barr-Virus* (PEEK *et al.*, 1994; FOX *et al.*, 1992; LERNER *et al.*, 1981b) sind mit humanem La/SS-B-Protein assoziiert. Auch kann eine Bindung an die mRNA des *Influenza-Virus* (PARK und KATZE, 1995) und des *Hepatitis-C-Virus* (ALI und SIDDIQUI, 1997) nachgewiesen werden. Das La/SS-B-Protein bindet auch an die *leader-RNAs* des *vesiculären Stomatitis-Virus* (VAN VENROOIJ *et al.*, 1993), des HIV (CHANG *et al.*, 1995), des *Polio-Virus* (MEEROVITCH *et al.*, 1993; MEEROVITCH *et al.*, 1989) und des Tollwut-Virus (KURILLA *et al.*, 1984), die keine 3'-Oligo(U)-Sequenz besitzen.

Nach FAN *et al.* (1997) sorgt humanes La/SS-B-Protein nur dann effizient für die Termination der Transkription, wenn Ser-366 unphosphoryliert ist. Die Phosphorylierung von Ser-366 durch die Caseinkinase II inhibiert die Funktion des La/SS-B-Proteins als Terminationsfaktor. Laut PFEIFLE *et al.* (1987) nimmt die Affinität des La/SS-B-Proteins zu RNAs ab, je stärker das Protein phosphoryliert ist. Dabei könnte es sich um eine Feinregulation der RNA-Bindung handeln (BACHMANN *et al.*, 1986c). Dem System vergleichbar wäre der Faktor rho in *E. coli* (BRENNAN *et al.*, 1987).

1.5.11.2 Das La/SS-B-Protein als Faktor der internen Translationsinitiation

Virale mRNAs sind oft sekundärstrukturreich, haben teilweise keine m⁷Gppp-Kappe und besitzen auf Grund ineinanderliegender Leserahmen mehrere Start-AUGs. Zur Virus-Replikation muss jeder Leserahmen zur Proteinsynthese genutzt werden. Nach dem *scanning-Modell* (KOZAK, 1978) ist eine Translation aber nur schwer vorstellbar. Wahrscheinlich besitzen solche mRNAs eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) und werden durch die m⁷Gppp-Kappe-unabhängige interne Translationsinitiation translatiert (BELSHAM, 1995; PELLETIER und SONENBERG, 1988). Zytoplasmatisch lokalisiertes

La/SS-B-Protein spielt, neben den herkömmlichen Initiationsfaktoren der Translation, hierbei eine wichtige Rolle (MEEROVITCH *et al.*, 1993). Vermutlich sorgt es als *landing pat protein* für die Bindung des Ribosoms an ein Start-AUG.

Humanes La/SS-B-Protein ist mit einer Reihe viraler RNAs assoziiert, die eine IRES besitzen, so z.B. die EBER1- und EBER2-RNAs des *Epstein-Barr-Virus* (LERNER *et al.*, 1981b), die VAI- und VAII-RNAs des *Adeno-Virus* (ROSA *et al.*, 1981), die *leader*-RNA des HIV (CHANG *et al.*, 1995), die mRNAs des *Hepatitis-C-Virus* (ALI *et al.*, 2000; ALI und SIDDIQUI, 1997) und die RNAs des *Polio-Virus* (MEEROVITCH *et al.*, 1993; MEEROVITCH *et al.*, 1989). Nach SHIROKI *et al.* (1999) spaltet die *Polio-Virus*-spezifische Protease 3C das C-terminal gelegene NLS des humanen La/SS-B-Proteins ab, was zu einer zytoplasmatischen Lokalisation des verkürzten La/SS-B-Proteins führt. Dieses kann dadurch für die interne Initiation der *Polio*-mRNA sorgen. Bei Abwesenheit des La/SS-B-Proteins werden vermehrt aberrante *Polio-Virus*-Proteine synthetisiert (MEEROVITCH *et al.*, 1993).

Auch eukaryontische RNAs besitzen eine IRES, so z.B. die drei RNAs des an die schwere Kette der Immunglobuline bindenden Proteins (BiP) (MACEJAK und SARNOW, 1991), die RNA des Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (FGF-2) (VAGNER *et al.*, 1995), die RNA des Initiations-Faktor eIF4G (GAN und RHOADS, 1996) und die RNAs der homeotischen Gene *Antennapedia* (OH *et al.*, 1992) und *Ultrabithorax* (YE *et al.*, 1997). Selbst die Translation des humanen La/SS-B-Proteins wird intern initiiert (GRÖLZ, 1998) (1.5.3). Damit könnte humanes La/SS-B-Protein für seine eigene interne Initiation der Translations verantwortlich sein.

Humanes La/SS-B-Protein wird nach Apoptoseinduktion durch eine PP2A-ähnliche Phosphatase dephosphoryliert und durch Caspasen proteolytisch in ein Protein mit einem MW von 45 kDa gespalten (RUTJES *et al.*, 1999). HOLCIK und KORNELUK (2000) fanden, dass humanes La/SS-B-Protein ein Bestandteil eines zytoplasmatischen RNA-Proteinkomplexes darstellte, der zur internen Translationsinitiation der mRNA des *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP) notwendig war, eines der Schlüsselproteine bei der Regulation der Apoptose.

1.5.11.3 Das La/SS-B-Protein als Stabilisator von Histon-Proteinen

Mit Beginn der S-Phase des Zellzyklus steigt die Halbwertszeit von Histon-mRNA (MCLAREN *et al.*, 1997). Dies führt zu einer Zunahme an Histon-Proteinen und beschleunigt gegen Ende der S-Phase den Zerfall von Histon-mRNA (KNIPPERS, 1997). MCLAREN *et al.* (1997) reinigten einen Stabilisator der Histon-mRNA und charakterisierten das gereinigte Protein als La/SS-B. In ihrem *in vitro*-Modell konnte die Zugabe von gereinigtem, humanem La/SS-B-Protein die Histon-mRNA stabilisieren.

1.5.11.4 Das La/SS-B-Protein als DNA-RNA-Helikase

Humanes La/SS-B-Protein kann unter ATP-Verbrauch dsRNA mit 3'-Überhang oder DNA-RNA-Hybride aufschmelzen (HÜHN *et al.*, 1997; XIAO *et al.*, 1994; BACHMANN *et al.*, 1990a; BACHMANN *et al.*, 1990c). Dies stimmt mit der Funktion des La/SS-B-Proteins als Transkriptions-/Terminationsfaktor von Pol III-Transkripten überein (GOTTLIEB und STEITZ, 1989a und 1989b). Die DNA-RNA-Helikase-Aktivität würde das Lösen von Pol III-Transkripten von der DNA-Matrize erleichtern, die dsRNA-Helikase-Aktivität könnte z.B. bei der internen Initiation von *Polio*-Virus-mRNA, deren 5'-UTR Sekundärstrukturen besitzt, dienlich sein.

1.5.11.5 Das La/SS-B-Protein als RNA-chaperone

Das La/SS-B-Protein LHP1 von *S. cerevisiae* ist nach YOO und WOLIN (1997) an der Stabilisierung der Konformation und der endonukleolytischen Reifung der prä-tRNAs beteiligt, indem es, gebunden an das 3'-Ende der prä-tRNAs, als RNA-chaperone fungiert. Dadurch beeinflusst das La/SS-B-Protein die Reifung, den Transport oder die Bildung von RNPs.

1.5.11.6 Das La/SS-B-Protein als Gegenspieler der Proteinkinase R (PKR)

In vitro wurde gezeigt, dass humanes La/SS-B-Protein die inhibitorische Wirkung der Interferon-abhängigen Proteinkinase R (PKR) auf die Proteinbiosynthese während des antiviralen Zustands einer Zelle bei Anwesenheit geringer Mengen an dsRNA durch Konkurrenz aufhebt (JAMES *et al.*, 1999). Die Funktion der PKR besteht darin, die zelluläre Translation bei Virusinfektionen zu inhibieren. Beim Auftreten größerer dsRNA-Mengen wird die PKR aktiviert und sorgt für die Inhibition der Translation. Die Autoren vermuten, dass die Fähigkeit des La/SS-B-Proteins die PKR zu hemmen und damit die Proteinbiosynthese aufrecht zu erhalten auf die Bindefähigkeit des La/SS-B-Proteins gegenüber dsRNA zurückzuführen ist.

1.5.11.7 Das La/SS-B-Protein als essentieller Faktor in der Embryonalentwicklung

BAI und TOLIAS (2000) konnten erstmals *in vivo* La/SS-B entwicklungs-genetisch bei *D. melanogaster* charakterisieren. Die Autoren konnten zeigen, dass Transkripte von La/SS-B sehr früh im gesamten Embryo exprimiert wurden. In späteren embryonalen Entwicklungsstadien finden sich diese vor allem im viszeralen Mesoderm, im Darm, in den Gonaden und in Drüsengewebe. Homozygote, La/SS-B-defiziente Larven sind auf Grund

schwerer Defekte im Mitteldarm letal. Die Defekte korrelieren mit dem Verlust von *Ultrabithorax* (*Ubx*). Wahrscheinlich spielt das La/SS-B-Protein nicht nur bei der Entwicklung von *D. melanogaster* sondern auch bei der von höheren Organismen eine wichtige Rolle.

1.6 Das murine Autoantigen La/SS-B

Im Vergleich zum humanen ist über das murine La/SS-B relativ wenig bekannt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das humane La/SS-B auf Grund seiner Rolle bei Autoimmunerkrankungen des Menschen verstärkt untersucht wird. Allerdings lassen sich viele Ergebnisse des humanen La/SS-B auf das murine übertragen.

Das murine La/SS-B-Phosphoprotein besteht aus 415 AS und besitzt ein MW von 47,7 kDa. Im Polyacrylamidgel wandert es auf einer Laufhöhe von etwa 45 kDa. Das murine La/SS-B-Protein ist zu 76,7% mit dem humanen identisch. Die C-terminale Domäne besitzt mit der humanen nur noch ungefähr 65% Übereinstimmung. Rek. murines La/SS-B-Protein bindet an Poly(U)-Agarose, was die Funktion des La/SS-B-Proteins als Transkriptions-/Terminationsfaktor von RNA-Pol III-Transkripten bestätigt (TOPFER *et al.*, 1993).

Das La/SS-B codierende Gen der Maus befindet sich als *single copy*-Gen auf dem Chromosom 2. Hinweise auf Pseudogene finden sich nicht. Bei der Untersuchung von verschiedenen Mausstämmen konnten TOPFER *et al.*, (1993) keine Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) ermitteln.

Insgesamt existieren drei murine La/SS-B-mRNAs, die sich nur in ihrer 5'-UTR, nicht aber im codierenden Bereich, unterscheiden. Das Start-AUG befindet sich wahrscheinlich im Exon 2. Vermutlich werden die 5'-UTRs von drei verschiedenen Exon 1 gebildet. Da für die murinen La/SS-B-mRNAs noch keine Nomenklatur eingeführt wurde, wurden die mRNAs im Folgenden willkürlich mit Exon 1a-, Exon 1b- und Exon 1c-mRNA-Isoform bezeichnet.

Das Exon 1b (TOPFER *et al.*, 1993; *GenBank accession No.* L00993) ist im Vergleich zum Exon 1a (GRÖLZ und BACHMANN, 1997d; unveröffentlicht; *GenBank accession No.* Y07951) an seinem 3'-Ende um 27 Nukleotide verlängert, sonst aber zum Exon 1a identisch. Wahrscheinlich stellen die Exon 1a- und Exon 1b-mRNA-Isoformen verschiedene *splice*-Varianten eines gemeinsamen Vorläufertranskripts dar. Dies würde der humanen La/SS-B-Exon 1'- bzw. La/SS-B-Exon 1''-mRNA entsprechen.

Das Exon 1c (TOPFER *et al.*, 1993; MARRA *et al.*, 1996; unveröffentlicht; *GenBank accession No.* AA798418) besitzt keinerlei Ähnlichkeit mit dem Exon 1a bzw. Exon 1b. Die von MARRA *et al.* (1996; unveröffentlicht; *GenBank accession No.* AA798418) gefundene Exon 1c-Sequenz unterschied sich von der Sequenz, die von TOPFER *et al.* (1993) gefunden wurde, nur darin, dass diese an ihrem 5'-Ende um 146 bp verlängert war. Wahrscheinlich beginnt die Transkription der mRNA-Isoformen an verschiedenen Transkriptionsstartpunkten, wie es für permanent exprimierte Haushaltsgene typisch ist.

2 AUFGABENSTELLUNG

Um ein murines Tiermodell entwickeln zu können, bei dem eine pathophysiologisch veränderte Expression von La/SS-B untersucht werden kann, ist es zuerst notwendig, die physiologische Situation des murinen La/SS-B zu verstehen. Hierbei sollen sich die Untersuchungen von der genomischen Ebene, über die Regulation der Transkription und Translation bis hin zum funktionellen Protein erstrecken. Die Untersuchungen müssen dabei alle bekannten murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen einschließen. Insgesamt steht immer der Vergleich mit dem humanen La/SS-B im Vordergrund.

Im Zusammenhang mit der genomischen Situation und der Expression der murinen mRNA-Isoformen stellen sich folgende Fragen:

- Wie ist das Strukturgen organisiert und welche Rückschlüsse lassen sich dadurch auf die Expression ziehen?
- Wird die Transkription der mRNA-Isoformen unabhängig von verschiedenen Promotoren reguliert? Wie viele Promotoren existieren, wo sind sie lokalisiert und welche mRNA-Isoformen werden von ihnen transkribiert?
- Nach KOZAK (1991b) könnten mRNAs mit verschiedenen 5'-UTRs *precursor*-mRNAs darstellen, welche posttranskriptional erst zu funktionellen mRNAs weiter zurecht geschnitten werden müssen. Handelt es sich bei den mRNA-Isoformen um *precursor*-mRNAs?
- Werden alle mRNA-Isoformen für die Synthese von funktionellem La/SS-B-Protein genutzt oder handelt es um eine Art regulatorische und, zumindest auf der Ebene der Translation, nicht-funktionelle mRNAs? Sind alle mRNA-Isoformen gut translatierbar oder gibt es Unterschiede in der Translationseffizienz?
- Lassen sich die alternativen 5'-UTRs der humanen und murinen mRNA-Isoformen miteinander vergleichen? Können Gemeinsamkeiten festgestellt werden?
- Existieren weitere alternative 5'-mRNA-Transkripte oder alternative *splice*-Transkripte?
- Werden zur Polyadenylierung klassische oder alternative Polyadenylierungssequenzen genutzt? Welche Größen besitzen die polyadenylierten mRNAs?
- Gibt es gewebeabhängige oder zellspezifische Unterschiede in der Expression der mRNA-Isoformen?
- Werden die mRNA-Isoformen nach dem *scanning*-Modell von KOZAK translatiert oder kann die Initiation der Translation durch den internen Eintritt des Ribosoms infolge einer internen Ribosomeneintrittsstelle (IRES) erfolgen?
- Kommt es zu einer Translokation des La/SS-B-Proteins vom Kern in das Zytoplasma, wenn es von einer bestimmten mRNA-Isoform in einem geeigneten Zellsystem überexprimiert wird?

Auf Proteinebene stellen sich konkret folgende Fragen:

- Wie viel Homologie zeigt das murine La/SS-B-Protein zum humanen. Welche Abweichungen in der AS-Sequenz lassen sich feststellen. Was resultiert daraus für die funktionellen Domänen?
- Lassen sich für das murine La/SS-B verschiedene isoelektrische Proteinformen nachweisen? Besitzt das murine La/SS-B-Protein eine hohe Ladungsheterogenität, ebenso wie das humane?

Unter pathophysiologischen Bedingungen ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Hat das Molekül Stickstoffmonoxid (NO) Einfluß auf das murine Autoantigen La/SS-B und könnte es dadurch zur Ausbildung von Autoimmunität kommen? Speziell soll das Augenmerk auf eine Veränderung der Proteinexpression und der Proteinlokalisierung liegen.
- Kann das Neoepitop, das bei der autoimmunen pSS-Patientin auf Grund einer Rasterschubmutation im codierenden Leserahmen des humanen La/SS-B-Gens entsteht, bei Immunisierung von Balb/c-Mäusen zur Erzeugung von anti-Neoepitop-AK führen? Können sich nach der Theorie des intramolekularen *epitope spreading* des weiteren Autoantikörper gegen das native La/SS-B-Protein nachweisen lassen? Kann die B-Zell-Autoimmunität und die Entstehung von ANAs somit auf einen Autoantigen-getriebenen Mechanismus infolge einer fehlerhaften Proteinexpression zurückgeführt werden?
- Wenn sich Autoantikörper induzieren lassen, sind diese dann für eine zellschädigende Vorläuferreaktion verantwortlich, durch die die nukleären Autoantigene dem Immunsystem zugänglich gemacht werden?

3 MATERIALIEN

3.1 Chemikalien und ihre Abkürzungen

Alle Salze, Säuren, Basen und Lösungsmittel (auch hier nicht explizit aufgeführte Substanzen) besaßen p.a. Qualität oder wurden in ihrer konzentriertesten oder reinsten Form bezogen.

Substanz	Vertreiber/Hersteller
2-Butanol	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
3-[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS)	Sigma Chemical Co., Deisenhofen
4-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma Chemical Co., Deisenhofen
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid (X-Gal)	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP, X-Phosphat)	Sigma Chemical Co., Deisenhofen
Aceton	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Acrylamidlösung	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Agar-Bacteriological	Gibco/ BRL GmbH, Eggenstein
Agarose und Low Melting Agarose (LMP-Agarose)	Biozym, Hameln
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA
Ampicillin (D[-]-Aminobenzylpenicillin-Na-Salz)	Sigma Chemical Co., Deisenhofen
Blockierungsreagenz	Roche, Mannheim
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Bromphenolblau (Na-Salz)	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Chloroform	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Coomassie-Brillant-Blau G250	Sigma Chemical Co., Deisenhofen
CSPD (Dinatrium 3-(4-methoxy-spiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo[3.3.1.1. ^{3,7}]decan}-4-yl) phenylphosphat)	Tropix, Bedford, Massachusetts, USA
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma Chemical Co., Deisenhofen
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Chemical Co., Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Chemical Co., Deisenhofen
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM-Medium)	Gibco/ BRL GmbH, Eggenstein
Entwickler für Röntgenfilme, Kodak LX 24	Kodak AG, Stuttgart
Essigsäure	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma Chemical Co., Deisenhofen
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)	Sigma Chemical Co., Deisenhofen
Ethylenglycol-bis-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma Chemical Co., Deisenhofen
Fixierer für Röntgenfilme, Kodak AL4	Kodak AG, Stuttgart
Fetales Kälberserum (FKS)	Roche, Mannheim

Formaldehyd (deionisiert)	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Formamid (deionisiert)	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Freundsches Adjuvans, komplett (cFa) oder inkomplett (iFa)	Difco, Michigan, USA
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Guanidinthiocyanat (GTC)	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Harnstoff	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Hefeextrakt	Gibco/ BRL GmbH, Eggenstein
Imidazol	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Ionenaustauscherharz (Amberlite MB-6)	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Isopropanol	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Kanamycin	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Lauroylsarcosin (Na-Salz)	Sigma Chemical Co., Deisenhofen
Lithiumchlorid	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Maleinsäure	Sigma Chemical Co., Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Natriumacetat (NaOAc)	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Natronlauge	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat (<i>Sodiumdodecylsulfate</i> = SDS)	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Nukleotide: dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) NTPs (ATP, CTP, GTP und Dig-UTP)	Roche, Mannheim Amersham, Braunschweig Roche, Mannheim
o-Phenylendiamin (OPD)	Sigma Chemical Co., Deisenhofen
Optimem-Glutamax-Medium	Gibco/ BRL GmbH, Eggenstein
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Penicillin	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Peptone 140	Gibco/ BRL GmbH, Eggenstein
Phenol	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Phosphate Buffer Saline (PBS) (nach Dulbecco)	Biochrom KG, Berlin
Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure) (PIPES)	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Protein-A-Sepharose	Sigma Chemical Co., Deisenhofen
Saccharose	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Salzsäure	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Sepharose CL-6B mit Nitrilo-Essigsäure-Derivat (Ni-NTA)	QIAGEN Inc., Hilden
Sequagel complete	Biozym, Hessisch Oldendorf
Sequagel XR	Biozym, Hessisch Oldendorf

S-Nitroso-L-Glutathion (GSNO)	Alexis Biochemicals, Grünberg
Streptomycin	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Tetracyclin	Roche, Mannheim
Toluidinblau	Sigma Chemical Co., Deisenhofen
Tris-Hydroxyethylaminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung (10x)	Biochrom KG, Berlin
Tween 20®	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe

3.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Vertreiber/Hersteller
Aerosol Resistant Tips	Biozym, Hameln
Chromatographiepapier, Whatman 3MM	Whatman, Maidstone, England
Deckgläschen, Ø 12 mm	Menzel Gläser, Braunschweig
Dialyseschlauch, Porengröße 30000 MG	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Filme (Kleinbild) Kodak Ectachrome 400	Kodak Limited, England
Filterpapier Munczell	Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden
Nylonmembran, positiv geladen	Roche, Mannheim
Objekträger (76x26 mm)	Menzel Gläser, Braunschweig
PCR-Reaktiongefäße (0,2 ml) und 8 Caps-Strip	Biozym, Hameln
Petrischalen (verschiedene Größen)	Greiner GmbH, Solingen
Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF)	Millipore GmbH, Eschborn
Röntgenfilme	Fuji Photo Film Co., LTD, Japan
Sterilfilter (2 Mikrometer)	Schleicher & Schüll GmbH, Dassel
Streifen mit immobilisierten pH-Gradient (IPG)	Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA
Zellkulturflaschen mit und ohne Filter	Nunc® GmbH, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten (6-, 12- und 24-Well)	Nunc® GmbH, Roskilde, Dänemark
Zellschaber	Nunc® GmbH, Roskilde, Dänemark

3.3 Geräte und Hilfsmittel

Gerät/Hilfsmittel	Hersteller/Vertreiber
Brutschrank Queue StabilTerm CO ₂ -Inkubator	Nunc® GmbH, Roskilde, Dänemark
Elektrophoresekammern:	
Bio-Rad (vertikal)	Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA
Elektrophoresekammern (horizontal)	Eigenbau der Institutswerkstatt
Protean II-Kammer (horizontal)	Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA
Flowbench UVF 6.18S	BDK Luft-und Reinraumtechnik, S.-Genkingen

Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Heizmagnetrührer MR 3001 Heidolf	NeoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Mikroskope: inverses Mikroskop Epifluoreszenz-/Lichtmikroskop IM35	Zeiss, Oberkochen Zeiss, Oberkochen
pH-Meter, Modell 3500 digital	Beckmann Instruments GmbH, München
Photometer: Einstrahlspektrophotometer DU-64 Durchflußspektrophotometer	Beckmann, Fullerton, USA Gynkotec, Germering
Röntgenfilmkassette	Amersham Buchler GmbH, Braunschweig
Saugpumpe Laboport	NeoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Schreiber LKB 6520	LKB, Bromma, Schweden
Schüttelinkubator Certomat H	B.Braun, Diessel Biotech GmbH, Melsungen
Semi-dry-Blotter 2117 Multiphor II	Pharmacia LKB, Freiburg
Sequenzierautomat LI-COR 4000 S	MWG-Biotech, Ebersberg
Spannungsgeräte: Modelle 3000Xi und 200/2.0 Multi Drive XL IEF-Cell™ für isoelektrischen Fokussierung	Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA
Sterilisator Heraeus Function Line	Heraeus Sepatech GmbH, Hanau
Thermocycler: Gene Amp PCR System 9600 Primus 96 Plus	Perkin Elmer, Norwalk, USA MWG-Biotech, Ebersberg
Transilluminator	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
UV-Crosslinker Stratalinker 1800	Stratagene, Heidelberg
Video-Dokumentationssystem UVP Image Store	Ultra Violet Products, Cambridge, GB
Wippschüttler WS 5	E. Bühler, Tübingen
Zentrifugen: Zentrifuge C5415 (Tischzentrifuge) Labofuge Ae Biofuge fresco Capsul HF-120 Sorvall RC-2B , -5B, -RMC-14 Eppendorf Centrifuge 5804R	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg Heraeus Sepatech GmbH, Hanau B. Hermle KG, Gosheim Tomy Seiko Co. LTD, Tokyo, Japan Dupont Instruments, Bad Homburg NeoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg

3.4 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Beim Einsatz von Enzymen wurde immer der dem Enzym beigefügte Puffer oder, falls möglich, der Puffer Y⁺/Tango™ verwendet. Folgende Enzyme wurden eingesetzt: *EcoR I* (aus *Escherichia coli*), *Nhe I* (aus *Neisseria mucosa heidelbergensis*), *Not I* (aus *Nocardia otitidiscavarium*) und *Xho I* (aus *Xanthomonas holcicola*).

3.5 Kits und deren Zusammensetzung

Die genaue Zusammensetzung von in Kits enthaltenen Puffern und Lösungen ist dem Protokoll des jeweiligen Herstellers zu entnehmen.

<p>5'-RACE System (Gibco/ BRL GmbH, Eggenstein): RNase H (2 U/μl) (aus <i>E. coli</i>); SuperScript II RT (200 U/μl) (aus <i>E. coli</i>); 0,1 M DTT; 25 mM MgCl₂; 10 mM dNTP-Mix; 10x PCR-Puffer für RT; DEPC-H₂O; 5x Tailing-Puffer; 2 mM dCTP; terminale Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT) (10U/μl); AAP-Primer; AUAP-Primer; GlassMax-Spin-Säulen; Binde-Lösung (6 M NaJ); 40x Waschpufferkonzentrat</p>
<p>BM Chemiluminescence Blotting Kit (Biotin/Streptavidin) (Roche, Mannheim): Lumineszenzsubstratlösungen A; Startlösung B mit Wasserstoffperoxid; Blockingreagenz; Streptavidin-POD; genaue Zusammensetzungen nur dem Hersteller bekannt</p>
<p>Dig Oligonucleotide Tailung Kit (Roche, Mannheim): 5x Reaktionspuffer; 25 mM CoCl₂-Lösung; 1 mM Dig-dUTP-Lösung; 10 mM dATP-Lösung; terminale Transferase (50 U/μl); 2% [w/v] Glycogen-Lösung; 1% [w/v] Poly(A)-Lösung</p>
<p>ECL-Blotting-Reagenz (Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig): Lumineszenzsubstratlösungen A; Startlösung B mit Wasserstoffperoxid; Blockingreagenz; genaue Zusammensetzungen nur dem Hersteller bekannt</p>
<p>GenomeWalker Kit (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, USA): 5 x 20 μl GenomeWalker Libraries (à 100 μg) (MDL-1: <i>EcoR</i> V; MDL-2: <i>Sca</i> I; MDL-3: <i>Dra</i> I; MDL-4: <i>Pvu</i> II; MDL-5: <i>Ssp</i> I); Adapter-Primer (AP1); <i>nested</i> Adapter Primer (AP2); 10x Tth PCR-Reaktionspuffer; 25 mM Mg(OAc)₂</p>
<p>Ligations Kit (Roche, Mannheim): T4-DNA-Ligase (1 U/μl) (aus T4-Phage); 10x Ligationspuffer</p>
<p>Linked <i>in vitro</i> SP6/T7-Transcription/Translation Kit-nonradioactive (Roche, Mannheim): T7-RNA-Polymerase (1 U/μl) (aus T7-Phage); 4x T7-Transkriptionspuffer; Translations-Mix; 25 mM MgOAc-Lösung; 25 mM EDTA-Lösung; SDS-Probenpuffer</p>
<p>QIAEX Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., Hilden): QIAEX II-Suspension; QX1; PE</p>
<p>QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN Inc., Hilden): QIAGEN-tip-100-Säulen; RNase A (2 U/μl) (aus Rinderpankreas); P1; P2; P3; QBT; QC; QF</p>
<p>QIAprep-spin Plasmid Mini Kit (QIAGEN Inc., Hilden): QIAprep-Spin-Säulen; Collection Tubes; RNase A (2 U/μl) (aus Rinderpankreas); P1; P2; N3; PE</p>
<p>QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Inc., Hilden): QIAquick Spin Säulen; Collection Tubes; PB; PE</p>
<p>PCR Dig Probe Synthesis Kit (Roche, Mannheim): Enzym-Mix Expand™ High Fidelity (3,5U/μl); 10x PCR Dig Probe Synthesis Mix; 10x PCR-Puffer für Dig-PCR; 10x dNTP-Stammlösung für Dig-PCR (jeweils 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)</p>

<p>SuperScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Gibco/ BRL GmbH, Eggenstein): RNase H (2 U/μl) (aus <i>E. coli</i>); SuperScript II RT (200 U/μl) (aus <i>E. coli</i>); 0,1 M DTT; 25 mM MgCl₂; 10 mM dNTP-Mix; 10x PCR-Puffer für RT; Oligo(dT)-Primer; DEPC-H₂O</p>
<p>Taq-Polymerase PCR Kit (Roche, Mannheim): Taq-DNA-Polymerase (1 U/μl) (aus <i>Thermus aquaticus</i>); 10x PCR-Puffer</p>
<p>Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit mit 7-deaza-dGTP (Amersham, Braunschweig): Terminationsmix A, C, G und T (Tris/HCl; pH 9,5; Magnesiumchlorid; Tween 20; Nonidet P-40; 2-Mercaptoethanol; thermostabile Pyrophosphatase; Thermo Sequenase; dATP; dCTP; 7-deaza-dGTP; dTTP; ddCTP; ddGTP; ddTTP)</p>
<p>Transfektions-Kit LipofectAMINE PLUS™ Reagent (Gibco/ BRL GmbH, Eggenstein): Lipofectamin; Plus-Reagenz; genaue Zusammensetzung ist nur dem Hersteller bekannt</p>

3.6 Puffer, Lösungen und Stammlösungen

Die Zusammensetzung von hier nicht aufgeführten Puffern finden sich in Klammern gesetzt im Methodenteil an der jeweiligen Stelle oder können dem Protokoll des Herstellers entnommen werden.

Name	Zusammensetzung
Ampicillin	4% [w/v] in <i>aqua dest.</i> ; sterilfiltriert; Lagerung bei -20°C
APS	10% [w/v] in <i>aqua dest.</i> ; Lagerung bei 4°C
IPTG	500 mM in <i>aqua dest.</i> ; sterilfiltriert; Lagerung bei -20°C
Kanamycin	5% [w/v] in <i>aqua dest.</i> ; sterilfiltriert; Lagerung bei -20°C
NBT	7,7% [w/v] in 70% [v/v] DMF; Lagerung lichtgeschützt bei -20°C
PMSF	100 mM in Ethanol p.a.; Lagerung bei -20°C
Tetracyclin	0,5% [w/v] in 70% Ethanol; sterilfiltriert; Lagerung bei -20°C
X-Gal	10% [w/v] in DMF; sterilfiltriert; Lagerung bei -20°C
X-Phosphat (BCIP)	5% [w/v] in DMF; Lagerung lichtgeschützt bei -20°C

3.7 Flüssige und feste Medien für Bakterien und eukaryontische Zellen

LB-Medium	1% [w/v] Peptone 140; 0,5% [w/v] Hefeextrakt; 1% [w/v] Natriumchlorid; pH 7,4
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5% [w/v] Agar Bacteriological
Kulturmedium	10% [v/v] FKS; 200 U/ml Penicillin; 50 U/ml Streptomycin; in DMEM-Medium
Einfriermedium	20% [v/v] FKS; 10% [v/v] DMSO; in DMEM-Medium
Stimulationsmedium	0,1% [v/v] BSA; 1 mM GSNO; in DMEM-Medium

3.8 Zelllinien und Primärzellen

Bezeichnung	Beschreibung
C2C12 ⁴	murine C3H-Myoblasten aus Myoblastengewebe (ATCC CRL-1772).
HeLa ⁵	humane, epitheliale Zelllinie aus einem Cervix-Karzinom (ATCC CCL2).
Mesangiumzellen ²	Präparation als Primärzellen aus einer weiblichen Balb/c-Maus.
Myelomzellen ¹	murine, tumoröse Suspensionszellen P3 x 63 Ag 8.653 (ATCC CRL-1580).
NIH-3T3 ⁵	embryonale, kontakt-inhibierte NIH Swissmouse Fibroblasten (ATCC CRL-1658).
P388D1 ²	murine DBA/2-Makrophagen aus tumorösem Lymphgewebe (ATCC CCL-46).
PCC7-Mz1 ¹	Subklon 1009 der murinen, embryonalen Carcinom-Zelllinie PCC7-S-AzaR ₁ .
Swiss-3T3 ³	embryonale, kontakt-inhibierte Swissmouse Fibroblasten (ATCC CRL-CCL92).

Die ATCC-Nummern beziehen sich auf den „Catalogue of Cell Lines & Hybridomas“, 7th Edition (1992). Die Zellen wurden bezogen oder zur Verfügung gestellt von:

¹ HD Dr. Sigrid Reinhardt, Institut für Physiologische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

² Dipl.-Biol. Andrea Pautz, Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie der Johann Wolfgang Goethe-Universitätsklinik Frankfurt am Main

³ HD Dr. Thomas Herget, Institut für Physiologische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

⁴ Dr. Ingo Gath, Institut für Pharmakologie der Johannes Gutenberg-Universitätsklinik Mainz

⁵ ATCC (Rockville Maryland, USA)

3.9 Bakterienstämme

Verwendet wurden die von *E. coli* abgeleiteten, Tetracyclin-resistenten Bakterienstämme XL1-Blue (BULLOCK *et al.*, 1987) und Epicurian Coli® BL21-Gold(DE3)pLysSTM Competent Cells der Firma Stratagene (Heidelberg). Mit beiden Bakterienstämmen war die von ULLMANN *et al.* (1967) beschriebene blau/weiß-Selektionierung nach dem Prinzip der α -Komplementation möglich.

3.10 Vektoren und Klone

Name	Herkunft	Antibiotikumsresistenzgen
CAT-Basic-Vektor	Promega, Madison, USA	Ampicillin
pcDNA3-Vektor	Invitrogen, USA	Ampicillin
pCI-Vektor	Promega, Madison, USA	Ampicillin
pCI-La-Voll-dHis	SCHÖRNER, 1999	Ampicillin
pET28a-Vektor	Novagen, USA	Kanamycin
pGEM-T-Vektor	Promega, Madison, USA	Ampicillin

3.11 Genomische DNA

Genomische DNA aus Lebergewebe einer weiblichen 129/SvEvTACfBr-Maus wurde von Prof. Dr. Jürgen Brosius, Institut für Experimentelle Pathologie der Universität Münster, zur Verfügung gestellt.

3.12 Primärantikörper

Bezeichnung	Klasse	Verdünnung	Spezifität/Epitop	Hersteller
anti-CAT Dig-Konjugat	polyklonal	1:200	CAT-Protein	Roche, Mannheim
anti-La/SS-B-5B9	IgG2a	1:40	La/SS-B-N-Terminus	DRATHEN (1997)
anti-La/SS-B-SW5	IgG2b	1:40	La/SS-B-N-Terminus	SMITH <i>et al.</i> (1985)

3.13 Polyklonale Sekundärantikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Spezifität/Epitop	Hersteller
anti-Dig AP-Konjugat (F _{ab} -Fragmente)	1:2500	Digoxigenin	Roche, Mannheim
anti-Maus-IgG AP-Konjugat	1:10000	murine IgG	Roche, Mannheim
anti-Maus-IgM AP-Konjugat	1:10000	murine IgG	Roche, Mannheim
anti-Maus-IgG POD-Konjugat	1:10000	murine IgG	Dianova GmbH, Hamburg
anti-Maus-IgG-Cy3 (F _{ab} -Fragmente)	1:200	murine IgG	Dianova GmbH, Hamburg

3.14 DNA-Molekulargewichtsstandards

Als DNA-Marker wurde der GeneRuler DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Dieser besaß folgende DNA-Leiter: 10, 8, 6, 5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5, 1,2, 1,031, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 und 0,1 kbp. Zur Herstellung wurde 1 µl Marker mit 6x DNA-Probenpuffer (40% [w/v] Saccharose; 0,25% [w/v] Bromphenolblau) und *aqua dest.* bis zu einem Endvolumen von 6 µl gemischt.

3.15 RNA-Molekulargewichtsstandards

Als RNA-Marker wurde der RNA Molecular Weight Marker I, Dig-labeled der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Dieser besaß folgende RNA-Leiter: 7,4, 5,3, 2,8, 1,9, 1,6, 1, 0,6, 0,4 und 0,3 kb. Zur Herstellung wurde 20 ng Marker mit 4x RNA-Probenpuffer (50% [v/v] deionisiertes Formamid; 16,7% [v/v] deionisiertes Formaldehyd; 10% [v/v] Glycerin; 0,5% [w/v] Bromphenolblau; in 1x MOPS (0,2 mM MOPS; 0,5 mM NaOAc; 0,1 mM EDTA; pH 7,0)) und DEPC-H₂O (*aqua dest.* mit 0,1% [v/v] DEPC) bis zu einem Endvolumen von 20 µl gemischt, zum Denaturieren für 15 min bei 65°C erhitzt und für 5 min auf Eis inkubiert.

3.16 Protein-Molekulargewichtsstandards

Verwendet wurden der LMW-Marker der Firma Bio-Rad Laboratories (Richmond, USA) und der BenchMark™ Prestained-Marker der Firma Gibco/ BRL GmbH (Eggenstein). Der LMW-Marker besaß die Protein-Leiter 97.4, 66.2, 45.0, 31.0, 21.5 und 14.4 kDa. Der Marker wurden wie folgt hergestellt: 5 µl LMW-Marker, 95 µl *aqua dest.*, 80 µl 2x SDS-Probenpuffer (200 mM DTT; 10% [w/v] SDS; 50% [v/v] Glycerin; 0,5% [w/v] Bromphenolblau; 100 mM Tris/HCl; pH 6,8), 20 µl 1 M DTT und 0,1% [w/v] Bromphenolblau. Die Markerlösung wurde anschließend für 5 min bei 95°C erhitzt. Eine weitere Hitzebehandlung vor dem Auftragen auf das SDS-Gel war nicht mehr notwendig. Der Prestained-Marker besaß die Protein-Leiter 194, 120, 87, 64, 52, 39, 26, 21, 15 und 9 kDa. 10 µl dieses Markers konnten direkt auf das SDS-Gel aufgetragen werden.

3.17 Computerprogramme zur Bearbeitung von Sequenzen

Name	Bezugsquelle
CLUSTALW 1.6 (THOMPSON <i>et al.</i> , 1994)	ftp.ebi.ac.uk
GENEDOC (NICHOLAS und NICHOLAS, 1996)	http.uam.ed/pub/mirror/molbio/ibmpc
HUSAR	www.dkfz-heidelberg.de
Molecular Analyst	Biorad, München
OLIGO 5	MBI (Molecular Biology Insights)
RNAdraw V1.0 (MATZURA, 1995)	Karolinska Institut Solna, Schweden

3.18 Versuchstiere

In dieser Arbeit wurden Balb/c-Mäuse verwendet, die im Tierstall des Instituts für Physiologische Chemie und Pathobiochemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz gezüchtet und gehalten wurden.

3.19 Synthetische Peptide und rek. Proteine des humanen La/SS-B

Bezeichnung	Eigenschaften
neo-La	12 AS langes La/SS-B-Peptid; stellt das Neoepitop des humanen La/SS-B dar
SOC-neo-La	an das Trägerprotein SOC (<i>sequential oligopeptide carrier</i>) gekoppeltes neo-La
rek. hLa	rek. humanes La/SS-B-Protein aus eukaryontischen Sf9-Zellen (SCHÖRNER, 1999)
rek. hLa	bakterielles rek. humanes La/SS-B-Protein (stand zur Verfügung)
rek. hLa-N(7A)	bakterieller rek. humaner La/SS-B-N-Terminus mit Neoepitop (stand zur Verfügung)
rek. hLa-N(9A)	bakterieller rek. humaner La/SS-B-N-Terminus ohne Neoepitop (stand zur Verfügung)
rek. hLa-C	bakterieller rek. humaner La/SS-B-C-Terminus (stand zur Verfügung)

3.20 Synthetische Oligonukleotide

IR-markierte Oligos für Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg), alle anderen von der Firma GenTech (Mainz) (Prof. Dr. W. Hennig) bezogen. Alle stromaufwärts (zum 5'-Ende) gerichteten Primer tragen am Ende ihres Namens ein „R“ oder die Bezeichnung „Rück“. In den folgenden Tabellen sind die Bezeichnung der Oligos (Spalte 1), ihre Annealing-Temperatur in [°C] (Spalte 2), ihre Binderegion (Spalte 3) und ihre Sequenz von 5' nach 3' (Spalte 4) dargestellt. Die genauen Binderegionen finden sich im Anhang (8.2 bis 8.4) bei den jeweiligen Sequenzen. Wird in der Spalte „Binderegion“ die Bezeichnung „Exon“ oder „Intron“ verwendet, so binden die Oligos an das jeweilige Exon bzw. Intron des murinen La/SS-B. Oligos, die an die humane La/SS-B-Sequenz binden, sind durch die Bezeichnung „hLa“ gekennzeichnet. Die fettgedruckten Sequenzbereiche kennzeichnen artifizielle Restriktionsschnittstellen (*EcoR* I = GAATTC; *Not* I = GCGGCCGC; *Nhe* I = GCTAGC; *Xho* I = CTCGAG) und artifizielle Start-AUGs bzw. Stop-Codons.

Sequenzierungs-Primer			
T7	46°C	T7-Sequenz	AAT ACG ACT CAC TAT AG
SP6	62°C	SP6-Sequenz	GAT TTA GGT GAC ACT ATA G
T3	46°C	T3-Sequenz	ATT AAC CCT CAC TAA AG
Balnt1	60°C	Intron 6	CTG GAA TCC ATG ATA AAG TGG
Balnt2	62°C	Intron 6	CCA CAT GCA TGC ATG GTA CC

Primer zur Überprüfung von Klonierungen			
T7	46°C	T7-Sequenz	AAT ACG ACT CAC TAT AG
SP6	62°C	SP6-Sequenz	GAT TTA GGT GAC ACT ATA G
SP6-pcDNA3	56°C	pcDNA3-Vektor	GCA TTT AGG TGA CAC TAT AG
T7-pET-Vor	54°C	pET28-Vektoren	TTA ATA CGA CTC ACT ATA GG
T7-pET-Rück	58°C	pET28-Vektoren	GCT AGT TAT TGC TCA GCG GT

Primer zur Herstellung einer Dig-markierten Sonde für Northern-Blots			
La-Murin-RT-PCR-Vor	68°C	Exon 2	GAA TTC GAA ACT TTA CAG ATA GCC AC
La-Murin-RT-PCR-Rück	90°C	Exon 11	GCG GCC GCA ACT ACT TGT CTC TAG CAC C

Primer zur Detektion der murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen in Geweben und Kulturzellen			
Maus-mRNA-F1	60°C	Exon 1a/b	CAG GCG CTT CTG TCG TTG T
Maus-mRNA-F2	60°C	Exon 1 a/b	TGA AGC TGT GGT GAC CGT G
Maus-mRNA-F3	60°C	Exon 1c	ACT CAT TCT CTT GTA TTG ACT AT
Maus-mRNA-R1	62°C	Exon 4	GGT CTG CTT GGT GAT CTT CTA
GAPDH-Vor	60°C	GAPDH-cDNA	AAT GCA TCC TGC ACC ACC AA
GAPDH-Rück	62°C	GAPDH-cDNA	GTC ATT GAG AGC AAT GCC AGC

Primer zur Amplifizierung von CAT			
CAT-Vor	82°C	CAT-cDNA	GCT AGC ATG GAG AAA AAA ATC ACT GGA TAT
CAT-Rück	86°C	CAT-cDNA	CTC GAG TTA CGC CCC GCC CTG CCA C

Primer für 5'-RACE			
La-Murin-P5R (GSP1)	60°C	Exon 5	GTG GCG TCA GTT GGG AAA C
AAP	70°C	Oligo(dC)-Trakt	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG
Maus-mRNA-R1 (GSP2)	62°C	Exon 4	GGT CTG CTT GGT GAT CTT CTA
AUAP	66°C	5'-Sequenz des AAP	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC

Primer des murinen La/SS-B-Gens			
La-Murin-P2	60°C	Exon 2	TAG CCA CAA TGG CTG AAA ATG
La-Murin-In2-F1	62°C	Intron 2	ATG GAA TGT TGT CAG TAA CAG AA
La-Murin-P3	58°C	Exon 3	TGG AGA CTT CAA TTT GCC AC
La-Murin-P4	60°C	Exon 4	CCC TGA AGT GAC GGA TGA G
La-Murin-P5	58°C	Exon 5	TCC CAA CTG ACG CCA CCC
La-Murin-P7	60°C	Exon 7	AAG CAG AGC AAA GTG GAA GC
La-Murin-P8	58°C	Exon 8	AGA GCA TGA AGG AAG ACA CA
La-Murin-P9	58°C	Exon 9	TTC AGG TGA CTT GGA TGA CC
La-Murin-P10	58°C	Exon 10	GTA ATA GGC CTG GTT ATG CT
La-Murin-P1R	60°C	Exon 1b	CTC CTC AGT CTC CAG AAG C
La-Murin-In2-R1	62°C	Intron 2	GAG CCA ATC AAT GTA GCT CCT
La-Murin-P4R	58°C	Exon 4	TGA CTT CCA TGA GTT TTG CC
La-Murin-P5R	60°C	Exon 5	GTG GCG TCA GTT GGG AAA C
La-Murin-P6R	60°C	Exon 6	GTG TCT TTG TAC TTC TGG CC
La-Murin-P8R	58°C	Exon 8	TGT GTC TTC CTT CAT GCT CT
La-Murin-P9R	60°C	Exon 9	CTG ATC ATC CAA GTC ACC TG
La-Murin-P10R	60°C	Exon 10	GTC CTC TTC CTT TGG GTG C
GWK-In1-R1A	62°C	Exon 1c	TAT GAA TTC TCA TAC ATC TCA ACA
GWK-In1-R5	62°C	Intron 1	ATA TAG TTA TGA GTT ACT GTT GGT
GWK-In2-R1	64°C	Intron 2	TCC ATG ACA ACA CAC GTA CAA G
GWK-In2-R3	66°C	Intron 2	TAT GCT AGC TTG TTA GAT ATT AGG
GWK-Ex4-R1	70°C	Exon 4	TGT CTG CAC TGA CTT CCA TGA GTT
GWK-In1-R2-nested	64°C	Exon 1c	CTC TTC ATG TAG TTG GTA AAG CA
GWK-In2-R4-nested	66°C	Intron 2	CAC ATA TCG CTA TTA GAT GTT CTG
GWK-In2-R2-nested	64°C	Intron 2	AGA AGA GCA TTG TAT AAT ACT GAG
GWK-Ex4-R2-nested	72°C	Exon 4	CTT AGA TTT GCT CAG TGC TTG CAC A
GWK-Ex11-R2-nested	62°C	Exon 11	ATA CAG GTG ACA TCG AAG TGG
Maus-mRMA-F3	60°C	Exon 1c	ACT CAT TCT CTT GTA TTG ACT AT

Primer für den GenomeWalker Kit			
AP 1	59°C	GenomeWalker Adapter	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C
AP2	71°C	GenomeWalker Adapter	ACT ATA GGG CAC GCG TGG T

Sonden für <i>in situ</i>-Hybridisierungen der murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen			
Exon 1a-antisense	82°C	Exon 1a-mRNA	TCT CCT CAG TCT CCA AGA AGC TCA CCT
Exon 1b-antisense	84°C	Exon 1b-mRNA	TAA AGT TTC TCA CAC TCG AAA GAT TCG GAT
Exon 1c-antisense	74°C	Exon 1c-mRNA	TAT ATA ATA GTC AAT ACA AGA GAA TGA GTA
Exon 1a-sense	82°C	n.b.	AGG TGA GCT TCT TGG AGA CTG AGG AGA
Exon 1b-sense	82°C	n.b.	ATC CGA ATC TTT CGA GTG TGA GAA ACT TTA
Exon 1c-sense	74°C	n.b.	TAC TCA TTC TCT TGT ATT GAC TAT TAT ATA

4 METHODEN

A) Molekularbiologische Arbeitsmethoden

4.1 Zu beachtende Arbeitsbedingungen bei der Kultivierung von Bakterien

Bei allen Arbeiten mit Bakterien wurde auf Sterilität geachtet. Verwendet wurden nur sterilisierte Gefäße oder Einwegprodukte sowie autoklavierte Pipettenspitzen und Reagenzien. Für die Entnahme von Kulturmedium wurden die Flaschen nur kurz geöffnet und der Rand ihrer Öffnungen und Deckel abgeflammt. So konnte eine Kontamination mit Fremdbakterien vermieden werden. Alles mit Bakterien kontaminierte Material wurde autoklaviert. Durch die Zugabe des entsprechenden Antibiotikums zum Nährmedium (Ampicillin 160 µg/ml; Tetracyclin 12,5 µg/ml; Kanamycin 30 µg/ml) war gewährleistet, dass nur Bakterien, die das Resistenzgen des Plasmids enthielten, sich in der Kultur vermehren konnten.

4.2 Anlegen bakterieller Über-Nacht-Kulturen auf Agarplatten

Zur Herstellung von LB-Agar-Platten wurde LB-Agar durch 30minütiges Autoklavieren verflüssigt und im Wasserbad auf 50°C abgekühlt. Der Lösung wurde das entsprechende Antibiotikum zugefügt, sowie im Falle einer blau/weiß-Selektionierung zusätzlich 1 mM IPTG und 0,02% [w/v] X-Gal. Je 20 ml des LB-Agars wurden in Petrischalen (Ø 8,5 cm) gegossen. Nachdem der Agar ausgekühlt war, konnten die Platten bis zu vier Wochen bei 4°C gelagert werden. Auf dem festen Nährboden waren die Bakterien unbeweglich und vermehrten sich an derselben Stelle weiter, wodurch eine sichtbare Kolonie entstand.

4.3 Anlegen bakterieller Über-Nacht-Suspensionskulturen

Suspensionskulturen wurden zur Plasmid-Präparation, bakteriellen Proteinexpression und Herstellung kompetenter Bakterien angelegt. 5 oder 40 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden mit einer Glycerin-Kultur, einer anderen Suspensionskultur oder mit von einer Agarplatte gepickten Bakterienkolonie angeimpft. Die ÜNK wurden in ein Reagenzglas oder in einen Rundkolben gegeben und mit einer Kapsenbergkappe oder mit Alufolie so verschlossen, dass ein Gasaustausch noch möglich war. Die Bakterien wuchsen im Inkubator bei 37°C bei 240 rpm für 12-16 h.

4.4 Anlegen bakterieller Glycerin-Kulturen

Eine bakterielle ÜNK wurde mit 18% [v/v] Glycerin gemischt. Glycerin schützte die Bakterien, indem es die Kristallbildung beim Einfrieren und Auftauen verhinderte. Die Bakterien wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Anschluss bei -70°C aufbewahrt (SAMBROOK *et al.*, 1989).

4.5 Schnelle Plasmid-Mini-DNA-Präparation

Diese DNA-Isolierung wurde mit dem QIAprep-spin Plasmid Mini Kit (3.5) durchgeführt, mit dem sich ca. 5-10 µg DNA gewinnen ließen. Mini-DNA wurde zum schnellen Überprüfen von Klonierungen, für Sequenzierungen oder zur Transformation eingesetzt. Von einer bakteriellen ÜNK wurden 2 ml entnommen und für 3 min bei 5000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 250 µl P1 resuspendiert und mit 250 µl P2 5 min bei RT alkalisch lysiert. Mit der Zugabe von 350 µl N3 wurde die Lösung neutralisiert, die Bakterienlyse gestoppt und die für die Affinitätsmatrix notwendige Salzkonzentration eingestellt. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis war die Fällung von denaturierten Proteinen, genomischer DNA, Zelltrümmern und SDS vollständig. Es folgte eine 10minütige Zentrifugation bei 16000 g. Nachfolgend wurde der Überstand auf die Qiaprep-Spin-Säulen gegeben und mit 16000 g für 30 sec abzentrifugiert, wobei die Plasmid-DNA an der Silica-Matrix band. Es folgen zwei Waschschriffe mit je 0,75 ml PE durch Zentrifugation mit jeweils 16000 g für 30 sec. Schließlich erfolgte die Elution der DNA mit 40 µl TE (10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 7,3-8,3) oder *aqua dest.*

4.6 Plasmid-Midi-DNA-Präparation

Verwendet wurde das QIAGEN Plasmid Midi Kit (3.5), mit dem sich ca. 500-1000 µg DNA gewinnen ließen. Eine 40 ml ÜNK wurde für 10 min mit 5000 g bei 4°C zentrifugiert und das Bakterienpellet in 4 ml P1 resuspendiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 4 ml P2 bei RT gestartet und nach 5 min mit 4 ml P3 gestoppt. Danach inkubierte die Lösung für 15 min auf Eis. Zellreste konnten durch Zentrifugation bei 5000 g bei 4°C für 30 min sedimentiert werden. Der Überstand wurde auf eine mit 5 ml QBT äquilibrierte Qiagen-Tip 100-Säule aufgetragen. Dann wurde 2mal mit je 10 ml QC gewaschen und die Plasmid-DNA anschließend mit 5 ml QF eluiert. Die Lösung wurde mit 0,7 Volumenanteilen Isopropanol bei RT gut durchmischt und die DNA für 30 min mit 16000 g bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen, um Reste des schwerer flüchtigen Isopropanols zu entfernen. Im Anschluss wurde das Pellet bei 37°C getrocknet und schließlich in 80 µl TE (10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 7,3-8,3) oder *aqua dest.* resuspendiert. Um die Nukleinsäuren vollständig in Lösung zu bringen, wurde die Flüssigkeit mehrfach kurz bei 50°C inkubiert, gut durchmischt, auf Eis gestellt und zum Schluß kurz herunterzentrifugiert.

4.7 Aufbewahrung von DNA

DNA blieb für viele Jahre bei -20°C, gelöst in TE (10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 7,3-8,3), stabil (SAMBROOK *et al.*, 1989). Das im Puffer enthaltene EDTA band den für DNasen notwendigen Kofaktor Mg²⁺. Der basische pH-Wert verhinderte eine autokatalytische Zersetzung der DNA infolge ihrer sauren Eigenschaften. Für eine kurzfristige Aufbewahrung von DNA eignete sich als Lösungsmittel auch *aqua dest.*. So konnten bei einer Weiterverarbeitung der DNA die für Enzyme notwendigen speziellen Salzkonzentrationen unproblematischer eingestellt werden.

4.8 Saure, ethanolische Fällung von Nukleinsäuren

Durch die saure, ethanolische Fällungen von Nukleinsäuren nach SAMBROOK *et al.* (1989) erfolgte eine Abtrennung von Proteinen und Pufferbestandteilen und eine Konzentrierung der Nukleinsäuren. Die Nukleinsäure-Lösung wurde mit 1/10 Volumen einer 3 M NaOAc-Lösung (pH 7,0) sowie dem 2,5fachen Ursprungsvolumen Ethanol p.a. versetzt. Gefällt wurde für 30 min bei -70°C bzw. über Nacht bei -20°C. Nach einer 30minütigen Zentrifugation mit 16000 g bei 4°C wurde der Überstand dekantiert. Zur Entfernung mitgefällter Salze wurde das Pellet 2mal mit dem 1,5 fachen Volumen des ursprünglichen Fällungsvolumens mit 70%igem Ethanol gewaschen. Der Ansatz wurde für 10 min bei 4°C mit 16000 g zentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Pellet bei 37°C getrocknet und schließlich in 10 bis 40 µl TE (10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 7,3-8,3) oder *aqua dest.* aufgenommen.

4.9 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Agarosegelelektrophorese diente dazu, Nukleinsäuren nach ihrer Größe und Konformation zu trennen und durch Anfärben sichtbar zu machen. Nukleinsäuren waren Makromoleküle, die bei physiologischem pH-Wert eine negative Gesamtladung besaßen und sich daher im elektrischen Feld zur Anode hin bewegten. Agarose bestand aus einem Gemisch saurer, linearer und gelierfähiger Polysaccharide. Die Wanderungsrate linearer Nukleinsäuren in einem Agarosegel verhielt sich umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres MW (SAMBROOK *et al.*, 1989). Die Wanderungsgeschwindigkeit hing, infolge der Bildung eines Molekularsiebes, von der Konzentration der Agarose im Gel ab. Nach AUSUBEL *et al.* (1987) konnte mit einer Agarosekonzentration von 1% [w/v] ein Auftrennungsbereich linearer Nukleinsäuren zwischen 10 und 0,5 kb erreicht werden. Weitere Parameter, die die Wanderungsgeschwindigkeit beeinflussten, waren die Pufferbedingungen und die Konformation. So liefen z.B. spiralisierte (*supercoiled*) Nukleinsäuren im Vergleich zu linearen auf etwa zwei Drittel der von der Basenzahl her zu erwartenden Höhe, da das Molekül durch die Verdrillung kleiner und kompakter war und sich somit schneller durch das Gel bewegten. Offene, relaxierte, zirkuläre (*nicked circle*) Nukleinsäuren wanderte dagegen weit langsamer.

4.9.1 DNA-Agarosegele

Als Form für die Gele dienten mit Klebeband umrandete Glasplatten. Der Probenkamm wurde am oberen Rand mit einem Abstand von ca. 1 mm zur Platte in die Form eingesetzt. 1 bis 2% [w/v] Agarose wurde mit 1x TAE-Elektrophoresepuffer (40 mM TrisOAc; 1 mM EDTA; pH 8,0) aufgeköcht, bis die Lösung klar erschien und in die vorgefertigte Form gegossen. Dabei sollte die Höhe des Gels ca. 0,5 cm betragen. Für die Elektrophorese von DNA-Fragmenten, die aus dem Gel eluiert werden sollten, und für die Analyse sehr kleiner und eng beieinander liegender DNA-Fragmente wurden die Gele aus LMP-Agarose hergestellt. Diese Agarose war reiner als herkömmliche Agarose und schmolz bei niedrigerer Temperatur (LMP-Agarose: 60°C; normale Agarose: 90°C). Die einzelnen Banden erscheinen im Gel schärfer voneinander abgetrennt und waren weniger mit anderen DNA-Fragmenten verunreinigt.

Dadurch gelang es, Fragmente in einem Größenbereich von wenigen Basenpaaren Unterschied als getrennte Banden darzustellen und zu isolieren. Das erstarrte Gel wurde schließlich in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 1x TAE-Elektrophoresepuffer bedeckt. Die zu analysierende DNA-Lösung wurde mit 6x DNA-Probenpuffer (40% [w/v] Saccharose; 0,25% [w/v] Bromphenolblau) 1:6 vermischt. Der Puffer enthielt Saccharose, die das spezifische Gewicht der Probe erhöhte und so ihr Absinken in die Probentasche bewirkte. Auf das Gel wurde ein DNA-Marker (3.14) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 3-5 V/cm Elektrodenabstand durchgeführt (SAMBROOK *et al.*, 1989). Anhand der Wanderung des im DNA-Probenpuffer enthaltenen anionischen Farbstoffes Bromphenolblau konnte der Verlauf der Elektrophorese verfolgt werden. Die Farbfront bewegte sich auf der Höhe von DNA mit einer Größe von ca. 500 bp (AUSUBEL *et al.*, 1987).

4.9.2 RNA-Agarosegele

Die Herstellung von RNA-Agarosegelen erfolgte in Anlehnung an die Herstellung von DNA-Agarosegelen (4.9.1). Für die Herstellung eines RNA-Gels wurden 1% [w/v] Agarose, 20% [v/v] 10x MOPS (20 mM MOPS; 5 mM NaOAc; 1 mM EDTA; pH 7,0) und 80% [v/v] DEPC-H₂O (*aqua dest.* mit 0,1% [v/v] DEPC) aufgeköcht, bis die Lösung klar erschien. Der auf 60°C abgekühlten Agarose-Lösung wurde deionisiertes Formaldehyd bis auf eine Endkonzentration von 2% [v/v] beigefügt, das denaturierend auf Nukleinsäuren wirkte und dadurch die Bildung von Sekundärstrukturen innerhalb der RNA verhinderte. Da auch Proteine denaturiert wurden, bestand während der Elektrophorese keine Gefahr durch RNasen. Die Agar-Lösung wurde in eine Gelform gegossen, in der die Polymerisation für 1 h erfolgte. Pro Laufspur wurden 5 µg RNA 4:1 mit 4x RNA-Probenpuffer (50% [v/v] deionisiertes Formamid; 16,7% [v/v] deionisiertes Formaldehyd; 10% [v/v] Glycerin; 0,5% [w/v] Bromphenolblau; in 1x MOPS) und DEPC-H₂O gemischt, zum Denaturieren für 15 min bei 65°C erhitzt und dann für 5 min auf Eis inkubiert. Auf das Gel wurde ein Dig-markierter RNA-Marker (3.15) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 1x MOPS bei höchstens 3 V/cm Elektrodenabstand durchgeführt

4.10 Nachweis von Nukleinsäuren in Agarosegelen

Nukleinsäuren ließen sich durch interkalierende Substanzen wie Ethidiumbromid anfärben. Dieser Farbstoff fluoreszierte rot-orange bei Anregung mit UV-Licht (254 oder 302 nm) (CRAWFORD und WARING, 1967). Die Nachweisgrenze lag bei doppelsträngigen DNA-Fragmenten je nach Länge und Dicke des verwendeten Agarosegel-Typs zwischen 1 und 10 ng/Bande. Die Färbung von Agarosegelen erfolgte für ca. 15 min in einem Ethidiumbromid-Bad (2 µg/ml in *aqua dest.*). Nach einem 10minütigen Waschschrift in *aqua dest.* wurden die einzelnen Banden auf einem langwelligen UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

Mit Toluidinblau konnten Nukleinsäuren mit 100 ng/Bande sichtbar gemacht werden. Die Färbung von Agarosegelen erfolgte für 25 min in einem Toluidinblau-Bad (0,1% [w/v] in *aqua dest.*). Nach einem 30minütigen Waschschrift in *aqua dest.* wurde der Hintergrund reduziert und die einzelnen Banden sichtbar gemacht. Ein Video-Gel-Dokumentationssystem ermöglichte das Photographieren der Gele, das Ausdrucken der Bilder auf Thermopapier und das Digitalisieren der Bilder.

4.11 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren zeigten ein typisches Absorptionsmaximum bei 260 nm. Das Ausmaß der Lichtabsorption war hierbei ein Maß für die Konzentration an Nukleinsäuren in der Lösung (Lambert-Beersches Gesetz). Bei einer Wellenlänge von 260 nm entsprach die optische Dichte (OD, Absorptionswert) von 1 bei einer Schichtdicke von 1 cm einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml (SAMBROOK *et al.*, 1989). Davon ausgehend ließ sich nach einer Messung im Photometer die Konzentration einer Nukleinsäurelösung errechnen. Für diese Messung wurde die Nukleinsäure-Lösung so verdünnt, dass sich die gemessenen Extinktionswerte möglichst zwischen 0,1 und 0,8 bewegten. Proteine besaßen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Bei dieser Methode war der bei 260 nm ermittelte Absorptionswert die Nukleinsäurekonzentration der Ausgangslösung in mg/ml, während der Quotient der Meßwerte von 260/280 nm einen Hinweis für Verunreinigungen der Lösung mit Proteinen darstellte. Ein Quotient von 1,8-1,9 galt als idealer Wert für eine Nukleinsäurepräparation. Ein niedrigerer Wert ließ auf Verunreinigungen mit Proteinen schließen (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Konzentrationsabschätzungen im Agarosegel kamen immer dann zum Einsatz, wenn von der zu untersuchenden Nukleinsäurelösung nur ein begrenztes Volumen mit einer geringen Menge an Nukleinsäuren vorhanden war, wie z.B. nach der Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen. Bei diesem Verfahren nutzte man die niedrige Nachweisgrenze von Nukleinsäuren durch Ethidiumbromid, das sich quantitativ zwischen den Basenpaaren einlagerte. Somit wiesen DNA-Fragmente gleichen MW bei gleicher Konzentration dieselbe Farbintensität auf. Durch einen direkten Vergleich der Intensitäten zwischen den Probenbanden und einer vergleichbar weit gelaufenen Standard-Markerbande konnte die Konzentration der Probenbande bestimmt werden, indem man das Verhältnis der Länge der Markerbande zur Gesamtlänge der unverdauten Marker-DNA mit der aufgetragenen Menge multiplizierte.

