



Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: **AT 395 786 B**

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1876/91

(51) Int.Cl.⁵ : **G01N 33/564**
G01N 33/68

(22) Anmeldetag: 18. 9.1991

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 7.1992

(45) Ausgabetag: 25. 3.1993

(56) Entgegenhaltungen:

C.A. 111(9), 1989; 76276A
EP-A2 0335293

(73) Patentinhaber:

SMOLEN JOSEF DR.
A-1130 WIEN (AT).
HASSFELD WOLFGANG DR.
A-1080 WIEN (AT).
STEINER GÜNTER DR.
A-1030 WIEN (AT).

(54) DIAGNOSTISCHES MITTEL, INSBESONDERE ZUR DIAGNOSE VON CHRONISCHER POLYARTHRITIS

(57) Core-Proteine A2, B1 oder B2 des heterogenen nuklearen Ribonukleoproteinkomplexes des Zellkerns eukaryotischer Zellen als diagnostisches Mittel, insbesondere zur Diagnose von chronischer Polyarthrititis.

AT 395 786 B

Der heterogene nukleare Ribonukleoprotein(hnRNP)-Komplex ist im Zellkern eukaryotischer Zellen lokalisiert und dort mit prä-mRNA assoziiert. Er besteht aus ca. 40 Proteinen, von denen die sogenannten "Core-Proteine" A1, A2, B1, B2, C1, C2 am besten charakterisiert sind (1, 2). Die Sequenzen der ihnen entsprechenden cDNAs wurden kürzlich aufgeklärt und daraus die Primärstrukturen der Proteine abgeleitet (3-6). Über die biologische Funktion der hnRNP Proteine ist noch wenig bekannt, doch scheinen sie an der Prozessierung der prä-mRNA zur reifen mRNA beteiligt zu sein (7, 8).

Es ist auch bereits bekannt, daß bei manchen Autoimmunerkrankungen Antikörper gegen hnRNP Proteine gebildet werden können (9, 10). Bisher wurde das Protein A1 als Autoantigen näher charakterisiert (11, 12), und zwar wurden Autoantikörper gegen (rekombinantes) A1 bei einigen Autoimmunerkrankungen nachgewiesen, so etwa bei chronischer Polyarthrit (cP), systemischem Lupus erythematosus (SLE), Mischkollagenose (MCTD) oder Sklerodermie. Obwohl Anti-A1 Antikörper in ca. 50 % der Seren von cP Patienten nachgewiesen wurden, können sie nicht als krankheitsspezifisch gelten, da sie mit einer Häufigkeit von 20 - 40 % auch bei den anderen genannten Erkrankungen auftraten.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß die Core-Proteine A2, B1 und B2 eine sehr hohe Krankheits-spezifität für cP aufweisen: Antikörper gegen diese Proteine treten bei anderen arthritischen Erkrankungen nicht und bei Kollagenosen nur in Einzelfällen auf. Der Nachweis dieser Antikörper kann somit als Hilfsmittel für die Diagnostik der cP herangezogen werden. Vorteilhaft ist auch, daß diese Antikörper bereits im Frühstadium der cP, wenn die Krankheit klinisch noch nicht manifest ist, auftreten können.

Geschützt werden sollen daher Core-Proteine A2, B1 oder B2 des heterogenen nuklearen Ribonukleoprotein-komplexes des Zellkerns eukaryotischer Zellen als diagnostisches Mittel, insbesondere zur Diagnose von chronischer Polyarthrit, sowie die Verwendung dieser Core-Proteine, um festzustellen, ob in menschlichen oder tierischen Körperflüssigkeiten, z. B. in Seren, für diese Proteine spezifische Antikörper vorhanden sind.

Es ist bereits ein Reagens aus einem Zellextrakt bekannt, das ein spezifisches Antigen bzw. spezifische Antigenfraktion für Antikörper, die bei cP auftreten, enthält. Dieses Reagens enthält zahlreiche Substanzen, und über die Struktur der einzelnen Substanzen finden sich nicht die geringsten Hinweise.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde dieses Reagens näher untersucht, wobei sich herausstellte, daß es als spezifische Antigene die Proteine A2, B1 und B2 des hnRNP-Komplexes enthält.

