

## 4. Diskussion

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden differentiell exprimierte Gene der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) untersucht. Die Gene wurden in einen Expressionsvektor kloniert und anschließend über Phage Display Antikörper hergestellt.

Im zweiten Teil der Arbeit konnten durch die Methode des Plasmascreenings auf Hochdichte-Proteinarrays Autoantigene identifiziert werden, die bei der autoimmunen Form der DCM möglicherweise eine entscheidende Rolle spielen.

### 4.1. Proteinexpression und Phagenantikörper-Selektion differentiell exprimierter Gene aus menschlicher Herz cDNA

Von 26 differentiell exprimierten Genen konnten 18 Gene kloniert und 12 exprimiert werden. In dieser Arbeit wurden für das Phage Display nur nativ aufgereinigte Proteine verwendet, die in *E. coli* exprimiert worden sind. *E. coli* hat den Vorteil einer einfachen Handhabung, es ist kosteneffizienter und, was noch wichtiger für den Einsatz der Proteine im Phage Display ist, dass eine große Menge an heterologen Proteinen (1.5-20 µg/ml) produziert werden kann.

Gegen sechs der zwölf exprimierten Proteine konnten polyklonale Phagenantikörper selektiert werden und gegen zwei dieser Proteine monoklonale Phagenantikörper. Das heißt, dass gegen 50 % der Proteine erfolgreich Phagenantikörper identifiziert werden konnten. Daraus ergibt sich aber auch die Frage, weshalb sich gegen die andere Hälfte der Proteine keine Antikörper selektieren ließen. Hierbei könnten verschiedene Faktoren einen Einfluss haben. Beispielsweise ist die Qualität einer Phagen-Bibliothek und damit die Affinität, sowie die Häufigkeit der antigenspezifischen Klone von großer Bedeutung. Diese wird stark durch die Quelle, aus der die Gene der variablen Domänen stammen, beeinflusst. Die Antikörpergene können z.B. aus natürlichen Quellen stammen, wie immunisierten Tieren, von Genen naiver Individuen oder sie werden auf synthetischem Wege erstellt (vgl. 1.5.1.).

Naive oder synthetische Bibliotheken sind Quellen von Antikörpern gegen eine große Vielzahl von Antigenen (Hoogenboom und Chames, 2000). Bei der Bibliothek, die in dieser Arbeit verwendet wurde handelte es sich um eine synthetische Bibliothek aus zufälligen PCR-Produkten der CDR2- und CDR3-Gensegmente mit einer Größe von  $10^{12}$  Phagen,

wobei davon ungefähr  $10^8$  unterschiedliche variable Domänen auftraten (Holt *et al.*, 2000). Das menschliche B-Zell-Repertoire liegt ungefähr bei  $10^{12}$  Zellen (Rolink *et al.*, 1993), sodass die Möglichkeit besteht, dass bei der in dieser Arbeit verwendeten Phagen-Bibliothek zum einen die Diversität nicht ganz ausreichte, um alle potentiellen Epitope zu erfassen und zum anderen aber auch die Möglichkeit von zu geringen Affinitäten bestand.

Neben der Qualität der Phagen-Bibliothek kann der Erfolg der Selektion auch durch die Konformationseigenschaften des Proteins beeinflusst werden. Es ist für viele Proteine beschrieben, dass es bei der Expression in *E. coli* zu Fehlfaltungen der Proteine kommen kann. Aktive Proteine besitzen *in vivo* häufig Kofaktoren oder kommen als Multienzym-Komplex vor, was zu einer Stabilisierung der Konformation führt (Knippers, 1997). Damit kann eine rekombinante Expression, in der begleitende Kofaktoren, Chaperone oder assoziierte Bindungspartner fehlen, zu möglichen Fehlfaltungen führen, sodass "artifizielle" Epitope präsentiert werden, gegen die in der Phagen-Bibliothek keine Liganden enthalten sind. Weiterhin hat auch die Immobilisierung der Proteine an magnetische Partikel einen Einfluss auf die Epitoperkennung. Wenn beispielsweise das Protein durch eine nach der Expression durchgeführten Biotinylierung modifiziert wurde, kann es durch die resultierende Einführung einer Vielzahl von Biotinen auch zu einer stark ungeordneten Immobilisierung an die verwendeten Streptavidin-Beads kommen. Verfügt die proteinkodierende Sequenz dagegen über eine zusätzliche Sequenz, die der Biotinylierungserkennungssequenz entspricht, erfolgt eine direktionale Immobilisierung. Dies erscheint schonender, allerdings können auch hierbei Fehlfaltungen, die einen möglichen Einfluss auf die Gesamtkonformation des Proteins haben, nicht ausgeschlossen werden.