4.12 Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen erfolgte mit dem QIAEX Gel Extraction Kit (3.5). Die gewünschte DNA-Bande wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde das 3fache Volumen an QX1 zu je einem Volumen Gel zugegeben. Das in diesem Puffer enthaltene Natriumthiosulfat setzte die DNA durch Auflösen der Agarose frei. Das Reagenz QIAEX II (Glasmilch) wurde für 30 sec auf dem Vortexer resuspendiert und davon 30 µl dem Ansatz hinzugefügt. Die Glasmilch besaß die Fähigkeit DNA reversibel zu binden (VOGELSTEIN und GILLESPIE, 1979). Der Ansatz wurde kurz gevortext und 10 min unter Schütteln bei 50°C inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz bei 16000 g kurz abzentrifugiert und 2mal mit je 500 µl QX1 gewaschen. Schließlich wurden dem Ansatz 500 µl PE hinzugefügt. Anschließend wurde kurz gevortext und für 30 sec bei 16000 g zentrifugiert. Danach wurde das Pellet an der Luft getrocknet und im Anschluss durch Zugabe von 40 µl *aqua dest.* gelöst. Durch *aqua dest.* wurde die DNA von der Glasmilch freigesetzt. Schließlich wurde kurz bei 16000 g zentrifugiert und der DNA-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

4.13 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

COHEN *et al.* (1973) beschrieben zum ersten Mal die Möglichkeit, DNA unterschiedlicher Herkunft mittels Restriktionsendonukleasen zu schneiden und über kohäsive Enden miteinander zu ligieren. Auf diese Weise konnte Fremd-DNA in Plasmidvektoren eingebaut und in Bakterien vermehrt werden. Restriktionsenzyme von Bakterien erkannten kurze Folgen von palindromischen Nukleotiden und schnitten die DNA entweder direkt an (Typ II) oder versetzt (Typ I und Typ III) von ihrer Erkennungssequenz. Die zelleigene DNA der Prokaryonten wurde vor dem Abbau durch Modifikation der Erkennungssequenzen (Methylierung) geschützt (STRYER, 1991). Dieses Restriktionssystem diente dem Schutz vor Fremd-DNA, z.B. vor Bakteriophagen (KNIPPERS, 1997). Bei Reaktionsansätzen zum Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen wurden 0,5-1,5 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 30 µl bei 37°C für 3-4 h geschnitten. Die Enzyme wurden in einer Konzentration von 3-5 U/µg Plasmid-DNA eingesetzt. Bei allen Restriktionsverdauen nahm das Enzymvolumen nur maximal 10% des Gesamtvolumens ein, da das den Enzymen zugesetzte Glycerin die Enzymreaktion störte. Nach Beendigung der Inkubationszeit konnte die Reaktion bei den meisten Enzymen durch Hitzeinaktivierung bei 60-65°C für 20 min abgestoppt werden. Das sich während der Inkubation bei 37°C mit der Zeit am Deckel des Reaktionsgefäßes ansammelnde Kondenswasser wurde 2mal/h abzentrifugiert, um die Salzkonzentration konstant zu halten. Die im Labor verwendeten Restriktionsenzyme erzeugten glatte Enden oder schnitten die DNA an versetzten Stellen, so dass ein Überhang eines der beiden DNA-Stränge entstand. Auf diese Weise ließen sich durch den Verdau zweier verschiedener DNAs mit demselben Enzym kohäsive, d.h. zueinander passende Enden erzeugen. Dies wurde für Klonierungen genutzt, denn an diesen komplementären Stellen lagerten sich die DNA-Bruchstücke bevorzugt zusammen (COHEN *et al.*, 1972).

4.14 Ligation von DNA-Molekülen

Zur Verknüpfung von Fremd-DNA und linearisiertem Plasmid wurde das Ligations Kit (3.5) verwendet. Die T4-DNA-Ligase (aus T4-Phage) bildete unter ATP-Verbrauch Phosphodiesterbindungen zwischen der freien 3'-OH-Gruppe des einen und der 5'-Phosphatgruppe des anderen Fragments (STRYER, 1991). Der Ligations-Reaktionsansatz umfasste ein Volumen von 10 µl und enthielt 50 ng linearisierte Vektor-DNA sowie Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 2:1 bis 10:1 (Insert-Enden : Vektor-Enden), 1 U T4-DNA-Ligase und 1 µl 10x Ligationspuffer. Die Inkubation erfolgte für 24-48 h bei 4°C, obwohl das Temperaturoptimum der Ligase bei 37°C lag. Jedoch waren bei dieser Temperatur die Wasserstoffbrückenbindungen der gepaarten DNA-Enden instabil. Die einzusetzende Insert-DNA-Menge ließ sich nach folgender Formel berechnen (SAMBROOK *et al.*, 1989):

$$\text{Insert-DNA [ng]} = \frac{\text{Vektor-DNA [ng]} \times \text{Größe d. Insert-DNA [kb]}}{\text{Größe des Vektors [kb]}} \times \text{gew. Verh.} \frac{\text{Insert-Enden}}{\text{Vektor-Enden}}$$

wobei das gewünschte Verhältnis (gew. Verh.) von der Art der Klonierung abhing. Bei einer gerichteten Klonierung (4.14.1) wurde ein Verhältnis von 2:1, bei einer T/A-Klonierung (4.14.2) ein Verhältnis von bis zu 10:1 (Insert-Enden : Vektor-Enden) gewählt.

4.14.1 Gerichtete Klonierung

Durch Doppelverdau eines Vektors mit zwei Restriktionsenzymen, die keine identischen Überhänge erzeugten, entstand nach Aufreinigung der DNA durch Gelelektrophorese und Elution der DNA-Bande aus dem Gel ein lineares DNA-Fragment mit an beiden Seiten unterschiedlichen, kohäsiven Enden. In einer Ligationsreaktion konnte ein solches Fragment nicht mehr mit sich selbst einen Ringschluß bilden. Zu einer Rezirkularisierung des Vektors kam es nur, wenn Insert-DNA über dieselben kohäsiven Enden verfügte und in einer Ligationsreaktion gerichtet in das Plasmid integriert wurde.

4.14.2 T/A-Klonierung von PCR-Fragmenten

Eine Reihe thermostabiler Polymerasen, wie die *Taq*-, jedoch nicht die *Pfu*- oder *Pwo*-Polymerase, fügten unspezifisch an das 3'-Ende von PCR-Produkten ein Desoxyadenosin an. Bei der direkten Klonierung von unmodifizierten PCR-Produkten wurde die terminale Transferase-Aktivität der *Taq*-Polymerase genutzt. Die Möglichkeit, mit der *Taq*-Polymerase an glatte Enden von linearisierten Vektoren einen einzelnen T-Rest anzuhängen, eröffnete einen leichten Weg zur direkten Klonierung von PCR-Fragmenten durch die T/A-Ligation. Es wurde der pGEM-T-Vektor (3.10) verwendet, der durch seine angefügten dephosphorylierten Thymidinreste eine sehr niedrige Rückligationsrate besaß. Von dem pGEM-T-Vektor wurden 50 ng in der Ligations-Reaktion eingesetzt.

4.15 Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien

COHEN *et al.* (1972) konnten zeigen, dass die Vorbehandlung von Bakterien mit eiskaltem CaCl_2 ihre Zellwand für Plasmide durchlässig machte. Aus einem Glycerinstock mit *E. coli*-Bakterien des Stammes XL-1 Blue wurde eine 5 ml ÜNK mit 12,5 µg/ml Tetracyclin angesetzt. Der XL-1 Blue-Bakterienstamm trug ein Tetracyclin-Resistenzgen im Genom und wurde somit in seinem Wachstum nicht beeinträchtigt. Die Extinktion der ÜNK wurde mittels photometrischer Trübungsmessung (Turbidimetrie) bei 600 nm bestimmt. Die ÜNK wurde anschließend so verdünnt, dass ein Extinktionswert von 0,2 im gewünschten Endvolumen erreicht wurde. Die Bakterien wuchsen bei 37°C und 240 rpm bis zu einer OD von 0,6. Bei dieser OD befanden sie sich in der logarithmischen Wachstumsphase (SAMBROOK *et al.*, 1989). Anschließend wurde die Bakterienkultur für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine 10minütige Zentrifugation bei 4°C mit 5000 g. Das Bakterienpellet wurde in 20 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung (75 mM CaCl_2 ; 10 mM PIPES; pH 7,0) resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Mit einem weiteren Zentrifugationsschritt mit 5000 g bei 4°C für 10 min wurden die Bakterien wieder pelletiert und das Pellet wiederum in 5 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung aufgenommen. Diese enthielt zusätzlich zum Schutz der Bakterien gegen das Einfrieren 20% [v/v] Glycerin. Die Bakterien suspension wurde in Aliquots von 200 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Bei dieser Temperatur blieben die Bakterien ohne Einbußen für mehrere Monate kompetent.

4.16 Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien

1 ng Plasmid-DNA oder 5 µl eines Ligationsansatzes wurden mit *aqua dest.* auf ein Endvolumen von 40 µl aufgefüllt und auf Eis gestellt. Ein Aliquot kompetenter Bakterien wurde aus dem -70°C-Vorrat entnommen und auf Eis aufgetaut. Die Bakterien und die DNA-Lösung wurden gemischt und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit lagerte sich die DNA an die Zellwände der Bakterien an. Ein Hitzeschock für 2 min bei 42°C bewirkte die Aufnahme der DNA in die Bakterien (SAMBROOK *et al.*, 1989). Im Anschluss wurde der Ansatz für 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz in 1,5 ml LB-Medium gegeben und bei 200 rpm für 1 h bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit konnte sich die Antibiotikumsresistenz ausbilden, die die transformierten Bakterien durch die Aufnahme eines Plasmids erhalten hatten. Schließlich wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 5 min bei 400 g pelletiert. Das zellfreie LB-Medium wurde dekantiert und die Bakterien mit 100 µl LB-Medium resuspendiert. Anschließend wurde die bakterienhaltige Lösung auf 37°C warme Agarplatten (4.2) mit einem Drigalsky-Spatel auf der Agar-Oberfläche ausplattiert. Im Anschluss erfolgte eine 16stündige Inkubation bei 37°C. Die Agarplatten konnten, mit Parafilm versiegelt, für ca. 3-4 Tage bei 4°C aufbewahrt werden. Bei zu langer Inkubation oder nach mehr als vier Tagen Aufbewahrungszeit entstanden Satellitenkolonien, da die Hauptkolonie das meiste an Antibiotikum abgebaut hatte und nun in ihrer nahen Umgebung Bakterien mit der Teilung beginnen konnten, die keine Resistenz besaßen. Von zufällig ausgewählten Kolonien wurden durch Picken ÜNKs (4.3) angelegt.

4.17 DNA-Sequenzierung

Bei dieser von SANGER *et al.* (1977) vorgestellten enzymatischen Methode der Sequenzierung wurden basenanalogue 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphate als spezifische Kettenverlängerungs-Inhibitoren der DNA-Polymerase für eine kontrollierte Unterbrechung der DNA-Replikation genutzt. Auf Grund des Fehlens der 3'-Hydroxyl-Gruppe brach die Ketten-Elongation mit dem Einbau eines ddNTP ab. Wenn Primer und DNA-Vorlage in Anwesenheit aller vier dNTPs und eines bestimmten ddNTPs mit DNA-Polymerase in einem Ansatz inkubiert wurden, entstand ein Gemisch aus unterschiedlich langen Fragmenten, die am 3'-Ende eines der vier ddNTPs trugen. Somit kam es an statistisch verteilten Positionen der neusynthetisierten DNA zu Kettenabbrüchen. Verwendet wurde ein automatisches DNA-Sequenziergerät, das für die Markierung Primer benutzte, die mit einem Infrarotfarbstoff gekoppelt waren. Während der elektrophoretischen Auftrennung wurden die markierten DNA-Fragmente durch einen Laserstrahl angeregt und emittierten infrarotes Licht mit einer Wellenlänge von 790 nm. Das erhaltene IR-Leiternmuster zeigte die Verteilung der IR-markierten DNA an. Wenn analog dazu für alle vier Nukleotide (A,C,G und T) Ansätze hergestellt und parallel auf das Gel aufgetragen wurden, konnte anhand des Bandenmusters die Sequenz der DNA direkt abgelesen werden. Zur Auswertung wurden die Sequenzen mit verschiedenen Computerprogrammen bearbeitet (3.17).

Zwei Glasplatten wurden mit *aqua dest.* gereinigt und mit Isopropanol entfettet. Dies war wichtig, da jegliche Verunreinigung den Lauf der Proben störte. Zwischen die Glasplatten wurden randständige Abstandshalter von 0,25 mm Dicke eingesetzt. Kleine Sequenziergele setzten sich aus 80% [v/v] Sequagel XR, 20% [v/v] Sequagel complete und 0,1% [v/v] APS zusammen. Große Gele bestanden aus 72% [v/v] Sequagel XR, 20% [v/v] Sequagel complete, 8,4% [v/v] Harnstoff, 1% [v/v] DMSO und 0,1%

[v/v] APS. Unter optimalen Bedingungen ließen sich mit einem kleinen Sequenziergel bis zu 800 b lesen, mit einem großen bis zu 1200 b. Die gut gemischte Lösung wurde mittels einer Spritze zwischen die schrägstehenden Glasplatten gegeben. Nach dem Gießvorgang wurde ein Vorkamm zwischen die Platten gesetzt. Nach 2-3 h war die Polymerisation des Gels abgeschlossen und der Vorkamm konnte entfernt werden. Stattdessen wurde ein sog. Haifischkamm eingesetzt, der die Taschen für die Proben formte. Nachdem das Gel in die Sequenzierapparatur eingehängt worden war, wurde der Vorlauf des Gels bei 45°C für 30 min mit 1500 V bzw. 2200 V (kleine bzw. große Sequenziergele) gestartet. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Sequenzierungs-Puffer (45 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA; 0,134 M Tris/HCl; pH 8,3-8,7).

Die Sequenzierreaktion wurde als *cycle*-Sequenzierung mit dem Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit mit 7-deaza-dGTP (3.5) durchgeführt. 1-2 µg der zu sequenzierenden DNA wurden mit 2 pmol infrarotgelabeltem Sequenzierungsprimer vermischt und der Ansatz mit *aqua dest.* auf 18,75 µl aufgefüllt. Je 4,5 µl dieser Mischung wurden dann in vier PCR-Reaktionsgefäße pipettiert und je 1,5 µl Terminationsmix (A, C, G oder T) des Thermo Sequenase Kits zugegeben. Dieser enthielt neben der thermostabilen DNA-Polymerase auch die erforderlichen dNTPs und ddNTPs. Die *cycle*-Sequenzierreaktion wurde unter Standard-PCR-Bedingungen durchgeführt (4.18). Danach wurden die Ansätze zur Denaturierung für 3 min auf 95°C erhitzt, sofort auf Eis gestellt und mit je 3 µl Stop/Ladepuffer (95% Formamid [v/v]; 0,1% [v/v] Xylencyanol; 10 mM EDTA; 0,1% [w/v] Bromphenolblau) versetzt. Im Anschluss wurden 1,5 µl der Proben in der Reihenfolge A, C, G und T auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese für 6-7 h bei 1500 V bzw. 2200 V durchgeführt.

4.18 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde erstmals von SAIKI *et al.* (1985) und MULLIS *et al.* (1986) beschrieben. Hierbei wurde in einem 50 µl-Reaktionsgemisch eine DNA-Vorlage (1 ng Plasmid-DNA oder 500 ng genomische DNA) mit zwei flankierenden Oligonukleotiden mit entgegengesetzter Orientierung (je 10 pmol) durch die hitzestabile Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq*) (1 U) unter Zusatz der vier verschiedenen dNTPs (je 0,2 mM) in einem Thermocycler amplifiziert. Dies geschah nach einer initialen Denaturierung (Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge) bei 95°C für 5 min in 35 Zyklen durch Denaturierung für je 30 sec bei 95°C, durch Anlagerung der Oligonukleotide für je 45 sec bei 56°C und durch Neusynthese des komplementären DNA-Stranges (Elongation) durch die *Taq*-Polymerase für je 2 min bei 72°C und schließlich durch terminale Elongation für 10 min bei 72°C. Zuletzt erfolgte eine Abkühlung auf 4°C. Die *Taq*-Polymerase, deren Temperaturoptimum bei 72°C lag, zeigte bei 95°C nur eine langsame Aktivitätsabnahme (INNIS *et al.*, 1988). Der Nachteil dieser Polymerase lag in ihrer relativ hohen Fehlerquote von etwa 2×10^{-4} Fehlern pro eingebauter Base (CHA und THILLY, 1993). Die *Taq*-Polymerase amplifiziert pro min ca. 1 kb DNA. Die 3'-Enden der Oligonukleotide dienten ihr als Reaktionsstartpunkt. Da bei einer PCR mit genomischer DNA Fragmentlängen unbekannter Größe amplifiziert wurden, wurde die Elongationszeit bis auf das Maximum der *Taq*-Polymerase ausgedehnt (6-7 min). Durch die Variation der Anlagerungs-Temperatur (55-65°C) konnte die Stringenz, mit der synthetische Oligonukleotide an der Zielsequenz banden, erhöht bzw. erniedrigt werden, da bei niedriger Anlagerungs-Temperatur u.U. auch Hybride mit Fehlpaarungen stabil bleiben konnten. Insbesondere bei Primern, die durch die Synthese einer Klonierungs-Schnittstelle Basenfehlpaarungen zur Zielsequenz aufwiesen, wurde die Stringenz niedrig gehalten und die günstigste

Anlagerungs-Temperatur ermittelt. Die Temperatur für die Primer-Hybridisierung war je nach Basenzusammensetzung und Länge des Oligonukleotides verschieden und wurde mittels einer Annäherungsformel berechnet (THEIN und WALLACE, 1986). Danach galt: T_m (Hybridisierungstemperatur) = $4 \times (\% \text{ GC-Gehalt}) + 2 \times (\% \text{ AT-Gehalt})$. Wurden zwei Primer mit unterschiedlichen Hybridisierungstemperaturen verwendet, so wurde die Anlagerung bei der niedrigeren Temperatur durchgeführt. Nach Aufschmelzen der DNA im Denaturierungsschritt konnte es beim Herunterkühlen auf die Anlagerungs-Temperatur zu intramolekularen Basenanlagerungen der einzelsträngigen DNA kommen. Derartige Sekundärstrukturen in der Matrize konnten die Anlagerung von Primern und die Synthese des komplementären Stranges durch die Polymerase stören. Durch die Zugabe von 5% [v/v] DMSO in das Reaktionsgemisch konnten auch sekundärstruktureiche DNA-Abschnitte amplifiziert werden (WINSHIP, 1989). Neuere Cycler besaßen einen beheizbaren Deckel, der die Verschlusskappen der Reaktionsgefäße auf 110°C erhitze. Dadurch entstand ein Temperaturgradient, der das Verdunsten der Proben verhinderte, auf Grund dessen auf eine Übersichtung des PCR-Ansatzes mit Mineralöl verzichtet werden konnte. Durchgeführt wurde die PCR mit dem *Taq*-Polymerase PCR Kit (3.5). Bei der Auswahl der Primer wurden einige grundsätzliche Parameter beachtet, soweit die Amplifikation von definierten DNA-Bereichen dies zuließ. Beim Entwurf der Primer wurde eine gleichmäßige Verteilung an G/C-Resten mit einem Anteil von ca. 50% angestrebt (LOWE *et al.*, 1990). Alle Basen sollten in etwa gleichem Verhältnis vorkommen und miteinander vermischt sein. Poly(A), -(T), -(C) oder -(G)-Stellen sollten vermieden werden. Das 3'-Ende des Primers sollte aus mindestens zwei G bzw. C bestehen. Durch eine geringe bzw. keine Komplementarität der gewählten Primerpaare im 3'-Bereich sollten die häufig auftretenden Primer-Dimer-Bildungen in der PCR minimiert werden. Weiterhin wurden die Primer auf eine Länge von maximal 30 b begrenzt, da bei der Synthese der Oligonukleotide über 30 b erhöhte Fehlerraten auftraten und Verlängerungen der Primer zu keiner signifikanten Erhöhung der Spezifität beitrugen. Wenn man die Primer so gestaltete, dass sie zwar zur gewünschten Sequenz auf der Ursprungs-DNA komplementär waren, jedoch eine Mutation von wenigen Basen enthielten, so konnte man aus der Ursprungs-DNA eine neue, mutierte DNA herstellen. Auf diese Weise ließen sich beispielsweise Restriktionsschnittstellen an einer bestimmten Stelle der DNA gezielt einfügen. Eine solche Veränderung der Ursprungs-DNA mittels PCR bezeichnete man als PCR-Mutation.

4.19 Reinigung von PCR-Produkten

Oft war es erforderlich z.B. Salze und Enzyme von PCR-Produkten zu entfernen, da diese bei weiteren Reaktionen stören könnten. Dies konnte auf zwei Arten erfolgen. Einmal konnte der gesamte PCR-Ansatz auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen werden und nach erfolgter Gelelektrophorese aus dem Gel eluiert werden. Diese Methode war z.B. zwingend erforderlich, wenn dem PCR-Ansatz DMSO zugefügt worden war. Die zweite Methode basierte auf dem Prinzip der Plasmidisolierung. Hierbei wurde das QIAquick PCR-Reinigungskit (3.5) verwendet. Zu dem PCR-Ansatz wurde das 5fache Volumen PB gegeben. Danach wurden der Ansatz auf eine QIAquick-Säule pipettiert, deren Silica-Matrix bei hohen Salzkonzentrationen DNA-Fragmente band, die größer als 100 bp waren. So konnten die Primer aus dem Gemisch entfernt werden. Durch eine 1minütige Zentrifugation bei 16000 g wurde die Lösung durch die Matrix transportiert. Die gebundene DNA musste vor dem Eluieren einmal mit 750 µl PE gewaschen werden. Die Elution erfolgte mit 25 µl *aqua dest.*

4.20 RT-PCR

Bei der RT-PCR wurde ein Teilstück einer spezifischen mRNA durch PCR amplifiziert. Dazu wurde die mRNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Dies geschah entweder mit dem nach stromaufwärts gerichteten Oligo(dT)-Primer, dessen Poly(dT)-Sequenz homolog zum Poly(A)-Trakt von eukaryontischen mRNAs war, oder mit einem nach stromaufwärts gerichteten genspezifischen Primer (GSP). Während der Oligo(dT)-Primer an den Poly(A)-Trakt aller mRNAs band, wurden mit dem GSP bereits selektiv nur wenige mRNAs mit zu dem Primer homologen Sequenzen in cDNA umgeschrieben. Bei der PCR wurde anschließend durch GSPs ein Teilbereich einer cDNA amplifiziert. Dazu musste allerdings die Sequenz der cDNA bekannt sein. Die RT-PCR wurde nach dem Protokoll, der Methode und den Reagenzien des SuperScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (3.5) durchgeführt. Der RNA/Primer-Mix setzte sich aus 5 µg total-RNA, 1 µl Oligo(dT)-Primer und 2 µl GSP bzw. 2 µl GSP1 zusammen. Dieser Ansatz wurde mit DEPC-H₂O (*aqua dest.* mit 0,1% [v/v] DEPC) auf 12 µl aufgefüllt und für 10 min bei 70°C inkubiert, was eine Denaturierung der RNA zufolge hatte. Im Anschluss daran folgte eine Inkubation für 1 min auf Eis und eine kurze Zentrifugation, um den Ansatz wieder zu sammeln. Der Reaktionsmix mit einem Gesamtvolumen von 7 µl setzte sich aus 2 µl 10x PCR-Puffer, 2 µl MgCl₂, 1 µl dNTPs und 2 µl DTT zusammen. Danach wurden 12 µl RNA/Primer-Mix und 7 µl Reaktionsmix zusammenpipettiert, gevortext und kurz abzentrifugiert. Für die Anlagerung der Primer an die RNA erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 42°C. Schließlich wurde 1 µl SuperScript II RT zugegeben, danach gevortext und abzentrifugiert. Für die RT-Reaktion wurde der Ansatz für 60 min bei 42°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Enzymsynthese durch Inkubation für 15 min bei 70°C terminiert. Nach einer kurzen Abkühlung auf Eis konnte der Ansatz bei -20°C gelagert oder 10% des Ansatzes direkt in der Amplifizierungs-PCR eingesetzt werden (4.18).

4.21 5'-RACE

Mit der 5'-RACE-Technik war es möglich, unbekannte 5'-Enden von mRNAs zu amplifizieren. Dadurch konnten z.B. alternative 5'-Transkripte gefunden werden. In dieser Arbeit wurde das 5'-RACE System (3.5) verwendet. Beim 5'-RACE ging die cDNA-Synthese durch RT-PCR immer von einem nach stromaufwärts gerichteten GSP1 aus. An das 3'-Ende der cDNA (= das 5'-Ende der Ausgangs-mRNA) wurde durch die terminale Desoxyribonukleotidyl-Transferase (TdT) ein Oligo(dC)-Trakt angefügt. Dieser diente dem nach stromabwärts gerichteten Abridged Anchor Primer (AAP) als Bindestelle. Der AAP bestand aus einer 3'-Region, welche komplementär zum Oligo(dC)-Trakt war, sowie einer 5'-Adaptersequenz. Mit dem AAP und dem GSP1 erfolgte eine erste Amplifizierung durch PCR, die aber in der Regel nicht spezifisch genug war, so dass eine zweite Amplifizierung durch *nested*-PCR notwendig war, mit der die Spezifität weiter erhöht wurde. Die zweite PCR erfolgte mit einem weiter stromaufwärts vom GSP1 gelegenen nach stromaufwärts gerichteten GSP2 und dem Abridged Universal Amplification Primer (AUAP), der an die 5'-Adaptersequenz des AAP band.

Durch die Reinigung des GSP1 war es möglich, diesen von Proteinen, z.B. RNasen, zu säubern, da diese eine Durchführung des 5'-RACE unmöglich machen konnten. Um die Verluste an Nukleinsäuren in der zu reinigenden Lösung in Grenzen zu halten, wurden 250 pmol des GSP1 auf 300 µl mit DEPC-H₂O (*aqua dest.* mit 0,1% [v/v] DEPC) aufgefüllt und durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt. Dazu

wurde die Lösung mit demselben Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und kurz auf dem Vortexschüttler homogenisiert, bis eine milchige Suspension entstanden war. 10 min Zentrifugation bei 16000 g trennten das Gemisch in eine wäßrige, obere Phase, eine dünne Interphase und eine hydrophobe, untere Phase. Die wäßrige Phase wurde vorsichtig abgesaugt und zur Entfernung von Phenolresten erneut mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt, zentrifugiert und abgesaugt. Im Anschluss daran wurde der wäßrige Überstand aus der Chloroform-Extraktion durch saure ethanolische Fällung gefällt und das Pellet in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

Die cDNA-Synthese erfolgte wie unter 4.20 beschrieben mit 2,5 pmol gereinigtem GSP1. Um überschüssige GSP1, Puffer-Komponenten, dNTPs und Enzyme zu entfernen, wurde die cDNA anschließend einer Reinigung unterzogen. Diese Reinigung erfolgte durch die Bindung der DNA an die Silica-Matrix einer Säule in Gegenwart des chaotropen Salzes Natriumjodid (VOGELSTEIN und GILLESPIE, 1979). Zum cDNA-Reaktionsgemisch wurden 90 µl (4,5faches Volumen) der Binde-Lösung zugefügt und die Lösung auf eine GlassMax-Spin-Säule aufgetragen. Nach 30 sec Zentrifugation bei 16000 g war die cDNA an die Silica-Matrix der Säule gebunden. Gewaschen wurde durch Auftragen und 30sekündiger Zentrifugation bei 16000 g mit 3mal 400 µl eiskaltem 1x Waschpuffer und anschließend 2mal mit 400 µl eiskaltem 70%igem Ethanol. Nach Entfernung des Ethanols wurde nochmals für 1 min zentrifugiert und die cDNA schließlich mit 50 µl 65°C warmen DEPC-H₂O von der Säule eluiert.

In ein Reaktionsgefäß wurden 10 µl der gereinigten cDNA, 5 µl 5x Tailing-Puffer und 2,5 µl dCTPs pipettiert, für 3 min bei 94°C inkubiert und 1 min auf Eis gestellt. Der Inhalt des Gefäßes wurde kurz herunterzentrifugiert, 1 µl TdT zugefügt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die TdT wurde zum Schluß durch Erhitzen für 10 min auf 70°C inaktiviert. Die mit einem Oligo(dC)-Trakt versehene cDNA konnte bei -20°C aufbewahrt oder direkt für die Amplifikation der cDNA eingesetzt werden.

Für die erste Amplifizierung wurden in einem 50 µl-PCR-Ansatz 4 µl cDNA, 1 µl AAP-Primer und 2 µl GSP1 verwendet. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit *aqua dest.* 1:100 verdünnt und davon 5 µl für eine zweite Amplifizierung (*nested*-PCR) mit 1 µl AUAP-Primer und 2 µl GSP2 eingesetzt.

4.22 Genome walking

Das *genome walking* war ein Verfahren zur Amplifizierung eines Teilstücks einer genomischen DNA-Sequenz durch PCR. In dieser Arbeit wurde das GenomeWalker-Kit (3.5) zur Amplifizierung unbekannter 5'-Enden von genomischer DNA verwendet. Genomische DNA war jeweils mit fünf verschiedenen *blunt-end*-Restriktionsenzymen (*EcoR V*, *Sca I*, *Dra I*, *Pvu II*, *Ssp I*) verdaut und an deren 5'-Ende ein DNA-Adapter bekannter Sequenz angefügt worden, der als Anker für einen ersten Adapter-Primer (AP1) fungierte. Ein nach stromaufwärts gerichteter genspezifische Primer (GSP1) diente als Rückwärtsprimer. Während der Adapter-Primer im Verlauf der PCR an die Adaptersequenz aller DNAs band, wurden mit dem GSP1 bereits selektiv nur wenige DNAs mit zu dem Primer homologen Sequenzen amplifiziert. Bei der sich anschließenden *nested*-PCR wurde durch den zweiten Adapter-Primer (AP2) und den weiter innen liegenden zweiten genspezifischen Primer (GSP2; *nested*-Primer) die Spezifität soweit erhöht, dass der gewünschte DNA-Bereich aus dem DNA-Gemisch amplifiziert wurde. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurde eine Drei-Schritt-PCR mit der *Taq*-Polymerase durchgeführt. Für eine *genome walking*-PCR wurde 1 µg DNA als Vorlage eingesetzt.

4.23 Zu beachtende Arbeitsbedingungen bei Arbeiten mit RNA

Bei Arbeiten mit RNA bestand die Gefahr der Kontamination mit RNasen. Aus diesem Grund wurde stets mit Handschuhen, hitzesterilisierten Glasgefäßen und RNase-freien Einwegartikeln gearbeitet. Zur Zerstörung der ubiquitär vorkommenden RNasen reichte eine Autoklavierung nicht aus, da sich die denaturierten Proteine spontan wieder zurückfalten konnten. Ein wirksamer Inhibitor von RNasen war DEPC, das kovalent an Histidin- und Tyrosin-Reste in Proteinen band und dadurch ihre Struktur zerstörte (LENONARD *et al.*, 1970). Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen, welche mit RNA-haltigen Lösungen in Berührung kommen sollten, wurden über Nacht in DEPC-H₂O (*aqua dest.* mit 0,1% [v/v] DEPC) gelegt, 30 min autoklaviert und getrocknet. Alle benötigten Lösungen wurden mit 0,1% [v/v] DEPC angesetzt. Um einen autokatalytischen Prozeß der RNA zu verhindern, wurde stets auf Eis gearbeitet. Auch SDS war ein wirksamer RNase-Inhibitor. Elektrophoresekammern, Gelformen, etc. wurden über Nacht in eine 1%ige SDS-Lösung gelegt und anschließend mit Isopropanol und DEPC-H₂O gespült.

4.24 RNA-Isolierung aus Zellkulturen und Geweben

Die schnelle Isolierung von RNA aus Zellkulturen oder Geweben erfolgte durch Phenol/Chloroform-Extraktion nach dem Protokoll von CHOMCZYNSKI und SACCHI (1987).

Für eine RNA-Präparation aus Zellen wurden diese in Petrischalen (Ø 6,5 cm) ausgesät (4.27). Die Zellen wuchsen bis zur gewünschten Konfluenz heran. Das Kulturmedium wurde entfernt und die Zellen 2mal mit kaltem 1x PBS (0,8 mM Na₂HPO₄; 0,1 mM KH₂PO₄; 0,14 mM NaCl; 0,26 mM KCl; pH 7,4) gespült, um das Kulturmedium zu entfernen. Schließlich wurden 400 µl einer kalten GSCN-Lösung (4,3 M Guanidinthiocyanat; 17 mM N-Lauroylsarcosin; 0,7% [v/v] β-Mercaptoethanol; 0,75 mM Na-Citrat; pH 7,0) auf die Schale gegeben, die Zellen homogenisiert und in ein Reaktionsgefäß überführt.

Für die mRNA-Präparation aus Geweben wurden Balb/c-Mäuse verwendet. Zur Gewebeentnahme wurden die Tiere mit Kohlendioxid betäubt und anschließend durch Genickbruch getötet. Die Präparation der Gewebe erfolgte auf Eis, um die Aktivität von Enzymen, speziell RNasen, zu minimieren. Das Präparationsbesteck wurde vorher durch Hitzesterilisation von RNasen befreit. Die Tiere wurden eröffnet, die gewünschten Organe entnommen, kurz in kaltem, sterilem 1x PBS gespült und schließlich in auf 4°C vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt. Dazu wurde dasselbe Volumen an kalter GSCN-Lösung gegeben. Die Röhrchen wurden mehrmals einem Einfrier-Auftauvorgang (Wechsel zwischen flüssigem Stickstoff und RT) unterzogen, um die Zellen zu lysieren. Oft war es nötig, gleiche Gewebe aus mehreren Mäusen zu vereinen, um eine höhere RNA-Ausbeute zu erhalten.

Den in GSCN-Lösung lysierten Zellkulturen bzw. Geweben wurde jeweils 1/10 Volumen einer 2 M NaOAc-Lösung (pH 4,0), 400 µl Phenol und 120 µl Chloroform zugeben. Die Suspension wurde durch vortexen gründlich gemischt, bis eine milchige Suspension entstanden war. Nach einer 15minütigen Inkubation auf Eis folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C mit 16000 g, die das Gemisch in eine RNA-haltige, wäßrige, obere Phase, eine dünne Interphase und eine hydrophobe, untere Phase auftrennte. Die RNA-haltige Phase wurde abgesaugt und in neues Reaktionsgefäß überführt. Schließlich wurde die RNA nach Zugabe von 700 µl kaltem Isopropanol 1 h bei -70°C oder über Nacht bei -20°C gefällt. Im Anschluss daran wurde die RNA durch eine 30minütige Zentrifugation mit 16000 g bei 4°C pelletiert und das Pellet zuerst mit 70% Ethanol, dann mit 96% Ethanol gewaschen. Das Ethanol wurde

abgesaugt, das Pellet bei 37°C getrocknet und in 30 µl DEPC-H₂O (*aqua dest.* mit 0,1% [v/v] DEPC) aufgenommen. Die RNA-Lösung konnte bei -20°C gelagert werden.

Zur RNA-Degradationsüberprüfung wurden pro Laufspur 3 µg RNA 1:6 mit 6x DNA-Probenpuffer (40% [w/v] Saccharose; 0,25% [w/v] Bromphenolblau) versetzt und auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte sehr schnell mit 6-10 V/cm Elektrodenabstand bis die Bromphenolblaufront 1,5 cm vom Auftragungsort entfernt war. Danach wurde das Gel mit Ethidiumbromid (4.12) gefärbt. Bei einer gelungenen RNA-Präparation waren nur die 28S- und 18S-rRNA Bande zu erkennen. Bei degradierter RNA zog sich ein Schmier über die gesamte Lauffront.

4.25 Northern-Blotting

Das Northern-Blotting war ein Verfahren, bei dem nach der elektrophoretischen Auftrennung die RNA auf eine Trägerschicht übertragen und dort immobilisiert wurde. Der Nachweis spezifischer mRNA-Moleküle erfolgte durch Hybridisierung mit einer markierten Gensonde (einer der RNA komplementären DNA). Die Northern-Blot-Technik erlaubte eine qualitative und quantitative Bestimmung einzelner RNA-Moleküle in RNA-Gemischen. Die hier beschriebene Methode des Northern-Blotting richtete sich nach einem Protokoll von SAMBROOK *et al.* (1989), wobei abweichend vom Originalprotokoll ein nicht-radioaktives, enzymatisches Nachweisverfahren gewählt wurde.

Die Markierung der DNA-Sonde erfolgte mit dem PCR Dig Probe Synthesis Kit (3.5). Die Durchführung der PCR erfolgte mit einigen Modifikationen. So wurde nicht die *Taq*-Polymerase verwendet, sondern der im Kit enthaltene Enzym-Mix Expand™ High Fidelity (1,5% [v/v] des PCR-Ansatzes). Als dNTPs wurde der 10x PCR Dig Probe Synthesis Mix verwendet (10% [v/v] des PCR-Ansatzes), mit dem Dig-UTPs (Digoxigenin-markierte UTPs) in das PCR-Produkt eingebaut wurden. Als DNA-Vorlage wurde in dieser Arbeit durch RT-PCR mit dem Oligo(dT)-Primer umgeschriebene total-RNA verwendet (5% [v/v] des PCR-Ansatzes). Die Zyklenzahl wurde auf 30 begrenzt. Die ersten 10 Zyklen der PCR wurden wie unter 4.18 beschrieben durchgeführt. Bei den folgenden 20 Zyklen wurde die Elongationszeit pro Zyklus um 5 sec erhöht. Der letzte Elongationsschritt wurde auf 7 min reduziert. Die markierte DNA-Sonde wurde wie unter 4.19 beschrieben gereinigt.

Die Gelelektrophorese wurde wie unter 4.9.2 beschrieben durchgeführt. Für den anschließenden kapillaren Transfer wurde eine Lage Whatman-Papier so auf dem Tisch einer Elektrophoresevorrichtung platziert, dass die Enden des Papiers in die Pufferkammern reichten. Das Agarosegel wurde mit der Oberseite nach unten auf das Whatman-Papier gelegt. Auf das Gel kamen eine Nylonmembran, dann zwei Lagen Whatman-Papier, ein 8-10 cm hohen Stapel Filterpapier, eine Glasplatte und zuoberst ein 500 g-Gewicht. In die Pufferkammern wurde als Transferpuffer 20x SSC (0,3 M Trinatriumcitrat Dihydrat, 3 M NaCl; 0,1% DEPC; pH 7,0) eingefüllt. Der kapillare Transfer, bei dem die RNA vom Gel auf die Nylonmembran transportiert wurde, erfolgte über Nacht (SAMBROOK *et al.*, 1989). Im Anschluss wurde der Blot 3 min in 6x SSC gewaschen und danach getrocknet. Schließlich wurde die RNA mit UV-Licht (254 nm, 90 mJ/cm²) kovalent mit der Nylonmembran verknüpft (CHURCH und GILBERT, 1984).

Dann wurde die Membran mit auf 42°C vorgewärmten 0,2 ml/cm² High-SDS-Hybridisierungspuffer (Prähybridisierungslösung) (50% [v/v] deionisiertes Formamid; 5% [w/v] SDS; 25% [v/v] 20x SSC; 0,1% [w/v] N-Lauroylsarcosin; 23,6% [w/v] Blockierungs-Reagenz; 0,1% [v/v] DEPC; in *aqua dest.*) für 2 h bei 42°C unter Schütteln inkubiert. Die markierte DNA-Sonde wurde mit DEPC-H₂O (*aqua dest.* mit 0,1% [v/v]

DEPC) auf 100 µl aufgefüllt, für 10 min auf 95°C erhitzt, herunterzentrifugiert und im Anschluss sofort auf Eis abgekühlt. Danach wurde der Blot mit 2 µl DNA-Sonde pro ml Prähybridisierungslösung unter Schütteln über Nacht bei 42°C inkubiert. Eine bereits benutzte Sonde konnte wiederverwendet werden, indem diese für 10 min auf 68°C im Wasserbad erwärmt, bei RT etwas abgekühlt und gegen die Prähybridisierungslösung ersetzt wurde. Am nächsten Tag wurde die Sonde entnommen und bei -20°C aufbewahrt. Zum Waschen wurde der Blot zunächst 2mal für 15 min mit 2x SSC mit 0,1% [w/v] SDS bei RT gespült. Danach wurde mit auf 42°C vorgewärmten 1x SSC mit 0,1% [w/v] SDS bei 42°C 2mal für 15 min gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran mit Maleinsäurepuffer (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; 0,1% [v/v] DEPC; pH 7,5) für 15 min bei RT äquilibriert. Zum Blocken aller unspezifischen Proteinbindestellen wurde der Blot für 30 min mit Maleinsäurepuffer mit 1% [w/v] Blocking-Reagenz (Roche) bei RT unter Schütteln inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation des Blots mit anti-Dig AP-Konjugat (F_{ab} Fragmente) (3.13) unter Schütteln für 30 min bei 37°C. Nicht gebundene AK wurden durch 2maliges Waschen für 15 min in Maleinsäurepuffer mit 0,1% [v/v] Tween 20 entfernt. Anschließend wurde der Blot mit Äquilibrationpuffer (100 mM Tris/HCl; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; 0,1% [v/v] DEPC; pH 9,5) für 15 min bei RT äquilibriert. Auf die abgetropfte Membran wurden 100 µl/cm² CSPD-Detektionslösung (1% [v/v] CSPD-Reagenz in Äquilibrationpuffer) pipettiert und für 5 min bei 37°C inkubiert. CSPD bildete ein Substrat für die AP und zersetzte sich nach Dephosphorylierung unter Aussendung von Fluoreszenz. Die Lichtemission war dabei proportional zur Enzymkonzentration und dauerte bis zu 12 h an. Der Blot wurde in eine Folie eingeschlagen und die Detektion in der Dunkelkammer durchgeführt (4.43).

Gebundene DNA-Sonden und AK konnten wieder von der Membran eluiert werden, so dass der Blot mit einer anderen Sonde inkubiert und weitere Transkripte nachgewiesen werden konnten. Dazu wurde der Blot für 15 min mit kochender 0,1% [w/v] SDS-Lösung inkubiert. Daran schloß sich ein 10minütiger Waschschriff mit der Elutionslösung (1% [w/v] SDS in 0,1x SSC) bei RT an. Danach konnte mit der Hybridisierung und Detektion der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde fortgefahren werden.

B) Zellbiologische Arbeitsmethoden

4.26 Zu beachtende Arbeitsbedingungen bei Eukaryontenzellen

Um Kontaminationen mit Bakterien oder Pilze der Eukaryontenzellen (3.8) zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte unter einer Sterilbank mit sterilisierten Geräten, steril filtrierten, autoklavierten oder bereits steril gekauften Substanzen durchgeführt.

4.27 Kultivierung von Eukaryontenzellen

Die Eukaryontenzellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Begasung kultiviert. Das Kulturmedium (3.7) wurde vor Gebrauch auf 37°C erwärmt. Sobald die Zellen in der Kulturflasche zu einem konfluenten Rasen herangewachsen waren, wurde das Kulturmedium entfernt, mit 1x PBS (0,8 mM Na₂HPO₄; 0,1 mM KH₂PO₄; 0,14 mM NaCl; 0,26 mM KCl; pH 7,4) gewaschen und 50 µl/cm²

Trypsin/EDTA-Lösung (1,5% [w/v] Trypsin; 0,02% [w/v] EDTA; in 1x PBS) hinzugefügt. Nach 2-10 min Inkubation bei 37°C lösten sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche ab. Zum Abstoppen der Trypsinreaktion wurde 0,5 ml/cm² Kulturmedium hinzugefügt. Schließlich wurden die Zellen mit einer angemessenen Zellzahl pro cm² in eine neue Kulturflasche ausgesät. Dabei richtete sich die Zellzahl nach der Wachstumsrate und Größe der Zellen.

4.28 Gefrierkonservierung und Auftauen von Eukaryontenzellen

Abtrysinierte Zellen wurden für 10 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Zellpellet in 5 ml Einfriermedium (3.7) resuspendiert wurde. Dieses enthielt als Gefrierschutzmittel 10% [v/v] DMSO, was Kristallbildungen während des Einfriervorgangs verhinderte. Je 1,5 ml der suspendierten Zellen wurden in Kryoröhrchen umgefüllt und in flüssigen Stickstoff endgelagert. Eine stufenweise Adaption an die Temperatur von -196°C ermöglichte den Zellen die osmotische Abgabe von intrazellulärem Wasser.

Zum Auftauen wurde ein Kryoröhrchen mit eingefrorenen Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Sobald sich das Einfriermedium verflüssigt hatte, wurden die Zellen für 10 min bei 400 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Zellpellet in Kulturmedium (3.7) resuspendiert und in eine Kulturflasche mit 0,5 ml/cm² Kulturmedium überführt wurde.

4.29 Herstellung von Proteinextrakten aus Eukaryontenzellen

Für die SDS-PAGE wurden Proteinextrakte aus Eukaryontenzellen hergestellt. Dazu wurde das alte Kulturmedium entfernt und die Zellen mit 1x PBS (0,8 mM Na₂HPO₄; 0,1 mM KH₂PO₄; 0,14 mM NaCl; 0,26 mM KCl; pH 7,4) bedeckt. Dieses wurde anschließend gründlich abgesaugt und die Zellen mit 10 µl/cm² 95°C heißem 1x SDS-Probenpuffer (100 mM DTT; 10% [w/v] SDS; 50% [v/v] Glycerin; 0,5% [w/v] Bromphenolblau; 50 mM Tris/HCl; pH 6,8) überschichtet. Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber homogenisiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Genomische DNA, die den Zellextrakt sehr viskos machte, wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 16000 g pelletiert. Der Proteinextrakt konnte bei -20°C aufbewahrt werden.

4.30 Bestimmung der Zellzahl von Eukaryontenzellen

Die Bestimmung der Zellzahl von aus einer konfluenten Kulturflasche abtrysinierten Zellen erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer. Ein geeichtes Deckgläschen wurde befeuchtet und so auf die Kammer gelegt, dass zwischen den seitlichen Rändern des Deckglases und der Kammer Newton'sche Ringe sichtbar waren. Dann wurde die Kammer mit einem Tropfen der Zellsuspension gefüllt. Unter dem Umkehrmikroskop wurden acht Felder der Kammer ausgezählt. Die Anzahl der gezählten Zellen multipliziert mit dem Faktor 20.000 ergab die Zellzahl pro ml Kulturmedium.

4.31 Transiente Transfektion von Eukaryontenzellen

Für Transfektionen wurde das Transfektions-Kit LipofectAMINE PLUS™ Reagent (3.5) verwendet. Zur Transfektion wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen pro 6-Well einer 35 mm-Kulturschalen (6-Well-Platten) ausgesät und für 18 h im Brutschrank mit 5% CO₂ bei 37°C inkubiert. Danach besaßen die Zellen die für die Transfektion notwendige Konfluenz von 80%. 1 µg Plasmid-DNA wurde mit 100 µl Optimem-Glutamax-Medium verdünnt. Dieses Gemisch wurde nach der Zugabe von 6 µl Plus-Reagenz, das durch seine Bindung an die DNA eine effizientere Bildung von Liposomen-Nukleinsäure-Komplexen ermöglichte, 15 min bei RT inkubiert. Danach konnte die Lipofectaminlösung, bestehend aus 3 µl Lipofectamin in 100 µl DMEM-Medium zu der DNA-Lösung pipettiert werden. Eine weitere, mindestens 15minütige Inkubation war notwendig, damit sich die DNA/Liposomenkomplexe ausbilden konnten. Zwischenzeitlich wurde das Kulturmedium über den Zellen gegen 2 ml DMEM-Medium ausgetauscht, da FKS und Antibiotika den Transfektionsvorgang störten. Nach der zweiten Inkubation wurden 0,8 ml DMEM-Medium zu dem Lipofectamin/DNA-Gemisch gegeben. Das DMEM-Medium wurde gegen diese Lösung ausgetauscht. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Brutschrank bei 5% CO₂ für 3-4 h. Danach wurde das DNA/Lipofectamin-Gemisch entfernt und durch 4 ml Kulturmedium ersetzt. Im Anschluss blieben die Zellen 30-40 h stehen, um die transfizierte DNA exprimieren zu können.

4.32 Immunzytochemische Fluoreszenzfärbung

Diese Methode wurde zum Nachweis und zur Lokalisation von Antigenen in Zellen verwendet. Bei der indirekten Immunfluoreszenztechnik waren die sekundären AK (3.13), die spezifisch gegen einen primären AK (3.12) gerichtet waren, mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert, die durch Anregung mit Licht der entsprechenden Wellenlänge zur Emission von Photonen angeregt werden konnten. Die verwendeten Sekundär-AK waren ausschließlich mit dem Fluorochrom Cy3 markiert. Cy3 wurde durch grünes Licht (553 nm) zur Emission von rotem Licht (575 nm) angeregt.

Nachdem Zellen, die auf Deckgläschen ausgesät worden waren, die gewünschte Konfluenz erreicht hatten, wurden die Deckgläschen entnommen und 2mal für 1 min mit 1x PBS (0,8 mM Na₂HPO₄; 0,1 mM KH₂PO₄; 0,14 mM NaCl; 0,26 mM KCl; pH 7,4) gespült. Anschließend wurden die Zellen mit kaltem Methanol-EGTA (0,02% [w/v] EGTA in Methanol) fixiert. Der Fixierungsprozeß erfolgte bei -20°C über einen Zeitraum von 20-30 min. Bei dieser Art der Fixierung wurden die Proteine durch Methanol dehydratisiert und immobilisiert. Auch wurden Membranproteine aus der Membran herausgelöst. Dadurch entstanden Lücken, durch die die AK in die Zellen eindringen konnten. Die zellulären Strukturen wurden bei dieser Fixierungsmethode nicht zerstört und Epitope nicht maskiert oder verändert (HARLOW und LANE, 1988). Die fixierten Zellen wurden zunächst 10 min in 1x PBS rehydratisiert und anschließend für 30 min mit unverdünnten Primär-AK beschichtet. Das Auftragen des sekundären AK erfolgte im Anschluss an einen 10minütigen Waschschrift mit 1x PBS. Die Deckgläschen wurden auf einen Objektträger in PBS/Glycerin (50% [v/v] 1x PBS; 50% [v/v] Glycerin) gelegt, mit Nagellack umrandet und unter dem Mikroskop ausgewertet (4.34).

4.33 *In situ*-Hybridisierung

Die Markierung der in der *in situ*-Hybridisierung verwendeten Oligos wurde mit dem Dig Oligonucleotide Tailing Kit (3.5) durchgeführt. Auf Eis wurden 4 µl 5x Reaktionspuffer, 4 µl CoCl₂-Lösung, 100 pmol Oligonukleotide, 1 µl Dig-dUTP-Lösung, 1 µl dATP-Lösung und 1 µl terminale Transferase zusammenpipettiert, mit *aqua dest.* auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Enzymreaktion wurden 1 µl Glycogen-Lösung mit 200 µl EDTA-Lösung (0,2 M EDTA in *aqua dest.*; pH 8,0) gemischt und 2 µl dieser Verdünnung zu dem Reaktionsansatz gegeben. Zum Präzipitieren wurde 2,5 µl LiCl-Lösung (4 M LiCl in *aqua dest.*) und 75 µl eiskaltes Ethanol p.a. zugefügt und für 30 min bei -70°C oder für 2 h bei -20°C inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz für 30 min mit 16000 g bei 4°C abzentrifugiert, das Pellet mit 50 µl kaltem 70%igen Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und in 20 µl DEPC-H₂O (*aqua dest.* mit 0,1% [v/v] DEPC) aufgenommen. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

Mittels eines Dot Blots konnte die Effizienz der Markierungsreaktion ermittelt werden. 1 µl der Dig-markierten Sonde wurde mit *aqua dest.* 1:10, 1:100, 1:1.000 und 1:10.000 verdünnt und je 1 µl der Verdünnung auf eine Nylonmembran aufgetragen, die anschließend für 30 min an der Luft getrocknet wurde. Danach wurde die Membran für 5 min in Maleinsäurepuffer (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; 0,1% [v/v] DEPC; pH 7,5) und anschließend zum Absättigen unspezifischer Bindestellen für 15 min in Maleinsäurepuffer mit 1% [w/v] Blocking-Reagenz (Roche) inkubiert. Der Nachweis der eingebauten Digoxigenin-Moleküle erfolgte mit anti-Dig AP-Konjugat (F_{ab} Fragmente) (3.13) für 45 min bei RT. Danach wurde die Membran 2mal 10 min in Maleinsäurepuffer und 5 min in Äquilibriumspuffer (100 mM Tris/HCl; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; 0,1% [v/v] DEPC; pH 9,5) gewaschen. Die Detektion mit dem NBT-X-Phosphat-System erfolgte wie unter 4.42 beschrieben. Die Farbreaktion sollte bis zu einer Verdünnung von 1:10.000 noch sichtbar sein. Durch Vergleich der Farbintensitäten mit einer Standardreihe ließ sich ermitteln, wie gut die Markierung gelungen war.

Nachdem Zellen, die auf Deckgläschen ausgesät worden waren, die gewünschte Konfluenz erreicht hatten, wurden diese entnommen und 2mal für 1 min mit 1x PBS (0,8 mM Na₂HPO₄; 0,1 mM KH₂PO₄; 0,14 mM NaCl; 0,26 mM KCl; pH 7,4) gespült. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation für 10 min in PFA-Lösung (4% [w/v] in 1x PBS; pH 7,2). Danach wurde 2mal für 5 min mit 1x PBS gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (30%, 50% und 70%) jeweils für 5 min entwässert. Die Deckgläschen konnten, überschichtet mit 70% Ethanol, bei 4°C aufbewahrt werden. Zur *in situ*-Hybridisierung wurden die Zellen 2mal für 5 min in 90% Ethanol und 2mal für 5 min in Ethanol p.a. gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die Dig-markierten Sonden wurden mit 2x SSC/FA (50% [v/v] 2x SSC; 50% [v/v] Formaldehyd) 1:20 verdünnt. Durch Formaldehyd wurden die Schmelzpunkte der Sonden halbiert. Die Berechnung der Hybridisierungstemperatur erfolgte mit der Formel, die unter 4.18 angegeben war. 10 µl der verdünnten Sonde wurde auf autoklavierte Objektträger pipettiert und die Deckgläschen luftblasenfrei aufgelegt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur der Sonden im Wasserbad in einer geschlossenen Metallkammer. Nach der Inkubation wurden die Objektträger in einer Glasküvette, die mit auf die Hybridisierungstemperatur vorgewärmten 2x SSC (0,03 M Trinatriumcitrat Dihydrat, 0,3 M NaCl; 0,1% DEPC; pH 7,0) gefüllt war, vorsichtig geschwenkt, bis sich die Deckgläschen abnehmen ließen. Im Anschluss wurden die Deckgläschen 3mal 20 min mit 0,1x SSC bei der Hybridisierungstemperatur, 2mal 5 min mit PBT (0,2% [w/v] BSA; 0,1% [v/v] Tween 20; in 1x PBS) bei RT und 15 min mit P2 bei RT

gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation der Deckgläschen mit anti-Dig AP-Konjugat (F_{ab} Fragmente) (3.13) für 1 h in einer feuchten Kammer bei 37°C. Für die Substratreaktion wurden die Deckgläschen 2mal 5 min in PBT und 2mal 5 min in P3 gewaschen. Dann erfolgte die Substratreaktion mit NBT-X-Phosphat-Substratlösung (4,5 µl NBT-Stammlösung und 2,5 µl X-Phosphat-Stammlösung pro ml P3) für ca. 30 min bei 37°C im Dunkeln, bis eine lila Färbung sichtbar wurde. Die Reaktion wurde durch Waschen in 1x PBS für 5 min gestoppt. Die Deckgläschen wurden auf einen Objektträger in PBS/Glycerin (50% [v/v] 1x PBS; 50% [v/v] Glycerin) gelegt, durch Umrandung mit Nagellack eingedeckelt und unter dem Mikroskop ausgewertet (4.34).

4.34 Mikroskopiertechniken

Ein inverses Stereomikroskop (IM 35) mit Hellfeld- und Phasenkontrasteinrichtung diente der Überprüfung kultivierter Eukaryontenzellen. Ein Stereomikroskop (Zeiss Axiophot) mit Hellfeld-, Phasenkontrast- und Epifluoreszenzeinrichtung wurde für Epifluoreszenzmikroskopie verwendet. Dabei wurden die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Objekte nach dem Auflichtprinzip durch Bestrahlung von oben mit Licht aus einer Quecksilberdampflampe zur Aussendung von Fluoreszenz angeregt. Die vom Objekt emittierte Fluoreszenz höherer Wellenlänge wurde durch Sperrfilter (Analysator) vom Anregungslicht getrennt. Ein Monochromator filterte für Färbungen mit dem Fluorochrom Cy3 Licht der Wellenlängen 530-570. Die Auswertung erfolgte mit den Öl-Immersionen-Objektiven x63 und x100. Mit dem Axiophot konnte eine Dokumentation der hergestellten Zellpräparate auf Farbdias erfolgen. Nach Entwicklung der Farbdias wurden diese mit einem Diafilm-Scanner digitalisiert.

C) Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

4.35 Bakterielle Expression von His-tag-Fusionsproteinen

Eine ÜNK aus BL21-Bakterien, die mit einem pET28a-Konstrukt transformiert worden waren, wurde mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37°C mit 240 rpm inkubiert. Die pET28-Vektoren besaßen das bakterielle lac-Operon, das durch IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactosid), ein physiologisch nicht verwertbares Galactosederivat, induziert werden konnte. Unter der Kontrolle dieses lac-Operons stand die Expression der T7-RNA-Polymerase. Die zu exprimierenden DNA-Sequenzen waren so inkloniert worden, dass sie unter der translationalen Kontrolle der T7-RNA-Polymerase standen. Nach der Induktion nahm die Menge an Polymerase zu, wodurch die Unterdrückung der Basalexpression durch das in wenigen Kopien vorliegende T7-Lysozym, dessen DNA in das Genom der BL21-Bakterien integriert war, aufgehoben wurde. Die Extinktion der ÜNK wurde mittels photometrischer Trübungsmessung (Turbidimetrie) bei 600 nm bestimmt. Anschließend wurde diese so verdünnt, dass ein Extinktionswert von 0,2 im gewünschten Endvolumen der Expressionskultur erreicht wurde. Die Bakterien wuchsen bei 37°C und 240 rpm bis zu einer OD von 0,7-0,9, so dass sie sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden und die Proteinexpression mit IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM induziert werden konnte. Nach weiterer 2-4stündiger Inkubation bei 37°C und 240 rpm wurde die Kultur für 10 min bei

5000 g abzentrifugiert. Das Pellet konnte bei -70°C eingefroren werden. Das Pellet wurde mit demselben Volumen an 1x PBS (0,8 mM Na_2HPO_4 ; 0,1 mM KH_2PO_4 ; 0,14 mM NaCl; 0,26 mM KCl; pH 7,4) für eine Affinitätsreinigung (4.36) oder 95°C heißen 1x SDS-Probenpuffer (100 mM DTT; 10% [w/v] SDS; 50% [v/v] Glycerin; 0,5% [w/v] Bromphenolblau; 50 mM Tris/HCl; pH 6,8) für eine SDS-PAGE (4.38) aufgenommen und die Bakterien durch 6malige Exposition mit Ultraschallwellen für jeweils 30 sec mit $\sim 100\text{ W}$ lysiert. Zwischenzeitlich wurde kurz auf Eis inkubiert, um einen Abbau der Proteine durch Proteasen zu vermeiden. Zuletzt erfolgte eine 15minütige Zentrifugation mit 16000 g bei 4°C . Die Proteinextrakte konnten bei -20°C gelagert werden.

4.36 Affinitätsreinigung von His-tag-Fusionsproteinen

Die Aufreinigung rek. His-tag-Fusionsproteine wurde mit einem von HOCHULI *et al.* (1987) beschriebenen Säulenmaterial durchgeführt, bei dem ein Nitrilo-Essigsäure-(NTA)-Derivat (Ni-NTA-Säule) mit vier funktionellen Gruppen als Ligand an Sepharose CL-6B gekoppelt vorlag. Die Metallchelataffinitätschromatographie (MCAC) beruhte auf NTA als Metallchelatformer und dem zentral gebundenen Ni^{2+} , bei dem zwei der insgesamt sechs vorhandenen Koordinationsstellen des Ions frei blieben, wodurch Proteine, die mehr als zwei benachbarte Histidin-Reste besaßen, binden konnten. Die Bindekapazität wurde vom Hersteller mit 5-10 mg Protein pro ml Ni-NTA-Säule angegeben. Zur Aufreinigung von His-tag-Fusionsproteinen besaß der pET28a-Vektor auf der 5'-Seite der MCS Nukleotide, die für sechs aufeinanderfolgende Histidinreste (His-tag) codierten (HOCHULI *et al.*, 1988). Die Aufreinigung erfolgte mit einem Niederdruck-Chromatographie-System, bestehend aus einer Peristaltik-Pumpe, einem UV-Monitor und einem Schreiber. Der am Photometer angeschlossene Schreiber zeichnete die Absorption der Flüssigkeit bei 254 nm auf. 1 ml der Ni-NTA-Säule wurde in Fertigsäulen eingefüllt und diese mit Pumpe, Photometer und Auffanggefäß verbunden. Das Pumpsystem bewirkte, dass soviel Flüssigkeit nachfloß, wie von der Säule zum Photometer gelangte. Bei einem Austausch von einer zur anderen Lösung ließ man die Flüssigkeit gerade bis zur Harzoberfläche ablaufen. So konnte eine Vermischung der Lösungen und ein Verdünnungseffekt vermieden werden. Die Matrix durfte aber niemals austrocknen, da dies die Proteinbindungen zerstörte. Die Säule wurde mit 1x PBS (0,8 mM Na_2HPO_4 ; 0,1 mM KH_2PO_4 ; 0,14 mM NaCl; 0,26 mM KCl; pH 7,4) äquilibriert und die Absorption des Durchlaufs photometrisch erfasst. Es wurde solange äquilibriert, bis der Schreiber eine gleichmäßige Basislinie zeigte. Anschließend wurde der Proteinextrakt, 1:2 mit 1x PBS verdünnt, auf die Säule gegeben. Dieser Vorgang wurde 2-3mal wiederholt, um die Proteinausbeute zu erhöhen. Anschließend wurde die Säule mit 1x PBS gewaschen, bis der Schreiber wieder eine konstante Basislinie anzeigte. Durch die niedrige Dissoziationskonstante von Ni-NTA ($K_D = 10^{-13}$ bei pH 8,0) ließen sich unspezifisch gebundene Proteine mit 10 mM Imidazol, einem Histidin-Analogon, von der Säule entfernen. Die Elution der His-tag-Fusionsproteine erfolgte mit 150 mM Imidazol. Um das Imidazol, das beim Erhitzen Proteine quervernetzen konnte, aus der affinitätsgereinigten Proteinlösung zu entfernen, wurde das Eluat in einen Dialyseschlauch gefüllt, der mindestens das doppelte Volumen des Eluates fassen sollte, um bei eindiffundierender Flüssigkeit nicht zu platzen. Die Dialyse erfolgte über Nacht gegen zwei Liter 1x PBS bei 4°C unter leichtem Rühren. Bei der SDS-PAGE wurden die Proben wegen des noch in geringen Mengen vorhandenen Imidazols nur auf 56°C erhitzt. Die Proteine konnten bei -20°C gelagert werden.

