

Aus der Medizinischen Poliklinik Innenstadt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

***Expression und Epigenetik bei HLA B27 assoziierter Arthritis.***

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Ernest Paul Mathavan

aus  
München

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. R. Gruber

Mitberichterstatter:

PD Dr. med. S. Krauss-Etschmann  
Prof. Dr. med. M. Maier

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Prof. Dr. med. H. Kellner

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

20.01.2011

## **I. Einleitung**

I.1	Geschichte des MHC und seiner Krankheitsassoziation	<u>5</u>
I.2	Konzept des MHC in Genetik und Immunologie	<u>6</u>
I.2.1	Genomische Organisation, Nomenklatur und Molekülstruktur	
I.2.2	Physiologie von MHC I und II in der Immunantwort	
I.3	Konzept der Spondylarthropathien (SpA)	<u>10</u>
I.4	Hypothesen zur Pathogenese der HLA-B 27 Krankheitsassoziation	<u>11</u>
I.4.1	Epidemiologische Studien	
I.4.2	Tiermodelle	
I.4.3	Spezielle Proteinbiologie des HLA B27	
I.4.4	Autoimmunität und die <i>arthritogenic peptide</i> Hypothese	
I.5	Etablierte genomische Typisierungs und Nachweisverfahren	<u>15</u>
I.6	Kritische Überlegungen und Zielsetzung	<u>15</u>

## **II. Material und Methoden**

II.1	Das analytische Verfahren im Überblick	<u>17</u>
II.2	Probenmaterial	<u>17</u>
II.2.1	Patientenauswahl durch Immunfluoreszenzfärbung	
II.2.2	Ursprung des untersuchten Probenmaterials	
II.3	Nukleinsäureextraktion	<u>19</u>
II.3.1	Simultanextraktion DNA/RNA mittels des <i>RNeasy QIAGEN Kit</i>	
II.3.2	Photometrie	
II.4.	Reverse Transkription mittels <i>QIAGEN Omniscript</i>	<u>20</u>
II.5	HLA B spezifische RT-PCR	<u>21</u>
II.5.1	Allgemeine Überlegungen zur PCR	
II.5.2	Verwendetes Verfahren	
II.6	Fragmentanalyse und Aufreinigung	<u>23</u>
II.6.1	Agarose Gel Elektrophorese	
II.6.1.1	Analytische Agarose Gele	
II.6.1.2	Präperative Agarose Gele	
II.6.2	Elution des Fragments mittels <i>BIO 101 Genclean II Kit</i>	
II.7	Vectorklonierung und Vereinzelung der Fragmente	<u>25</u>
II.7.1	Der Vektor <i>pCR 2.1. TOPO (invitrogen)</i> und Ligation	
II.7.2	Transfektion in kompetente <i>E.coli TOP10F (invitrogen)</i>	
II.7.3	Ausbringen, Picken und Bebrüten der transformierten <i>E.coli</i>	
II.7.3.1	Herstellung der Nährmedien	
II.7.3.2	Bakterienkultur	
II.8	PCR zur Herstellung des Zielfragmentes (B-Fragment), die <i>huckepack PCR</i>	<u>27</u>

II.9	SSCP-Gelanalyse	<u>29</u>
II.9.1	Gerät	
II.9.2	Gele	
II.9.3	Laufpuffer und Probenauftrag, Laufbedingungen und Färbung	
II.10	Sequenzierung von musterhaften Klonen	<u>33</u>
II.10.1	Plasmidminiprep mit dem <i>Plasmix Kit (Talent)</i>	
II.10.2	Doppelrestriktionsverdau des Plasmides	
II.11.	Zyklisches Sequenzieren	<u>34</u>
II.11.1	Sequenzierreaktion	
II.11.2	Gelelektrophorese und Auswertung	

### **III Ergebnisse**

III.1	Häufigkeit von Mutationen in den unterschiedlichen Geweben	<u>37</u>
III.2	Vergleich der Puffersysteme	<u>40</u>
III.3	Ergebnisse der Sequenzanalyse	<u>42</u>

### **IV Diskussion**

IV.1	Darstellung der Ergebnisse	<u>46</u>
IV.2	Mögliche Ursachen der Mutagenese in vivo	<u>47</u>
IV.2.1	RNA <i>editing</i> als möglicher Generator der gefundenen RNA Mutationen	
IV.2.2	Oxidativer RNA Schaden	
IV.3	Der systematische Fehler durch eine artifizielle Mutagenese	<u>49</u>
IV.3.1	Artifizielle Mutagenese durch die Polymerasen	
IV.4	Hypothetische Auswirkungen der mRNA Mutationen	<u>50</u>
IV.5	Citrullinierte Proteine (CCP) als Beispiel posttranslationaler Pathogenese	<u>51</u>
IV.6	Tumorimmunologie und das <i>Immunoediting</i>	<u>52</u>

### **V Zusammenfassung** 53

### **VI Statistik**

VI.1	Vergleich der Kontrolle gegen Patient Gelenkspunktat <i>ex vivo</i>	<u>56</u>
VI.2	Vergleich Patient Gelenkspunktat <i>ex vivo</i> gegen Kultur	<u>57</u>

**VII Anhang**

VII.1 Das analytische Verfahren im graphischen Überblick 58

**VIII Tabellen und Abbildungen** 59

**IX. Literaturverzeichnis** 61

## *I. Einleitung*

### **I.1 Geschichte des Histokompatibilitätskomplexes (MHC) und seiner Krankheitsassoziation**

Die Entdeckung des MHC geht auf Peter A. Gorer zurück und datiert auf das Jahr 1936 (Gorer P A, 1936). Gorer experimentierte damals mit Blutgruppenantigenen von Mäusen und erreichte 1938 durch Tumortransplantationsversuche sogar den Brückenschlag zur Antigenität solider Gewebe (Klein J, 1986). Gorer vermutete, dass es einen genetisch determinierten Faktor gebe, dessen Anwesenheit im transplantierten Tumor und dessen Abwesenheit im Empfänger zur Abstoßung des transplantierten Gewebes führe. Dieser später so genannte H Faktor, H für Histokompatibilität, beschrieb den MHC der Maus.

Auch heute zu Tage ist der *extended MHC* (xMHC) noch einer der am intensivsten umforschten Orte des Genomes, da seine Genprodukte eine wesentliche Funktion in der Immunologie, der Transplantationsmedizin und der Erforschung des genetischen Hintergrundes menschlicher Erkrankungen darstellen. Diese Forschung nutzt den hohen Polymorphismus dieses Genortes - nach heutigem Erkenntnisstand ist das xMHC der polymorphste Genort des menschlichen Genomes überhaupt (Horton R., 2004) - um Assoziationen von bestimmten MHC Haplotypen zu Erkrankungen zu definieren. Diese Suche führte zu einer Liste von ca. einhundert vornehmlich immunologisch bedingter Erkrankungen, die solch eine Assoziation aufweisen. Dabei reicht das Spektrum der wissenschaftlichen Ergebnisse von Erfolgen, wie bei zum Beispiel der Hämochromatose und der Entdeckung des HFE Gens und der Mutation C282Y, bis hin zu Rätseln bezüglich komplexer Erkrankungen wie dem Typ 1 Diabetes oder der Rheumatoiden Arthritis. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Krankheitsassoziation des HLA-B27 zu den Spondylarthropathien, welche in zumindest zweierlei Hinsicht eine besondere ist. Zum einen stellt sie die stochastisch stärkste Krankheitsassoziation dar, zum zweiten stellen die Spondylarthropathien eine Gruppe Erkrankungen von unstrittbar autoimmunologischer Natur dar, sodass ein direkter kausaler Zusammenhang zu HLA-B27 evident erscheint. Zur Veranschaulichung sei bemerkt, dass bereits der Austausch einer einzelnen Aminosäure am HLA-B27 Molekül ausreicht um die Krankheitsassoziation herzustellen oder zunichte zu machen.

Diese Arbeit möchte einen Beitrag zur Assoziationsforschung leisten indem sie ein sehr punktuelles, aber wie ich hoffe scharfes Schlaglicht auf epigenetische Prozesse in der

Biologie des HLAB 27 wirft. Im Folgenden wird eine Methodik beschrieben und evaluiert, welche es ermöglicht Veränderungen auf HLA-B27 Transkripten, im Speziellen der mRNA von HLA-B27, zu beobachten.

## **I.2 Konzept des MHC in Genetik und Immunologie**

Die Evolution des MHC mit seinem Nebeneinander von hoch polymorphen (z.B. klassische Klasse I und II Gene) und stark konservierten (z.B. Klasse III Gene) Genorten ist weiterhin Gegenstand der aktuellen Diskussion (Nei M., 2005). Auf der Proteinebene gehört das MHC zur Immunglobulinsuperfamilie, zu welcher neben den Antikörpern unter Anderen z.B. der T-Zell-Rezeptor, CD4 und CD8 gehören. Man nimmt heute an, dass diese Proteine alle von einer Immunglobulin Domäne abstammen. Die treibende evolutionäre Kraft stellen hierbei die zunehmend komplexen Zell-Zell Interaktionen, sowie die Auseinandersetzungen mit infektiösen Agenzien dar (Alberts B. et al., 2002). Als Generator des hohen Polymorphismus wurde das Konzept einer *birth and death* Evolution etabliert. Hierbei ist vor allem die Genduplikation von Bedeutung. Der Polymorphismus wird hierbei von häufiger Genduplikation plus Mutationen und dem jeweiligen Ausscheiden von funktionell oder selektionistisch ungünstigen Genen in Form von Pseudogenen unterhalten. Für HLA-B27 und seine inzwischen 31 Subtypen gilt 2705 als der Urtyp (Reveille J.D., 2006). Wichtig für die Untersuchung der Krankheitsassoziation ist des Weiteren das Phänomen des *linkage disequilibrium* welches für die Gene des MHC gilt. Dieses beschreibt, dass die unterschiedlichen Genotypen einiger MHC Gene häufiger kombiniert miteinander vorkommen, als die Einzelwahrscheinlichkeiten ihrer Genotypen innerhalb einer bestimmten Population erwarten ließen.

Diesbezüglich entwarf Alper et al das Konzept des *extended haplotype* und konnte sowohl für die Transplantationsimmunologie als auch für einige HLA Krankheitsassoziationen zeigen, dass diese kombinierten Genotypen schwerer wiegen als der alleinige HLA-Haplotyp (Alper C.A., 1992). Für HLA-B27 tritt zum Beispiel ein *linkage disequilibrium* für die Kombination mit einzelnen TNF- $\alpha$  Genotypen auf (Martinez-Borra J., 2000). Bisher ergab sich jedoch für die HLA-B27 Krankheitsassoziation kein Hinweis, dass ein anderes Gen im Sinne des *extended haplotype* zu dieser beiträgt. Für eine aktuelle Genkarte des extended human MHC welches sich über 7,6 Mb erstreckt und ca. 252 exprimierte Gene enthält siehe Horton et. al. (Horton R., 2004). Im Folgenden wird nun das menschliche MHC im engeren Sinne dargestellt.

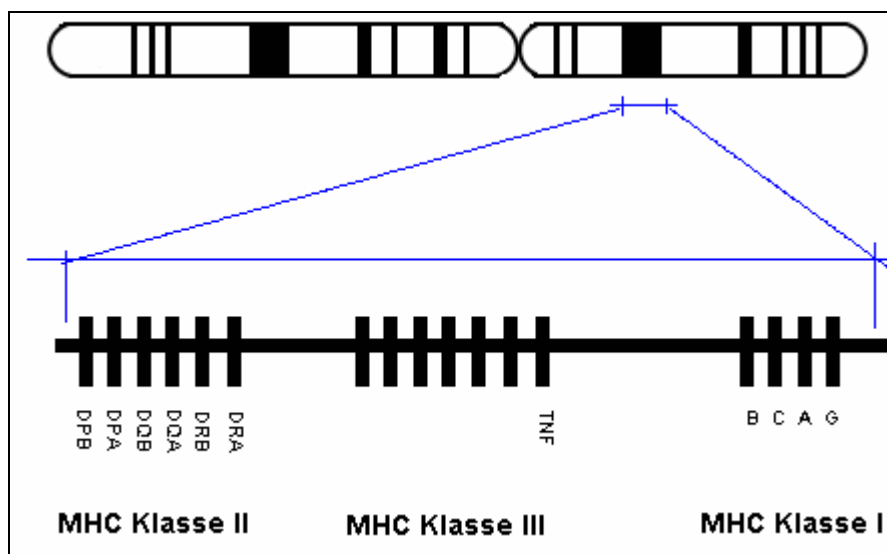
## I.2.1 Genomische Organisation, Nomenklatur und Molekülstruktur

Das *Human Leukocyte Antigen* (HLA) befindet sich innerhalb des *Major Histocompatibility Complex* (MHC) auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 bei Bande 6p21.3 (Abb. 1.1) .

Formal wird dieses in 3 Gencluster, Klasse I-III, unterteilt. Während die Klasse I und II Proteine der Immunglobulin Superfamilie mit antigenpräsentierender Funktion kodiert, enthält die Klasse III die Sequenzen für eine heterogene Gruppe von Proteinen (Komplementfaktoren, *heat shock proteine*, Cytokine).

Das Klasse I Gencluster besteht aus drei „klassischen“ Genen die mit den Buchstaben A bis C bezeichnet werden. Diese sind in hohem Maße polymorph und kodieren alle für Isotypen des HLA Klasse I Moleküls.

### *Das menschliche MHC*



**Abbildung 1.1** Schematische Darstellung des Chromosom 6 Bande 6p21.3, die Banden entstehen durch eine Giemsa-Färbung des kondensierten Chromatins typischerweise während der Metaphase des Zellzykluses. Dargestellt ist die Lage der MHC Gene.

Der HLA-B Locus der hier genauer untersucht werden soll erstreckt sich über ca. 4kb genomischer DNA und enthält 8 Exone.

Um bei dem gegebenen Polymorphismus jeden Isotypen exakt bezeichnen zu können wird dem buchstabenkodierten Genlocus ein sechsstelliger Zahlencode angehängt. Die ersten beiden Ziffern bezeichnen den serologisch definierten Isotypen, die nächsten beiden spezifizieren diesen, definiert über die distinkten Aminosäuresequenzen, die letzten beiden

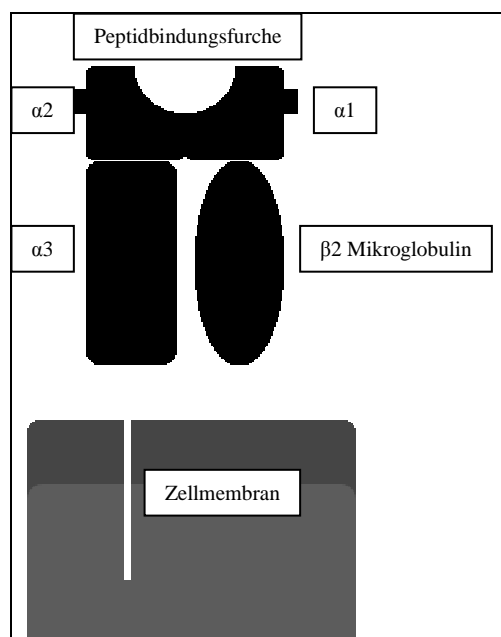


schließlich stehen für genomisch definierte Subtypen, die jedoch keine Aminosäureveränderungen im Protein nach sich ziehen (Marsh G.E., 2002).

Das resultierende Proteinprodukt ist ein Heterodimer assembliert aus einer schweren Kette (*heavy chain*, hc), bestehend aus drei Domänen ( $\alpha$  1-3) und einem nicht kovalent gebundenen und anderenorts kodierten Globulin ( $\beta$ 2- Mikroglobulin).

Die  $\alpha$ 1 (Exon 2) und  $\alpha$ 2 (Exon 3) Domäne bilden die Peptidbindungsfurche in Form einer  $\beta$ -Faltblattebene die von zwei  $\alpha$ -Helices überspannt wird (Abb.1.2).

*Schematische Darstellung des MHC Klasse I Proteinkomplexes auf der Zelloberfläche*



*Abbildung 1.2 Dargestellt sind die Proteindomänen inklusive dem  $\beta$ 2 Mikroglobulin*

Diese Furche spannt sich über ca.  $10 \times 25 \text{ \AA}$ . Die Wände werden von Seitenketten der  $\alpha$ -Helices, der Boden von Seitenketten der  $\beta$ -Faltblattebene gebildet (Bjorkman P.J., 1987). Als wichtig für die Peptidbindung wurden 6 Anker Taschen beschrieben die mit den Buchstaben A bis F bezeichnet werden (Buxton S.E., 1992).

Als variabelste Regionen sind sie das Substrat des hohen Polymorphismus, Generator des breiten Antigenpräsentationsrepertoire und Ort der empfindlichen Rezeptorinteraktion (s.u.).

Während Klasse II Moleküle hauptsächlich auf Antigen präsentierenden Zellen (APC) exprimiert werden, befindet sich Klasse I auf allen kernhaltigen Zellen.

## I.2.2 Physiologie von MHC I und II in der Immunantwort

Die 70iger Jahre erbrachten die Erkenntnis, dass die adaptierte Immunantwort MHC restringiert ist (Zinkernagel R.M., 1974). Diese Formulierung beschreibt, dass das Fremdantigen nicht direkt, sondern erst nach Prozessierung und Präsentation durch MHC Moleküle von T-Zellen erkannt wird, welche dann eine Immunantwort durch antigenspezifische Antikörper oder Zelllyse durch zytotoxische T-Zellen triggern können. Der Vorgang des Erkennens, bei dem der vorgefertigte und antigenspezifische T-Zell-Rezeptor (TCR) sein Antigen plus HLA Molekül bindet, wird als *priming* bezeichnet (Roitt I.M., 2000). Die Aktivierung, bestehend aus Zellteilung und Reifung der T-Zelle, benötigt eine *Clusterung* der HLA-TCR Komplexe aber auch weiterer kostimulierender Rezeptoren (B7/CD28, LFA-3/CD2) und stabilisierender Rezeptoren (ICAM-1/LFA-1) und führt zur Formung einer immunologischen Synapse. Sie gewährleistet eine ausreichende Kontaktzeit und die Summation stimulierender Signale die erst durch Phosphorylierungskaskaden der Rezeptoren und Zytokinsekretion zur Stimulation der T-Zelle und ihrer immunologischen Funktionen (T-Zell Hilfe/ Zytotoxische T-Zell Lyse) führt.

HLA Klasse II interagiert demnach mit dem TCR einer CD4 positiven T-Helferzelle ( $T_H$ ). Damit nimmt es zusammen mit weiteren Signalen eine Schlüsselstellung am Scheideweg zwischen Toleranz und Triggerung einer Immunantwort ein, da fast alle adaptiven Immunfunktionen von T-Zell-Hilfe abhängig sind. In geringem Maße interagieren auch CD4 positive zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) mit HLA II und führen im Fall einer Aktivierung zur Zelllyse.

MHC Klasse I ist für die Antigenerkennung mittels des TCR von CD 8 positiven CTL verantwortlich. Für die Interaktion des Klasse I Molekül mit CTL ergeben sich vier Fälle die zum Erkennen und bei ausreichender Stimulation, zu einem lysierenden CTL-Klon führen:

- In Ausnahme zu oben genannter Regel können APC phagozytierte und somit exogene Antigene auf Klasse I präsentieren (*crosspriming*).
- Obiger Regel folgend wird endogenes Fremdantigen durch mit intrazellulären Keimen infizierten Zellen präsentiert (intrazelluläre Keime).
- Endogenes alteriertes Selbstantigen oder überexprimiertes Selbstantigen wird durch Tumorzellen präsentiert (*immunsurveillance*).