Darüber hinaus haben die Selektionsbedingungen an sich einen Einfluss auf die Effizienz der Selektion. Der Einsatz von großen Mengen Protein ist für das Phage Display wichtig, um die Konkurrenz mit dem Blocking-Agenz zu verringern, da es ebenfalls zum Target für die Selektion wird, vor allem, wenn die Blocking-Substanz in den Bindungslösungen vorhanden ist wie es bei PTM der Fall war (Liu *et al.*, 2002). Eine andere bereits erwähnte Problematik liegt in der Verringerung der Phagen-Diversität bei Steigerung der Selektionsrunden. Hierbei verdrängen die höher affinen Phagen die weniger affinen Phagen, was zu einer Verringerung der Diversität führt und damit zur geringeren Selektionseffektivität der spezifischen Phagen gegen wichtige Epitope.

Ab der dritten Selektionsrunde erzielt man meist eine messbare Anreicherung spezifischer Phagen. In einigen Fällen konnte beobachtet werden, dass eine Verminderung spezifischer Phagen von der dritten zur vierten Runde aufgetreten ist (z.B. MYL2). Dies lässt sich durch teils dominierende Antikörper, die eine sehr hohe Antigenaffinität besitzen, erklären, sowie durch den Einfluss der Expression des Antikörpers auf das Wachstumsverhalten des Wirtes. Stört die Expression des einen Antikörpers seinen Wirt im Wachstum mehr als der konkurrierende Antikörper, folgt daraus die oben erwähnte Verminderung von der dritten zur vierten Runde (Stausbøl-Grøn *et al.*, 2001).

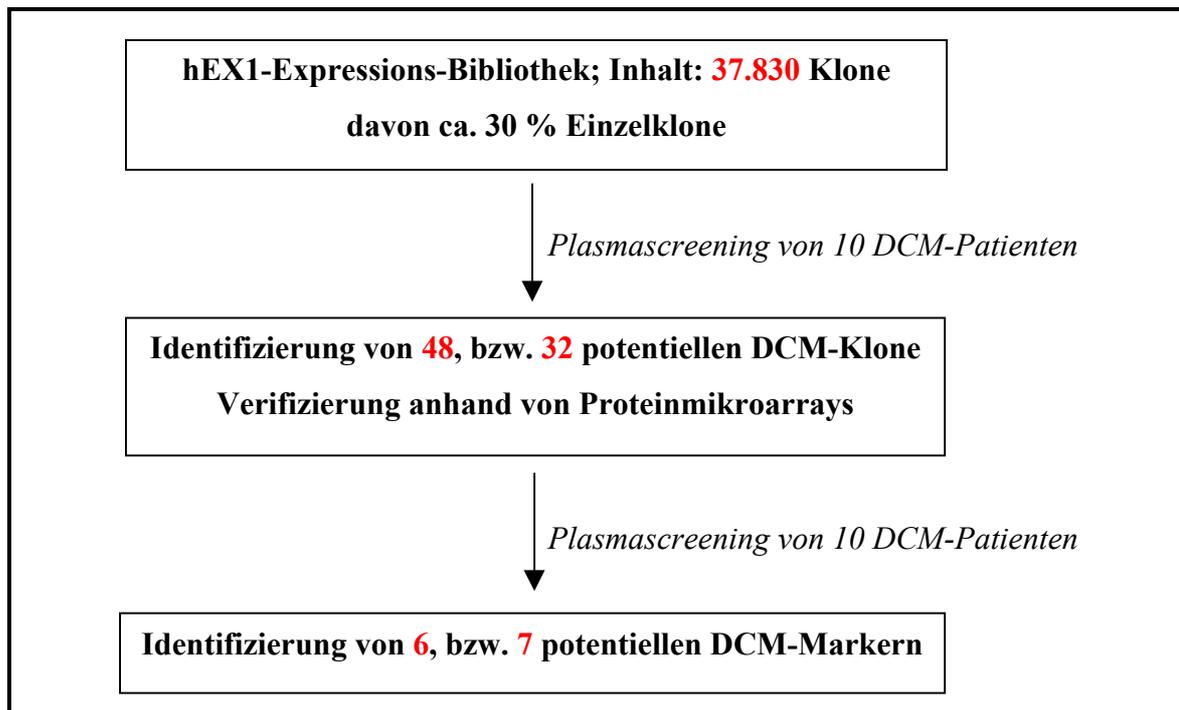
Zur Verifizierung wurden die Phagen auf Western-Blots und in der Immunhistochemie getestet. Es wurde festgestellt, dass die scFv's zu unspezifisch im Präparat banden und sich zudem als zu instabil erwiesen (mündliche Auskunft Zoltán Konthur, MPI für molekulare Genetik, Berlin). Dies lässt sich mit großer Wahrscheinlichkeit auf die geringe Größe der scFv's zurückführen. Beispielsweise setzt die Morphosys AG dimere Fabs in der Immunhistochemie ein und konnte mit diesen gute Erfolge erzielen (<http://www.morphosys.de/de/frame.asp?w=181>). Auch die Versuche, bei denen Proteine aus verschiedenen Geweben isoliert wurden, auf PVDF-Membran aufgebracht und gegen die spezifischen Phagen direkt getestet, waren in ihren Ergebnissen sehr unspezifisch (vgl. 3.1.3.2.2.) (Liu *et al.*, 2000). Abhängig vom eingesetzten Klon der monoklonalen Phagen gab es starke bis mittlere Hintergrundsignale.