4.37 Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Durch den Gehalt an aromatischen Resten der AS Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Histidin absorbierten Proteine mit einem Maximum bei 280 nm. Nukleinsäuren, die als Verunreinigung des Proteinextraktes auftraten, absorbierten bei 260 nm. KALB und BERNLOHR (1977) beschrieben eine Methode, um diesen Fehler zu minimieren. Sie verwendeten die Absorption der Peptidbindungen, die bei 230 nm lag. Die Nukleinsäuren zeigten hier ein Absorptionsminimum. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mit der von KALB und BERNLOHR (1977) aufgestellten Formel:

$$C_{\text{Protein}} [\text{mg/ml}] = (183,1 \times A_{230} - 75,8 \times A_{260}) / 1000 \quad (C = \text{Konzentration}; A = \text{Absorption})$$

4.38 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In einem Polyacrylamidgel ließen sich Proteine unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen nach ihrem MW elektrophoretisch auftrennen (LAEMMLI, 1970; RAYMOND und WEINTRAUB, 1959). DTT reduzierte Disulfidbrücken im Protein zu Sulfhydrylgruppen, während sich das anionische Detergens SDS gleichmäßig in die Proteine einlagerte, wodurch es nichtkovalente Wechselwirkungen unterband und die Eigenladung der Proteine maskierte (STRYER, 1991). Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine war abhängig von der elektrischen Feldstärke, der Nettoladung, der Masse und der Gestalt der Moleküle sowie dem Viskosegrad des Mediums (TISELIUS, 1937). Die Beweglichkeit der Proteine war auf Grund des konstanten Ladungs/Masse-Verhältnisses eine lineare Funktion der Logarithmen ihrer relativen MW (WEBER und OSBORN, 1969). Polyacrylamidgele entstanden durch chemische Kopolymerisation von Acrylamidmonomeren und dem Vernetzer N,N'-Methylenbisacrylamid. Bei der als radikalische Polymerisation ablaufenden Reaktion diente APS als Radikalbildner, dessen Reaktion durch N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) katalysiert wurde. In dieser Arbeit wurde die von ORNSTEIN (1964) eingeführte diskontinuierliche SDS-PAGE (DISK-SDS-PAGE) nach der Methode von LAEMMLI (1970) angewendet, mit der sich noch Proteine getrennt darstellen ließen, die nur einen Größenunterschied von 10 AS (ca. 1 kD) aufwiesen (STRYER, 1991). Zwei gereinigte Glasplatten wurden durch zwei Abstandhalter (0,5 mm dick und 1 cm breit) an den Längsseiten voneinander getrennt und mit Klammern an der Elektrophoresekammer befestigt. Zwischen die Glasplatten wurde ein Kamm geschoben, der Taschen mit Probenvolumina von 40 µl bzw. 20 µl formte. Die verwendeten Trenngele bestanden aus 10-15% Acrylamid mit 0,1% [w/v] SDS und 375 mM Tris/HCl (pH 8,8). Das Sammelgel setzte sich aus 6% Acrylamid, 0,1% [w/v] SDS und 125 mM Tris/HCl (pH 6,8) zusammen. Die Polymerisation des Acrylamids erfolgte jeweils durch die Zugabe von APS und TEMED (Endkonzentration je 0,1% [w/v]) kurz vor dem Gießen der Gele. Anschließend wurden die Pufferreservoirs mit SDS-Elektrophoresepuffer (192 mM Glycin; 0,1% [w/v] SDS; 25 mM Tris/HCl; pH 8,3) aufgefüllt. Die Proteinproben wurden 5:1 mit 5x SDS-Probenpuffer (500 mM DTT; 10% [w/v] SDS; 50% [v/v] Glycerin; 0,5% [w/v] Bromphenolblau; 250 mM Tris/HCl; pH 6,8) gemischt, im Anschluss für 5 min bei 95°C erhitzt und dann aufgetragen. In der äußersten Tasche wurden 10 µl eines Protein-Standardmarkers (3.16) aufgetragen. Leerbleibende Taschen wurden mit 10 µl 1x SDS-Probenpuffer beladen, um ein gleichmäßiges elektrisches Feld zu gewährleisten. Die Elektrophorese wurde mit konstant 0,5 V/cm² gestartet. Sobald die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 0,8 V/cm² erhöht. Wenn die Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt.

4.39 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie-Brillant-Blau

Die unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Brillant-Blau beruhte auf elektrostatischen Bindungen und apolaren Wechselwirkungen zwischen dem Farbstoff und dem Protein (ANDREWS, 1986). Coomassie detektierte einzelne Proteinbanden ab 0,1 µg Proteingehalt (HARLOW und LANE, 1988). Die Gele wurden 30 min mit Coomassie-Brillant-Blau-Lösung (2,5% [w/v] Coomassie-Brillant-Blau; 45% [v/v] Methanol; 45% [v/v] *aqua dest.*; 10% [v/v] Essigsäure) unter Schütteln bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Hintergrund des SDS-Gels mit Coomassie-Brillant-Blau-Entfärbelösung (20% [v/v] Methanol; 70% [v/v] *aqua dest.*; 10% [v/v] Essigsäure) solange reduziert, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Die Gele konnten zwischen zwei Cellophan-Folien bei RT getrocknet werden.

4.40 Western-Blotting

Bei der von BURNETTE (1981) als Western-Blotting bezeichneten Methode wurden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine PVDF- (Polyvinylidendfluorid-) Trägermembran (Bindungskapazität 170-200 µg/cm²) elektrophoretisch übertragen, an der sie über hydrophobe Wechselwirkungen immobilisiert wurden und dann für immunochemische Untersuchungen zur Verfügung standen (KYHSE-ANDERSEN, 1984; REISER und WARDALE, 1981; BITTNER *et al.*, 1980; TOWBIN *et al.*, 1979). In dieser Arbeit fand der Semi-Dry-Transfer Anwendung, bei dem nur ein Anfeuchten der Membran und Filterpapiere erforderlich war (KYHSE-ANDERSEN 1984). Die hydrophobe Oberfläche der PVDF-Membran wurde durch Inkubation für 10 sec in Methanol und anschließend für 10 min in Transfer-(Blotting-) Puffer (25 mM Tris/HCl; 192 mM Glycin; 20% [v/v] Methanol; pH 8,3) äquilibriert und dann dem SDS-Gel aufgelegt. Über und unter das Gel wurde ein mit Transfer-(Blotting-) Puffer angefeuchteter Filterpapierstapel gelegt. Der Aufbau wurde nun auf den mit Transfer-(Blotting-) Puffer befeuchteten Grafit Elektroden einer Blotting-Apparatur so orientiert, dass das Gel zur Kathode und die PVDF-Membran zur Anode zeigte. Der Transfer erfolgte für 6 min je Prozentigkeit des SDS-Gels bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² Membranoberfläche. Nach Beendigung des Transfers wurden die Marker-Spuren für 1 h mit Coomassie-Brillant-Blau-Lösung (2,5% [w/v] Coomassie-Brillant-Blau; 45% [v/v] Methanol; 45% [v/v] *aqua dest.*; 10% [v/v] Essigsäure) unter Schütteln bei RT inkubiert. Danach wurde der Hintergrund mit Coomassie-Brillant-Blau-Entfärbelösung (20% [v/v] Methanol; 70% [v/v] *aqua dest.*; 10% [v/v] Essigsäure) und Methanol reduziert. Schließlich wurde der Markerstreifen getrocknet.

4.41 Immundetektion von Proteinen

Der Western-Blot wurde zum Absättigen freier Bindungsstellen in 1 ml/cm² Blockierungs-Lösung (NBT-X-Phosphat-Färbesystem: 3% [w/v] BSA in 1x TBS; ECL-System: 2% [v/v] Blocking-Reagenz in 1x TBS) über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Der Nachweis von reaktiven Proteinbanden erfolgte durch indirekte Immunodetektion. Hierbei wurden die primären AK (3.12) durch mit Enzymen gekoppelte sekundäre AK (3.13) spezifisch erkannt. Alle Inkubations- und Waschschriffe fanden auf dem Wippschüttler bei RT statt. Nach Entfernung der Blockierungs-Lösung wurde der Blot kurz mit

1x TBS (150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl; pH 7,5) gewaschen. Dann folgte die 45minütige Inkubation mit dem primären AK. Anschließend wurde 5mal 5 min mit 1x TBST (1x TBS mit 1% [v/v] Tween 20) gewaschen, bevor sich die 45minütige Inkubation mit dem sekundären AK anschloß. Schließlich wurde 3mal für 5 min mit 1x TBST gewaschen, bevor die Nachweisreaktion erfolgte (4.42 und 4.43).

4.42 Nachweisreaktion mit dem NBT-X-Phosphat-(BCIP-) System

Die Nachweisgrenze des NBT-X-Phosphat-Färbesystems lag bei 100 pg Protein. Bei dieser Methode war das Enzym AP an den sekundären AK gekoppelt. Das Substrat X-Phosphat (BCIP = 5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat) wurde hydrolytisch gespalten, wodurch ein unlöslicher blauer Indigo-Niederschlag entstand. Im alkalischen Medium gab Indigo Protonen ab, die den Farbverstärker Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) zu purpurfarbenem Diformazan reduzierten (BLAKE *et al.*, 1984). Die Proteine wurden als lila Banden sichtbar. Der Blot wurde 2mal für 3 min mit P3 (100 mM Tris/HCl; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; 0,1% [v/v] DEPC; pH 9,5) gewaschen. Anschließend wurde der Blot mit 100 µl/cm² NBT-X-Phosphat-Substratlösung (4,5 µl NBT-Stammlösung und 2,5 µl X-Phosphat-Stammlösung pro ml P3) bei 37°C für ca. 5 min inkubiert. Während der Farbentwicklung wurde der Ansatz abgedunkelt aufbewahrt, um ein Ausfallen des Farbkomplexes auf der Membran zu vermeiden. Die Reaktion wurde durch Waschen in 1x PBS (0,8 mM Na₂HPO₄; 0,1 mM KH₂PO₄; 0,14 mM NaCl; 0,26 mM KCl; pH 7,4) für 5 min gestoppt. Anschließend wurde der Blot auf Filterpapier luftgetrocknet und unter Lichtausschluß aufbewahrt, da es sonst zum Ausbleichen der Farbstoffkomplexe kam.

4.43 Nachweisreaktion mit dem ECL-System

Verwendet wurde das ECL-Blotting-Reagenz (3.5). Die Nachweisgrenze der verstärkten Chemolumineszenz (ECL) lag bei 1 pg Protein. Bei diesem Nachweissystem war der sekundäre AK mit POD gekoppelt, das als Substrat H₂O₂ benötigte. Bei der Reaktion entstand ein Sauerstoffion, das unter Einfluß des Reduktionsmittels Luminol (Diazylhydrazid = 5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion) oxidierte. Luminol wurde dabei zu 3-Aminophthalat umgewandelt, das bei Rückkehr in den Grundzustand Photonen der Wellenlänge 425 nm emittierte (ROSWELL und WHITE, 1978). Diese Lichtemissionen wurden durch 4-Jodophenol verstärkt, da dieses als Radikalüberträger zwischen H₂O₂ und Luminol fungierte. Da die Lichtemission proportional zur Enzymkonzentration und damit zur AK-Konzentration war, eignete sich das ECL-System für vergleichende Quantifizierungen. Der Blot wurde in der Dunkelkammer angetrocknet und mit 100 µl/cm² Detektionslösung (1% [v/v] Startlösung B in Lumineszenzsubstratlösungen A; Inkubation für 30 min bei RT im Dunkeln) überschichtet und für 1 min inkubiert. Schließlich wurde die Membran auf Filterpapier angetrocknet, in eine Plastikfolie eingeschlagen, in die Expositions-kammer gelegt und Röntgenfilme aufgelegt. Die Expositionszeit betrug zwischen 30 sec und 30 min. Zur Entwicklung wurden die Filme 5 min in ein Bad mit Röntgenfilm-Entwickler (1:5 verdünnt mit *aqua dest.*) gelegt, in *aqua dest.* gespült, 3 min in ein Bad mit Röntgenfilm-Fixierer (1:5 verdünnt mit *aqua dest.*) überführt, wieder mit *aqua dest.* gespült und im Anschluss getrocknet.

4.44 Antikörper-Elution

Nach der Detektion mit dem ECL-System (4.43) konnten AK wieder von der Membran eluiert werden. Dadurch war es möglich, die Membran mit einem anderen primären und sekundären AK zu inkubieren. Die zweite Detektion erfolgte immer mit dem NBT-X-Phosphat-(BCIP-) System (4.42). Für die Elution wurde die Membran 3mal 5 min mit 1x TBST (0,15 M NaCl; 0,01 M Tris/HCl; 1% [v/v] Tween 20; pH 7,5) gewaschen, anschließend für 10 min mit Elutionspuffer (500 mM NaCl; 200 mM Glycin; pH 2,3) überschichtet, wieder 3mal 5 min mit 1x TBST gewaschen und nochmals für 10 min mit Elutionspuffer inkubiert. Die pH-Sprünge führten dabei zum Lösen der Antigen-AK-Bindungen. Zuletzt erfolgte ein Waschschriff mit 1x TBS (150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl; pH 7,5). Danach wurde, wie unter 4.41 beschrieben, fortgefahren.

4.45 Hochauflösende, zweidimensionale Gelelektrophorese

Die hochauflösende, zweidimensionale Elektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten wurde nach der Methode von GORG *et al.* (2000) durchgeführt. Der Stand der Technik wurde regelmäßig von GORG *et al.* im Internet aktualisiert (<http://www.weihenstephan.de/blm/deg>). Mit der isoelektrischen Fokussierung (1. Dimension) wurden Proteine auf Grund ihres relativen Gehalts an sauren und basischen AS nach ihren isoelektrischen Punkten in einem immobilisierten pH-Gradienten (IEF-IPG) aufgetrennt. Der isoelektrische Punkt (pI) eines Proteins war derjenige pH-Wert, bei dem seine Nettoladung Null betrug. Bei diesem pH-Wert war die elektrophoretische Beweglichkeit ebenfalls gleich Null. Bei der Elektrophorese eines Proteingemisches in einem pH-Gradienten wanderte jedes Protein so weit, bis es eine Position im Gel erreichte, wo der pH-Wert seinem pI entsprach. Mit der isoelektrischen Fokussierung konnte man Proteine trennen, deren pI-Werte sich nur um 0,01 unterschieden.

Zur Herstellung von Proteinproben aus Zellkulturen wurden die Zellen mit 10 µl/cm² Lysispuffer (7M Harnstoff; 2M Thioharnstoff; 1% [v/v] DTT; 2% [w/v] CHAPS; 0,8% [v/v] Pharmalyte; pH 3-10) lysiert, mit einem Zellschaber homogenisiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Um im Proteinextrakt die Aktivität von Proteasen zu hemmen, wurde PMSF bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Im Anschluss erfolgte der Aufschluss der Zellen durch sechsmalige Exposition mit Ultraschallwellen für jeweils 30 sec mit ~100 W. Zwischen den Beschallungen wurden die Zellen für jeweils 30 sec auf Eis gestellt. Schließlich wurde der Proteinextrakt für 5 min bei 16000 g zentrifugiert, um unlösliche Materialien abzuzentrifugieren. Schließlich wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Zur Herstellung von Proteinproben aus rek. Proteinen (4.36) erfolgte die Dialyse nicht gegen 1x PBS, sondern gegen Lysispuffer. Nach Herstellung der Proteinproben wurde die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt (4.37). Die Extrakte konnten bei -20°C aufbewahrt werden.

Mit der IEF-Cell™ wurden 17 cm lange IPG-Streifen prozessiert, die vor Beginn der Fokussierung rehydratisiert wurden. Dazu wurden 330 µl Rehydratisierungslösung (8 M Harnstoff; 10 mM DTT; 0,5% [w/v] CHAPS; 0,25% [v/v] Pharmalyte; pH 3-10) in die Mitte einer Vertiefungen des Kunststoffeinsatzes der IEF-Cell™ pipettiert und die IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten hinein gelegt. Im Anschluss erfolgte die Rehydratisierung für 12 h bei 30-50 V und 0,05 mA/IPG-Streifen. Dann wurden 100-250 µg an Protein seitlich in die Aussparungen der Kunststoffzelle appliziert. Um die IPG-Streifen vor Austrocknung bzw. der Auskristallisation des Harnstoffs zu schützen, wurde eine ausreichende Menge an Silikonöl auf

die Streifen pipettieren. Schließlich wurde die Fokussierung für 1 h bei 200 V, für 1 h bei 500 V, für 1 h bei 500 V ansteigend bis 10.000 V und für 3 h bei 10.000 V durchgeführt. Nach Beendigung der Fokussierung konnten die IPG-Streifen bis zur weiteren Verwendung bei -70°C (max. 9-12 Monate) gelagert oder sofort äquilibriert werden. Dazu wurden die IPG-Streifen 10 min in Äquilibrationslösung (6 M Harnstoff; 30% [v/v] Glycerol; 2% [v/v] SDS; 50 mM Tris/HCl; 1% [w/v] DTT; 0,1% [w/v] Bromphenolblau; pH 8,8) geschüttelt. Danach wurde in Äquilibrationslösung inkubiert, die zusätzlich 260 mM Jodacetamid enthielt, was Streifenbildungen im SDS-Gel vermied.

Mit der sich anschließenden SDS-PAGE (2. Dimension) wurden die Proteine nach ihren MW aufgetrennt, was zu einem zweidimensionalen Punktmuster führte. Die Durchführung der SDS-PAGE unterschied sich in nur wenigen Punkten von der, die unter 4.38 beschrieben war. Diese Großformat-SDS-PAGE wurde mit der Protean II-Kammer über Nacht durchgeführt. Das SDS-Gel (15%) wurde mit dem Puffersystem nach LAEMMLI (1970) ohne Sammelgel hergestellt. Die äquilibrierten IPG-Streifen wurden kurz in SDS-Elektrophoresepuffer (192 mM Glycin; 0,1% [w/v] SDS; 25 mM Tris/HCl; pH 8,3) getaucht, auf das SDS-Gel gelegt und mit einem Spatel leicht angedrückt. Anschließend wurde der IPG-Streifen mit einer 70°C warmen 1%igen Agaroselösung fixiert. Um einen optimalen Proteintransfer vom IPG-Streifen in das SDS-Gel und eine gleichmäßige Auftrennung der Proteine zu gewährleisten, wurde die Stromstärke auf 20 mA pro Gel begrenzt.

4.46 *In vitro*-Transkription/-Translation

Die *in vitro*-Transkription und die *in vitro*-Translation waren biochemische Verfahren, bei denen eukaryontische mRNAs zellfrei, d.h. unter Verwendung entsprechend aufbereiteter Zellextrakte, *in vitro* transkribiert und translatiert wurden. In dieser Arbeit wurde das Linked *in vitro* SP6/T7-Transcription/Translation Kit nonradioactive (3.5) verwendet. Spiralförmig ineinander verdrehte (*supercoiled*) Plasmid-DNA, die den Promotor für die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 trug, wurde dabei mit der T7-RNA-Polymerase in $m^7\text{Gppp}$ -Kappen-RNA transkribiert und mit Kaninchen-Retikulozyten-Lysat zu Biotin-markierten Proteinen, unter Verwendung von an ihrer ϵ -Aminogruppe mit Biotin gekoppelten Lysin-tRNA, translatiert (PELHAM und JACKSON, 1976). In einem zellfreien Transkriptionssystem begann die Translation immer am ersten Start-AUG. Die Synthese von Proteinen erforderte eine Reihe von Komponenten, die in dem *in vitro*-System enthalten waren. Hierzu gehörten u.a. Ribosomen, eine vollständige Mischung von tRNAs, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, Enzyme und Proteinfaktoren für die Initiation, Elongation und Termination der Proteinbiosynthese, energieliefernde Systeme sowie K^+ - und Mg^{2+} -Ionen. Für die Transkriptionsreaktion sollten alle verwendeten Materialien RNase-frei sein. 5 μl 4x T7-Transkriptionspuffer und 0,5 μg Plasmid-DNA wurden zusammenpipettiert und mit DEPC- H_2O (*aqua dest.* mit 0,1% [v/v] DEPC) auf 20 μl aufgefüllt. Der Ansatz wurde kurz abzentrifugiert und im Anschluss für 15 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abkühlung auf Eis terminiert. Zur Translationsreaktion wurden 10 μl des Transkriptionsreaktionsansatzes und 40 μl des Translations-Mixes (Retrikulozyten-Lysat) zusammenpipettiert, vorsichtig gemischt, kurz abzentrifugiert und für 60 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abkühlung auf Eis terminiert. 25 μl des Ansatzes wurden mit 5 μl des mAK anti-La/SS-B-5B9 (3.12) für weitere 30 min bei 30°C inkubiert. Die Immunpräzipitation erfolgte unter ständigem Schütteln für 10 min mit 5-15 mg Protein A-gekoppelter Sepharose. Die Protein A-Sepharose mit gebundenen Immunkomplexen wurde für 10 min bei 16000 g

abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 500 µl 1x PBS (0,8 mM Na₂HPO₄; 0,1 mM KH₂PO₄; 0,14 mM NaCl; 0,26 mM KCl; pH 7,4) homogenisiert und erneut für 10 min bei 16000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschschrift ein weiteres Mal mit 500 µl 1x PBS wiederholt. Das Pellet wurde mit 20 µl 1x SDS-Probenpuffer (100 mM DTT; 10% [w/v] SDS; 50% [v/v] Glycerin; 0,5% [w/v] Bromphenolblau; 50 mM Tris/HCl; pH 6,8) homogenisiert und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Anschließend wurde 10 min bei 16000 g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde einer SDS-PAGE (4.38) mit anschließendem Western-Blotting (4.40) unterzogen. Der Nachweis der *in vitro*-Translationsprodukte wurde mit dem BM Chemiluminescence Blotting Kit (Biotin/Streptavidin) (3.5) durchgeführt. Nach dem Western-Blotting wurde die Membran für 40 min bei RT in 1 ml/cm² Blockierungs-Lösung (2% [v/v] Blocking-Reagenz in 1x TBS) inkubiert. Die Lösung wurde verworfen und der Blot 4mal für 10 min mit 1x TBS (150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl; pH 7,5) gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit 0,25 ml/cm² Streptavidin-POD-Arbeitslösung (1% [w/v] Blockingreagenz; 0,1 U/ml Streptavidin-POD-Konzentrat; in 1x TBS) für 30 min inkubiert. Danach wurde die Membran 4mal für 10 min mit 1x TBST (1x TBS mit 1% [v/v] Tween 20) gewaschen. Die Detektion wurde nach 4.43 durchgeführt.

4.47 Immunisierung von Mäusen

Durch die Applikation immunogenen Materials konnte die Entwicklung von AK bzw. AK-produzierender Zellen induziert werden. Wurde mit kleinen Peptiden immunisiert, die auf Grund ihrer geringen Größe wenig immunogen waren, so wurden diese an ein Trägerprotein (*carrier*) gekoppelt, um die Immunreaktion zu erhöhen. In dieser Arbeit wurden an das Trägerprotein SOC (*sequential oligopeptide carrier*) (SAKARELLOS-DAITSIOTIS *et al.*, 1999) chemisch gekoppelte Peptide verwendet. Immunisiert wurden weibliche, neun Wochen alte Balb/c-Mäuse in vierwöchigen Abständen. Insgesamt wurde 4mal immunisiert. Die erste (Grund-) Immunisierung erfolgte mit 100 µg Antigen pro Maus in Beisein von komplettem Freundschem Adjuvans. Die zweite Immunisierung (1. *boost*) wurde mit 100 µg Antigen pro Maus in Beisein von inkomplettem Freundschem Adjuvans durchgeführt. Bei der dritten und vierten Immunisierung (2. und 3. *boost*) wurden nur noch 50 µg Antigen pro Maus in physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl in *aqua dest.*) injiziert. Die Injektionen erfolgten *intraperitoneal* (in die Bauchhöhle). Bei dem kompletten Freundschem Adjuvans (cFa) handelte es sich um eine Wasser-in-Öl-Emulsion, die hitzeinaktivierte Mycobakterien (*Mycobacterium tuberculosis*) enthielt, die bei dem inkompletten Adjuvans (iFa) fehlten. Freundsches Adjuvans führte zu einer Verstärkung der Immunantwort gegen das applizierte immunogene Material (MASSEGEFF *et al.*, 1993). Die geringeren Antigenkonzentrationen bei den Auffrischimmunisierungen (*boosts*) und diese selbst dienten dazu, die Antigen-spezifischen B-Zellen zu vermehren und den Klassenwechsel von IgM zu IgG zu induzieren.

4.48 Gewinnung von Blut aus Mäusen

Die Balb/c-Mäuse wurden durch Ether narkotisiert und die Schwanzvene punktiert. Das Blut wurde in heparinisierten Kapillaren aufgenommen, in Reaktionsgefäße überführt, für 1 h bei 37°C und über Nacht bei 4°C inkubiert, um die Koagulation zu begünstigen. Im Anschluss erfolgte eine

Zentrifugation bei 16000 g für 30 min, um Zellen und feste Serumbestandteile zu pelletieren. Der Serumüberstand konnte bei -20°C gelagert werden.

4.49 ELISA

Der ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) eignete sich zum Nachweis von Serum-AK, die gegen bestimmte Antigene gerichtet waren. Die verwendeten Träger bestanden aus Kunststoff (Polystyrol und Polyvinylchlorid) (CATT und TREGGAR, 1967), an den Antigene nicht kovalent gebunden wurden (MILES und HALES, 1968; SILMAN und KATCHALSKI, 1966). Bei einem indirekten ELISA wurden die Serum-AK an das immobilisierte Antigen gebunden und mittels eines Enzym-markierten Sekundär-AK detektiert (ENGVALL und PERLMANN, 1971; VAN WEEMEN und SCHUURS, 1971). Die Detektionsgrenze des ELISA lag bei 0,01 bis 0,1 ng Protein (HARLOW und LANE, 1988). Die Sensitivität war abhängig von der Menge des Antigens und der Avidität der Primär-AK. Die Platten wurden mit Proteinkonzentrationen von 0,25 bis 0,5 μg beschichtet. Zuviel an Protein führte zur Ablösung von der Platte und Störung des Nachweises (HARLOW und LANE, 1988). Verdünnungen wurden in 1x PBS (0,8 mM Na_2HPO_4 ; 0,1 mM KH_2PO_4 ; 0,14 mM NaCl; 0,26 mM KCl; pH 7,4) angesetzt. Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Pro Vertiefung wurden 50 μl der jeweiligen Antigenverdünnung in die Mikrotiterplatte pipettiert. Die optimale Antigenkonzentration wurde vorher in einer Verdünnungsreihe ermittelt. Die Kopplung der Proteine an die Platte erfolgte für 1 h bei 37°C . Im Anschluss wurde 3mal mit je 150 μl 1x PBST (1xPBS mit 0,1% [v/v] Tween 20) gewaschen. Um unspezifische Reaktionen zu vermeiden, mussten freigebliebene Bindestellen mit je 150 μl einer 1,5%igen BSA-Lösung (in 1x PBS) für 1 h bei RT inkubiert werden. Nach 3maligen Waschen mit je 150 μl 1x PBST wurden 50 μl des zu testenden Serums in die Vertiefungen pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die optimale Serumkonzentration wurde vorher in einer Verdünnungsreihe (1:10 bis 1:10000) ermittelt. Schließlich wurde 3mal mit je 150 μl 1x PBST gewaschen und die Mikrotiterplatte anschließend mit je 50 μl des mit 1x PBS 1:10000 verdünnten Sekundär-AK anti-Maus-IgG POD-Konjugat (3.13) beschichtet. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C . Es folgte ein 3maliges Waschen mit je 150 μl 1x PBST und *aqua dest.*

Die Detektion der AK erfolgte mittels eines Systems, das sich aus den Komponenten o-Phenylendiamin (OPD) und Wasserstoffperoxid zusammensetzte (VOLLER *et al.*, 1979). Die an den Sekundär-AK gebundene Peroxidase katalysierte in Gegenwart von H_2O_2 die Umsetzung von OPD zu gelbbraunem 1,2-Dinitrophenol. Pro Vertiefung wurden 50 μl OPD-Substratlösung (15 mM OPD; 0,05% [v/v] H_2O_2 ; 50 mM Na_2HPO_4 ; 25 mM Citrat; pH 5,0) pipettiert. Im Anschluss inkubierte die Platte 15 min unter Lichtausschluss bei 37°C . Danach wurde die Färbereaktion durch Zugabe von je 25 μl einer 4,5 M H_2SO_4 -Lösung beendet. Die Auswertung der Farbreaktionen erfolgte qualitativ und quantitativ mit einem Photometer bei 492 nm.

5 ERGEBNISSE

A) Untersuchung des murinen La/SS-B-Strukturgens

5.1 Sequenzierung des Gens

Ziel der Sequenzierung war es, das vollständige murine La/SS-B-Strukturgen zu erhalten, um z.B. Rückschlüsse auf die Expression der murinen La/SS-B-mRNAs ziehen zu können. Von TOPFER *et al.* (1993) war eine murine La/SS-B-cDNA-Sequenz veröffentlicht worden (*GenBank accession No.* L00993), die als Vorlage zur Konstruktion von Exon-spezifischen Primern diente, mit denen die Introns von genomischer DNA einer weiblichen 129/SvEvTACfBr-Maus (3.11) durch PCR (4.18) amplifiziert werden sollten. Da beim humanen La/SS-B-Gen die Exon-Intron-Übergänge bekannt waren (GRÖLZ, 1998) (8.1 und Tabelle 2 und 3), diente die humane Sequenz dazu, die *splice*-Stellen in der murinen La/SS-B-cDNA vorauszusagen, um die Lage der Exon-spezifischen Primer zu optimieren und diese nicht über eine *splice*-Stelle zu legen. Für jedes Intron sollte ein passendes Primerpaar gefunden werden, wobei ein Intron mit einem nach 3'-gerichteten Primer im Exon auf dessen 5'-Seite und einem nach 5'-gerichteten Primer im Exon auf dessen 3'-Seite amplifiziert werden sollte. Dies war auch größtenteils möglich. Einige Introns ließen sich jedoch nicht auf diese Weise amplifizieren. Solche Introns wurden mittels des *genome walking* (4.22) erhalten, einer Methode zur Amplifizierung unbekannter 5'-Enden einer genomischen DNA-Sequenz durch PCR. Hierbei war es notwendig, die Spezifität der ersten PCR-Reaktion durch eine zweite (*nested-PCR*) zu erhöhen, bei der die *nested*-Primer innerhalb der Sequenz des ersten PCR-Produktes lagen. Als Grundlage für die Sequenzierung des murinen La/SS-B-Gens dienten die durch PCR amplifizierten Intron-Fragmente (Abb. 4), die in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-T (3.10) durch T/A-Klonierung einkloniert wurden (4.14.2).

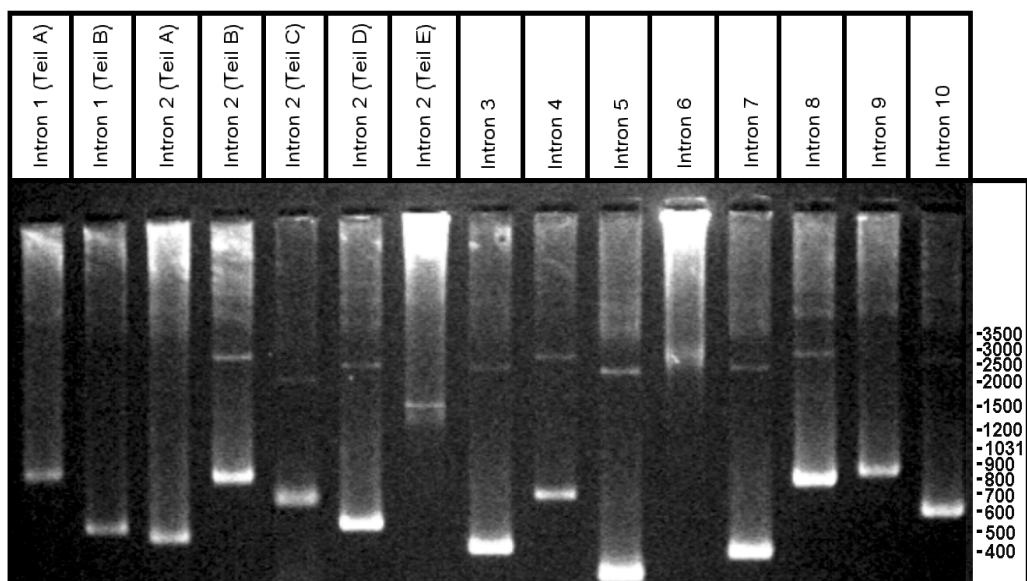


Abb. 4: Agarosegel der genomischen PCR des murinen La/SS-B-Gens

Die Sequenzierung (4.17) erfolgte mit den Standard-Primern T7, SP6 und/oder T3 (3.20), für die der Vektor pGEM-T spezifische Bindestellen besaß. Diese Vorgehensweise hatte den Vorteil, dass mit zuverlässigen Sequenzier-Primern gearbeitet werden konnte, da nicht jeder in der PCR einsetzbare Primer auch zum Sequenzieren geeignet war. Die Sequenz der meisten Introns konnte auf diese Weise ermittelt werden. Größere Fragmente, die sich nicht in einem durchsequenzieren ließen, konnten mit internen La/SS-B-spezifischen Intron-Primern (3.20) sequenziert werden. Dabei diente die mit den Standard-Primern ermittelte Sequenz als Grundlage für die Konstruktion weiter 5'-gelegener Sequenzier-Primer. Alle für die Sequenzierung des Gens verwendeten Primer finden sich im Anhang unter 8.2 und bei den Materialien unter 3.20. In Tabelle 1 sind die Primerkombinationen zur Amplifizierung der Introns, die Größe der PCR-Fragmente und die Größen der Introns dargestellt.

Intron	Primerkombination	Größe des PCR-Fragments (in bp)	Größe des Introns (in bp)
Intron 1 (Teil A)	1. PCR: AP1 und GWK-In1-R1A 2. PCR: AP2 und GWK-In1-R2-nested	894	858
Intron 1 (Teil B)	1. PCR: AP1 und GWK-In2-R3 2. PCR: AP2 und GWK-In2-R4-nested	492	217
Intron 2 (Teil A)	Maus-mRNA-F3 und GWK-In2-R3	432	432
Intron 2 (Teil B)	La-Murin-P2 und GWK-In2-R1	854	780
Intron 2 (Teil C)	1. PCR: AP1 und GWK-In2-R1 2. PCR: AP2 und GWK-In2-R2-nested	710	674
Intron 2 (Teil D)	1. PCR: AP1 und GWK-Ex4-R1 2. PCR: AP2 und GWK-Ex4-R2-nested	509	118
Intron 2 (Teil E)	La-Murin-In2-F1 und La-Murin-In2-R1	1595	1595
Intron 3	La-Murin-P3 und La-Murin-P4R	368	193
Intron 4	La-Murin-P4 und La-Murin-P5R	687	608
Intron 5	La-Murin-P5 und La-Murin-P6R	254	71
Intron 6	La-Murin-P4 und La-Murin-P8R	2477	1149
Intron 7	La-Murin-P7 und La-Murin-P8R	348	296
Intron 8	La-Murin-P8 und La-Murin-P9R	800	699
Intron 9	La-Murin-P9 und La-Murin-P10R	770	362
Intron 10	La-Murin-P10 und GWK-Ex11-R2-nested	576	286

Tabelle 1: Primerkombinationen, Größen der PCR-Fragmente und Größen der Introns des murinen La/SS-B-Gens

Die hier ermittelte Sequenz des Intron 1 mit einer Länge von 982 bp reichte nicht bis zum Exon 1b. Selbst mit der Technik des *genome walking* konnte die fehlende Anschlusssequenz nicht erhalten werden. Durch Sequenzierung eines genomischen La/SS-B-Klons einer Cosmid-Genbank mit dem Primer GWK-In1-R5 (3.20) konnte das fehlende Sequenzstück mit einer Länge von 420 bp ermittelt werden (SCHÖRNER und BACHMANN, 2000; unveröffentlicht). Damit betrug die Gesamtgröße des Intron 1 1402 bp. Wie das Intron 1 und konnten auch das Intron 2 nicht als zusammenhängendes Intron erhalten werden, sondern wurde durch PCR mit genomischer DNA und/oder *genome walking* amplifiziert. Die Gesamtgröße des Intron 2 betrug 2869 bp. Alle weiteren Introns konnten ohne

genome walking durch PCR mit genomischer DNA erhalten werden. Für das Intron 6 konnte kein geeignetes Primerpaar gefunden werden. Daher wurde dieses Intron mit weiter 5'- bzw- 3'- liegenden Primern amplifiziert, was zur Folge hatte, dass es zusätzlich mit den La/SS-B-genspezifischen internen Sequenzierungs-Primern Balnt1 und Balnt2 sequenziert werden musste. Dabei diente die mit den pGEM-T-Standard-Primern ermittelte Sequenz zum Entwurf dieser Primer.

Der Promotorbereich konnte weder durch PCR mit genomischer DNA noch durch *genome walking* ermittelt werden. Durch Sequenzierung eines genomischen La/SS-B-Klons einer Cosmid-Genbank mit dem Primer La-Murin-P1R (3.20) konnte die Promotorsequenz erhalten werden (SCHÖRNER und BACHMANN, 2000; unveröffentlicht).

Alle ermittelten Sequenzen wurden zusammengefügt und mit der murinen cDNA-Sequenz (TOPFER *et al.*, 1993) kombiniert. Auf diese Weise wurde die komplette genomische Sequenz des murinen La/SS-B-Gens erhalten. Diese Sequenz ist in Abb. 5 dargestellt.

Abb. 5: Sequenz des murinen La/SS-B-Gens

Alle Exons sind umrandet. Fett dargestellt sind der Promotorbereich zu Beginn der Sequenz, die Poly(T)₁₇-Region im Intron 1, das Start-AUG im Exon 2, die 9A-Kassette im Exon 7, das AUG-Codon zu Beginn der C-terminalen Proteinhälfte (M223) im Exon 9 und das Stop-Codon im Exon 11. Nach dem Promotor folgt das Exon 1a bzw. Exon 1b. Die Sequenz, um die das Exon 1b im Vergleich zum Exon 1a verlängert ist, ist unterstrichen. Da sich das Exon 1c direkt vor dem Exon 2 befindet, ist dieses durch Unterstreichung gekennzeichnet. Die 146 bp, um die die Exon 1c-Sequenz von MARRA *et al.* (1996; unveröffentlicht; *GenBank accession No AA798418*) im Vergleich zu der Exon 1c-Sequenz, die von TOPFER *et al.* (1993) gefunden wurde, verlängert ist, sind kursiv dargestellt.

-600		ANCCCCNACNCCNTTNAAGKSRAATNN	-501
-500	NTTTNNAAGGCCAANNCTKTGGCCNCCCCTTTWATAATTNCAANACNCCCAGAAAAGGTAGNNNAATTTTCYCAACAAAGGNAGGAGGAGTTTTAGGGT		-401
-400	CANCTGGTCTAARANNAGCCCGAGTTCCTGGATAGCCGGGGCTTCCSCCGGAAACGCTKTCACAAAAA		-301
-300	AARRRRAAGGGGAAAAAAGAAAAACCAAGCGCTACAGAAGAAAGAAAGGGAAGGCTCGAACATACTGCCACGAAACACATTAAARACAAAGATCTCCA		-201
-200	CAAAAAACACTTCCTGTGAGCCCTAACATTCTGTGAGCAATTTAAACAATTTCTCGGGGGGAGTTCGGCGAGACGACTCTCCTTCAGATTGTGGAGC		-101
-100	TCGTAACGGCCGTGCGCGAAAGCAGAGCCGGCCACTGCGTCCGCGCCACGCCACTGTCCGCAAGGGCTGCCGGGAAAGCCCCATCTTTAAGCGC		-1
1	<u>TCGCTGTCGGGCCCGCCGGCGCTCGGAAGTCCAGGCGCTTCTGTGCTGTTCTTGAAGCTGTGGTGACCGTGGGATCCGAATCTTTGAGGTGAGCTTCTTG</u>		100
101	<u>SAGACTGAGGAGA</u> AGGTACGAAGGGCTGTGCTATGCGCAGGCCCTCACTTCTCTCCGCGCCCGCGTGGGCCGCGCGCCCGTGGCCGTGCTGGAC		200
201	CGCGCCCGAGGGGGCGGGCCCTCGGCGAGGCCACCGAGCGGGCCCGCGCCAGAGATGCGGGCGCCTGGGGCTTTCCACGTGCGAGGATCCCGGGCGG		300
301	CCGGTGTGGGAGGATGCGGCTCTCGCGGGGCTTTAGCGAGGCTCGCCGCATCTCACGGCGCTCCTTCGGTTTGTCTTGCACCCCTTTCTGACT		400
401	GGCCAGAGGGCGATGTTTCGACCATTTAAGTCTTTAGGGTGTGCGGGTTAAACCGCACAGGGTTCTGTGGGACTGACTGGAGCCGAAAGAAT		500
501	GGGGCCCGCTATTGGGTTCCAGCGTCTATCTTTTTTTTTTTTTTTTCCCTCAAAGAAGTCCATTGCCATTCTGTCTCAGTGTGAACAGTCCCT		600
601	AAATTGGTAGGCCCGCAGAACTTGCAGGGGCTAAGTACTAGTGTGATTTGACCTGTGCTCTGTAGTAAAGTGAAGTGTGGTAGTGGGAGACA		700
701	AACCAGCGCTGTAACAGTAAATCTGAAGTGGGACGTACTTCTGTAGATTTCCCATACAGGACAGTGTATCGCCAGCAGTCTCCAGCATTTTGAGC		800
801	AATGCTCAAGAAATATACCAACAGTAACTATACTATAGTGTGCTGAGATAAAGTCTTCAAGAGCTGGTATACTTCCGTAACAATATGGTAGGTT		900
901	GGTTTAGTAAGGGCGCTGAAGCCAGTAAGACAGAAGATCCGGTTTGTGATTTCTAGCAAAACAGTATCACAGTCCCTCTTTATCTAGGATTGCTGAC		1000
1001	ACCGTGAACAGGAAAGTGGCTATAGAGTTAACAGTGTAGTGTGTTTAGGCACATCTTACCTCCAGCGTCCCTAGTTTAAAAATTTTTGTATCTG		1100
1101	TGCTCACAAAGGTCCTATTTCTGTATTCTCCTATATAGTGTCTAACACCGTAACTTTCATATCTGAACCTATTTTCATTTTTACCAGTAATAAGTTT		1200
1201	TGTAAGTCAGCTGTGACTAATTTTGAAAAGAAACGCAATAATGGCATTTGAGGGCTATAGGAATATACTGTGCGAGACTATAATACTGATTTTTTA		1300
1301	AAGCTAGGAATGATTTGAGGGTAGTTAAGTGGACATTTTCTGCTTTTTTGTTTTTATCGCTGAACTTTGCTT <u>TTACCAACTACATGAAGAGTTGGTTACA</u>		1400
1401	<u>AAGTAGGATTTACTGGGAGGAGGGTTGTTGATCTGAGTTTTCCATCCATAATCCAAGGTTGCTTTGTTGAGATGTATGAGAAATCATAGGGAACCT</u>		1500
1501	<u>GTAAAGTTAGGAATTTGAAATTA</u> AAAAAAGTGGCATACTTTTACTCATCTCTGTTATGACTATTATATAAAAAATAATAACCTTCTACCAGTGC		1600
1601	<u>TTGAGAACTTTACAGATAGCCACAATG</u> CGCTGAAATGAGGATAATGAAAAATGACTGCTTTGGAGGCCAAAATCTGTATCAAAATGAGGATGATTCT		1700
1701	TGTGTGGTTAAATTTGAACTTAAGATGAAAACAGAACATCTAATAGCGATATGTGGGCTTTTCAAACAACCTGGCTTAGCTTTGATTCTGGAGTTAATAT		1800
1801	GAATGTATTCATATTAGGGCAAAGTTAGAAGTCTCAAGAATTACAGACATTTCAAAGGTAACACTGTAGACTGGTGTATTTTTGAGACACAGAGTTCT		1900
1901	CAAGTCTGTAATAATGGAGTAATAATTTGTCAGTTGATGTGAAAATTAATGGTGTGCGCTAATATCTAACAAGCTAGCATAAATCCATGGTAAAGTACTTC		2000
2001	TGGTCAAATAATAGTTTATCTATCTAGTGTCTCTTCAAAGGTAACATACTTTTAAACAATATGACATTTCAAAGTCCGTTAGACTGTTC		2100
2101	TCCACTTCTCTCTGCGTGCAGTCTAGCCCTTCTCTCTTTCTCTCTTTCTGCCCCACTTCCCATGGAGACTTCCCTGGCCCTCATCTTGGGGCCAG		2200
2201	TGATCTTGGCCATCTAAGATCAGCTTCCCAATAAACCTGCATTTAATAATAATCTTAAAAAAGAAAGAAAGAAATAACAAGTCTGTATGACAT		2300
2301	TTCAAATTTAGTTTATAGTGAATGTTGTGTCAGTAAACAGAAATGGCTGTGGGAAATTTGCCATAAAATGCTTTTATGCCATGAAATAACATTGGTTAGTG		2400
2401	TGTGTGCTCTTTTTTTCCATTTCTTAGCTGTTTGGTTTTGTTTTAACTGTGACACCTTTGCTCTTAAATTTGTCCTGTTTATTTTTGTTTTCTCAT		2500
2501	ATTTTCCCCCTCTCAGTAATGGAGATCAAACCTAAGGCATGCTAGGCAGTCACTCACTGAGCTGTAGGCATTTGCGGCTACAAATGTTGTCTGATTTTT		2600
2601	TTAAAAATTTATTTTATTTATGTGCAATGGTGTGTTGTCTGATGTATGCTGTGTGAAGGATCCCCGGAAGTACAGACAGTTGTGAGCTTC		2700
2701	TATGTGGATGCCAAGAAATGAACCTGGGTCTCCGGAAGAGCAGCTAGTCTTTTAACTGTGAAACCATCTCCAGCCCTTTTGGTTGATTTGGGGGAAAA		2800
2801	AATTGTGTTTTCTTAATAATGCAAAAGCAGTGATAAGATAATTTGCTGTTTTAATGCTTGGAAACAATAGCAAAATTTGTTATAGAAAAGATAATGTTCTCT		2900

2901	CCCACAGCCTGCAGCCTCACATCTCTCCCTCTTGAGATATTCAAGGTTAAAAGCCTTTTCATACCCATGTTCAAAAATACATTTTATTTTAGTGTACTT	3000
3001	TATGTGTATGGATGTTATGTCTACATGTATGGCTGTGTGCCGTGTACATGCCTGGGTGCCCTCAGAAGCCAGAAGTGTGCACCTGGCTCCCTAGGACTGG	3100
3101	AATAACAGATGGGTAAAGCCCTAATGGAAGTGCCTGGTCCACCATCTGGTGCCTCTTAACTCTGAGTCACTCTCCAGCTCCCTAAA	3200
3201	TATTTTATTTTAAAGAGGCCCAATTTTATTTTAAAGAAATAAAAGTCAAGTAAACTACTCAGAGACAAGATTTCCCTAAACACTCCCAACA	3300
3301	GGATGCCCTATAAACTTAATTTTATTTTCCCTTTTCCCCCAACAACATGAGATGTTTTAGAGAGTAAAGTTTTGTTTCCCAACAATATATAATTA	3400
3401	ATAATCATCTCTCTAAAGATATAGATTTTAAAAATATGAGTTCTAGATATTTCTTATGTAAAAATTTAGTAAACAGGTCTACTGCTGCCTCTCCC	3500
3501	TCTCGTCTCTCTCCCTCCCTTTTCTCTTTACTTTTTTCTTCTTTTATCCATCCATCATCTCATGCATCCAGGGCTCTCTGGGGAAAATTCAC	3600
3601	AAACTCATAGAGGTAGATCACTTGTCTTCTGCTTCCCATGTGTGAGAATTAAGAGCATGAGCCATCACATCTACTTTATAAAAAATAGTGTGTCT	3700
3701	TGTGTCTGTCTGCATATCAATATTTGGCCCTCAGAGGTGCATCCTCTGGAGCTGTAGTTACAGTCTCTTATGAGCCAACTGACAAGCCGTGAAGAACCT	3800
3801	ACCTCAGGCTCTTGGAAAGCAGCAGCATTCTTAGGCATTGAGCCATCCTCTAGCTCTCTGCTGATTTCTTAAAGATGGAATCTTAGGAGGAGCTAC	3900
3901	ATTGATTTGGCTCAAGCTAGTGTGAGATTGAAGGCATCTTAGTTTTGATTAGTAAATGATACATAGATTTTTTGTGTTTGTGGTGTGTGTTATATAATT	4000
4001	TTTAAAGGTGGCTGGTATGTTGGTACCTAATTTAATCTAGGACCTTGGAAAGTAGAGGCAGGTGGATCTCTTGACTTTGAGAACTTAGAAGAAATTC	4100
4101	TGCCCTCAGGTCTTAAAGTCAGAAATCACAGCATGAACCATGACTTCCAGCTGAATTTATAAAGCCTTAAAGATGAATGTTTGGCCCCCTC	4200
4201	CCTTTATGTCTTTTAAACATTTCCAAGCAGTCACTCTGGGTCTGCTACTTTTTAGCTGAGGATTGAGCCCAACTCTCAGTTTACTTTTCCCA	4300
4301	CATTGATTTAAAAAGAAGTTTTAAAAATATGTAGATTTTCATTATATTTTGGAGCTTTATATCTGGCAATGAACCTGTTCACATACTTTTAGTATCC	4400
4401	TCTACTGATTTGATATCATACATATAGTCTTAAAGAGAAATATTAGGCTCTTTAAATCTAAACATTTTAAAGGTAAAAAGTCAATTTTCAAAAA	4500
4501	TTTCATGATTGAACCTAGTATTATACAATGCTCTTCTGAAATACATTATAATTTATTCACAGTATTATTGGAGCTTCAATTTGCCACGAGACAAGTTTT	4600
4601	TAAAAGAACAGATCAAATGGATGAAGGCTGGGTACCTTTGAAAACAATGATAAAATCAACAGCTAAAGTCTTTTGTGGTGGTTGTTCTATTCTTGG	4700
4701	GATTAAACCTAGGAACCTGTACATGTGTGTCAITGAAITACCTTAGTTTTGCGGCTAAATAAATAAATACTTTTAAAGCCATCAGTTCTGTTTAC	4800
4801	TGTTGAGAGCTACTACTAAATCTGCTTTTACAGTGTTTTACATGTATGTTTCTAGCTTTTCAAGTAAACCCGGCTGACAACAGACTTTAATGTATGTGAAGC	4900
4901	ACTGAGCAAACTAAGGCAAACTCATGGAAGTCAGTGCAGACAAAATAAAATAGAAATCACCAAGCAGACCCTCCCTGAAGTACGGATGAGTAT	5000
5001	AAGAATGATGTAATAAACAAGATCTGTTTATATTTAAAGTGGTCCATGATGTATTTTCATGTATTTATTATTATTAATTTACTATTTTTGGTTTTTGA	5100
5101	GACAGGGTTTCTCTGTATAGTCTGCTATCTTGGAACTCCTCTGAGACCAGGCTGCCCTCGAACTCAGAAATCTGCCTCATATTACTTTTACTTAGA	5200
5201	AAGAAAATGCTCAGGGATCACATTTGGCCAGTTTAGCTATGTACTTCTAAGTCTTTATCATTTGTAATGTTACATTTGTTACATGATAAACTCTAATA	5300
5301	GCTGAATCTATAGTAAATTTTCTTAGCATATTAATTTCTAAATGCATAATGAAAGCTTTGAAAATAAGGAAAGTAGATTGAATAGTGTGAAGTACCATT	5400
5401	GTGAAACCTCAAAAGTCTTACCATGTAAATAAAGCTTTGTCTTGGCTCCAGCTGTAGTTATTTGGAGCAAACTCAGGGTGAATCACTTATGTCACCTAG	5500
5501	AGAATAAGGTTGTTAAACAATTAAGAGAGGGAGAGAAAGATACCTAGCTGACTTCTGTTTTCGAGACAAAATAAATCAGTTTATTTCTGGGAGAGTTTA	5600
5601	CCCAGGAGCTATTATTGTACTCTTTTCTACTTTTTACAGTAAAGGTTTCCCACTGACCCACCTTGTATGATATAAAGAATGGCTAGACGATAAAG	5700
5701	SCCAAACTACTGAATATTCAAATGAGAAGAACATTACACAAAACATTTAAGCTATGATAAATTTGATGTAGACTTCTGATTGTGACATATCACTGTAAGGA	5800
5801	AATATTTATTTGCTCTTACAGTGGTCAATATTGCTGTGTTTGTATGATATTAGTCTGCAAGAAAGTTTGTGGAGATCCCTGGCCAGAAGTACAAGAGC	5900
5901	ACTAACCTGCTAATACTCTTTAAAGTAAAGTCTTTCTAGGTTTCTCAGACCCAAAATTTTATTTGGGAATGATACAATGGGGTAAAGTAAACAACAGCA	6000
6001	CCTCCAGATAGTTAATATCATTTTTGTAGCTCTGAAACAGTTTCAAGGGTAAATATAGTCTAAAGTTACTTTATTTTATTTGCCTTGGAGTATGTATGTT	6100
6101	ATGATGGAGGTCCACCTGGCCCTTAAACATGCATGTGGAGGTCAGAGCAACTCTGTAGTCAGCTCTCTCCCTCCACTTTATAGGATTTCCAGGGATGGA	6200
6201	ACTCAGGGCATCAATCTTGTGCACGAAATGTTCTTACCTACTTTGTGTAGCTGTGTAAGTAAACTTGGGGGGCTGGAGAGATGGCTCAAGTGTAAAGAG	6300
6301	CACTGACTGCTCTCTTAGGCTCTGAGTCAAATCCCAGCAATCATATAAATATTATAAATAAATTTAAAAAAGAAATCAAACCTTGGGTTGT	6400
6401	CAGGCTTAGTAGCAGGTCATTTACATGATGAGCAGCATCATCTCTAGCCCTGCTAAATCTTTCATTTATAGTGACTAGTGAGAAAAGTTGTTAGTAT	6500
6501	TTATTTTGCATCTAAAACGTAAGGAAATAGAGGTAATCAGAATGCTTAAATGTTTGGTTCTCATGTTTGGTTATTTTTCAGATTGTATATAAACATTTT	6600
6601	TTTAAACATCATGTAGTATAAAGATAGGAGGCTTGGCCCAATCTGTATGATAAGATAAAGTAGAGCCAGCTATAAAGACGCAACAGAGGTTAATAG	6700
6701	GAGTAGAATGTTTCCAAAGTCCCAGATTCAATTTCTAGACCCATAAACAATCTTTAAGTTGTCCATAACATGTTTGTAGCTTTAGACTTTAACCCTCTC	6800
6801	TTTAGGCTCAGGTACCATGCATGCATGTGTACACAGATATACACATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA	6900
6901	AGCACTAAGGAGACGAGGAGCAGGTTGATCTCTGTGAGGTCAAGGCTAGCCTGGTCTACAGAAGTAGTTCTGGGGACAGCTAAGACTCCCCAACAATG	7000
7001	TTGTCTTGAACAAGGGGAAAAAGTAGTTTTAGCTTTTGTGAGCTTAGCCTGTGTTTTATGTTCTTCAGTGAAGATTACTTTGCAAAAAAATGTA	7100
7101	AGAAGAAGCAGACGAAAGTGAAGCTAAATTAAGAGCTAAACCTAAAGTCTGTTGACTTCTTTGTGACATTCTTAATTTTCTTAATGTTTTGACAAGT	7200
7201	TTAAGTATGTTATTTGGGCAAGCCGATGATGAGCTTTGAAATGAGTGGTAATGGCTCTGCCAGTATGGTAAATGAAATGTTGGCCCTCAAGTACCTTG	7300
7301	ATCAACCATTTTGTCTGGTGTGTATGATGTTGAAAAAGAAAAAACCCTCAAGGACTGTGTTGATGAAATGGGTGGTGTAAATGTTCAAGGTTATGTAAG	7400
7401	TATAAACACATTATAATCATAAGACATTTGTTTTTGAAGCATGAAGGAAGACACAAGCCAGGAAGTACTGAAACCTAAAGTACTAATAACTAAAACATG	7500
7501	AGATAATTTAAGGTAGAATTTTTTTTTTGAAGTTACATTTTGTGTGTGTGTGTATGTTGGTACACCGTTACATGCCACTGCAATTTGTGTACAGGT	7600
7601	CAGAAGTCTCCATGTGTATCCAGGGATTACAGTCAGGTTGTAGCCTGGCAATAAGCACTTTTACCATTACCCGCTGACCAATCTGCTGGCCGAGATA	7700
7701	GAGTCTCACTATGTAAGTCTAGCTGGCTAGAAATGGCTATGTAGATCAGTAGGCCTCACATTTGGAGACATACACCTGATTTACCTCCAGCTACTGG	7800
7801	GATTTAAGAAAGGCACATACCACATGTCCAATGTATGCTGTACATGTTACCTGACCAACTATATACATTATGCCCTGAGCAGCTGTGTGAGGAC	7900
7901	CCTGTGAGAAATGTTTGTAGTGTGTGCATTTAGTGTGTGCATGATACACATACTGTTATCTGGGATTTATTAATAGCAGATAGTTATTAACCATCACTA	8000
8001	TAGAAGAACTAAAGTAAAGCCTTTGTAAGACATGACAGCCGAGACGAATACACAGTTTCACTGCATTAAGTAGTCTGATATATCTTTTCTTATGTA	8100
8101	GGTATAGAAATGACTTGAAGCATTTTGGTGTGAGTGTGACTTAAAGAAAGGCTTTGATGGCTGTATATTTTATAGAGAGCTTGAAGGAAAGATGGGA	8200
8201	TGCTTACTGAAGTTTTCAGGTGACTTGGATGACCAGACCTGTAGAGAAGATTACACTTCTTTCTCAAATCATGGTGAATAAATAAATGGGTGCATTTG	8300
8301	CCAGAGGAGCAAAAGCCTTTGGAACAATTTGTCTCTTATTAGCAATGCTTTAAAAGTCTGTAGAATGTTATCTTCTAGAAGAAAAATATTATAGAA	8400
8401	AGTAGTTGTTTTAAAACTAGTTGTTATAAAGCATGTTAATGAAATAGTTCCTAATTAGTCATTTACTTTTGTCTTTGGTCCCTTAATTTAGATGTGATG	8500
8501	TCTTTCCCTCCTTGTGCAGATGGTAAATGCTGACGTTGAAACAAGATTGGGAGGACAGGTATGAAAATGAAAATAGAAAATAACAGATGAGAA	8600
8601	AGGTGTGTGGAGGGTACGTAAGAAAATTTGCAGACTACAAAATAAAGAGTGAACAATTTCAATTTTCTCTTGTATGTGTAGCTGAAATTAATCTCTCAAAG	8700
8701	AAAGGCTAAGGAAGCACTTGAAGAAAGCAGAAATGCAATAATGTAACCTACTGTTAAGGAACAAGAAAGGTGACTTGGAAAGTACTAGAAGGACATGCG	8800
8801	SAAAAAGAAGCATTGAAAAAATCACAGATGATCAGCAAGAATCCCTAAACAATGGAAGTCAAAAAGAGGGCATGCAGGTGGAAGATTAAAGGAAGCGC	8900
8901	ATGTTTTTACAGCAGCCCGCAGATTTAAAGAAAAGGGAAGGTAATAGCCCTGGTTATGCTGGGCCACCCAAAGGAAGGACAGTTTCACTGGAAGGAG	9000
9001	CAAGATTTGATGATGATGATCGTCTGCTGTGCTAAAGTCTTTACTAATCTTGGGAGCGAAATCTATAGTAAAGTACTATTTCTCTGTCTAAGTGATA	9100
9101	TTCTTGAATTAGTACCCTCTCTTCTGCTGTTATTTTCAAGAGTAGAGGTTGGTTGAAAAGATAAATTTAGAGATCAAAAGGAAGACTACTTAAAGGAAA	9200
9201	GCTTTCTCTTGAAGGGAAGATGCATTTTTTTTTTAAAGAGGCTATTACCAATACTGTAATCTGTTATTAATAAACAAGTCAACAGTGAATTTAAACA	9300
9301	AAATTTATGTTTAAATACGACCAATGAAAGAGGAGAGATGGAAGAGACAGAGAACCCGCATCAAGCATTAAGAAAGAGAAAATGGTGTAGAG	9400
9401	ACAAGTAGTTTATTTAGTAAAGCAGTGTTTTTTACTTCTTTAGTATTGATTTTAAAGTCTTTTGTGCTTCAAGAAAGTAAAGGCAATGAGGTCC	9500
9501	ACTTCGATGCTACCTGTATAAAGGAAAAATTTGTTTACTTCTTTTGTGATCAATCAAGTTTTTAAATGATAGTTCTGTTTGTGTTGGATGATTAA	9600
9601	AAATAGAGAAGGAAGATTTCTCTCTTAATTTGCTTTGAAATAGAGAATGATATAGTACAGATTTGAAAATATATACTGTATAAAAAATAGCCAATAGTTT	9700
9701	TTTCTCTTTTTTATTTCTCTTAAAAAGCTTTCATAAAGAACTTCAACTAAAATATTAGCTCTTGGAGTATAAAGCCCTTCTCCACAGCTAATTTGTCTA	9800
9801	ATCTCTCATGCTACTTTATATTTTACCATTTACCTTGGTAAAGAGTAAATACCAATTAACAAGCTTTTGAATACTGGATGTACACAGACTACAATTGG	9900
9901	AAAACCTTACAGATTTCTTTTATGAAAGTTGTATAATGCTGTGATAGATCAATCGAAGCTCTGTAAAAAAGAAAGCCCGACA	10000

B) Untersuchung der murinen La/SS-B-mRNAs bzw. La/SS-B-cDNAs

5.2 Northern-Blotting

Mittels der Northern-Blot-Technik sollte eine Größenbestimmung der murinen La/SS-B-mRNAs erfolgen. Dazu wurde total-RNA aus NIH-3T3-Zellen isoliert (4.24), elektrophoretisch aufgetrennt (4.25) und auf eine Trägermembran übertragen (4.25). Der spezifische Nachweis der murinen La/SS-B-mRNAs erfolgte durch Hybridisierung mit einer Dig-markierten murinen La/SS-B-cDNA-Sonde, die mit dem AK anti-Dig AP-Konjugat (3.13) nachgewiesen wurde (4.25). Die Sonde wurde mit den Primern La-Murin-RT-PCR-Vor und La-Murin-RT-PCR-Rück (3.20) aus einer cDNA-Vorlage hergestellt, die aus total-RNA von NIH-3T3-Zellen mit dem Oligo(dT)-Primer durch RT-PCR erhalten wurde (4.20). Mit diesen Primern wurde ein 1285 bp großes PCR-Fragment amplifiziert, das nur den codierenden Leserahmen der La/SS-B-mRNA enthielt (Exon 2–11). Dadurch konnte die Sonde an alle La/SS-B-mRNA-Isoformen binden, da diese nur in ihren 5'-UTRs verschieden waren. Eine Unterscheidung der La/SS-B-mRNA-Isoformen war jedoch nur möglich, wenn dies das Auftrennungsvermögen des Northern-Blottings zuließ. Mit einem Dot Blot (4.33) wurde die Effizienz der Sondenmarkierung überprüft. Die Detektion der murinen La/SS-B-mRNAs ist in Abb. 6 dargestellt. Wie zu erkennen war, konnte nur eine einzelne Bande mit einer Laufhöhe von ca. 1,8 kb detektiert werden, die mit großer Wahrscheinlichkeit ein Gemisch aus den verschiedenen murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen darstellte.