- Endogenes Selbstantigen wird im Rahmen der Transplantatimmunologie durch allogenes MHC präsentiert (direkte Alloreaktion) oder exogenes Fremdantigen wird durch eigenes MHC im Rahmen des *crosspriming* präsentiert (indirekte Alloreaktion).

Als weitere Lymphozytengruppe interagieren Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) in komplementärer Weise mit HLA Klasse I, da sie bei fehlender Expression die Zielzelle ebenfalls lysieren. Sie benutzen hierzu ein Gleichgewicht an inhibitorischen Rezeptoren (KIR/CD94/NKG2) und stimulierenden Rezeptoren (Backström E., 2004).

Eine weitere hier relevante Ausnahme stellen CD4 positive Lymphozyten dar, welche MHC Klasse I restringiert sind (Bendelac A., 1994). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten sporadisch HLA-B27 restringierte CD4 positive Lymphozyten charakterisieren. Boyle et al. konnten dies in einen Zusammenhang mit ungewöhnlichen Formen von B27 (*siehe auch I.4.3*) in vitro bringen (Boyle L.H., 2004).

Die Expression des MHC wird vor allem im Rahmen einer T<sub>H</sub> Antwort der Immunabwehr durch  $\gamma$ -Interferon verstärkt. Für die Spondylarthropathien fielen reversible falsch negative Typisierungsergebnisse mittels serologischer Nachweistests während der interkurrenten Erkrankung auf, sodass hier eine transiente Minderexpression von HLA-B27 postuliert wurde (Kirveskari J., 1997).

### **I.3 Konzept der Spondylarthropathien (SpA)**

Das Konzept der SpA geht auf Beobachtungen von Klinikern zurück, datiert auf die Mitte der 70er Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts und formte sich in Abgrenzung zur Rheumatoiden Arthritis (Moll JM , 1974). Es wurde eine Assoziation bestimmter rheumatischer Erkrankungen mit einer Sakroiliitis und deren familiäre Häufung beobachtet.

Heute zählen hierzu die Ankylosierende Spondylitis (AS/ Morbus Bechterew), die Reaktive Arthritis (ReA/ Reiter Syndrom), Arthritiden assoziiert mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, die Psoriasis Arthritis sowie die undifferenzierte Spondylarthritis (Braun J , 2002). Die Prävalenz der SpA steht dabei in enger Abhängigkeit zur Prävalenz von HLA-B27 in der jeweiligen Bevölkerung, die weltweite Prävalenz wird auf ca. 2% geschätzt (Sieper J, 2006)

#### **I.4 Hypothesen zur Pathogenese der HLA-B 27 Krankheitsassoziation**

Viele der HLA Klasse I und II Genloki sind mit einem erhöhten Krankheitsrisiko für Erkrankungen assoziiert. Die stärkste Assoziation besteht für die Spondylarthropathien (SpA) und HLA-B 27. Bis zu 95% der Westeuropäer mit einer *Ankylosing Spondylitis* (AS) sind B 27 positiv. Die Wahrscheinlichkeit eines HLA-B 27 positiven Individuums eine Erkrankung aus dem Formenkreis der SpA zu akquirieren beträgt um die 10% (Reveille J.D., 2001). Die HLA-B27 Familie setzt sich aus 23 verschiedenen Subtypen, von denen alle bis auf B\*2706 und B\*2709 eine Krankheitsassoziation zeigen, zusammen. B27 bindet ein 6-8 Aminosäuren langes Peptid hauptsächlich durch die Taschen B und F, wobei sich alle B27 Subtypen die Eigenschaften der Tasche B teilen und innerhalb der Tasche F am stärksten variieren. Bemerkenswerterweise zeigt die Tasche B eine Spezifität für Peptide die an zweiter Position ein Arginin tragen. Trotz intensiver Forschung konnte das Substrat der beobachteten Assoziation bisher nicht aufgedeckt werden.

Eine unübersichtliche Vielzahl an Evidenzen und Hypothesen wurde seit der Erstbeschreibung der starken Krankheitsassoziation durch Schlosstein et al. (Schlosstein L., 1973) entwickelt. Hierfür ausschlaggebend ist zum einen, dass die experimentellen Evidenzen aus unterschiedlichen Forschungsbereichen stammen und sie sich zum anderen auf jeweils unterschiedliche Erkrankungen aus dem heterogenen Bereich der Spondylarthropathien beziehen. Das Spektrum reicht hier von Theorien, die lediglich einen an HLA-B27 gekoppelten Marker für ursächlich erachten, bis zur Frage ob HLA-B27 im Rahmen der adaptiven Immunfunktion, einer unspezifischen Immunfunktion, oder aufgrund einer ungewöhnlichen Proteinbiologie als pathogenetisch ursächlich zu erachten ist.

Allerdings besteht im aktuellen Diskurs ein breiter Konsens darüber, dass es sich bei den SpA um polygene Erkrankungen mit einer direkten pathogenetischen Rolle von HLA-B27 handelt. Für eine Übersicht siehe *Tab. 1.1*

*Hypothesen zur HLA-B27 Krankheitsassoziation, modifiziert nach ( P. Bowness, 2000 )*

# HLA-B27 ist an das krankheitsassoziierte Gen gekoppelt
# HLA-B27 bindet und präsentiert ein arthritisinguzierendes Peptid an T-Lymphozyten
# HLA-B27 ist an der Selektion eines für die Spondylarthropathien empfänglichen T-Zell Repertoire während deren Reifung im Thymus beteiligt
# HLA-B27 hat eine ungewöhnliche Zellbiologie im Vergleich zu anderen Klasse I Molekülen
# Das freie Cystein an Position 67 von HLA-B27 wird nach Oxidierung immunogen
# HLA-B27 führt im Rahmen einer Molekularen Mimikry zu humoraler Kreuzreaktivität mit bakteriellen Antigenen
# HLA-B27 ist Rezeptor für einen bakteriellen Liganden
# Interaktion zwischen HLA-B27 und einem bakteriellen Superantigen führt zu unspezifischer T-Zell Stimulierung
# Von HLA-B27 gebundene Peptide werden von Klasse II Molekülen CD4 positiven T-Zellen präsentiert

**Tabelle 1.1**

Die wichtigsten Hypothesen und Evidenzen sollen nun schlaglichtartig beleuchtet werden, wobei das Hauptaugenmerk auf die, für diese Arbeit wesentlichen, gerichtet sein soll.

### **I.4.1. Epidemiologische Studien**

Epidemiologische Studien zeigen, dass lediglich ca. 10% aller HLA-B27 positiven *Caucasier* eine Erkrankung aus dem SpA Formenkreis entwickeln. Diese Zahl erhöht sich auf 20% bei Vorliegen einer positiven Familienanamnese. Diese hohe Wiederauftretenswahrscheinlichkeit unter Verwandten ersten Grades spricht für einen gewichtigen genetischen hereditären Faktor. Bezieht man die gewonnenen Zahlen auf die SpA Prävalenz unter nicht verwandten HLA-B27 positiven Individuen, so lässt sich hierdurch zudem ein von HLA-B27 unabhängiger genetischer Faktor dokumentieren (Brebant M., 2006). Nach Daten aus Familienstudien wird der Beitrag von HLA-B27 am genetisch determinierten Erkrankungsrisiko für die SpA auf ca. 40% geschätzt. An alternativen Genen werden MICA und MHC Klasse II Genotypen diskutiert, das oben erwähnte *linkage disequilibrium* macht hier den Zugang zu HLA-B27 unabhängigen Faktoren jedoch schwierig (Reveille J.D., 2006).

Interessanterweise scheinen betroffene Familien keine phänomenologischen Subtypen der SpA aufzuweisen, sondern bilden alle klinischen Erkrankungen des SpA gleichermaßen aus (Brebant M., 2006).

### I.4.2 Tiermodelle

Experimente mit HLA-B27 transgenen Ratten konnten bei ausreichender Kopienzahl und bei geeignetem genetischem Hintergrund, sowie dem Vorhandensein einer normalen Darmflora eine den SpA ähnliche Erkrankung reproduzieren (Taurog J.D., 1999). Diese Erkrankung ließ sich durch unreife hämatopoetische Stammzellen, jedoch nicht durch reife T Lymphozyten, auf nicht transgene Ratten, oder gesunde Ratten mit niedriger Kopienzahl, übertragen (Breban M., 1993). Thymusfreie Ratten entwickeln keine Erkrankung bis ihnen gereinigte T-Lymphozyten verabreicht oder ein Thymus transplantiert wurde. (Breban M., 1996). Bemerkenswerterweise zeigt sich dieses Phänomen auch in CD8 T-Zell depletierten Tieren. Diese Befunde unterstreichen eine direkte Funktion von HLA-B27 und rücken auf zellulärer Ebene vor Allem T-Zellen, auch CD4 T-Zellen in das Schlaglicht.

### I.4.3 Spezielle Proteinbiologie des HLA-B27

MHC Klasse I *heavy chains* (hc) gelangen kotranslational in das Endoplasmatische Retikulum (ER), um hier mit Hilfe spezieller *chaperons* (calnexin/calretikulin/Erp57/BiP) ihre regelrechte Faltung im Sinne einer Tertiärstruktur zu erlangen und mit dem  $\beta$ 2- Mikroglobulin ( $\beta$ 2) ein Heterodimer zu bilden. Allen voran scheint hier BiP im Sinne einer Qualitätskontrolle am Scheideweg zwischen dem Weitertransport und der Degradation durch die ER-assoziierte-Degradation (ERAD) zu stehen. Ausschlaggebend scheint hier eine korrekte Faltung der Proteine zu sein, welche vermittelt durch eine differenzielle Glykosylierung entweder zur Retention im ER, oder zum Ausschleusen aus dem ER mit konsekutiver Ubiquitinierung und einem Proteasom abhängigen Abbau führt. Desweiteren aktiviert BiP die *unfolded protein response* (UPR) welche zu einer Hochregulation sowohl der ERAD Bestandteile als auch der *chaperons* führt und bei einem Überlaufen des ER mit *misfolded* Proteinen aktiv wird (Kostova Z., 2003). In einem zweiten Schritt wird das hc/ $\beta$ 2 Heterodimer durch Bindung an einen *Peptide loading complex* (transporter associated with antigen processing (TAP), tapasin (TSN), calreticulin, Erp57) mit hochaffinen Peptiden beladen (Gundo D., 2001). Diese nun stabilen Heterotrimere gelangen über den Golgiapparat an die Zelloberfläche.

Mear et al. beschrieben erstmals eine erhöhte Rate an *misfolded* HLA-B27 hc (*heavy chain*) trotz vorhandenen *chaperons* und TAP, also unter physiologischen Bedingungen, und deren Abbau durch das ERAD (Mear J.P., 1999). Durch vergleichende Untersuchung zwischen einem synthetisierten HLA-B27.A2B, welches sich durch B2705 lediglich innerhalb der B

Tasche der  $\alpha 2$  Domäne strukturell und funktionell unterscheidet, und HLA-B2705 konnten sie dieses Phänomen erwähnter B-Tasche zuschreiben. Als ursächlich wurde die Kombination der B-Taschen Residuen Glu45/Cys67/Lys70, welche die Ausbildung von Disulfidbrücken begünstigt und so zu einer Retention im ER führen könnte, postuliert. Die Kombination dieser Residuen ist dem HLA-B27 einzigartig (Smith J.A., 2006).

Des Weiteren wurden für HLA-B27 ungewöhnliche Expressionsformen, wie leere hc/ $\beta 2$  Heterodimere, hc/hc Homodimere und hc Homomere, an der Zelloberfläche in vitro und Tiermodellen beschrieben (Boyle L.H., 2004). Kollenberger et al. konnten das Vorkommen von HLA Homodimeren und eine KIR Rezeptorinteraktion (siehe I.2.2) bei SpA Patienten und gesunden Kontrollen nachweisen (Kollenberger S., 2002).

.Mear eröffnete hier eine neue Hypothese zur HLA-B27 Krankheitsassoziation. Durch seine Anfälligkeit zum *misfolding* könnten vermehrt abnormale Formen von B27 auf der Zelloberfläche entstehen und so zu nichtklassischen T-Zell Interaktionen führen. Alternativ könnte eine UPR Aktivierung eine ER Stressantwort mit konsekutiver NF- $\kappa$ B Ausschüttung auslösen und so den gesuchten entzündlichen Prozess triggern. Schließlich könnte der vermehrte Abbau von HLA-B27 Molekülen zu häufigerer Präsentation durch andere HLA Klasse I Molekülen führen und somit immunogen wirken.

#### **I.4.4 Autoimmunität und die *arthritogenic peptide* Hypothese**

Die Frage, ob es sich bei den SpA um Autoimmunerkrankungen handelt, bleibt weiterhin umstritten. Die wohl suggestivste Hypothese zur Krankheitsassoziation erklärt das spezifische Peptidrepertoire von HLA-B27 als ursächlich und postuliert die klassische Präsentation von endogenen Peptiden gegenüber CD8 positiven T Lymphozyten mit konsekutiver CTL Effektorfunktion als krankheitsauslösend.

Für die ReA und die AS gelang die Isolierung von HLA-B27 restringierten CTL mit Reaktivität gegen infizierte und nichtinfizierte Zellen (Herrmann E., 1993). Außerdem wiesen konkordant erkrankte Zwillinge eine erhöhte Oligoklonalität innerhalb des T-Zell Rezeptorrepertoires an CD4 und CD8 Lymphozyten im Vergleich zu diskordant erkrankten Zwillingen auf (Duchmann R., 2001).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Theorie im Widerspruch zu den tierexperimentellen Daten steht, wo CD8 T Lymphozyten keine wesentliche Rolle zu spielen scheinen. In der Literatur werden die Einzelbeschreibungen reaktiver CTL gegen Peptide

triggernder Bakterien oder kreuzreaktiver CTL als nicht ausreichend evident bezüglich ihrer Ursächlichkeit eingestuft (Smith J.A., 2006).

### **I.5 Etablierte genomische Typisierungs- und Nachweistechiken**

Wie oben beschrieben eignen sich die serologischen Nachweistechiken nur zur Bestimmung eines HLA Isotypen. Zur exakten Typisierung und Beobachtung des HLA Lokus werden heute sogenannte genomische Nachweisverfahren angewandt, die eine direkte Typisierung aufgrund von Basensequenzen der DNA anstreben.

Bei der *Sequence Specific Oligonucleotide Probe Hybridization* (SSOPH) wird mittels Primern, die möglichst unspezifisch an den flankierenden Regionen binden, in einer PCR beide Allele des unbekanntes Lokus amplifiziert und anschließend deren Bindungsmuster an allelspezifische Oligonukleotide (*dot-blot* Hybridisierung) interpretiert. Die *Sequence Specific Primer PCR* (SSP-PCR) benutzt sequenzspezifische Primerpaare, die an den hoch polymorphen Genorten binden und nur ihr zugehöriges Allel vervielfältigen, welches anschließend mittels Gelelektrophorese anhand seiner Größe identifiziert wird.

Schließlich steht nach unspezifischer Vervielfältigung mittels PCR die direkte Sequenzierung zur Verfügung, die allerdings immer ein Mischergebnis aus beiden heterozygoten Allelen ergeben wird (Williams T.M., 2001).

### **I.6 Kritische Überlegungen und Zielsetzung**

Neuere Erkenntnisse zur Pathogenese der SpA haben den Blick von den kanonischen MHC Klasse I Funktionen, hin zur ungewöhnlichen Proteinbiologie und alternativen regulatorischen Funktionen von HLA-B27 gelenkt. Für das MHC mit seiner hohen Gendichte und komplexen Funktion sind epigenetische Einflüsse, die sowohl zur Krankheitsassoziation, als auch zur veränderten Proteinbiologie beitragen denkbar. Somatische Mutationen des HLA-B27 auf DNA oder RNA Ebene würden zu einer Anhäufung fehlerhafter Proteine führen. Hierdurch könnte sowohl ein vermehrtes *misfolding*, als auch eine immunologische Reaktion gegen verändertes Selbstprotein unterhalten werden.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Zur Nomenklatur dieser Arbeit sei hier erwähnt, dass der Begriff Mutation aufgrund seiner geltenden Definition eigentlich nicht für mRNA Moleküle gebräuchlich ist. In der vorliegenden Arbeit werden mit dem



Gegen eine Beteiligung von Mutationen auf DNA Ebene spricht einerseits, dass maligne Transformationen für HLA-B27 assoziierte Erkrankungen nicht beschrieben sind. Sollten andererseits die Mutationen in Anlehnung an die T-Zell-Rezeptor-Reifung im Rahmen der physiologischen Funktion des MHC Klasse I auftreten, erscheint es wenig plausibel, dass dies ausschließlich für HLA-B27 und die mit ihm assoziierten Erkrankungen gelten sollte. Für Veränderungen auf der mRNA gelten diese Überlegungen jedoch nicht. Des Weiteren würden Mutationen auf intakter mRNA, im Gegensatz zur DNA in jedem Fall zur Translation fehlerhafter Proteine führen, wodurch sich direkt ein Hinweis auf die funktionelle Relevanz der gefundenen Mutation ergibt.

Für einen biochemischen Zugriff auf diese Mutationen ergeben sich einige Schwierigkeiten. Der unmittelbarste Zugang wäre eine Direktsequenzierung, der mittels PCR spezifisch amplifizierte HLA-B27 cDNA. Durch die Auswertung der Chromatogramme würden Mutationen als *Doppelpeaks* auffallen. Zum einen wären hierdurch nur dominante Mutationen die in ausreichender Häufigkeit auftreten erkennbar, da einzelne oder randomisiert auftretende Mutationen in der *gepoolten* Probe untergingen. Zum anderen wäre ein Rückgriff auf das einzelne mutierte Molekül nicht mehr möglich. Im unter *II.* beschriebenen Verfahren wurde dem begegnet indem ein Klonierungsschritt zur Vereinzelung der Stichproben eingeführt wurde. Um die Analytik nicht zu arbeitsextensiv zu gestalten wurden die Klone mittels einer SSCP-Gelanalyse auf Mutationen voruntersucht und anschließend nur bestimmte Klone zur genauen Bestimmung der Art der Mutation sequenziert.

Ziel der Arbeit ist es Mutationen auf der mRNA von HLA B27 in verschiedenen Geweben einer an SpA erkrankten Patientin zu erfassen und diese mit einer gesunden Kontrolle zu vergleichen, um zu prüfen ob derartige Veränderungen mit der SpA vergesellschaftet sind. Die unter *II.2.1* beschriebene Auswahl der Patientin, erfolgte gemäß der Annahme, dass der hypothetische Mechanismus der somatischen HLA-B27 Mutation zu einer mangelnden HLA Molekülexpression von intaktem HLA-B27 auf der Zelloberfläche führen würde.

---

Begriff der Mutation auch Basenveränderungen auf der mRNA unabhängig von ihrem Entstehungsmechanismus bezeichnet, welche durch den Translationsapparat als ein Basenaustausch erkannt werden und somit analog zu Mutationen auf der DNA zu veränderten Aminosäuresequenzen in translatierten Proteinen führen würden.