Gewinnung von A2

HeLa Zellkerne wurden 30 min auf Eis mit hypotonem Puffer (10 mMol Hepes-KOH, 2,5 mMol MgCl₂, 25 % Glycerin; pH 7,9) unter Rühren inkubiert, anschließend wurde das gleiche Volumen hypertonen Puffer zugesetzt (10 mMol Hepes-KOH, 2,5 mMol MgCl₂, 0,88 Mol NH₄Cl, 25 % Glycerin; pH 7,9) zugegeben und weitere 45 min unter Rühren inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne durch 20-minütige Zentrifugation bei 20 000 g abgetrennt, der Überstand durch Verdünnen mit 20 mMol Hepes-KOH, pH 7,9 auf eine NH₄Cl Konzentration von 0,3 Mol eingestellt und als Zellkernextrakt definiert. Zur Reinigung von A2 wurden 40 ml des Zellkernextraktes (200 mg Gesamtprotein) über eine Heparin-Sepharose CL6B-Säule (40 x 1,5 cm) chromatographiert. Die Säule wurde zunächst mit Puffer A (20 mMol Hepes-NaOH, 0,3 Mol NaCl, 1 mMol EDTA; pH 7,9) gewaschen, dann mit Puffer B (Puffer A mit 1 Mol NaCl) und schließlich mit Puffer C (Puffer B mit 6 Mol Harnstoff) eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden elektrophoretisch auf 12%igen Polyacrylamid-SDS Gelen aufgetrennt (das Molekulargewicht von A2 beträgt etwa 36 kD) und auf Nitrocellulose transferiert. Die Nitrocellulose wurde mit einem anti-A2-hältigen Patientenserum inkubiert und gebundene Antikörper mittels eines gegen humanes IgG gerichteten zweiten Antikörpers, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert war, detektiert. A2 war ausschließlich im Puffer C Eluat nachweisbar, wobei der Hauptanteil in drei Fraktionen konzentriert war. In Fig. 1 sind die Fraktionen, bei denen Puffer gewechselt wurde, durch Pfeile markiert. Die Hauptmenge von A2 war in der "Peakfraktion" sowie den beiden folgenden Fraktionen des 1 Mol NaCl/6 Mol Harnstoff Eluates enthalten. Die in diesen Fraktionen enthaltene Proteinmenge betrug etwa 10 mg, sodaß eine annähernd 20fache Anreicherung von A2 aus dem rohen Kernextrakt erzielt worden war. Die Proteine wurden durch Zugabe von Ammonsulfat (Endkonzentration 500 g/l) ausgefällt, in (20 mMol Tris-Essigsäure, 6 Mol Harnstoff, pH 8,3) gelöst und durch Chromatofocusing auf dem Ionenaustauscher PBE 94 (15 x 0,6 cm) weiter aufgetrennt. Die Säule wurde mit Startpuffer (20 mMol Tris-Essigsäure, 3 Mol Harnstoff; pH 8,3) äquilibriert und mit (1 : 8 verdünnten Polypuffer 96 mMol Essigsäure, 3 Mol Harnstoff; pH 6) eluiert. Der Hauptanteil an Protein eluierte in den ersten Fraktionen bei pH 8,3 - 8,0, enthielt aber nicht A2, das erst in späteren Fraktionen bei pH 7,5 - 7,2 eluierte. Da diese A2 Präparation weitestgehend frei von kontaminierenden Proteinen war, konnte sie zur Sequenzanalyse herangezogen werden. In Fig. 2 ist die Position von A2 durch einen Pfeil angegeben. Dieses Serum reagierte nicht nur mit A2 (starke Bande), sondern auch mit der schwächeren Doppelbande knapp über A2, die höchstwahrscheinlich den Proteinen B1 und B2 entspricht; M = Molekulargewichtsmarker.