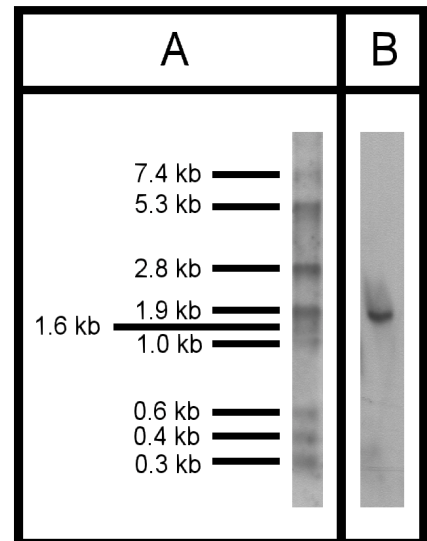


Abb. 6: Detektion der murinen La/SS-B-mRNA im Northern-Blot
 A) RNA-Marker (3.15)
 B) La/SS-B-mRNA-Isoformen

5.3 *In situ*-Hybridisierung

Durch die Technik der *in situ*-Hybridisierung (4.33) sollte festgestellt werden, ob es sich bei den murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen um fertig gesplissene, zytoplasmatische mRNAs handelte. Die *in situ*-Hybridisierung wurde an NIH-3T3-Zellen durchgeführt, da diese ein relativ großes Zytoplasma besaßen, wodurch eine zytoplasmatische Detektion der mRNAs vereinfacht wurde. Außerdem sollten die Zellen eine Konfluenz von weniger als 50% besitzen, wodurch das Kern-Zytoplasmaverhältnis zu Gunsten des Zytoplasmas verschoben war, da die Zellen Ausläufer ausbilden konnten. Zur Unterscheidung der drei murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen wurden die Oligo-Sonden so gewählt, dass diese jeweils spezifisch an eine der drei Isoformen

banden. Die Sonde Ex1a-antisense (3.20) erkannte die *splice*-Übergangssequenz zwischen dem Exon 1a und 2 und detektierte somit die Exon 1a-mRNA-Isoform. Die Sonde Ex1b-antisense (3.20) sollte in der Sequenz der 27 Nukleotiden binden, um die das Exon 1b im Vergleich zum Exon 1a verlängert war, und detektierte somit die Exon 1b-mRNA-Isoform. Die Sonde Ex1c-antisense (3.20) band an ein Sequenzstück des Exon 1c und detektierte somit die Exon 1c-mRNA-Isoform. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurden als Kontrollen die Sonden Ex1a-sense, Ex1b-sense und Ex1c-sense hergestellt, die nicht binden sollten. Des weiteren wurden Zellen nur mit dem Nachweisreagenz behandelt, um unspezifische Reaktionen bei der Nachweidfärbung auszuschließen. Alle Sonden wurden Dig-markiert (4.33), so dass sie nach Bindung an ihre spezifische mRNA-Sequenz mit dem AK anti-Dig AP-Konjugat (3.13) im NBT-X-Phosphat-System (4.33) nachgewiesen werden konnten. Mittels eines Dot Blots (4.33) wurde die Effizienz der Sondenmarkierung überprüft. In Abb. 7 ist die lichtmikroskopische Auswertung der *in situ*-Hybridisierung dargestellt.

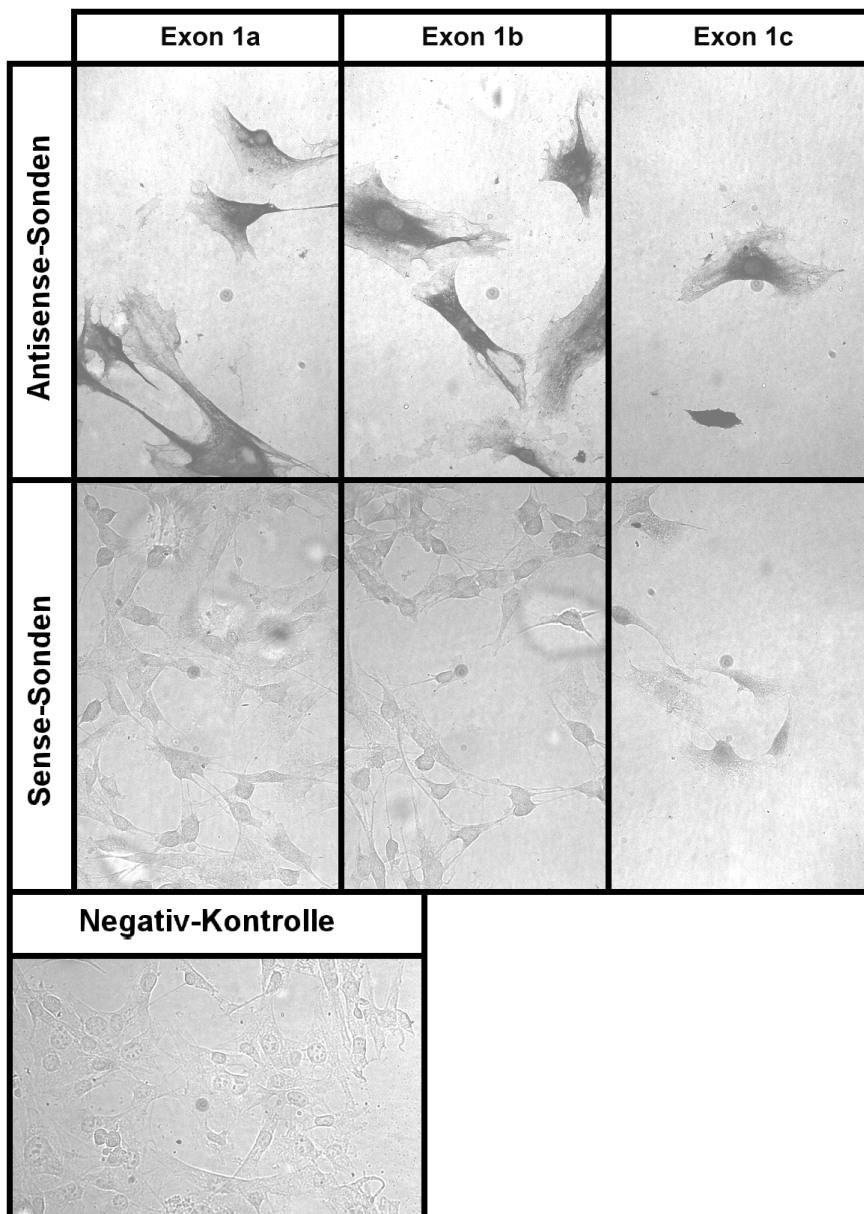


Abb. 7: *In situ*-Hybridisierung der murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen an NIH-3T3-Zellen

Die Zellen wurden bei 400x Vergrößerung dokumentiert.

Mit allen *antisense*-Sonden konnten die jeweiligen murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen im Zytoplasma detektiert werden. Damit stellten die murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen fertig gesplissene, zytoplasmatische mRNAs dar. Mit den *sense*-Sonden konnten keine mRNAs detektiert werden. Ebenso war keine Färbung der Negativ-Kontrolle zu erkennen, die nur mit Nachweisreagenz behandelt worden war.

5.4 Expressionsanalyse der mRNA-Isoformen

In diesem Versuch sollte die Expression der drei murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen in verschiedenen Geweben von Balb/c-Mäusen (3.18), Balb/c-Mausembryonen (3.18), murinen Zellkulturen (3.8) und murinen Primärzellen (3.8) mit der RT-PCR-Technik (4.20) untersucht werden. Von Interesse war hierbei, ob eine gewebe- bzw. zellspezifische Expression festzustellen war. Daher musste bei dieser Methode gewährleistet sein, dass sich die drei murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen eindeutig voneinander unterscheiden ließen.

Um bei Zellkulturen eine mögliche proliferationsabhängige Expression feststellen zu können, wurden die Zellen so ausgesät, dass diese zum Zeitpunkt der RNA-Präparation eine Konfluenz von mehr als 80% bzw. weniger als 50% besaßen oder im undifferenzierten bzw. differenzierten Stadium vorlagen. Zur Differenzierung waren zwei der verwendeten Zelllinien befähigt, die C2C12-Myoblasten und die PCC7-Mz1-Zellen. Während sich die C2C12-Zellen nach einigen Tagen von selbst zu Muskelgewebe differenzierten, benötigten die PCC7-Mz1-Stammzellen zur Differenzierung zu neuronalen Zellerivaten des PNS (BERGER *et al.*, 1997) 0,1 μ M *all-trans*-Retinsäure (RA) und 1 mM dibutyryl-cAMP (dbcAMP) als Zusatz zum Kulturmedium. Undifferenzierte bzw. differenzierte PCC7-Mz1- und C2C12-Zellen wurden zur Verfügung gestellt (3.8).

Aus den murinen Zellmaterialien wurde total-RNA isoliert (4.24) und diese durch reverse Transkription (4.20) in cDNA umgeschrieben. Dies erfolgte mit dem nach stromaufwärts gerichteten Oligo(dT)-Primer (3.20), dessen Poly(dT)-Sequenz homolog zum Poly(A)-Trakt von eukaryontischen mRNAs war. Dadurch wurden alle mRNAs in cDNA umgeschrieben, die einen Poly(A)-Trakt besaßen. Bei der anschließenden PCR (4.18) wurde größtenteils der 5'-Bereich der cDNAs, der sich zwischen den drei mRNA-Isoformen unterschied, durch spezifische La/SS-B-mRNA-Isoform-Primer amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass die amplifizierten PCR-Fragmente eine Größe zwischen 350 und 400 bp besaßen, was die Auftrennung eng zusammenliegender Banden bei der DNA-Agarosegel-Analyse (4.9) unter Verwendung eines 2%igen LMP-Agarosegels (4.9.1) begünstigte.

Für jede La/SS-B-mRNA-Isoform sollte ein eigenes Primerpaar konstruiert werden. Für die Exon 1a- und Exon 1c-Isoform war dies möglich, nicht jedoch für die Exon 1b-Form, da der Vorwärtsprimer in der 27 bp langen Sequenz hätte liegen müssen, um die das Exon 1b im Vergleich zum Exon 1a verlängert war. Diese Sequenz bot dafür aber keine optimalen

Voraussetzungen. Daher wurde das Primerpaar, das zur Detektion der Exon 1a-Isoform diente, auch zur Detektion der Exon 1b-Isoform genutzt. Somit wurden die Exon 1a- und Exon 1b-Isoform gleichzeitig in einem PCR-Ansatz nachgewiesen. Die Unterscheidung dieser beiden Isoformen erfolgte im Agarosegel durch den Laufunterschied von 27 bp.

Zur Detektion der Exon 1a-Form bzw. Exon 1b-Isoform wurden zwei Primerpaare konstruiert (1. Primerpaar: La-mRNA-F1 und La-mRNA-R1; 2. Primerpaar: La-mRNA-F2 und La-mRNA-R1), um die Nachweischancen zu erhöhen, da mit beiden Primerpaaren bei verschiedenen Geweben bzw. Zellkulturen die Effizienz der cDNA-Amplifikation unterschiedlich war. Die mit dem 1. Primerpaar La-mRNA-F1 und La-mRNA-R1 (3.20) amplifizierte Exon 1a-Form besaß eine Größe von 376 bp, die Exon 1b-Form eine Größe von 398 bp. Die mit dem 2. Primerpaar La-mRNA-F2 und La-mRNA-R1 (3.20) amplifizierte Exon 1a-Form besaß eine Größe von 349 bp, die Exon 1b-Form eine Größe von 371 bp.

Wenn im Agarosegel zwei Banden detektiert werden konnten, so bedeutete dies, dass sowohl die Exon 1a- als auch die Exon 1b-Isoform exprimiert wurden. War auf dem Agarosegel dagegen nur eine Bande zu erkennen, so musste festgestellt werden, um welche Isoform es sich dabei handelte. Dazu wurde die cDNA aus dem Agarosegel eluiert (4.12), durch T/A-Klonierung (4.14.2) in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-T (3.10) inkloniert und mit den Standard-Primern T7, SP6 und/oder T3 (3.20) sequenziert (4.17).

Mit den beiden Primern La-mRNA-F3 und La-mRNA-R1 (3.20) wurde die Exon 1c-Isoform in einem eigenen PCR-Ansatz amplifiziert. Die mit dieser Primerkombination amplifizierte cDNA besaß eine Größe von 362 bp.

Um festzustellen, ob die PCR unter den gewählten Bedingungen erfolgreich sein konnte und um eine Degradation der total-RNA auszuschließen, wurden für jedes Gewebe bzw. Zellkulturen als Positiv-Kontrollen PCR-Fragmente mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren amplifiziert. Zum einen wurde mit den Primern GAPDH-Vor und GAPDH-Rück (3.20) ein Bereich der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) amplifiziert. Dieses PCR-Fragment besaß eine Größe von ca. 500 bp und sollte immer in allen Geweben bzw. Zellkulturen detektierbar sein, da es sich bei der GAPDH um ein essentielles, permanent exprimiertes Haushaltsgen handelte, das eine wichtige Funktion in der Glycolyse ausübte.

Außerdem wurde mit den Primern La-Murin-RT-PCR-Vor und La-Murin-RT-PCR-Rück (3.20) ein PCR-Fragment von La/SS-B amplifiziert, das nur den codierenden Leserahmen (Exon 2–11) enthielt. Dieses PCR-Fragment besaß eine Größe von 1285 bp. Da mit dieser Primerkombination keine Isoform-spezifischen PCR-Produkte amplifiziert wurden, konnte mit dieser RT-PCR festgestellt werden, ob eine generelle La/SS-B-mRNA-Expression stattfand.

Die Agarosegele zur Analyse der PCR-Fragmente aus verschiedenen Mausgeweben und Mausembryonen sind in Abb. 8 dargestellt. In Abb. 9 finden sich die Agarosegele zur Analyse der PCR-Fragmente aus murinen Zellkulturen und Primärzellen mit einer Konfluenz von >80% bzw. <50% oder im undifferenzierten bzw. differenzierten Stadium.

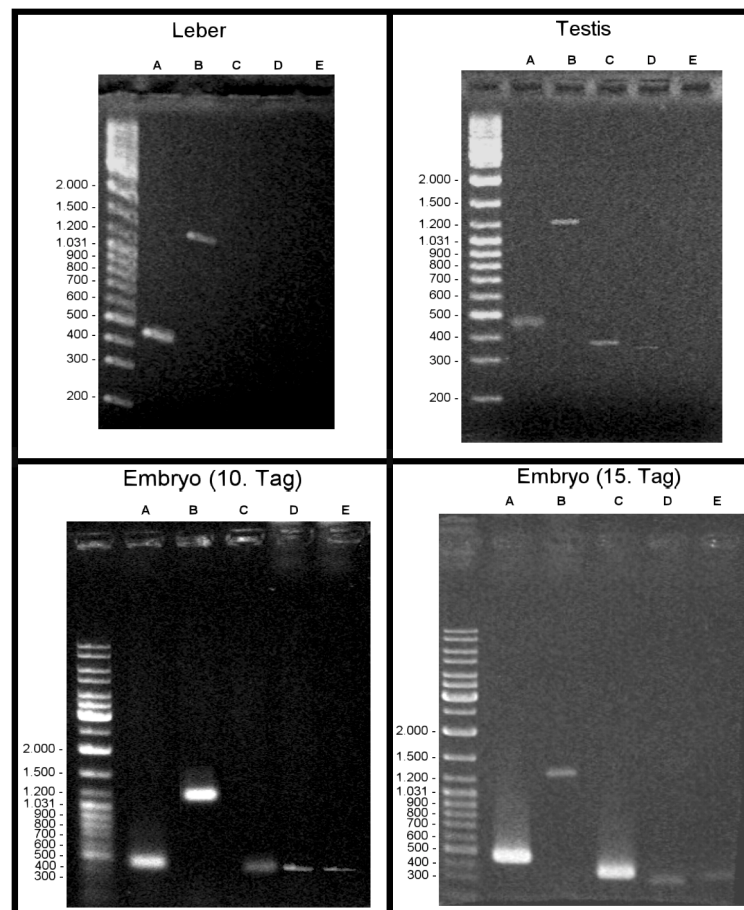
Für die Abb. 8 und 9 galt folgende Auftragsreihenfolge: In Laufspur (A) wurden die

PCR-Produkte des Primerpaares GAPDH-Vor und GAPDH-Rück und in Laufspur (B) die PCR-Produkte des Primerpaares La-Murin-RT-PCR-Vor und La-Murin-RT-PCR-Rück aufgetragen. In Laufspur (C) fanden sich die PCR-Produkte des Primerpaares La-mRNA-F1 und La-mRNA-R1 und in Laufspur (D) die PCR-Produkte des Primerpaares La-mRNA-F2 und La-mRNA-R1. In Laufspur (E) waren die PCR-Produkte des Primerpaares La-mRNA-F3 und La-mRNA-R1 enthalten. Als Marker wurde immer der GeneRuler DNA Ladder (3.14) verwendet.

Wie in Abb. 8 und 9 zu erkennen war, konnte in Laufspur (A) die spezifische GAPDH-Bande mit einer Laufhöhe von ca. 500 bp und in Laufspur (B) die PCR-Fragmente der La/SS-B-Kontrolle (Exon 2–11) mit einer Laufhöhe von ca. 1300 bp bei allen untersuchten Proben detektiert werden. Dies zeigte, dass die Durchführung der Versuche unter den gewählten Bedingungen möglich war und dass immer wenigstens eine La/SS-B-mRNA-Isoform exprimiert worden war, was der Beschreibung von La/SS-B als Haushaltsgen entsprach.

In Laufspur (C) konnte bis auf Lebergewebe bei allen Proben eine Einzelbande mit einer Laufhöhe von ca. 400 bp detektiert werden. Bei NIH-3T3-Zellen (<50% konfluent) und P388D1-Makrophagen (<50% konfluent) traten zwei eng zusammenliegende Banden auf.

Abb. 8: Nachweis der murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen in adulten und fetalen Geweben



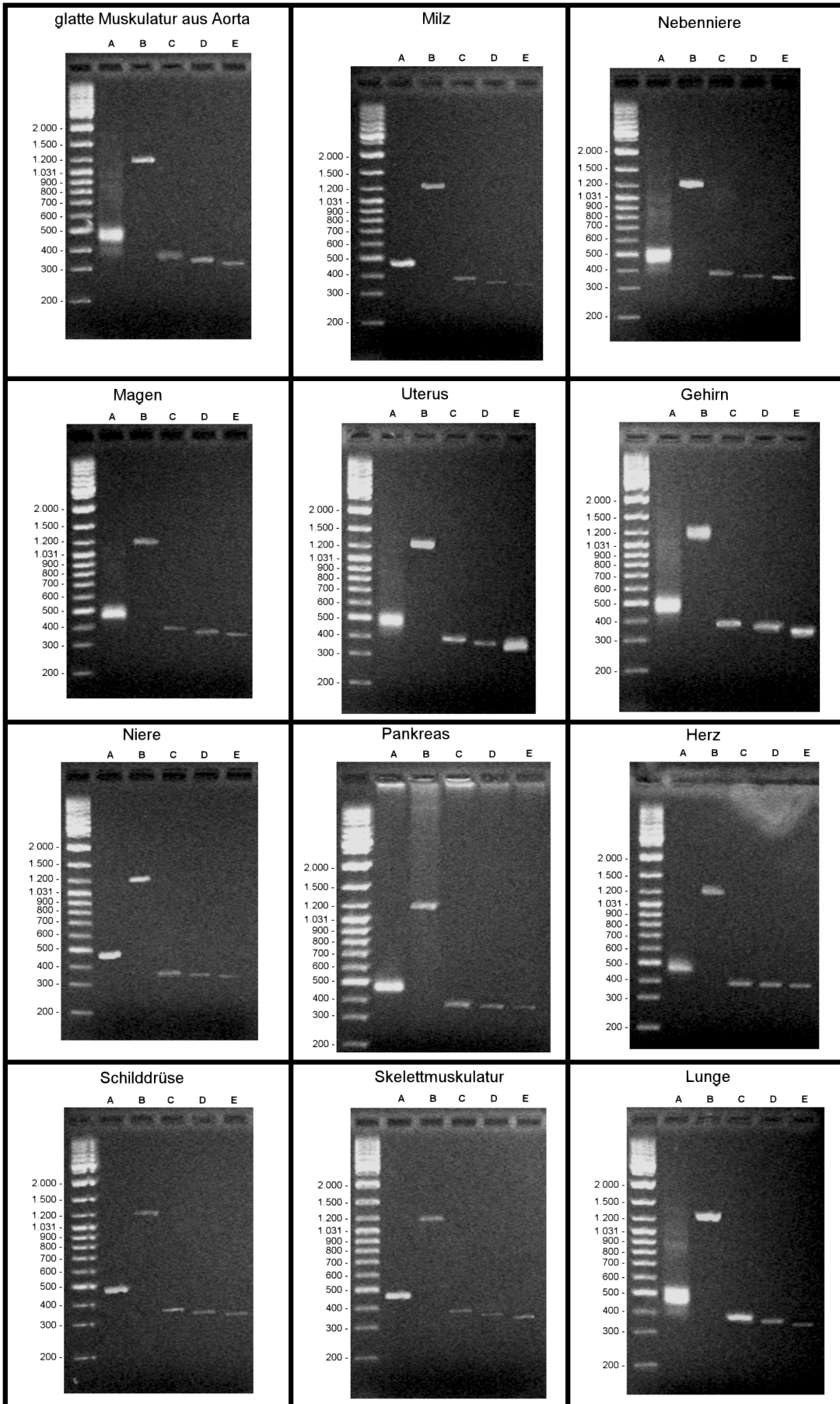
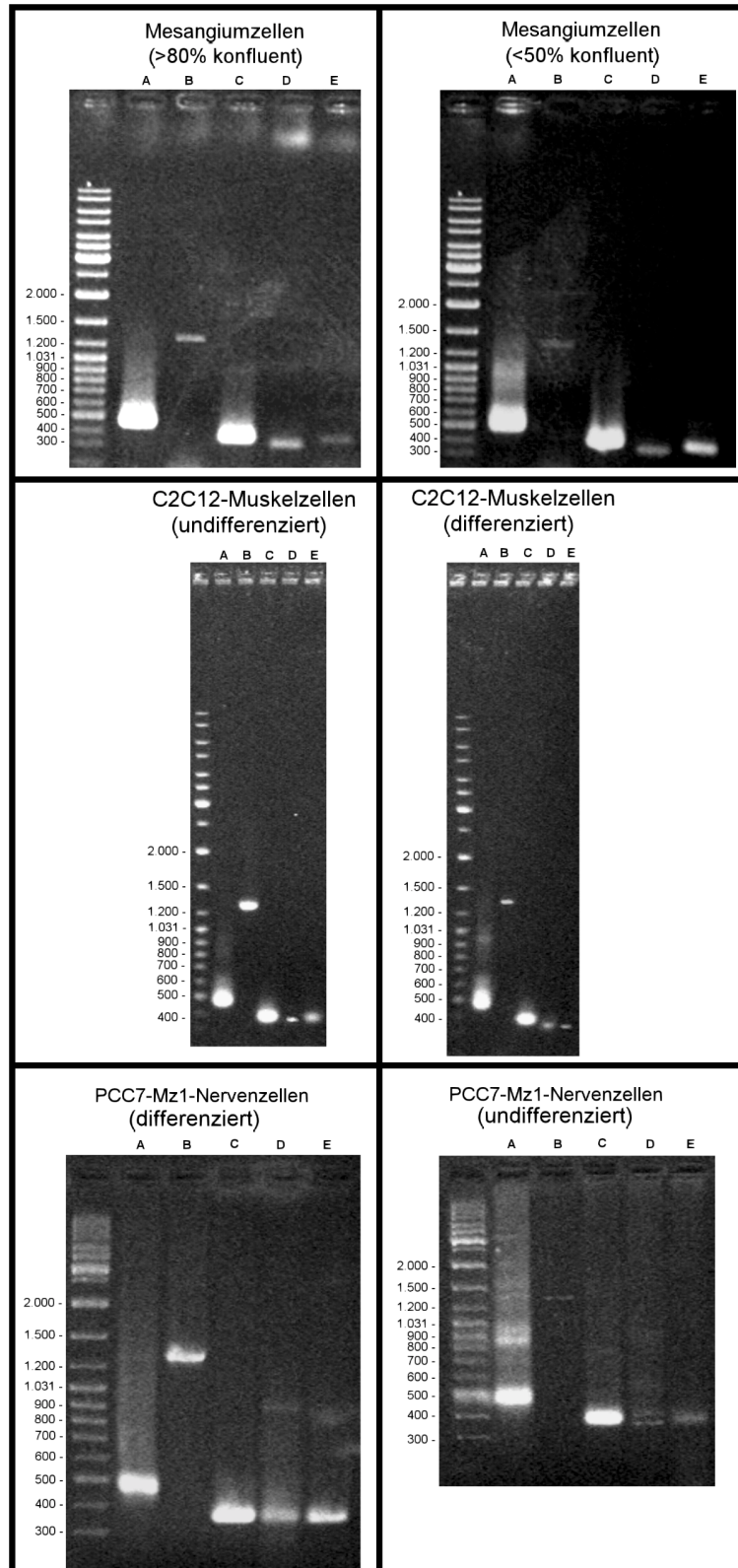
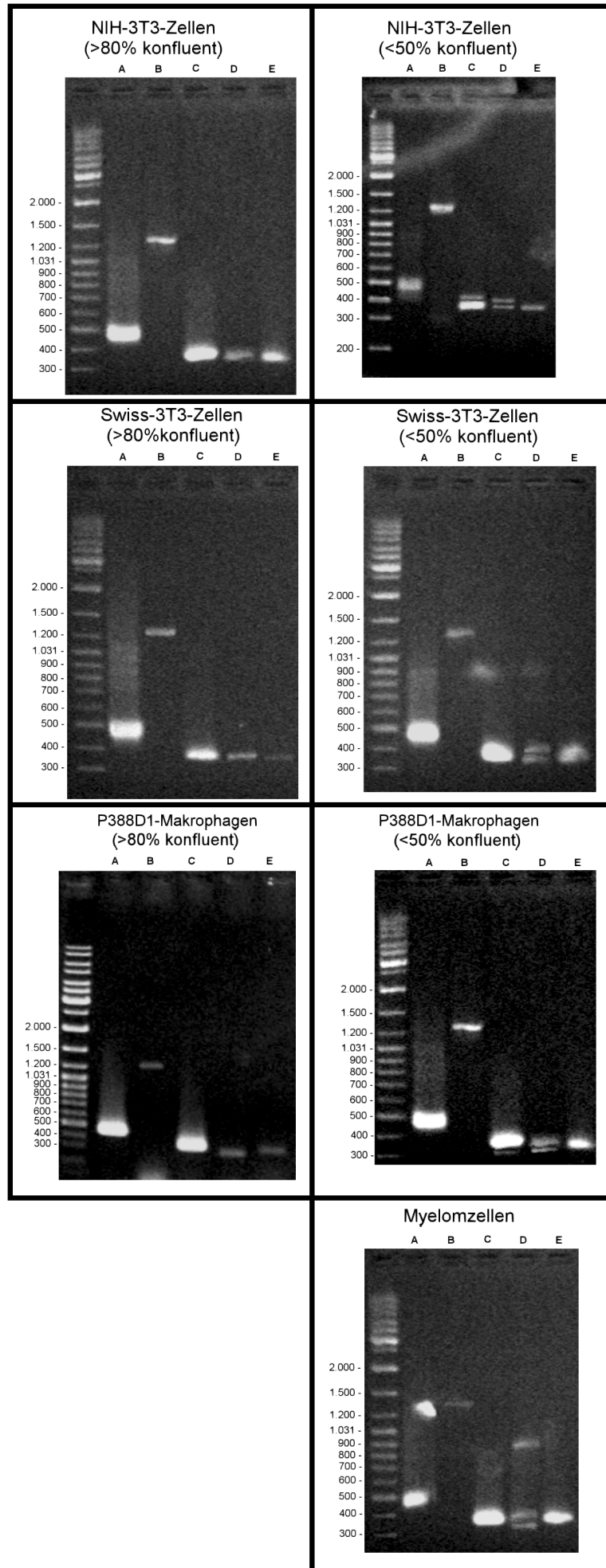


Abb. 9: Nachweis der murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen in Zellkultur- und Primärzellen durch RT-PCR





In Laufspur (D) wurde mit Ausnahme des Lebergewebes bei allen Proben eine Bande bei einer Laufhöhe von ca. 400 bp detektiert. Bei PCC7-Mz1-Nervenzellen (undifferenziert), NIH-3T3-Zellen (<50% konfluent), Swiss-3T3-Zellen (<50% konfluent), P388D1-Makrophagen (<50% konfluent) und Myelomzellen trat zusätzlich eine zweite Bande auf.

Da in Laufspur (C) und (D) die gleichen mRNA-Isoformen amplifiziert wurden, stellte das ungleiche Auftreten der Doppelbanden zunächst einen Widerspruch dar. Eine wahrscheinliche Erklärung war, dass mit dem 1. Primerpaar La-mRNA-F1 und La-mRNA-R1 (Laufspur (C)) die cDNAs zu stark amplifiziert wurden, um zwei einzelne Banden unterscheiden zu können. Dies war dagegen mit dem 2. Primerpaar möglich (Laufspur (D)).

Durch Sequenzierungen wurde festgestellt, dass es sich in Laufspur (C) bzw. (D) bei Einzelbanden und bei der unteren cDNA-Bande von Doppelbanden um die Exon 1a-mRNA-Isoform handelte. Somit stellte die obere cDNA-Bande die Exon 1b-mRNA-Isoform dar.

In Laufspur (E) konnte mit Ausnahme des Leber- und Testisgewebes bei allen Proben die Exon 1c-mRNA-Isoform-Bande mit einer Laufhöhe von ca. 360 bp detektiert werden.

Die erhaltenen Ergebnisse ließen sich kurz wie folgt zusammenfassen: Mit Ausnahme des Leber- und Testisgewebes wurden in allen untersuchten Proben die Exon 1a- und Exon 1c-mRNA-Isoform des murinen La/SS-B exprimiert. PCC7-Mz1-Nervenzellen (undifferenziert), NIH-3T3-Zellen (<50% konfluent), Swiss-3T3-Zellen (<50% konfluent), P388D1-Makrophagen (<50% konfluent) und Myelomzellen exprimierten zusätzlich die Exon 1b-mRNA-Isoform.

5.5 Translationsanalyse der mRNA-Isoformen

Da es sich bei den drei alternativen mRNA-Isoformen des murinen La/SS-B um vollständig gesplissene, zytoplasmatische mRNAs handelte (5.3), die größtenteils ubiquitär exprimiert wurden (5.4), stellte sich hier die Frage nach ihrer Funktion. Wurden die alternativen Isoformen für die Synthese von funktionellem La/SS-B-Protein genutzt oder handelte es sich um eine Art regulatorische und, zumindest auf der Ebene der Translation, nicht-funktionelle mRNAs? Wenn alle alternativen mRNA-Isoformen funktionelles La/SS-B-Protein lieferten, in welchem Ausmaß erfolgte dann die Translation? Im Folgenden sollte untersucht werden, ob alle mRNA-Isoformen gut translatierbar waren und ob es zwischen diesen Unterschiede in der Translationseffizienz gab. Die Überprüfung der Translatierbarkeit erfolgte durch transiente Transfektionen (4.31), die Quantifizierung der translatierten La/SS-B-Proteine durch *in vitro*-Transkription/-Translation (4.46).

5.5.1 Klonierung der eukaryontischen Expressionsvektoren

Zur Translationsanalyse mussten zunächst die drei La/SS-B-mRNA-Isoformen als möglichst vollständige cDNAs aus total-RNA durch RT-PCR hergestellt und in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 (3.10) kloniert werden. In diesem Vektor wurde die Transkription der einklonierten cDNA durch den viralen CMV-Promotor angetrieben.

Um alle La/SS-B-mRNA-Isoformen durch RT-PCR zu erhalten, wurden die NIH-3T3-Zellen so ausgesät, dass diese zum Zeitpunkt der RNA-Präparation eine Konfluenz von weniger als 50% besaßen. Die reverse Transkription erfolgte mit dem nach stromaufwärts gerichteten Oligo(dT)-Primer (3.20), wodurch alle mRNAs in cDNA umgeschrieben wurden, die einen Poly(A)-Trakt besaßen. Bei der sich anschließenden PCR wurden die verschiedenen Isoformen durch La/SS-B-Isoform-spezifische Primer amplifiziert. Dabei musste gewährleistet sein, dass sich die murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen eindeutig voneinander unterscheiden ließen. Die Primer für die RT-PCR wurden so gewählt, dass bei allen mRNA-Isoformen möglichst viele Basen der 5'-Bereiche und des 3'-Bereichs amplifiziert wurden.

Daher konnten nicht für alle drei mRNA-Isoformen verschiedene Primerpaare konstruiert werden, sondern nur zwei. Mit dem ersten Primerpaar Iso-Ex1a/b-Vor und Iso-Ex11-Rück (3.20) wurden die beiden alternativen cDNA-Isoformen mit dem Exon 1a bzw. Exon 1b im gleichen PCR-Ansatz amplifiziert. Die Exon 1a-cDNA besaß eine Größe von 1456 bp, die Exon 1b-cDNA 1483 bp. Diese beiden Isoformen unterschieden sich nur in ihrer Größe, und zwar um die 27 Nukleotide, um die das Exon 1b im Vergleich zum Exon 1a verlängert war. Bei der Analyse dieser PCR-Fragmente im Agarosegel reichte der Laufunterschied von 27 bp bei einer Gesamtgröße von ca. 1500 bp zwischen den cDNA-Isoformen Exon 1a und Exon 1b nicht aus, um beide Bande getrennt darstellen zu können. Selbst bei der Verwendung eines 1%igen LMP-Agarosegels konnten die eng zusammenliegenden Banden nicht scharf voneinander getrennt werden. Somit war eine Unterscheidung dieser beiden cDNA-Varianten nur durch Sequenzierung möglich. Dazu wurde die Bande, die sowohl die Exon 1a- als auch die Exon 1b-Isoform enthielt, aus dem Agarosegel eluiert (4.12) und durch T/A-Klonierung (4.14.2) in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-T (3.10) einkloniert. Mehrere Klone wurden mit den Standard-Primern T7, SP6 und/oder T3 (3.20) so lange sequenziert (4.17), bis ein Exon 1a- und ein Exon 1b-cDNA-Klon gefunden wurde.

Mit dem zweiten Primerpaar Iso-Ex1c-Vor (3.20) und Iso-Ex11-Rück (3.20) wurde die Exon 1c-Variante in einem eigenen PCR-Ansatz amplifiziert. Die Exon 1c-cDNA besaß eine Größe von 1474 bp. Diese Exon 1c-cDNA entsprach der Sequenz, die von TOPFER *et al.* (1993) gefunden wurde. Eine Exon 1c-cDNA, die im Vergleich zur Exon 1c-cDNA von TOPFER *et al.* (1993) an ihrem 5'-Bereich um 146 bp verlängert war (MARRA *et al.*, 1996; unveröffentlicht; *GenBank accession No AA798418*), konnte nicht erhalten werden. Die eluierte cDNA-Bande wurde durch T/A-Klonierung in den Vektor pGEM-T einkloniert.

Als Positiv-Kontrolle wurde mit den Primern La-Murin-RT-PCR-Vor und

La-Murin-RT-PCR-Rück (3.20) ein PCR-Fragment des La/SS-B amplifiziert, das am 5'-Ende mit dem Start-AUG im Exon 2 begann und am 3'-Ende mit dem Stop-Codon endete und somit nur den codierenden Leserahmen enthielt. Somit konnte die Translation nicht durch Exon 1-spezifische 5'-Strukturen beeinflusst werden. Die cDNA wurde durch T/A-Klonierung in den Vektor pGEM-T (3.10) einkloniert.

Für die weitere Klonierung dieser vier cDNAs in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 (3.10) besaßen alle verwendeten Vorwärtsprimer an ihrem 5'-Ende artifizielle *EcoR I*-Restriktionsschnittstellen und alle Rückwärtsprimer an ihrem 3'-Ende artifizielle *Not I*-Restriktionsschnittstellen. Dadurch konnten alle cDNAs durch einen Restriktionsverdau (4.13) mit den Enzymen *EcoR I* und *Not I* (3.4) aus dem PCR-Klonierungsvektor pGEM-T herausgeschnitten und in den Vektor pcDNA3 einkloniert werden, der ebenfalls mit den Enzymen *EcoR I* und *Not I* verdaut wurde. Die durch diese Klonierung entstandenen Konstrukte wurden wie folgt bezeichnet: pcDNA3-Maus-La-Ex1a, pcDNA3-Maus-La-Ex1b, pcDNA3-Maus-La-Ex1c und pcDNA3-La-Murin (Exon 2-11).

Nach Abschluß der Klonierungen wurden alle Bereiche, die durch PCR amplifiziert worden waren, sowie die Klonierungsschnittstellen und Übergänge vom Vektor zur cDNA durch Sequenzierung (4.17) auf Mutationen oder Klonierungsartefakte hin untersucht.

5.5.2 Transiente Transfektion

Die Translationsfähigkeit der drei murinen La/SS-B-cDNA-Isoformen (5.5.1) wurde mit der Technik der transienten Transfektion untersucht. Die Expressionsanalyse wurde in der humanen Zelllinien HeLa (3.8) durchgeführt. Das Zellsystem musste die Voraussetzung erfüllen, dass das durch die hineintransfizierten cDNAs exprimierte murine La/SS-B-Protein vom endogenen, humanen La/SS-B-Protein im Immuno-Blot unterscheidbar war.

Für die Untersuchung der Expression im Immuno-Blot wurden humane HeLa-Zellen (3.8) mit den Vektoren, die unter 5.5.1 kloniert worden waren (pcDNA3-La-Murin (Exon 2-11), pcDNA3-Maus-La-Ex1a, pcDNA3-Maus-La-Ex1b und pcDNA3-Maus-La-Ex1c) transient transfiziert (4.31). Dabei diente das Konstrukt pcDNA3-La-Murin (Exon 2-11) als Positiv-Kontrolle. Zusätzlich wurde als Negativ-Kontrolle der Vektor pcDNA3 transfiziert. Von den Zellen wurden Zellextrakte hergestellt (4.29), in einem 10 %igen SDS-Gel durch Elektrophorese (4.38) aufgetrennt und durch das Western-Blotting auf eine Trägermembran übertragen (4.40). Die Probenvolumina betragen jeweils 20 µl. Für die Detektion der La/SS-B-Proteine wurde der Immuno-Blot mit dem primären mAK 5B9 (3.12) und dem AP-markierten Sekundär-AK anti-Maus-IgG (3.13) im NBT-X-Phosphat-System (4.42) gefärbt. Kreuzreaktivitäten zwischen den AK konnten ausgeschlossen werden, wie Laborerfahrungen gezeigt hatten. Der mAK 5B9 reagierte gleichermaßen mit murinem und humanem La/SS-B-Protein (DRATHEN, 1997). Der Immuno-Blot ist in Abb. 10 dargestellt.

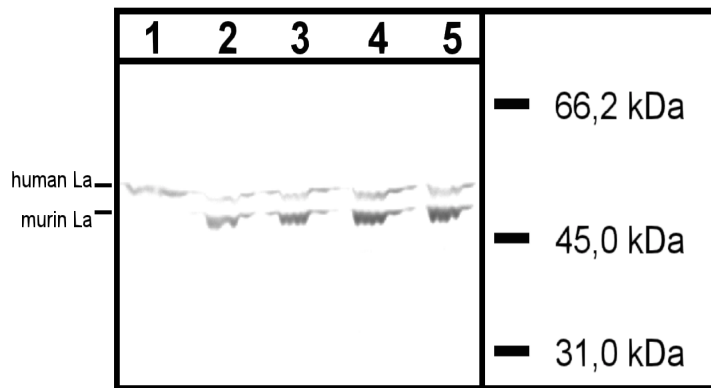


Abb. 10: Immuno-Blot zur Untersuchung der drei murinen 5'-cDNA-Isoformen auf deren Expression bei transients Transfektion in humane HeLa-Zellen

Als Marker wurde der LMW-Marker (3.16) verwendet.

- 1) cDNA3-Vektor
- 2) pcDNA3-La-Murin (Exon 2-11)
- 3) pcDNA3-Maus-La-Ex 1a
- 4) pcDNA3-Maus-La-Ex 1b
- 5) pcDNA3-Maus-La-Ex 1c

In allen fünf Laufspuren war jeweils die endogene, humane La/SS-B-Bande mit einem MW von etwa 50 kDa zu erkennen (obere Bande). Das durch Transfektion exprimierte murine La/SS-B-Protein mit einem MW von etwa 45 kDa konnte in den Laufspuren 2-5 detektiert werden (untere Bande). Somit konnte von allen hergestellten murinen La/SS-B-Konstrukten das La/SS-B-Protein exprimiert werden. Dies ließ den Schluß zu, dass es sich bei allen drei cDNA-Isoformen um exprimierbare, funktionelle cDNAs handelte.

5.5.3 *In vitro*-Transkription/-Translation

Die *in vitro*-Transkription und die *in vitro*-Translation waren biochemische Verfahren, bei denen eukaryontische mRNAs zellfrei, d.h. unter Verwendung entsprechend aufbereiteter Zellextrakte, *in vitro* transkribiert und translatiert wurden. Hier sollte die *in vitro*-Transkription/-Translation zur genauen Bestimmung der Translationseffizienz der drei La/SS-B-cDNA-Isoformen eingesetzt werden. In dem gewählten Verfahren liefen die Transkription mit der T7-Polymerase und die Translation in Reticulozyten-Lysat in Gegenwart von an ihrer ϵ -Aminogruppe mit Biotin gekoppelten Lysin-tRNA in einem Ansatz ab (4.46).

Verwendet wurden die unter 5.5.1 klonierten Konstrukte pcDNA3-La-Murin (Exon 2-11), pcDNA3-Maus-La-Ex1a, pcDNA3-Maus-La-Ex1b und pcDNA3-Maus-La-Ex1c. Dabei diente das Konstrukt pcDNA3-La-Murin (Exon 2-11) als Positiv-Kontrolle. Um unspezifische Translationen ausschließen zu können, wurde als Negativ-Kontrolle der Vektor pcDNA3 eingesetzt. Die *in vitro* translatierten Produkte wurden mit dem mAK 5B9 immunpräzipitiert, durch ein 10%iges SDS-Gel (4.38) aufgetrennt und mit Streptavidin-POD im ECL-Färbesystem detektiert (4.43). Damit der Blot densitometrisch ausgewertet werden konnte, mussten in allen Laufspuren vergleichbare Mengen aufgetragen werden. Hierbei betragen die Probenvolumina 20 μ l (4.46). Der Immuno-Blot ist in Abb. 11 dargestellt.

Bei der Positiv-Kontrolle in Laufspur 2 und bei den La/SS-B-cDNA-Isoformen in den Laufspuren 3-5 konnte die La/SS-B-Bande mit einem MW von etwa 45 kDa detektiert werden. Daneben ließen sich noch schwächere Banden erkennen. Bei der Negativ-Kontrolle in Laufspur 1 waren keine Banden zu sehen. Somit konnten offensichtlich alle unspezifischen

Proteine aus dem Reticulozyten-Extrakt durch die Immundepletion entfernt werden. Die *in vitro*-Transkription/-Translation bestätigte die aus der transienten Transfektion (5.5.2) erhaltenen Ergebnisse, dass es sich bei allen drei La/SS-B-cDNA-Isoformen um exprimierbare, funktionelle cDNAs handelte.

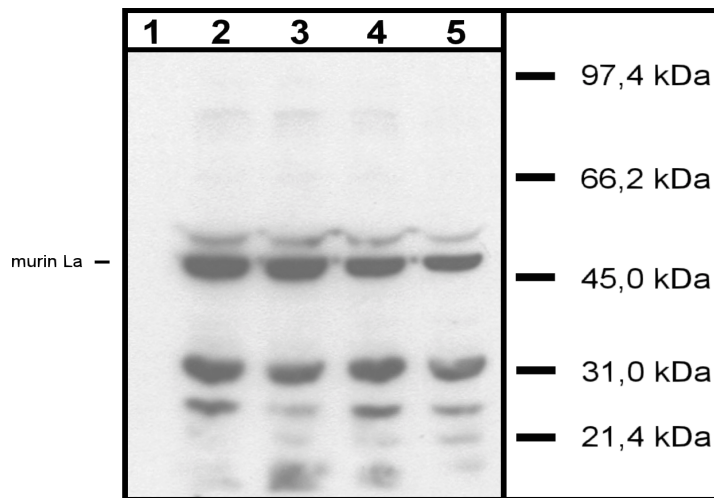


Abb. 11: Immuno-Blot zur Untersuchung der drei murinen 5'-cDNA-Isoformen auf deren Expression in der *in vitro*-Transkription und *in vitro*-Translation

Als Marker wurde der LMW-Marker (3.16) verwendet.

- 1) pcDNA3-Vektor
- 2) pcDNA3-La-Murin (Exon 2-Exon 11)
- 3) pcDNA3-Maus-La-Ex 1a
- 4) pcDNA3-Maus-La-Ex 1b
- 5) pcDNA3-Maus-La-Ex 1c

Zur Quantifizierung wurden die La/SS-B-Protein-Banden mit dem Programm Molecular Analyst (3.17) ausgewertet. Die Banden wurden durch einen Rahmen eingegrenzt und die Intensität der Schwärzung innerhalb des Rahmens im Vergleich zum Hintergrund des Blots berechnet. Die grafische Darstellung dieser Auswertung ist in Abb. 12 dargestellt.

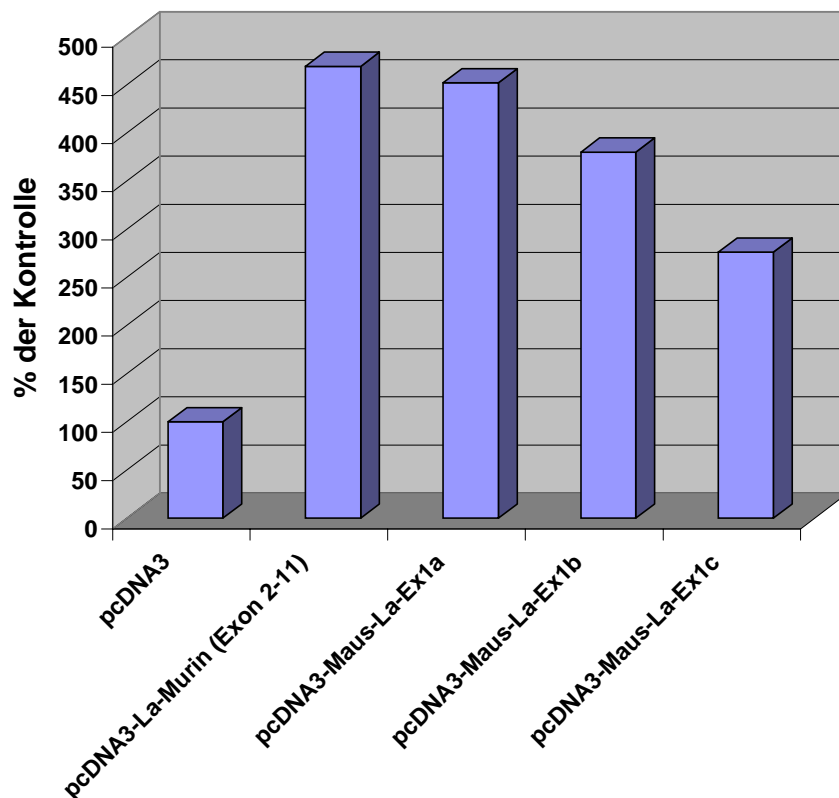


Abb. 12: Grafische Darstellung der densitometrischen Auswertung der murinen La/SS-B-Proteinbanden

Die ermittelten OD-Werte sind in Prozent der Kontrolle (pcDNA3; Laufspur 1) dargestellt.

Anhand der ermittelten OD-Werte konnte festgestellt werden, dass alle *in vitro* transkribierten La/SS-B-mRNAs annähernd mit gleicher Effizienz translatiert wurden. Die Konstrukte pcDNA3-La-Murin (Exon 2-11) und pcDNA3-Maus-La-Ex1a wurden fast gleich gut translatiert. Die Konstrukte pcDNA3-Maus-La-Ex1b und pcDNA3-Maus-La-Ex1c wurden etwas schwächer translatiert. Größere Differenzen in der Expression konnten allerdings nicht festgestellt werden.

5.6 Lokalisationsanalyse des murinen La/SS-B-Proteins bei transienter Überexpression

Das La/SS-B-Protein wird heute in der Literatur weitgehend als nukleäres Protein beschrieben (BACHMANN *et al.*, 1986a). Von GRÖLZ und BACHMANN (1997e) war für das humane La/SS-B-Protein gezeigt worden, dass es zu einer Translokation vom Kern in das Zytoplasma kommen konnte, wenn es in NIH-3T3-Zellen von der alternativen Exon 1'-cDNA überexprimiert wurde. Dagegen zeigten Zellen, transfiziert mit der klassischen Exon 1-cDNA, auch bei Überexpression weiterhin die nukleäre La/SS-B-Protein-Lokalisation.

Daher stellte sich die Frage, ob für das murine La/SS-B-Protein, wenn es von einer bestimmten murinen La/SS-B-cDNA-Isoform translatiert wurde, ebenfalls eine zytoplasmatische Proteinlokalisierung festgestellt werden konnte.

Um dies zu untersuchen, wurden die unter 5.5.1 hergestellten cDNA-Konstrukte pcDNA3-Maus-La-Ex1a, pcDNA3-Maus-La-Ex1b und pcDNA3-Maus-La-Ex1c in NIH-3T3-Zellen transient transfiziert (4.31). Eine mögliche zytoplasmatische Detektion des murinen La/SS-B-Proteins wurde durch das große Zytoplasma der dieser Zellen begünstigt.

Um auszuschließen, dass NIH-3T3-Zellen von sich aus eine zytoplasmatische La/SS-B-Protein-Lokalisation aufwiesen oder dass eine Translokation des La/SS-B-Proteins vom Kern in das Zytoplasma infolge der Transfektion stattfand, wurde als Negativ-Kontrolle der Vektor pcDNA3 transfiziert. Um auszuschließen, ob eine veränderte Lokalisation auf Grund der Transfektion erfolgte, die nicht auf eine bestimmte cDNA-Isoform zurückzuführen war, wurde das Konstrukt pcDNA3-La-Murin (Exon 2-11) transfiziert.

Zur Detektion der Translationprodukte wurde der mAK 5B9 verwendet, mit dem allerdings das endogene, murine La/SS-B-Protein nicht von dem überexprimierten Protein unterschieden werden konnte. Transfizierte Zellen ließen sich von nicht-transfizierten nur dadurch unterscheiden, dass einige Zellen infolge der Transfektion vergrößert waren.

Damit überprüft werden konnte, ob die Transfektion unter den gewählten Bedingungen erfolgreich verlaufen war, wurde als Positiv-Kontrolle das Konstrukt pCI-La-Voll-dHis (3.10) transfiziert. Der darin enthaltene Leserahmen codierte für das humane La/SS-B-Protein. Dieses konnte mittels des La/SS-B-spezifischen mAK SW5 (3.12) eindeutig vom endogenen, murinen La/SS-B-Protein unterschieden werden, da der mAK SW5 nur humanes La/SS-B-Protein detektierte, nicht aber murines.

30 h nach Beginn der Transfektion wurden die Zellen in Methanol/EGTA fixiert (4.32), die Translationsprodukte immunzytochemisch mit den mAK 5B9 bzw. SW5 (3.12) und einem mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markierten anti-Maus-AK (3.13) nachgewiesen und durch Epifluoreszenz-Mikroskopie (4.34) analysiert. Laborerfahrungen zufolge konnten Kreuzreaktivitäten zwischen den AK ausgeschlossen werden. Die Immunfluoreszenzfärbungen sind in Abb. 13 dargestellt.

Die Immunfärbung in Bild (F) der Abb. 13 zeigte, dass die Transfektion unter den gewählten Bedingungen erfolgreich verlaufen war, da das humane La/SS-B-Protein im Zellkern detektiert werden konnte. Eine zytoplasmatische Translokation des endogenen, murinen La/SS-B-Proteins infolge der Transfektion konnte nicht festgestellt werden (Abb. 13: Bild (A)). Wie die Bilder (B) bis (E) der Abb. 13 zeigten, konnte in allen Zellen das murine La/SS-B-Protein mit der typischen, nukleären Lokalisation nachgewiesen werden. Infolge der Transfektion vergrößerte Zellen waren nur teilweise zu erkennen (Abb. 13).

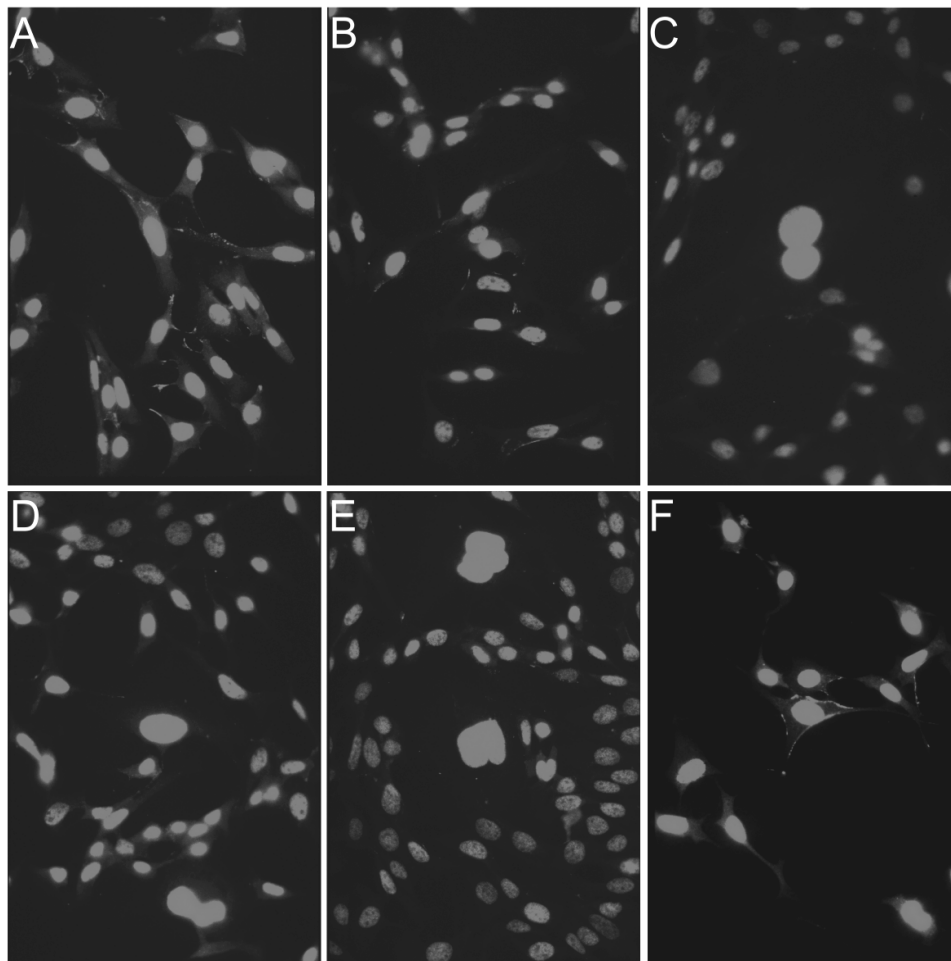


Abb. 13: Immunzytochemische Fluoreszenzfärbung von La/SS-B nach transienter Transfektion der murinen 5'-cDNA-Isoformen in NIH-3T3-Zellen

A) pcDNA3-Vektor; B) pcDNA3-La-Murin (Exon 2-11); C) pcDNA3-Maus-La-Ex 1^o;
 D) pcDNA3-Maus-La-Ex 1b; E) pcDNA3-Maus-La-Ex 1c; F) pCI-La-Voll-dHis
 Detektion mit dem mAK 5B9: A), B), C), D), E); Detektion mit dem mAK SW5: F)
 Die Zellen wurden bei 400x Vergrößerung dokumentiert.

5.7 Untersuchung der mRNA-Isoformen auf das Vorkommen einer IRES

Zum eindeutigen Nachweis einer möglichen internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) in cDNAs war nur der dicistronen-Test anerkannt. Hierbei wurden zwei exprimierbare, funktionelle cDNAs mit einem Initiator- und einem Stop-Codon hintereinander gesetzt. Nach der Transkription entstand eine dicistrone mRNA, bei der zwei vollständige Leserahmen (Cistrons) hintereinander auf einer mRNA lagen. Nach dem *scanning*-Modell band die 40S-Untereinheit des Ribosoms an die 5'-Kappe der dicistronen mRNA, lief bis zum ersten geeigneten Start-AUG, verband sich dort mit der 60S-Untereinheit und translatierte den ersten Leserahmen. Am Stop-Codon des ersten Leserahmens wurde die Translation unterbrochen, und das Ribosom zerfiel wieder in seine Untereinheiten. Zu einer internen Initiation am Start-AUG des zweiten Leserahmens konnte es bei eukaryontischen Zellen nicht mehr kommen, es sei denn, der zweite Leserahmen enthielt IRES-Elemente (SARNOW *et al.*, 1995).

5.7.1 Klonierung der dicistronen Konstrukte

Zur Untersuchung einer möglichen internen Initiation am Start-AUG im Exon 2 der murinen La/SS-B-cDNA-Isoformen sollten für die Transfektion in humane HeLa-Zellen geeignete dicistrone Vektoren mit den verschiedenen 5'-UTRs der murinen La/SS-B-cDNAs hergestellt werden. Als funktionelle, dicistrone cDNAs wurden Konstrukte, bestehend aus dem Leserahmen der bakteriellen Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) (GORMAN *et al.*, 1982) und dem Leserahmen der murinen La/SS-B-cDNAs mit den verschiedenen 5'-UTRs angestrebt. Der CAT-Leserahmen sollte als eigenständiger, offener Leserahmen vor dem offenen Leserahmen der jeweiligen murinen La/SS-B-cDNA-Isoformen kloniert werden.

Grundlage dieser Klonierungen bildeten die unter 5.5.1 hergestellten Konstrukte pcDNA3-Maus-La-Ex1a, pcDNA3-Maus-La-Ex1b und pcDNA3-Maus-La-Ex1c. Die Primer für die PCR der La/SS-B-cDNA-Isoformen (5.5.1) waren so gewählt worden, dass möglichst viele Basen der unterschiedlichen 5'-Bereiche und des 3'-Bereichs amplifiziert wurden, da eventuell vorhandene IRES-Elemente sowohl im 5'- als auch im 3'-Bereich lokalisiert sein konnten. Die genaue Position ist bis heute jedoch nicht geklärt. Zur Herstellung der CAT-Konstrukte wurden die unter 5.5.1 hergestellten Konstrukte mit den Restriktionsenzymen *EcoR I* und *Not I* verdaut. Alle zur Herstellung der pcDNA3-Konstrukte verwendeten Vorwärtsprimer besaßen an ihrem 5'-Ende artifizielle *EcoR I*-Restriktionsschnittstellen und alle Rückwärtsprimer an ihrem 3'-Ende artifizielle *Not I*-Restriktionsschnittstellen. Die herausgeschnittenen cDNAs wurden in den Vektor pCI einkloniert, der mit den Enzymen *EcoR I* und *Not I* verdaut worden war. Die entstanden Konstrukte erhielten die Bezeichnungen pCI-Ex1a-Maus-La, pCI-Ex1b-Maus-La und pCI-Ex1c-Maus-La (Abb. 14).

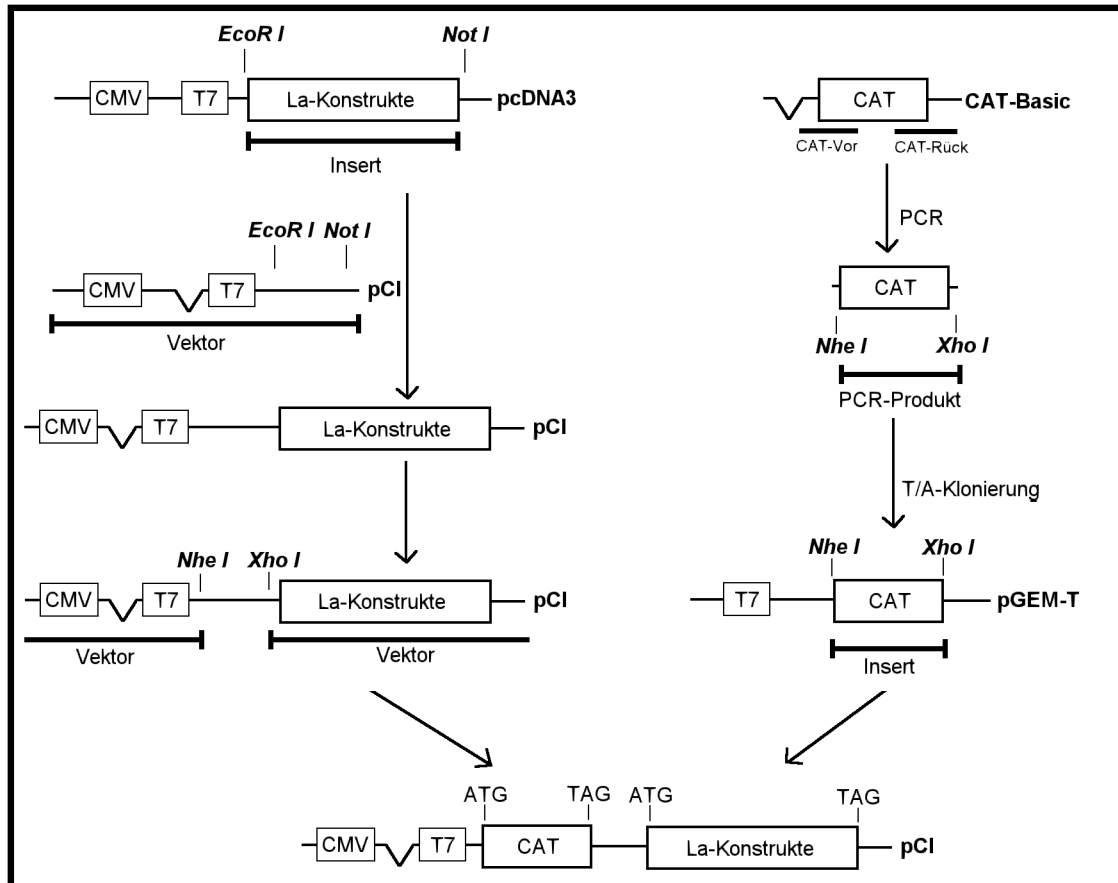


Abb. 14: Klonierungsschema der murinen dicistronen CAT-La/SS-B-cDNA-Konstrukte

Grundlage zur Herstellung eines Kontrollkonstrukts war der Klon *pcDNA3-La-Murin* (Exon 2-11) (5.5.1), dessen *La/SS-B-Insert* mit dem Start-AUG im Exon 2 begann und am 3'-Ende mit dem Stop-Codon endete und somit nur den codierenden Leserahmen ohne die alternativen 5'-Anfänge enthielt. Das Konstrukt *pcDNA3-La-Murin* (Exon 2-11) wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoR I* und *Not I* verdaut, da dies die unter 5.5.1 verwendeten Primer auf Grund der artifiziellen Restriktionsschnittstellen zuließen. Die herausgeschnittene cDNA wurden in den Vektor *pCI* inkliert, der mit den Enzymen *EcoR I* und *Not I* verdaut worden war, wobei das Konstrukt *pCI-La-Murin* (Exon 2-11) (Abb. 14) entstand.