## II. Material und Methoden

### II.1 Das analytische Verfahren im Überblick

Das verwendete Verfahren extrahiert zunächst die gesamte RNA aus den *gepoolten* Zellen der jeweiligen Probe. In dem ersten Schritt der reversen Transkription (RT) wird jegliche intakte messenger RNA (mRNA) einmalig durch die Reverse Transkriptase in eine stabile copy DNA (cDNA) im Verhältnis 1:1 umgeschrieben. Von dieser cDNA wird eine bestimmte Menge in eine HLA B spezifische PCR eingesetzt, welche ausschließlich die ursprüngliche HLA B mRNA in 10 linearen und 35 exponentiellen Zyklen amplifiziert. Jeder ursprünglichen mRNA entsprechen nun ca.  $11 \times 2^{35}$  ( $3,7 \times 10^{11}$ ) HLA B PCR Produkte. Diese werden im Weiteren mittels Gellauf isoliert und durch die nachfolgende Klonierung und Transfektion in *E. coli* wieder vereinzelt. Danach entsprechen theoretisch einer ursprünglichen HLA B mRNA ca.  $3,7 \times 10^{11}$  *E. coli* Kolonien, da jede Kolonie ausschließlich ein HLA B PCR Produkt beinhaltet. Hierauf wird zur Herstellung des untersuchten Zielfragmentes noch eine *huckepack* PCR angewendet und sämtliches Produkt in einen *Slot* der SSCP Gelanalyse gespeist. Immer noch generiert hier eine ursprüngliche HLA B mRNA  $3,7 \times 10^{11}$  SSCP *Slots*. Umgekehrt entspricht 1 *Slot* einem HLA B PCR Produkt. Bei diesen Zahlen muss man sich vor Augen halten, dass das hypothetische Verhältnis zwischen veränderter zu normaler RNA ebenfalls amplifiziert wird und somit erhalten bleibt. In einem Nebenweg wurde auf sechs in der SSCP sich musterhaft darstellende Klone zurückgegriffen und nach einem Plasmid *Minipräp* direkt sequenziert. Für eine graphische Übersicht siehe *Abb.7.1 (Im Anhang)* Die einzelnen Schritte werden im Folgenden dargestellt.

## II.2 Probenmaterial

### II.2.1 Patientenauswahl durch Immunfluoreszenzfärbung

Aus einem Probenpool von HLA-B27 positiven Patienten wurden fünf, von denen sowohl eine PBMC Fraktion, sowie kryokonserviertes plus in erster Passage kultiviertes ex vivo Gelenkpunktat vorhanden war, ausgewählt.

Unter der Hypothese, dass Mutationen des HLA-B27 Transkriptes zu einer Verminderung der HLA-B27 Molekülexpression führen würden, sollte ein Patient gewählt werden welcher HLA Klasse I auf der Zelloberfläche exprimiert, bei dem HLA- B27 jedoch fehlt.

Die kultivierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend abtrypsiniert. Nach der ersten Resuspension im Medium wurden sie abzentrifugiert und in 1ml eiskaltem Medium erneut resuspendiert, anschließend mit einer Trypanblaufärbung auf Vitalität getestet und in einer Neubauerkammer nach der Formel:

$$N \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = N / \text{ml gezählt.}$$

Zur Immunfluoreszenzfärbung wurden vier Antikörper ausgewählt. Zur Mikroskopie wurden ca  $10^4$  Zellen in 400µl RPMI1640/10% FCS pro Kammer eines *Chamberslideobjektträgers* gefüllt. Nach Adhäsion der Zellen wurde der Überstand abpipettiert und mit 200µl einer 1:20 in RPMI1640/10% FCS verdünnten Antikörperlösung überschichtet und 30 Minuten bei 4° C inkubiert. Anschließend 2malig mit PBS gewaschen und zur Fixierung in PBS/10% Formaldehyd 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurde die Färbung mikroskopisch ausgewertet und ein Patient, der die gewünschte Konstellation aufwies, für die weiteren Untersuchungen ausgewählt (siehe *Tab. 2.1*).

#### *Immunfluoreszenzbindungsmuster der ausgewählten Patientin*

Bezeichnung	Bindungsspezifität	Bindungsmuster der Patientin
B 9.12.1	alle Klassen I, HLA A und B	schwach positiv
ME1	nur HLA-B27 und HLA-B7	alle Zellen negativ
PBM1	β 2 Mikroglobulin	schwach positiv

***Tabelle 2.1: Die Tabelle zeigt die Expression von MHC Klasse I auf der Zelloberfläche der Patientin, definiert über das Färbemuster der Monoklonalenantikörper. Demnach zeigt die Patientin einen Verlust von HLA-B27 bei vorhandener Expression von HLA-B39.***

### **II.2.2 Ursprung des untersuchten Probenmaterial**

Es wurden drei verschiedene Gewebe einer HLA-B27 positiven erkrankten Patientin zur Probe, sowie Nabelschnurblut eines HLA-B27 positiven gesunden weiblichen Neugeborenen „*SM neonatal*“ zur Kontrolle untersucht. Alle Proben wurden im Folgenden gleich behandelt. Die Patientin war mit einer akuten Oligoarthritis zur Untersuchung gekommen, die Diagnose blieb trotz weiterer Konsultation bei einer Oligoarthritis unklarer Genese, DD:  
 - Erstmanifestation einer seropositiven chronischen Polyarthritis

- HLA-B27 assoziierte Oligoarthritis
- Arthritis psoriatica

Alle Proben entstammen der ersten Konsultation, in deren Rahmen eine Kniegelenkspunktion, sowie eine Blutabnahme vorgenommen worden waren.

Als „*ex vivo*“ Material diente das frisch in einer Glyzerolgefrierlösung bei  $-80\text{ C}$  verwahrte Gelenkspunktat. Des Weiteren wurde selbiges in erster Passage kultiviertes Gelenkspunktat als „*Kultur*“, sowie eine PBMC Fraktion der Patientin als „*Blut*“ verwertet.

## **II.3 Nukleinsäuren Extraktion**

### **II.3.1 Simultanextraktion DNA/RNA mittels des *RNeasy QIAGEN Kit***

Alle vier Ausgangsproben wurden der gleichen DNA/RNA Extraktion mit Hilfe eines kommerziellen *qiagen Kits* unterzogen. Bei allen weiteren Arbeitsschritten wurden die allgemeinen Kautelen im Umgang mit RNA wie rnasefreie Arbeitsgeräte, das Tragen von Handschuhen, Pipettenspitzen mit Filter, Arbeiten auf Eis und zügiges Vorgehen beachtet und finden sich nicht einzeln erwähnt.

Die parallele DNA/RNA Extraktion wurde gemäß dem Quiagen Protokolls durchgeführt. Nach Empfehlung des Herstellers wurden von jeder Probe  $10^6$  Zellen unter der Schätzung:  $1 \times 10^6$  Zellen  $\approx$  10 - 100  $\mu\text{g}$  RNA beschickt.

Das *Kit* arbeitet mit einer Elutionssäule und führt zur DNA/RNA Bindung durch ein Ionenaustauscherharz. Die selektive Bindung von RNA und DNA erfolgt über positive Ladungen des Harzes und negative Ladungen des Phosphatrückgrats der Nukleinsäuren unter spezifischen ph-Wert und Salzkonzentrationen des Puffers. Es folgen die Arbeitsschritte der Zelllysis, Homogenisierung, Ausfällung der Proteine und deren Abzentrifugation, Ausfällung der Nukleinsäuren aus dem Überstand in Isopropanol und Abzentrifugation selbiger. Lösen der so gewonnen Nukleinsäuren und Zugabe des Bindungspuffers für die RNA Bindung. Beschicken der Harzsäule und waschen der gebundenen RNA. Elution der RNA und prompte Ausfällung in  $0^\circ\text{ C}$  Isopropanol zur Konservierung. Erneute Beschickung der Säule mit dem Auffang aus dem ersten Durchgang, Waschen und Elution der DNA im Vorgesehen Puffer, Präzipitieren in Isopropanol, waschen mit 70% Etoh. Nach Lufttrocknung des Sediments lösen in TE und konservieren bei  $-20^\circ\text{C}$ .

### **II.3.2 Photometrie**

Die RNA Proben werden in DEPC Wasser verdünnt, DNA Proben in TE und bei 260 und 280 nm im Photometer zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung untersucht.

#### **II.4 Reverse Transkription mittels *OIAGEN Omniscrypt***

Ziel dieses Arbeitsschrittes ist die nun extrahierten mRNAs einer HLA-B spezifischen Vervielfältigung mittels PCR zugänglich zu machen. Hierzu wird die extrahierte RNA mit Hilfe einer RNA abhängigen DNA Polymerase, der Reversen Transkriptase, in äquimolaren Mengen in die sogenannte c-DNA umgeschrieben. Die unten aufgeführten Arbeitsschritte werden anhand der Produktausbeute aus dem folgenden PCR Schritt evaluiert. Ein extra Denaturierungsschritt wird eingeführt und die Reversetranskription bei vergleichsweise hoher Temperatur durchgeführt (*Tab.2.2*). Nach Angaben des Herstellers arbeitet das *Kit* mit einer in *E. coli* exprimierten rekombinanten Reversen Transkriptase mit einer RNA abhängigen DNA Polymerasenaktivität. Ebenso weist diese eine Aktivität als DNA abhängige DNA Polymerase und als Ribonuklease im Sinne einer RNase auf.

Als *Primer* wurde ein unspezifischer *Oligo dT Primer* verwendet. Er bindet an den Poly Adenosin Schwanz, der jeder intakten mRNA eigen ist, und gewährleistet so, dass unter der gesamten isolierten RNA nur intakte mRNA der weiteren Analytik zugeführt wird. Unten bezeichnete Reaktion findet in 20µl Endvolumen statt, das Produkt wird auf 50µl 1mM EDTA/DEPC aufgefüllt und aliquotiert.

***Tabelle 2.2 und 2.3 Protokoll der Reversen Transkription***

Produkt	Endkonzentration
RT Puffer	1x
dNTPs	5mM each
Oligo-dT	10µM
RNase Inhibitor	20Units
Reverse Transcriptase	4 Units
RNA	ca. 400ng

***Tabelle 2.2***

Schritt	Zeit/Min	Temperatur/°C
Denaturieren	2	60
Reverse Transkription	60	42
Konservieren	∞	4

*Tabelle 2.3: Die Reverse Transkription verwendet einen Poly- T Primer (Oligo-dT) welcher an den Poly Adenosinschwanz jeder reifen mRNA bindet. Bei nur einem Zyklus wird somit jede mRNA in die chemisch stabilere cDNA umgeschrieben. Dieser cDNA Pool ist der Ausgangspunkt für die weitere Analytik*

## **II.5. HLA B spezifische RT-PCR**

### **II.5.1 Allgemeine Überlegungen zur PCR**

Ziel dieses Schrittes ist es, ausgehend von der geeigneten Vorlage, spezifisch beide HLA-B Allele auf eine der Analytik zugängliche Menge zu vervielfältigen. Die PCR arbeitet nach Aufschmelzung der DNA Matrix in Einzelstränge (Denaturierung) mit der Bindung, von den zu der flankierenden Regionen der Zielsequenz komplementären Oligonukleotidprimern (Annealing) und anschließenden Verlängerung (Extension) dieser durch hitzebeständige DNA abhängige DNA Polymerasen. Dank der Hitzebeständigkeit der Polymerase lassen sich diese Schritte zyklisch wiederholen und führen so nach n Zyklen zu einer exponentiellen ( $2^n$ ) Vermehrung der Zielmatrix.

Die PCR wird an einem gesonderten Arbeitsplatz mit gesonderten Arbeitsgeräten und unter Verwendung von Einwegmaterial durchgeführt. Etliche Voruntersuchungen fließen in das unten beschriebene Verfahren ein, Negativkontrollen wurden bei jedem Ansatz mitgeführt. Verunreinigungen durch das Extraktionsprozedere, etwa durch das Zellysedetergens, sollten nach der Isopropanolfällung ausgewaschen worden sein. Die Wahl des Enzyms, die Temperatur einzelner Schritte und ihre Dauer, sowie die Zugabe und Konzentration einzelner *enhancer* werden durch Experimentreihen empirisch bestimmt.

Als Primer werden HLA-5UT und HLA-3UT (Curran M.D., 1996) in leichter Veränderung, wie unten (Tab. 2.3) gezeigt, verwendet. Diese werden über Primerprogramme, Datenbanken und schließlich im Experiment evaluiert. Sie generieren ein ca. 1,3kb langes, das gesamte HLA B Transkript darstellende Fragment.

Es wurde mit dem TGradient Thermoblock der Firma Biometra, sowie mit dem GeneAmp 2400 der Firma Perkin Elmer gearbeitet.

**Primer der HLA B spezifischen PCR**

Name	Sequenz 5`- 3`	Tm nearest neighbor °C	Tm nach Wallace °C
HLA-B-5`CAP	CGG ACTCAG AAT CTC CTC AGA CG	64,77	72,00
HLA-B-3`UT	GAA ACA CAG GTC AGC ATG GGA AC	65,13	70,00
HLA-B-5`CAP 2	TCA GAA TCT CCT CAG ACG CCG AG	67	64,2

**Tabelle 2.4** Im Buchstabenkode ist hier die Basenfolge der Oligonukleotidprimer notiert. Tm bezeichnet die Temperatur bei welcher der Primer mit seiner komplementären Zielsequenz zu 50% eine Basenpaarung eingegangen ist. Diese Eigenschaft des Oligonukleotids ergibt sich aus seiner Basenzusammensetzung. Je kälter die Reaktionstemperatur, um so unspezifischer bindet der Primer, je wärmer um so eher bindet der Primer ausschließlich an komplementäre Basen. Zur Verwendung des eingenisteten Primers HLA-B-5`CAP 2 siehe II.5.2

### II.5.2 Verwendetes Verfahren

Das optimierte und schließlich verwendete Verfahren könnte man als eine *seminested touch up PCR* bezeichnen. In einem ersten Zyklus unter alleiniger Verwendung des HLA-B5`CAP Primers wird bei relativ kalter Temperatur und langer Extensionszeit, also bei unspezifischen Bedingungen, die lineare Vermehrung der durch GC Reichtum und komplexer Tertiärstruktur schwierigen Zielsequenz erreicht. In einem zweiten Schritt werden nun die Primer HLA-B5`CAP 2 und HLA-B3`UT zugegeben. Die 5`Primer überlappen teilweise (*nested*) und durch die höhere Temperatur (*touch up*), sowie kürzere Zeiten, wird jetzt unter spezifischeren Bedingungen exponentiell vervielfältigt, siehe Tab 2.5 und 2.6. Es werden ca. 0,066pg Ziel cDNA eingesetzt.

**Tabelle 2.5 und 2.6** Protokoll der HLA B spezifischen PCR

Produkt	Konzentration Teil1	Konzentration Teil2
PCR Puffer	1	1
MgCl	1,5mM	1,5mM
dNTPs je	0,2mM	0,2mM
HLA-B-5`CAP	1ng/µl	0,5ng/µl
HLA-B-5`CAP 2	-	5ng/µl
HLA-B-3`UT	-	5ng/µl
Red-Taq	0,25 U/µl	0,75 U/µl

**Tabelle 2.5**

	Temp in °C	Zeit in `Min/`` Sekunden	Zyklus
Denaturieren	96	2	
Denaturieren	96	1`	→ x 10
Annealing	50	1`	
Extension	72	3`	←
Pause	4	5`	
Denaturieren	96	30``	→ x 35
Annealing	62	30``	
Extension	72	3`	←
Pause	4	∞	

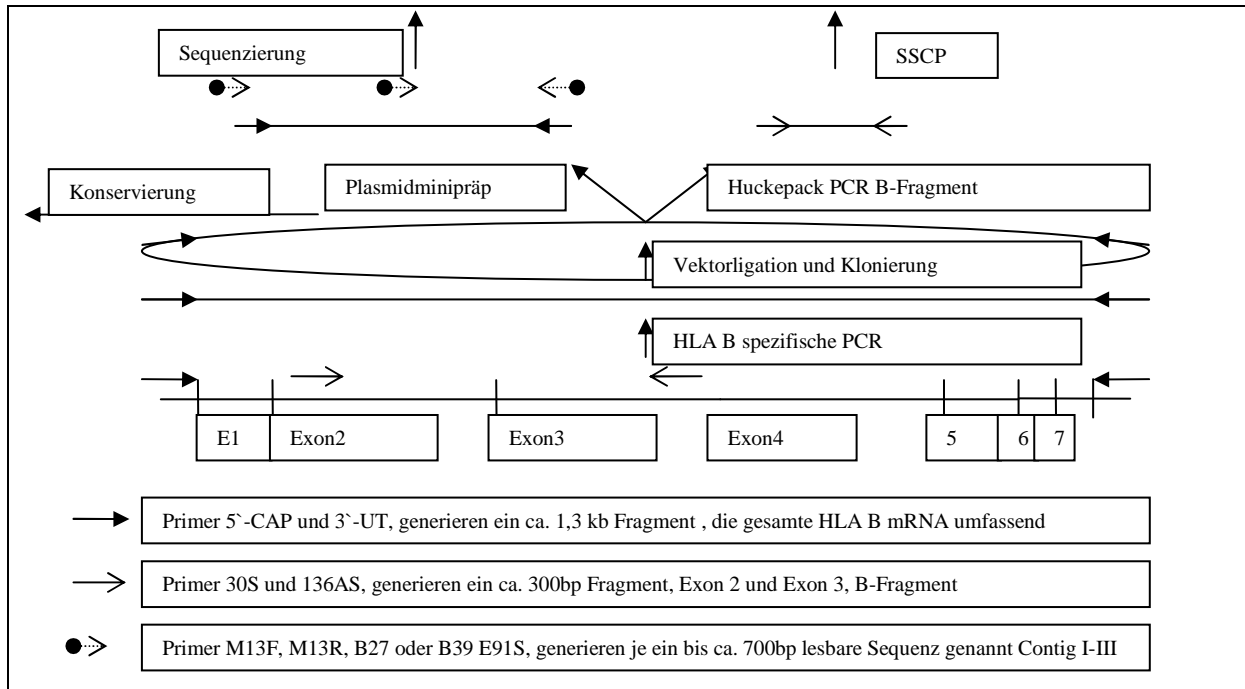
*Tabelle 2.6 : Die Tabellen 2.4-6 beschreiben das verwendete seminested touch up PCR Verfahren. Mit ihm gelingt die Vervielfältigung des gesamten 1.3 kb Konstrukts welches die gesamte mRNA von HLA-B umspannt. Das gesamte Konstrukt wird in den Vektor ligiert, in Bakterien kloniert und über das Ausplattieren selbiger wieder vereinzelt. Die vereinzelt und händisch gepickten Kolonien werden in Glycerollösung tiefgefroren und bilden den Ausgangspunkt und die Rückgriffmöglichkeit für die weitere Analyse mittels der SSCP Gelanalyse und der Direktsequenzierung*

## **II.6 Fragmentanalyse und Aufreinigung**

Einleitend folgt hier eine grobe schematische Darstellung des Vorgehens unter Berücksichtigung der wesentlichen Scheidewege, um im Weiteren einen guten Überblick zu gewährleisten. *Abb. 2.1*



### Der Weg der Moleküle innerhalb der Analytik



**Abbildung 2.1:** In der untersten Zeile über der Primerlegende ist die mRNA von HLA B mit Ihren einzelnen Exonen gemeinsam mit den beiden wichtigen Primerpaaren schematisch dargestellt. Auf die HLA B spezifische PCR folgt die Ligatur des gesamten Konstruktes in einen Vektor mit anschließender Transformation in kompetente Bakterien. Nach deren Vereinzlung und Gewinnung wird zur Konservierung eine Gefrierlösung angelegt. Von hieraus wird zum einen die SSCP Gelanalyse des kleineren B-Fragmentes (Exon 2 und 3), als auch die Direktsequenzierung der relevanten Proben unternommen.

## II.6.1 Agarose Gel Elektrophorese

Für alle Agarose Gele wird *Qualex Gold Agarose* der Firma Hybaid, sowie zur Färbung das Produkt *Gelstar* der Firma Biozyme verwendet. Zur Produktlängen- und groben Mengenbestimmung wird die *1kb plus DNA ladder* von Gibco BRL aufgetragen. Die Agarose wird in 1x Puffer geschmolzen, nach Abkühlung mit dem Farbstoff versehen und in *trays* gegossen. Die Beladung erfolgt stets unter Puffer, gefahren wird bei 4°C je nach Fragmentgröße zwischen 50- 140 V.