#### **4.1.1. Fazit**

Das Ziel bestand darin, Antikörper im Hochdurchsatz-Verfahren gegen differentiell exprimierte Gene von DCM-Patienten zu erhalten. Diese Antikörper sollten die anschließende funktionelle Charakterisierung dieser Proteine mithilfe der Immunhistochemie unterstützen, d.h., Zeitpunkt und Vorkommen im Gewebe bei DCM-Patienten, um Proteine, die eine Rolle bei der DCM spielen nachzuweisen und letztendlich diagnostische und prognostische Informationen zu erhalten. Die Methode des Phage Display ist eine gute Technik, um auf schnellem, kosteneffektiven Weg unter Umgehung von Tierversuchen Antikörper zu generieren. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist anzumerken, dass die Methode noch nicht zu wirklich effizienten Ergebnissen kommt. Dies hängt zum Teil auch mit der Qualität der verwendeten Quellen und von den verwendeten Targets ab.

## 4.2. Untersuchung der dilatativen Kardiomyopathie mit Hilfe einer menschlichen fötalen Expressionsbibliothek

Fu *et al.* haben 2002 bei *in vivo* und *in vitro* Studien mit anti-Rezeptor Autoantikörpern und anderen Autoantikörpern gezeigt, dass eine Subgruppe der DCM autoimmun bedingt ist. Die DCM weist eine starke Heterogenität auf, was beinhaltet, dass verschiedene Subgruppen von DCM unterschiedliche Pathogenitäten besitzen, wie im theoretischen Teil dargestellt wurde (vgl. 1.3.) (Fu *et al.*, 2002). Im Rahmen der Arbeit wurden zunächst über klonale Hochdichte-Proteinfilter mit 37.830 immobilisierten Proteinen 48 als putative Targets eingegrenzt, die über IgG-Antikörper ermittelt wurden, sowie 32 Proteine, die von IgG3-Antikörpern erkannt wurden. Darauf folgte eine präzisere Validierung mittels Protein-Mikroarrays, wobei zum einen sechs Proteine bei den IgG-Versuchen identifiziert werden konnten und sieben bei der Autoantikörper-Detektion durch IgG3-Antikörper (vgl. Abb. 32).