Als Ausgangskonstrukt für die Herstellung des *CAT-Leserahmens* diente der Vektor *CAT-Basic* (3.10). Die PCR (4.18) zur Amplifizierung der *CAT-cDNA* wurde mit den Primern *CAT-Vor* und *CAT-Rück* (3.20) durchgeführt. Die amplifizierte *CAT-cDNA* besaß eine Größe von 648 bp. Die Primer wurden so gewählt, dass die *CAT-cDNA* mit dem Start-AUG begann und mit dem Stop-Codon endete. Die *CAT-cDNA* wurde durch *T/A-Klonierung* in den PCR-Klonierungsvektor *pGEM-T* (3.10) inkliert. Der *CAT-Vorwärtsprimer* besaß an seinem 5'-Ende eine artifizielle *Nhe I*-Restriktionsschnittstelle und der *CAT-Rückwärtsprimer* eine artifizielle *Xho I*-Restriktionsschnittstelle. Dadurch konnte die *CAT-cDNA* mit diesen beiden Enzymen herausgeschnitten und in die zuvor hergestellten *pCI-Konstrukte* inkliert werden, die ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *Nhe I* und *Xho I* verdaut worden waren. Die *Nhe I*- und *Xho I*-Restriktionsschnittstellen waren im Vektor *pCI* so gelegen, dass die *CAT-cDNA* vor

den verschiedenen La/SS-B-cDNAs kloniert werden konnte (Abb. 14).

Zusätzlich sollte ein pCI-Konstrukt kloniert werden, das nur den CAT-Leserahmen enthielt. Dazu wurde der Vektor pCI mit den Restriktionsenzymen *Nhe I* und *Xho I* verdaut und die CAT-cDNA einkloniert, die ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *Nhe I* und *Xho I* verdaut worden war. Das dabei entstandene Konstrukt erhielt die Bezeichnung pCI-CAT.

Am Ende der Klonierungen standen folgende Konstrukte zur transienten Transfektion in HeLa-Zellen (5.7.2) zur Verfügung: pCI-CAT-Ex1a-Maus-La, pCI-CAT-Ex1b-Maus-La, pCI-CAT-Ex1c-Maus-La, pCI-CAT-La-Murin (Exon 2-11) und pCI-CAT.

Nach Abschluß der Klonierungen wurden alle Bereiche, die durch PCR amplifiziert worden waren, sowie die Klonierungsschnittstellen und Übergänge vom Vektor zur cDNA durch Sequenzierung (4.17) auf Mutationen oder Klonierungsartefakte hin untersucht.

5.7.2 Transiente Transfektion und Immuno-Blotting

Als Modellsystem zur Untersuchung einer möglichen internen Initiation der Translation der drei murinen La/SS-B-cDNA-Isoformen diente die humane Zelllinie HeLa (3.8). Dabei musste die Voraussetzung erfüllt sein, dass eine Unterscheidung des endogenen, humanen La/SS-B-Proteins und des eventuell durch eine interne Initiation translatierten murinen La/SS-B-Proteins möglich war. Für die Untersuchung des murinen La/SS-B-Proteins im Immuno-Blot wurden humane HeLa-Zellen (3.8) mit den Vektoren, die unter 5.7.1 kloniert wurden, transient transfiziert (4.31).

30 h nach Beginn der Transfektion wurden aus den transfizierten Zellen Zellextrakte hergestellt (4.29) und diese in einem 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (4.38). Die Probenvolumina betragen jeweils 20 µl. Danach erfolgte der Transfer der Proteine durch das Western-Blotting (4.40) auf eine PVDF-Membran. Die Detektion der humanen bzw. murinen La/SS-B- und CAT-Proteine konnte gleichzeitig erfolgen, da alle Proteine verschiedene MW besaßen und daher in der SDS-PAGE Laufunterschiede aufwiesen. Zur Detektion der La/SS-B-Proteine wurde der mAK 5B9 (3.12) verwendet, mit dem sowohl endogenes, humanes La/SS-B-Protein detektiert werden konnte, als auch murines La/SS-B-Protein (DRATHEN, 1997). Der polyklonale Digoxigenin-markierte anti-CAT-AK (3.12) detektierte nur die Chloramphenicol-Acetyltransferase. Kreuzreaktivitäten zwischen den AK konnten ausgeschlossen werden (GRÖLZ, 1998; PAUTZ, 1998). Die primären Immunkomplexe wurden mit den AP-konjugierten Sekundär-AK anti-Dig (3.13) und anti-Maus-IgG (3.13) im NBT/X-Phosphat-System (4.42) sichtbar gemacht. Die verwendeten Sekundär-AK waren bereits dahingehend charakterisiert worden, dass sie keine Kreuzreaktivitäten zeigten (PAUTZ, 1998). Der Immuno-Blot ist in Abb. 15 dargestellt.

Um den Laufunterschied zwischen endogenem, humanem La/SS-B-Protein (ca. 50 kDa) und murinem (ca. 45 kDa) zu verdeutlichen, wurde in Laufspur 1 ein NIH-3T3-Zellextrakt und in

Laufspur 2 ein HeLa-Zellextrakt aufgetragen (Abb. 15).

In Laufspur 3 (Abb. 15) wurde ein Extrakt aus mit pCI-CAT transfizierten HeLa-Zellen aufgetragen. Hierbei konnte das endogene, humane La/SS-B-Protein bei etwa 50 kDa (obere Bande) und das CAT-Protein mit einem MW von ca. 29 kDa (untere Bande) detektiert werden.

In Laufspur 4 (Abb. 15) mit pCI-CAT-La-Murin (Exon 2-11) transfizierten HeLa-Zellen, konnten nur das endogene, humane La/SS-B-Protein und das CAT-Protein nachgewiesen werden, nicht aber das murine La/SS-B-Protein. Die Expression des zweiten Leserahmens (murines La/SS-B) hätte nur möglich sein können, wenn IRES-Elemente innerhalb des codierenden La/SS-B-Leserahmens lagen. Da die Translation nicht durch Exon 1-spezifische 5'-Strukturen beeinflusst werden konnte, konnten sich potentielle IRES-Elemente nur noch in den verschiedenen 5'-UTRs der murinen La/SS-B-cDNAs befinden.

In den Laufspuren 5-7 (Abb. 15) konnte das endogene humane La/SS-B-Protein (obere Bande) und das CAT-Protein als Translationsprodukt des ersten Leserahmens (untere Bande) detektiert werden. Das murine La/SS-B-Protein mit einem MW von etwa 45 kDa ließ sich als Translationsprodukt des zweiten Leserahmens in keinem Fall detektiert (Abb. 15). Somit enthielten die verschiedenen 5'-UTRs der murinen La/SS-B-cDNAs nicht die Information, die für eine interne Translationsinitiation verantwortlich waren.

Das CAT-Protein konnte im Vergleich zum endogenen, humanen La/SS-B-Protein in allen transfizierten HeLa-Zellextrakten in höherer Konzentration detektiert werden (Abb. 15), was für eine gut gelungene Transfektion gewertet werden konnte.

Zusammengefasst ließ sich folgendes feststellen: In allen dicistronen Konstrukten wurde nur der erste der beide Leserahmen (CAT-Leserahmen) exprimiert. In keinem Fall wurde das zweite, für La/SS-B codierende Cistron, translatiert. Dies ließ den Schluß zu, dass die murinen La/SS-B-cDNAs keine IRES besaßen und die Translation nicht durch interne Translationsinitiation am Start-AUG im Exon 2 erfolgte.

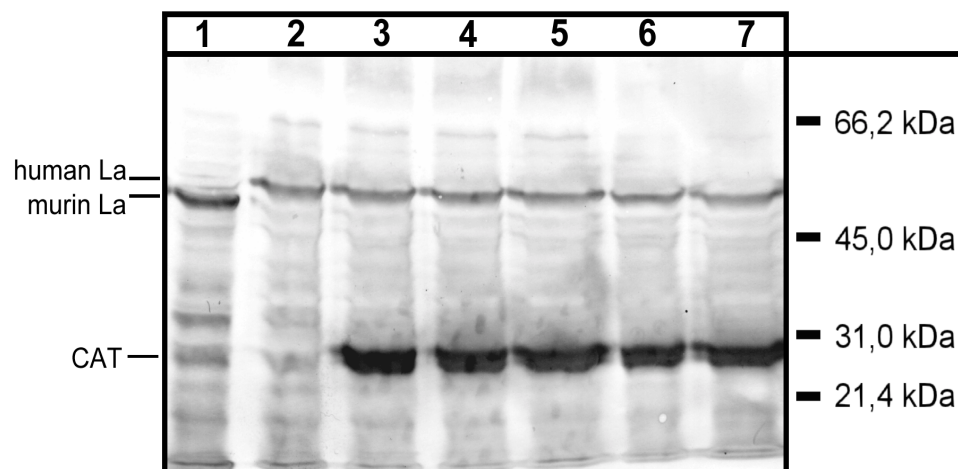


Abb. 15: Immuno-Blot zur Untersuchung einer IRES nach transienter Transfektion der drei murinen 5'-cDNA-Isoformen humaner HeLa-Zellen

Als Marker wurde der LMW-Marker (3.16) verwendet.

1) NIH-3T3-Zellextrakt; 2) HeLa-Zellextrakt; 3) pCI-CAT; 4) pCI-CAT-La-Murin (Exon 2-Exon 11); 5) pCI-CAT-Maus-La-Ex1a; 6) pCI-CAT-Maus-La-Ex1b; 7) pCI-CAT-Maus-La-Ex1c

5.8 Suche nach weiteren mRNA-Isoformen

5.8.1 Suche nach weiteren alternativen 5'-mRNA-Isoformen durch 5'-RACE

Bisher wurden drei murine La/SS-B-mRNA-Isoformen gefunden (TOPFER *et al.*, 1993; *GenBank accession No.* L00993; *GenBank accession No.* Y07951), die sich nur in ihren 5'-UTRs unterschieden. Mittels des 5'-RACE (4.21), mit dem unbekannte 5'-Enden von mRNAs amplifiziert werden konnten, wurde nach weiteren La/SS-B-5'-UTR-Transkripten gesucht.

Verwendet wurden total-RNA-Präparationen (4.24) von NIH-3T3-Zellen, deren Konfluenz weniger als 50% betrug. Mit dem nach stromaufwärts gerichteten genspezifischen Primer (GSP1) La-Murin-P5 (3.20) wurde selektiv nur ein Teilstück der La/SS-B-mRNAs durch reverse Transkription (4.20) in cDNA umgeschrieben. Bei der ersten PCR wurden mit dem Vorwärtsprimer AAP (3.20) und dem Rückwärtsprimer La-Murin-P5R diese cDNA-Teilstücke amplifiziert. Die anschließende *nested*-PCR zur Erhöhung der Spezifität wurde mit dem weiter innen liegenden GSP2-Rückwärtsprimer Maus-mRNA-R1 (3.20) und dem Vorwärtsprimer AUAP (3.20) durchgeführt. Durch die Wahl des AAP und AUAP als Stromaufwärts-Primer wurde keine Selektion auf Exon 1a-, 1b- oder 1c-cDNAs getroffen.

Der gesamte PCR-Ansatz wurde in einem 1%igen LMP-Agarosegel (4.10) analysiert. Meist war nur ein Schmier über die ganze Laufspur zur erkennen. Nur einmal konnten drei dominierende Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die cDNA eluiert (4.12) werden. Allerdings liefen diese cDNAs unter der zu erwartenden Laufhöhe von 401 bp (Exon 1a), 428 bp (Exon 1b) bzw. 395 bp (Exon 1c). Die isolierten PCR-Fragmente wurden in den Klonierungsvektor pGEM-T (3.10) subkloniert (4.14.2) und einzelne Klone mit den Standard-Primern T7, SP6 und/oder T3 (3.20) sequenziert (4.17). Die Sequenzierungen zeigten, dass es sich um die bereits beschriebenen cDNAs handelte. Von den 5'-UTRs waren aber nur noch wenige Nukleotide erhalten, dass gerade noch eine Identifizierung der cDNA-Isoformen möglich war. Somit wurden weitere 5'-Isoformen nicht gefunden. Vermutlich stellten die bisher gefundenen murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen die längsten Transkripte dar.

5.8.2 Suche nach *splice*-mRNA-Isoformen durch RT-PCR

Mittels RT-PCR (4.20) sollte untersucht werden, ob murine La/SS-B-mRNA-Isoformen existierten, die alternative mRNA-*splice*-Transkripte darstellten. Z.B. wurde bei einer mRNA-Isoform des Ro52/SS-A das Exon 4 durch alternatives *splicing* entfernt (CHAN *et al.*, 1995). Auch dem humanen La/SS-B-Pseudogen 3 fehlte das Exon 3 (GRÖLZ *et al.*, 1997c).

Für die RT-PCR wurden total-RNA-Präparationen (4.24) von NIH-3T3-Zellen verwendet, deren Konfluenz weniger als 50% betrug. Die reverse Transkription (4.20) erfolgte mit dem Oligo(dT)-Primer (3.20), wodurch alle mRNAs mit einem Poly(A)-Trakt in cDNAs

umgeschrieben wurden. Mit den Primern La-Murin-RT-PCR-Vor und La-Murin-RT-PCR-Rück (3.20) wurde ein PCR-Fragment des La/SS-B amplifiziert, das am 5'-Ende mit dem Start-AUG im Exon 2 begann und am 3'-Ende mit dem Stop-Codon endete und somit nur den codierenden Leserahmen enthielt. Der gesamte PCR-Ansatz wurde in einem 1%igen LMP-Agarosegel (4.9.1) so weit aufgetrennt, dass Banden mit geringen Laufunterschieden getrennt voneinander darstellbar waren. Außer der erwarteten Bande bei 1285 bp waren jedoch keine weiteren Banden zu erkennen. Somit konnten keine mRNA-*splice*-Transkripte gefunden werden.

C) Untersuchung des murinen La/SS-B-Proteins

5.9 Bakterielle Expression

5.9.1 Klonierung des bakteriellen Expressionsvektors

Zur Herstellung von rek. murinem La/SS-B-Protein musste der La/SS-B-Leserahmen in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert werden. Die Expression sollte im bakteriellen System erfolgen, da sich hierbei in kurzer Zeit größere Proteinmengen gewinnen ließen.

Für die Klonierung eines bakteriellen, murinen La/SS-B-Expressionsvektors standen der Klon pcDNA3-La-Murin (Exon 2-11) (5.5.1) und der bakterielle Expressionsvektor pET28a (3.10) zur Verfügung. Die RT-PCR-Primer (3.20) zur Herstellung des Konstrukts pcDNA3-La-Murin (Exon 2-11) waren so gewählt worden, dass die La/SS-B-cDNA am 5'-Ende mit dem Start-AUG im Exon 2 begann und am 3'-Ende mit dem Stop-Codon endete (3.20). Die Primer wurden so konstruiert, dass die La/SS-B-cDNA *in frame* mit dem N-terminal gelegenen Start-AUG und His-*tag* des pET28a-Vektors durch eine *EcoR I/Not I*-Restriktionsverdau kloniert werden konnte (4.13). Der N-terminal gelegene His-*tag*, bestehend aus sechs Histidin-Resten, war für die Proteinaufreinigung über eine Ni-NTA-Agarosesäule notwendig (4.36). Bei dieser Klonierung wurde das Konstrukt pET28a-La-Murin (Exon 2-11) erhalten. Vor der Transformation dieses Konstrukts in Expressionsbakterien des Stammes BL21 (4.16), wurde es durch Sequenzierung auf seine Korrektheit hin überprüft (4.17).

5.9.2 Expression und Aufreinigung

Nach Expression des rek. His-*tag*-Fusionsproteins in BL21-Bakterien (4.35) und der Herstellung von bakteriellem Protein-Totalextrakt (4.35), erfolgte die Affinitätsreinigung mittels einer Ni-NTA-Säule (4.36). Bei der Affinitätsreinigung wurde der kompetitiven Effekt von Imidazol genutzt, das als Histidin-Analogon Histidin-Reste von der Säule verdrängte. Durch

einen Waschschrift mit Imidazol in niedriger Konzentration (10 mM) wurden unspezifisch gebundene, bakterielle Proteine von der Säule entfernt. Insgesamt wurden zehn Waschfraktionen zu je 2 ml aufgefangen. Die Elution des rek. His-*tag*-Fusionsproteins von der Säule erfolgte mit Imidazol in höherer Konzentration (150 mM). Hierbei wurden drei Eluatfraktionen zu je 2 ml erhalten. Da Imidazol nicht die Proteinstruktur beeinflusste, war das rek. His-*tag*-Fusionsprotein nativ.

5.9.3 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Die Überprüfung der Qualität und Quantität der Proteinexpression und Affinitätsreinigung erfolgte durch eine 10%ige SDS-PAGE (4.38) und anschließender Färbung des SDS-Gels mit Coomassie-Brillant-Blau (4.39). Aufgetragen wurden jeweils 5 μ l des Totalextrakts, der ersten beiden Waschfraktionen, die erfahrungsgemäß den meiste Anteil an bakteriellen Proteinen enthielten, und der drei Eluatfraktionen.

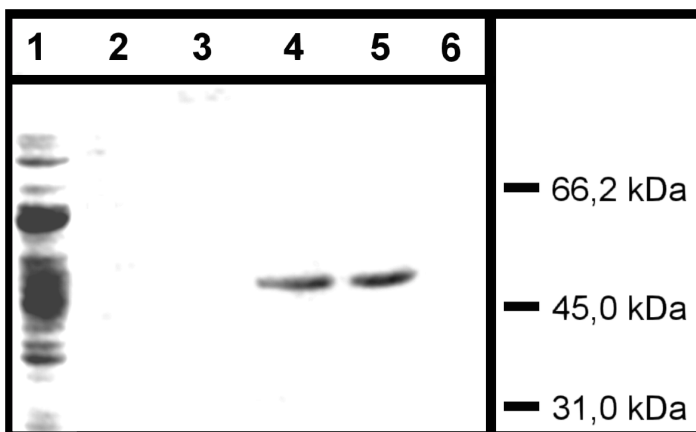


Abb. 16: SDS-Gel zur murinen La/SS-B-Proteinexpression

Als Marker wurde der LMW-Marker (3.16) verwendet.

- 1) Totalextrakt
- 2) 1. Waschfraktion mit bakt. Proteinen
- 3) 2. Waschfraktion mit bakt. Proteinen
- 4) 1. Eluatfraktion mit rek. murinem La/SS-B-Protein
- 5) 2. Eluatfraktion mit rek. murinem La/SS-B-Protein
- 6) 3. Eluatfraktion mit rek. murinem La/SS-B-Protein

Im Totalextrakt (Abb. 16: Laufspur 1) ließen sich viele Proteine nachweisen. In den Waschfraktionen (Abb. 16: Laufspur 2 und 3) waren keine Proteine zu erkennen, da wahrscheinlich durch das kontinuierliche Waschen eine so große Verdünnung eingetreten war, wodurch die Proteinkonzentration unter die Coomassie-Brillant-Blau-Nachweisgrenze gefallen war. Das rek. His-*tag*-Fusionsprotein war nur in den ersten beiden der drei Eluatfraktionen detektierbar (Abb. 16: Laufspuren 4, 5 und 6). Wahrscheinlich konnte es nur auf Grund der Nachweisgrenze der Coomassie-Färbung nicht mehr in der dritten Eluatfraktion nachgewiesen werden. Das MW des rek. His-*tag*-Fusionsproteins lag etwas über 45 kDa, was auf die zusätzlichen AS des pET28a-Vektors (darunter auch der His-*tag*) zurückzuführen war.

Die Quantität des rek. His-*tag*-Fusionsproteins ließ sich im Vergleich mit den Markerbanden mit bekannten Proteinkonzentrationen im SDS-Gel abschätzen. Bei einer Auftragsmenge von 5 μ l ergab sich eine Gesamtproteinkonzentration von etwa 0,5 mg/ml.

5.9.4 Western-Blotting und Immundetektion

Zur Überprüfung der Immunogenität des rek. His-*tag*-Fusionsproteins wurden jeweils 2 µl des Totalextrakts, der ersten beiden Waschfraktionen und der drei Eluatfraktionen durch eine 10%ige SDS-PAGE (4.38) aufgetrennt und durch das Western-Blotting auf eine PVDF-Membran transferiert (4.40). Die indirekte Immundetektion (4.41) der immobilisierten Proteine erfolgte mit dem mAK 5B9 (3.12) und dem mit AP konjugierten anti-Maus-IgG-Sekundär-AK (3.13). Dieser war bereits dahingehend charakterisiert worden, dass keine Kreuzreaktivitäten auftraten. Der Nachweis erfolgte durch das NBT-/X-Phosphat-System (4.42). Dieses System war sensitiver als die Färbung der SDS-Gele mit Coomassie-Brillant-Blau (4.39).

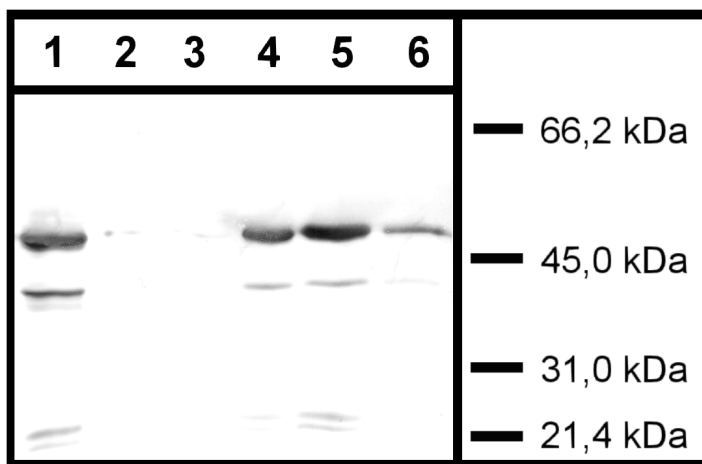


Abb. 17: Immuno-Blot zur murinen La/SS-B-Proteinexpression

Als Marker wurde der LMW-Marker (3.16) verwendet.

- 1) Totalextrakt
- 2) 1. Waschfraktion mit bakt. Proteinen
- 3) 2. Waschfraktion mit bakt. Proteinen
- 4) 1. Eluatfraktion mit rek. murinem La/SS-B-Protein
- 5) 2. Eluatfraktion mit rek. murinem La/SS-B-Protein
- 6) 3. Eluatfraktion mit rek. murinem La/SS-B-Protein

Auf Grund der höheren Sensitivität des Immuno-Blots ließ sich das rek. His-*tag*-Fusionsprotein mit einem MW von etwas über 45 kDa im Totalextrakt und in allen Eluatfraktionen nachweisen (Abb. 17: Laufspuren 1, 4, 5 und 6). Somit bestätigte sich die Vermutung, dass das rek. His-*tag*-Fusionsprotein auch in der dritten Eluatfraktion enthalten war und nur auf Grund der niedrigeren Nachweisgrenze der Coomassie-Brillant-Blau-Färbung nicht detektiert werden konnte. Bei den Waschfraktionen (Abb. 17: Laufspuren 2 und 3) ließ sich kein rek. His-*tag*-Fusionsprotein detektieren.

Im Immuno-Blot waren beim Totalextrakt und den drei Eluatfraktionen (Abb. 17) neben den rek. His-*tag*-Fusionsprotein-Banden mit einem MW von etwa 45 kDa weitere Banden mit MW von ungefähr 43 und 28 kDa zu erkennen. Hierbei handelte es sich vermutlich um Degradationsprodukte des rek. His-*tag*-Fusionsproteins, da diese Banden nicht in den Waschfraktionen (Abb. 17: Laufspuren 2 und 3) detektiert werden konnten.

Die unter 5.9.3 und 5.9.4 erhaltenen Ergebnisse ließen sich wie folgt kurz zusammenfassen: Das murine La/SS-B-Protein konnte im bakteriellen Expressionssystem als rek. His-*tag*-Fusionsprotein in ausreichender Menge exprimiert und unter nativen Bedingungen gereinigt werden, so dass es für weitere Experimente zur Verfügung stand (5.10 und 5.12).

5.10 Hochauflösende 2D-Gelelektrophorese

Bisher konnten 14 isoelektrische, humane La/SS-B-Proteinformen mit einem MW von etwa 50 kDa gefunden werden. Nur vier dieser isoelektrischen Proteinformen ließen sich auf Phosphorylierungen zurückführen. Die anderen isoelektrischen Formen stellten eine große Ladungsheterogenität des humanen La/SS-B-Proteins dar (BROEKHUIS *et al.*, 2000).

Diese Ergebnisse sollten als Grundlage für die Untersuchung dienen, ob und wie viele isoelektrische murine La/SS-B-Proteinformen existierten und ob das murine La/SS-B-Protein ebenfalls eine hohe Ladungsheterogenität besaß. Zu diesem Zweck wurde ein Zellextrakt aus murinen NIH-3T3-Zellen und das unter 5.9 hergestellte rek. murine La/SS-B-Protein mittels der hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Mit dem Zellextrakt aus murinen NIH-3T3-Zellen sollte die Gesamtzahl an isoelektrischen Proteinformen bestimmt werden. Rek. Protein sollte keiner posttranslationalen Modifikation unterworfen worden sein. Sollten sich trotzdem isoelektrische Proteinformen nachweisen lassen, so müssen diese eine hohe Ladungsheterogenität repräsentieren.

Nach Herstellung der Proteinproben für die 2D-Gelelektrophorese (4.45) wurden 125 µg des NIH-3T3-Extraktes bzw. 250 µg des rek. murinen Proteins auf einen IPTG-Streifen (4.45) aufgetragen. Im Anschluss daran erfolgte die Auftrennung der Proteine mit der isoelektrischen Fokussierung (1. Dimension) (4.45) auf Grund des relativen Gehalts an sauren und basischen AS nach den isoelektrischen Punkten (pI). Im Anschluss erfolgte die weitere Auftrennung der Proteine nach ihrem MW in einer 15%igen SDS-PAGE (2. Dimension) (4.45). Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (4.40), wurde die Detektion der isoelektrischen La/SS-B-Proteinformen mit dem mAK 5B9 (3.12) und dem Sekundär-AK anti-Maus-IgG POD-Konjugat (3.13) im ECL-Färbesystem (4.43) durchgeführt.

Der Immuno-Blot der 2D-Gelelektrophorese mit murinem NIH-3T3-Zellextrakt findet sich in Abb. 18. Es konnten 16 isoelektrische Formen des murinen La/SS-B-Proteins mit einem pI von 5,1 bis 6,1 detektiert werden. Als MW-Standard wurden 20 µg rek. murines La/SS-B-Protein aufgetragen. Alle Proteine besaßen das erwartete MW von etwa 45 kDa.

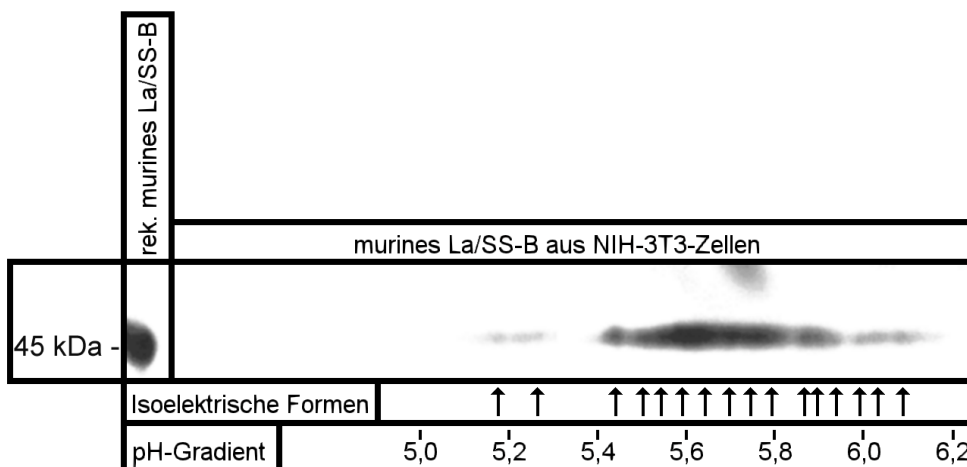


Abb. 18: Hochauflösende 2D-Gelelektrophorese mit NIH-3T3-Zellextrakt

Die Darstellung des Immuno-Blots der 2D-Elektrophorese von rek. murinem La/SS-B-Protein findet sich Abb. 19. Hierbei ließen sich 13 isoelektrische Proteinformen mit einem pI zwischen 4,5 und 5,5 detektieren.

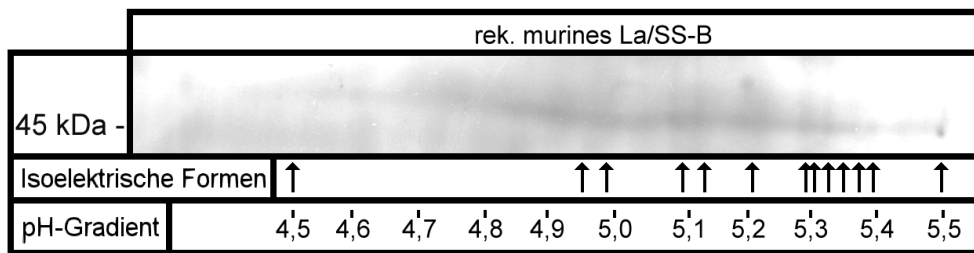


Abb. 19: Hochauflösende 2D-Gelelektrophorese mit rek. murinem La/SS-B-Protein

Da bei der 2D-Gelelektrophorese mit murinem NIH-3T3-Zellextrakt insgesamt 16 isoelektrische Formen des murinen La/SS-B-Proteins, von BROEKHUIS *et al.* (2000) aber nur 14 isoelektrische Formen des humanen La/SS-B-Proteins detektiert werden konnten, sollte mit einer 2D-Gelelektrophorese eines humanen HeLa-Zellextrakts überprüft werden, ob nicht ebenfalls 16 isoelektrische La/SS-B-Proteinformen existierten. Vielleicht konnten die Autoren nicht alle isoelektrische Formen des humanen La/SS-B-Proteins detektieren, da über den mAK SW5 (3.12) aufgereinigte, humane Zellextrakte verwendet worden waren.

Die Herstellung des humanen HeLa-Zellextraktes und die Durchführung der 2D-Gelelektrophorese erfolgte wie bei dem murinen NIH-3T3-Zellextrakt. Der Immuno-Blot der 2D-Gelelektrophorese mit humanem HeLa-Zellextrakt ist in Abb. 20 dargestellt. Als MW-Standard wurden 20 µg eukaryontisches, rek. humanes La/SS-B-Protein (3.19) auf das Gel aufgetragen. Es konnten 16 isoelektrische Proteinformen mit einem pI zwischen 6,0 und 6,8 detektiert werden. Alle Proteine besaßen das erwartete MW von etwa 50 kDa.

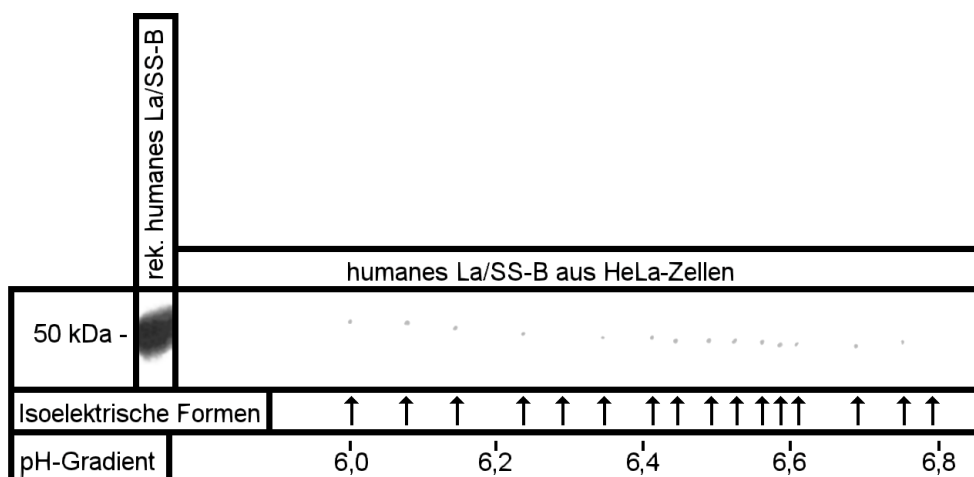


Abb. 20: Hochauflösende 2D-Gelelektrophorese mit HeLa-Zellextrakt

Zusammengefasst zeigten die hier erhaltenen Ergebnisse folgendes: Eukaryontisches, posttranslational modifiziertes, murines La/SS-B-Protein ließ sich in der 2D-Gelelektrophorese in 16 isoelektrische Proteinformen auftrennen. Selbst rek. murines La/SS-B-Protein lieferte

noch 13 isoelektrische Formen. Bei eukaryontischem, posttranslational modifiziertem, humanem La/SS-B-Protein konnten im Vergleich zu BROEKHUIS *et al.* (2000) drei weitere isoelektrische Proteinformen detektiert werden. Damit erhöhte sich die Anzahl der isoelektrischen humanen La/SS-B-Proteinformen auf 16. Somit besaßen das humane und murine La/SS-B-Protein dieselbe Anzahl an isoelektrischen Proteinformen.

5.11 Untersuchung des Einflusses von NO auf das murine La/SS-B-Protein

Im Zusammenhang mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen war eine Beteiligung von Stickstoffmonoxid (NO) diskutiert worden, ein Molekül mit vielfältigen Aufgaben im Organismus. Von mehreren Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass die NO-Konzentration bei SLE-Patienten im Vergleich zu Gesunden erhöht war (WANCHU *et al.*, 1998). Außerdem wurden Tiermodelle beschrieben, bei denen NO-Gabe zu typischen Autoimmunkrankheitssymptomen führten (MCCARTNEY-FRANCIS *et al.*, 1993; WEINBERG *et al.*, 1994; CROSS *et al.*, 1994; ZHAO *et al.*, 1996; BRENNER *et al.*, 1997; HOEY *et al.*, 1997).

Exemplarisch sollte am La/SS-B-Protein untersucht werden, ob NO auf Autoantigene Einfluß ausübt. Da alle Autoimmun-NO-Tierversuche an Nagern durchgeführt wurden, erschien es zweckmäßig, NIH-3T3-Zellen (3.8) zu verwenden. Konkret sollte ermittelt werden, ob Zellen, die einem NO-Donor ausgesetzt wurden, eine Veränderung der Proteinmenge und/oder eine Veränderung der Proteinlokalisierung des La/SS-B zeigten. Die Quantifizierung erfolgte durch Immuno-Blot-Analyse (5.11.1), die Lokalisation durch Epifluoreszenzmikroskopie (5.11.2).

5.11.1 Quantifizierung

NIH-3T3-Zellen wurden für 2, 4, 8, 12 und 24 h in Stimulationsmedium kultiviert (3.7). Dieses Medium enthielt als NO-Donor S-Nitroso-L-Glutathion (GSNO) in einer Konzentration von 1 mM. Des Weiteren wurden als Kontrollen NIH-3T3-Zellen in Kulturmedium (3.7) zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns (0 h) und für 24 h gehalten. Diese Zellen sollten die „Normalexpression“ des endogenen La/SS-B-Proteinen zeigen. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten der NIH-3T3-Zellen wurden aus den Zellen Extrakte hergestellt (4.29) und die Gesamtproteinkonzentration photometrisch bestimmt (4.37).

Von den hergestellten Proteinextrakten wurden jeweils 30 µg auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der Durchführung der SDS-PAGE erfolgte das Western-Blotting und die Detektion der La/SS-B-Proteinbanden mit dem mAK 5B9 (3.12) und dem anti-Maus-IgG POD-Konjugat–Sekundär-AK (3.13) im ECL-System (4.43). Das ECL-System eignete sich für vergleichende Quantifizierungen, da die Lichtemission proportional zur Enzymkonzentration und damit zur AK-Konzentration war. Die Darstellung des Immuno-Blots findet sich Abb. 21. In

allen Laufspuren war eine murine La/SS-B-Proteinbande mit einem MW von ungefähr 45 kDa zu erkennen (Abb. 21).

Zur Quantifizierung wurden die einzelnen Banden durch einen Rahmen eingegrenzt und die Intensität der Schwärzung innerhalb des Rahmens im Vergleich zum Hintergrund des Blots mit dem Programm Molecular Analyst (3.17) berechnet. Die grafische Darstellung der densitometrischen Auswertung der La/SS-B-Proteinbanden findet sich in Abb. 22. Es gab eine deutliche Zunahme des La/SS-B-Proteins bei den Zellen, die mit Stimulationsmedium inkubiert wurden, im Vergleich zu den Zellen, die in Kulturmedium gehalten wurden. Nach 2 h Inkubation stieg die Proteinmenge um das 4fache des Normalwertes an, nach 4 h um das 5fache.

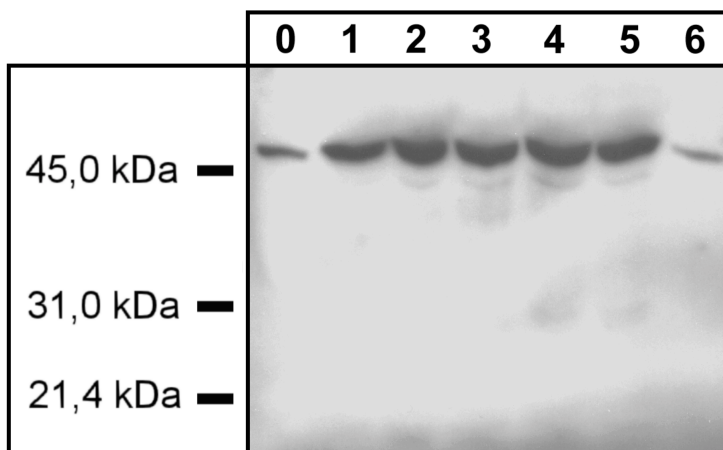


Abb. 21: Immuno-Blot zur Stimulation von NIH-3T3-Zellen mit GSNO

Als Marker wurde der LMW-Marker (3.16) verwendet.

- 0) Zellen in Kulturmedium bei 0 h
- 1) Zellen in Stimulationsmedium für 2 h
- 2) Zellen in Stimulationsmedium für 4 h
- 3) Zellen in Stimulationsmedium für 8 h
- 4) Zellen in Stimulationsmedium für 12 h
- 5) Zellen in Stimulationsmedium für 24 h
- 6) Zellen in Kulturmedium für 24 h

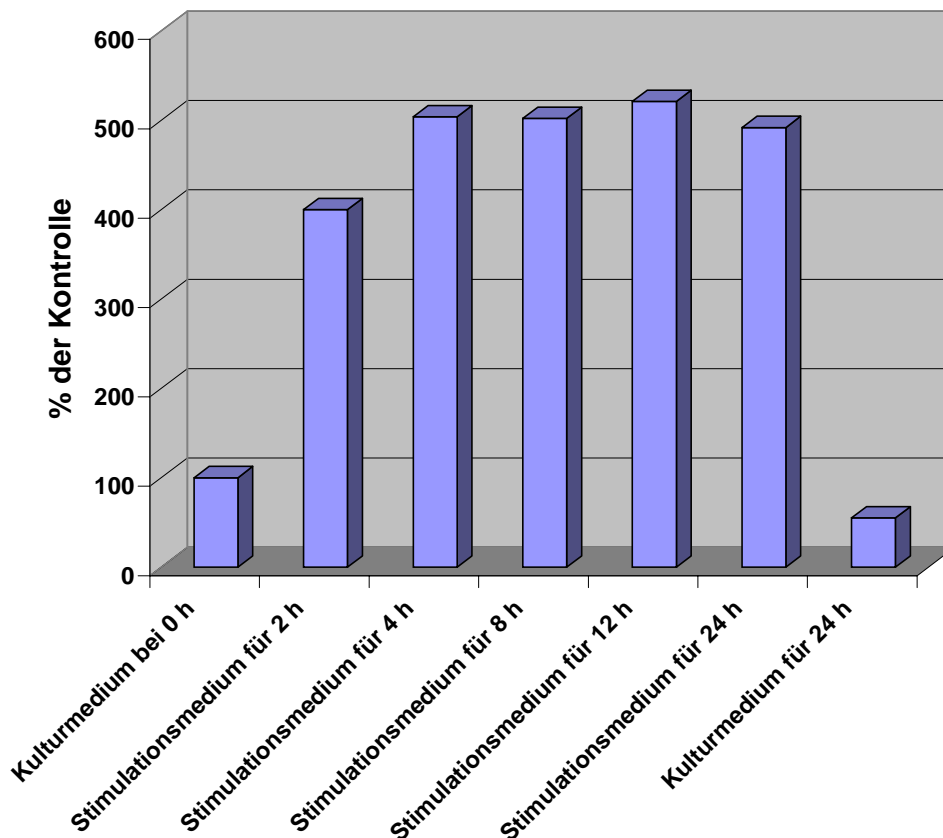


Abb. 22: Grafische Darstellung der densitometrischen Auswertung der La/SS-B-Proteinbanden
Die ermittelten OD-Werte sind in Prozent der Kontrolle (Kulturmedium bei 0 h) dargestellt.

5.11.2 Lokalisationsanalyse

NIH-3T3-Zellen wurden für 2, 4, 8, 12 und 24 h in Stimulationsmedium kultiviert (3.7). Mittels dieser stimulierten Zellen sollte untersucht werden, ob eine Translokation des La/SS-B-Proteins aus dem Kern stattfand. Als Kontrollen wurden NIH-3T3-Zellen in Kulturmedium (3.7) zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns (0 h) und für 24 h kultiviert. Diese Zellen sollten die typische, nukleäre Färbung zeigen.

Die Zellen wurden nach ihrer jeweiligen Inkubationszeit in Methanol/EGTA fixiert (4.32) und mit immunzytochemischen Färbungen (4.32) analysiert. Der Nachweis der endogenen, murinen La/SS-B-Proteine erfolgte mit dem mAK 5B9 (3.12) und einem mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markierten anti-Maus-AK (3.13). Laborerfahrungen zufolge konnten Kreuzreaktivitäten zwischen den AK ausgeschlossen werden. Die Auswertung der hergestellten Präparate erfolgte durch Epifluoreszenz-Mikroskopie (4.34). Die Immunfluoreszenzfärbungen sind in Abb. 23 dargestellt.

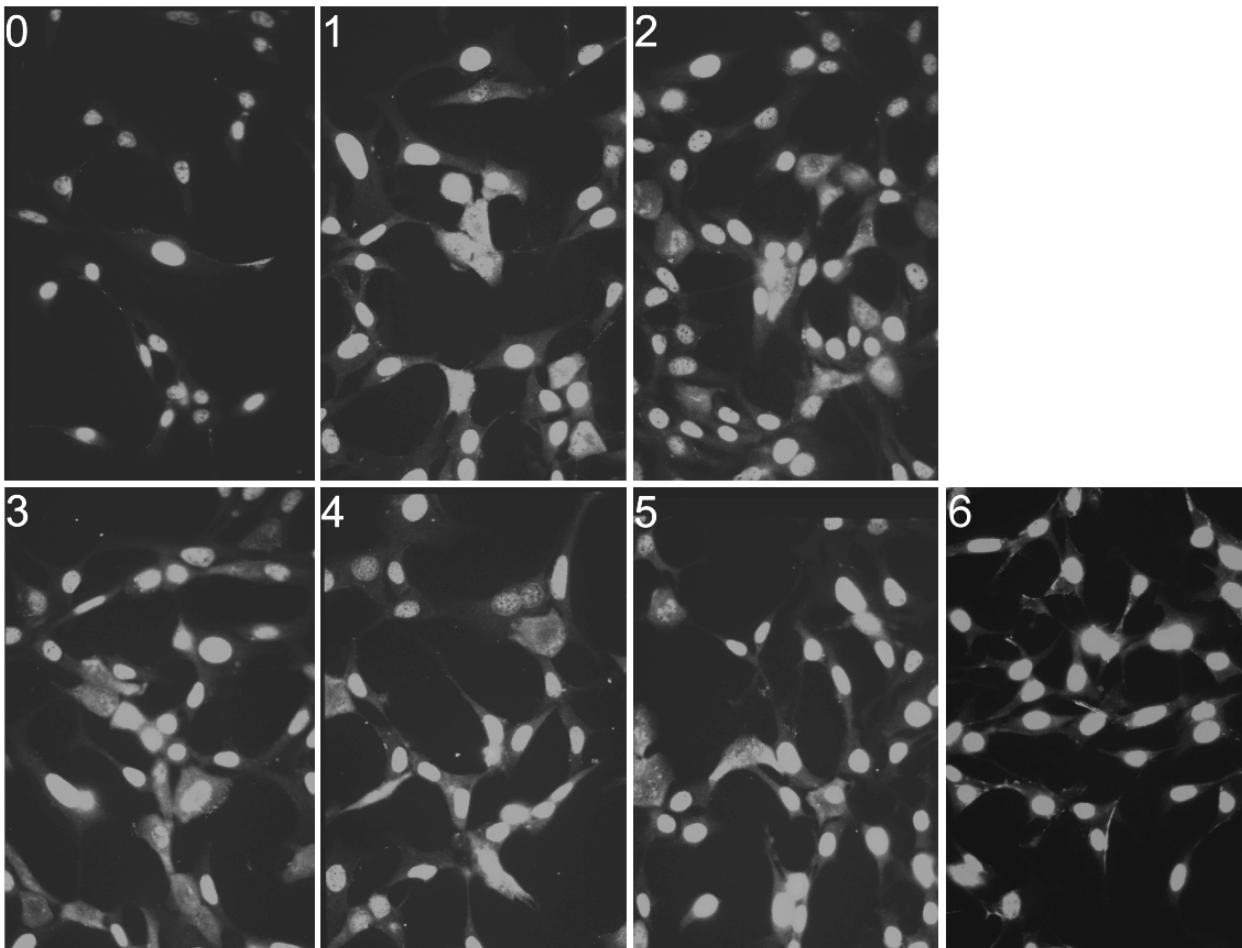


Abb. 23: Immunzytochemische Fluoreszenzfärbung von NIH-3T3-Zellen nach Stimulation mit GSNO

0) Kulturmedium bei 0 h; 1) Stimulationsmedium für 2 h; 2) Stimulationsmedium für 4 h; 3) Stimulationsmedium für 8 h; 4) Stimulationsmedium für 12 h; 5) Stimulationsmedium für 24 h; 6) Kulturmedium für 24 h

Die Zellen wurden bei 400x Vergrößerung dokumentiert.

Die in Kulturmedium gehaltenen NIH-3T3-Zellen (Abb. 23: Bild 0 und 6), zeigten die typische, nukleäre Färbung. Auch bei den Zellen, die verschieden lang mit GSNO inkubiert wurden (Abb. 23: Bilder 1-5), ließ sich größtenteils die typische, nukleäre Proteinlokalisierung detektieren. Allerdings traten auch Kern- und Zytoplasmafärbung oder nur zytoplasmatische Färbung auf. Eine Zunahme der Translokation in das Zytoplasma konnte auch bei längerer Inkubationsdauer nicht ermittelt werden. Nicht auszuschließen war bei einigen Zellen auch eine Translokation bis auf die Zelloberfläche.

5.12 Induktion von Autoantikörpern durch Immunsierung des humanen neo-La-Epitops

Bei einer Autoimmunpatientin konnte im Exon 7 des humanen La/SS-B-Gens in einer *hot spot*-Region, in der die Mutationswahrscheinlichkeit stark erhöht war, eine Deletion eines Adenin-Nukleotids festgestellt werden (BACHMANN *et al.*, 1996a). Wahrscheinlich handelte es sich um eine Punktmutation, die von der Patientin im Laufe ihres Lebens erworben wurde. Als Folge dieser somatischen Mutation wurde nur das N-terminale Fragment des La/SS-B-Proteins gebildet (BACHMANN *et al.*, 1997). Jedoch wich die AS-Sequenz unterhalb der Rasterschubmutation von der nativen AS-Sequenz ab, da, bedingt durch die Mutation, 12 neue AS codiert wurden, die im nativen La/SS-B-Protein nicht vorkamen, bevor die Translation in Folge eines neu entstandenen Stop-Codons unterbrochen wurde (BACHMANN *et al.*, 1996b). Diese 12 AS wurden im Folgenden mit neo-La bezeichnet. Das N-terminale Proteinfragment des La/SS-B, an dessen C-terminalem Ende sich diese 12 AS befanden, wurde als La-N(7A) benannt. Ein N-terminales Proteinfragment des La/SS-B ohne die 12 fremden AS wurde als La-N(9A) bezeichnet.

Hypothetisch gesehen würde auch die Deletion eines Adenin-Nukleotids in der *hot spot*-Region im Exon 7 des murinen La/SS-B-Gens zur Bildung von 12 fremden AS führen. Diese 12 AS würden sich zwischen Mensch und Maus in nur drei AS (Abb. 32) unterscheiden.

Die neu entstandenen 12 AS stellten vermutlich ein Neopitop dar. Nach der Hypothese von LANZAVECCHIA (1995) könnten Neopitope beim Durchbrechen von Toleranz, bei der Entstehung von Autoimmunität und/oder dem *triggern* der Immunantwort beteiligt sein. Das neo-La zeigte Homologie zur Topoisomerase I, zur RNA-Polymerasen, zur reversen Transkriptase, zu einigen anderen DNA-bindenden Proteinen und zum nativen La/SS-B-Protein selbst (BACHMANN *et al.*, 1996a).

Daher sollte durch Immunsierung von Balb/c-Mäusen mit neo-La untersucht werden, ob es möglich war, AK gegen das neo-La-Epitop zu induzieren. Des weiteren sollte überprüft werden, ob die Immuntoleranz gegen körpereigenes La/SS-B-Protein durchbrochen werden konnte und sich Autoantikörper gegen das endogene, murine La/SS-B-Protein nachweisen ließen. Gleichzeitig sollte untersucht werden, gegen welche Domänen im La/SS-B-Protein Autoantikörper gebildet wurden.

Da bei einer Immunisierung mit kleinen Peptiden die Induktion einer Immunantwort nur schwer auszulösen war, wie dies bei dem nur 12 AS großen neo-La der Fall war, musste die Immunogenität erhöht werden. Dies wurde durch chemische Kopplung des neo-La an das Trägerprotein SOC (*sequential oligopeptide carrier*) (SAKARELLOS-DAITSIOTIS *et al.*, 1999) erreicht. Dieses Immunisierungspeptid wurde als SOC-neo-La bezeichnet (3.19).

Mit SOC-neo-La wurden weibliche, neun Wochen alte Balb/c-Mäuse in vierwöchigen Abständen 4mal immunisiert (4.47). Fünf Tage nach jeder Immunisierung wurde den Mäusen Blut abgenommen (4.48) und das Serum isoliert. Die Seren wurden auf das Vorhandensein von Autoantikörpern im ELISA (5.12.1), im Immuno-Blot (5.12.2) und mit immunzytochemischen Färbung (5.12.3 und 5.12.4) getestet.

5.12.1 Nachweis von Autoantikörpern durch ELISA

Getestet wurde neben der Reaktivität der Seren auf SOC-neo-La und neo-La die Reaktivitäten auf folgende bakteriellen rek. La/SS-B-Proteine bzw. –Proteinfragmente (3.19): humanes La/SS-B-Protein (rek. hLa), humaner La/SS-B-N-Terminus mit Neoepitop (rek. hLa-N(7A)), humaner La/SS-B-N-Terminus ohne Neoepitop (rek. hLa-N(9A)), humaner La/SS-B-C-Terminus (rek. hLa-C) und bakterielles murines La/SS-B-Protein (rek. mLa) (5.9). Von SOC-neo-La wurden 5 µg, von neo-La 2,5 µg, von rek. hLa, rek. hLa-N(7A)), rek. hLa-N(9A)), rek. hLa-C und rek. mLa jeweils 0,25 µg im ELISA eingesetzt. Als Negativkontrollen dienten PBS, um auf unspezifische Reaktionen des Sekundär-AK anti-Maus-IgG POD-Konjugat (3.13) mit den Antigenen hinzuweisen, und Serum einer Balb/c-Maus, das vor den Immunisierungen abgenommen wurde, womit das Vorhandensein von Autoantikörpern vor den Immunisierungen ausgeschlossen werden sollte. Die Auswertung des ELISA (4.49) erfolgte qualitativ und quantitativ mit einem Photometer bei 492 nm. Die grafische Darstellung der ELISA-Messungen der Balb/c-Maus, mit den größten Reaktivitäten, sind in Abb. 24 dargestellt.

Schon fünf Tage nach der 1. Immunisierung zeigten sich gute Reaktivitäten des Maus-Serums auf SOC-neo-La, rek. hLa, rek. hLa-N(7A), und rek. mLa. Hierbei lagen die Reaktivitäten zwischen 240% und 320% der Kontrolle (Abb. 24). Eine etwas schlechtere Reaktivität konnte für neo-La detektiert werden (ca. 160% der Kontrolle) (Abb. 24). Dagegen waren nur wenige AK gegen rek. hLa-N(9A)) und rek. hLa-C nachzuweisen (Abb. 24).

Nach der 2. Immunisierung zeigte sich, dass die Reaktivitäten auf SOC-neo-La, rek. hLa-N(7A) und rek. mLa weiter zunahmen. Hierbei stiegen die Reaktivitäten auf 300% bis 430% der Kontrolle an (Abb. 24). Die Reaktivität gegen rek. hLa änderte sich im Vergleich zur 1. Immunisierung kaum (Abb. 24). Die AK gegen neo-La und rek. hLa-N(9A) dagegen nahmen auf etwa 270% bis 340% der Kontrolle stark zu (Abb. 24). Die Reaktivität gegen rek. hLa-C verstärkte sich nur leicht auf etwa 160% der Kontrolle (Abb. 24).

Fünf Tage nach der 3. Immunisierung stieg die Reaktivität gegen SOC-neo-La, neo-La, rek. hLa, rek. hLa-N(9A) und rek. mLa. auf ca. 400% der Kontrolle an (Abb. 24). Die Reaktivität gegen rek. hLa-N(7A) betrug nun ca. 460% der Kontrolle. Die Reaktivität gegen rek. hLa-C stieg von ca. 160% nach der 2. Immunisierung auf ca. 280% der Kontrolle an.

Nach der 4. Immunisierung erhöhte sich die Reaktivität gegen SOC-neo-La auf 1200% der Kontrolle. Zwischen allen anderen Proteinen bzw. Proteinfragmenten ließen sich nur noch geringe Unterschiede in der Reaktivität feststellen (Abb. 24). Eine stärkere Zunahme der Reaktivitäten gegenüber der 3. Immunisierung ließ sich nicht nachweisen.

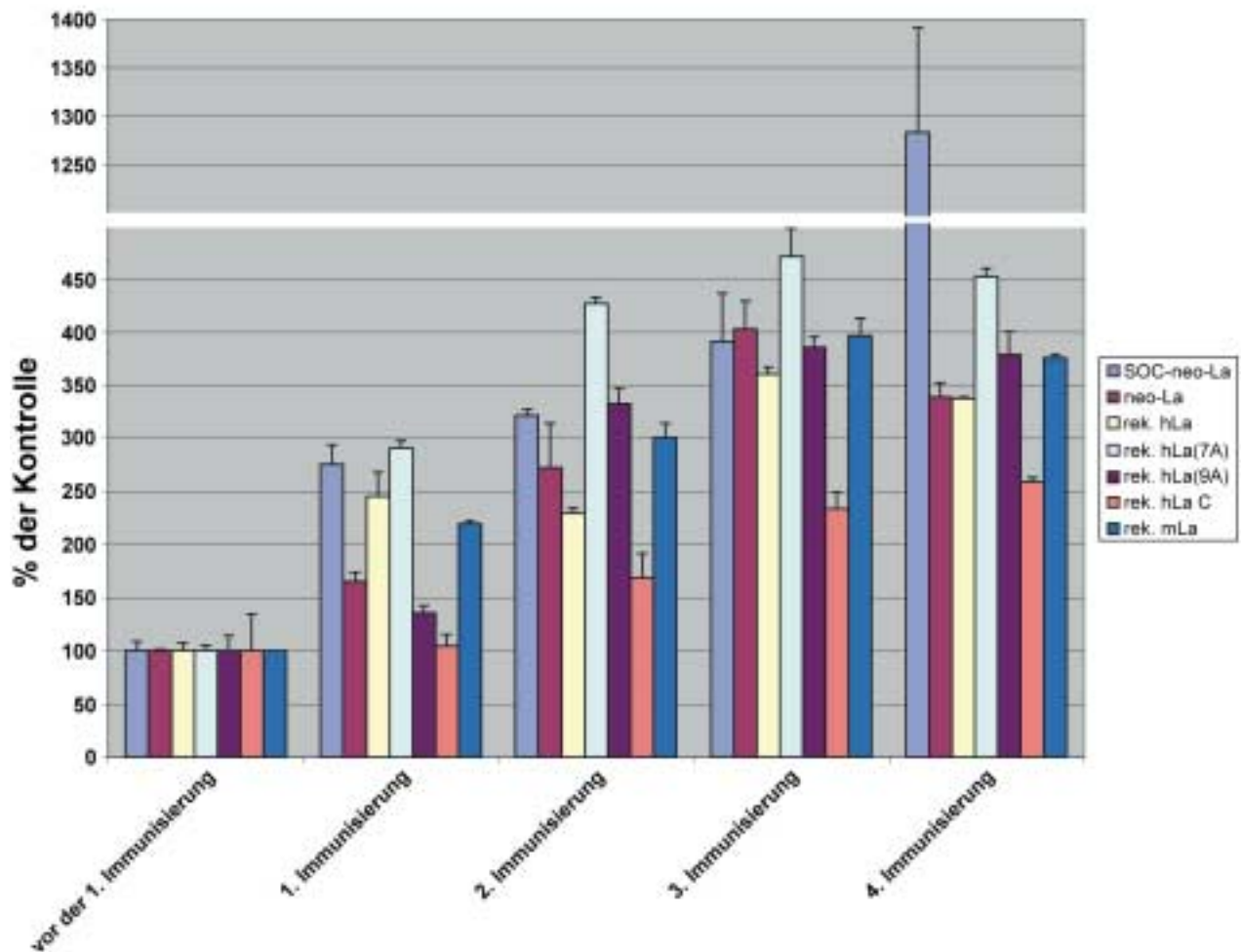


Abb. 24: Grafische Darstellung der ELISA-Messung der Seren einer Balb/c-Maus

Die ermittelten OD-Werte sind in Prozent der Kontrolle (vor der 1. Immunisierung) dargestellt.

Kurz zusammengefasst zeigten die hier ermittelten Ergebnisse, dass sich bei Immunisierung des humanen La/SS-B-Neopeptids AK gegen das Neopeptid induzieren ließen. Außerdem konnte die Immuntoleranz gegen endogenes, murines La/SS-B-Protein durchbrochen werden. Auch humanes La/SS-B-Protein wurde von den Serum-AK erkannt. Die Reaktivitäten gegen humanes und murines La/SS-B-Protein waren ungefähr gleich. Anfangs wurden AK gegen die N-terminale Proteinhälfte des humanen La/SS-B gebildet. Später war auch der La/SS-B-C-Terminus in die Immunantwort involviert. Somit könnte die Immunantwort dem Mechanismus des intramolekularen *epitope spreading* folgen.

5.12.2 Nachweis von Autoantikörpern durch Immuno-Blotting

Um die Reaktivitäten der Maus-Seren im Immuno-Blot zu überprüfen, wurden jeweils 25 µg der bakteriellen Proteine rek. hLa, rek. hLa-N(7A), rek. hLa-N(9A), rek. hLa-C (3.19) und rek. mL (5.9) auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen, durch SDS-PAGE (4.38) aufgetrennt und durch Western-Blotting auf eine PVDF-Membran transferiert (4.40). Die Immundetektion (4.41) der immobilisierten La/SS-B-Proteine erfolgte mit den gewonnenen Maus-Seren (5.12). Der indirekte Nachweis der AK-Protein-Komplexe erfolgte durch ein Gemisch bestehend aus einem mit AP konjugierten anti-Maus-IgG-Sekundär-AK (3.13) und einem mit AP konjugierten anti-Maus-IgM-Sekundär-AK (3.13). Der anti-Maus-IgM-Sekundär-AK wurde zusätzlich verwendet, um auch IgM in den Seren nachweisen zu können. In manchen Fällen konnten trotz mehrmaliger Immunisierungen keine IgG induziert werden. Die verwendete Sekundär-AK waren bereits dahingehend getestet worden, dass sie keine Kreuzreaktivitäten zeigte. Die Detektion erfolgte durch das NBT-/X-Phosphat-System (4.42).

Im Immuno-Blot zeigte keines der Seren Reaktivität zu den Proteinen bzw. Proteinfragmenten. Dies lag vermutlich daran, dass die Proteine durch die SDS-PAGE denaturiert wurden. Im ELISA (5.12.1) wurden nur Proteine eingesetzt, die unter nativen Bedingungen gewonnen wurden. Dies ließ den Schluß zu, dass die Serum-AK ausschließlich Konformationsepitope erkennen konnten.

5.12.3 Nachweis von Autoantikörpern durch immunzytochemische Färbung

Um die Hypothese zu bestätigen, dass die Serum-AK nur native Proteine detektierten, wurde die Reaktivität der Maus-Seren in immunzytochemischen Färbungen (4.32) auf murinen NIH-3T3-Zellen getestet. Den ELISA-Ergebnissen zufolge war zu erwarten, dass die Seren die endogenen, murinen La/SS-B-Proteine detektierten.