### II.6.1.1 Analytische Agarose Gele

Für die mannigfaltigen analytische Elektrophoresen wird ein 0,5 x TBE ( Tris, Borat, EDTA) verwendet. Für das 1,3 kb Fragment wird z.B. ein 1,2 % Gel verwendet. Die Sichtbarmachung und Dokumentation erfolgt an einem 300nm Transilluminator.

### **II.6.1.2 Präparative Agarose Gele**

Zur Gewinnung und Aufreinigung des 1.3 kb Fragmentes zur anschließenden Klonierung werden die Proben in einem 1x TAE ( Tris- Acetat, EDTA) 1,2% Agarose bei 100V gefahren und unter kurzer Darstellung an einem 400-500nm Transilluminator mittels Skalpell ausgeschnitten. Durch diesen Schritt werden Nebenprodukte der PCR, sowie andere für die Klonierung störende PCR Ingredienzien eliminiert.

### **II.6.2 Elution des Fragmentes mittels *BIO 101 Genclean II Kit***

Das *BIO 101 Genclean II Kit* arbeitet durch die Bindung von Nukleinsäuren an einer Glasmilch unter Hochsalzpuffer Bedingungen. Die Banden werden ausgeschnitten und gewogen. Zugabe des dreimaligen Volumens an Natriumjodid und Erhitzen auf 55°C führt zum Schmelzen der Agarose. Zugabe von 1µl Glasmilchsuspension bei 4°C und Vortexen führt zur Bindung der Nukleinsäuren. Abzentrifugieren der Glasmilch und Verwerfen des Überstandes. Dreimaliges waschen mit einem ethanolhaltigen Puffer und anschließendes Eluieren in einem Niedrigsalzpuffer, 20µl Oligo-TE ( 10mM Tris, 0,1mM EDTA, ph 8). Anschließend werden je 5µl zur Mengenschätzung in ein 2% 0,5 TBE Gel nach 1 Stunde bei 120V beschickt.

### **II.7. Vektorklonierung und Vereinzelung der Fragmente**

Durch diesen Schritt soll das *gepoolte* Produkt durch die Ligation in einen Vektor und anschließende Transfektion in *E. coli* wieder vereinzelt werden. Ein Fragment wird hierzu in einen Vektor ligiert und damit ein Bakterium transformiert. Nach dem Ausplattieren entspricht somit eine Kolonie wieder einem Bakterium und somit einem Fragment.

Die Klonierungsstrategie arbeitet mit einem linearen Vektor der nur durch den Einschluss des Fragmentes zirkulär wird. Dieser Vektor trägt Resistenzgene für Ampicillin und Kanamycin wodurch nach dem Ausplattieren der Bakterien auf einem ampicillinhaltigen Medium das Vorhandensein des zirkularisierten Vektors im Bakterium Bedingung wird. Somit entspricht jede gewachsene Bakterienkolonie einem erfolgreich transformierten Bakterium. Als Kontrollen werden jeweils nur Vektor ohne Fragment für die Ligationreaktion und pUC 18 Plasmid transfizierte, als auch nichttransfizierte *E. coli* zur Kontrolle der Transformationseffizienz, sowie der Abwesenheit einer Resistenzkontamination mitgeführt.

### II.7.1 Der Vektor pCR 2.1- TOPO (invitrogen) und Ligation

Der Plasmidvektor wird in linearisierter und aktivierter Form geliefert. Dies bedeutet das Vorhandensein eines Thymidin Restes am 3`Ende sowie einer kovalentgebundenen Topoisomerase I. Das hier verwendete *Taq*-Polymerase PCR Produkt verfügt über einen Adenosin Überhang an seinem 3`Ende. Unter Freigabe der Topoisomerase katalysiert diese die Ligation des PCR Produktes in den Vektor. Es werden ca. 10ng Fragment pro Ligation eingesetzt (Tab. 2.7).

#### *Ligationsreaktion*

Produkt	Endkonzentration
PCR Puffer	1fach
Saltsolution NaCl/MgCl <sub>2</sub>	200mM/10mM
Topo Vektor	5 ng
Eluat	ca 10 ng

*Tabelle 2.7 : Hier ist die Konzentration der einzelnen Reagenzien für die Ligationsreaktion wiedergegeben. Durch die chemische Vorbehandlung des Vektors wird eine Verbindung (Ligation) mit sich selbst verhindert. Da die Taq-Polymerase den PCR Produkten einen Poly-Adenosin Ende anhängt ligiert der Vektor nur mit einem PCR Produkt.*

Auf Eis pipettieren, gut vermischen, 5 Min auf Eis, 30 Min Raumtemperatur.

### II.7.2 Transformation in kompetente E coli TOP10F` (invitrogen)

Der verwendete Zelltyp wird durch chemische Vorbehandlung *kompetent* gemacht. In diesem Zustand sind die Bakterien erheblich traktiert, tragen Löcher in ihren Membranen und sind bei -80°C konserviert. Nach Bindung des Vektors erlauben die Bakterien nach dem Hitzeschock die Aufnahme des fremden Genmaterials. Antauen der Bakteriensuspension aus -80°C. Sofort nach dem Flüssigwerden Zugabe der Ligationsreaktion und Mischen durch auf und ab pipettieren. 10 Minuten Inkubation auf Eis, dann für 30 Sekunden zum Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad. Anschließend Zugabe von 250µl SOC Medium und im Schüttler für 1 Stunde bei 37°C zum Heilen.

## **II.7.3 Ausbringen, Picken und Bebrütung der transformierten E.coli**

### **II.7.3.1 Herstellung der Nährmedien**

Es werden zwei verschiedene Zustände des Mediums benötigt:

- 47% TB, Ampicillin 100 µg/ml Flüssigmedium
- 47% TB, Ampicillin 100 µg/ml, 25% Agar Festmedium in Platten.

Verwendet wird *terrific broth* (Gibco BRL 22711-014) als Nährlösung und Aqua ad. inj., sowie Selektagar für das Festmedium. Es wird eine 47% TB Lösung hergestellt (+- Agar 25%) und anschließend für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert und nach dem Abkühlen mit Ampicillin versetzt. Die Platten werden noch im warmen Zustand gegossen und einige Stunden im Brutkasten bei 37°C getrocknet. Ein Teil der TB/Amp Lösung wird unter sterilen Bedingungen ad 100µl auf eine Mikrotiterplatte ausgebracht versiegelt und bei -80°C verwahrt.

### **II.7.3.2 Bakterienkultur**

Die Kolonien werden dann manuell durch Ansaugen an eine 100µl Filterspitze gewonnen, durch einen Kolbenhub auf einer vorgelegten mit Oligo-TE befüllten Mikrotiterplatte gelöst und durch Überführen derselben Pipettenspitze in die vorgelegte TB/Amp Flüssigplatte weitergeimpft. Letztere Flüssigplatten werden für 6h bei 37°C geschüttelt, mit 100µl TB/Amp 50% Glycerol aufgefüllt, versiegelt und bei -80°C verwahrt. Die Oligo-TE Suspensionsplatten werden bei -20°C verwahrt. Es werden so viele Kolonien wie vorhanden, mindestens jedoch 96 gepickt.

## **II.8 PCR zur Herstellung des Zielfragmentes (B-Fragment), die *huckepack* PCR**

Ziel dieser letzten PCR ist es, ausgehend von dem vereinzelt 1,3 kb Fragment welches die gesamte mRNA des HLA-B Proteins umfasst, ein durch die SSCP Methode untersuchbares Fragment in ausreichender Menge herzustellen. Unter Verwendung des unten genannten Primerpaares entsteht ein ca. 300bp langes, die Exone 2 und 3 umspannendes, und somit die  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  Peptidomäne repräsentierendes Fragment (B-Fragment).

Auch für diese PCR gelten die unter *II.5.1* genannten Erwägungen. Erwähnenswert bleibt hier die Notwendigkeit einer relativ hohen Zykluszahl, trotzdem man von einem hochkonzentrierten *Zieltemplate* in den Bakterien ausgehen muss. Ursächlich hierfür ist am ehesten eine mangelhafte Freisetzung der DNA aus den Bakterien, da diese ja lediglich in TE suspendiert werden, sowie das mögliche Vorhandensein von PCR-Hemmstoffen aus dem Nährmedium.

***Primerpaar zur Herstellung des B-Fragmentes***

Name	Sequenz 5` - 3` S=C/G, W=A/T	Tm nearest neighbor °C	Tm nach Wallace °C
Ex2-30 S	GAC GAC ACS CWG TTC GTG A	60,7	60
Ex3-136AS	CGG CGG TCCA GGA GCT	55	54

***Tabelle 2.8 : Im Buchstabenkode sind die beiden Primer für das ca. 300bp messende die Exone 2 und 3 umfassende B-Fragment notiert. Um die Bindung an jedes HLA B Allel und somit an eine Konsensussequenz aller HLA-B Allele zu gewährleisten enthalten die Primer sogenannte Wobbelbasen, welche mit S und W abgekürzt sind.***

**Tabelle 2.9 und 2.10 Protokoll der „huckepack PCR“**

Produkt	Endkonzentration in 10µl
PCR Puffer	1
MgCl	1,8mM
dNTPs	je 0,4mM
Primer	je 4 ng/µl
Enhancer	1
Taq Polymerase	0,05 U

**Tabelle 2.9**

	Temperatur °C	Zeit `Min / ``Sek	Zyklus
Denaturieren	96	10 `	
Denaturieren	94	10 ``	→ x 30
Annealing	62	20 ``	
Extension	72	17 ``	←
Pause	4	∞	

**Tabelle 2.10 :** Die Tabellen 2.8-10 beschreiben das verwendete PCR Verfahren um ausgehend von den vereinzelt Bakterienklonen das für die SSCP Gelanalyse verwendete B-Fragment zu vervielfältigen. Dieses umfasst Exon 2 und 3, welche für die  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  Domänen des MHC Moleküls kodieren. Diese sind sowohl für die Peptidbindung, als auch für die Molekülfaltung wichtig und daher für eine genauere Untersuchung relevant.

Alle Picks werden dieser PCR unterzogen und je 4µl in einem 0,5 TBE 2% Gel bei 120V 1 Stunde gefahren und so auf Vorhandensein des Fragments getestet. Alle PCR positiven Koloniepicks werden gereiht und in die SSCP eingesetzt.

## **II.9 SSCP Gelanalyse**

Die *Single Strand Conformation Polymorphism* ist ein gelelektrophoretisches Verfahren zur Aufdeckung von Mutationen und wurde 1989 von Orita et al. (Orita M., 1989) eingeführt. Sie arbeitet mit einem nichtdenaturierenden Acrylamidgel welches mit denaturierter Einzelstrang DNA beschickt wird. Während des Gellaufes renaturieren die Einzelstränge mit sich selbst und formen so eine sequenzabhängige dreidimensionale Struktur welche das Laufverhalten bestimmt. Die Proben werden vor dem Auftrag mit Hitze und durch Komponenten des Laufpuffers denaturiert. In der Literatur liegt die Erkennungsrate für eine Punktmutation bei

ca 80%. Folgende Faktoren beeinflussen dabei die Sensitivität des Verfahrens (Nataraj A.J., 1999):

- Größe des DNA-Fragmentes (je größer desto weniger sensitiv)
- Vernetzungsgrad des Gels
- Puffereigenschaften wie pH und Ionenstärke
- Glycerol
- Geltemperatur
- DNA Konzentration
- GC-haltigkeit des zu untersuchenden Fragmentes

Das verwendete Fragment hat eine Länge von ca. 330 bp und GC Gehalt von ca. 67%. Art des Puffers, Glycerolgehalt des Gels, sowie der Vernetzungsgrad werden variiert und bezüglich der Unterscheidbarkeit der Banden, ihrer Reproduzierbarkeit, als auch der Handhabbarkeit der Gele evaluiert.

### **II.9.1 Gerät**

Verwendet wird ein umgebautes Gerät der Firma biorad. Umbauten waren bezüglich der Pufferzirkulation und der Kühlung notwendig, da mit hoher Spannung gearbeitet wird. Das Gerät fasst zwei 20x20cm Gele zwischen beschichteten Glasplatten. Diese sind zwischen zwei Pufferkammern gespannt. Eine Kühlröhre, welche an eine Kühlaggregat angeschlossen ist und ein zirkulierender Schwimmer sorgen für die Kühlung.

### **II.9.2 Gele**

Ein 1xTBE 10% PAA (37,5:1) 5% Glycerol, sowie ein 1xMTE 10% PAA (75:1) werden in die Auswertung mit einbezogen. Die erste Prozentzahl bezeichnet den Gesamtacrylamidgehalt am Gelvolumen, das Zahlenverhältnis in Klammern den Vernetzungsgrad; also das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid.

MTE (30mMTrizma, 35mM MES, 1mM Na-EDTA)

Die Komponenten ohne TEMED/APS werden vermischt, APS und TEMED hinzugefügt, ca. 1 Minute geschwenkt und in die Platten gegossen. Mindestens 2h bei 4°C polymerisieren lassen (*Tab 2.11*).

*Komponenten der SSCP Gele*

Komponenten	30ml End
40% PAA (75:1) oder (37.5:1)	7,5 ml
MTE 20x oder TBE 20X	1,5 ml
H <sub>2</sub> O	20,8 ml
TEMED	30 µl
APS 10%ig	200µl

*Tabelle 2.11 : Es wurden Gele mit verschiedenem Vernetzungsgrad und Mischverhältnissen, sowie zwei unterschiedliche Puffersysteme verwendet. Zur Erklärung siehe Text II.9.2*

**II.9.3 Laufpuffer und Probenauftrag, Laufbedingungen, Färbung***Autragspuffer der SSCP*

Komponenten	Laufpuffer 2x
Formamid	95%
Bromphenolblau	5%
Xylencyanol	5%
Trypanblau	0,02%
Na-EDTA	20mM
NaOH	10mM

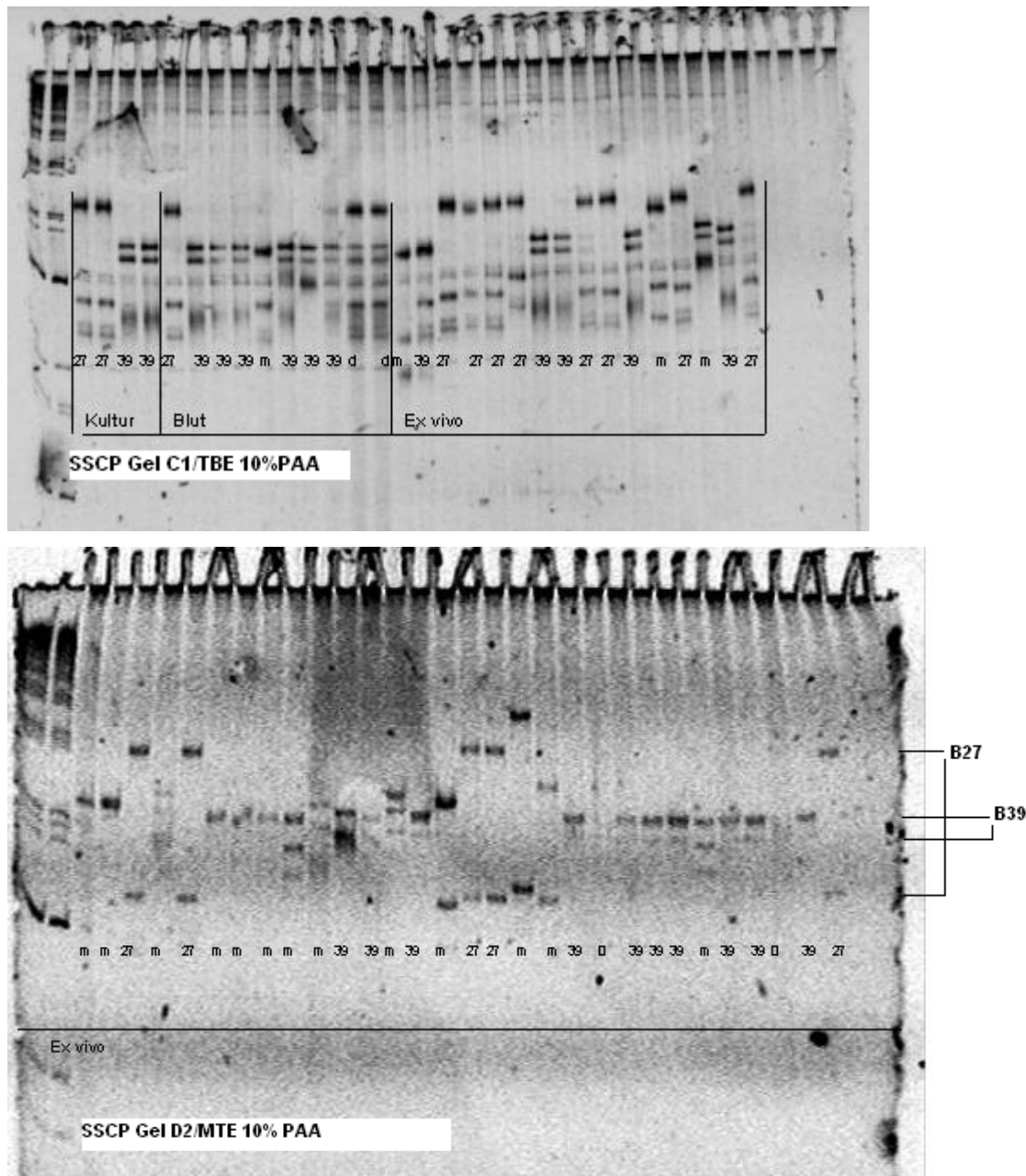
*Tabelle 2.12 : Die Zugabe der drei Farbstoffe Bromphenolblau, Xylencyanol und Trypanblau dienten zur optischen Überwachung des Gellaufs. Diese waren mit dem bloßen Auge am Gerät verfolgbar.*

2-5µl PCR Produkt plus Laufpuffer, 85 °C für 2 Minuten denaturieren, sofort auf Eis und zügig je 10µl auftragen. 4-8 Stunden bei 400-600 Volt und 18-30 °C laufen lassen und über die Farbstoffbanden Monitoren.

Anschließende Färbung des Gels in 2x Gelstar/MTE (TBE) für 20 Min in Dunkelheit und Dokumentation an einem 300nm UV-Transiluminator. Die Auswertung erfolgt wiederum unabhängig durch zwei erfahrene Untersucher, uneindeutige Laufspuren werden ausgeschlossen. Als Beispiel folgt die *Abbildung 2.1*.



*Beispiel für die Auswertung eines SSCP Gels*



*Abbildung 2.2: In den SSCP Gellauf wird das B-Fragment, ein ca. 300bp messendes, die Exone 1 und 2 des HLA B Alleles beinhaltend in denaturierter Form (nicht gefalteter Einzelstrang), geladen und für ca. 6 Stunden bei ca. 500 Volt Spannung gefahren. Während des Gellaufes renaturieren die Einzelstränge mit sich selbst und bilden so räumlich getrennte und basenspezifische Banden. Ein einzelner Basenaustausch genügt um dem renaturierten gefalteten Einzelstrang einen unterschiedlichen Bandenlauf zu bescheren. Die beiden ersten Laufspuren am linken Bildrand wurden mit einer DNA Leiter zur Orientierung beschickt. Nach rechts folgend laufen die einzelnen Fragmente, im oberen Gel aus allen drei Geweben im unteren Gel ausschließlich aus der Probe ex vivo stammend. Gemäß dem Wissen aus der direkten Sequenzierung ließen sich die Bandenmuster ihrem Allel zuordnen. HLA B-27 Fragmente zeigen eine weite Spange, während die HLA B-39 Fragmente als nahe Doppelbande laufen. Abweichendes Laufverhalten demaskiert das Vorhandensein einer Mutation. In einigen Fällen beinhaltet die Probe beide Allele durch akzidentielle Ligation beider in den*

*bakteriellen Vektor. Demgemäß wurden die einzelnen Spalten mit 27(Bande HLA-B27), 39(Bande HLA B39), m(Variante Bande/Mutation), d(Doppelklon) bezeichnet.*

## **II.10 Sequenzierung von musterhaften Klone**

Ziel der direkten Sequenzierung von beispielhaften Klonen ist zum einen die Kontrolle der inserierten Genfragmente, zum zweiten die Zuordnung der Banden zu dem jeweiligen HLA-B Allel, als auch die Bestätigung der über das SSCP Gel gefundenen Varianten.