**Abb. 32: Überblick über die Identifizierungsschritte der potentiellen DCM-Marker.**

Ürsprünglich standen 37.830 redundante Expressionsklone auf der hEX1-Bibliothek als potentielle Autoantigene für das Screenen von DCM-Plasma zur Verfügung, wobei davon ca. 12.000 unterschiedlich sind. Nach dem ersten DCM-Plasmascreening der hEX1-Bibliothek, konnten mit dem IgG-Antikörper 48, bzw. mit dem IgG3-Antikörper 32 mögliche Autoantigene identifiziert werden. Nach einem Neuordnen dieser Proteine und einem weiteren Plasmascreening auf einem Proteinchip waren am Ende bei der IgG-Detektion noch 6 und bei der IgG3-Detektion noch 7 potentielle DCM-Marker übrig geblieben.

#### 4.2.1. Auswertung der Ergebnisse vom Plasmascreening auf der Expressionsbibliothek

Das Screenen von Plasma von DCM-Patienten und von gesunden Kontrollen erfolgte anfänglich auf der Expressionsbibliothek hEX1, die aus cDNA von humanem fötalen Hirngewebe erstellt wurde (Büssow *et al.*, 1998). Um Hintergrundsignale, d.h., Kreuzreaktionen von den verwendeten sekundären Antikörpern (anti humanes IgG und anti Maus-AP) auszuschließen bzw. diese ausfindig zu machen, wurden die Antikörper ohne vorherige Inkubation mit Plasma auf den hEX1-Filtern getestet. Das Auftreten von Kreuzreaktionen liegt wahrscheinlich an der limitierten Spezifität dieser sekundären Antikörper. Die Antikörper-Spezifität ist durch die Bindungs-Affinität an bestimmte Epitope definiert und wird in der Regel nicht gegen ganze Expressionsbibliotheken getestet. Diese Kreuzreaktivität könnte man sich aber auch zunutze machen, um beispielsweise Antigene mit ähnlichen Epitopen auf einem Array zu identifizieren (Büssow, Dissertation, 1998).

Bei den Screeningversuchen wurde das Plasma der Patienten und der Kontrollen verwendet. Der Unterschied von Plasma zu Serum besteht darin, dass dem Serum der Gerinnungsfaktor Fibrinogen fehlt und, dass das Plasma einfacher zu separieren ist von den zellulären Blutbestandteilen. Weiterhin erhält man routinemäßig mehr Plasma als Serum, wenn von der gleichen Gesamtblutmenge ausgegangen wird, sodass ein höherer totaler Proteingehalt im Serum vorliegt. Es bestehen einige methodische Unterschiede, wenn es darum geht, Substanzen wie z.B. Cholesterin, Lactat Dehydrogenase, Alkalische Phosphatase u.a. im Plasma bzw. Serum zu untersuchen (Lum und Gambino, 1974). Es zeigte sich aber, dass bei der Identifizierung von Autoantikörpern unter Verwendung von Plasma oder Serum keine Unterschiede festgestellt wurden. In dieser Arbeit wurden neben Plasma auch isolierte Immunglobuline von DCM-Patienten, welche während der Immunadsorptionstherapie anfielen, auf den Protein-Filtern der hEX1-Bibliothek getestet. Dabei wurden nur ungefähr ein Drittel von den Antigenen auf den Filtern detektiert im Vergleich zu denjenigen, die mit Plasma identifiziert wurden. Dies läßt sich mit großer Wahrscheinlichkeit darauf zurückführen, dass die aufgereinigten Immunglobuline stark verdünnt waren, sodass schwach konzentrierte Autoantikörper möglicherweise in nicht detektierbaren Konzentrationen vorlagen.

#### 4.2.2. Das Vorkommen von natürlichen Autoantikörpern

Bei der Identifizierung der positiven Klone stellte sich heraus, dass im allgemeinen die Kontrollplasmen weniger positive Signale zeigten als die Patientenplasmen. Da es sich um eine redundante Bibliothek handelte und nicht alle detektierten Klone sequenziert wurden, kann keine qualitative Aussage über diesen Befund getroffen werden. Allerdings konnte eine gewisse Schnittmenge zwischen den Kontrollen und den Patienten ausgemacht werden (vgl. Tab. 4), was die Vermutung bestätigt, dass die Patienten mehr Autoantikörper pro ml Plasma aufwiesen und dies damit ein Hinweis war, dass eine autoimmune Erkrankung vorliegen könnte. Durch das Screenen von Plasma auf der hEX1-Proteinexpressions-Bibliothek mit über 37.500 Expressionsklonen ist es möglich, eine gleichzeitige Einschätzung von vielen verschiedenen Antikörper-Reaktivitäten mit Autoantigenen zu treffen.