Zur Immunfärbung wurden NIH-3T3-Zellen in Methanol/EGTA fixiert (4.32). Diese Art der Fixierung führte zu keiner Veränderung der Proteinstrukturen. Die fixierten Zellen wurden anschließend mit den Maus-Seren inkubiert (4.32). Das Serum einer Balb/c-Maus, das vor den Immunisierungen abgenommen wurde (5.12), diente dazu, das Vorhandensein von Autoantikörpern auszuschließen. Der Nachweis der Antigen-AK-Komplexe erfolgte mit einem mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markierten anti-Maus-AK (3.13). Dieser Sekundär-AK detektierte alle Subklassen muriner AK. Laborerfahrungen zufolge konnten Kreuzreaktivitäten des Sekundär-AK ausgeschlossen werden. Die Bilder der Immunfluoreszenzfärbungen sind in Abb. 25 dargestellt.

Wie in Abb. 25 zu erkennen war, lieferten alle Seren eine nukleäre Färbung, wie sie für das La/SS-B-Protein typisch war. Das Serum einer Balb/c-Maus, das vor den Immunisierungen abgenommen wurde, lieferte keinerlei Färbung. Die Ergebnisse der immunzytochemischen

Färbung bestätigten die aus den Ergebnissen des ELISA (5.12.1) und des Immuno-Blots (5.12.2) geschlossene Vermutung, dass mit den Maus-Seren nur Konformationsepitope nativer Proteine detektiert werden konnten.

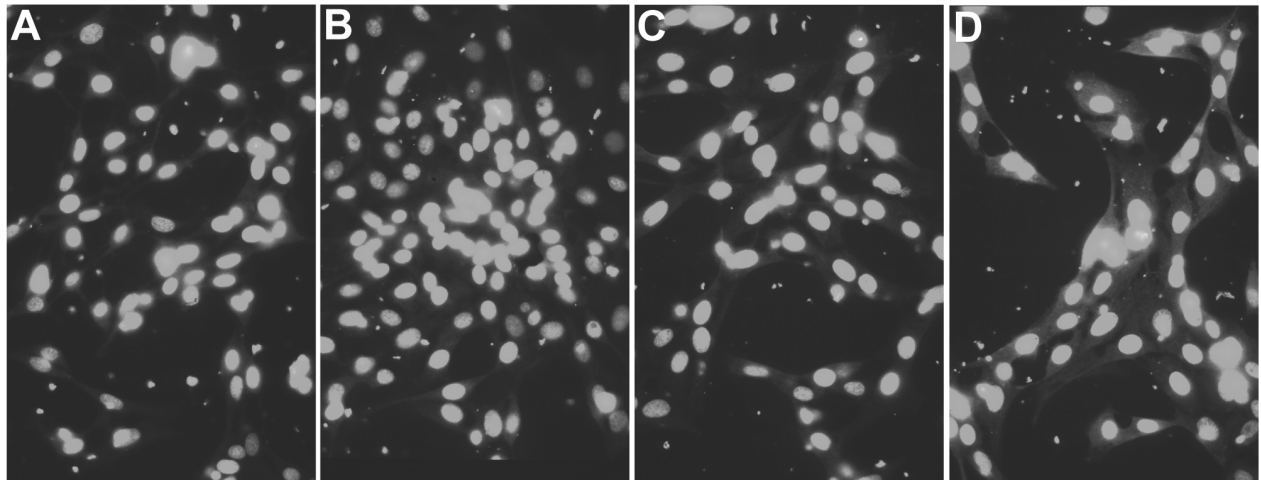


Abb. 25: Immunzytochemische Fluoreszenzfärbungen von NIH-3T3-Zellen, gefärbt mit murinen Seren, die nach den Immunisierungen mit SOC-neo-La erhalten wurden.

A) 1. Immunisierung; B) 2. Immunisierung; C) 3. Immunisierung; D) 4. Immunisierung
Die Zellen wurden bei 400x Vergrößerung dokumentiert.

5.12.4 Zusammenhang zwischen ANAs und einer zellschädigenden Vorläuferreaktion

Als endogener Faktor bei der Entstehung von Autoimmunität wurde u.a. eine zellschädigende Vorläuferreaktion diskutiert. Die Zellmembran stellte für die antinukleären Antikörper (ANAs) eine undurchdringliche Barriere dar. Ebenso wenig konnten die nukleären Antigene die Zellmembranen intakter Zellen nicht durchdringen.

Um zu untersuchen, ob durch die Immunisierung mit neo-La Serum-AK erzeugt wurden, die an Zelloberflächen banden und somit eine zellschädigende Vorläuferreaktion auslösen konnten, wurden mit den Maus-Seren immunzytochemische Färbungen (4.32) an NIH-3T3-Zellen durchgeführt. Die Färbungen erfolgten wie unter 4.32 beschrieben, allerdings mit dem Unterschied, dass die Zellen zuerst mit den Serum-AK inkubiert (4.32) und danach erst mit Methanol/EGTA fixiert (4.32) wurden. Auf diese Weise konnten die Serum-AK nicht in die Zellen eindringen. Wenn die Serum-AK an Oberflächenstrukturen auf den NIH-3T3-Zellen binden sollten, dann müsste dies in der immunzytochemischen Färbung in einer Färbung der Zellmembran resultieren. Die Auswertung der Präparate erfolgte durch Epifluoreszenz-Mikroskopie (4.34).

In keinem Fall konnte eine Immunfluoreszenzfärbung detektiert werden. Somit banden die Serum-AK nicht an Oberflächenstrukturen von NIH-3T3-Zellen. Dies ließ den Schluß zu, dass die induzierten Serum-AK nicht für eine zellschädigende Vorläuferreaktion verantwortlich sein konnten.

6 DISKUSSION

A) Analyse des murinen La/SS-B auf genomischer Ebene

Im Zusammenhang mit der genomischen Situation sollte die Organisation des murinen La/SS-B-Strukturgens aufgeklärt werden, damit u.a. Rückschlüsse auf die Transkription gezogen werden konnten. Von besonderem Interesse war, zu klären, ob die Möglichkeit der Existenz eines zweiten, alternativen Promotors neben dem eigentlichen Basis-Promotor gegeben war und welche mRNA-Isoformen von diesem aus transkribiert werden könnten. In diesem Zusammenhang war die Aufklärung des *splice*-Mechanismus, der für die Entstehung der mRNA-Isoformen verantwortlich war, von großer Bedeutung.

6.1 Allgemeine Merkmale des Strukturgens

Das La/SS-B codierende Gen des Menschen und der Maus lagen jeweils auf dem Chromosom 2 (PRUIJN, 1994; TOPFER *et al.*, 1993; CHAMBERS *et al.*, 1988) (1.5.1 und 1.6). Beide Gene codierten für 13 Exons (PRUIJN, 1994; TOPFER *et al.*, 1993; CHAMBERS *et al.*, 1988) (Abb. 5 und 8.1). Neben dem eigentlichen Gen existierten im humanen Genom drei La/SS-B-Retropseudogene, die vermutlich nach reverser Transkription von La/SS-B-mRNAs in das Genom integriert wurden und von invertierten Sequenzwiederholungen eingerahmt waren (BARTSCH 1997; GRÖLZ *et al.*, 1997c) (1.5.1). TOPFER *et al.* (1993) beschrieben dagegen das murine La/SS-B-Gen als *single copy*-Gen. Die Untersuchung von drei Mausstämmen ergab keine Hinweise auf Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (TOPFER *et al.*, 1993) (1.6).

Die ermittelte Sequenz des murinen La/SS-B-Gens wurden mit FASTA-Mail (EMBL-Datenbank, U.K., FASTA@EBI.AC.UK) auf Homologien zu bekannten Sequenzen untersucht. Allerdings konnten keine ermittelt werden. Im Gegensatz dazu wurde von GRÖLZ (1998) gezeigt, dass die humane La/SS-B-Gensequenz eine Reihe von Alu-Sequenzen in den 2 kb stromaufwärts des Exon 1, sowie in den Introns 1, 2, 4, 6 und 8 enthielt (8.1).

6.2 Sequenzunterschiede

Zwischen der erhaltenen murinen Gen-Sequenz (Abb. 5) und der Sequenz von TOPFER *et al.* (1993) (*GenBank accession No.* L00993) wurden im Exon 1b und im Exon 11 Unterschiede in der Nukleotidsequenz festgestellt (Abb. 26). Hierbei handelte es sich um Punktmutationen, die allerdings nicht den codierenden Bereich betrafen und vermutlich auf Sequenzierfehler zurückzuführen waren, die im Rahmen jeder Sequenzierung auftraten.

Exon 1b	
(1)	TGCTGTCGGGCCCCCGCGCTCGGAAGTCCAGGCGCTTCTGTCGTTGTTCTTGAAGCTGGTGACCGTGGGATCCGAATCTTTCGAGGT AGCTTC TGGAGACTGAGGAGA
(2)	TGCTGTCGGGCCCCCGCGCTCGGAAGTCCAGGCGCTTCTGTCGTTGTTCTTGAAGCTGGTGACCGTGGGATCCGAATCTTT GAGGTGAGCTTCTTGGAGACTGAGGAGA
Exon 11	
(1)	GTTAGATTTTAAGCTGCTTTTGTCTTCAGAAGCTTTAAAAAGAAAAGCGAATTAGG CCACTTCGATGTCACCTGTATAAAGGAAAATTTGTTTACTTCTTTTGTGTATC
(2)	GTTAGATTTTAAGCTGCTTTTGTCTTCAGAAGCTTTAAAAAGAAAAGCGAATTAGGTCCACTTCGATGTCACCTGTATAAAGGAAAATTTTGTTTACTTCTTTTGTGTATC

Abb. 26: Sequenzabweichungen im Exon 1b und Exon 11 des murinen La/SS-B

Fehlende Basen in der Datenbanksequenz von TOPFER *et al.* (1993) (*GenBank accession No.* L00993) (1) oder dem sequenzierten murinen La/SS-B (2) sind durch ein Leerzeichen gekennzeichnet.

6.3 Die Exons und Introns

Das murine Gen besaß vom ersten Exon bis zur 3'-UTR eine Länge von 9982 bp, das humane Gen 10567 bp (Abb. 5 und 8.1). Somit differierte die Gesamtgröße des Gens zwischen diesen beiden Spezies nicht sehr stark. Beim Vergleich der Exons wurde festgestellt, dass die Größen der Exons 3, 4, 5, 6, 7 und 9 beim humanen und murinen Gen übereinstimmten. Die Exons 2, 8, 10 und 11 differierten in ihrer Größe zwischen 10 und 30 Nukleotiden (Tabelle 2).

Auch beim Vergleich der Nukleotidsequenzen der Exons 2-11 ließen sich große Übereinstimmungen feststellen. Dies hatte sicherlich die hohe Homologie des murinen und humanen La/SS-B-Proteins von etwa 76,7% zufolge. Größere Sequenzabweichungen ließen sich ab dem Exon 8 erkennen. Dies war vermutlich der Grund für die Homologie der C-Termini des murinen und humanen Proteins von nur noch 65% (TOPFER *et al.*, 1993) (1.6).

Die Größen der verschiedenen Exon 1 wichen stark voneinander ab. Das humane Exon 1 besaß eine Länge von 156 bp, das Exon 1' eine Länge von 489 bp und das Exon 1'' eine Länge von 493 bp (Tabelle 2). Schon zwischen dem humanen Exon 1 und dem Exon 1' bzw. 1'' ließen sich in Bezug auf ihre Größe keine Gemeinsamkeiten feststellen. Das murine Exon 1a besaß eine Größe von 86 bp, das Exon 1b eine Größe von 113 bp und das Exon 1c eine Größe von 225 bp (Tabelle 2). Auch die Nukleotidsequenzen der humanen und murinen Exon 1 unterschieden sich vollständig voneinander (Abb. 5 und 8.1). Somit ließ sich keine Aussage darüber machen, welches humane Exon 1 einem murinen Exon 1 entsprach.

Beim Vergleich der Intron-Sequenzen und Intron-Größen ließen sich fast keine Gemeinsamkeiten feststellen (Abb. 5 und 8.1), was sicherlich an den verschiedenen Spezies lag. Als einzige Gemeinsamkeit fand sich im Intron zwischen dem humanen Exon 1 und Exon 2 in der Sequenz des Exon 1' bzw. Exon 1'' eine Poly(T)₂₃-Region (8.1). Auch in der murinen Sequenz fand sich im Intron 1 eine Poly-(T)₁₇-Region (Abb. 5). Überraschenderweise besaß das murine La/SS-B-Gen zwischen dem Exon 1c und dem Exon 2 kein Intron (Abb. 5). Das humane Gen konnte dagegen zwischen allen Exons ein Intron aufweisen (8.1). In Tabelle 2 sind alle Exon-Intron-Größen des murinen und humanen La/SS-B-Gens detailliert dargestellt.

A) Humanes La/SS-B-Gen			B) Murines La/SS-B-Gen		
	Lage (in bp)	Größe (in bp)		Lage (in bp)	Größe (in bp)
Promotor	1 - 239	239	Promotor	-527 - -1	527
Exon 1	240 - 396	156	Exon 1a	1 - 86	86
Intron 1	397 - 2328	1931	Intron 1a	87 - 1516	1429
Exon 1'	397 - 886	489	Exon 1b	1 - 113	113
Intron 1'	887 - 2328	1441	Intron 1b	114 - 1516	1402
Exon 1''	397 - 890	493	Exon 1c	1371 - 1596	225
Intron 1''	891 - 2328	1437	Intron 1c	-	-
Exon 2	2329 - 2403	74	Exon 2	1597 - 1690	93
Intron 2	2404 - 4127	1723	Intron 2	1691 - 4561	2870
Exon 3	4128 - 4231	103	Exon 3	4562 - 4664	103
Intron 3	4232 - 4318	86	Intron 3	4665 - 4858	193
Exon 4	4319 - 4493	174	Exon 4	4859 - 5033	174
Intron 4	4494 - 5437	943	Intron 4	5034 - 5642	608
Exon 5	5438 - 5545	107	Exon 5	5643 - 5750	107
Intron 5	5546 - 5623	77	Intron 5	5751 - 5822	71
Exon 6	5624 - 5724	100	Exon 6	5823 - 5923	100
Intron 6	5725 - 7135	1410	Intron 6	5924 - 7073	1149
Exon 7	7136 - 7207	71	Exon 7	7074 - 7145	71
Intron 7	7208 - 7513	305	Intron 7	7146 - 7436	290
Exon 8	7514 - 7556	42	Exon 8	7437 - 7476	39
Intron 8	7557 - 8927	1370	Intron 8	7477 - 8176	699
Exon 9	8928 - 9068	140	Exon 9	8177 - 8317	140
Intron 9	9069 - 9520	451	Intron 9	8318 - 8680	362
Exon 10	9521 - 9848	327	Exon 10	8681 - 9032	351
Intron 10	9849 - 10192	343	Intron 10	9033 - 9319	286
Exon 11	10193 - 10580	387	Exon 11	9320 - 9687	367
3'-UTR	10581 - 10806	288	3'-UTR	9688 - 9982	294

Tabelle 2: Lage und Größe der Exons und Introns im (A) humanen La/SS-B-Gen (GRÖLZ, 1998) und (B) murinen La/SS-B-Gen

Die Zahlenangaben beim murinen La/SS-B-Gen beziehen sich auf die komplette Nukleotidsequenz aus Abb. 8, die Zahlenangaben beim humanen La/SS-B-Gen auf die komplette Nukleotidsequenz im Anhang (8.1).

Beim Vergleich der Exon-Intron-*splice*-Nukleotidsequenz-Übergänge ließen sich ab dem Exon 2 des humanen und murinen La/SS-B-Gens große Übereinstimmungen feststellen. Hierbei besaß die 5'-*splice*-Stelle meist die Basenabfolge AG/GT und die 3'-*splice*-Stelle meist die Basenabfolge AG/GG. Dagegen wiesen die Sequenz-Übergänge der verschiedenen Exon 1 keinerlei Gemeinsamkeiten auf. Dies konnte nicht weiter verwundern, da die verschiedenen Exon 1 bei der Maus und beim Menschen auch sonst keine Ähnlichkeiten besaßen. Die Sequenzen der Exon-Intron-*splice*-Übergänge finden sich in Tabelle 3.

A) Sequenzen der Exon-Intron- <i>splice</i> -Übergänge im humanen La/SS-B-Gen					
Bezeichnung	Exon 3'	Intron 5'	Intron 3'	Exon 5'	Bezeichnung
Exon 1	...GCTTTGCT	GGTGC GCG...	...TTTACAG	ATAGCCGC...	Exon 2
Exon 1'	...GGGAAAAC	GTGGGTAA...	...TTTACAG	ATAGCCGC...	Exon 2
Exon 1''	...AAACGTGG	GTAATATT...	...TTTACAG	ATAGCCGC...	Exon 2
Exon 2	...AAATTGAG	GTATGATT...	...TCTCACAG	TATTATTT...	Exon 3
Exon 3	...TTCAACAG	GTAACAAG...	...CTCTTCAG	GTGAACC...	Exon 4
Exon 4	...TTTATATT	GTAAGTGG...	...CTTCACAG	AAAGGCTT...	Exon 5
Exon 5	...CATTTAAG	GTATGATA...	...TTTACAG	GGATCAAT...	Exon 6
Exon 6	...CTTTCAA	GTAAGTCT...	...TTCTTTAG	GGACGATT...	Exon 7
Exon 7	...GCTAAACA	GTAAGTAT...	...ATTGTAG	GGAGCAAG...	Exon 8
Exon 8	...CTGAAATG	GTAAGTAT...	...TTTATAG	AAATCTCT...	Exon 9
Exon 9	...CAAAGAG	GTCAGAGG...	...TGGTATAG	GGGATAAT...	Exon 10
Exon 10	...TGCAACTG	GTAAGTTT...	...CGTTATAG	GACCTGTG...	Exon 11
B) Sequenzen der Exon-Intron- <i>splice</i> -Übergänge im murinen La/SS-B-Gen					
Bezeichnung	Exon 3'	Intron 5'	Intron 3'	Exon 5'	Bezeichnung
Exon 1a	...AATCTTTG	AGGTGAGC...	...TTCCTACC	AGTGTGAG...	Exon 2
Exon 1b	...TGAGGAGA	AGGTACGA...	...TTCCTACC	AGTGTGAG...	Exon 2
Exon 1c	...ACTTTGCT	TTACCAAC...	...ATTCACAG	TATTATTT...	Exon 2
Exon 2	...AAATTGAG	GTATGATT...	...ATTCACAG	TATTATTT...	Exon 3
Exon 3	...TTCAACAG	GTAAGTCT...	...CTTTTCAG	GCTAAACC...	Exon 4
Exon 4	...TTTATATT	GTAAGTGG...	...TTTACAG	AAAGGTTT...	Exon 5
Exon 5	...CATTTAAG	GTATGATA...	...CTTTCACAG	GGTCAAT...	Exon 6
Exon 6	...CTCTTAA	GTAAGTCT...	...TTCTTCAG	GGAAGATT...	Exon 7
Exon 7	...GCTAAACA	GTAAGTCT...	...GTTTTAG	AGAGCATG...	Exon 8
Exon 8	...CTGAAACC	GTAAGTAC...	...TTTATAG	AGAGCTCT...	Exon 9
Exon 9	...CAAAGAG	GTTTGAA...	...ATGTGTAG	GGAATAAT...	Exon 10
Exon 10	...TCGTCGTG	GTAAGTCT...	...TGTAATAG	GACCAATG...	Exon 11

Tabelle 3: Sequenzen der Exon-Intron-*splice*-Übergänge im (A) humanen La/SS-B-Gen (GRÖLZ, 1998) und (B) murinen La/SS-B-Gen

Dargestellt sind jeweils acht Nukleotide auf der 3'-Seite eines vorangehenden Exons, auf der 5'- und 3'-Seite des nachfolgenden Introns und auf der 5'-Seite eines darauffolgenden Exons.

6.4 Der Basis-Promotor

Eukaryontische Pol II-Promotoren bestanden aus einem *core*-Promotor-Element (Basis-Promotor) sowie aus genspezifischen, regulatorischen DNA-Elementen (TJIAN und MANIATIS, 1994; KOLESKE und YOUNG, 1995; KORNBERG, 1996). Das *core*-Promotor-Element bildete das minimale DNA-Element, das für die Transkriptions-Initiation durch die RNA-Pol II *in vitro* notwendig und ausreichend war. Die regulatorischen Elemente bestanden aus den die Transkription verstärkenden *enhancer*- und abschwächenden *silencer*-Elementen und konnten über einen weiten Bereich, sowohl stromaufwärts wie auch stromabwärts vom Transkriptionsstart, verteilt sein. An das *core*-Promotor-Element banden verschiedene generelle Transkriptionsfaktoren (GTFs), rekrutierten die Pol II und bildeten den basalen Transkriptionsapparat (BURATOWSKI, 1994; ROEDER, 1996). An die *enhancer*- und *silencer*-Elemente banden regulatorische Faktoren, die Aktivatoren bzw. Repressoren. Die Interaktion zwischen dem basalen Transkriptionsapparat und den regulatorischen Faktoren konnte vermutlich über verschiedene Kofaktoren erfolgen. Als Kofaktoren wurden mit dem TATA-Box-Bindeprotein (TBP) assoziierte Faktoren (TAFs), lösliche generelle Kofaktoren und mit dem C-terminalen Ende der Pol II direkt interagierende Mediatoren beschrieben

(VERRIJZER und TJIAN, 1996; KAISER und MEISTERERNST, 1996; BJÖRKLUND und KIM, 1996). Der *core*-Promotor wurde bei den meisten Genen durch die etwa 30 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart gelegene TATA-Box gebildet. Darüber hinaus enthielten viele Promotoren, mit oder ohne TATA-Box, eine pyrimidinreiche Initiator-Sequenz, die direkt über dem Transkriptionsstart lag (ROEDER, 1996). Ein Initiator-Element wurde erstmals von SMALE und BALTIMORE (1989) am Beispiels des Gens der murinen terminalen Desoxyribonucleotidyltransferase (TdT) beschrieben und besaß die nur sehr schwache Konsensussequenz YYAYTCYY (DU *et al.*, 1993). Allgemein konnten Promotoren von eukaryontischen Genen in solche eingeteilt werden, bei denen das *core*-Promotor-Element eine TATA-Box enthielt, und in solche ohne TATA-Box. Die Promotoren vieler Haushaltsgene enthielten Initiatorelemente, jedoch keine TATA-Box, und erschienen auf Grund mehrerer Bindestellen für den Transkriptionsfaktor (TF) Sp1 G/C-reich (DYNAN und TJIAN, 1983; MELTON *et al.*, 1986; VIHINEN *et al.*, 1996). Die Initiation der Transkription konnte bei diesen Promotoren an verschiedenen Stellen erfolgen (MELTON *et al.*, 1986).

Der Promotorbereiche des humanen La/SS-B-Gens besaß eine Größe von 239 bp (Tabelle 2). GRÖLZ (1998) suchte mit dem Programm HUSAR (3.17) den Promotorbereich des humanen La/SS-B-Gens nach Promotorelementen und potentiellen TF-Bindestellen ab. Dabei fand sich keine TATA-Box, dafür aber eine GC-reichen Region. Stromaufwärts des humanen Exon 1 lagen eine CAAT-Box, eine SP1-Bindestelle und direkt stromabwärts davon eine AP2-Bindestelle. Ein 17 Nukleotide langer Bereich wurde auf Grund von Sequenzvergleichen mit Promotoren anderer Gene nach CHAMBERS *et al.* (1988) als G/C-reiches Promotorelement bezeichnet. Im Exon 1 selbst lag eine weitere AP2-Bindestelle.

Auch der Promotorbereiche des murinen La/SS-B-Gens, der eine Größe von 527 bp besaß (Tabelle 2) und sich stromaufwärts des Exon 1a bzw. Exon 1b befand, wurde mit dem Programm HUSAR (3.17) nach Promotorelementen und TF-Bindestellen abgesucht. Nur die gängigsten TFs sind in Abb. 27 dargestellt und im Folgenden kurz beschrieben. Es fanden sich eine CCAAT-Box und mehrere davon abweichende Bindestelle, an die der *CCAAT-binding factor* oder der CTF (= *CCAAT-Box-factor* = *nuclear factor-1* = NF-1) binden konnten. CCAAT-bindende Proteine fungierten als Aktivatoren der Promotor-Grundfunktion und als Regulationselemente (KNIPPERS, 1997). Feststellen ließen sich auch Bindestellen für TFIIA, TFIIA- α/β *precursor (major)*, TFIIA- α/β *precursor (minor)*, TFIIA- γ , TFIIIB, TFIIIE, TFIIIF, TFIIIF- α , TFIIIF- β und TFIID. TFIID spielte eine besondere Rolle beim Aufbau des Transkriptionskomplexes (KNIPPERS, 1997). Bindestellen für TBP, TBP-1 und TBF1 ließen sich ebenfalls detektieren. Von Bedeutung war das Vorhandensein von GC-Boxen, die besonders häufig in Promotoren von TATA-Box-freien Haushaltsgenen vorkamen und an die das Glykoprotein Sp1 (GC-Box-Protein) band. Sp1 sorgte zusammen mit TAF für die richtige Platzierung von TFIID im Bereich des Transkriptionsstarts (KNIPPERS, 1997). Des weiteren fanden sich Bindestellen für c-Myc und E2F-1, das eine zentrale Rolle bei der Regulation der Genaktivität im Verlauf des Zellzyklus einnahm (KNIPPERS, 1997). Interessanterweise ließen

6.5 Der alternative Promotor

Bei der Untersuchung, wie es zur Entstehung der alternativen mRNAs des humanen La/SS-B kommen konnte, fand GRÖLZ (1998), dass das humane Gen einen zweiten, alternativen Promotor besaß und die verschiedenen mRNA-Isoformen durch einen Promotorwechsel in Kombination mit alternativem *splicing* entstanden. Der alternative Promotor lag im Intron 1 nach dem Exon 1 und dehnte sich bis in das alternative Exon 1' hinein aus (1.5.1 und Abb. 2). Mit dem Programm HUSAR (3.17) wurden in diesem Bereich Bindestellen für AP1 und TFIID gefunden. Im Exon 1', stromaufwärts der Poly(dT)-Sequenz (8.1), befanden sich zwei weitere Konsensussequenzen für Sp1, zwei für AP2 und eine Bindestelle für NF-κB (GRÖLZ, 1998). Etwa 20 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts des längsten alternativen Exon 1'- bzw. Exon 1''-Transkripts wurde eine von der TATA-Box-Konsensussequenz abweichende TFIID-Bindesequenz (TACAAA) gefunden. Diese Sequenz fungierte beim E1aL-Gen des *Adeno*-Virus als schwacher Promotor (HUANG *et al.*, 1988) und könnte bei der Transkription der alternativen Exon 1'- bzw. Exon 1''-mRNA-Isoformen das *core*-Promotor-Element darstellen. Da sich die humane Exon 1''-La/SS-B-mRNA von der Exon 1'-La/SS-B-mRNA nur um vier Nukleotide am 3'-Ende unterschied, wurde davon ausgegangen, dass die beiden Isoformen durch alternatives *splicing* einer gemeinsamen Vorläufer-RNA entstanden (1.5.1). Die Transkription dieser mRNA-Isoformen erfolgte von dem alternativen Promotor aus. Somit verfügten die klassische Exon 1- und die alternativen Exon 1'- bzw. Exon 1''-mRNA-Isoformen jeweils über einen eigenen Promotor (1.5.1 und Abb. 2). Die Promotoren der Exon 1- und Exon 1'- bzw. Exon 1''-Isoformen könnten darüber hinaus auf gemeinsame regulatorische Elemente zurückgegriffen und sich gegenseitig positiv oder negativ beeinflusst haben. Offensichtlich hemmte ein Sequenzbereich stromaufwärts des Transkriptionsstarts der Exon 1-mRNA-Isoform selektiv den alternativen Promotor. Dies war ein Hinweis darauf, dass es regulatorische Elemente gab, die selektiv die Transkriptionsrate der alternativen Isoformen beeinflussten (GRÖLZ, 1998).

Um zu überprüfen, ob das murine La/SS-B-Gen neben dem Basis-Promotor, wie das humane La/SS-B-Gen, einen zweiten, alternativen Promotor besitzen und ob die Transkription der drei murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen ebenfalls durch einen Promotorwechsel in Kombination mit alternativem *splicing* entstehen könnte, wurde der Bereich, den das Intron 1 und Exon 1c des murinen La/SS-B-Gens umfasste (Abb. 5), mit dem Programm HUSAR (3.17) nach Promotorelementen und TF-Bindestellen abgesucht.

Die Positionen der hierbei gefundenen TFs sind in Abb. 28 dargestellt. Es fand sich eine TATA-Box und Bindestellen für MTF-1 und PPAR. Außerdem ließ sich eine Bindestelle für NF-1/L (*nuclear factor-1* oder CCAAT-Box-TF CTF) detektieren. Weiterhin wurden Bindestellen für c-Fos und c-Jun, insbesondere für JunD gefunden. Ebenso wurden Bindestellen für AP-1 und AP-2 detektiert. Des Weiteren fand sich eine Bindestelle für TCF-1A. Außerdem waren SP1- und TFIID-Bindestellen vorhanden. Des Weiteren fanden sich Bindestellen für c-Myc.

Ebenso ließen sich Bindestellen für die Proteine E12 und E47 detektieren. Nachweisen ließ sich des weiteren eine Homöobox-Bindestelle für das Oktamer-Bindeprotein N-Oct-3. Schließlich konnten noch Bindestellen für die TFs GATA-1, GATA-1B, GATA-2, GATA-3 und NF-E1b und NF-E1c gefunden werden.

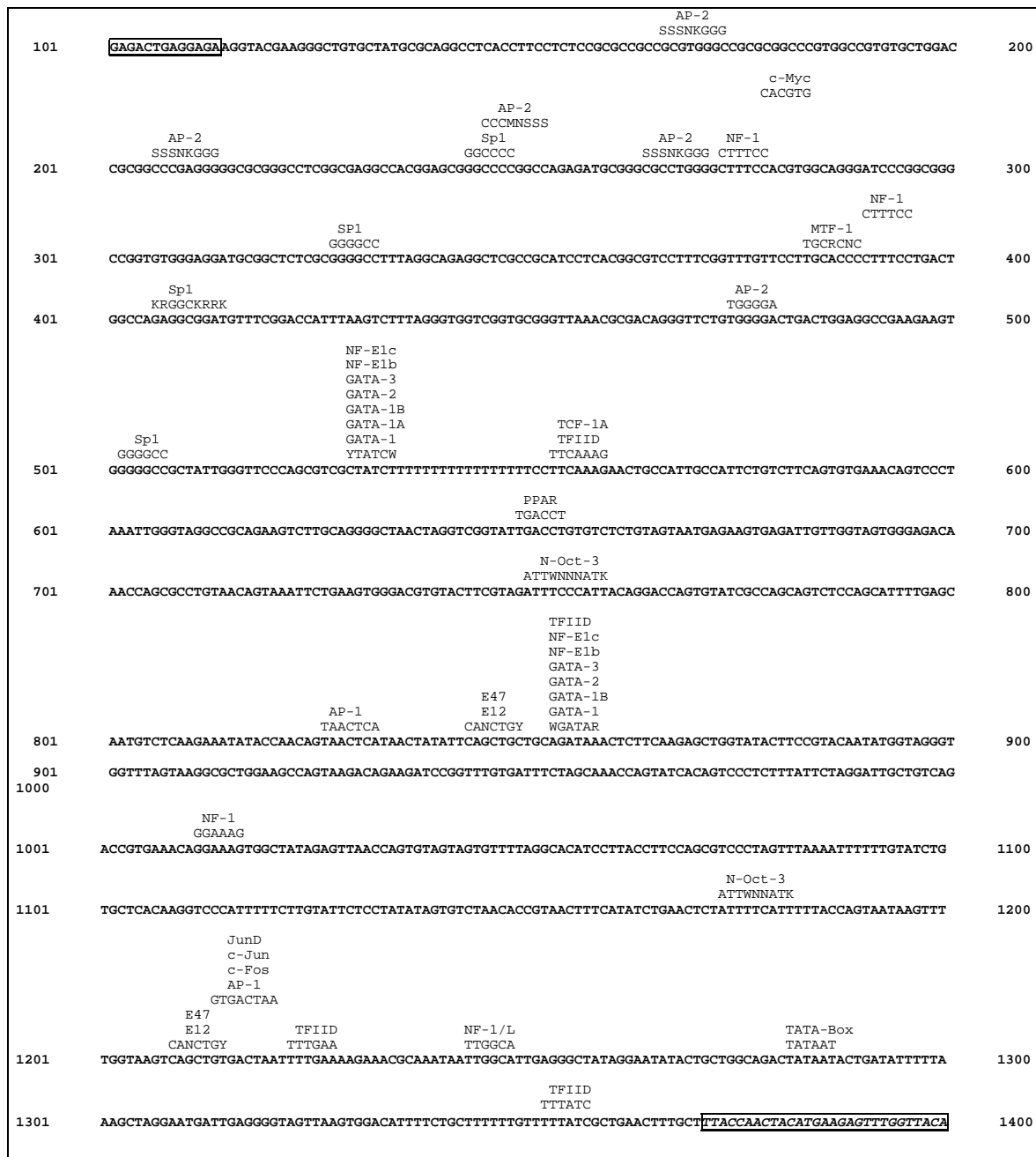


Abb. 28: Darstellung von TFs, die stromaufwärts des Exon 1c im Intron 1 des murinen La/SS-B liegen

Die Zahlenangaben beziehen sich auf diejenigen in Abb. 5

Zusammengefasst ließ sich folgendes feststellen: Die stromaufwärts des Exon 1c im Intron 1 gefundenen Promotorelemente und regulatorischen TFs könnten auf einen zweiten, alternativen Promotor des murinen La/SS-B-Gens hindeuten. Die Existenz eines solchen alternativen Promotors müsste aber noch eindeutig bewiesen werden.

6.6 Der alternative *splice*-Mechanismus

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse (6.4 und 6.5) konnte ein hypothetisches Modell entwickelt werden, wie es zur Entstehung der alternativen mRNAs des murinen La/SS-B kommen konnte (Abb. 29). Vermutlich besaß das murine Gen neben dem Basis-Promotor einen zweiten, alternativen Promotor, der sich im Intron 1 zwischen dem Exon 1a bzw. Exon 1b und dem Exon 1c befand. Somit war die Möglichkeit gegeben, dass die Transkription von zwei verschiedenen Promotoren aus starten konnte. Wahrscheinlich entstanden die verschiedenen mRNA-Isoformen durch einen Promotorwechsel in Kombination mit alternativem *splicing* (Abb. 29). Dies würde genau der Situation beim humane La/SS-B-Gen entsprechen (Abb. 2). Zumindest musste man für die murinen mRNA-Isoformen Exon 1a und Exon 1b ein solches alternatives *splicing* fordern. Da sich diese nur um 27 Nukleotide am 3'-Ende des Exon 1 unterschieden, konnte davon ausgegangen werden, dass diese beiden Isoformen durch alternatives *splicing* einer gemeinsamen Vorläufer-RNA, unter Verwendung einer zum Exon 1b alternativen, 27 Nukleotide stromabwärts gelegenen 5'-*splice*-Stelle, entstanden (Abb. 29), wie dies bei den Exon 1'- bzw. Exon 1''-mRNA-Isoformen des humanen La/SS-B-Gens der Fall war. Aus diesem Grund konnte angenommen werden, dass es einen gemeinsamen Promotor für die Exon 1a-mRNA und Exon 1b-mRNA gab.

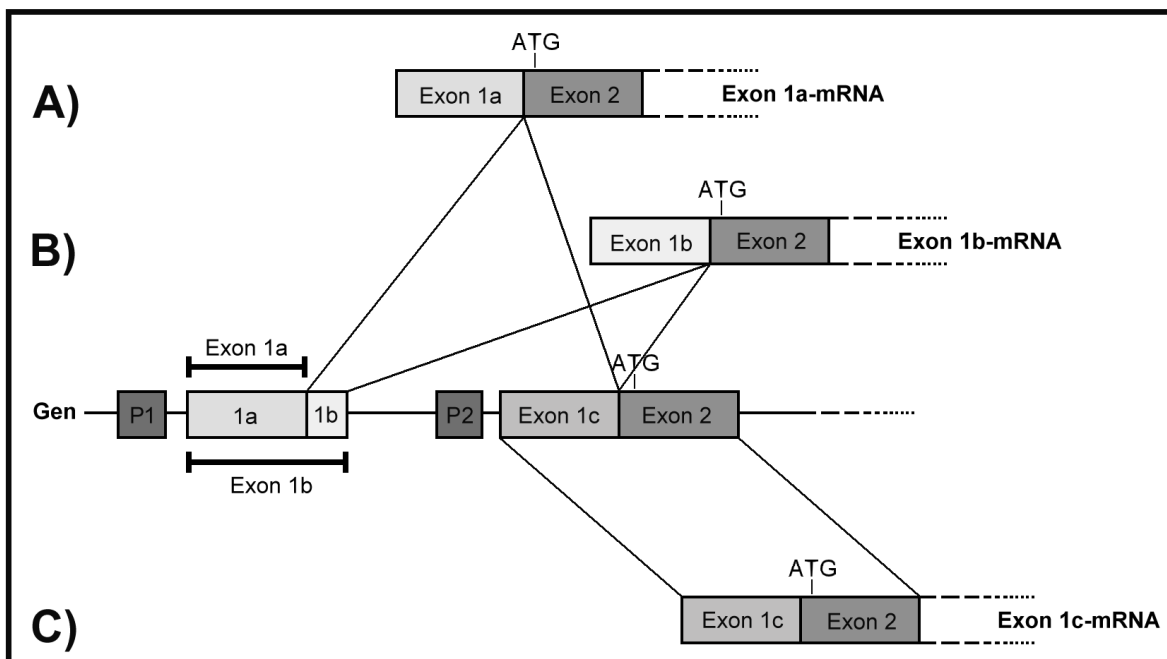


Abb. 29: Die hypothetische Entstehung der mRNA-Isoformen des murinen La/SS-B

A) alternative mRNA mit dem Exon 1a

B) alternative mRNA mit dem Exon 1b

Mitte: Gen mit dem Basis-Promotor P1, Exon 1a, Exon 1b, alternativen Promotor P2, Exon 1c und Exon 2

C) alternative mRNA mit dem Exon 1c

6.7 Vergleich der alternativen Exon 1 des murinen und humanen La/SS-B-Gens

Da sich die Sequenzen der humanen und murinen Exon 1 vollständig voneinander unterschieden (6.3) und sich daher keine Aussage darüber machen ließ, welches humane Exon 1 einem murinen Exon 1 entsprach, musste der Vergleich einerseits nach ihrer Lage auf dem La/SS-B-Gen und andererseits nach der Art des *splice*-Mechanismus erfolgen. Übereinstimmend war der *splice*-Mechanismus der Exon 1'- bzw. Exon 1''-mRNA-Isoform und der Exon 1a- bzw. Exon 1b-mRNA-Isoform (Abb. 2 und Abb. 29). Diese beiden mRNA-Formen entstanden sowohl beim Menschen als auch bei der Maus vermutlich aus einem gemeinsamen Vorläufer-RNA-Molekül, wobei eine Exon 1-*splice*-Variante jeweils immer an ihrem 3'-Ende um einige Basen verlängert war. Während im humanen Gen sich das Exon 1'- bzw. Exon 1'' im Intron zwischen dem Exon 1 und dem Exon 2 befand (8.1), stellte das Exon 1a- bzw. Exon 1b im murinen Gen das erste Exon dar, das nach dem Basis-Promotor lokalisiert war (Abb. 5).

Demzufolge müsste das humane Exon 1 dem murinen Exon 1c entsprechen. Allerdings war das humane Exon 1 und das murine Exon 1c bei den jeweiligen Genen verschieden lokalisiert. Das humane Exon 1 war das erste Exon nach dem Basis-Promotor (8.1), während das murine Exon 1c zwischen dem Exon 1a bzw. Exon 1b und dem Exon 2 lag (Abb. 5).

Die verschiedenen mRNA-Isoformen wurden beim humanen und murinen Gen von verschiedenen Promotoren aus transkribiert. Die humanen mRNA-Formen Exon 1' bzw. 1'' wurden wahrscheinlich vom zweiten, alternativen Promotor des humanen La/SS-B-Gens transkribiert, während die murinen mRNA-Formen Exon 1a- bzw. Exon 1b vermutlich vom Basis-Promotor des murinen La/SS-B-Gens transkribiert wurden. Im Unterschied zur humanen Exon 1-mRNA, die vom Basis-Promotor transkribiert wurde, wurde die murine Exon 1c-mRNA vermutlich vom zweiten, alternativen Promotor transkribiert.

Nach Abwägung aller Fakten könnte das humane Exon 1 dem murinen Exon 1c, das humane Exon 1' dem murinen Exon 1a und das humane Exon 1'' dem murinen Exon 1b entsprechen.

6.8 Die codierende, C-terminale Nukleotidsequenz

SEMSEI *et al.* (1993) konnten in der C-terminalen, codierenden Nukleotidsequenz des La/SS-B aus Ratte im Vergleich zur humanen und bovinen Nukleotidsequenz eine Nukleotid-Insertion und eine Nukleotid-Deletion feststellen (Abb. 30). Da die murine Nukleotidsequenz in diesem Bereich fast vollständig mit der aus Ratte übereinstimmte, wies die murine Sequenz ebenfalls die Insertion und Deletion auf (Abb. 30). Somit lag der Verdacht nahe, dass es sich um eine Nager-spezifische Insertion bzw. Deletion handeln könnte.

Die Insertion umfasste 48 Nukleotide (Abb. 30 A). 13 Nukleotide stromabwärts des 5'-Endes dieser Insertion fand sich ein 17 bp langes Motiv (in Abb. 30 A unterstrichen), das

exakt nach dem 3'-Ende der Insertion wiederholt wurde (in Abb. 30 A finden sich aus Platzgründen nach dem 3'-Ende der Insertion nur noch 9 b dieses Motivs).

Die Deletion umfasste 24 Nukleotide (Abb. 30 B). Teilweise fand sie sich auch in der bovinen Nukleotidsequenz (Abb. 30 B). Die Entstehung dieser Deletion bei Nagern bzw. der teilweisen Deletion beim bovinen La/SS-B könnte durch eine Spezies-abhängige Entwicklung einer Donor-Akzeptor-*splice*-Stelle erklärt werden. Interessanterweise fand sich auf der 3'-Seite der Deletion eine *splice*-Stelle (in Abb. 30 B durch einen Pfeil gekennzeichnet).

In ihrer Gesamtheit betrachtet, könnten Spezies-spezifische Unterschiede des La/SS-B auf eine Optimierung auf die jeweilige Spezies hinweisen, was im Endeffekt zur Bildung Spezies-spezifischer Barrieren geführt haben könnte.

A) Nukleotid-Insertion			
humanes La	: 960	:	AATAATAGAA GACCAACAAGAATCCCTAA ACAATGGAAGTCAAAAGGT-----CGTAGATTT
bovines La	: 960	:	AATAATAGAA GATCAACAAGAATCTCTAA ACAATGGAAGTCAAAAGGT-----CGAAGATTT
Ratten La	: 960	:	AATC ACAGATGATCAACAAGAATCTCTGA ACAATGGAAGTCAAAAGGAGGTCATGCAGCCCGCAGATTTAAAGGAAGTCATGTTTTACAGCAGCTCGCAGATTT
murines La	: 960	:	AATAATAGAA GACCAACAAGAATCCCTAA ACAATGGAAGTCAAAAGGAGGGCATGCAG GTGGAAGATTTAAAGGAAGTCATGTTTTACAGCAGCCCGCAGATTT
B) Nukleotid-Deletion			
			↓
humanes La	: 1120	:	ATGAACATGATGAACATGATGAAAATGGT GCAACTGGACCTGTG AAAAGA
bovines La	: 1120	:	ATGAACGTGATG----- AAAATGGTGCATCTCGAGCAGT AAAAGA
Ratten La	: 1120	:	ATCATCGT CGTG -----GACCA GTG AAAAGA
murines La	: 1120	:	ATCATCGT CGTG -----GACCA GTG AAAAGA

Abb. 30: Darstellung der Spezies-spezifischen Insertion bzw. Deletion in der C-terminalen, codierenden Nukleotidsequenz des La/SS-B von Mensch, Rind, Ratte und Maus (verändert nach SEMSEI *et al.*, 1993)

Die Zahlenangaben beziehen sich auf die murine Nukleotidsequenz (8.3). Fett gedruckte Nukleotide kennzeichnen Sequenzunterschiede. Striche stellen fehlende Nukleotide dar. In (A) ist das 17 bp lange Motiv unterstrichen, das exakt nach dem 3'-Ende der Insertion wiederholt wird. Aus Platzgründen finden sich nur noch 9 b dieses Motivs nach dem 3'-Ende der Insertion, die ebenfalls unterstrichen sind. Der Pfeil in (B) kennzeichnet eine *splice*-Stelle.

6.9 Die alternativen Polyadenylierungsstellen

Die La/SS-B-Nukleotidsequenz in der 3'-UTR von Maus und Ratte, die die Polyadenylierungsstellen enthielt, stimmte fast vollständig überein (Abb. 31). SEMSEI *et al.* (1993) zeigten, dass bei der La/SS-B-Nukleotidsequenz der Ratte im Gegensatz zu der des humanen La/SS-B andere Polyadenylierungsstellen bzw. -signale vorhanden waren. Die klassische Polyadenylierungssequenz (5'-AAUAAA-3') des humanen La/SS-B fand sich nicht in der Ratten-Nukleotidsequenz. Ebenso wenig konnte diese beim murinen La/SS-B gefunden werden (Abb. 31).

Anstelle dessen fanden sich bei beiden Nagern zwei alternative Sequenzen (5'-AUUAAA-3', 5'-AAUAUA-3') (Abb. 31). Scheinbar wurde die klassische Polyadenylierungssequenz bei Nagern deletiert. Auf der anderen Seite fanden sich in der humanen Sequenz ebenfalls zwei alternative Polyadenylierungsstellen (5'-AUUAAA-3', 5'-AAUAUA-3') (Abb. 31). Von SEMSEI *et al.* (1993) konnte gezeigt werden, dass alle

Polyadenylierungsstellen in Mensch und Ratte genutzt wurden. Da die beiden Nager-Sequenzen in diesem Bereich zu fast 100% identisch waren, konnte mit großer Sicherheit postuliert werden, dass beim murinen La/SS-B ebenfalls die beiden alternativen Polyadenylierungsstellen verwendet wurden.

Alternative Polyadenylierungsstellen wurden bei nur 5% aller mRNAs nachgewiesen. Dass allerdings Haushaltsgene wie La/SS-B alternative Polyadenylierungssequenzen besaßen, war sehr ungewöhnlich (SEMSEI *et al.*, 1993).

humanes La	: 9186	:	ATTCAAATATCAAAGGAAGATTCTTCC <u>ATTAAA</u> TTGCCTTTGTAATATGAGAATGTATTAGTACAAACT---AACT <u>AAATAAA</u> ATATATACTATATGAAAAGGC
Ratten LA	: 9186	:	<u>ATTAAA</u> ATATGAAAAGGAAGATTCTTCCCTTAATTGCCTTTGTAATATGAGAATGTATTAGTACAGACTTGTAA-----AATATATACTGTATAAAAATAGC
murines La	: 9186	:	<u>ATTAAA</u> ATATGAGAAGGAAGATTCTTCCCTTAATTGCCTTTG-AATATGAGAATGTATTAGTACAGA-TGTAA-----AATATATACTGTATAAAAATAGC

Abb. 31: Vergleich der Polyadenylierungsstellen im 3'-Bereich der La/SS-B-Nukleotidsequenzen von Mensch, Ratte und Maus (verändert nach SEMSEI *et al.*, 1993)

Die klassische Polyadenylierungssequenz ist fett unterstrichen. Die alternativen Polyadenylierungssequenzen sind dünn unterstrichen. Fett gedruckte Nukleotide kennzeichnen Sequenzunterschiede. Striche stellen fehlende Nukleotide dar. Die Zahlenangaben beziehen sich auf murine La/SS-B-Gensequenz aus Abb. 5.

6.10 Die *hot-spot*-Region

Im Exon 7, das für die *linker*-Region codierte, die die N- und C-terminale Domäne des humanen La/SS-B-Proteins miteinander verband, war eine Adenin-Kassette enthalten, in der acht Adenine aufeinander folgten. Bisher wurden zwei humane cDNAs isoliert, die in dieser Adenin-Kassette eine Insertion (9A-Mutation) bzw. eine Deletion (7A-Mutation) eines Adenins aufwiesen (1.5.9). Darüber hinaus war dieselbe Region, in der die Mutationen in den cDNAs gefunden worden waren, auch bei den drei humanen La/SS-B-Pseudogenen ungewöhnlich inhomogen (1.5.1). So enthielten die Pseudogene an der Poly(dA)₈-Stelle Insertionen von 4, 16 und 24 Adenin-Resten (BARTSCH, 1997; GRÖLZ *et al.*, 1997c). Offensichtlich handelte es sich bei der Region im Exon 7 um eine *hot spot*-Region, in der Mutationen gehäuft auftraten.

Sowohl die 9A- als auch die 7A-Mutation hatte eine Verschiebung des Leserasters zufolge. Bei der 9A-Mutation entstand ein neues Stop-Codon gleich nach der Punktmutation (Abb. 32). Bei der 7A-Mutation wurde der eigentliche Leserahmen des La/SS-B-Proteins verlassen, was die Synthese von 12 AS bewirkte, die normalerweise kein Bestandteil des humanen La/SS-B-Proteins waren und ein Neoepitop bilden könnten (BACHMANN *et al.*, 1996b) (1.5.9), bevor die Translation an einem neu entstandenen Stop-Codon abbrach (Abb. 32). In beiden Fällen wurde nur die N-terminale Proteinhälfte translatiert.

Vollständiges La/SS-B-Protein könnte trotz der 7A- oder -9A-Mutation gebildet werden, indem die Translation am nachfolgenden Start-AUG an Position 223 (M223) durch den Eintritt des Ribosoms nach dem Mechanismus der internen Translationsinitiation oder der Reinitiation fortgesetzt wurde. Funktionelles La/SS-B-Protein könnte somit durch Zusammenlagerung der N-terminalen und C-terminalen Proteinhälfte entstehen.

Hypothetisch würde die für das humane La/SS-B-Gen beschriebene Insertions- bzw. Deletions-Mutation beim murinen La/SS-B-Gen die gleichen Folgen ergeben. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die Poly-(A)-Kassette des murinen La/SS-B im Normalfall neun Adenine enthielt (Abb. 32). Bei der Insertions-Mutation (10A-Mutation) wären es dann zehn Adenine, bei der Deletions-Mutation (8A-Mutation) nur acht Adenine. Wie beim humanen La/SS-B würde bei der Insertions-Mutation der Leserahmen so verschoben werden, dass die Translation an einem neu entstandenen Stop-Codon vorzeitig abbrach (Abb. 32). Bei einer Deletions-Mutation würde die Leserasterverschiebung die Bildung von 12 fremde AS bewirken (Abb. 32). Diese 12 AS stimmte zwischen Mensch und Maus bis auf drei AS überein (Abb. 32: unterstrichene AS). Neoepitope könnten bei der Entstehung von Autoimmunität und dem *triggern* der Immunantwort beteiligt sein (LANZAVECCHIA, 1995) (1.5.9).

Normale Situation:	
murin 9A:	AAGGAAGATTACTTTGCAAAAAAAAAATGAAGAAAGAAAGCAGAGCAAAGTGAAGCTAAATTAAGCTAAACAA K E D Y F A K K N E E R K Q S K V E A K L K A K Q
human 8A:	GACCTGTAATACTTTTCAAGGACGATTACTTTGCCAAAAAAAAATGAAGAAAGAAAGCAAATAAAGTGAAGCTAAATTAAGAGCTAAACAGGAGCAAGCAAGCCAAACAAAAGTTAGAA D L L I L F K D D Y F A K K N E E R K Q N K V E A K L R A K Q E Q E A K Q K L E
Insertions-Mutation:	
murin 10A:	AAGGAAGATTACTTTGCAAAAAAAAAATGA K E D Y F A K K K *
human 9A:	GACCTGTAATACTTTTCAAGGACGATTACTTTGCCAAAAAAAAATGA D L L I L F K D D Y F A K K K *
Deletions-Mutation:	
murin 8A:	AAGGAAGATTACTTTGCAAAAAAAAAATGAAGAAAGAAAGCAGAGCAAAGTGAAGCTAAATTA K E D Y F A K K M K K E <u>S R A</u> K W K L N *
human 7A:	GACCTGTAATACTTTTCAAGGACGATTACTTTGCCAAAAAAAAATGAAGAAAGAAAGCAAATAAAGTGAAGCTAAATTA D L L I L F K D D Y F A K K M K K E <u>N K I</u> K W K L N *

Abb. 32: Darstellung der Poly-(A)-Kassette im Exon 7 des murinen und humanen La/SS-B mit und ohne Mutationen in der *hot spot*-Region

Die Sequenzen beginnen mit der ersten Aminosäure des Exon 7. Die Poly-(A)-Kassette ist jeweils fett dargestellt. Die AS, die sich zwischen dem humanen und murinem Neoepitop unterscheiden, sind durch Unterstreichung gekennzeichnet.

B) Analyse des murinen La/SS-B auf transkriptionaler und translationaler Ebene

Im Zusammenhang mit der Expression der murinen mRNA-Isoformen sollte zunächst geklärt werden, welche Größen die polyadenylierten mRNAs besaßen. Außerdem musste überprüft werden, ob weitere mRNA-5'-UTR-Transkripte oder alternative *splice*-Transkripte existierten. Des Weiteren sollte ermittelt werden, ob es sich um fertig prozessierte, zytoplasmatische und funktionelle mRNAs handelte, die für die Synthese von La/SS-B-Protein genutzt wurden, und ob das Protein vom Zellkern in das Zytoplasma translokalisiert wurde, wenn die Translation von einer bestimmte mRNA-Isoform erfolgte. Außerdem sollte festgestellt werden, ob es eine gewebeabhängige oder zellspezifische Expression der mRNA-Isoformen

gab. Von großem Interesse war auch die Aufklärung des Translationsmechanismus der mRNA-Isoformen. Hierbei sollte festgestellt werden, ob die Translation nach dem *scanning*-Modell von KOZAK und/oder durch den internen Eintritt des Ribosoms infolge einer internen Ribosomeneintrittsstelle (IRES) erfolgen konnte.

6.11 Größenbestimmung der polyadenylierten mRNAs

Zur Größenbestimmung der murinen La/SS-B-mRNA wurde ein Northern-Blotting durchgeführt (5.2). Mit der zur Detektion verwendeten Sonde konnten zwar theoretisch die drei murinen alternativen mRNA-Isoformen unterschieden werden, jedoch ließ dies das geringe Auftrennungsvermögen des Northern-Blottings nicht zu, da nur eine einzelne Bande von etwa 1,8 kb detektiert werden konnte (5.2). Diese Bande stellte mit großer Wahrscheinlichkeit ein La/SS-B-mRNA-Gemisch dar, bestehend aus den drei murinen mRNA-Isoformen. Auch die humane La/SS-B-mRNA erschien im Northern-Blot als einzelne Bande und besaß eine Größe von ca. 1,8 kb (CHAN *et al.*, 1989a; CHAMBERS *et al.*, 1988) (1.5.1). Humane mRNA-Isoformen ließen sich auch hier nicht unterscheiden. Betrachtete man die Größe der murinen cDNAs mit ca. 1,4 kb (8.3), so müssten die murinen La/SS-B-mRNAs einen etwa 400 b langen Poly(A)-Trakt besitzen. Dass ein Poly(A)-Trakt vorhanden war, wurde aus der Tatsache geschlossen, dass die cDNA-Synthese mit dem Oligo(dT)-Primer möglich war (z.B. 5.4). Die Bildung des Poly(A)-trakts konnte beim murinen La/SS-B nur durch die alternativen Polyadenylierungsstellen (6.9) erfolgen, denen somit eine reelle Funktion zukam.

6.12 Suche nach weiteren mRNAs

Bei dem 5'-RACE (5.8.1) wurden die amplifizierten La/SS-B-cDNA-Fragmente daraufhin untersucht, ob weitere alternative 5'-Isoformen existierten und ob die alternativen 5'-Isoformen in ihrer Länge von den bekannten Isoformen abwichen. Falls es sich bei den alternativen mRNAs mit dem Exon 1a, 1b bzw. 1c um unvollständig gesplissene *precursor*-mRNAs handelte, musste es möglich sein, cDNA-Fragmente der vollständig gesplissenen Formen zu isolieren. Alternative Isoformen könnten ein artifizielles Nebenprodukt der Transkription eines Haushaltsgenes darstellen. Durch einen zu weit stromabwärts liegenden Startpunkt der Transkription könnten nicht-funktionelle Abbilder der einzigen physiologischen mRNA entstehen. Aberrante mRNAs kamen vermutlich nur in einer sehr geringen Konzentration vor und wurden rasch abgebaut. Bedingt durch die hohe Sensitivität der PCR wäre es jedoch möglich solche artifizialen Nebenprodukte zu detektieren. Die Sequenzierungen der 5'-RACE-cDNA-Produkte zeigten, dass es sich bei um die bereits beschriebenen 5'-Anfänge der mRNAs handelte. Allerdings waren diese deutlich verkürzt. Dies stimmte mit den von

CHAMBERS *et al.* (1988) erhaltenen Ergebnissen für das humane La/SS-B überein, bei dem die 5'-Anfänge der mRNA-Isoformen ebenfalls stark variierten. Dies war typisch für Haushaltsgene mit einem Promotor ohne TATA-Box (MELTON *et al.*, 1986). Somit stellten die drei bisher gefundenen murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen (TOPFER *et al.*, 1993; GRÖLZ und BACHMANN, 1997d; unveröffentlicht) (*GenBank accession No.* L00993 und Y07951) vermutlich die längsten Transkripte dar. Weitere alternative 5'-Isoformen wurden nicht gefunden. Falls alle Isoformen einen signifikanten Beitrag zur Menge an La/SS-B-Protein leisteten, mussten sie in ähnlichem Umfang gebildet werden. Ansonsten hätte es sich bei ihnen auch um Nebenprodukte der Transkription handeln können. Die für die den 5'-RACE für alle Isoformen immer die gleiche Primerkombinationen verwendet wurde und auch sonst immer gleiche Bedingungen vorherrschten, konnten die amplifizierten PCR-Banden quantitativ miteinander verglichen werden. Größere Konzentrationsunterschiede zwischen den cDNA-Produkten konnten allerdings nicht festgestellt werden.

Mittels der Technik der RT-PCR sollte (5.8.2) untersucht werden, ob murine, alternative La/SS-B-mRNA-Isoformen existierten, bei denen Exons herausgeschnitten oder Introns nicht herausgeschnitten waren. Wie bei dem Autoantigen Ro52 β /SS-A, bei dem im Vergleich zum Ro52 α /SS-A das Exon 4 herausgeschnitten wurde, könnten ganze Exons fehlen. Auch das Pseudogen 3 des humanen La/SS-B, bei dem das Exon 3 fehlte, könnte auf die Existenz weiterer Isoformen hindeuten (1.5.1). *Splice*-Varianten des murinen La/SS-B, bei denen ein Exon deletiert war, waren nicht zu erwarten. Einmal, weil auch beim humanen La/SS-B keine mRNAs gefunden wurden, bei denen ein Exon *herausgespliced* war. Auf der anderen Seite hätten auch nur wenige Exons herausgeschnitten werden können, ohne dass es dabei zu einer Leserasterverschiebung kommen würde. Dies wäre nur bei den Exons 5, 7 und 9 möglich gewesen. Dabei wäre die cDNA um 108 bp, 72 bp bzw. 141 bp verkürzt gewesen. Durch eine solche Deletion wären teilweise funktionelle Proteinbereiche deletiert worden. Intron-Insertionen waren im Grunde gänzlich auszuschließen, da es hierbei immer zu einer Verschiebung des Leserasters kommen würde. Alternativ gesplissene cDNA-Fragmente wurden nicht gefunden.

Die Ergebnisse der 5'-RACE- und RT-PCR-Experimente ließen die folgenden Aussagen zu: Da keine weiteren mRNA-Isoformen des murinen La/SS-B-Gens nachgewiesen werden konnten, musste es sich bei allen La/SS-B-cDNA-Isoformen um Derivate von vollständig gesplissenen La/SS-B-mRNAs handeln. Die bereits gefundenen murinen mRNAs stellen vermutlich die längsten gefundenen Transkripte dar (TOPFER *et al.*, 1993; *GenBank accession No.* L00993; *GenBank accession No.* Y07951), da keine verlängerten Transkripte detektiert werden konnten. Weitere 5'-UTR-Isoformen oder *splice*-Varianten des La/SS-B-Gens konnten mit der zur Zeit sensitivsten Technik, der PCR, nicht gefunden werden. Somit schien die Anzahl an La/SS-B-mRNA-Isoformen bei Mensch und Maus identisch zu sein (1.5.1 und 1.6).

6.13 Ubiquitäre und zellspezifische Expression der mRNAs

Die Expression der drei murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen in Mausgeweben, Mausembryonen, murinen Zellkulturen und Primärzellen sollte dahingehend untersucht werden, ob eine gewebespezifische mRNA-Expression festzustellen war (5.4). Voraussetzung für diesen Versuch war, dass sich durch die angewandte Methode alle drei murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen eindeutig voneinander unterscheiden ließen, dass die Methode einfach, schnell und reproduzierbar war, dass wenig Ausgangsmaterial notwendig war, dass die Methode sensitiv genug war und dass eventuell eine Quantifizierung möglich war.

Zu dieser Untersuchung boten sich somit die Methode des Northern-Blots, der *in situ*-Hybridisierung oder der RT-PCR an. Das Northern-Blotting bot z.B. die Möglichkeit, die La/SS-B-mRNA-Isoformen relativ schnell und mit geringem Aufwand zu quantifizieren. Allerdings war eine Unterscheidung der mRNA-Isoformen auf Grund des geringen Auflösungsvermögens der mRNAs bei einer Laufhöhe von ca. 1,8 kb nicht möglich (5.2). Des Weiteren erforderte das Northern-Blotting große Mengen an Ausgangsmaterial. So benötigten CHAMBERS *et al.* (1988) für einen Northern-Blot 10 µg Poly(A)-gereinigter humaner La/SS-B-mRNA. Diese Menge an gereinigter mRNA erforderte ungefähr 1 mg RNA einer Präparation von total-RNA. Ein Northern-Blot konnte aus diesem Grunde nur angewendet werden, wenn genügend Ausgangsmaterial zur Verfügung stand und das Gen von Interesse in größerem Ausmaß exprimiert wurde. In der *in situ*-Hybridisierung war es zwar möglich, die drei murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen eindeutig voneinander zu unterscheiden (5.3), jedoch gestaltete sich die Herstellung von Gewebeschnitten gerade bei sehr kleinen Geweben (z.B. Nebenniere) als schwierig. Auch war die *in situ*-Hybridisierung oft weniger gut zu reproduzieren.