Es werden 6 Proben einer Direktsequenzierung unterzogen, 2 Proben eines Wildtyp Bandenmusters, sowie 4 variante Bandmuster.

### **II.10.1 Plasmidminiprep mit dem *Plasmix Kit (Talent)***

Zu diesem Schritt wird auf die unter *II.7.3.2* beschriebene Gefrierlösungsplatten zurückgegriffen. 20µl werden nach dem Auftauen entnommen und die Bakterien hieraus abzentrifugiert und in 200ml TB/Amp resuspendiert und bei 37 °C für 16 Stunden bebrütet. Das *Miniprep Kit* arbeitet durch die Plasmidbindung an ein Siliziumharz. Nach der Zellysis und einer Fällungsreaktion wird dem Überstand dieses Harz hinzugefügt und nach Bindung an Selbiges in mehreren Schritten über einer Filtersäule unter Vakuumsog gewaschen. Die Filtersäule wird in eine Zentrifuge transferiert und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 100µl Oligo-TE 80°C vom Harz gelöst und durch Zentrifugation eluiert.

### **II.10.2 Doppelrestriktionsverdau des Plasmids**

Neben der Ausbeute soll hier die Integrität sowie Orientierung des inserierten Fragmentes getestet werden. Ausgewählt wird je ein Enzym das im Polylinker des Plasmids das Fragment herausschneidet (Bam HI), als auch eines, welches eine asymmetrische Schnittstelle im Fragment besitzt (Bgl II). Bgl II schneidet zudem im Vektor, sodass je 3 Fragmente distinkter Größe entstehen und die Orientierung festlegen.

**Restriktionsverdau der Plasmide**

Produkt	Endkonzentration	Erkennungssequenz
Plasmidprep	1 µl	
Puffer B	Tris-HCL 10mM, MgCl 5mM, NaCl 100mM, 2Mercaptoethanol 1mM	
Bgl II	2,5 U/µl	5`A↓GATCT3`
Bam HI	2,5 U/µl	5`G↓GATCC3`

**Tabelle 2.13 : Die Enzyme Bgl II und Bam HI zerschneiden das zirkuläre Plasmid welche das inserierte 1,3 kb HLA B cDNA des jeweiligen B Allels enthalten in 3 Fragmente. Die Länge der Fragmente zeigt in welcher Orientierung die HLA B cDNA in das Plasmid eingefügt wurde.**

1 Stunde bei 37 °C inkubieren

**II.11 Zyklisches Sequenzieren**

Das Prinzip des zyklischen Sequenzierens beruht auf der Zugabe von farbmarkierten Dideoxynukleotiden, welche im Gegensatz zu den ebenso vorhandenen Desoxynukleotiden zu einem Strangabbruch bei der DNA Synthese führen, also zu einer der PCR (siehe II.5.1) identischen Reaktion. Eine Besonderheit stellt eine genetisch veränderte *Taq*-Polymerase dar, die unter anderem Dideoxy- und Desoxynukleotide nicht mehr diskriminiert. Es entstehen so DNA Fragmente aufsteigender Länge, welche an ihrem Ende mit der Farbe ihres letzten Nukleotides gefärbt sind.

**II.11.1 Sequenzierreaktion**

Als Primer werden hier je nach Orientierung des Fragments die am Plasmid bindenden M13 Forward und M13 Reverse verwendet. Da diese Reaktion nur bis zu einer Länge von ca. 700bp akkurat läuft, wird zusätzlich noch, je nach Allel, ein interner Primer B39E91S bzw. B27E91S verwendet (Tabelle 2.14).

*Sequenzierprimer*

Name	Sequenz 5`- 3`	Tm nearest neighbor °C	Tm nach Wallace °C
M 13 Forward	GTA AAA CGA CGG CCA G	46	46
M 13 Reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC	43	45
B27 E91S	GGG TCT CAC ACC CTC CAG AAT	54	56
B39 E91S	GTC TCA CAC CCT CCA GAG G	52	55

**Tabelle 2.14 : Darstellung der Primer im Buchstabenkode. Die Primer M 13 binden am flankierendem Plasmid selbst. Die Primer E91S sind allelspezifisch und binden am Exon 3. Ihre Verwendung gewährleistet auch eine Sequenzierung von der ungefähren Mitte des 1,3kb Konstrukts und somit eine gute Lesbarkeit der Daten.**

*Protokoll der Sequenzierreaktion*

Produkt	Endkonzentration
Dye Terminator Mix	1
Primer	5ng/µl
Plasmid DNA	ca. 200-500ng

**Tabelle 2.15**

P.E.	Temperatur °C	Zeit `Min / ``Sek	Zyklus
Denaturieren	96	10`	
Denaturieren	96	30``	→ x 25
Annealing	50	15``	
Extension	60	3`	←
Pause	4	∞	

**Tabelle 2.16 : Die Tabellen 2.14-16 stellen das Rezept der Sequenzierreaktion dar. Das Verfahren arbeitet mit einer Mischung aus farbmarkierten Basen, welche nach dem Einbau durch die Polymerase zu einem Strangabbruch führen und normalen Basen für die Polymerisation des Nukleotidstrangs. So entstehen Fragmente jeder Länge der zu sequenzierenden Sequenz, welche durch die Farbe ihrer jeweils letzten Base diese erkennbar machen. Die automatische Auswertung erfolgt durch eine Trennung der Fragmente ihrer Länge nach und Detektion der jeweils letzten Base über ihre Farbe.**

Anschließend Fällung der Reaktion mit NaOAc/EtOH, waschen mit 70% EtOH, Überstand verwerfen, gemäß Protokoll.

## II.11.2 Gelelektrophorese und Auswertung

Die Elektrophorese wird in einem Labor der Firma Sequiserve an einem ABI Gerät durchgeführt, die Ergebnisse als Datei überbracht. Zur Auswertung wird eine teilweise als *freeware* angebotene Software mit dem Namen „*codoncode aligne*“ der Firma Codoncode Corporation verwendet. Die Auswertung wird durch zwei erfahrene Untersucher jeweils unabhängig voneinander vorgenommen, die Ergebnisse danach verglichen. Hierzu werden die zugehörigen Sequenzen zu einem *contig aligned*, anhand der Chromatogramme ab und bis zu einer ausreichenden Lesbarkeit geschnitten. Zum Contig I werden die jeweiligen Sequenzen in 5`-3` Leserichtung orientiert, als Startpunkt ergibt sich der Beginn des Exon 1. Contig III umfasst die Sequenzen der internen Primer und überlappt mit dem Block I mit ca. 48 bp und beginnt im Exon 3. Schließlich ist als Contig II der vom jeweiligen Gegenprimer aus sequenzierte Rest gefasst. Er beginnt in Exon 4 und reicht bis in den untranslatierten Bereich. Zur besseren Übersicht siehe die Abbildung 2.3.

### **HLA-B27 cDNA und B-Fragment**

	LOCUS	NM_005514	1533 bp	mRNA	linear	PRI 19	-JUL-2005				
1	Exon1	Contig I	atgctggtea	tggcgccocg	aaccgtctct	ctgctgctct	cgccggc cct ggccctgacc				
61			gagacotggg	ccg Exon2	gctccca ctccatgagg	tattttctaca	ctccctgtct cgggcccggc				
121			cgcggggagc	cccgcttcat	ctcagtgggc	tacg Primer 30S	tggagc acaccagtt cgtgaggttc				
181			gacagcagc	cccgagttcc	gagagaggag	ccgocggcgc	cgtggataga gcaggagggg				
241			ccggagtatt	gggaccggaa	ca cacagatc	tacaaggccc	aggcacagac tgaccgagag				
301			agcctgcgga	acctgcgcg	ctaactacaac	cagagcgagg	ccg Exon3 Pimer E91S	ggtctca caccctccag			
361			agcatgtacg	gctgcgacgt	ggggccggac	Cintig III	gggcgcctcc tccgcgggca	tgaccagtac			
421			gcctacgacg	gcaaggatta	catcgccctg	aac Beginn	Sequenz i nt	gaggacc tgc Primer 136AS	gctcctg gaccgcgcg		
481			gacacggcgg	ctcagatcac	ccagcgc Ende	Sequenz I	aag tgggagggcgg	ccctgagggc	ggagcagcgg		
541			agagcctacc	tggagggcga	gtgcgtggag	tggctccgca	gatacctgga	gaaccgggaag			
601			gacaagctgg	agcgcgct	Exon4 ga	cccccaaacg	acacacgtga	cccaccaccc	catctctgac		
661			catgaggcca	ccctgaggtg	ctgggcccctg	ggtttctacc	ctgocggagat	cacactgacc			
721			tggcagcggg	atggcgagga	ccaaactcag	gacaactgagc	Contig II	ttgtggagac	cagaccagca		
781			ggagatagaa	ccttccagaa	gtgggcagct	gtgggtgtgc	cttctggaga	agagcagaga			
901			tacaatgcc	atgtacagca	tgaggggctg	ccg aagcccc	tcacctgag	atggg Exon 5	agccc		
961			tcttccag	ccaccgtccc	catcgtgggc	attgtgtgtg	gcctggctgt	cctagcagtt			
1021			gtggtcatcg	gagctgtggt	cgct Ende	Sequenz int	gctgtg	atgtgtagga	ggaagagttc	Exon 6	aggtgaaaa
1081			ggagggagct	actctcaggg	tgcgt	Exon 7	gcagc	gacagtcccc	agggctctg	a	tgtctctctc
1141			acagctttaa	aag 3`UT	cctgaga	cagctgtctt	gtgagggact	gagatgcagg	atttctca		
1201			gcctcccctt	tgtgacttca	agagcctctg	gcactctctt	ctgcaaaagg	acctgaaatg			
1261			gtctgctcc	ctgttagcat	aatgtgagga	ggtggagaga	cagcccaccc	ttgtgtccac			
1321			tgtgacccc	Pimer 3`UT	t gttcccacgc	tgacc	tgtgt	tctctccca	gtcatcttct	ttgttccaga	
1381			gaggtggggc	tggatgtctc	catctctgtc	tcaactttac	gtgcactgag	ctgcaacttc			
1441			ttacttccct	actgaaaata	agaatctgaa	tataaatttg	ttttctcaaa	tatttgctat			
1501			gagaggttga	tggattaatt	aaataagtca	attcctggaa	tttgaagag	caaataaaga			
			cctgagaacc	ttccagaa	aa aaaaaaaaa	aaa					
B-Fragment			Primer 30S	tggagc	acaccagtt	cgtgaggttc			Exon2		
			gacagcagc	cccgagttcc	gagagaggag	ccgocggcgc	cgtggataga	gcaggagggg			
			ccggagtatt	gggaccggaa	cacacagatc	tacaaggccc	aggcacagac	tgaccgagag			
			agcctgcgga	acctgcgcg	ctaactacaac	cagagcgagg	ccg ggtctca	caccctccag	Exon3		
			agcatgtacg	gctgcgacgt	ggggccggac	gggcgcctcc	tccgcgggca	tgaccagtac			
			gcctacgacg	gcaaggatta	catcgccctg	aac Beginn	Sequenz int	gaggacctgc	gctcctggaccg	Primer 136AS	

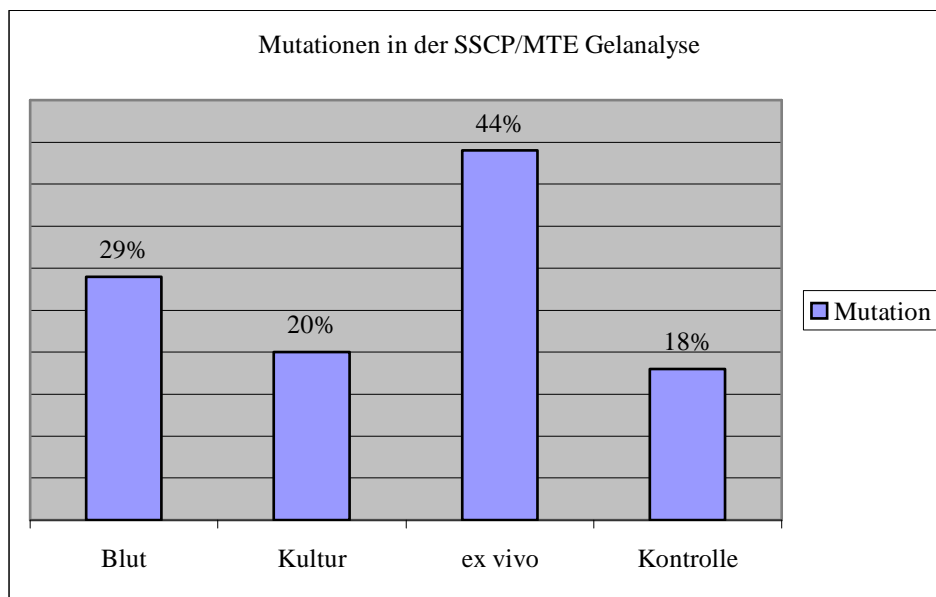
**Abbildung 2.3 : Gezeigt ist im Buchstabencode der einzelnen Basen die m-RNA bzw. c-DNA von HLA-B27 und im unteren Abschnitt nochmals das in der SSCP Analyse untersuchte B-Fragment. a für Adenin, t für Thymin, g für Guanin und c für Cytosin. Eingebettet in den Code sind der Beginn der Exone, der Startpunkt der Sequenzierreaktion (Contig I-III), sowie das Primerpaar 30S und 136AS welche das B-Fragment generieren.**

### III Ergebnisse

#### III.1 Häufigkeit von Mutationen in den unterschiedlichen Geweben

Für die relativen Häufigkeiten ergibt sich im *ex vivo* Material mit 44 % in MTE (20% in TBE) die deutlichste Tendenz zu vermehrten Mutationen verglichen mit der *Kontrolle* (*SM neonatal*) von 18% in MTE bzw. *Kultur* 20% in MTE (13% in TBE) und *Blut* 29% in MTE (5% in TBE). Die Rohdaten sind in *Tabelle 3.1*, ein Diagramm als *Abbildung 3.1* dargestellt. Als signifikant erhöht stellt sich somit die Anzahl der Mutationen im Gelenkspunktat *ex vivo* verglichen gegen die Probe *Kontrolle* (Fisher`s exact test  $p=0,0022$ ; Chisquare  $p=0,003$ ), sowie gegen die in erster Passage kultivierte Gelenkspunktat *Kultur* (Fisher`s exact test  $p=0,013$ ; Chisquare  $p=0,015$ ) dar.

**Abbildung 3.1 Häufigkeiten der Mutationen in den unterschiedlichen Proben**



**Abbildung 3.1 :Dargestellt ist die prozentuale Häufigkeit von Mutationen in den einzelnen Proben in der MTE gepufferten SSCP Analyse**

Der statistische Vergleich der anderen Proben erbringt bezüglich der Häufigkeit der Mutationen keinen signifikanten Unterschied und sie kann demnach als Hintergrundfehler des Verfahrens angesehen werden. Zusammenfassend weist das Verfahren bei der interkurrent erkrankten Patientin eine signifikant erhöhte Mutationsrate auf der intakten mRNA des entzündeten Gelenkes (Probe *ex vivo*) gegenüber der Kontrolle nach. Dieser Effekt lässt sich

im gleichen Material, wenn es in einer Passage kultiviert wurde (Probe *Kultur*), nicht mehr nachweisen. Eine ebenso erhöhte Mutationsrate zeigt sich in der parallel gewonnenen Blutprobe (Probe *Blut*), zwar statistisch nicht signifikant, so zumindest als Tendenz.

### Auswertung der SSCP Gele

Probe	Abbildung	Puffersystem und Gel	Auswertbare Banden	Anzahl B 27	Anzahl Bx	Anzahl Doppelklone	Anzahl Mutationen	Prozent der Mutationen
Kultur	sscpA1	1xTBE 10%PAA	8	3	4	1	1	12,50%
	sscpB1	1xTBE 10%PAA	9	3	5	1	1	11,00%
	sscpC1/c2	1xTBE 10%PAA	21	10	8	1	3	14,00%
	sscpF1/F2	1xMTE 10%PAA	44	11	24	3	9	22,00%
<b>Gesamt</b>			<b>82</b>	<b>27(33%)</b>	<b>41(50%)</b>		<b>14</b>	<b>17,00%</b>
<b>Gesamt TBE/MTE</b>			<b>38/44</b>	<b>16/11</b>	<b>17/24</b>	<b>3/3</b>	<b>5/9</b>	<b>13/20</b>
Blut	sscpA1	1xTBE 10%PAA	8	5	3	0	0	0,00%
	sscpB1	1xTBE 10%PAA	11	6	4	1	1	9,00%
	sscpC1	1xTBE 10%PAA	12	3	8	2	1	10%
	sscpE1/E2	1xMTE 10%PAA	45	10	22	0	13	29%
<b>Gesamt</b>			<b>76</b>	<b>24(31%)</b>	<b>37(49%)</b>		<b>15</b>	<b>20%</b>
<b>Gesamt TBE/MTE</b>			<b>31/45</b>	<b>14/10</b>	<b>15/22</b>	<b>3/0</b>	<b>2/13</b>	<b>6/29</b>
ex vivo	sscpA1/A2	1xTBE 10%PAA	12	5	4	0	2	16,60%
	sscpC1	1xTBE 10%PAA	16	8	5	0	3	19%
	sscpG1	1xTBE 10%PAA	8	2	4	0	2	25%
	sscpD1/D2	1xMTE 10%PAA	50	10	18	0	22	44%
<b>Gesamt</b>			<b>86</b>	<b>25(29%)</b>	<b>31(36%)</b>		<b>29</b>	<b>34%</b>
<b>Gesamt TBE/MTE</b>			<b>36/50</b>	<b>15/10</b>	<b>13/18</b>	<b>0/0</b>	<b>7/22</b>	<b>19/44</b>
Kontrolle	sscpH1	1xMTE 10%PAA	18	1	14	0	3	17%
	sscpI1/I2	1xMTE 10%PAA	50	11	30	0	9	18%
<b>Gesamt</b>			<b>68</b>	<b>12(18%)</b>	<b>44(64%)</b>		<b>12</b>	<b>18%</b>

**Tabelle 3.1:** Angegeben sind jeweils die Anzahl der technisch auswertbaren Banden, die Anzahl der B27-, Bx- und Doppelklonbanden, sowie die Anzahl der Mutationen. Gelb hinterlegt sind jeweils deren Gesamtsumme und die Summe unterschieden nach den Puffersystemen TBE und MTE. Es zeigt sich eine signifikant erhöhte Mutationsrate im frischem Gelenkspunktat verglichen gegen das, in einer Passage kultivierte, Gelenkspunktat und gegen die Kontrolle. Des weitern zeigt das MTE gepufferte System eine höhere Anzahl



*an Mutationen bei verhältnismäßig geringerer Ausbeute an normalem HLA-B27, möglicherweise aufgrund einer besseren Diskriminierung von normalem und mutiertem HLA-B27.*