Sequenzanalyse von A2

Nach Ausfällung mit Ammonsulfat wurden 20 mg A2 mit Trypsin (0,05 mg/ml in 125 mMol Ammoniumbicarbonat, pH 7,5) 18 Stunden bei 37 °C verdaut, und die proteolytischen Peptidfragmente mittels "Reversed Phase" HPLC aufgetrennt. Fünf der auf diese Weise erhaltenen Peptide wurden sequenziert und ihre Sequenzen

mittels Computeranalyse mit bereits publizierten Proteinsequenzen verglichen. Der Vergleich zeigte, daß alle fünf Sequenzen identisch mit entsprechenden Sequenzabschnitten des A2 Proteins des hnRNP-Komplexes waren, sodaß es sich eindeutig um A2 handelte. In Fig. 3 ist die Aminosäure-Sequenz von A2 nach Burd et al. (5) im Einbuchstaben Aminosäurecode gezeigt. In der Evolution konservierte Sequenzen sind eingerahmt. Die fünf sequenzierten Peptide sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Assoziation von anti-A2-Autoantikörpern mit Autoimmunkrankheiten

Antikörper gegen das Reagens wurden, von wenigen Ausnahmen abgesehen, nur in etwa 35 % von CP-Patienten nachgewiesen. Es wurde nun untersucht, ob die Spezifität auch bei Verwendung von hochgereinigtem A2 erhalten bliebe. Dazu wurden Seren von Patienten mit cP (n=30), SLE (20), MCTD (10), Sjögren's Syndrom (5), Sklerodermie (5), Polymyositis (5), reaktiver Arthritis (20) und Osteoarthritis (15) auf das Vorhandensein von anti-A2 mittels der Immunoblot-Methode untersucht. Dazu wurde die Nitrozellulose durch 30minütige Inkubation mit 10 mMol Phosphatpuffer, 140 mMol NaCl, pH 7,4 (PBS), der 3 % Magermilch enthielt, abgesättigt, und anschließend mit Serum (1 : 25 im selben Puffer verdünnt) 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Nitrocellulose wurde dann mehrmals mit PBS, 0,1 % Triton, pH 8,2, gewaschen und dann mit einem mit alkalischer Phosphatase konjugiertem anti-human IgG Antikörper (Verdünnung 1 : 2500) in 10 mMol Phosphatpuffer, 140 mMol NaCl, 0,1 % Triton X-100 pH 7,4, (PBS-Triton), 3 % Trockenmilch, 30 min weiterinkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS-Triton wurden die an A2 gebundenen Autoantikörper mittels einer durch alkalische Phosphatase katalysierten Farbreaktion nachgewiesen. Außer bei 33 % der cP Seren, wurden deutliche Reaktionen bei 5 % der SLE Seren und bei 30 % der MCTD Seren beobachtet: alle übrigen untersuchten Seren enthielten keine oder nur schwache gegen A2 gerichteten Reaktivitäten. Alle anti-A2 positiven Seren der MCTD Patienten enthielten darüber hinaus noch anti-U1RNP Antikörper, die einen diagnostischen Marker für diese Erkrankung darstellen, wodurch sie sich serologisch von cP unterscheiden läßt.

Die Daten zeigen, daß die zunächst bei Verwendung roher Kernextrakte festgestellte Krankheitsspezifität weitgehend erhalten bleibt, wenn gereinigtes A2 unter den beschriebenen Detektionsbedingungen verwendet wird. Die beobachteten schwachen Reaktivitäten können durch den Einsatz höher verdünnter Seren (1 : 50 - 1 : 100) eliminiert werden.

Identifizierung weiterer cP spezifischer Antigene

Etwa zwei Drittel der A2-positiven Seren enthält noch zusätzliche Reaktivitäten, die gegen Antigene mit etwas höheren Molekulargewichten als A2 gerichtet sind. Die zwei häufigsten sind am Immunoblot zumeist als Doppelbande nachweisbar und haben Molekulargewichte von etwa 36 bzw. etwa 37 kD. Studien mit affinitätsgereinigten Antikörpern zeigten, daß zwischen allen drei Antigenen eine hohe immunochemische Verwandtschaft bestehen muß, da die entsprechenden Antikörper starke Kreuzreaktivitäten zeigten. Diese Reaktivitäten waren auch nachweisbar, wenn gereinigte hnRNP-Komplexe als antigene Quelle verwendet wurden. Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß diese beiden Antigene ebenso wie A2 Bestandteile des hnRNP-Komplexes sind und es sich um die Proteine B1 und B2 handelt: Ausgeprägte Kreuzreaktivität von Kaninchen anti-A2 Antikörpern mit B1 und B2 ist bereits beschrieben worden (5). B1 ist nämlich bis auf eine 12 Aminosäuren umfassende Insertion identisch mit A2 (5) und B2 stellt möglicherweise eine um 52 Aminosäuren verlängerte Version von A1 dar (6). Da keine auffällige Kreuzreaktivität zwischen A1 und A2 gefunden wurde, jedenfalls nicht in unserem Detektionssystem, könnte die Kreuzreaktivität zwischen A2 und B2 am ehesten als Folge dieser Insertion betrachtet werden, durch die ein neues Epitop in das Molekül eingebracht wurde. Andererseits kann dieses Ergebnis auch dahingehend interpretiert werden, daß B2 nicht mit A1 sondern mit A2 sehr nahe verwandt ist, ähnlich wie B1 (5).