Dass auch die Kontrollplasmen positive Signale auf den Filtern zeigten, bestätigt die Tatsache, dass jeder Mensch bzw. jedes Wirbeltier von Geburt an ein gewisses Repertoire an sog. natürlichen Autoantikörpern (NAA) besitzt (Unwin *et al.*, 2003).

Die NAA sind vor allem gegen Autoantigene gerichtet, bei denen es sich meist um konservierte Protein-Strukturen handelt (Marchalonis *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurden vor allem intrazelluläre Proteine des Zytoskeletts wie Stathmin, Tubulin und Myosin von natürlichen Autoantikörpern identifiziert. Dies bestätigen Untersuchungen von Pashov *et al.*, die ebenfalls unter anderem Tubulin, Myosin, HSP und Aldolase als Autoantigene identifiziert haben (Pashov *et al.*, 2002). Es konnten jedoch keine Literaturhinweise gefunden werden, in denen Stathmin als natürlicher Autoantikörper auftritt. Allerdings konnte es in den Plasmascreening-Versuchen bei über 80 % der eingesetzten Proben identifiziert werden. Die Stathmin-Familie zählt vier Mitglieder: Stathmin, SCG10, SCLIP und RB3, bei denen es sich um kleine Phosphoproteine handelt, die Stathmin-Domänen besitzen und die Zell-Proliferation und Differenzierung regulieren und dabei auch eine Interaktion mit zwei alpha-beta Tubulin Heterodimeren eingehen (Bièche *et al.*, 2003).

Die bisher durchgeführten Studien, die man zu den natürlichen Autoantikörpern findet, lassen vermuten, dass entweder das Keimbahn-Repertoire, das IgM-Antikörper im Fötus kodiert, evolutionär Autoantikörper gegen Autoantigene selektiert oder dass das B-Zell-Repertoire von Neugeborenen nach Selbsterkennung während der fötalen Entwicklung selektiert wurde (Lacroix-Desmazes *et al.*, 1998). Die NAA gehören zu den IgM-, IgG- und

IgA-Isotypen, allerdings herrscht in adulten Individuen die IgG-Klasse vor (Avrameas *et al.*, 1991).

Untersuchungen von Lacroix-Desmazes *et al.* haben während einer Studie, in der bei Individuen nach über 25 Jahren erneut der Autoantikörper-Level bestimmt wurde, keine Erhöhung der Autoantikörper im Alter ausmachen können (Lacroix-Desmazes *et al.*, 1999). Dies steht allerdings im Gegensatz zu der ermittelten Diversifikation, die beim Repertoire von IgG-Antikörpern gegen fremde Antigene mit Zunahme des Alters gemacht wurde. Demnach würde diese Studie bestätigen, dass die natürlichen Autoantikörper einer positiven Selektion unterliegen, die gegen ein eingeschränktes Set von Autoantigenen gerichtet sind und in allen Individuen auftauchen (Lacroix-Desmazes *et al.*, 1995). Die Rolle dieser natürlichen Autoantikörper ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Dass die Autoantikörper sich in ihrem Repertoire von Individuum zu Individuum leicht unterscheiden, könnte auf unterschiedliche Antigene von verschiedenen Pathogenen zurückzuführen sein oder auf genetische Unterschiede sowie auf lokale Umwelteffekte (Marchalonis *et al.*, 2002). Auf der anderen Seite scheinen diese natürlichen Autoantikörper die Aufgabe der Regulation und funktionalen Homöostase zu besitzen, da sie invariante Zellen und Serumkomponenten erkennen und augenscheinlich Funktionen in der zellulären Regulation oder dem Entfernen von alternden oder beschädigten Zellantigenen haben (Kay *et al.*, 1975). Weiterhin wird vermutet, dass NAAs an konstante oder variable Regionen von Immunglobulinen binden und dadurch die Beseitigung von zirkulierenden Immunkomplexen fördern (Hay *et al.*, 1976). Generell sind NAA polyreaktiv und weisen eine geringe bis mittlere Affinität auf (Bendzen *et al.*, 1989; Avrameas *et al.*, 1991). Aufgrund der Polyreaktivität oder Kreuzreaktivität können NAAs auch Pathogene binden, weshalb man ihnen eine Rolle in der natürlichen „nicht-spezifischen“ Immunabwehr zukommen lassen könnte (Michel *et al.*, 1990).