### **III.2 Vergleich der Puffersysteme**

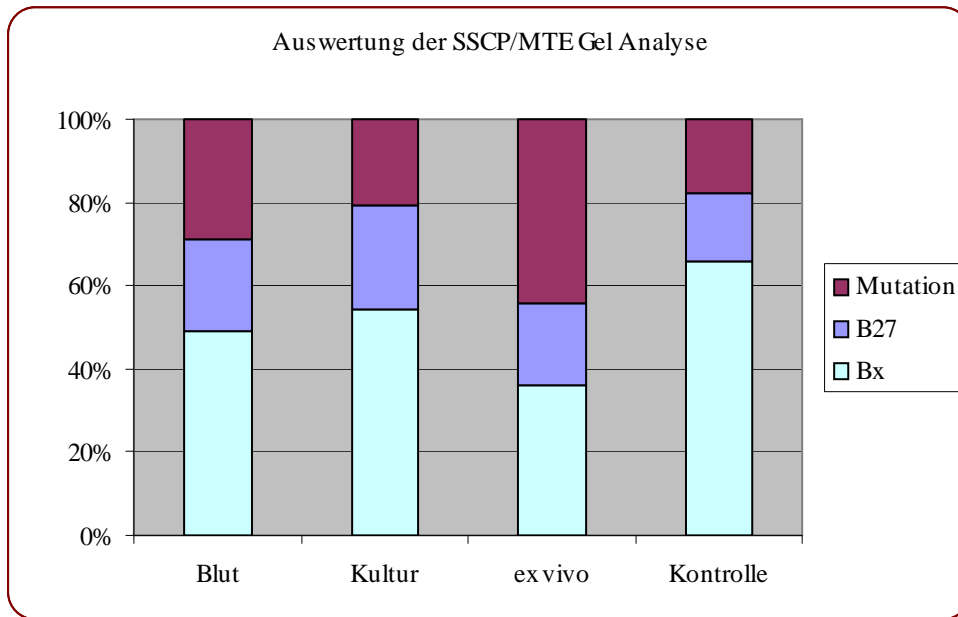
#### *Vergleich der SSCP Puffer TBE und MTE*

Puffersystem und Gel	Gewebe	Abbildung	Auswertbare Banden	Anzahl/% B 27	Anzahl/% Bx	Anzahl/% Mutationen
1xTBE 10%PAA	Kultur	A1/B1/C1/C2	38	16/42	17/45	5/13
1xTBE 10%PAA	Blut	A1/B1/C1	31	14/45	17/55	2/5
1xTBE 10%PAA	ex vivo	A1/A2/C1/G1	35	15/43	13/37	7/20
1xMTE 10%PAA	Kultur	F1/F2	44	11/25	24/55	9/20
1xMTE 10%PAA	Blut	E1/E2	45	10/22	22/49	13/29
1xMTE 10%PAA	ex vivo	D1/D2	50	10/20	18/36	22/44
1xMTE 10%PAA	Kontrolle	H1/I1/I2	68	12/18	44/64	12/18

***Tabelle 3.2 : Hier sind getrennt nach verwendetem Puffer (TBE oder MTE) die Ergebnisse der SSCP-Gelanalyse in absoluten Zahlen und Prozentanteilen wiedergegeben.***

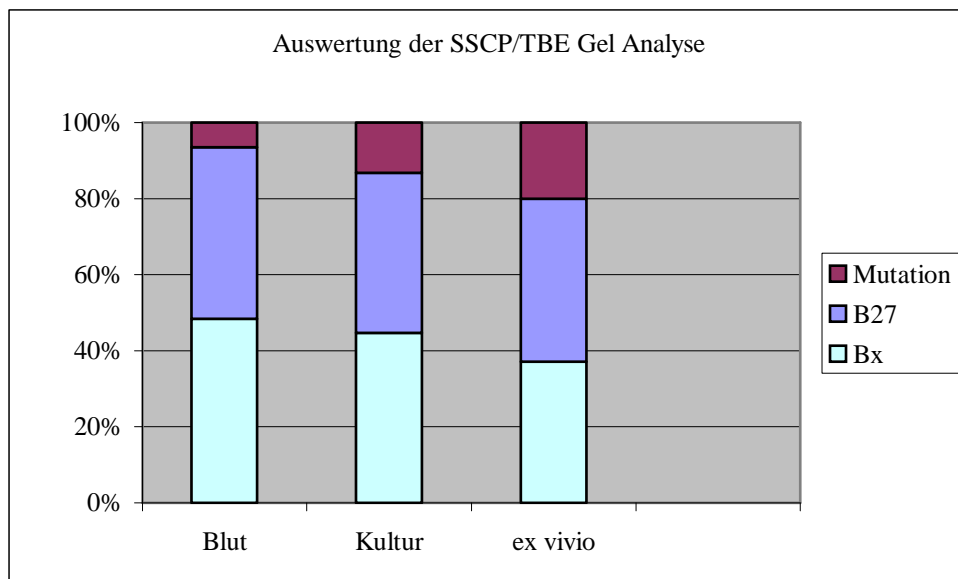
Wie aus der *Tabelle 3.2* zu ersehen ist, finden sich in den MTE gepufferten Systemen ein im Durchschnitt 2,9-fach erhöhter Nachweis von Mutationen innerhalb der untersuchten Gewebe, bezogen auf die Prozentzahlen. Während im TBE gepufferten System die Häufigkeit der Allele nahezu gleich ist, stellt sich unter MTE Pufferung das B27 Allel als ca. nur noch halb so häufig mit dem Ausreißer der Kontrolle, wo es um den Faktor 3,5 vermindert, dar. Siehe hierzu *Abbildungen 3.2 und 3.3* in welchen die Verteilung der jeweiligen Allele beziehungsweise der Mutationen für den TBE und den MTE Puffer getrennt dargestellt sind.

**Graphische Darstellung der Ergebnisse im MTE Gel**



**Abbildung 3.2**

**Graphische Darstellung der Ergebnisse im TBE Gel**



**Abbildung 3.3 :** Im Vergleich der beiden Diagramme zeigt sich deutlich die höhere Sensitivität der MTE Gele für Mutationen und die parallele Abnahme an normalem HLA-B27 bei unveränderter Häufigkeit des HLA Bx Alleles

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass das MTE gepufferte System gegenüber dem TBE eine fast dreifach erhöhte Sensitivität für Mutationen zeigt und zu einer Demaskierung einer um den Faktor zwei ungleichen Häufigkeit der Allele, zu Ungunsten von B27, natürlich nur auf semiquantitative Weise, führt. Möglicherweise beruht dies auf einer besseren Diskriminierung von normalem und mutiertem HLA-B27 im MTE. Daher wurde die

statistische Analyse lediglich auf die MTE basierten Ergebnisse gestützt, obwohl sie sich in Ihrer Tendenz auch in den TBE Daten wiederfinden. Des Weiteren besteht eine Korrelation zwischen dem für das *ex vivo* Material unter II.2.1 färberisch nachgewiesenen Fehlen von HLA-B27 Molekülen auf der Oberfläche der Zellen und dem, um den Faktor 2 verminderten B27 Nachweis im Gel. Für die relativen Häufigkeiten ergibt sich im *ex vivo* Material mit 44% in MTE (20% in TBE) die deutlichste Tendenz zu vermehrten Varianten, verglichen mit der *Kontrolle* von 18% in MTE bzw. *Kultur* 20% in MTE (13% in TBE) und *Blut* 29% in MTE (5% in TBE).

### **III.3. Ergebnisse der Sequenzanalyse**

Einleitend ist hier zu erwähnen, dass die untersuchten Proben ihrer Wahl nach der Evaluation der SSCP dienen und nicht einer stochastischen Stichprobe entsprechen. Ihre Ergebnisse sind demnach nicht bezüglich der Frage nach Art und Häufigkeit von Mutationen im Transkript interpretierbar.

Zum besseren Überblick folgt hier zunächst die Darstellung des HLA-B27 Transkriptes und herausgegriffen das im SSCP Gellauf untersuchte B-Fragment. In die Basenfolge sind die Primer des B-Fragmentes 30S-136AS, sowie der jeweilige Beginn der Sequenzanalyseblöcke mit Contig I-III eingeschrieben (*s.o. Abb. 2.2*).

Alle untersuchten Klone enthalten das komplette HLA B Transkript. Der Genotyp kann als HLA-B27 und HLA-B39 bestimmt und der jeweiligen Doppelbande im Gellauf zugeordnet werden. Alle als Varianten gelaufenen Klone enthalten eine oder mehrere Mutationen innerhalb des mittels des B-Fragments untersuchten Bereiches. Alle Klone tragen überdies weitere Mutationen auch außerhalb des vom B-Fragment erfassten Bereiches (*siehe Tab 3.3 und 3.4*).

*Sequenzanalyse der Klone*

<i>Klon</i>	<i>Typ</i>	<i>Lokalisation</i>	<u>Basen</u>	<i>Tripletts</i>	<i>Aminosäure</i>	<i>Folge</i>
C11	B27	Ex2 ( $\alpha$ 1), Contig I 273	T→C	TGC→CGC	$\alpha$ 1 91 Cys→Arg	neu→bas
		Ex4 ( $\alpha$ 3), Contig III 374	A→G	CAG→CGG	$\alpha$ 3 250 Gln→Arg	neu→bas
		Ex4 ( $\alpha$ 3), Contig III 512	A→G	AGA→GGA	$\alpha$ 3 297 Arg→Gly	bas→unp
		Bzw. , Contig II 133				
		Ex5 (ez), Contig II 161	T→C	GTC→GCC	ez 306 Val→Ala	unp→unp
D4	B27	Ex4 ( $\alpha$ 3), Contig III 379	A→G	ACT→GCT	$\alpha$ 3 252 Thr→Ala	neu→unp
		Ex5 (ez), Contig II 146	C→A	TCT→TAT	ez 301 Ser→Tyr	neu→neu
		Ex5 (UT), Contig II 177	T→A			
		Ex5 (UT), Contig II 213	C→A			
C10	B39	Ex3 ( $\alpha$ 2), Contig I 417	A→G	CAT→CGT	$\alpha$ 2 137 Tyr→Arg	neu→bas
		Bzw. , Contig III 20				
		Ex4( $\alpha$ 3), Contig III 251	A→G	CAT→CGT	$\alpha$ 3 212 His→Arg	bas→bas
C3-5	B39	Ex2 ( $\alpha$ 1), Contig I 289	A→G	CAG→CGG	$\alpha$ 1 96 Gln→Arg	neu→bas
		Ex3 ( $\alpha$ 2), Contig I 369	G→A	AGG→AAG	$\alpha$ 2 121 Arg→Lys	bas→bas
H10	B39	Ex2 ( $\alpha$ 1), Contig I 93	T→C	TAT→TAC	$\alpha$ 1 31 Tyr silent	neu
		Ex2 ( $\alpha$ 1), Contig I 230	A→G	ATA→ATG	$\alpha$ 1 76 Ile→Met	unp→unp
		Ex3 ( $\alpha$ 2), Contig III 198	C→T	TAT→TAC	$\alpha$ 2 195 Tyr silent	neu
		Ex4 ( $\alpha$ 3), Contig II 98	T→C	GTA→GCA	$\alpha$ 3 285 Val→Ala	unp→unp
B9-2	B39	Ex2 ( $\alpha$ 3), Contig III 146	G→A	AAG→AAA	A3 210 Lys silent	silent

**Tabelle 3.3 : Darstellung der gefundenen Mutationen auf den sechs sequenzierten Proben. Die erste Reihe gibt den Namen der Probe, die zweite Reihe die Art des Allels, die dritte den Ursprungsort anhand der Sequenzproben (Contig I-III), die vierte Reihe die Art der Mutation auf Basenebene, die fünfte Zeile die konsekutive Veränderung im Basentriplet, die sechste die konsekutive Änderung auf Ebene der Aminosäuren im Protein und die letzte Reihe ob dadurch eine Änderung der chemischen Eigenschaften im Molekül folgt.**

Insgesamt werden auf den 6 Sequenzen 17 Mutationen gefunden. Alle stellen Punktmutationen dar. Die Häufigste ist ein Wechsel von A→G (40%), danach T→C (24%), G→A und C→A (12%). Bis auf zwei stille Mutationen würden alle zu einem Aminosäureaustausch führen, meistens auch mit Änderung ihrer chemischen Eigenschaften. Die jeweiligen Auswirkungen auf die Tertiärstruktur des Moleküls würden den Ansatz dieser Arbeit sprengen und erscheinen überdies als beliebig, da keine mehrfachen, oder gar dominanten Mutationen gefunden wurden.

Bezüglich der Korrelation zwischen SSCP Gelanalyse und den Sequenzen ergibt sich in fünf Fällen eine Konkordanz der Befunde, in einem Fall trägt der Klon H10 eine Mutation, die sich im Gellauf nicht darstellt. Im Fall des Klon B9-2 zeigt die Sequenz, welche im Bereich

des B-Fragments ohne Abweichung ist, dass das entscheidende Kriterium für ein abweichendes Bandenmuster vor allem der Abstand der beiden Banden zueinander und nicht deren absolute Laufstrecke ist. *Tabelle 3.4* zeigt die für das B-Fragment und damit die SSCP Gelanalyse relevanten Mutationen im Einzelnen (vergleiche *hierzu auch Abbildung 2.2*).

*Sequenzierergebnisse bezogen auf den Gellauf bzw. das B-Fragment*

<i>Klon</i>	<i>Typ</i>	<i>Mutationen</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Bande</i>	<i>Bewertung</i>
C11	B27	Contig I 273	Variante	Variante	konkordant
D4	B27		Wildtyp	Wildtyp	konkordant , Kontrolle
C10	B39	Contig I 417 bzw Contig III 20	Variante	Variante	konkordant
C3-5	B39	Contig I 289 Contig I 369	Variante	Variante	konkordant
H10	B39	Contig I 230	Variante	Wildtyp	diskordant, eigentliche Kontrolle
B9-2	B39		Wildtyp	Wildtyp	konkordant

*Tabelle 3.4 : Die Tabelle stellt die Ergebnisse der SSCP-Analyse und der Sequenzierreaktion gegenüber. Als Klon werden hier die vereinzelt klonierten Bakterienkolonien, welche zum Rückgriff in Glycerollösung bei -80 Grad Celsius konserviert wurden, bezeichnet. Jeder Klon enthält nur ein HLA-B mRNA Konstrukt aus der PCR-Reaktion. Hiervon ausgehend wurde die huckepack PCR für das B-Fragment welches in die SSCP-Analyse eingespeist wurde angefertigt. Sequenziert wurden jeweils eine als Wildtyp gelaufene Probe der beiden Allele, die Kontrolle und drei als Mutation gewertete Proben. Stimmte das SSCP Ergebnis mit der Sequenzierreaktion überein wurde auf konkordant bewertet. In einem Fall (Klon H10) stellte sich eine in der Sequenzierreaktion gefundene Mutation in der SSCP-Analyse nicht dar. Hier wurde als diskordant bewertet. Der jeweilige Ort der Mutation in der Sequenz ist als Nummer der mutierten Base im Contig I-III angegeben. Zur Interpretation siehe Text.*

Zur besseren Übersicht folgt hier eine Darstellung aller gefundenen Mutationen für das HLA-B27 Molekül auf Aminosäureebene.

*Darstellung der Mutationen auf der Proteinebene*

	<u>Swiss-Prot: 1B27 HUMAN (P03989)</u>		<u>14</u>
1-24	MRVTAPRTLL LLLWGAVALT ETWA	Signal	0
25-114	GSMSR <u>Y</u> FHTSVSRPG RGEPRFITVG YVDDTLFVRF DSDAASPREE PRAPW <u>I</u> EQEG PEYWDRETQI <u>C</u> KAKA <u>Q</u> TDRE DLRTLLRYYN QSEA	Alpha1	4
115-206	GSHTLQ <u>N</u> MYGCDVGPD GRLLRG <u>Y</u> HQD AYDGKDIAL NEDLSSWTAA DTAAQITQRK WEAARVAEQLRAYLEGECE WLRR <u>Y</u> LENGK ETLQRA	Alpha2	3
207-298	DPP <u>K</u> <u>T</u> HVTHHPISD HEATLRCWAL GFYPAEITLT WQRDGEDQTQ <u>D</u> TELVETPA GDRTFQK WAA VVVPSGEEQR YTCH <u>V</u> QHEGL PKPL <u>T</u> LRW	Alpha3	6
299-308	EP <u>S</u> SQST <u>V</u> PI	Connecting peptid	2
309-332	VG IVAGLAVLAV VVIGAVVAAV MC	Transmembran	
333-462	RRKSSGGK GGSYSQAACS DSAQGSVSLTA	cytoplasmatic	

**Tabelle 3.5 : Aminosäuren (AS) im Einbuchstabenkode, die jeweils von einer Mutation betroffene AS ist unterstrichen**

## **IV. Diskussion**

Zunächst soll nun eine interpretative Darstellung der Ergebnisse samt ihrer möglichen Auswirkung für die Immunbiologie von HLA-B27 erfolgen. Der zweite Teil der Diskussion beschäftigt sich dann kritisch mit der artifiziellen Mutagenese des Verfahrens. Einschränkend sei vorab erwähnt, dass die vorgelegten Ergebnisse sich lediglich auf eine Patientin und eine Kontrolle beziehen, die Patientin bezüglich des dargestellten Phänomens nicht im gesunden Zustand verglichen wurde und das Verfahren bezüglich der Varianten nicht zwischen den beiden B Allelen unterscheiden kann. Des Weiteren bleibt die Zellart, sofern es sich um eine umschriebene handelt, durch das Verfahren uncharakterisiert. Auch stellt die unter *I.6* und *II.2.1* dargelegte Probenselektion im Sinne einer mangelnden HLA-B27 Molekül Expression kein anerkanntes Phänomen der SpA dar. Somit kann weder ein ursächlicher Zusammenhang zu der Erkrankung, respektive SpA, noch zu HLA-B27 durch das vorgelegte Experiment nachgewiesen werden.

### **IV.1. Darstellung der Ergebnisse**

Die Ergebnisse zeigen, dass die gefundenen varianten Banden in der SSCP Gelanalyse tatsächlich Mutationen auf der mRNA des B-Allels entsprechen. Dadurch, dass für die Reverse Transkription ein unspezifischer Poly-T Primer verwendet wird, ist zudem sicher gestellt, dass lediglich intakte und reife mRNA der weiteren Untersuchung zugeführt wird. Die so gefundenen mutierten mRNAs würden demnach in vivo der Translation zugeführt und somit, wie beispielhaft unter *Tabelle 3.3* und *Tabelle 3.5* gezeigt, zu veränderten HLA-B Molekülen führen. Das Verhältnis von Mutation und Wildtyp Allel in der SSCP Gelanalyse (*siehe hierzu Abbildung 3.2 und 3.3*) zeigt bei einer ca. 50% Häufigkeit des B39 Allels eine Verminderung des B27 Wildtyps um die jeweilige Häufigkeit der Mutationen in den untersuchten Proben. Eindrücklich zeigt sich dies auch im Vergleich der beiden Puffersysteme TBE und MTE. Hier gelingt im MTE ein erhöhter Nachweis von mutierten Proben und konsekutiv ein noch geringerer Anteil des HLA-B27 Wildtyps. Zwar zeigen sich in den zur Sequenzierung ausgewählten Proben auch Mutationen des zweiten HLA B Alleles der Patientin, diese können aber auch durch die artifizielle Mutagenese (*siehe unter IV.3*) des Verfahrens und somit dem Hintergrundfehler zugeschrieben werden. Es ist demnach wahrscheinlich, dass die gefundenen Mutationen welche nicht dem Hintergrundfehler geschuldet sind ausschließlich HLA B-27 betreffen. Möglicherweise ist dies auch das

pathogenetische Substrat des in der Antikörperfärbung nachgewiesenen Mangels von HLA-B27 Molekülen auf der Zelloberfläche der Patientin.