Die RT-PCR stellte eine der sensitivsten Techniken dar. Ausgehend von Femtogramm oder nur einem einzelnen Molekül wurde die Nukleinsäure zwischen zwei Primern um das 10^7 - 10^{10} fache vermehrt. Daher waren nur geringe Mengen an Ausgangsmaterial notwendig. Theoretisch wurden in der PCR während der exponentiellen Phase der Vermehrung in n Zyklen 2^n Kopien des PCR-Produktes gebildet. Tatsächlich war die Vermehrungsrate zumeist geringer und hing von einer Vielzahl von Parametern wie z.B. den Reaktionsbedingungen und Bindungseigenschaften der Primer ab. Im Vergleich zum Northern-Blotting wurde für einen Ansatz einer RT-PCR nur etwa 5 µg total-RNA eingesetzt. Außerdem konnten gleiche Gewebe vereinigt werden. Ein Nachteil der RT-PCR war, dass sich die PCR-Produkte nur sehr schwer quantifizieren ließen. Die bisher übliche Methode mit einer Referenz-RNA und das Austesten der optimalen Zyklenzahl war in dieser Art und Weise nicht mehr akzeptiert. Heute erfolgte eine PCR-Quantifizierung mit einem *light-cycler*, der die Zunahme der PCR-Produkte während der PCR photometrisch bestimmte. Ein solches Gerät stand allerdings nicht zur Verfügung. Voraussetzung für eine Quantifizierung war des Weiteren, dass die Referenz-mRNA und die zu untersuchende mRNA im gleichen Ansatz amplifiziert wurden, was wahrscheinlich nicht möglich war, da eine Hybridisierung der Primer mit sich selbst nicht auszuschließen war. Nach

Abwägung aller Faktoren wurde zur Expressionsanalyse der murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen die Methode der RT-PCR gewählt.

In allen untersuchten Mausgeweben, Mausembryonen, murinen Zellkulturen und Primärzellen konnte die GAPDH-Kontrollbande detektiert werden (Abb. 8 und 9), was zeigte, dass die Durchführung des Versuchs unter den gewählten Bedingungen möglich war. Ebenso konnte überall die La/SS-B-Kontrollbande (Exon 2–11) nachgewiesen werden (Abb. 8 und 9), was bedeutete, dass immer wenigstens eine La/SS-B-mRNA-Isoform exprimiert werden musste, was der Beschreibung von La/SS-B als permanent exprimierendes Haushaltsgen entsprach (1.5.1). Auch von TOPFER *et al.* (1993) konnte gezeigt werden, dass das La/SS-B-Protein in vielen Mausgeweben exprimiert wurde, was auf eine ubiquitäre Expression schließen ließ. Dabei blieb jedoch die Frage offen, welche mRNA-Isoform in welchem Gewebe exprimiert wurde.

Die Exon 1a- und die Exon 1c-mRNA-Isoform des murinen La/SS-B wurden ebenfalls von fast allen untersuchten Proben exprimiert (Abb. 8 und 9). Eine Ausnahme bildeten das Leber- und Testisgewebe (Abb. 8). Bei Lebergewebe konnte mit allen Isoform-spezifischen Primern kein PCR-Produkt erhalten werden (Abb. 8). Da aber der codierende Leserahmen des La/SS-B amplifiziert werden konnte, konnte dies nicht auf eine gewebeabhängige Expression hindeuten. Bei Testisgewebe konnte mit dem Primerpaar La-mRNA-F3 und La-mRNA-R1 (5.4) keine Bande amplifiziert werden (Abb. 8). Wahrscheinlich wurde die PCR bei diesen Geweben durch unbekannte Faktoren gestört.

Die zusätzliche Expression der Exon 1b-mRNA-Isoform konnte in keinem der untersuchten murinen Geweben, Mausembryonen oder murinen Primärzellen, sondern nur in Zellkulturen nachgewiesen werden, jedoch nur in solchen, die zum Zeitpunkt der RNA-Präparation eine Konfluenz von weniger als 50% besaßen (NIH-3T3-Zellen, Swiss-3T3-Zellen, P388D1-Makrophagen und Myelomzellen) oder im undifferenzierten Entwicklungsstadium (PCC7-Mz1-Nervenzellen) vorlagen (Abb. 9). Die zusätzliche Expression der Exon 1b-mRNA-Isoform bei NIH-3T3-Zellen (<50% konfluent) bestätigte die Ergebnisse aus der *in situ*-Hybridisierung (5.3). Der Unterschied zu den Zellkulturen, die zum Zeitpunkt der RNA-Präparation eine Konfluenz von mehr als 80% besaßen oder im differenzierten Entwicklungsstadium vorlagen, bestand darin, dass sich diese Zellen in der proliferativen Phase befanden. Die meisten hier verwendeten Zelllinien waren kontakt-inhibiert, so dass die Proliferation mit zunehmender Konfluenz abnahm. Dies würde erklären, warum sich diese mRNA-Isoform in keinem murinem Gewebe nachweisen ließ, denn hierbei handelte es sich ausschließlich um nicht-proliferatives Dauergewebe. Jedoch konnte in embryonalem Mausgewebe (Mausembryo Tag 10 und 15) (Abb. 8), das stark proliferativ war, und einigen Zellkulturen mit einer Konfluenz von weniger als 50% zum Zeitpunkt der RNA-Präparation (Mesangiumzellen und C2C12-Muskelzellen) ebenfalls keine Exon 1b-mRNA-Isoform detektiert werden (Abb. 9). Somit konnte die Expression dieser mRNA-Isoform nicht alleine von der Proliferationsphase der jeweiligen Zellen abhängen. Alle Zellkulturen, bei denen die

Exon 1b-mRNA-Isoform detektiert werden konnte, besaßen als einzige Gemeinsamkeit Tumoreigenschaften, wobei die Zellen aus unterschiedlichen Tumorgeweben isoliert wurden (3.8). Interessanterweise wurde auch die humane La/SS-B-Exon 1'-mRNA-Isoform aus Tumor-Lebergewebe isoliert. Dass die Exon 1b-mRNA-Isoform nur in verschiedenen, tumorartigen Zellkulturen nachgewiesen werden konnte, nicht aber in allen Zellkulturen, zeigte, dass es sich um eine Tumor-spezifische Expression handeln könnte. Aus den genannten Gründen konnte es sich nicht um Zellkulturartefakte handeln.

Der Exon 1b-mRNA-Isoform könnte bei proliferativen Tumorzellen möglicherweise eine besondere Funktion zugeordnet werden, wobei die Funktion der mRNA-Isoformen generell sowohl beim murinen als auch beim humanen La/SS-B unbekannt war. Vermutet wurde aber eine regulatorische Funktion (BACHMANN *et al.*, 1997), was für die hier erhaltenen Ergebnisse zutreffen würde. Auf der anderen Seite könnte das Zustandekommen dieser mRNA-Isoform durch ein verändertes *splicing* bei proliferativen Tumorzellen erklärt werden. Hierbei könnte es sich nur um eine Überlastung des *splice*-Apparates handeln, wenn man davon ausging, dass in der Proliferation von der Zelle vermehrt La/SS-B-Protein exprimiert werden musste. Durch die Überlastung könnten die 27 Nukleotide, um die das Exon 1b im Vergleich zum Exon 1a verlängert war, nicht mehr deletiert werden. Ob es sich bei der Expression der Exon 1b-mRNA-Isoform um einen Tumormarker handelte, müsste allerdings noch weiter untersucht werden. Interessant zu überprüfen wäre, ob sich diese mRNA-Isoform auch in Maus-Tumorgewebe nachweisen ließ und wenn ja, ob es sich hierbei um einen allgemeinen Tumormarker handelte, mit dem sich viele Krebsarten detektieren ließen, oder ob diese mRNA-Isoform nur bei speziellen Tumoren auftrat. Leider stand tumoröses Mausgewebe nicht zur Verfügung und die Induktion von Tumoren bei Tieren unterlag strengen Bestimmungen.

Für die humanen La/SS-B-mRNA-Isoformen konnte bisher keine eindeutige, gewebespezifische Expression gezeigt werden. GRÖLZ (1998) fand, dass in Raji-Zellen die Transkription aller La/SS-B-mRNA-Isoformen hochreguliert war; insbesondere wurden die alternativen Exon 1'-Transkripte in weit größerem Umfang transkribiert, als dies in anderen Zelllinien oder Geweben der Fall war. Raji-Zellen wurden aus mit dem *Epstein-Barr-Virus* (EBV) transformierten Lymphozyten eines Patienten mit *Burkitt-Lymphom* isoliert. Dies stellte eine interessante Korrelation mit den Ergebnissen über die murine Exon 1b-mRNA-Isoform dar. Demzufolge könnte die murine Exon 1b-mRNA-Isoform der humanen alternativen Exon 1'-mRNA-Isoform homolog sein. Interessanterweise wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eine Infektion mit EBV und die Entstehung von Autoimmunität und Sjögren Syndrom (SS) in Verbindung gebracht. So konnten EBV-DNA und -Antigene in einer statistisch signifikanten Häufigkeit bei Patienten mit SS nachgewiesen werden (FOX *et al.*, 1992; FOX *et al.*, 1986; MARIETTE *et al.*, 1991). Vielleicht führten Infektionen mit bestimmten Viren zu einer Hochregulation bzw. Veränderung des Mengenverhältnisses der La/SS-B-mRNAs in Lymphozyten. Denkbar wäre, dass die Entstehung von Autoimmunität durch eine unter pathophysiologischen Bedingungen veränderte Genexpression begünstigt wurde.

6.14 Fertig gesplissene und zytoplasmatische mRNAs

Nach KOZAK (1991b) konnten cDNAs mit verschiedenen 5'-UTRs *precursor*-mRNAs darstellen, welche posttranskriptional erst zu funktionellen mRNAs weiter zurecht geschnitten wurden. Dies könnte z.B. bei den beiden mRNA-Isoformen Exon 1a und Exon 1b der Fall gewesen sein. Bei der Exon 1b-mRNA-Isoform handelte sich entweder um eine alternativ gesplißene mRNA, bei der die 27 Nukleotide, um die das Exon 1a der Exon 1a-mRNA-Isoform verkürzt war, durch alternatives *splicing* erst noch entfernt wurden (Abb. 29), oder es handelte sich um eine fertig gesplissene mRNA-Form. Den Ergebnissen der *in situ*-Hybridisierung (5.3) zufolge handelte es sich bei allen La/SS-B-mRNA-Isoformen nicht um *precursor*-mRNA, sondern um fertig gesplißene, zytoplasmatische mRNAs, da alle mRNA-Isoformen im Zytoplasma detektiert werden konnten.

6.15 Funktionelle mRNAs

Um zu klären, ob es sich bei den drei vollständig gesplissenen, zytoplasmatischen mRNA-Isoformen des murinen La/SS-B um funktionelle mRNAs handelte, die für die Synthese von funktionellem La/SS-B-Protein genutzt wurden, oder ob es sich um eine Art regulatorische und, zumindest auf der Ebene der Translation, nicht-funktionelle mRNAs handelte, wurde deren Translation qualitativ durch transiente Transfektion und quantitativ durch *in vitro*-Transkription/-Translation untersucht (5.5).

Die transiente Transfektion der drei verschiedenen cDNA-Isoformen erfolgte in humanen HeLa-Zellen, die ein geeignetes Testsystem zur Untersuchung der Expression von murinem La/SS-B-Protein darstellten. Die Translationsprodukte aller La/SS-B-cDNA-Isoformen ließen sich in der transienten Transfektion mit dem La/SS-B-spezifischen mAK 5B9 (3.12) im Immuno-Blot detektieren. Der mAK 5B9 reagierte spezifisch mit humanem und murinem La/SS-B-Protein (1.5.8). Das durch die murine La/SS-B-Protein mit einem MW von etwa 45 kDa konnte im Blot vom humanen mit einem MW von etwa 50 kDa deutlich unterschieden werden (Abb. 10). Damit stellten die mRNA-Isoformen nicht nur fertig gesplissene und zytoplasmatische, sondern auch funktionelle mRNAs dar, die translatiert werden konnten.

Um die Vermutung von TOPFER *et al.* (1993) zu überprüfen, die Funktion der verschiedenen La/SS-B-mRNA-Isoformen könnte darin bestehen, unterschiedliche Proteinmengen zu liefern und somit die Expression des La/SS-B-Proteins zu regulieren, wurde die Proteinexpression der drei mRNA-Isoformen quantifiziert (5.5.3). Um quantitative Unterschiede in der Expression der alternativen cDNA-Isoformen genauer bestimmen zu können, wurde mit der *in vitro*-Transkription/-Translation eine Technik eingesetzt, die sich sehr gut für Quantifizierungen eignete. Da die Transkription und Translation in einem Ansatz stattfanden, konnte davon ausgegangen werden, dass Unterschiede der murinen

La/SS-B-Proteinmengen auf die Translationseffizienz der cDNA-Isoformen zurückzuführen waren. Durch eine densitometrische Bestimmung konnte gezeigt werden, dass alle *in vitro* transkribierten/translatierten alternativen cDNA-Isoformen mit gleicher Effizienz exprimiert wurden (Abb. 12). Im Gegensatz dazu konnte von GRÖLZ (1998) für die humanen La/SS-B-cDNA-Isoformen gezeigt werden, dass die Translationseffizienz der alternativen cDNA-Isoformen geringer war, als die der klassischen.

Neben den murinen La/SS-B-Banden mit einem MW von etwa 45 kDa konnten auch einige schwächere Banden detektiert werden (Abb. 11). Diese Banden waren nur in den Laufspuren zu erkennen, in denen die Translationsprodukte der alternativen cDNA-Konstrukte des La/SS-B aufgetragen wurden. Somit konnten unspezifische Transkriptionen und Translationen von Anteilen des Vektors pcDNA3 ausgeschlossen werden. Auch konnten diese Banden keine Proteine aus dem Reticulozyten-Extrakt darstellen, da diese offensichtlich alle durch die Immundepletion mit dem für das La/SS-B-spezifische mAK 5B9 entfernt wurden. Demzufolge musste es sich bei diesen Banden ebenfalls um La/SS-B-Banden handeln. Bei den Banden mit ungefähr 43 und 28 kDa handelte es sich entweder um Degradationsprodukte des La/SS-B-Proteins, oder um ein N-terminal verkürztes La/SS-B-Protein, das durch interne Initiation entstanden sein musste (SCHÖRNER und DRATHEN, 2000; unveröffentlicht).

In vitro-Translationssysteme mit Reticulozyten-Lysat neigten zur Artefaktbildung; mitunter kam es zur Entstehung von aberranten Translationprodukten. Diese Translationsprodukte entstanden vermutlich durch Initiation der Translation von einem intern gelegenen Methionin anstelle des korrekten Start-AUGs (SVITKIN *et al.*, 1994). Die Banden mit einer Größe von etwa 43 und 28 kDa könnten solchen aberranten Translationsprodukten entsprechen. Die Banden mit einem MW von ca. 60 kDa könnten La/SS-B-Proteine darstellen, die mit verkürzten La/SS-B-Fragmenten assoziiert waren (BACHMANN, 2000; unveröffentlicht).

Da die Nebenbanden jeweils gleich intensiv gefärbt waren, musste die *in vitro*-Translation und die Immundepletion bei allen Ansätzen mit einer vergleichbaren Effizienz abgelaufen sein. Darum war es auch zulässig, die Intensität der La/SS-B-Banden direkt miteinander zu vergleichen (Abb. 11).

6.16 Der Translationsmechanismus der mRNAs

Das *scanning*-Modell der Translation von eukaryontischen mRNAs (KOZAK, 1978) postulierte, dass die 40S-Ribosomenuntereinheit zusammen mit verschiedenen Translations-Initiationsfaktoren am 5'-Ende einer mRNA an die 7-Methylguanosinium-Kappe (m^7 Gppp-Kappe) band und über die 5'-UTR bis zu einem ersten Start-AUG mit einer für die Initiation der Translation vorteilhaften Umgebungssequenz (Kozak-Sequenz) (KOZAK, 1989; KOZAK, 1987) wanderte. Durch einen Vergleich von 699 Vertebraten-mRNAs wurde von KOZAK (1987) die Konsensussequenz GCCGCC^A/₆CCAUGG für die Initiation der Translation

ermittelt (das Start-AUG ist unterstrichen). Das Start-AUG und die flankierenden Sequenzen fungierten dabei als Stop-Signal für die ribosomale 40S-Untereinheit (KOZAK, 1987).

Vor allem zwei Positionen in der Umgebungssequenz des AUGs waren hoch konserviert: 97% aller von KOZAK (1987) untersuchten mRNAs besaßen ein Purin an Position -3 (ausgehend von dem Adenin des AUG mit der Position +1) und 46% ein G an Position +4. Üblicherweise reichte bereits ein Purin an der Position -3 für die Initiation der Translation am ersten Start-AUG (KOZAK, 1991a). Sobald ein AUG erkannt wurde, verband sich die 40S- mit einer 60S-Untereinheit zum intakten Ribosom und begann mit der Translation. Neben der Position und Umgebungssequenz beeinflussten die Länge der 5'-UTR und Sekundärstrukturen sowohl stromaufwärts wie stromabwärts des Initiator-AUGs die Effizienz der Initiation der Translation (KOZAK, 1991a). Stromabwärts vom AUG liegende Sekundärstrukturen konnten sich positiv auf die Initiation auswirken, vermutlich indem sie die Geschwindigkeit abbremsten, mit der die 40S-Untereinheit an der mRNA entlangwanderte (KOZAK, 1991a). Demgegenüber wirkten sich Sekundärstrukturen zwischen der m⁷Gppp-Kappe und dem Initiator-AUG immer negativ auf die Translation aus (KOZAK, 1986). Für eine effektive Translation musste die 5'-UTR wenigstens 20 Nukleotide Länge besitzen. Eine längere 5'-UTR verbesserte die Translationseffizienz nur, wenn sie keine Sekundärstrukturen enthielt. Die optimale Länge lag bei etwa 80 Nukleotiden (KOZAK, 1991a). Eine lange und sekundärstrukturreiche 5'-UTR bildete die größte Barriere für eine effektive Translation (KOZAK, 1991b).

Die überwiegende Mehrzahl aller mRNAs bei Vertebraten entsprach den Kriterien einer für die 40S-Untereinheit gut *scannbaren* und damit translatierbaren mRNA. Die 5'-UTRs der meisten Vertebraten-mRNAs hatten eine Länge von 20 bis 100 Nukleotiden (KOZAK, 1987). Von 346 untersuchten mRNAs besaßen nur 27 eine 5'-UTR, die länger als 200 Nukleotide war (KOZAK, 1987). Zusätzliche, in der 5'-UTR stromaufwärts des eigentlichen Initiator-AUGs gelegene AUGs fanden sich in 82 von 701 mRNAs (KOZAK, 1987). mRNAs mit langen 5'-UTRs, ausgedehnten Sekundärstrukturen und mehreren potentiellen Start-AUGs gehörten vor allem zur Gruppe der Protooncogene, der TFs, der Rezeptor-Proteine, der Signaltransduktionsproteine und der Immunantwortproteine (KOZAK, 1991b). Da diese Proteine in der Regel nur in sehr geringer Konzentration in der Zelle vorlagen, könnte die Struktur der 5'-UTR ihrer mRNAs einen Regulationsmechanismus darstellen (KOZAK, 1991b). Diese mRNAs sollten demnach ineffizient translatiert werden. Abgesehen davon könnten nach KOZAK (1991b) viele der publizierten cDNAs mit ausgedehnter 5'-UTR mRNA-Vorläufern entsprechen, welche noch ein Intron enthielten. Darüber hinaus verfügten einige Gene über mehrere Promotoren. Je nachdem, von welchem Promotor aus die Transkription erfolgte, entstand eine funktionelle, translatierbare mRNA oder eine nicht-funktionelle mRNA mit langer 5'-UTR. Bei solchen Genen konnte durch Umschalten von einem auf den anderen Promotor die Menge an funktioneller mRNA des betreffenden Proteins reguliert werden (KOZAK, 1991b). Denkbar wäre auch, dass bei einigen publizierten cDNAs mit langer, sekundärstrukturreicher 5'-UTR lediglich die gut translatierbare Form noch nicht gefunden wurde (KOZAK, 1991b).

Bei mRNAs mit langer 5'-UTR gab es nach KOZAK (1991b und 1989) im wesentlichen zwei Möglichkeiten, wie trotz stromaufwärts gelegener AUGs die Translation am eigentlichen Initiator-AUG beginnen konnte. Wenn die Umgebungssequenz eines AUGs in einer für die Initiation der Translation unvorteilhaften Umgebung lag, konnten einige der Ribosomen dieses AUG überlesen und zum nächsten AUG gelangen, das in einer für die Translationsinitiation vorteilhaften Umgebung lag, und dort mit der Translation beginnen. Dies wurde als *leaky scanning* bezeichnet (KOZAK, 1989). Eine zweite Möglichkeit bestand darin, dass es trotz 5'-aufwärts gelegener AUGs, die sich in einer für die Initiation der Translation vorteilhaften Umgebung befanden, zu einer Initiation der Translation an dem weiter 3'-gelegenen AUG kommen konnte. Einer solchen Reinitiation waren jedoch enge Grenzen gesetzt. Sie konnte nur stattfinden, wenn dem weiter am 5'-Anfang gelegenen AUG dicht darauf ein Stop-Codon folgte und dieses Stop-Codon stromaufwärts des eigentlichen Initiator-AUGs lag. Nach Erreichen dieses Stop-Codons sollte die 40S-Ribosomenuntereinheit dann nicht wie gewöhnlich von der mRNA-Matritze abfallen, sondern an ihr weiter entlangwandern (KOZAK 1991a; KOZAK 1991b; KOZAK 1989). Erreichte sie ein weiteres Start-AUG, konnte sie sich erneut mit der 60S-Ribosomenuntereinheit verbinden und somit die Translation initiieren. Eine Reinitiation war nur dann effizient, wenn der stromaufwärts des eigentlichen Start-AUGs gelegene Leserahmen kurz war und er in der Nähe des 5'-Endes der mRNA lag. Codierte der erste Leserahmen dagegen ein vollständiges Protein, so war eine Reinitiation an einem weiter 3'-gelegenen Start-AUG kaum noch möglich. Bei überlappenden ORFs konnte es keine Reinitiation an dem stromaufwärts vom Stop-Codon liegenden AUG geben, da sich die 40S-Untereinheit nur in 5'-3'-Richtung fortbewegen konnte (KOZAK, 1995).

Von verschiedenen viralen mRNAs war bekannt, dass sie auf eine von der 5'-Kappe unabhängige Weise translatiert werden konnten. Erste Hinweise kamen von *Picornavirus*-Viren, deren Genom aus einer Plusstrang-RNA bestand, welche anstelle einer 5'-m⁷Gppp-Kappe am 5'-Ende ein kleines, kovalent gebundenes Peptid enthielt (EHRENFELD und SEMLER, 1995). Die 5'-UTRs waren in der Regel sehr lang (650-1300 Nukleotide) und besaßen neben massiven und ausgedehnten Sekundär- und Tertiärstrukturen auch mehrere Start-AUGs (SACHS *et al.*, 1997). Trotz dieser Struktur wurden die viralen RNAs in infizierten Zellen mit hoher Effizienz translatiert (EHRENFELD und SEMLER, 1995; HELLEN und WIMMER, 1995; SACHS *et al.*, 1997). Von SACHS *et al.* (1997) konnte für alle RNAs bzw. mRNAs von *Picornavirus*-Viren gezeigt werden, dass sie über eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) verfügten, an der die Translation durch einen internen Eintritt der 40S-Untereinheit des Ribosoms eingeleitet wurde. Auch die RNA des *Hepatitis-C-Virus* (HCV) enthielt eine IRES (TSUKIYAMA-KOHARA *et al.*, 1992), die entgegen der *Picornavirus*-IRES nicht nur aus Bereichen der 5'-UTR bestand, sondern mit der codierenden Sequenz überlappte (REYNOLDS *et al.*, 1995). Da die den *Picornavirus*-Viren eigenen IRES-Elemente auch in Abwesenheit weiterer, vom Virus-Genom codierter Proteine funktionell waren, musste der zelluläre Translationsapparat alleine in der Lage sein, eine interne Initiation zu ermöglichen. Nach einer Infektion mit *Polio-Virus*, einem

Vertreter der *Picornavirus*-Viren, wurde in den infizierten Zellen der Initiationskomplex inaktiviert, welcher es der 40S-Untereinheit ermöglichte an die m⁷Gppp-Kappe von mRNAs zu binden. Auf diese Weise wurde die von der 5'-Kappe abhängige Translation zellulärer mRNAs unterdrückt (GUTIERREZ-ESCOLANO und DEL ANGEL, 1996).

Der Vorteil dieser Strategie für die Viren war offensichtlich. Schon früh wurde darüber spekuliert, dass auch bei zellulären mRNAs mit langer 5'-UTR eine Initiation der Translation durch eine IRES ohne ein *scanning* der 5'-UTR möglich sein könnte (PELLETIER und SONENBERG, 1988). Und tatsächlich konnten einige eukaryontische, zelluläre mRNAs identifiziert werden, deren Translation nach dem Mechanismus der alternativen Translation durch eine IRES erfolgte. So wurde beobachtet, dass die mRNAs von Hitzeschockproteinen (HSPs) unter Bedingungen, bei denen die von der 5'-Kappe abhängige Translation der meisten zellulären mRNAs inhibiert war, z.B. während eines Hitzeschocks, aber auch nach einer Infektion mit *Picornavirus*-Viren, effektiv translatiert wurden (RHOADS und LAMPHEAR, 1995). Obwohl klar schien, dass HSP-mRNAs einen von der 5'-Kappe unabhängigen Mechanismus für ihre Translation ausnutzen konnten, konnte bisher nur für die mRNA des HSP-Proteins BiP (Bindeprotein der schweren Kette des Immunglobulin) eine interne Initiation nachgewiesen werden (MACEJAK und SARNOW, 1991). Die interne Initiation könnte auch zu bestimmten Zeiten des Zellzyklus oder der Entwicklung und Differenzierung einer Zelle der vorherrschende Mechanismus der Translation sein. So war in Mammalia-Zellen während der Mitose infolge einer Unterphosphorylierung des Faktors eIF-4E, welcher ein Bestandteil des 5'-Kappe-Erkennungskomplexes war, die 5'-Kappe-abhängige Translation stark vermindert (TARNOWKA und BAGLIONI, 1979, BONNEAU und SONENBERG, 1987). YE *et al.* (1997) fanden darüber hinaus, dass in transgenen *D. melanogaster* die Aktivität der IRES der Gene *antennapedia* und *ultrabithorax* stark entwicklungsabhängig reguliert war.

Die IRES-Elemente der verschiedenen viralen und zellulären mRNAs besaßen wenig oder überhaupt keine Homologien in ihrer Primärsequenz. Auf der Ebene der Sekundärstrukturen hingegen schienen gemeinsame Elemente vorhanden zu sein (SACHS *et al.*, 1997; LE und MAIZEL, 1997). Seit der Entdeckung des von der 5'-Kappe unabhängigen Translationsmechanismus wurde intensiv nach zellulären Faktoren gesucht, die die interne Initiation ermöglichen. Da in dem für einen von der 5'-Kappe abhängigen Translationsmechanismus gut geeigneten *in vitro*-Translationssystem mit Extrakten von Weizenkeimlingen keine der bekannten IRES funktionell war, musste es zelluläre Initiations-Faktoren geben, die über eine Bindung an die mRNA der 40S-Untereinheit den internen Eintritt ermöglichen (SACHS *et al.*, 1997). Vor allem wurden das Polypyrimidintract-Bindeprotein (PTB) und das La/SS-B-Protein diskutiert (BELSHAM und SONENBERG, 1996). Dabei könnte die Fähigkeit des La/SS-B-Proteins zweiwertige Kationen binden zu können mit der internen Initiation der Translation in Zusammenhang stehen, da 5'-UTRs oft zweiwertige Kationen enthielten. Das La/SS-B-Protein könnte an diese Kationen binden, wodurch es dem Ribosom helfen könnte, das Start-AUG zu finden, an dem die interne

Translationsinitiation erfolgen sollte (BACHMANN *et al.*, 2000). Nach der Hypothese von YOO und WOLIN (1997) könnte das La/SS-B-Protein durch seine *chaperone*-Aktivität die Menge an korrekt gefalteten RNAs und damit die Funktionalität der IRES erhöhen. So konnte die Menge der *Polio*-Virus-RNA durch die Zugabe von rek. La/SS-B-Protein zu Reticulozyten-Lysat auf das 10fache gesteigert werden (MEEROVITCH *et al.*, 1993).

Nach JACKSON *et al.* (1995) gab es nur einen überzeugenden Nachweis für die Existenz einer IRES: den dicistronen-mRNA-Test. Bei einer dicistronen mRNA lagen zwei vollständige, offene Leserahmen (Cistrons) mit einer 5'-UTR, einem Initiator-AUG und einem Stop-Codon auf einer mRNA direkt hintereinander. Da beide Sequenzen unter der Kontrolle eines übergeordneten Promotors standen, wurden sie bei der Transkription in eine dicistronen mRNA umgeschrieben. An die 5'-Kappe dieser dicistronen mRNA band die 40S-Untereinheit des Ribosoms und wanderte von dort aus stromabwärts, bis sie ein in einer optimalen Umgebung liegendes Start-AUG erreicht hatte. Dort verband sie sich mit der 60S-Ribosomenuntereinheit und die Translation begann. Wenn das Ribosom an dem ersten Stop-Codon angelangt war, das in einem dicistronen Konstrukt das des ersten Leserahmens sein sollte, zerfiel es in seine Untereinheiten und beendete damit die Übersetzung der mRNA in eine Proteinsequenz. Normalerweise sollte in einer eukaryontischen Zelle lediglich das erste Cistron translatiert werden. Ein darunterliegender Leserahmen konnte nur dann noch translatiert werden, wenn er eine IRES enthielt, an der das Ribosom intern initiieren konnte. Die Hypothese wurde untermauert, wenn die Translationseffizienz des zweiten Cistrons gegenüber der des ersten nicht stark vermindert war (KAMINSKI *et al.*, 1994). PELLETIER und SONENBERG (1988) plazierten die 5'-UTR des *Polio*-Virus zwischen die Leserahmen für die Thymidin-Kinase und die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT). Die Autoren konnten nachweisen, dass sowohl *in vivo* nach Transfektion in Cos-Zellen als auch *in vitro* in einem Reticulozyten-Translationssystem das zweite Cistron der dicistronen mRNA translatiert wurde.

Die Situation der Translation von zwei der humanen La/SS-B-mRNA-Isoformen ließ sich mit den Modellen zur Initiation der Translation bei Vertebraten nur schwer in Einklang bringen. Die klassische Exon 1-La/SS-B-mRNA-Isoform enthielt keine weiteren AUGs, besaß keine besonderen Strukturmerkmale, entsprach mit etwa 100 Nukleotiden Länge den Kriterien einer gut *scannbaren* mRNA und wurde von einem Promotor transkribiert, wie er typisch für Haushaltsgene war (GRÖLZ, 1998) (1.5.3). Diese mRNA-Isoform sollte demnach gut translatierbar sein, keine IRES besitzen und daher auch nicht nach dem Mechanismus der internen Initiation translatiert werden müssten. Dagegen besaßen die alternativen Exon 1'- bzw. Exon 1''-La/SS-B-mRNAs eine etwa 500 Nukleotide lange 5'-UTR mit ausgedehnten Sekundärstrukturen und drei zusätzlichen AUGs mit offenen Leserahmen (ORF-1 bis 3) (1.5.3). Aus diesen Gründen erschienen die beiden alternativen mRNAs nach dem *scanning*-Modell für eine Translation ungeeignet. Die Untersuchung und der Nachweis einer IRES bei den humanen La/SS-B-mRNA-Isoformen erfolgte mit dem dicistronen-mRNA-Test. Alle verwendeten Konstrukte enthielten als ersten Leserahmen den der Chloramphenicol-Acetyltransferase und

als zweiten Leserahmen den der jeweiligen La/SS-B-mRNA-Isoform. GRÖLZ (1998) und PAUTZ (1998) konnten nachweisen, dass die alternativen Exon 1'- bzw. Exon 1''-mRNAs eine IRES enthielten und nach dem Modell der internen Initiation translatiert wurden. Ein artifizielles Durchlesen (*leaky scanning*) oder eine Reinitiation erschien als Erklärung für die Expression unwahrscheinlich. Bei diesen beiden mRNA-Isoformen war die interne Initiation die Voraussetzung für die Translation.

Überraschenderweise konnte gezeigt werden, dass auch die Translation der humanen, klassischen Exon 1-La/SS-B-mRNA durch eine IRES erfolgte (SCHÖRNER und DRATHEN, 2000; unveröffentlicht; GRÖLZ, 1998; PAUTZ, 1998), obwohl diese mRNA nach den Kriterien von KOZAK (1991b) gut translatierbar war und daher nicht über eine IRES verfügen müsste. Wahrscheinlich konnte diese mRNA-Isoform sowohl nach dem *scanning*-Modell als auch dem Mechanismus der internen Initiation translatiert werden. Mit Ausnahme der BIP-mRNA (MACEJAK und SARNOW, 1991) war bisher in mRNA-Molekülen, die eine gut *scannbare* 5'-UTR besaßen, noch keine IRES detektiert worden.

Somit konnten die humanen, alternativen mRNAs von La/SS-B, das mutmaßlich selbst einen Faktor für die interne Initiation darstellte, selbst intern initialisiert werden. Es wäre vorstellbar, dass zu Zeiten, in denen die von der 5'-Kappe abhängige Translation nach dem *scanning*-Modell nicht möglich war, die Produktion von La/SS-B-Protein durch interne Initiation erfolgte. Dies könnte z.B. immer dann der Fall sein, wenn der Faktor eIF-4E unterphosphoryliert vorlag (GRÖLZ, 1998).

Es stellte sich die Frage, in welcher Region der humanen La/SS-B-mRNA die Information lag, die dafür verantwortlich war, dass in dicistronen Konstrukten eine interne Initiation des zweiten Leserahmens stattfand und warum diese ausschließlich an dem Start-AUG in Exon 2 begann. Es wurde vermutet, dass die Region unterhalb der Sequenz des Exon 1 bzw. des Exon 1' oder Exon 1'' lag, da eine interne Initiation der humanen mRNA von La/SS-B auch ohne die Sequenz des Exon 1 bzw. Exon 1' oder Exon 1'' möglich war (GRÖLZ, 1998; PAUTZ, 1998). Dass die Lage einer IRES nicht auf die 5'-UTR einer mRNA beschränkt sein musste, war schon für die IRES des *Hepatitis-C-Virus* gezeigt worden. Diese erstreckt sich bis in den codierenden Bereich der mRNA (REYNOLDS *et al.*, 1995). PAUTZ (1998) konnte zeigen, dass eine Beteiligung der C-terminalen Nukleotidsequenz des humanen La/SS-B nicht auszuschließen war. Somit könnte auch die 3'-Region bei der Initiation der Translation einen Einfluß haben. In der Tat gab es Hinweise auf eine Bedeutung von 3'-Elementen an der internen Initiation, wie z.B. für die virale mRNA des Gelben-Gersten-Zwergwuchs-Virus (*barley yellow dwarf virus*) gezeigt werden konnte (WANG *et al.*, 1997) gezeigt.

In Analogie zum humanen La/SS-B erfolgte die Untersuchung der Existenz einer möglichen IRES am Start-AUG im Exon 2 bei den murinen La/SS-B-cDNA-Isoformen ebenfalls durch dicistrone Konstrukte. Es wurden Konstrukte hergestellt, bestehend aus dem CAT-Leserahmen und dem Leserahmen der verschiedenen 5'-UTRs der murinen La/SS-B-cDNAs. Als Modellsystem zur Untersuchung einer möglichen internen Initiation der

Translation diente die humane Zelllinie HeLa. In diesem Modellsystem war eine Unterscheidung des endogenen, humanen La/SS-B-Proteins und des möglicherweise durch eine IRES translatierte murine La/SS-B-Proteins möglich, da der mAK 5B9 sowohl humanes als auch murines La/SS-B-Protein detektieren konnte (1.5.8). Mit dem Konstrukt pCI-CAT-La-Murin (Exon 2-11) (Abb. 15: Laufspur 4) sollte ausgeschlossen werden, dass die Expression des zweiten Leserahmens auf eine Reinitiation der Translation zurückgeführt werden konnte, was zwar der geringe Abstand von fünf Nukleotiden zwischen dem Stop-Codon des CAT-Gens und dem Initiator-AUG des La/SS-B-Leserahmens möglich machen könnte, jedoch auf Grund der Länge des ersten Cistrons von 648 bp als wenig wahrscheinlich erschien (KOZAK, 1991b). Demnach hätte sich das La/SS-B-Protein als Translationsprodukt des zweiten Leserahmens nachweisen lassen können, genau dann, wenn sich innerhalb des codierenden La/SS-B-Leserahmens eine IRES befand, die für eine interne Initiation am Start-AUG im Exon 2 hätte sorgen können. Ein solches Translationsprodukt ließ sich jedoch nicht nachweisen. Demnach bestand noch die Möglichkeit, dass eine potentielle IRES in den verschiedenen 5'-UTRs lokalisiert war, so dass jeweils der zweite Leserahmen der Konstrukte pCI-CAT-Maus-La-Ex1a, pCI-CAT-Maus-La-Ex1b und pCI-CAT-Maus-La-Ex1c (Abb. 15: Laufspuren 5-7) durch interne Initiation der Translation hätte exprimiert werden müssen. Dies war aber nicht der Fall, denn das murine La/SS-B-Protein mit einem MW von etwa 45 kDa ließ sich als Translationsprodukt des zweiten Leserahmens in keinem Fall detektieren (Abb. 15).

Nun stellte sich die Frage, warum die Translation der murinen La/SS-B-cDNA-Isoformen im Gegensatz zu den humanen nicht intern initiiert wurde. Zuerst musste überprüft werden, ob die Notwendigkeit einer internen Translationsinitiation bestand. Dazu wurden die 5'-UTRs der mRNAs mit den Programmen RNAdraw (3.17) nach einem Algorithmus von ZUKER und STIEGLER (1981) und OLIGO 5 (3.17) analysiert. In den 5'-UTRs der murinen Exon 1a- (GRÖLZ und BACHMANN, 1997d; unveröffentlicht; *GenBank accession No* Y07951), Exon 1b- (TOPFER *et al.*, 1993; *GenBank accession No.* L00993) und Exon 1c-cDNA-Isoformen (TOPFER *et al.*, 1993) fanden sich keine besonderen Strukturmerkmale, wie im Fall der humanen Exon 1'- und Exon 1''-cDNA, so z.B. ausgeprägte Sekundärstrukturen, lange Poly-Sequenzen, lange G/C-reiche Regionen oder zusätzliche aufwärts AUGs, die eine Translation nach dem *scanning-* oder *leaky scanning-*Modell hätten behindern können und eine interne Translationsinitiation erforderlich machten.

Auch in der Exon 1c-Sequenz (MARRA *et al.*, 1996; unveröffentlicht; *GenBank accession No* AA798418), die im Vergleich zu der von TOPFER *et al.* (1993) an ihrem 5'-Bereich um 146 bp verlängert war, fanden sich keine ausgeprägten Sekundärstrukturen, lange Poly-Sequenzen oder lange G/C-reiche Regionen. Allerdings besaß diese an ihrem 5'-Ende verlängerte Exon 1c-Sequenz drei potentielle Start-AUGs. Bei einer Initiation der Translation an einem dieser drei Start-AUGs würden aber nur sehr kurze Leserahmen codiert. Bei einer Expression am ersten möglichen Start-AUG würden nur sechs AS translatiert, bevor ein Stop-TAG die Translation beenden würde. Bei einer Translation am zweiten Start-AUG

würden nur fünf AS gebildet werden, bevor wiederum ein Stop-TAG die Translation unterbrechen würde. Begann die Translation am letzten Start-AUG, das sich im La/SS-B-Leserahmen befand, so würden nur 12 AS entstehen, bevor ein Stop-TGA die Translation beenden würde. Nach dem *leaky scanning*-Modell von KOZAK könnte die Translation auf Grund dieser sehr kurzen Aufwärtsleserahmen trotzdem immer am eigentlichen Start-AUG im Exon 2 erfolgen. Somit wäre eine interne Initiation der Translation auch bei dieser verlängerten Exon 1c-mRNA nicht zwingend notwendig.

Des weiteren besaß das murine La/SS-B im Exon 2 mit der Nukleotidsequenz ACAAUGG (das Start-AUG ist unterstrichen) die von KOZAK (1987) ermittelte optimale Ribosombinde-Konsensussequenz (ANNAAUGG), was als ein Hinweis für das *scanning*-Modell gewertet werden konnte. Allerdings enthielt auch das humane La/SS-B diese optimale Konsensussequenz. Der einzige Unterschied bestand darin, dass beim humanen La/SS-B das Adenin in Position -3 durch ein Guanin ersetzt war. Ob dieser geringfügige Unterschied allerdings dafür verantwortlich war, dass das humane La/SS-B-Protein durch eine interne Translationsinitiation exprimiert wurde, war sehr fraglich. Nach KOZAK (1991a) sollte ein solcher Austausch, bei dem ein Purin durch ein anderes Purin ersetzt wurde, keinen Einfluß auf Initiation der Translation am ersten Start-AUG haben.

Auch die Länge der murinen, alternativen Exon 1 entsprachen mit 86 (Exon 1a) (GRÖLZ und BACHMANN, 1997d; unveröffentlicht; *GenBank accession No* Y07951), 113 (Exon 1b) (TOPFER *et al.*, 1993; *GenBank accession No.* L00993) und 80 Nukleotiden (Exon 1c) (TOPFER *et al.*, 1993) bzw. 225 Nukleotiden (MARRA *et al.*, 1996; unveröffentlicht; *GenBank accession No* AA798418) der von KOZAK (1991a) postulierten optimalen Länge, um für die 40S-Untereinheit eine gut *scannbaren* und damit translatierbaren mRNA darzustellen.

Ein weiterer Grund für das Fehlen einer IRES bei den murinen La/SS-B-cDNA-Isoformen könnte im C-terminalen Bereich des codierenden Leserahmens liegen. PAUTZ (1998) konnte zeigen, dass die interne Translationsinitiation des humanen La/SS-B einer dicistronen mRNA deutlich verschlechtert war, wenn der C-terminale, codierende Leserahmen deletiert war. Dies wies darauf hin, dass der C-Terminus zumindest einen positiven Effekt auf eine interne Initiation der Translation besaß. Auch könnten IRES-Elemente vollständig im C-Terminus lokalisiert sein. Dass sich beim murinen La/SS-B keine interne Translationsinitiation nachweisen ließ, könnte an der im Vergleich zum humanen La/SS-B anderen Nukleotidabfolge hängen. Der C-Terminus des murinen und humanen La/SS-B-Proteins wiesen nämlich nur noch zu 65% Homologie auf (1.6).

Zusammengefasst konnte folgendes festgehalten werden: Da das zweite, für La/SS-B codierende Cistron, nie translatiert wurde, ließ dies die Schlussfolgerung zu, dass die murinen La/SS-B-cDNAs keine IRES besaßen, die eine interne Translationsinitiation am Start-AUG im Exon 2 ermöglichte. Die murinen mRNA-Isoformen ließen sich mit dem *scanning*-Modell zur Initiation der Translation bei Vertebraten sehr gut in Einklang bringen. Eine Notwendigkeit der internen Initiation der Translation bestand nicht.

6.17 Die Lokalisation des Proteins

Bei La/SS-B-Protein-Immunfärbungen konnten homogene (NYMAN *et al.*, 1986) oder gesprenkelte Kernfärbungen (BACHMANN *et al.*, 1990b; CHAN und TAN, 1987; BACHMANN *et al.*, 1986a) oder auch nukleoläre Färbungen (DENG *et al.*, 1981) auftreten (1.5.10).

GRÖLZ und BACHMANN (1997e) transfizierten NIH-3T3-Zellen mit der klassischen Exon 1-cDNA und den alternativen Exon 1'- bzw. Exon 1''-cDNAs des humanen La/SS-B. Zellen, die mit der klassischen Exon 1-La/SS-B-cDNA transfiziert wurden, zeigten eine nukleäre La/SS-B-Protein-Lokalisation, während Zellen, transfiziert mit den alternativen Exon 1'- bzw. Exon 1''-La/SS-B-cDNAs, eine vermehrt zytoplasmatische Lokalisation aufwiesen. Bedachte man, dass die alternativen Exon 1'- und Exon 1''-cDNAs aus den PBLs einer pSS-Patientin isoliert wurden, könnte den alternativen La/SS-B-Transkripten eine pathophysiologische Bedeutung zukommen. Insgesamt gesehen führten pathophysiologische Faktoren, die bei Patienten einen Krankheitsschub auslösten, zu einer Umverteilung des La/SS-B-Proteins, so dass den ANA eine pathogene Funktion zukommen könnte. (PEEK *et al.*, 1994; VENABLES und BROOKES, 1992; BABOONIAN *et al.*, 1989).

Auf der Grundlage dessen stellte sich die Frage, ob für das murine La/SS-B-Protein, wenn es von einer der drei murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen translatiert wird, ebenfalls eine vermehrt zytoplasmatische Proteinlokalisierung festgestellt werden konnte, was auf eine pathophysiologische Bedeutung der murinen alternativen mRNAs schließen lassen würde. Die Untersuchung erfolgte durch transiente Transfektion und immunzytochemische Fluoreszenzmikroskopie (5.6). Dabei konnte das La/SS-B-Protein immer nur mit der üblichen nukleären Lokalisation nachgewiesen werden (Abb. 13). Trotz der Überexpression war keine zytoplasmatische Färbung des La/SS-B-Proteins und somit keine Translokation detektierbar. Somit stellte sich die Frage, ob den alternativen, murinen La/SS-B-mRNA-Isoformen überhaupt eine pathophysiologische Bedeutung zugesprochen werden konnte. Nur die gewebespezifische Expression der Exon 1b-mRNA-Form in proliferierenden Zellkulturen mit Tumorcharakter könnte auf eine Pathophysiologie hindeuten (5.4 und 6.13).

C) Analyse des murinen La/SS-B auf Proteinebene

Die Untersuchung des murinen La/SS-B-Proteins erfolgte unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen. Zunächst sollten die Domänen und Strukturelemente des murinen Proteins mit dem humanen verglichen werden. Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob sich verschiedene isoelektrische Proteinformen nachweisen ließen und ob das murine Protein, ähnlich dem humanen, eine hohe Ladungsheterogenität besaß.

Unter pathophysiologischen Bedingungen wurde der Einfluß des Moleküls Stickstoffmonoxid auf das murine La/SS-B-Protein untersucht. Außerdem sollte mittels

Immunisierung des humanen La/SS-B-Neoepitops geklärt werden, ob sich anti-Neoepitop-AK oder sogar Autoantikörper gegen das native La/SS-B-Protein erzeugen ließen, die womöglich für eine zellschädigende Vorläuferreaktion verantwortlich sein könnten, bei der die nukleären Autoantigene dem Immunsystem zugänglich gemacht werden konnten.

6.18 Das murine La/SS-B-Protein

6.18.1 Konservierungen

Das La/SS-B-Protein war hoch konserviert und besaß zwischen den verschiedenen Spezies Homologien von 60% bis zu 95% (PRUIJN, 1994) (1.5.6). Das murine La/SS-B-Protein war zu 76,7% mit dem humanen und bovinen (*GenBank accession No. X13698*) La/SS-B-Protein identisch, wobei die N-terminale Proteinhälfte die größte Homologie besaß (1.6). Der C-terminale Domäne stimmte mit der des humanen oder bovinen La/SS-B-Proteins nur noch zu ungefähr 65% überein (TOPFER *et al.*, 1993) (1.6). Ein Vergleich der AS-Sequenz des murinen und humanen La/SS-B-Proteins findet sich in Abb. 33. Zwar waren besonders im C-Terminus des Proteins mehrere AS-Austausche zu erkennen, jedoch wurden viele AS durch ähnliche ersetzt (Abb. 33), was sicherlich die große Homologie von 76,7% erklärte.

6.18.2 Das RNP-Motiv

Das in der N-terminale Domäne ca. 80 AS umfassende RNP-Motiv (AS 112-187) war hoch konserviert (1.5.4). Im RNP1 des RNP-Motivs fand sich nur ein einzelner Austausch einer AS, der keine signifikante Änderung dieser Struktur zur Folge hatte, wobei Valin beim humanen La/SS-B-Protein durch Alanin beim murinen La/SS-B-Protein ersetzt wurde (Abb. 33). Einen solchen AS-Austausch fand sich auch beim bovinen La/SS-B-Protein (TOPFER *et al.*, 1993).

6.18.3 Das Kernlokalisierungssignal

Die AS-Sequenz des auf der C-terminalen Domäne liegenden NLS (Abb. 33), das für den Transport des neusynthetisierten, prozessierten Proteins durch die Kernporen in den Zellkern verantwortlich war (SIMONS *et al.*, 1996; DINGWALL und LASKEY, 1991) (1.5.4), wich zwischen den Spezies Mensch und Maus nur geringfügig ab. Da aber auch das murine La/SS-B-Protein in der Zelle nukleär lokalisiert vorlag, musste dieser Bereich trotzdem für den Import des Proteins in den Zellkern verantwortlich sein.

6.19 Die isoelektrischen Proteinformen

CHAMBERS *et al.* (1988), FRANCOEUR (1985) und PIZER *et al.* (1983) konnten in der zweidimensionalen Gelelektrophorese bis zu acht isoelektrische Formen des humanen La/SS-B-Proteins mit einem pI zwischen 6 und 7,5 detektieren. Dabei sollten diese isoelektrischen Proteinformen überwiegend durch *in vivo*-Phosphorylierungen nur an den in der C-terminalen Proteindomäne enthaltenen frei zugänglichen Serin-Resten zustande kommen (CHAN *et al.*, 1986). Threonin-Phosphorylierungen stellten nach PFEIFLE *et al.* (1987) und PIZER *et al.* (1983) *in vitro*-Artefakte dar (1.5.5).

BROEKHUIS *et al.* (2000) fanden mit der hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese (GORG *et al.*, 2000) in mit dem mAK SW5 aufgereinigten humanen Zellextrakten insgesamt 14 isoelektrische Formen des humanen La/SS-B-Proteins mit einem pI zwischen 6 und 7,5 (1.5.5). Mittels mutierter La/SS-B-Proteine konnten die Autoren die konservierten AS Thr-302, Ser-325, Thr-362 und Ser-366 als Phosphorylierungsstellen identifizieren, wobei Ser-366 am effizientesten phosphoryliert wurde. Nach FAN *et al.* (1997) sorgte das humane La/SS-B-Protein nur dann effizient für die Termination der Transkription von Pol III-Transkripten, wenn der Serin-Rest 366 unphosphoryliert war (1.5.11.1). Des Weiteren behandelten die Autoren das aufgereinigte, humane La/SS-B-Protein mit alkalischer Phosphatase. In der 2D-Gelelektrophorese konnten immer noch acht isoelektrische Proteinformen detektiert werden, die etwas basischere pI -Werte aufwiesen. Das humane La/SS-B-Protein musste demnach eine hohe Ladungsheterogenität besitzen.

Die von BROEKHUIS *et al.* (2000) erhaltenen Ergebnisse waren die Intention zu überprüfen, wie viele isoelektrische Proteinformen des murinen La/SS-B existierten. Durch die 2D-Gelelektrophorese mit murinem NIH-3T3-Zellextrakt konnten 16 isoelektrische Proteinformen mit einem pI zwischen 5,1 und 6,1 ermittelt werden (5.10). Rek. murines La/SS-B-Protein lieferte 13 isoelektrische Proteinformen mit einem pI zwischen 4,5 und 5,5 (5.10). Das murine La/SS-B-Protein musste demnach, wie auch das humane La/SS-B (BROEKHUIS *et al.*, 2000), eine hohe Ladungsheterogenität besitzen. Der Unterschied von drei isoelektrischen, murinen Proteinformen würde genau mit den drei potentiellen Phosphorylierungsstellen im murinen La/SS-B-Protein korrelieren. Dies müssten die konservierten AS Thr-302, Ser-325 und Thr-362 sein. Das Ser-366, das beim humanen La/SS-B-Protein am effizientesten phosphoryliert werden sollte, fand sich nicht im La/SS-B-Protein von Nagern. Damit wurde die Beobachtung von FAN *et al.* (1997) in Frage gestellt, dass humanes La/SS-B-Protein nur dann effizient für die Termination der Transkription von Pol III-Transkripten sorgte, wenn der Serin-Rest 366 unphosphoryliert war (1.5.11.1). Beim murinen La/SS-B-Protein könnte eine andere Phosphorylierungsstelle die Aufgabe des Ser-366 übernehmen oder es wurde ein anderer Mechanismus der Termination der Transkription von Pol III-Transkripten verwendet. Zwischen den pI -Werten der murinen, isoelektrischen La/SS-B-Proteinformen von NIH-3T3-Zellextrakten (pI zwischen 5,1 und 6,1)

und rek. Proteinen (pI zwischen 4,5 und 5,5) ließ sich eine pI-Wert-Verschiebung in den sauren Bereich feststellen. Dies war sicherlich auf die unterschiedliche Art der Gewinnung dieser beiden Proben zurückzuführen (5.10). Somit war es nicht möglich, die einzelnen isoelektrischen Formen der Zellextrakt-La/SS-B-Proteine und der rek. La/SS-B-Proteine zu vergleichen und dadurch festzustellen, welche isoelektrische Form der entsprechenden zuzuordnen war.

Da für das murine La/SS-B-Proteine 16 isoelektrische Formen detektiert werden konnten, sollte überprüft werden, ob noch weitere humane isoelektrische Proteinformen des La/SS-B existierten (5.10). Und tatsächlich konnte mit der hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese mit humanem HeLa-Zellextrakt insgesamt 16 isoelektrische La/SS-B-Proteinformen mit einem pI zwischen 6,0 und 6,8 detektiert werden (5.10). Nun stellte sich Frage, warum zwei Proteinformen mehr detektiert werden konnten. Die erste Möglichkeit bestand darin, dass von den Autoren über den mAK SW5 aufgereinigte, humane Zellextrakte verwendet wurden. Zellextraktaufarbeitungen konnten stark die isoelektrische Fokussierung (1. Dimension) beeinflussen. Jede zusätzliche Behandlung eines Extraktes konnte zu Modifikationen von Proteinen führen. Zum zweiten könnten die verwendeten mAK die Ursache für die Diskrepanz darstellen. Der hier verwendete mAK 5B9 könnte ein solches Epitop im La/SS-B-Protein erkennen, dass es ihm möglich war, alle isoelektrischen Proteinformen zu erkennen. Vielleicht lag das Epitop des von BROEKHUIS *et al.* (2000) verwendeten mAK SW5 in einer Region des La/SS-B-Proteins, die einer solchen Modifikation unterworfen war, dass dieser mAK eine solche isoelektrische Proteinform nicht mehr detektieren konnte. Des weiteren ließen sich geringe Unterschiede in den erhaltenen pI-Werten feststellen.

Im Folgenden sollten hier die Ergebnisse zusammengefasst werden: BROEKHUIS *et al.* (2000) detektierten 14 isoelektrischen Formen des humanen La/SS-B-Proteins mit einem pI zwischen 6 und 7,5. In dieser Arbeit wurden 16 isoelektrischen Formen des humanen La/SS-B-Proteins mit einem pI von 6 und 6,8 nachgewiesen. Dieser Unterschied könnte die Theorie stützen, dass Zellextraktaufarbeitungen die isoelektrische Fokussierung (1. Dimension) beeinflussen könnten. Eine 2D-Gelelektrophorese mit murinem NIH-3T3-Zellextrakt lieferte ebenfalls 16 isoelektrische Proteinformen mit einem pI zwischen 5,1 und 6,1. Rek. murines La/SS-B-Protein lieferte 13 isoelektrische Proteinformen mit einem pI zwischen 4,5 und 5,5. Das murine La/SS-B-Protein besaß somit eine hohe Ladungsheterogenität. Der Unterschied von drei isoelektrischen, Proteinformen korrelierte mit den drei potentiellen Phosphorylierungsstellen im murinen La/SS-B-Protein.

6.20 Der Einfluß von NO auf das murine Autoantigen La/SS-B

Die Rolle von NO in Säugern war sehr komplex. Alleine die Tatsache, dass ein so einfach aufgebautes Molekül Signalfunktionen ausübte und dadurch komplexe Prozesse steuerte, war höchst erstaunlich (BOGDAN, 1998). Mittlerweile wurden drei verschiedene

NO-Synthasen (NOS) beschrieben, die alle die gleiche Redoxreaktion katalysierten, sich jedoch in ihren biochemischen und strukturellen Eigenschaften, in der Art und Weise der NO-Freisetzung, in ihrer Verteilung und in ihrer Regulation beträchtlich voneinander unterschieden (MICHEL und FERON, 1997; NATHAN, 1997). Die Typ 1-NOS wurde konstitutiv in Neuronen exprimiert, deren Aktivität durch den Ca^{2+} -Gradienten reguliert wurde. NO war in Neuronen wichtig für die Neurotransmission und den Lernvorgang. Die Typ 2-NOS wurde auf transkriptionaler Ebene durch Zytokine induziert. Eine Regulation durch einen Ca^{2+} -Gradienten fand nicht statt. Exprimiert wurde die Typ 2-NOS vor allem in inflammatorisch wirkenden Makrophagen, denen es dadurch möglich war mikrobielle Pathogene und Tumorzellen effektiv zu bekämpfen. Die Typ 3-NOS wurde konstitutiv in Endothel- und Blutzellen exprimiert. NO regulierte dort den Tonus der glatten Endothelmuskulatur, die Thrombozytenaggregation und die Adhäsion von zirkulierenden Blutzellen an die Endothelzellen. In jüngerer Zeit hatte sich gezeigt, dass nicht nur die Zytokin-induzierbare Typ 2-NOS, sondern auch die konstitutive Typ 1-NOS und Typ 3-NOS in ihrer Expression reguliert werden konnten. In Anbetracht der zahlreichen Funktionen der NOS kam der Expressionsregulation dieser Enzyme erhebliche physiologische und pathophysiologische Bedeutung zu (BOGDAN, 1998).

NO schützte vor intrazellulären Bakterien und Parasiten und half bei der Bekämpfung von verschiedenen viralen Infektionen (XIE *et al.*, 1996; BOGDAN, 1997; MACMICKING *et al.*, 1997; FANG, 1997), förderte aber die Entstehung von Tumoren und Metastasen (JENKINS *et al.*, 1995; DUENAS-GONZALEZ *et al.*, 1997). NO besaß auch neurotoxische Eigenschaften und konnte Bluthochdruck verursachen (MICHEL und FERON, 1997; NATHAN, 1997). Außerdem konnte in Tiermodellen von Nagern eindrucksvoll bestätigt werden, dass NO die experimentelle, allergische *Encephalopathie* und *Uveitis*, die inflammatorische *Arthritis* und die Immunkomplex-*Glomerulonephritis* auslöste (MCCARTNEY-FRANCIS *et al.*, 1993; WEINBERG *et al.*, 1994; CROSS *et al.*, 1994; ZHAO *et al.*, 1996; BRENNER *et al.*, 1997; HOEY *et al.*, 1997). Somit hatte NO einen entscheidenden Einfluß bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Hierbei beeinflusste NO das Verhältnis der Th1/Th2-CD4-T-Zellen, wodurch sich das Verhältnis der Th1/Th2-spezifischen Zytokine änderte (SINGH *et al.*, 2000).

Bei SLE-Patienten konnte eine Hochregulation der induzierbaren Typ 2-NOS im Gefäßendothel und eine insgesamt erhöhte Blut-NO-Konzentration festgestellt werden (BELMONT *et al.*, 1997). Diese Ergebnisse für das Gefäßendothel konnten von BRUNDIN *et al.* (1998) im Gehirn von SLE-Patienten bestätigt werden, wobei die NO-Konzentration ebenfalls erhöht war. Eine generelle Erhöhung der NO-Konzentration bei SLE-Patienten konnten WANCHU *et al.* (1998) feststellen. Dies ließ den Schluß zu, dass NO einen wichtiger Faktor für die Entstehung von SLE darstellen könnte. Die Frage blieb aber bestehen, ob die erhöhte NO-Konzentration die Entstehung von Autoimmunität auslöste oder ob die erhöhte NO-Konzentration eine Folge von Autoimmunität war. Nicht auszuschließen war auch ein möglicher gegenseitiger Verstärkereffekt.

Die pathophysiologische Funktion von NO konnte nur vollständig geklärt werden, wenn

dessen Einfluß auf bekannte Autoantigene, wie z.B. dem Autoantigen La/SS-B verstanden wurde. Insbesondere von Interesse war, ob es zu einer Veränderung der Proteintranslationseffizienz oder der Proteinlokalisierung kommen konnte (5.11).

6.20.1 Der Einfluß von NO auf die Expression

Da es sich bei La/SS-B um ein permanent exprimiertes Haushaltsgen handelte (6.4 und 6.5), war es sehr überraschend, dass der NO-Donor GSNO offensichtlich die Expression des La/SS-B-Proteins positiv beeinflusste und eine deutliche Zunahme der La/SS-B-Proteinkonzentration bei NIH-3T3-Zellen bewirkte (Abb. 21 und 22). Allerdings waren in der Literatur auch andere Haushaltsgene beschrieben worden, die einer Regulation unterlagen, so z.B. die für die NOS codierenden Gene. Die La/SS-B-Konzentration stieg nach nur 2 h Inkubation mit GSNO um das 4fache des Normalwertes an. Eine längere Inkubation mit GSNO erhöhte die Expressionseffizienz nur noch wenig (5fache des Normalwertes). Die Bedeutung der Erhöhung der La/SS-B-Expression blieb aber unklar.

Auf transkriptioneller Ebene könnte der TF NF- κ B (6.4 und 6.5) für eine verstärkte La/SS-B-Transkription sorgen, was zu einer Erhöhung der Proteinmenge führte. Normalerweise lag NF- κ B in einer inaktiven Form vor. Zu einer Aktivierung dieses TF kam es vor allem durch äußere Einflüsse, wie z.B. durch Zytokine, durch Hemmung der Proteinbiosynthese, durch Schädigung der DNA, durch Erhöhung der intrazellulären Sauerstoffradikale im Zuge einer Entzündung oder durch Virusinfektionen (KNIPPERS, 1997). Womöglich besaß auch das Molekül NO die Fähigkeit, eine Aktivierung von NF- κ B auszulösen. Sowohl der Basis-Promotor (6.4) als auch der alternative Promotor (6.5) besaßen Bindestellen für NF- κ B.

6.20.2 Der Einfluß von NO auf die Lokalisation

In immunzytochemischen Färbungen ließ sich das La/SS-B-Protein hauptsächlich im Zellkern detektieren (BACHMANN *et al.*, 1990b; CHAN und TAN, 1987; BACHMANN *et al.*, 1986a; NYMAN *et al.*, 1986; DENG *et al.*, 1981) (1.5.10). Das La/SS-B-Protein konnte aber auch in das Zytoplasma translokiert werden, so z.B. über die transiente Bindung an den 3'-Oligo-U-Teil von RNA-Pol III-Transkripten (z.B. 4,5S-RNA, hY-RNAs) (PEEK *et al.*, 1994; PEEK *et al.*, 1993). In seltenen Fällen fand sich eine zytoplasmatische Lokalisation des La/SS-B-Proteins in mitotischen Zellen (BACHMANN *et al.*, 1992a). Insbesondere fand sich eine zytoplasmatische Lokalisation des La/SS-B-Proteins bis hin zur Translokation an die Zelloberfläche nach Einwirkungen verschiedener Stressfaktoren, z.B. bei *Herpes*- und *Polio*-Virusinfektionen (MEEROVITCH *et al.*, 1993; BACHMANN *et al.*, 1992b; BACHMANN *et al.*, 1989c; BABOONIAN *et al.*, 1989), Hemmung der Glykosylierung (BACHMANN *et al.*,

1990b), Inhibition der Transkription (BACHMANN *et al.*, 1989a; BACHMANN *et al.*, 1987) und Apoptoseinduktion durch UV-Licht (BACHMANN *et al.*, 1990b) (1.5.10).