Es gibt wahrscheinlich nur wenige Autoantigene, deren Peptide durch ein bestimmtes MHC-Molekül in einer Menge präsentiert werden, die ausreicht, um von den T-Effektorzellen erkannt zu werden, die aber für die Induktion der Toleranz zu gering ist. Es scheint ausgeschlossen, dass diese natürlichen Autoantikörper bei gesunden Individuen eine Autoimmunität auslösen. Zwar ließen sich auch Autoantigene identifizieren, die bei Autoimmunkrankheiten eine Rolle spielen, wie z.B. das Thyreoglobulin der Schilddrüse, aber in diesem Fall wird angenommen, dass sich dann die Epitop-Spezifität dieser

Antikörper von den pathogenen Autoantikörpern unterscheidet (Unwin *et al.*, 2003). Dabei stellt sich die Frage, warum bei der Bindung des einen Epitops eine Autoimmunantwort ausgelöst wird, die Bindung eines anderen Epitops aber keine weiteren Auswirkungen hat. Dies lässt sich möglicherweise mit dem individuellen MHC-Genotyp erklären, da MHC-Polymorphismen die Affinität der Peptidbindung stark beeinflussen (Janeway *et al.*, 1997). Dies würde auch einen Zusammenhang zwischen Autoimmunerkrankungen und bestimmten MHC-Genotypen erklären und eine genetische Prädisposition einiger Autoimmunerkrankungen erklären, sowie die Tatsache, dass verschiedene Individuen mit derselben Autoimmunkrankheit die gleichen Antigene in körpereigenen Geweben erkennen. In Rahmen dieser Arbeit konnte diese Feststellung bestätigt werden. Beim Screening der Plasmen mit der hEX1-Bibliothek und der Detektion durch den IgG-Antikörper wurde das Protein Tubulin-alpha als natürlicher Autoantikörper ermittelt, da es in 70 % der Individuen, unabhängig ob es sich um gesunde oder erkrankte Individuen handelte, auftrat. Bei der gleichen Versuchsdurchführung, aber einer Detektion mit dem Antikörper IgG3 wurde hingegen das Tubulin-alpha als potentieller DCM-Marker ermittelt, da nur Autoantikörper von kranken Individuen das Protein gebunden hatten. Dies bestätigt auch die Ergebnisse, die Warraich *et al.* und Staudt *et al.* mit IgG3 ermittelt haben (Warraich *et al.*, 2002; Staudt *et al.*, 2002).

### **4.3. Protein-Mikroarrays**

Spätestens seit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms, hat sich das Interesse auf die Expression dieser Gene gerichtet und damit auf ein weites Feld weiterer nachfolgender Untersuchungen zum völligen Verständnis der Gesamtheit der Proteine, dem sogenannten Proteom. Die Aufgabe der Entschlüsselung des Proteoms ist mit Sicherheit aufwendiger als die Sequenzierung des Genoms, jedoch sind viele neue Technologien in der Entwicklung. Viele dieser Entwicklungen haben ihre Wurzeln in der erfolgreichen Anwendung von Makro- und Mikroarrays (Lopez *et al.*, 2003).

Der Vorteil von Proteinarrays für die Medizin liegt in der Anwendbarkeit für die Diagnostik. Proteinarrays sind unter anderem sinnvoll für den Nachweis von vorhandenen, bzw. nicht vorhandenen Proteinen und der Spezifität des Antikörperrepertoires von autoimmunen Erkrankungen. Diese Methode erlaubt eine eindeutige Diagnose der

Krankheit, was besonders wichtig ist, wenn klinisch heterologe Symptome vorliegen wie es bei der DCM der Fall ist, oder wenn im frühen Krankheitsverlauf die Symptome uneindeutig sind. Es lassen sich damit möglicherweise die Art der Krankheit oder sogar Subtypen, sowie neue Autoantigene erkennen. Die Suche nach krankheitsspezifischen Proteinen ist allgemein wichtig für die biomedizinische Forschung. Zudem besitzen diese Proteine ein kommerzielles Potential als Krankheitsmarker und als Medikamenten-Targets (Cahill, 2001).