Zwei Beobachtungen legen nahe, dass die gefundenen Mutationen nicht bereits auf der DNA Ebene vorhanden waren, sondern kotranskriptionell entstanden sind. Zum einen zeigen sich in der SSCP Gelanalyse keine dominanten varianten Banden, was bei einem Ursprung auf DNA Ebene zu erwarten gewesen wäre. Zum zweiten wies das verwendete Kniegelenkspunktat (Probe „*ex vivo*“) nach einmaliger Passage in Kultur (Probe „*Kultur*“) die gefundene signifikant erhöhte Mutationszahlen nicht mehr auf. Auch wenn die kotranskriptionelle Genese der Mutationen sich durch das vorgelegte Verfahren nicht beweisen lässt - zum ersten könnte eine nicht ausreichende Probenzahl in der SSCP Analyse zum mangelnden Nachweis sich wiederholender varianter Bandenmuster führen und zum Zweiten die ursächlichen Zellen selektiv in Passage untergegangen sein, so lässt sich doch an einem randomisierten Auftreten dieser Mutationen festhalten.

## **IV.2. Mögliche Ursachen der Mutagenese in vivo**

Über das Gleichgewicht zwischen somatischer Mutation und der daraus folgenden Plastizität des Genoms auf der einen Seite und der notwendigen Konservierung des Erbgutes andererseits ist bei höheren Lebewesen wenig bekannt. Für Bakterien und Hefen sind mutagene Zustände, welche über mehrere Generationen fortbestehen unter Stressbedingungen beschrieben. Führend ist hier das so genannte *SOS System*, das vornehmlich, aber nicht ausschließlich auf DNA Schaden reagiert. Die Frage ob es eine gelenkte Hypermutation als Antwort auf solche Stressoren gibt bleibt weiterhin unbeantwortet (Bridges B.A., 2001). Letztlich bezieht sich dieses Wissen aber auf sich replikativ teilende Organismen und auf Mutationen der DNA. Eine Ausnahme stellt die gut untersuchte Immunglobulinsynthese der B Zellen dar (*siehe IV.2.1*).

Für die postulierten RNA Veränderungen kommen somit zwei Ursachen, das so genannte *editing*, sowie ein unspezifischer oxidativer Schaden, in Betracht.

### **IV.2.1. RNA editing als möglicher Generator der gefundenen RNA Mutationen**

Der *editing* Prozess scheint der Diversifizierung der menschlichen Genomprodukte zu dienen und ist für Säugetiere, wie *knock out* Experimente zeigen, essentiell. Zwei Familien von Desaminasen, *ADAR* und *APOBEC*, wurden bisher beschrieben. *ADAR* unterteilt sich in drei



Typen, wirkt auf doppelsträngige RNA und katalysiert die Desaminierung von Adenin zu Inosin. Sowohl das Spliceosom als auch die Transkription interpretiert Inosin als Guanosin. Der *editing* Prozess führt hier also zu einem Nukleotidwandel von A nach G. Verschiedene Wirkungen wie die Veränderung von *splicing* Signalen, die Aufhebung von *STOPP codons*, aber auch Aminosäuresubstitutionen auf Proteinebene konnten dem zugeschrieben werden. Die zweite Familie *APOBEC* katalysiert einen Wechsel von Cytidin nach Uracil und scheint auf DNA und RNA zu wirken. Auch für sie konnte die Formung alternativer Proteine, Protektion vor Viren durch massives *editing* ihrer Transkripte, aber auch durch das Familienmitglied *AID* die Mitwirkung an der Diversifizierung des Antikörperrepertoires nachgewiesen werden (Levanon K., 2005). Obwohl der Mechanismus bisher ungeklärt ist, scheint die *AID* sowohl für die somatische Hypermutation, als auch für den Antikörper Klassenwechsel auf molekularer Ebene unabdingbar (Casalho M., 2004). So genannte *Alu repeats* über welche die RNA die notwendige Tertiärstruktur erlangt um *editing* Prozessen zugänglich zu werden und die überdies als Marker im Genom für solche Ereignisse dienen, wurden nun auch im *MHC* Klasse I Genkomplex beschrieben (Kulski J.K., 2005). Insofern ist es denkbar, dass HLA B Transkripte dem *editing* unterliegen. Attraktiv erscheint des Weiteren, dass *Alu repeats* selbst hoch polymorph sind und ihre Assoziation zu HLA-B27, im Sinne des unter 1.2 diskutiertem *extended haplotype* ein Substrat der Krankheitsassoziation darstellen könnten. Allerdings sind *editing* Prozesse in der Literatur bisher für den *MHC* nicht beschrieben.

#### **IV.2.2. Oxidativer Schaden**

Oxidativer Schaden an Nukleinsäuren und seine Relevanz für verschiedene Erkrankungen wird zunehmend erkannt. Obgleich bis zu zwanzig verschiedener oxidativer Schädigungen an Nukleinsäuren beschrieben sind, war der Fokus bisheriger Forschung hauptsächlich auf das 8-*Oxo-Guanin* wegen seiner Fähigkeit mit Adenosin eine Fehlpaarung einzugehen, gerichtet (Evans M.D., 2004). Für pathogenetisch so unterschiedliche Erkrankungen wie den Morbus Alzheimer, Brustkrebs, aber auch chronisch entzündliche Erkrankungen wie Hepatitis C oder Rheumatoide Arthritis konnten erhöhte 8-*Oxo-Guaninspiegel* im Urin und Gewebe nachgewiesen werden (Cooke M.S., 2003). Die RNA wird allgemein für ebenso anfällig für oxidative Schäden angesehen, ist aber weit weniger extensiv untersucht. Auch für die RNA wird eine 8-*Oxo-Guanin* Bildung beschrieben. Für sie wurde eine hoch affine Bindung an das *YB-1 Protein*, ein *MHC* Klasse II Genpromotor, experimentell beschrieben und als eine regulative Funktion für oxidierte RNA postuliert (Haiyakawa H., 2002). Im vorliegenden Fall

könnte 8 *Oxo-Guanin* zu Missinkorporationen durch die RT führen und so zu einer erhöhten Variantenzahl beitragen. Experimentelle Daten für andere Oxidationsprodukte und ihre Auswirkung auf die Translation *in vivo* oder *in vitro* liegen derzeit nicht vor.

### **IV.3 Der systematische Fehler durch eine artifizielle Mutagenese**

Ein Hauptproblem dieser Arbeit bleibt die artifizielle Mutagenese durch das Verfahren. Eine mögliche Quelle ist hier die Darstellung der PCR Produkte durch den Transilluminator. Die für die präparative Arbeit benutzte Wellenlänge (400-500nm) führt zu keiner direkten DNA Schädigung, allerdings ist eine Schädigung durch entstehende aktive Sauerstoffspezies möglich. Des Weiteren werden die Produkte mit dem Farbstoff *GelStar* gefärbt. Trotz der unter *II.6* beschriebenen Aufreinigungstechniken muss auf molekularer Ebene von einer direkten oder durch die Polymerasen vermittelten möglichen Mutagenese ausgegangen werden. Der Hauptanteil an der artifiziellen Mutagenese entfällt jedoch auf die verwendeten Polymerasen.

#### **IV.3.1 Artifizielle Mutagenese durch die Polymerasen**

Der Analytik mittels SSCP wird ein 330bp messendes PCR-Produkt zugeführt. Sichtbar sind demnach auch Polymerasenfehler während der reversen Transkription (RT), der HLA B spezifischen RT-PCR, innerhalb der transformierten *E. coli*, sowie während der ersten Zyklen der zum Zielfragment führenden *huckepack* PCR.

Der Versuch sich dem artifiziellen Fehler rechnerisch zu nähern zeigt sich aus mehreren Gründen als wenig akkurat. Für die verwendete *Taq* Polymerase sind Missinkorporationen einzelner Nukleotide (1/9000) und Leserahmenfehler (1/41000) beschrieben (Eckert K.A., 1990). Die Angaben in der Literatur zur allgemeinen Fehlerrate pro Basenpaar pro PCR-Zyklus schwanken zwischen  $0,79 \times 10^4$  und  $0,075 \times 10^4$  um ca. eine 10er Potenz (Bracho M.A., 1998). Diese Fehlerhäufigkeit hängt des Weiteren von Faktoren wie der dNTP Konzentration, Reaktionstemperaturen, dem GC Gehalt des Zieltemplates, dem pH-Wert,  $MgCl_2$  Konzentration etc. ab. Kunkel et al. haben diesbezüglich ideale Rahmenbedingungen formuliert (Eckert K.A., 1991). Gewonnen werden diese Daten hauptsächlich durch vorwärts Mutationsanalysen (Bebenek K., 1995). Zusammenfassend beziehen sich die Daten auf kurze DNA Zieltemplates unter Idealbedingungen was für die vorliegende Arbeit nicht der Fall ist.

Ein einfaches Rechenbeispiel bezogen auf die Reverse Transkription kann dies verdeutlichen. Für die RT des HIV I Virus (in dieser Arbeit nicht verwendet) wird ein Fehler von 1/1700 pro bp in der Literatur angegeben, womit sie allerdings einen Spitzenplatz einnimmt (Roberts J.D., 1988). Rechnerisch könnte somit alleine dieser Schritt zu einer Variantenhäufigkeit von 19% führen.

Dem sich hier offenbarenden strukturellen Problem der Arbeit, den artifiziellen Fehler nicht von dem angenommenen Phänomen unterscheiden zu können, lässt sich aber dadurch begegnen die Arbeit selbst als vorwärts Mutationsanalyse zu lesen. Setzt man die Probe *SM neonatal* als Kontrolle, ergibt sich als artifizieller Hintergrund eine Variantenhäufigkeit von ca. 19%. Diese unterschätzt zwar den Polymerasenfehler da eine Variante mehrere Fehler tragen kann, stellt aber die einzig zulässige Kontrolle dar, da nur in ihr gleiches Template und Untersuchungsbedingungen zum Tragen kommen. Da sich die Probe *ex vivo* sowohl von der Kontrolle als auch von der Probe *Kultur* signifikant unterscheiden, muss hier ein Effekt unabhängig von einem systematischen Fehler angenommen werden.

#### **IV.4. Hypothetische Auswirkungen der mRNA Alterationen**

Wie einleitend diskutiert, lassen sich die Ergebnisse der Arbeit nur als Hinweis bezüglich einer pathogenetischen Bedeutung für HLA-B27 und seine Rolle für die SpA interpretieren. Postuliert man einen oxidativen Schaden, stellt sich keine naheliegende Hypothese, weshalb dies gerade für HLA-B27 oder die SpA gelten sollte, dar. Die Ergebnisse aus der Krebsforschung zeigen, dass selbst die Inaktivierung einzelner Reparaturmechanismen nicht genügen, um *in vivo* zu einer erhöhten Mutagenese zu führen. Die gefundenen mRNA Veränderungen könnten demnach auch ein *in vivo* kompensiertes Phänomen unter vermehrtem oxidativem Stress, wie z.B. an Orten aktiver Inflammation darstellen. Attraktiver erscheint eine Assoziation zu *editing* Prozessen. Da *editing* häufig in oben erwähnten *Alu repeats*, beziehungsweise in unmittelbarer Nähe zu ihnen auftritt, könnte hier eine Verbindung zu distinkten HLA B Haplotypen vorliegen. Allerdings erbrachte eine Suche nach einer Assoziation zwischen HLA Haplotypen und *Alu repeats* bisher keine Assoziation zu B27 (Kulski J.K., 2005). Einschränkend muss hier festgestellt werden, dass unser Wissen über *editing* bzw. der Inhalt der zur Verfügung stehenden Datenbanken noch unvollständig ist.

Unabhängig von der Frage warum das gefundene Phänomen mit HLA-B27 oder den SpA assoziiert sein soll, hätte das Auftreten von veränderten Proteinen weitreichende Implikationen für die immunologische wie proteinbiologische Funktion von HLA-B27. Die verwendete RT nutzt einen Primer der an den Poly A Schwanz der mRNA bindet und führt so ausschließlich intakte und reife mRNA dem Verfahren zu. Insofern ist zu erwarten, dass die mRNA Varianten, welche nicht dem Hintergrundfehler des Verfahrens zuzuschreiben sind, auch in vivo der Translation zugeführt werden. Derart verändertes Selbstprotein könnte durch eine MHC I Präsentation immunogen wirken. Die gefundenen Mutationen der Varianten wiederholen sich weder in den nicht stochastischen sequenzierten Klonen, noch im Muster der SSCP Analyse und treten demnach randomisiert auf. Dies könnte auch erklären, warum sie als arthritogenes Peptid nicht identifiziert werden konnten. Ebenso könnten diese nach einer Translation als veränderte Proteine das Substrat des *misfolding* darstellen, wie unter I.4.3. und I.4.4. beschrieben.

#### **IV.5 Citrullinierte Proteine (CCP) als Beispiel „postrationaler“ Pathogenese**

Dass posttranslationale Veränderungen einen attraktiven Schlüssel zu HLA assoziierten rheumatischen Erkrankungen liefern können, zeigen aktuelle Erkenntnisse zu cyclischen citrullinierten Proteinen (CCP) bei der Rheumatoiden Arthritis. Hier eröffnete die Entdeckung von Antikörper gegen citrullinierte Selbstproteine einen serologischer Marker für die RA von hoher Spezifität und stellen ein neues Feld für Hypothesen zum genetischen Hintergrund dar (Vossenar E.R., 2004). Die Citrullinierung beschreibt die Desaminierung von Argininresiduen an körpereigenen Proteinen durch eine Gruppe von Desaminasen (PAD; *peptidylarginine deaminase enzymes*) zu Citrullin, welches keine körpereigene Aminosäure darstellt. *Single nucleotid polymorphisms* (SNPs) dieser Enzymgruppe zeigen eine starke Assoziation zur RA und tragen möglicherweise durch eine höhere Stabilität oder veränderte Reifung ihrer mRNAs zur Pathogenese bei (Suzuki A., 2003). Eine Brücke zum assoziierten HLA DR4 konnte geschlagen werden, als an transgenen Ratten eine höhere Bindungsaffinität von citrullinierten im Vergleich zu nicht citrullinierten Proteinen an das MHC Klasse II mit konsekutiver CD4 Zell Aktivierung gezeigt werden konnte (Hill J.A., 2003).

#### **IV.6 Tumorimmunologie und das *Immunoediting***

Die initiale Theorie über das fehlende Selbst im Sinne einer mangelhaften HLA Klasse I Expression und deren Überwachung durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) als Teil des angeborenen Immunsystems geht auf Kärre et al. zurück und fand unter dem Namen der *missing self* Theorie Eingang in die wissenschaftliche Diskussion (Kärre K, 1990). Die Überlegung folgte tierexperimentellen Daten über lysierende NK-Zellen gegenüber allogenen Stammzellen und Lymphomzellen. In der heutigen Tumorimmunologie werden NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen (CTL) als reziprokes System der immunologischen Überwachung angesehen. NK-Zellen erkennen und lysieren demnach Tumorzellen denen die HLA Klasse I Expression fehlt, CTLs erkennen Tumorantigene die von HLA Klasse I präsentiert werden. Eine Vielzahl von veränderten Expressionsmustern an HLA Klasse I wurden bisher in fast allen Tumoren beschrieben (Chang C-C, 2006). Diese reichen vom Fehlen eines der heterozygoten Allele bis zum kompletten Fehlen von HLA Klasse I oder der ersatzweisen Expression von HLA-E Molekülen. Als Konzept wurde ein Drei-Phasen-System aus *Elimination*, *Equilibrium* und *Escape* entwickelt, in welchem die heutigen Erkenntnisse in einem dynamischen Prozess integriert werden (Dunn G.P., 2004). Entscheidend ist hierbei der als *immunoediting* bezeichnete Gedanke, dass die zugrundeliegenden genetischen Veränderungen welche von herab regulierten Transkriptionsfaktoren bis zum Chromosomenverlust reichen können, nicht der beliebigen genetischen Instabilität der Tumoren allein geschuldet ist, sondern dass diese *Escapevarianten* ein Produkte des immunologischen Selektionsdruckes darstellen.

Posttranslationale Mechanismen sind bis dato noch nicht publiziert, würden aber in der sogenannten Equilibriumsphase eine probate Vorstufe zu den späteren DNA Defekten darstellen. Es zeigt sich in diesem Beispiel zumindest, dass ein länger wirkender immunologischer Druck zu verändertem Expressionsverhalten führen kann. Solch eine klonale Genese wäre auch für chronisch entzündliche Erkrankungen denkbar.

## V. Zusammenfassung

Die seit ca. 30 Jahren währenden Forschungsbemühungen um die Krankheitsassoziation von HLA-B27 zu den Spondylarthropathien haben zu einer Vielzahl von Hypothesen geführt ohne ihre eigentliche Pathogenese aufdecken zu können. Neue Erkenntnisse in der Epigenetik, aber auch die ungewöhnlichen Proteinbiologie des HLA-B27 Moleküls ermutigen dazu sich posttranskriptionellen Ereignissen zuzuwenden. Die Epigenetik befasst sich mit den Mechanismen, die meist durch Nukleinsäuren selbst vermittelt, zur Regulation aber auch Formung von Genprodukten beiträgt und so dem Genom die Plastizität verleiht die es in biologischen Systemen annimmt. Im Rahmen der Diskussion dieser Arbeit werden am Beispiel von *editing* Prozessen (*siehe IV.2.1*) einige heute bereits bekannte Einflüsse auf physiologische, aber auch pathophysiologische Vorgänge im menschlichen Organismus diskutiert. Desweiteren gelang es Mear et. al. dem HLA-B27 Molekül einzigartige Eigenschaften zuzuschreiben was alternative Erklärungsmöglichkeiten für die Assoziationshypothesen bedeutet (*siehe I.4.3*).

Ermutigt durch diese neuen Forschungsansätze versucht die vorliegende Arbeit einen Zugang zu möglichen Veränderungen auf HLA-B27 Transkripten, nämlich der mRNA von HLA-B27, zu finden. Die mRNA, synthetisiert durch eine DNA abhängige RNA Polymerase, stellt den ersten Schritt auf dem Weg von der DNA zum fertigen Molekül dar. Veränderungen der mRNA könnten Ausdruck von epigenetischen Mechanismen sein und so zu einer veränderten Proteinbiologie beitragen.

Ausgewählt wurde hierzu eine interkurrent erkrankte HLA-B27 positive Patientin von der eine Blutprobe, ein Gelenkspunktat und ein in erster Passage kultiviertes Gelenkspunktat untersucht wird.

Einem biochemischen Zugriff auf Veränderungen der mRNA - im Rahmen der Arbeit werden diese als Mutationen der mRNA bezeichnet - stellten sich mehrere grundsätzliche Probleme. Zunächst ist es unbekannt ob es sich um eine oder mehrere bestimmte Mutationen handelt, oder ob diese gleichsam randomisiert auftreten. Desweiteren ist ebenso unbekannt ob sich diese Mutationen nur in wenigen Zellen in gleicher Weise oder in vielen Zellen auf unterschiedliche Weise finden. Um die Mutationen in jedem Fall detektieren zu können wird in der vorliegenden Arbeit nach dem notwendigen *pooling* und Amplifizierung der Proben ein zusätzlicher Vereinzelungsschritt eingefügt. Diese spezielle Sensitivität erkaufte sich das vorgelegte Verfahren mit einer nicht unerheblichen systematischen Fehlerrate. So zeigte die zur Kontrolle mitgeführte Probe eines HLA-B27 positiven gesunden Neugeborenen eine

Mutationshäufigkeit von ca. 19%, welche sich hauptsächlich durch die Fehlerhäufigkeit der verwendeten Polymerasen *in vitro* in den kombinierten Amplifizierungsschritten erklären lässt.