Ausgehend von der Überlegung, dass NO einen Stressfaktor für Zellen darstellen könnte, war es nicht weiter überraschend, dass Zellen, die mit dem NO-Donor GSNO inkubiert wurden, neben der üblichen nukleären Färbung teilweise eine zytoplasmatische Lokalisation oder sogar eine Translokation bis an die Zelloberfläche des La/SS-B-Proteins zeigten (Abb. 23). Dabei spielte die Dauer der Inkubationszeit kaum eine Rolle. Nach 2 h traten die ersten Protein-Translokationen auf. Trotz längerer Inkubationszeiten blieb das Verhältnis der Zellen, die nur eine Kernfärbung zeigten, zu denen konstant, die eine Translokation aufwiesen.

Zusammengefasst zeigten die hier erhaltenen Ergebnisse, dass die murine La/SS-B-Expression von NO positiv beeinflusst werden konnte. Dies war für ein Haushaltsgen bei erster Betrachtung ungewöhnlich. Über den Grund einer Erhöhung der La/SS-B-Proteinkonzentration ließ sich nur spekulieren. NO bewirkte zum zweiten eine Translokation des La/SS-B-Proteins vom Zellkern in das Zytoplasma oder sogar auf die Zelloberfläche. Damit könnte NO eine pathogene Funktion zugeordnet werden, da somit eines der Zielautoantigene von Kollagenosen dem Immunsystem zugänglich gemacht wurde.

6.21 Induktion von ANAs durch Immunisierung des humanen La/SS-B-Neopeptops

6.21.1 *epitope spreading* induzierter ANAs

Als Neopeptide wurden AS-Sequenzen oder –Strukturen bezeichnet, die unter normalen Umständen im Körper nicht gebildet wurden oder dem Immunsystem nicht zugänglich waren (1.3). Erst pathologische Veränderungen, z.B. somatische Mutationen, könnten zur Entstehung von Neopeptiden führen (1.3 und 1.5.9). Wenn diese im Laufe des Lebens entstanden, könnten Immunzellen dieses Epitop als fremd erkennen und dagegen vorgehen, da diese Immunzellen bei der Ausbildung der Selbsttoleranz nicht den Toleranzmechanismen unterworfen wurden. Falls Neopeptide zusätzlich Homologien zu anderen körpereigenen Proteinen aufwiesen, könnten AK nach dem Mechanismus des molekularen *mimikry* gegen diese körpereigenen Proteine affin werden, d.h. es fand ein intermolekulares *epitope spreading* vom Neopeptid auf andere Proteine statt. Somit könnten Neopeptide dafür verantwortlich sein, dass die Selbsttoleranz des Immunsystems gegen Eigenantigene durchbrochen wurde und dadurch Autoimmunität entstand (LANZAVECCHIA, 1995). Die Neopeptide könnten des Weiteren durch *triggern* des Immunsystems die Immunantwort aufrecht erhalten. Ebenso bestand die Möglichkeit, dass, wenn in körpereigenen Proteinen ein Neopeptid enthalten war, die gegen das Neopeptid gebildeten AK durch den Mechanismus des intramolekularen *epitope spreading* auf andere, native Epitope desselben Proteins reiften.

Die Situation eines durch ein Neopeptid ausgelöstes intra- und intermolekulares *epitope*

spreading könnte bei der SLE-Patientin vorherrschen, die eine somatische Punktmutation in der *linker*-Region des humanen La/SS-B aufwies (1.5.9). Durch die Mutation konnte nur der N-terminale Bereich des La/SS-B-Proteins exprimiert werden (BACHMANN *et al.*, 1997). An dessen C-terminalem Ende fanden sich jedoch, bedingt durch die Rasterschubmutation, 12 fremde AS, die im normalen La/SS-B-Protein nicht vorkamen und somit ein Neoepitop darstellen könnten (BACHMANN *et al.*, 1996b). Dieses Neoepitop wies Homologie zu anderen bekannten Autoantigenen und zum nativen La/SS-B-Protein auf (BACHMANN *et al.*, 1996a). Somit lag der Verdacht nahe, dass das Neoepitop für die Bildung von anti-La/SS-B-AK durch den Mechanismus des intramolekularen *epitope spreading* verantwortlich sein könnte.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden Balb/c-Mäuse mit dem Neoepitop immunisiert (5.12). In erster Linie sollte überprüft werden, ob es generell möglich war, AK gegen das Neoepitop zu erzeugen. Da das 12 AS lange Neoepitop nur wenig immunogen war, wurde es an das Trägerprotein SOC (*sequential oligopeptide carrier*) (SAKARELLOS-DAITSIOTIS *et al.*, 1999) chemisch gekoppelt. SOC ersetzte in diesem Fall den N-Terminus des humanen La/SS-B-Proteins. Der N-Terminus mit dem Neoepitop des La/SS-B-Proteins, wie er von der autoimmunen Patientin gebildet wurde, konnte deshalb als Trägerprotein nicht verwendet werden, da sich sonst nicht unterscheiden ließ, ob die Immunantwort auf Grund des La/SS-B-N-Terminus oder des Neoepitops zustande kam.

Die gute Reaktivität gegen SOC-neo-La nach der 1. Immunisierung ließ sich darauf zurückführen, dass dieses Immunisierungs-Peptid sowohl von AK gegen SOC als auch von AK gegen neo-La erkannt wurden. Hierbei überwogen die AK gegen SOC, da die Reaktivität gegen das neo-La-Peptid etwas schlechter ausfiel. In den nachfolgenden Immunisierungen zeigten sich deutliche Reaktivitäten gegen das neo-La-Peptid. Somit stellte das Neoepitop ein immunogenes Antigen dar, wogegen im Tiermodell Maus die AK-Bildung induziert werden konnte (5.12.1). Dass aber schon fünf Tage nach der 1. Immunisierung Reaktivitäten gegen rek. hLa vorhanden waren, spiegelte die Tatsache wieder, dass das Neoepitop Kreuzreaktivitäten gegen natives La/SS-B-Protein zeigte. Ähnlich war die Reaktivität gegen rek. mLa zu erklären, da humanes und murines La/SS-B-Protein ca. 76,7% Homologie besaßen (1.6). Hierbei könnten die AK aber nur Epitope auf rek. hLa und rek. mLa erkennen, die sich in der N-terminalen Proteinhälfte befanden, da sich keine Reaktivität gegen rek. hLa-C detektieren ließ. Dies ließe sich auch damit erklären, dass die C-terminale Proteinhälfte zwischen humanen und murinen La/SS-B-Proteinen nur noch 65% Identität aufwies (1.6). Dies stellte zunächst einen Widerspruch dar, denn rek. hLa-N(9A) zeigte nur eine schlechte Reaktivität. Wahrscheinlich fehlten diesem La/SS-B-N-Terminus einige Konformationsepitope, die auf Grund des Vorhandenseins des C-terminalen Abschnitts bei dem La/SS-B-Volllängeprotein vorhanden waren, nicht aber bei rek. hLa-N(9A). Die gute Reaktivität gegen rek. hLa-N(7A) ließ sich auf zwei Gründe zurückführen. Dieser La/SS-B-N-Terminus konnte sowohl von AK, die gegen neo-La gerichtet waren, als auch von AK, die gegen den N-Terminus des La/SS-B-Proteins gerichtet waren, erkannt werden. Auch AK, die die

Übergangsregion detektierten, konnten für die Reaktivität verantwortlich gewesen sein (5.12.1).

Nach weiteren Immunisierungen nahmen die Reaktivitäten gegen alle getesteten Proteine bzw. Proteinfragmente oder Peptide weiter zu. Vor allem ließ sich nun die Reaktivität gegen rek. hLa-C detektieren. Die enorme Reaktivität gegen SOC-neo-La nach der 4. Immunisierung konnte man damit erklären, dass durch diesen letzten *boost* vor allem AK gegen SOC erzeugt wurden. (5.12.1)

Des weiteren ließen sich im Verlauf der Immunantwort AK nachweisen, die sowohl mit endogenem, murinem als auch mit humanem La/SS-B-Protein reagierten (5.12.1). Diese AK waren mit großer Wahrscheinlichkeit nach dem Mechanismus des intramolekularen *epitope spreading* gebildet worden. Dies zeigte, dass die Immuntoleranz gegen das Autoantigen La/SS-B durch Immunisierung des Neopepitops durchbrochen werden konnte. Die Reaktivitäten der Serum-AK gegen humanes und murines La/SS-B-Protein waren ungefähr gleich. Die Immunantwort gegen humanes La/SS-B-Protein war zunächst gegen das immunodominante N-terminale Epitop gerichtet und ging erst später, wahrscheinlich wiederum durch intramolekulares *epitope spreading*, auf die C-terminale Region über. Dies stimmte mit Ergebnissen überein, die von MCNEILAGE *et al.* (1990) bei der Untersuchung von Patientenserum publiziert worden waren (1.5.7).

Die Neopepitop-Sequenz des humanen und murinen La/SS-B-Protein unterschieden sich in nur drei AS (Abb. 32). Anhand der Ergebnisse ließ sich feststellen, dass es keine große Rolle spielte, ob die Immunisierungen mit humanem oder murinem Neopepitop durchgeführt wurden. Die Immunisierung mit humanem Neopepitop erschien als logisch, da bisher nur bei einer Patientin dieses eindeutig nachgewiesen werden konnte. Da das humane und murine La/SS-B-Protein etwa 76,7% Homologie aufwies, war es nicht verwunderlich, dass die murinen Serum-AK auch rek. humanes La/SS-B-Protein erkannten (5.12.1). Gerade der N-Terminus des La/SS-B-Proteins wies zwischen diesen beiden Spezies eine sehr große Homologie auf. Speziespezifische C-terminale Serum-AK konnten nicht detektiert werden, da kein C-terminales Fragment des murinen La/SS-B-Proteins zur Verfügung stand.

Übertrug man diese Ergebnisse auf die autoimmune SLE-Patientin, bei der das Neopepitop gebildet wurde (1.5.9), hätten sich im Anfangsstadium der Krankheit in erster Linie Autoantikörper gegen das Neopepitop des La/SS-B-Proteins nachweisen lassen müssen. Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium waren dann infolge des *epitope spreading* Autoantikörper vorhanden, die auch mit dem nativen La/SS-B-Protein reagierten. Da das Serum dieser Patientin auch AK gegen andere Autoantigene enthielt (ältere Laborbefunde), wie etwa Ro52/SS-A und Ro60/SS-A, könnte die Immunantwort durch den Mechanismus des intermolekularen *epitope spreading* auf diese Antigene übergegangen sein. Dies ließ sich allerdings nicht mehr verifizieren, da Serumproben aus den Anfängen der Krankheit nicht zur Verfügung standen. Bedenken sollten man allerdings, dass diese Art der Entstehung von anti-La/SS-B-Autoantikörpern bis jetzt mit großer Wahrscheinlichkeit einmalig war, da bisher in keinem anderen autoimmunen Patienten die Bildung eines solchen Neopepitops nachgewiesen

werden konnte. Sicherlich stellten Neoepitope nur eine Möglichkeit dar, um die Toleranzmechanismen des Immunsystems zu durchbrechen.

Interessanterweise handelte es sich bei den Epitopen, die von den Serum-AK erkannt werden, ausschließlich um Konformationsepitope, da mit den Maus-Seren nur native, nicht aber denaturierte Proteine detektiert werden konnten (5.12.2 und 5.12.3). Demnach könnte es sich bei allen immundominanten Epitopen (CHAN *et al.*, 1986), die unter den Säugetierspezies konserviert waren (SEMSEI *et al.*, 1993; WENG *et al.*, 1993; CHAN *et al.*, 1986), um immundominante Konformationsepitope handeln (1.5.7).

Zusammengefasst konnte im Tiermodell Maus gezeigt werden, dass B-Zell-Autoimmunität und die Entstehung von ANAs zumindest teilweise auf einen Autoantigen-getriebenen Mechanismus infolge einer fehlerhaften Proteinexpression eines Autoantigens zustande kam. Damit fiel den ANAs eine direkte pathophysiologische Rolle zu.

6.21.2 Zellschädigende Vorläuferreaktion induzierter ANAs

Da Zellmembranen für die antinukleären Antikörper (ANAs) eine undurchdringliche Barriere darstellten und die die nukleären Antigene die Zellmembranen intakter Zellen nicht durchdringen konnten, war vermutlich eine zellschädigende Vorläuferreaktion dafür verantwortlich, dass den ANAs ihre Zielantigene zugänglich gemacht wurden (1.3). Allerdings spielten noch viele andere Faktoren bei der Entstehung von Autoimmunität eine wichtige Rolle.

Eine zellschädigende Vorläuferreaktion könnte z.B. durch Kreuzreaktivitäten der induzierten Autoantikörper mit Zelloberflächenstrukturen zustande kommen. Wenn die Autoantikörper auch Oberflächenstrukturen erkennen würden, dann konnten die nukleären Autoantigene durch die nachfolgende Zerstörung der Zielzelle, bedingt durch eine Entzündungsreaktion, freigesetzt werden. Allerdings ließen sich keine Kreuzreaktivitäten der Maus-Seren mit Zelloberflächenproteinen nachweisen. Dies ließ den Schluß zu, dass die induzierten Serum-AK nicht für eine Zellschädigung verantwortlich waren.

Ein weiterer Hinweis auf eine zellschädigende Vorläuferreaktion wären auftretende Krankheitssymptome bei den immunisierten Mäusen gewesen, wie sie für den SLE oder das pSS typisch waren. Solche Symptome konnten aber nicht festgestellt werden. Dies ließ vermuten, dass die Bildung von Autoantikörpern alleine nicht ausreichte, um die Krankheiten zu induzieren. Dafür müssten weitere Prädispositionen vorhanden sein, was die Tatsache widerspiegelte, dass Autoimmunerkrankungen multifaktorelle Krankheiten waren (1.3).

Zusammengefasst ließ sich Folgendes feststellen: Die induzierten Autoantikörper waren nicht für eine zellschädigende Vorläuferreaktion verantwortlich, da sie nicht mit Zelloberflächenproteinen kreuzreagierten und bei den immunisierten Mäusen keinerlei Krankheitssymptome auftraten.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Seren von Patienten mit Kollagenosen, wie dem systemischen *Lupus erythematoses* oder dem primären Sjögren Syndrom, enthalten autoreaktive Antikörper gegen Proteine des Zellkerns. Eines dieser Zielantigene ist das Autoantigen La/SS-B. Zur Bildung der antinukleären Antikörper könnten neben weiteren Faktoren auch Veränderungen in den Zielantigenen führen.

Zur Entwicklung eines murinen Tiermodells, an dem eine pathophysiologisch veränderte Expression des Autoantigens La/SS-B untersucht werden konnte, musste die physiologische Situation des murinen La/SS-B auf genomischer Ebene, auf der Ebene der Transkription und Translation und der Ebene des funktionellen Proteins verstanden werden, um einen Vergleich mit dem humanen La/SS-B zu ermöglichen.

Das murine La/SS-B-Strukturgen lag als *single copy*-Gen auf dem Chromosom 2. Pseudogene oder Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen existierten nicht (TOPFER *et al.*, 1993). Das Gen besaß vom ersten Exon bis zur 3'-UTR eine Länge von 9982 bp und enthielt 13 Exons, wobei in den Exons 2-11 der codierende Leserahmen enthalten war. Das Start-AUG befand sich im Exon 2. Insgesamt existierten drei verschiedene Exon 1, die nach ihrer Lage auf dem Gen mit Exon 1a, 1b und 1c bezeichnet wurden. Das Exon 1b war mit dem Exon 1a identisch, nur dass es an seinem 3'-Ende um 27 Nukleotide verlängert war. Das Exon 1c besaß keinerlei Ähnlichkeit mit dem Exon 1a bzw. Exon 1b. Dem Exon 1c folgte sofort das Exon 2. Ein Intron zwischen diesen beiden Exons existierte nicht.

Die Intronsequenzen des murinen und humanen La/SS-B wiesen große Unterschiede in ihrer Größe und Nukleotidsequenz auf. Die Exon-Sequenzen und die Exon-Intron-*splice*-Sequenzübergänge beim humanen und murinen La/SS-B-Gen stimmten fast vollständig überein. Eine Ausnahme stellten die verschiedenen Exon 1 dar, die keinerlei Gemeinsamkeiten aufwiesen. Ging man von der Lage auf dem Gen und der Art des *splice*-Mechanismus aus, so würde das humane Exon 1 dem murinen Exon 1c, das humane Exon 1' dem murinen Exon 1a und das humane Exon 1'' dem murinen Exon 1b entsprechen.

Bedingt durch die drei verschiedenen Exon 1, existierten drei verschiedene murine mRNA-Isoformen, die sich nur in ihrem jeweiligen Exon 1 unterschieden. Das Exon 1a, 1b oder 1c stellte jeweils die 5'-nicht codierende Region der La/SS-B-mRNAs dar.

Stromaufwärts des Exon 1a bzw. 1b befand sich der Basis-Promotor, dessen Strukturelemente dafür sprachen, dass es sich um ein permanent exprimiertes Haushaltsgen handelte. Strukturelemente im Intron 1 wiesen auf einen alternativen Promotor hin. Vermutlich entstanden die drei mRNA-Isoformen durch einen Promotorwechsel in Kombination mit einem alternativen *splice*-Vorgang. Die Exon 1a- und Exon 1b-mRNA-Isoform wurden vermutlich aus einer gemeinsamen Vorläufer-RNA gebildet.

Die Polyadenylierung erfolgte wahrscheinlich an zwei alternativen

Polyadenylierungssequenzen, da die klassische Polyadenylierungssequenz im murinen La/SS-B nicht existierte. Die polyadenylierten mRNAs besaßen eine Länge von etwa 1,8 kb.

Bei den murinen mRNA-Isoformen handelte es sich nicht um *precursor*-mRNAs, sondern um vollständig gesplissene, zytoplasmatische und funktionelle mRNAs, die mit gleicher Effizienz zu La/SS-B-Protein translatiert wurden. Die Initiation der Translation erfolgte nicht wie beim humanen La/SS-B durch eine interne Translationsinitiation mittels einer internen Ribosomeneintrittsstelle (IRES), sondern durch das *scanning*-Modell für Vertebraten von KOZAK. Die Exon 1a- und die Exon 1c-mRNA-Isoform wurden ubiquitär exprimiert. Dagegen fand sich die Exon 1b-mRNA-Isoform ausschließlich in proliferierenden Zellkulturen mit Tumorcharakter. Weitere alternative mRNA-Isoformen oder an der 5'-Seite verlängerte Transkripte gab es nicht. Jede mRNA-Isoform codierte für nukleäres La/SS-B-Protein.

Das murine La/SS-B-Phosphoprotein bestand aus 415 AS und besaß ein theoretisches MW von 47,7 kDa. Es hatte 76,7% Homologie zu dem humanen La/SS-B-Protein. Spezies-spezifischen Unterschiede wiesen auf eine Optimierung des Proteins auf die jeweilige Spezies hin. Im ATP-Bindemotiv des murinen La/SS-B fand sich im Vergleich zum humanen eine Insertion von 16 AS, die eine Nager-spezifische Insertion darstellen könnte (TOPFER *et al.*, 1993). Auf cDNA-Ebene fanden sich in der C-terminalen Nukleotidsequenz eine Nager-spezifische Insertion und eine Deletion.

Posttranslational modifiziertes, murines La/SS-B-Protein besaß eine hohe Ladungsheterogenität und ließ sich in der 2D-Gelelektrophorese in 16 isoelektrische Proteinformen mit einem pI zwischen 5,1 und 6,1 auftrennen. Davon ließen sich vermutlich nur drei isoelektrische Proteinformen auf Phosphorylierungen zurückführen. Auch humanes La/SS-B-Protein ließ sich in 16 isoelektrische Formen auftrennen, wobei nur vier davon auf Phosphorylierungen zurückzuführen waren.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass sich die physiologische Expression des murinen La/SS-B sehr gut in Einklang mit der humanen bringen ließ. Somit stellte das murine Tiermodell ein geeignetes System zu weiteren Untersuchungen bei pathophysiologischen Expressionsveränderungen dar.

Die Expression des murinen La/SS-B-Proteins konnte durch Stickstoffmonoxid (NO) um das 5fache gesteigert werden. Außerdem bewirkte NO eine Translokation des Proteins vom Zellkern in das Zytoplasma oder sogar auf die Zelloberfläche. Damit könnte NO eine pathogene Funktion zugeordnet werden, da somit eines der Zielautoantigene von Kollagenosen dem Immunsystem zugänglich gemacht wurde.

Nach Immunisierung des humanen La/SS-B-Neoepitops ließen sich AK gegen das Neoepitop, humanes und murines La/SS-B-Protein induzieren. Damit konnte die Entstehung von ANAs teilweise auf einen Autoantigen-getriebenen Mechanismus infolge einer fehlerhaften Proteinexpression zurückgeführt werden. Die AK erkannten nur Konformationsepitope. Durch die induzierten AK ausgelöste zellschädigende Vorläuferreaktionen, die für die Krankheitsentstehung hätten verantwortlich sein können, waren nicht festzustellen.

8 ANHANG

8.1 Genomische Sequenz des humanen La/SS-B

Die folgende Sequenz findet sich in der Datenbank unter *GenBank accession No. X97869* (GRÖLZ *et al.*, 1998). Alle Exons sind umrandet. Fett dargestellt sind der Promotorbereich, die Poly(T)₂₃-Kassette und die drei potentiellen Start-AUGs im Exon 1' bzw. Exon 1'', das eigentliche Start-AUG im Exon 2, die 8A-Kassette im Exon 7, das Start-AUG zu Beginn der C-terminalen Proteinhälfte (M223) im Exon 8 und das Stop-Codon im Exon 11. Die Sequenz beginnt mit dem Promotorbereich. Das Exon 1, das direkt dem Promotorbereich folgt, ist nur umrandet. Das nachfolgende Exon 1' ist doppelt unterstrichen. Die vier Nukleotide, um die das Exon 1'' im Vergleich zum Exon 1' verlängert ist, sind einfach unterstrichen.

1	GGGCTGGGGTACAGACGCCGTCCAGAAACTTAAAAATAAATGTTTATACTAACACAACTAGCAGCCATCCCTACAACCTGGAGTACTTTTTAAC	100
101	CAATCTGTTGGGATTGAGGGCGGACTCCAGGGTCCCTGGGAGGCCCGCAGCCGCATGCTCAGAGCACAGGGACCGCTCCACCTCGTCCGTGGCC	200
201	CTGCCACCACAGCCCAAGAGCTGCCGGAGCGTCCC <u>ATCTTCTTGGAGCGCTTTAGGCTGGCCGGCGCTGGGAGGTGGAGTCGTGCTGTTGCT</u>	300
301	<u>GTTFGTGAGCCTGTGGCGCGGCTTCTGTGGCCCGGAACCTTAAAGGTGAGTAACCTCGGTTGGCTAATGAGAAGCTACAAAAGGTCGCCCTTGTCTGGT</u>	400
401	<u>CGCGACTGCGCGTTCCTGTTCTTACTGCTTCTCGCGCGTCCGTCGCGCCCTCGCTTCTCAGCTCAGGCCGAGCGCGCGTGGCCCGCAGCCGGAG</u>	500
501	<u>CGCGCGGAGCCGAGGGGGCGCGCGCGCGGAGCTGCCCGCGAGGAATGCGGGATCTGGGGTTCGCCGACGTGGCTGGTCCAGGAGTTC</u>	600
601	<u>CGGTGCTTAGAGACGGGACTGTGGCTGCCCTCATCCCATATGCGTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACCTCCACCGCTCTTAGCTCACCGAAG</u>	700
701	<u>CTTGTGCCATCTCTGTAAGTTTCTGGGGAGGTGGCACGGGTAACCGCGGAGGTTCTGTGGAGCCTATGGGACTGACTGGAGGCCAAAGAACTTT</u>	800
801	<u>GGGCCGAGATGTACACCAGCGTCACTCTTTGGTCTGTAGGGCCCTCATCGCTACATCAGGTTTCAGTGTGAAACGGGAAAACGTG</u> STAATAATTC	900
901	ATTTACAGTCGTACATCTGGAANAAGTATCTGATGAAACCGAGTTCAAAATTAGGCCAAATAGGTTTTGCAGGCTCAAATAGTATTTTTATTTTCATCG	1000
1001	TTTGTCTTGTAGGGGGCCCTAGATCACGGTAGTAACCTTAGGAGTGTAGATTGTGATAGACAAGACAATGCATAAAATGAGTAATTTCTTAGGGGATG	1100
1101	TGGATCACACAGTACCCGTTGCAAGTGTCTTCTATGTGTATCCATGATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATG	1200
1201	ATCAGTTCATAACTAGAGTCAACTAATGGCAATATTTCTCGATGATTTGTTTACATAAATTTGTACAGTTGGGATGACTGGGTGGCTTAGTAGAGTCTG	1300
1301	GAGGCAAGTACTTTGTAAGTAGAAGACTTGGTTTGTAAATTTCTAGCAAACTAATAGCACAGCTTCCTTTTTTTCATTGCAAGTCTAATGTCAGGAATAACA	1400
1401	AACAGAAACTGGCTATCCAATGTATTAGTAAATAGTAGGCACTCCCACTCCCAAGTTAAATGTTGTTAGTATGACCACTTCCCATTTTTGTGTTTCGT	1500
1501	ATGTTCTTAGCATAGAGTATCTAAGGAATGTAACATTTTTACCTTAAAGTTATGATGCTAACTTGGTAACAAGTTTGGGTAAGTCACTTGTGACT	1600
1601	ACATTTTAAAGAAATGAGGCCGGCGGCTGCTCACGCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCGGGTGGATCGCCAGAGTCAAGAGTCAAA	1700
1701	GACCAGCCTGACCAACATGGTGAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAATTAGTCAGCCGAGCCGTTGGTGGGGCCGCTGTAATCCAGCTACTCA	1800
1801	GGAGGCCAAGCGGAATCGCTGGAACCTGGGAGGCAGAGTTCGACTGAGCCGAGATCGCACCTTGCCTCCAGCCTGGGCAACAAAAGCAGAGACTCCG	1900
1901	TCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAGTGAACCCATACCAAAACAAATGCAACAGAGAGCCATGGTAAATACAGATAGATGTTATCTGTTTAA	2000
2001	AACGGAATGGTGGTAAAGTATTGGATTTTTTCCCTAAAGCTTGTGACCAGCTAAGTGAAGATAAACAGTTCTTGTATAGAAGTGGGTTAG	2100
2101	TGATTTACTGAAAGACAAGTTTTTATAGTTTTTAGATTTTTTATCACTTATCCAAAGTGTGCTTTGTTGAGATATTGAGAAGTCAAGAAAGAAC	2200
2201	TGAACCCGTGAAATAGAAATCTTGATTTTTTAAAGAAACGGGATATTAATCTTTGTAACATTTATCTTTCTTACTTTAGTTTTATATAAAAAATAA	2300
2301	CTTTATGCTAATTTGGAAATTTTACAC <u>ATAGCCCAATGGCTGAAATGGTGAATGAAAGATGGCTGCCCTGGAGGCCAAATCTGTCACTAAAT</u>	2400
2401	<u>GAG</u> GTATGATCTCTGTCTATAAAGTTCCTTGAAGAAATACAGAAAGAACATTTAATCTTAGTACTAGGACATATCAACATTTTG	2500
2501	TTTGCCTTTGATCTTAGATGAACATATAAAGTACACAGTTTTATATTGGTGGAGCCAGGTTGTGAACTTAAGATGTACAAACATTTCAAAAGGTAAC	2600
2601	ACTATAAAGTAGAGTACTTAATCTTTTTAAATTTTAGTTTTCATAGTCTCATATAAAAAATTTAGCTTCATAGTCTCATATAAAATGAGAATAATAGTA	2700
2701	GTTCCCTCCTATAAGGTAGTTGGAGGATTAGTGAATATAAGTAAAGTACTTAGAGAATCTTGACAAAATTTGTTGCTTTTACTTTTTATGTTTAC	2800
2801	TTCTGGCATTCCAAATAGTCATACTTGGGTTTTTCTTGGCTGTATATTGAGAGTTCCTCTATGCTTAAATTTGAGAAACATTTACTTTAACTTTTTTT	2900
2901	TTTTTTTTTTTTTTTTGGAGCAGCTTACTTTTGGTCCAGGCTGGAGTACAGTGGCACAAATATGCTCCTACTGCAGCTTCAACCTGCCAGGCTTAAG	3000
3001	CAATCCTCCACTTCACTTCTGAGCTGGGACTAGAGGCACGTACCTCTATTTCTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTT	3100
3101	TGCCATGTTGCCAAGCTGCTTGAACCTCAGACTCAAGCAATGCACCCACCTCAGCCCTCTAAAGTGTGGGATTAGGCATGAACACCACCTCTGG	3200
3201	CCCCCACCCTTTTTTGGAGATGAGTCTCACTTTTTGTCAGGCTGGAAATGAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAGCCTCTGCCCTCCGGTTTCAA	3300
3301	ATGATCTTCTGCCCCAGCCCCCTGAGTAGCTGGGACTACAGGTGTGCCACTATGTCAGCTAATTTTTGTATTTTTTAGTAGAGACGGGTTTGACCA	3400
3401	TGTCGGCCAGGGTGTCTCAATCTCTTGAACCTCCAAAGTGCAGGATACAGGCGTGGCCACCGTGCCTGGCCCCGTCCCTTATTTTTTAAATTTTAA	3500
3501	AAATTAGAAGGGCAGGTGGTGGCTCATGCTGCATCCAGCACTTTGGAGGCCAGGTTGGGCAAGTTCGCTTGAGATCAGAGTTCAAGGCCAACAT	3600
3601	GGTAAACCCCTGCTCTACTAAAAATAACAAAATTTGCTGGCGTGGTGTACATGCCTGTAATCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCAC	3700
3701	TTGAACCTGGGAGCGGAGTTGCGCAAGCTGAGTTCAATGCCACTGCATCTCAGCCTGAGCGACAGAGTAAAGTCTGCTCAAAAAAATAATAGAAAT	3800
3801	GAGTGATTAACCAATTTCTCCAGTCTTTTTTATTTAAACCATCTGTTCTTTCCACACTGATTTGCAAGAGCCTTTTCATATAATCTTTAAATATATCTT	3900
3901	CTTTAAGGTTTCTAGTCTATTGACACATCTGTTACACTATTTAGTAATTGACATTTTGTATTTATCTTTTGTAACTTTGTAACATTTATGATATT	4000
4001	TGGGAAAGTGTTTGCTTTTGAACCTTATGATTTTTTAAATAACAGAACTGGTACTGTAGAGTAAATGTCAGGATTTGGAGTCCATATATACAGTGT	4100
4101	CTGAAATACATTTGAATTTATCTCACAG <u>TATTATTTGGCGACTTCAATTTGCCACGGGACAAGTTTCTAAAGGAACAGATAAAAAGTGGATGAAGCTGGG</u>	4200
4201	<u>TACCTTTGGAGATAATGATAAAATCAACA</u> GTAAACAAGCTTTTAAAAATAATCTTTAGGTTTCTGTTTACAATGAGTGTACTGCTGAGTCTTATGTT	4300
4301	TTTATATGTACTCTTCA <u>CTTGAACCGCTAACCAACAGACTTAAATGTAATTGGGAAGCATTGAGCAATCCAAGGCAGAACTCATGGAATCAGTGAA</u>	4400
4401	<u>GATAAACTAAAATCAGAAGGCTCCCAAGCAACCCCTACCTGAAAGTACTGATGAGTATAAAAAATGATGTAAAAAACAGATCTGTTTATATTT</u> TAAGT	4500
4501	GGCCTGTAATGCAATTTAAATATCTTACATTTATTTAGAAAGTAAAGTACGGAAGAATAAGGGCTCAGGAATCACAGCCTCACTAATTAATCTGATGCTCT	4600
4601	TCGTAATATTCTAACCTAAGTTCTTTTGTGTTTGTGTTTGGAGACAGTCTCATCTGTTGCTCAGTTGGAGTGCAGTGGTGTGATCATGGCCAC	4700

4701	TGCAGTCTTGACCTCTGGGCTCAAGTGATCCTCCACCTCAGCCTCCTGAGTGTGGACTACAGGTGCATGCTACCATGCCTGGCAAAAAATTTTTT	4800
4801	GTAGAGACGGTCTTCTGTGTTGCCAGGCTGGTGTCAATCTCCTGGGCTCTAGTGTCAACCTTGACCTCCCAAAGTGTGGGATACAGGTGTG	4900
4901	AGCCACCATGCTAGTCTTAAGTTTATCTTCATAAACGTGGATTTTTCTACCTGTGAAGTCTGTTGTGAGAATTAATGAAAAAATATATATACCA	5000
5001	TTGGATGAAATCTTTGACATATTTTAAGCACTATTTCGCTATTAGCTGTCTTATTATTACAGCAGCTAAACTGGATTGCAGTTTTCTTTAGTGTATTTTT	5100
5101	AAATAGTTTTTTATACGGAAAAATTCAGATACATATATAAATAGATTCAATATGTACCATCACCAGCTTTAGTAGTTAATAACAGAACATGCAAAATCA	5200
5201	TCTTGTTTTATTTCTGCTCAACTGAATATTTTGAAGCAAAATACAGATGAATCACTTTTATTGTACTGGAGAGTAGTGGCTCCAAACAGGCTGTTA	5300
5301	AGTGATTAACAAAGAGAAAATAGAGATAGATAGTATATCTCGGGTTCATTTCAAGAAAAATGAATCAAAATCTCTCCAATTTGTTTATCTGAGAAGTCAT	5400
5401	TATTTGTTATTTGTACATTTCTTCCACTCTTCCACAGAAAGGCTTCCCACTGATGCAACTCTTGATGACATAAAAGAATGGTTAGAAGATAAAGGTCAA	5500
5501	CTACTAAATATTCAGATGAGAAGAACATTGCATAAAGCATTTAACCTATGATATAACAGACTTTTTCTAGTTTTAAAAATATATGGACATCACTTAAAAA	5600
5601	AATATTTTCCTTCTTTTACAGCGATCAATTTTTGTGTGTTGATAGCATTGAATCTGCTAAGAAATTTGTAGAGACCCCTGGCCAGAGTACAAGA	5700
5701	AACAGACCTGCTAATACTTTTCAAGTAAAGTCTTTTTGTGTGATTTTTCTCGCTGGCTTTTACTTATATGGACACACACTAGGGTAAGGAGCATGGAAGTAG	5800
5801	TATCCCCTGAAAGGCCAATATTTCTTAGTATCTTTAGATGACCTTTGAGAAATGCTTGATATTTGTTTCAGTGAGAACTATAGTCTTTTGGACTATAAGAA	5900
5901	AAGTGTTCATTAGTACCTTTTCACTGTTAACAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAGACAAGTTTCACTCTTGTCCACCAGGCTGGAGTGCAGTG	6000
6001	GTGTGATCTTGGCTCCCTGCAACCTCTGCTTCTCGGGTCAAGCCATCTCTCGCCACGCTCTCTGAGTAGCTGGGACTACAGGCGCGTCCACCTCGT	6100
6101	CCACCTAATTTTTGTATTTTTTAGTAGAGATGGAGTTTCCACATGTTGGCCAGGCTGTCTTGAACCTCTGACTCAGATCATCCGCTGCTTTGGCCCTCC	6200
6201	CAAAGTGTGGGACTCAGGCTGAGCCTGCGCCAGCCCTGTTAGCCATTATTAAGGAGGTTATGTTTTAAATACTGATTTTGCATCTAAAATTTT	6300
6301	TGATCAGGCTGGGTATTAATAATTTGGTCTTTGTGTGTTTGGAAAAATATATCAATGCAGTTTTCATCTTATTTTTTCATAGCCTATATGTCTTTTTTTTT	6400
6401	TTTTTTTTTTTTTTTTTACAGTACAAAGGATTGAGATTTGGGTCACATCTTTTGGAAATGTGTCTAAGTGTCTAAAAATGGGGATGAACAGGAGCA	6500
6501	TTTTCATGATAAAATAGGTGTAGGGCCATAGTTCCTACTTTAGAAGACTGTGCATTAGTCTTCTAAATGGTATATACTAAACTTGATTGACTTAGAGA	6600
6601	TGCAGTGTAGGGTCAATAGTATCAGTGTAAATCTCAAAAATTTTAACTGATTTTTCATATGTTATTGTTGGATCTTGGGATTTTTGAAATTTTCT	6700
6701	CCTTTTGTGGAATTAACATATAGAAAATGCAATATTTTGCATGACTTCTGATACACTTTTTCCCTATACATGAATGATAAATGGAAATCAACATG	6800
6801	AAATGTCTAATGGATAGGGGTTTCTTTTTGGGGTCAAGAAATGTTCTGAAATTAGTAGTGTGTTGTACAACCTGAATATACTAAAAAACATCAAGG	6900
6901	TACACTTTAAAAGAGTGAATTTTGTGGCAGATGGATTTTTCTCAGTAAAGCTGTATATAAAAAAACATGAGAGAGTAAATCTTGGGATATTTTGA	7000
7001	ATTTTTAGTTGATGATTATGTTGATAGTAAGCGTGTGCAACATTCATGCTGTGCCATGTCTTAAGTTATTCATAAATATCTGCAGTCTTAACTTTGTTC	7100
7101	TCGTGAACCTAGCCCTGTACTGTGTCTTTTCAAGCAGGATTACTTTGGCAAAAAATGAAGAAAGAAAACAAAATAAAGTGAAGCTAAATTAAGAC	7200
7201	CTAAACAATAAGTATGTTGAACATAACAGACATAATTTGAATCTCTTAAACTCTGACAGAAATATAGCTGGTGAGCTCTGAAATAGTGGCAGTAGAC	7300
7301	TTTTCTTTTGTAGTGAACACTGAGATCTTAAGCTGCTTTGACAAATCTCAGGGCCAAATGCAATTTGCAGCTTAGCATTGGACGATCAAAAAACCTAAG	7400
7401	GACTTCTGGCTTTGGTTAAGTAAGTTTAGTGATCATGATTGGTTAACTTTATTAGGACTTAAATTTCTTATATAGTAAATAGAAGTATGTTATAATTATA	7500
7501	TTTTTATTTGTAGCGAGCAAGAACAAAAGTTAGAAGAGATGCTGAAATGTAAGTATATATACTGCTATCTAGTACATCTGTAATTCGAAGT	7600
7601	TAAATGAATAGCTTTTAAAGCTGAGGACTTTTTCAAGAAAATACGTAAGCAAAGCTATCTATAGTTGTTATTGCATTAAGTAATACATCAGGTATTATAT	7700
7701	TGAGGAAAAGAGAAAACCTAAGGATAGGAAATATGTTCTAAAATATGAAAAGGCGGGTGCAGTGGCCACGCTGTAATCCCGACACTTTGGAAGGCC	7800
7801	GAGGCGGCAGATCAGTTGAGGCAGGAGTTCGAGACCAGCTTGGCCAAATGTTGAAACCCCATCTTGACTAAAAATACAAAATAGCCAGGCTGTGT	7900
7901	GGTGATGCGCTGTAATCCAGCTTATGTGGGAGGCTGAGGCGAGGAAATCACTTGAACCCAGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAACCAAGATCATGCCACTGCA	8000
8001	CTCCAGCCTGGGTGACAGAGTGAACCTGTTTTAAAAATAAAAAATATAATAAACACAGGAAAATATATTTTTGAAATATTCAGAAAAAGTTCATTTATG	8100
8101	CCTAGAACTTATTTTTATGAGAAAATGTCCTATAACTCTTAAAGATTCTAATCATAGTTAATACTAACATGACTTTTATTTTTGACTTAAATAGATACT	8200
8201	GATGTGATTTCCATTTAGAAAAGTTACAGTAAAAATTTTTTATTTGGGAAAATAATGACTATAAATTTTTTTTTTCTTTTTTGTAGACCGAGTCTCAG	8300
8301	TGTTGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGGATCTCGGCTCACTGCAAGCTCCACCTCCAGATTCATGCCATTCTTCTGCCFCAGCCTCCCGAGTAGCTGG	8400
8401	GACTACAGGCGCTGCAACCTGCGCTAATTTTTGTATTTTTTTTTTAAAGCAAGACGGGGTTTCAACATGTTAGCTAGGATGCTCTGATCTCTTTGACC	8500
8501	TGGTGATCCGCTGCTCGGCCCTCCCAAAGTGTGGGATTACAGGTGTGAGCCACTGCGCCCGCTAAAAATTTTTTAAAGTATGATAAATACTGCCTA	8600
8601	GAATATTTTTCCAAAGATAGTTAATAGCCAGATTATGATGTTTAACTAATTAATACAGTTGTATAAGAGATCAATATAGAAAAGCCATTTGGAATA	8700
8701	AAGGATGACAAAGGAAACCAACACTATGAAACTACTTTATTTATTTATTTATTTATTTTTTGTAGATGGAGTTTCGCTTCTGCTGCCCGCGGCA	8800
8801	AGAACTACTTTAAAATAGCATTTTGGTTTCTAGTCTTTTTCTGTATAGCTATAAGGTGGTGTGAGTCAATTTCTGGTCTGTTGCTGCTTTTAAAGAACT	8900
8901	TTTTCTCCTTTGTATATTTTATACAAATCTTAGAAGAAAGATTGGATGCTTGTCTGAAATTTTCGGGTGATTAGATGATCAGACTGACAGATAAG	9000
9001	ATTTACACATACTTTTCTCAATCATGTTGAAATAAATGGATAGACTTCGTGAGAGGACAAAAGAGCTCAGAGGAGCAAAGAGGTTGGATACATCC	9100
9101	CTATCCTTTTTAGCAATCAGTTTGAAAATCTGTAGAAAATAGACAAAATAGTAGAAAAGTAAATTTTTAAAAATGTGTTTATTAATAGTTTCTACTTG	9200
9201	ATCATTGTTTATTTGCCACTAGATGTGATGCTGATATTTTCTGAATATACTAAATAGTTTCTACTTGATCATTTACTTTGTTGTTATTGTCACATATAT	9300
9301	GTGATGCTGATGATTTCTGAATATACTATGAATAACTGTTCTACTGATGATGTCAGTTTACTTCTGTAGCATCTCTTTCTACTGTTTCAGTAAAAAT	9400
9401	TCATTCAAACTGGTAAAGACATGGAAGGTTTTCAGGTTAGAAAAATTAATTTGGCAAAAGAAATTAATTTGGGACTAAAAACCAAGGTTATGCCTTTT	9500
9501	GTTTTCTGCTCTCTGATATAGCGGATAATTTTAAAGAAAAGCAAGGAAGCATTGGGTAAGGCCAAAGATGCAAAATAATGGTAACTTACAAATTAAG	9600
9601	GAACAAGAAAGTACTTGGGAGTACTAGAAGGAGGTTGAAAAAGAACCTAGAGAAAATAAGAAAGCAACAAAGAAATCCCTAAACAAATGGAAG	9700
9701	TCAAAAGTCTGATGTTTAAAGGAAAAGGAAAGGTAATAAAGCTGCCAGCCTGGGCTCGTAAAGGAAAAGTACAGTTTTCAGGGCAAGAAAACGAAAT	9800
9801	FTGCTAGTGTGATGAACATGATGAACATGATGAAATGGTCAACTCTAAGTTTTTTTTAAAGTCTTTTGGTAGTTTCATGAGAAAATTTCTACTTCCA	9900
9901	TAAATAAATGATTTGCCAGAGAAATAGGATTTGGCTTTTCACTCCTGTATAAGTCCATTTCTGGATTATTAACGATTTACTCGGTTATGCTGTTG	10000
10001	TATARGTCAGGGACAGGATATTTGGAAGATGAATCTAGAGGTGAGTCTGACTAAGAGAAAAGCCTTTTCTCATTGGTCAAGGAAGTTGTCATCTT	10100
10101	TTTTCAACAGTATCATTATTAATAATTTGCTCAGTATTAACCTAGAGCAGTACTTACGTTGAATTTAACAAAAATTAATTTGTTACGTTTATAGCACTGTG	10200
10201	AAAAGAGCAAGAGAAGAACAGACAAGAAAGAACCTGCATCCAAAACAAGAAAACAGAAAATGGTGTGGAGACCAGTAGTTTAGTAAACCAATTTTTT	10300
10301	ATTCATTTTTAAATAGGTTTTTAAACGACTTTTGTGTTGGGGCTTTTTAAAGGAAAACCGAATTAGTCCACTTCAATGTCCACTGTGAGAAAAGGAAAAA	10400
10401	TTTTTTGTTGTTTAACTGTCTTTTTGTTATGCAAAATGAGATTTCTTTGAATGATTTGTTCTGTTTGTGTTATTTCAGATGATTCAAATATCAAAGGA	10500
10501	AGATTTCTCCATTAATTTGCTTTTGAATATGAGAATGATTTAGTACAACTAACAATAAAAAATATATACTATATGAAAAGAGCAAAAACAGTTTTTTGAT	10600
10601	TTTTTTTTCTTTTTTGTACCCAAAGCATTAGGAAAAGACTAGAATATTAGCTATTGACGATGGCCCTTTCCACAGGCCATTTATGGTGTCTCCTAGGC	10700
10701	TGGCTTTGTATATTTACACAGGAAAGTTGGTAACACTAGAATAAATCTGTCACAAGCTTTCCCTTTTTTTCTTTTTCGAGACTGAGTCTCACTCYTA	10800
10801	TCGCGC	10806

8.2 Lage der Primer im murinen La/SS-B-Gen

In der folgenden Sequenz des murinen La/SS-B-Gens sind alle Primer enthalten, die für PCR mit genomischer DNA oder für das *genome walking* verwendet werden. Vorwärtsprimer sind durch (→), Rückwärtsprimer durch (←) gekennzeichnet. Alle Rückwärtsprimer tragen außerdem den Zusatz „-R“ oder „-Rück“. Alle Exons sind umrandet. Fett dargestellt sind das Start-AUG im Exon 2, die 9A-Kassette im Exon 7, das Start-AUG zu Beginn der C-terminalen Proteinhälfte (M223) im Exon 9 und das Stop-Codon im Exon 11. Die Sequenz beginnt mit dem Exon 1a bzw. Exon 1b. Im ersten Exon ist die Sequenz unterstrichen, um die das Exon 1b im Vergleich zum Exon 1a verlängert ist. Da sich das Exon 1c direkt vor dem Exon 2 befindet, ist das Exon 1c zusätzlich durch Unterstreichung gekennzeichnet. Die Lage und Größe der Exons und Introns des murinen La/SS-B-Gens finden sich in Tabelle 2.

1	<u>TCGCTGTCGGGCCCCCGCGCTCGGAAGTCCAGGCGCTTCTGTCGTTGTTCTTGAAGCTGTGGTGACCGTGGGATCCGAATCTTTGAGGTGAGCTTCTTG</u>	La-Murin-	100
	-P1R (←)		
101	GAGACTGAGGAG AGGTACGAAGGGCTGTGCTATGCGCAGGCCCTCACCTTCTCTCCGCGCCCGCCGCTGGGCCGCGCGGCCCGGTGGCCGTGTGCTGGAC		200
201	CGCGGCCCGAGGGGGCGCGGGCCCTCGGGGAGGCCACGGAGCGGGCCCCGGCCAGAGATCGGGGCGCTGGGCTTTCCACGTGGCAGGGATCCCAGCGGG		300
301	CCGCTGTGGGAGGATCGCGCTCTCGCGGGCCCTTAGGCAGAGGCTCGCCGCATCCTCACGGCTCCTTTCCGTTTGTTCCTTGACCCCTTTCTCTGACT		400
401	GGCCAGAGGCGGATGTTTCGGAACATTTAAGTCTTTAGGGTGTGCGGTGCGGGTTAAACGCGACAGGGTCTGTGGGACTGACTGGAGGCCGAAGAAGT		500
501	GGGGCCGCTATTGGGTTCCAGCGTCGCTATCTTTTTTTTTTTTTTTTCTTCAAGAAGTCCCATTTGCCATTCTGTCTTCAGTGTGAAACAGTCCCT		600
601	AAATGGGTAGGCGCAGAAGTCTGCAGGGCTAACTAGGTCGGTATTGACCTGTGTCTCTGTAGTAATGAGAAGTGAGATTGTTGGTAGTGGGAGACA		700
701	AACCAGCGCTGTAAACAGTAATTTCTGAAGTGGGACGTACTTCTGTAGATTTCCCATTTACAGGACAGTGTATGCCAGCAGTCTCCAGCATTGTTGAGC		800
	GWK-In1-R5 (←)		
801	AATGTCTCAAGAAATAT ACCAACAGTA ACTCATA ACTATAT TTCAGCTGCTGCAGATAAACTCTTCAAGAGCTGGTACTTCCGTACAATATGGTAGGGT		900
901	GGTTTAGTAAGCGCTGGAAGCCAGTAAGACAGAAGATCCGGTTTGTGATTTCTAGCAAACAGTATCACAGTCCCTCTTTATTCTAGGATTGCTGTCAG		1000
1001	ACCGTGAAACAGAAAGTGGCTATAGAGTTAAACAGTGTAGTAGTGTTTTAGGCACATCCTTACCTTCCAGCGTCCCTAGTTTAAAATTTTTGTATCTGT		1100
1101	TGCTCACAAGTCCCATTCTTTCTTGTATTCTCTATATAGTGTCTAACACCGTAACCTTCATATCTGAAGTCTATTTTTCATTTTACCAGTAATAAGTTT		1200
1201	TGGTAAGTCAAGCTGTGACTAATTTTGAAGAAACAGCAAAATAATGGCATTGAGGGCTATAGGAATATACTGCTGGCAGACTATAATATACTGATATTTTTA		1300
	GWK-In1-R2-nested (←)		
1301	AACTAGGAATGATTGAGGGTAGTTAAGTGGACATTTCTGCTTTTTTGTGTTTTATCGCTGAACTTT GCCTTACCAACTACATGAAGAGTTGGTTACA		1400
	GWK-In1-R1A (←)		
1401	<u>AACTAGGATTTACTGGAGGAGGGTGTGATCTGAGTTTCCATCCATAATCCAAGTGTGCTTTGTGTGAGATGTATGAGAATTCATAGGGAAACCT</u>		1500
	Maus-mRNA-F3 (→)		
1501	<u>CTAAGTGTAGGAATCTTGAATTAATAAAGTGGCATACTTTTACTCATCTCTTGTATTGACTATTATATAAATAATAACCTTCTACACAGT</u>		1600
	La-Murin-P2 (→)		
1601	<u>TCGAGAACTTTACAGATAGCCCAATGGCTGAAATGGAGATAATGAAAAATGACTGCTTTGGAGGCCAAAATCTGTATCAAAATGAG</u> STATGATTCT		1700
	GWK-In2-R4-nested (←)		
1701	TGTGTGGTTAAATGTAACCTAAGATGAAACAGAACATCT AAATAGCGATATGTGGGCTTTTCAAAACACTGGCTTAGCTTTGATTTGGAGTTAATAT		1800
1801	GAATGTATTCATATTAGGGCAAAGTTAGAAGTCTCAAGAATTACAGACATTTCCAAAGGTAACACTGTAGACTGGTGTGTTTTTTTTGAGACACAGAGTTCT		1900
	GWK-In2-R3 (←)		
1901	CAAGTCTGAAAAATGGAGTAATATTGTGCTAGTGTGAAAAATTAAGTGTG CCATAATATCAACAGCTAGCATAAAATCCATGGTAAAGTACTTC		2000
2001	TGGTCAAATAATAGTTTATCTATCTAGTTAGTCTCTCTTCTAAAAGTTAACATAACTTTTTAACAAAATTAAGCATTCAAAAGTCCCTGTAGACTGTTCT		2100
2101	TCCACTTCTCTCTGCGTGCCTTAGCCCTTCTCTCTTTCTCTCTTTCTGCCCCACTTCCCCATGGAGACTTCCCTGGCCCTCATCTTGGGGCCAG		2200
2201	TGATCTTCCCACTAAGATCAGCTTCCCAATAAAGTGCATTTAATAATACTTAAAAAAGAAAAAGAAAAATAACAAAAGCTCTGTAGCAT		2300
	La-Murin-In2-F1 (→)		
2301	TTCAAATTTAGGTTTAGAT GGAAATGTGTCAGTAAACAGAA TGGCTGTGGGAAATGGCCATAAATGCTTTTTATGCCATGAAATAACCATGGTTAGTG		2400
	GWK-In2-R1 (←)		
2401	TGTGTGCTCTTTTTTCCATTTCTTAGCTGTTTTGGTTTTGTTTTAACT GTGTACACCTTTGCTTTAAAT TTGCTGCTTTTTATTTTCTGTTTCTCAT		2500
2501	ATTTTCCCTTCTGAGTAATGGAGATCAAACCAAGGCATGCTAGGCAGTCACTCAGTGAAGTGTAGGCATTTGCGGCTACAAATGTTGCTGATTTTTT		2600
2601	TTAAAAATATTATTTATTTATGTGATTTGGTGTGTTGCTGCTGATGTGCTGTGTAAGGATCCCCCGAACATAGAGTTACAGACAGTTGTGAGCTTC		2700
2701	TATGGATGCCAAGAAATGAACCTGGTCTCCGGAAGAGCAGCTAGTTCTTTAACTGCTGAACCATCTCCAGCCCTTTGTTGATTGGGGAAAAA		2800
2801	AATTGTGTTTTCTTAATAATGCAAAAGCAGTGATAAGATAAATGCTGTTTAAATGCTTGGAAACAATAGCAAATTTGTTATAGAAAAAATAATGTTCTCT		2900
2901	CCCACAGCTCGAGCCTCACATCTCTCCCTCTTGAGATATCAAGGTTAAAGCCCTTTTCACTACTCCATGTTCAAAAATACATTTTATTTTAGTGTACTT		3000
3001	TCTGTATGGATGTTATGCTACATGATGGCTGTGCGGTGACATGCTGGGTCCTCCAGAACCCAGAAAGTGTGCACTGGCTCCCTCAGGAAATTCAC		3100
3101	AATAACAGATGGGTATAAGGCCCTAATGGAAGTCCGGGAATGAACTGGTCAACATTCAGTGTCTTAACTCTGAGTCACTCTCCAGCTCTTAA		3200
3201	TATTTTTTTTTAAAGAGGCCCAATTTTTTATTTTTTAAAGAAATAAAGTTCAAGTAAACACTACTCAGAGACAAGATTTCTTAAACATCCCAACCA		3300
3301	GGATGGCCTATAAACAATTTATTTTTTCTTTTTCCCCCAACAACATGAGATGTTTTTAGAGAGTAAAGTTTTGTTTCCCAACAATATATAATTA		3400
3401	ATAATCATCTCTCTAAAGTATAGATTTTTAAAAATATGATTTCTACGATATCTTTATGFAAAAATTTAGTAAACAGGCTACTGCTTGGCTTCTCC		3500
3501	TCTCGTCTCTCTCCCTCTTTTCTCTTTTACTTTTTTCTCTTTTACTCTTTTATCCATCCATTCATCTCATGCCAGGGCTCTCGGGGAAAAATTCAC		3600
3601	AAACTCATAGAGGTAGATCACCTTGTCTTCTGCTTCCCATGTGTGAGAATTAAGAGCATGAGCCATCACATCTACCTTATTTTAAAAAATAGTGTGTGTC		3700
3701	TGTGCTGTCTGCATATCAATATTTGGCCCTCAGAGGTGTCTCTCTGGAGCTGTAGTTACAGTCTCTTATGAGCCAACTGACAAGCCCTGTAGAAGCT		3800
	La-Murin-		
3801	ACCTCAGTCTTCTGGAAGAGCAGCAGCATTCTTAGGCATTGAGCCATCTCTAGCTCTCTGCTGATTTCTTTAAGATGGAATTCCTAG GAGGAGCTAC		3900
	In2-R1 (←)		
3901	ATTGATTGGCTC AAAGCTAGTGTGAGATTGAAGCATCTTAGGTTTTGATTAGTAATGATACTAGATTTTTTGTGTTTGGTGTGTGTTTATATAAAT		4000
4001	TTTAAAGTGGCTGGTATGTTGGTACCTAATTTTTAATCTTAGGACTTGGAAAGTAGAGGCAGGTGGATCTCTGACTTTGAGAACTTAGAAGAAATTC		4100

8.3 Lage aller Oligonukleotide in der murinen La/SS-B-cDNA

In der folgenden murinen La/SS-B-cDNA-Sequenz sind alle Primer und Sonden enthalten, die für PCRs mit La/SS-B-cDNAs und *in situ*-Hybridisierungen verwendet werden. Vorwärtsprimer sind durch (→), Rückwärtsprimer durch (←) gekennzeichnet. Alle Rückwärtsprimer tragen außerdem den Zusatz „-R“ oder „-Rück“. Fett dargestellt sind das Start-AUG im Exon 2, das Stop-Codon im Exon 11 und artifizielle Restriktionsschnittstellen in den Primersequenzen. Die drei alternativen Exon 1 (Exon 1a, 1b und 1c) sind einzeln dargestellt. Die Sequenz beginnt mit dem ersten alternativen Exon 1 (Exon 1a bzw. Exon 1b). Im ersten Exon ist die Sequenz doppelt unterstrichen, um die das Exon 1b im Vergleich zum Exon 1a verlängert ist. Ab dem Exon 2 ist jedes geradzahlige Exon unterstrichen. Das Exon 11 ist doppelt unterstrichen, um es von der 3'-UTR abzugrenzen.

Exon 1a / Exon 1b			
		Iso-Ex1a/b-Vor (→)	
		GAATTC CAGGCGCTTCTGTCGTTG	
		Maus-mRNA-F1 (→)	Maus-
1	TGCTGTGGGCCCGCCGGCGCTCGGAAGTCCAGGCGCTTCTGTCGTTGTTCTTGAAGCTG	CAGGCGCTTCTGTCGTTGT	TGAAGCTG
			60
		Exon 1b-antisense/sense	
		ATCCGAATCTTTGAGGTGAGCTTCTG	
		mRNA-F2 (→)	Exon 1a-antisense/sense
61	TGGTGACCGTG	AGGTGAGCTTCTTGGAGACTGAGGAGA	
		TGGTGACCGTGGATCCGAATCTTTGAGGTGAGCTTCTTGGAGACTGAGGAGA	113

Exon 1c			
1	TTACCAACTACATGAAGAGTTTGGTTACAAAGTAGGATTTACTGGAGGAGGGGTTGTTG		60
61	ATCTGAGTTTCCATCCATAATCCAAGGTGTGCTTTGTTGAGATGTATGAGAATCATA		120
		Exon 1c-antisense/sense	
		TACTC	
		Iso-Ex1c-Vor (→)	
		GAATTC ACTC	
		Maus-mRNA-F3 (→)	
121	GGGAAACCTGTAAGGTTAGGAATCTTGAAATTAATAAAAAAAAAAGTGGCATACTTTTACTC	ACTC	180
		Exon 1c-antisense/sense	
		ATTCTCTGTATTGACTATTATATA	
		Iso-Ex1c-Vor (→)	
		ATTCTCTGTATTGACTA	
		Maus-mRNA-F3 (→)	
		ATTCTCTGTATTGACTAT	
181	ATTCTCTGTATTGACTATTATATAATAATAAACCTTCCTACC		240

Exon 2 - Exon 11			
1		La-Murin-RT-PCR-Vor (→)	
		GAATTC GAAACTTTACAGATAGCCAC	
		AGTGTG GAAACTTTACAGATAGCCACA	
			28
29	<u>ATGGCTGAAAATGGAGATAATGAAAAATGACTGCTTTGGAGGCCAAAATCTGTCATCAA</u>		88
1	<u>M A E N G D N E K M T A L E A K I C H Q</u>		20
89	<u>ATTGAGTATTATTTGGAGACTTCAATTTGCCACGAGACAAGTTTTAAAGAAGCAGATC</u>		148
21	<u>I E Y Y F G D F N L P R D K F L K E Q I</u>		40
149	<u>AAATTGGATGAAGGCTGGGTACCTTTGGAAACAATGATAAAAATCAACAGGCTAAACCGG</u>		208
41	<u>K L D E G W V P L E T M I K F N R L N R</u>		60
209	<u>CTGACAACAGACTTTAATGTAATTGTGCAAGCACTGAGCAAATCTAAGGCAAAACTCATG</u>		268
61	<u>L T T D F N V I V Q A L S K S K A K L M</u>		80
		Maus-mRNA-R1 (←)	
		TAGAAGATCACCAAGCAGACC	
269	<u>GAAGTCAGTGCAGACAAAATAAAAATAGAAGATCACCAAGCAGACCCTCCCTGAAGTG</u>		328
81	<u>E V S A D K T K I R R S P S R P L P E V</u>		100
		La-Murin-P5R (←)	
		GTTTCCCAACT	
329	<u>ACGGATGAGTATAAGAATGATGTAATAAAACAGATCTGTTTATATAAAGGTTTCCCAACT</u>		388
101	<u>T D E Y K N D V K N R S V Y I K G F P T</u>		120
		La-Murin-P5R (←)	
		GACGCCACC	
389	<u>GACGCCACCCTTGATGATATAAAAGAATGGCTAGACGATAAAGGCCAAATACTGAATATT</u>		448
121	<u>D A T L D D I K E W L D D K G Q I L N I</u>		140

9 ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Bachmann durchgeführt.

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Mittel verwendet zu haben. Des weiteren versichere ich, dass ich diese Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung oder die gleiche oder Teile der Abhandlung als Dissertation bei einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich eingereicht habe.

Mainz, November 2000

(Christian Schörner)

10 VERÖFFENTLICHUNGEN

10.1 Gedruckte Vorträge

BACHMANN, M.³, FARRIS, D.³, KAUFMAN, K.³, DRATHEN, U.¹, SCHÖRNER, C.¹, GROSS, J.³, GROSS, T.³, JAMES, J.³ and HARLEY, J.B.³:

Adoptive Transfer of anti-La T-cells into human-La transgenic mice: Comparison of transgenic monoclonal anti-La antibodies with self and nonself anti-La monoclonal antibodies of hyperimmunized mice.

5th Dresden Symposium on Autoantibodies (2000)

SCHÖRNER, C.¹, SCHMITZ, M.² and BACHMANN, M.¹:

Nuclear import of Ro52 requires La/SS-B.

4th Dresden Symposium on Autoantibodies (1998)

10.2 Vorträge

BACHMANN, M.³, KURIEN, B.T.³, SCHÖRNER, C.¹, GROSS, J.³, GROSS, T.³, JAMES, J.³, SCOFIELD, R.H.³ and HARLEY, J.B.³:

Does the nuclear autoantigen La/SS-B function by binding/chelating divalent cations?

5th Dresden Symposium on Autoantibodies (2000)

BACHMANN, M.³ and SCHÖRNER, C.¹:

Methods and strategies in the detection of novel autoantigens.

5th Dresden Symposium on Autoantibodies (2000)

¹ Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie der Universität Mainz

² Institut für Immunologie der Universitätsklinik Dresden

³ Arthritis and Immunology Program, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, USA