Während man bei Antikörpercharakterisierungen und Plasmascreening das gängige Arrayformat verwenden kann, d.h., die Proteine liegen denaturiert in Harnstoffpuffer vor, ist es für andere Applikationen wie der Protein-Protein-, Protein-Ligand- oder der Protein-Medikament-Interaktion von Nachteil, da hierfür die Proteine nativ vorliegen und eine richtige Faltung aufweisen müssen (Cahill, 2001). Neuere Untersuchungen zeigen, dass dieses Problem unter Umständen gelöst werden kann, wenn die Proteine in PBS mit 40 % Glycerin aufbewahrt werden, um die Verdunstung der Nanotropfen, die das Protein enthalten, zu verhindern. Zudem werden die Proteine auf Glasobjektträger gespottet, die mit aldehydhaltigen Silanen behandelt wurden, wodurch die Proteine kovalent auf der Glasoberfläche gebunden werden können und somit ihre Fähigkeit, andere Proteine oder kleine Moleküle in Lösung zu binden, beibehalten (MacBeath und Schreiber, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proteine allerdings denaturiert auf die Chipoberfläche aufgetragen, da das Screenen auf den großen Filtern der hEX1-Bibliothek ebenfalls mit denaturierten Proteinen erfolgte und somit Kohärenz der Ergebnisse gewährleistet war.

#### **4.3.1. Erzeugung eines Proteinchips mit potentiell relevanten DCM-Proteinen**

Mit der Methode des Plasmascreenings auf Proteinexpressions-Bibliotheken sind wir in der Lage, eine große Anzahl von Proteinen, die möglicherweise als Autoantigene bei DCM-Patienten auftreten, zu isolieren, zu exprimieren und aufzureinigen.

Für die Herstellung sogenannter DCM-Chips wurden Proteine verwendet, die bei den jeweiligen Plasmascreening-Experimenten auf den Filtern der hEX1-Bibliothek und anschließender Detektion mit IgG-, bzw. IgG3-Antikörpern identifiziert wurden. Dabei konnten bei der Versuchsdurchführung mit dem IgG-Antikörper 48 potentiell relevante

Proteine identifiziert werden und mit dem IgG3-Antikörper 32 Proteine. Nach Aufbringung der Proteine auf den Chip erfolgten die anstehenden Inkubationen mit den Plasmen.

Der größte Unterschied zwischen den Filtern der hEX1-Bibliothek und den Proteinchips bestand in der Qualität der aufgebrauchten Proteine. Auf den Mikroarrays lagen die Proteine in aufgereinigter Form vor, während sie auf den Filtern in klonaler Form vorlagen. Dies resultierte in einer deutlich höheren Sensitivität der Mikroarrays. Bei den klonalen Filtern bestand zudem die Möglichkeit, dass *E. coli*-Bestandteile, die sich möglicherweise nach Entfernen der Kolonien noch auf den Filtern befanden, Bindeepitope zum Teil blockieren konnten oder aber zusätzlich Epitope liefern, durch die Kreuzreaktionen hervorgerufen werden konnten. Aus diesem Grunde empfiehlt sich nach dem Screening auf den großen Filtern eine Folge-Analyse der möglichen positiven Klone auf den Mikroarrays. Durch die erhöhte Sensitivität der Mikroarrays lässt sich möglicherweise auch erklären, warum hier zum Teil Proteine sowohl von Patientenplasmen als auch von Kontrollplasmen gleichermaßen erkannt wurden, die aber vormals auf den Filtern ausschließlich von Patientenplasma detektiert worden waren. Auch Robinson und Mitarbeiter haben aufgrund dieser höheren Sensitivität weite und überlappende Autoantikörper-Antworten auf den Arrays beobachten können (Robinson *et al.*, 2002).