Nachweis von Antikörpern

Die reaktiven Antigene A2, B1, B2 können an eine Matrix immobilisiert und mit Körperflüssigkeit in Kontakt gebracht werden. Die Antikörper können mittels nachfolgender Verfahren nachgewiesen werden.

1) ELISA:

Die angereicherten Antigene werden non-kovalent an eine Kunststoffoberfläche, vorteilhafterweise an Mikrotiterplatten, gebunden. Dies geschieht durch mehrstündige Inkubation in einem geeigneten Puffersystem, z. B. Boratpuffer (pH 8,2 bei 4 °C, 100 mMol/l Borsäure, 26 mMol/l Na-Tetraborat, 75 mMol/l NaCl oder Carbonatpuffer, pH 9,6, oder Phosphatpuffer, pH 7,4). Freie Bindungsstellen werden durch Inkubation mit Boratpuffer, der 3 % fettarme Trockenmilch enthält, oder Boratpuffer, der 1 % BSA enthält, abgesättigt. Nach mehreren Waschschrritten erfolgt die Inkubation mit den im Boratpuffer verdünnten Seren (2 Stunden, 37 °C). Antikörper gegen A2 (B1, B2) werden mittels eines gegen den Fc-Teil von humanem IgG gerichteten Antikörpers, der mit alkalischer Phosphatase oder Peroxidase gekoppelt ist, nachgewiesen. Als Substrate für die Enzyme dienen p-Nitrophenylphosphat oder o-Anisidin. Die Intensität der entstehenden Farbe ist direkt proportional der Bindung der Antikörper.

2) Radioimmunoessay (RIA):

In einem analogen Verfahren wird das Antigen an Polystyrol-Kugeln gebunden. Der Nachweis erfolgt ähnlich wie beim Western-Blot-Verfahren durch Inkubation mit einem gegen die Fc-Region des IgG gerichteten Kaninchen-Human-Antikörpers und anschließende Inkubation mit ¹²⁵J-markiertem Anti-Kaninchen-Antikörper. Die Kugeln werden mehrmals gewaschen und die Menge an gebundener Radioaktivität bestimmt. Die gemessene Radioaktivität ist ein direktes Maß für das Vorhandensein der Antikörper.

3) Streifentest:

Die angereicherten Antigene werden durch Auftropfen auf einen Träger (z. B. Nitrozellulose, Nylonmembran) immobilisiert und anschließend mit Seren in Kontakt gebracht. Der Nachweis der Antikörper gegen A2 (B1, B2) erfolgt dann in gleicher Weise wie beim Western-Blot-Verfahren entweder radiochemisch oder photometrisch in Analogie zu dem bei der ELISA-Technik beschriebenen Verfahren.

4) Agglutinationstest:

Bei diesem Verfahren werden die gereinigten Antigene an Partikel, z. B. Latex, adsorbiert. Ein Tropfen des verdünnten Patientenserums wird auf einem Objektträger mit einem Tropfen der Latex-Suspension in Kontakt gebracht. Mit einem dünnen Stab wird gut gemischt und nach 2 bis 5 min auf Agglutination geprüft und mit einem Kontrollserum verglichen. Durch entsprechende Verdünnung der positiven Seren kann der Antikörperfilter halbquantitativ erfaßt werden.

In ähnlicher Weise können auch Erythrozyten mit Antigenen sensibilisiert und durch Antikörper zur Agglutination gebracht werden.