Demnach wurde zunächst die gesamte RNA der jeweiligen Probe extrahiert (pooling). Die gesamte mRNA mittels einer Reversen Transkription in die stabilere *copy DNA* (cDNA) umgeschrieben und anschließend beide komplette HLA-B Allel Transkripte durch eine PCR vervielfältigt (Amplifikation). Dieses PCR Produkt wird aufgereinigt und durch eine Vektorligation in *E. coli* kloniert (Vereinzelung). Die *E. coli* wurden ausplattiert und deren Kolonien jeweils in Mikrotiterplatten überführt. Hiervon ausgehend wurden zwei Mutationsanalyseverfahren angewendet. Einerseits wird eine SSCP Gelanalyse verwendet, welche einzelne Basenveränderungen durch ein verändertes Laufverhalten im Gel aufdeckt. Da dieses Verfahren nur kleine Fragmente untersuchen kann wird ausgehend von den Bakterienkolonien durch eine PCR ein die Exone 2 und 3 umfassendes Fragment (B-Fragment) gewonnen und untersucht. Außerdem werden bestimmte im Gellauf evaluierte Proben einer Direktsequenzierung zur weiteren Charakterisierung der Mutationen, aber auch der Wildtyp Allele zugeführt.

Im Ergebnis zeigt sich eine signifikant erhöhte Mutationsrate im frischen Gelenkspunktat gegenüber der Kontrolle und dem kultivierten Gelenkspunktat. Im Verhältnis der beiden Wildtyp Allele zeigt sich HLA-B27 unterrepräsentiert. In der Direktsequenzierung ergibt sich mit einer Ausnahme eine Übereinstimmung mit den Daten der SSCP Gelanalyse, wobei sich einmalig eine vorhandene Mutation auf der mRNA nicht im Gellauf darstellt. Bei den Mutationen handelt es sich in allen Fällen um Basenaustausche welche sich über das gesamte HLA B Transkript verteilen. Es zeigen sich weder in der SSCP Gelanalyse noch in den Sequenzdaten wiederholte oder bestimmte Mutationen.

Im Ergebnis zeigt sich das gefundene Verfahren geeignet Mutationen auf der mRNA nachzuweisen und kann diese quantitativ von dem ihm immanenten systematischen Fehler unterscheiden.

Der für die SSCP Gelanalyse verwendete MTE Puffer zeigt sich dem TBE Puffer durch seine bessere Diskriminierung zwischen Mutation und Wildtyp überlegen.

Bei der untersuchten Patientin zeigen sich Mutationen auf den Transkripten (mRNAs) von HLA B in der Probe aus dem entzündeten Gelenk. Betrachtet man die Verhältnisse zwischen Mutation und den beiden Wildtyp Allelen in der SSCP Gelanalyse scheinen diese, mit Ausnahme des systematischen Fehlers, wahrscheinlich HLA-B27 zu betreffen.

Möglicherweise lässt sich hierdurch der bei der Patientin gefundene allelspezifische Mangel

an HLA-B27 Oberflächenmolekülen (*siehe II.2*) erklären. Die gefundenen Mutationen treten randomisiert auf und sind wahrscheinlich nicht auf der DNA vorhanden.

Es ist denkbar, dass in dieser Mutationsbereitschaft auch der Schlüssel zur Krankheitsassoziation von HLA-B27 liegt. So könnte diese generiert durch epigenetische Mechanismen wie dem *Editing* im Sinne eines *extended haplotype* genetisch an den HLA-B27 Haplotypen gekoppelt sein. Veränderte HLA-B27 Moleküle könnten das Substrat des *misfolding* darstellen oder im Sinne ihrer Immunogenität nach Präsentation auf HLA Klasse I Molekülen zu einem „*arthritogenic peptide*“ werden.



## VI Statistik

Verwendet wurde der *fishers exact test* anhand einer Vierfeldertafel. Bei einem signifikanten Ergebnis ist es unwahrscheinlich dass die Assoziation zwischen Mutationsrate und jeweiliger Probe eingedenk der Mutationshäufigkeit dem Zufall geschuldet ist. Verglichen wurden die einzelnen Proben gegen die Kontrolle, sowie das Gelenkspunktat *ex vivo* mit seiner in eine Passage genommenen Zellkultur. Ein signifikanter Unterschied ergab sich für den Vergleich zwischen der *Kontrolle* und dem Gelenkspunktat *ex vivo*, sowie für den Vergleich *ex vivo* und *Kultur*. Dargestellt sind lediglich diese beiden signifikanten Ergebnisse, welche auch nach einer Korrektur für multiples Testen bestand haben.

### VI.1. Vergleich der Kontrolle gegen Patient Gelenkspunktat ex vivo

#### *Vierfeldertafel Kontrolle gegen Gelenkspunktat ex vivo*

Vergleich Kontrolle versus ex vivo	Mutationen	Wildtyp	Gesamt
Kontrolle SM neonatal	12	56	68
Patient ex vivo	22	28	50
Gesamt	34	84	118

*Tabelle 6.1: Zeigt die Rohdaten der statistischen Analyse, vgl. Tabelle 3.1*

#### **Fisher's Exact Test :**

The two-sided P value is 0.0022, considered very significant.

The row/column association is statistically significant.

### VI.2. Vergleich Patient Gelenkspunktat ex vivo gegen Kultur

#### *Vierfeldertafel Gelenkspunktat ex vivo gegen Kultur*

Vergleich ex vivo versus Kultur	Mutationen	Wildtyp	Gesamt
Patient ex vivo	22	28	50
Patient Kultur	9	35	44
Gesamt	31	63	97

*Tabelle 6.2: zeigt Rohdaten der statistischen Analyse, vgl. Tabelle 3.1*

#### **Fisher's Exact Test :**

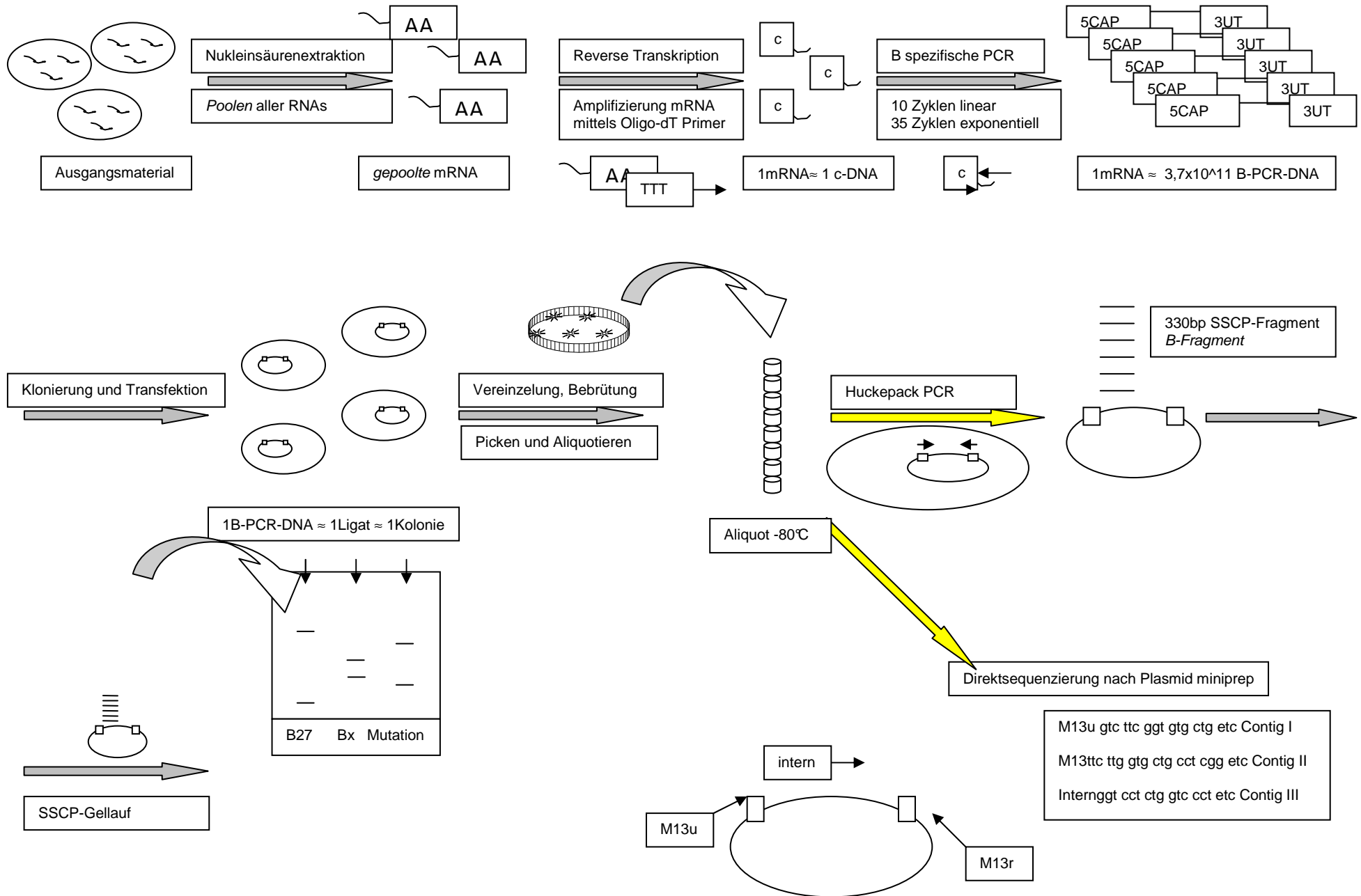
The two-sided P value is 0.0172, considered very significant.

The row/column association is statistically significant.

Zusammenfassend zeigt sich die Mutationsrate im Gelenkspunktat der Patientin signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle und dem in einer Passage kultiviertem Gelenkspunktat.

**VII Anhang**

**VII.1 Das analytische Verfahren im graphischen Überblick (Abbildung 7.1)**



### VIII. Tabellen und Abbildungen

Abbildung 1.1	Das menschliche MHC	<u>7</u>
Abbildung 1.2	Darstellung des MHC Klasse I Proteinkomplexes auf der Zelloberfläche	<u>8</u>
Abbildung 2.1	Der Weg der Moleküle	<u>24</u>
Abbildung 2.2	Beispiel für die Auswertung eines SSCP-Gels	<u>32</u>
Abbildung 2.3	HLA-B27 cDNA und B-Fragment	<u>36</u>
Abbildung 3.1	Prozentuale Häufigkeit der Mutationen in den verschiedenen Proben im MTE	<u>37</u>
Abbildung 3.2	Graphische Darstellung der Ergebnisse im MTE	<u>41</u>
Abbildung 3.3	Graphische Darstellung der Ergebnisse im TBE	<u>41</u>
Abbildung 7.1	Das analytische Verfahren im graphischen Überblick	<u>58</u>
Tabelle 1.1	Theorien zur Krankheitsassoziation	<u>12</u>
Tabelle 2.1	Immunfluoreszenzbindungsmuster der ausgewählten Patientin	<u>18</u>
Tabelle 2.2	Protokoll der Reversen Transkription	<u>20</u>
Tabelle 2.3	Protokoll der Reversen Transkription	<u>21</u>
Tabelle 2.4	Primer der HLA-B spezifischen PCR	<u>22</u>
Tabelle 2.5	Protokoll der HLA-B spezifischen PCR	22
Tabelle 2.6	Protokoll der HLA-B spezifischen PCR	<u>23</u>
Tabelle 2.7	Ligationsreaktion, das PCR Produkt wird in den Vektor ligiert	<u>26</u>
Tabelle 2.8	Primerpaar der <i>huckepack</i> PCR	<u>28</u>
Tabelle 2.9	Protokoll der <i>huckepack</i> PCR	<u>29</u>
Tabelle 2.10	Protokoll der <i>huckepack</i> PCR	<u>29</u>
Tabelle 2.11	Komponenten der SSCP Gele	<u>31</u>
Tabelle 2.12	Auftragspuffer der SSCP	<u>31</u>
Tabelle 2.13	Restriktionsverdau der Plasmide	<u>34</u>
Tabelle 2.14	Sequenzierprimer	<u>35</u>
Tabelle 2.15	Produkte der Sequenzierreaktion	<u>35</u>
Tabelle 2.16	Protokoll der Sequenzierreaktion	<u>35</u>

Tabelle 3.1	Auswertung der SSCP-Gele	<u>39</u>
Tabelle 3.2	Vergleich der SSCP Puffer TBE und MTE	<u>40</u>
Tabelle 3.3	Sequenzanalyse der Klone	<u>43</u>
Tabelle 3.4	Sequenzergebnisse bezogen auf den Gellauf bzw. das B-Fragment	<u>44</u>
Tabelle 3.5	Darstellung der Mutationen auf der Proteinebene	<u>45</u>
Tabelle 6.1	Vierfeldertafel <i>Kontrolle</i> gegen Gelenkspunktat <i>ex vivo</i>	<u>56</u>
Tabelle 6.2	Vierfeldertafel Gelenkspunktat <i>ex vivo</i> gegen <i>Kultur</i>	<u>57</u>

***IX Literaturverzeichnis***

1. Alberts B. et al., Molecular Biology of the cell 2002, 4<sup>th</sup> ed.
2. Alper C.A., Exp Clin Immunogenet. 1992;9(2):58-71
3. Backström E., 2004, Scandinavian Journal of Immunology 60, 14–22
4. Bebenek K., Methods Enzymology, 1995, 202
5. Bendelac A., Science. 1994, 25;263(5154):1774-8
6. Bjorkman P.J., Nature. 1987 Oct 8-14;329(6139):506-12.
7. Boyle L.H., Current Molecular Medicine 2004, 4, 51-58
8. Boyle L.H., Immunology 2004 112 54–63
9. Bracho M.A., Journal of general Virology, 1998,79
10. Braun J., Ann Rheum Dis, 2002 ;61 Suppl 3:iii61-7
11. Breban M., Best Pract Res Clin Rheumatol. 2006 Jun;20(3):593-9
12. Breban M., J Exp Med. 1993 Nov 1;178(5):1607-16
13. Breban M., J Immunol. 1996 Jan 15;156(2):794-803
14. Bridges B.A., 2001, Phil. Trans. R. Soc. Lond., 356
15. Buxton S.E., J Exp Med. 1992 Mar 1;175(3):809-20.
16. Cascalho M., The Journal of Immunology, 2004, 172: 6513–6518
17. Chang C-C., Cancer Immunol. Immunother., 2007, 56; 227-236
18. Cooke M.S., FASEB J. 17, 1195–1214, 2003
19. Curran, M.D.; Europ. Journ. o. Immunogenetics 1996/ 23 S 297-309
20. Duchmann R., Clinical and Experimental Immunology 2001, 123: 315-322
21. Dunn G.P., Immunity 2004, 21: 137-148

22. Eckert K.A., Nuc acid Reasearch 1990, 18/13
23. Eckert K.A., PCR Methods Appl. 1991 Aug;1(1):17-24
24. Evans M.D., BioEssays 26:533–542, 2004
25. Gorer P A, Br. J. of Exp. Path. 1936, 17: 42-50
26. Gorer, P. A., J. Path. Bact. 1938, 47: 231
27. Gundo D., The Journal of Immunology, 2001, 166: 1703–1709
28. Haiyakawa H., Biochemistry 2002, 41, 12739-12744
29. Hermann E., Lancet. 1993 Sep 11;342(8872):646-50
30. Hill J.A., J Immunol 2003, **171**:538-541
31. Horton R., Nature Reviews 2004, 5:889-899
32. Kärre K., Immunology Today 1990, Vol. 11, 7
33. Kirveskari J., British Journal of Rheumatology 1997, 36:185-189
34. Klein J, Immunogenetics 1986, 24:331-338
35. Kollenberger S., ARTHRITIS & RHEUMATISM Vol. 46(11), 2002, 2972–82
36. Kostova Z.,EMBO J. 2003 May 15;22(10):2309-17
37. Kulski J.K., 2005, Cytogenet Genome Res 110:193–202
38. Levanon K., EMBO Rep. 2005 Sep;6(9):831-5
39. Marsh G.E., Tissue Antigens. 2002 Mar;59(3):237-8
40. Martinez-Borra J., Human Immunology 2000, 61, 131–139
41. Mear J.P., The Journal of Immunology, 1999, 163: 6665–6670
42. Moll J.M., Medicine (Baltimore) 1974 ;53(5):343-64
43. Nataraj A.J., Electrophoresis 1999,20,1177-1185
44. Nei M., Annual Review of Genetics 2005, 39, 121-152

45. Orita M., Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Apr;86(8):2766-70
46. Reveille J.D., Best Pract Res Clin Rheumatol. 2006 Jun;20(3):601-9
47. Reveille J.D., Curr Opin Rheumatol. 2001 Jul;13(4):265-72
48. Roberts J.D., Science, 1988 Nov 25;242(4882):1171-3
49. Roitt I.M., Leitfaden der Immunologie, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Sep 2000
50. Schlosstein L., N Engl J Med. 1973 Apr 5;288(14):704-6
51. Sieper J., Best Practice and Research Clinical Rheumatology, 2006, 20/3
52. Smith J.A., Best Practice and Research Clinical Rheumatology, 2006, 20/3
53. Suzuki A., Nature Genetics, 34/4, Aug 2003, 395-402
54. Taurog J.D., Immunol Rev. 1999 Jun;169:209-23
55. Vossenar E.R., Arthritis Res Ther 2004, 6:107-111
56. Williams T.M., J Mol Diagn. 2001 Aug;3(3):98-104
57. Zinkernagel R.M., Nature. 1974 Apr 19;248(450):701-2



### *Danksagung*

Herrn Prof. Dr. R. Gruber danke ich für die Überlassung des Themas und die zugewandte wie geduldige Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Kellner danke ich für die Heranführung an diese Arbeit und die freundliche Überlassung der Patientenproben.

Herrn Dipl. biol. A. Koroknay danke ich für seine Mentorenschaft, sowie für die unermüdliche und wertvolle Zusammenarbeit.

Herzlichen Dank an meine Eltern Monika und Thambirajah, meine Frau Anna und allen Freunden die meinen Weg begleitet haben. Dank auch an meine Freunde Sabine Hochmuth und Vitus Krumbholz für das Lektorat.

***Lebenslauf***

---

Name: Ernest Paul Mathavan  
 Wohnort: Astallerstrasse 16, 80339 München  
 Geburtsdatum: 31.01.1973  
 Geburtsort: München  
 Familienstand: verheiratet, eine Tochter

***Schulbildung***

---

1980-1984 Maria Montessori Schule München  
 1984-1986 Hauptschule München Nord  
 1986-1990 Staatliches Gymnasium München Nord  
 1990-1994 Städtisches Willi-Graf-Gymnasium München

***Zivildienst***

---

1994-1995 Krankenpflege Paulinen Krankenhaus Berlin und  
 Städtisches Krankenhaus München Schwabing

***Hochschulbildung***

---

1995-1996 Studium der Philosophie LMU München  
 1996-2002 Studium der Humanmedizin LMU München

***Praktisches Jahr***

---

Aug. bis Nov. 2001 - Neurologie : Klinik Valenz, Schweiz  
 Dez. bis März - Chirurgie : Korle-Bu Teachinghospital, Ghana  
 Apr. bis Aug. 2002 - Innere Medizin : Poliklinik Innenstadt LMU

***AIP/ Assistenzarzt***

---

März 03 bis April 2004 Allgemeine Chirurgie / Gefäßchirurgie St. Vinzenz Hospital Köln  
 CA Dr. med. D. Trüb  
 Mai 04 bis Dez. 2006 Innere Medizin Marienkrankenhaus Bergisch Gladbach Akademisches  
 Lehrkrankenhaus der Universität Köln  
 CA PD. Dr. med. J. v. Schönfeld  
 Seit März 2007 Innere Medizin Krankenhaus Barmherzige Brüder München  
 Akademisches Lehrkrankenhaus der TU München  
 CA Prof. Dr. med. J. Wechsler

***Dissertation***

---

Seit 1998 Rheumaeinheit der Poliklinik der LMU  
 Prof. Dr. med. R. Gruber

München, 20. August 2010

Ernest Mathavan