5) Doppelimmundiffusion (DID):

Bei dieser Methode wird die Präzipitation von Antigen-Antikörper-Komplexen in einem Trägermedium, vorzugsweise Agarose, nachgewiesen. Dazu werden in die Agarose Löcher gestanzt, wobei das Antigen in das mittlere Loch, die Seren in die radialen Löcher gefüllt werden. Eine Präzipitationslinie deutet auf das Vorhandensein von Antikörpern hin. Ihre Identität kann durch Vergleich mit monospezifischen Kontrollseren überprüft werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Core-Proteine A2, B1 oder B2 des heterogenen nuklearen Ribonukleoproteinkomplexes des Zellkerns eukaryotischer Zellen oder Teilsequenzen davon als diagnostisches Mittel, insbesondere zur Diagnose von chronischer Polyarthrit.

2. Verwendung der Core-Proteine bzw. Teilsequenzen nach Anspruch 1, um festzustellen, ob in menschlichen oder tierischen Körperflüssigkeiten, z. B. in Seren, für diese Proteine spezifische Antikörper vorhanden sind.

Hiezu 3 Blatt Zeichnungen

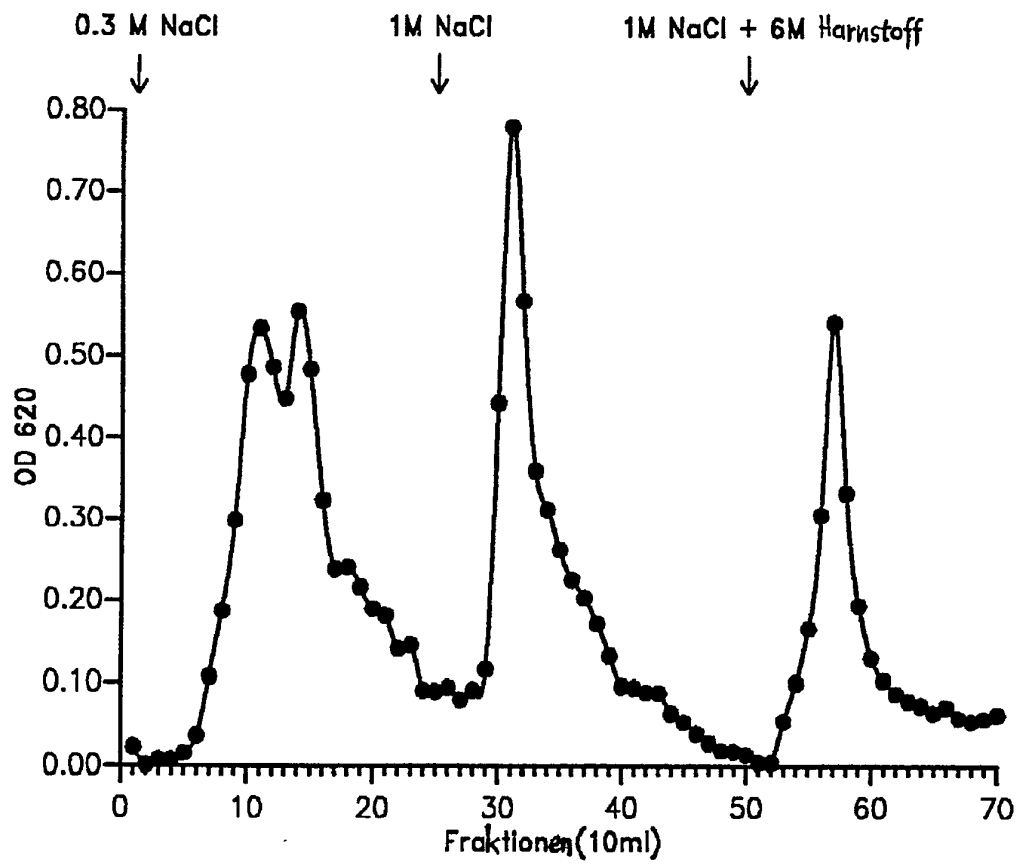


Fig. 1

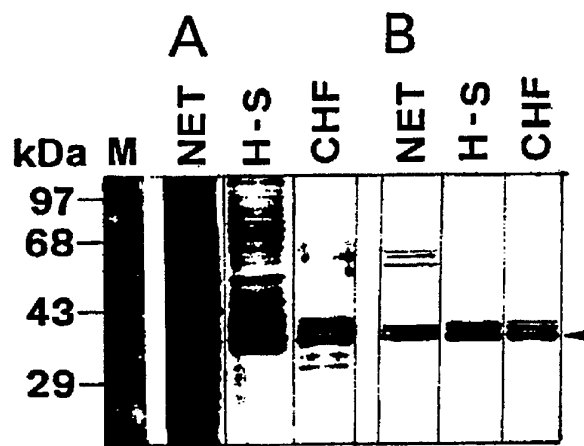


Fig. 2

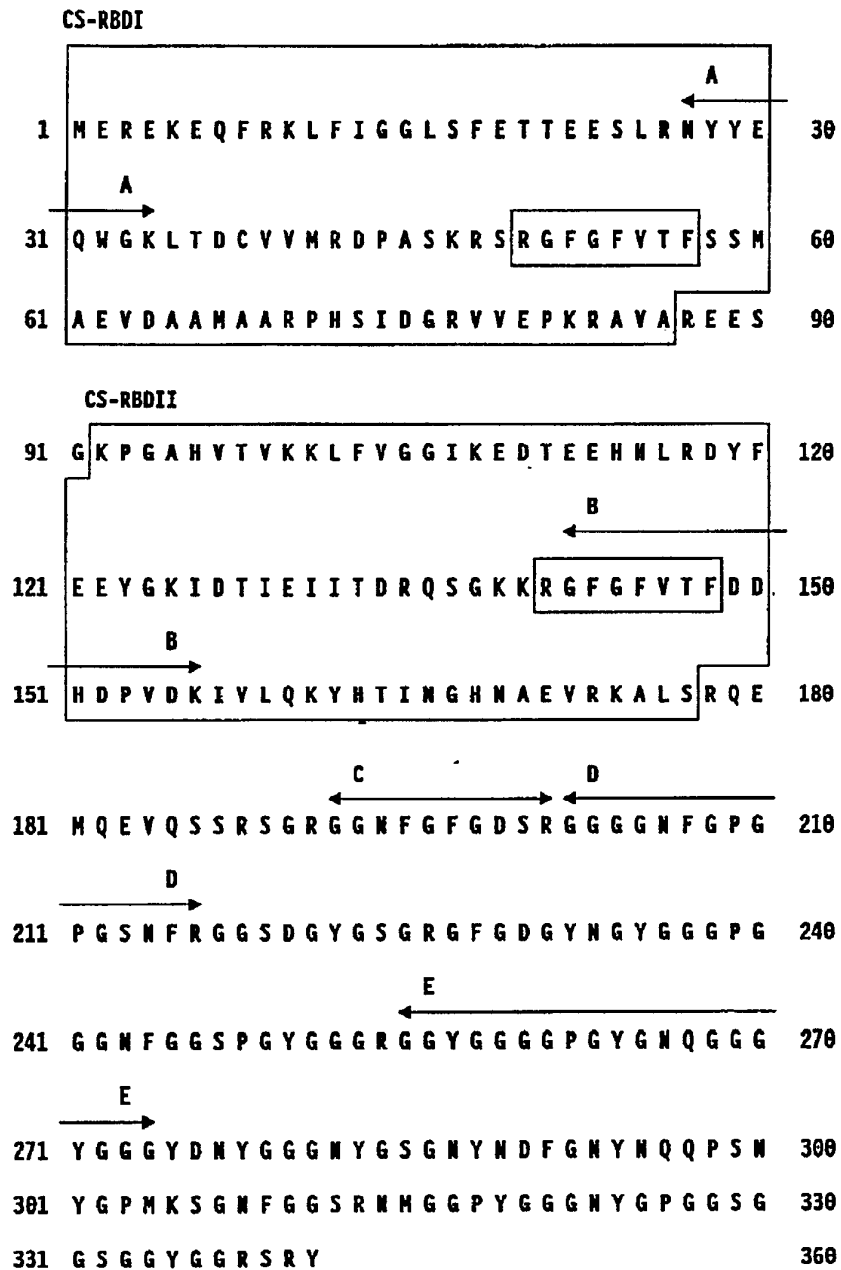


Fig. 3