Weiterhin ließ sich beobachten, dass Proteine zwar auf den klonalen Filtern erkannt wurden, aber in aufgereinigter Form auf den Mikroarrays keine Interaktion mehr zeigten wie beispielsweise in dem Fall des Proteins Peroxisom-Biogenesis-Faktor 13 (PEX13). Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die für das Protein kodierende Sequenz in einem anderen Leserahmen lag als der am N-terminalen Ende befindliche RGSHis<sub>6</sub>-Epitop-Tag. In Verbindung mit der polycistronischen Transkriptionsmaschinerie von *E. coli* findet man neben dem artifiziellen RGSHis<sub>6</sub>-Tag-Fusionsprotein auch, sofern intern Startcodons in einem einigermaßen akzeptablen Kontext liegen, Peptide aus den anderen Leserahmen, welche den Autoantikörper binden. Liegen die Proteine also unaufgereinigt und auf den Filtern immobilisiert vor, kann eine Antikörper-Bindung nachgewiesen werden. Ist jedoch nach Aufreinigung nur noch das artifizielle RGSHis<sub>6</sub>-Fusionsprotein vorhanden, kann diese Antikörper-Bindung nicht mehr stattfinden. Dies ist beispielsweise ein möglicher Grund dafür, dass sich die Zahl von 48 auf 6 putative DCM-Markern reduzierte.

Dass gesunde Kontrollen auch an die ermittelten Proteine binden, scheint an dem heterogenen Krankheitsbild der DCM zu liegen. Auch Matsui hat 1995 bei Untersuchungen

an  $\beta$ - und M2-Rezeptoren Kontrollen detektiert, die an die Rezeptoren banden (Matsui *et al.*, 1995). Zudem scheint eine Abhängigkeit zwischen der Intensität des Hintergrundes auf dem Array, mit der Konzentration des Proteins zu bestehen. Generell lassen sich Proteine noch bei einer absoluten Konzentration von 100 pg/ml detektieren (Haab *et al.*, 2001).

Bei der leichten Kette des skeletalen Myosins, das als Positivkontrolle auf den Chips eingesetzt wurde, konnte die Beobachtung gemacht werden, dass erst bei einer 1:2 Verdünnung des Proteins, sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Patienten, 2-4 fach höhere Werte vorlagen als bei der immobilisierten unverdünnten Form. Ähnliche Beobachtungen konnten mit Tubulin gemacht werden. Hier waren die Werte bei einer 1:5-Verdünnung ungefähr 8fach höher als bei der 1:2-Verdünnung. Zudem traten aber diese hohen Signalwerte nur bei den Patientenplasmen auf, sodass Tubulin beim IgG3-Versuch als potentieller DCM-Marker identifiziert werden konnte. Der Grund für die höheren Signalwerte bei höheren Verdünnungen könnte daran liegen, dass sich diese Proteine wie in der Zelle auch, bei höherer Konzentration zusammenlagern und die Epitope für die Antikörper dabei verdecken. Die Epitope werden dann erst durch eine Verdünnung für die Autoantikörper zugänglich. Zusätzlich kann es bei einigen Proteinen, wie beim Myosin, zu gestörten Wechselwirkungen zwischen Antikörper und Antigen durch eine Verdrängungsreaktion mit hohen Konzentrationen des reinen Epitops kommen. Daher sind die Signalstärken bei diesen Proteinen bei der unverdünnten Stufe niedriger als bei einer Verdünnung des Proteins.

Der Nachteil der verwendeten Proteinarrays ist darin zu sehen, dass mit großer Wahrscheinlichkeit einige Autoantigene nicht detektierbar waren, was vermutlich am Verlust der dreidimensionalen Struktur, den sterischen Interferenzen oder elektrostatischen Abstoßungen gelegen hat (Robinson *et al.*, 2002).

Verbesserungen dieser Methode sind wahrscheinlich möglich durch Anpassung der Oberflächen und der Bedingungen für die Bindung von strukturell und chemisch heterogenen Autoantigenen (Robinson *et al.*, 2002). Desweiteren könnte man in folgenden Screeningversuchen native Proteine einsetzen.

Generell ist die Anwendung der Autoantigen-Array-Technologie eine gute Methode für eine frühe Diagnose und Behandlung von Autoimmunerkrankungen durch schnelles Erkennen von spezifischen Autoantikörpern bei autoimmunen Erkrankungen durch Screening.

Die Vorteile dieser Technologie sind u.a.:

- Die Antigenerkennung, die mit dem fluoreszenzmarkierten zweiten Antikörper kann noch im Nanogramm-Bereich erfolgen.
- Der Antigenarray ist 4-8 mal sensitiver bei der Detektion von Autoantikörpern als die ELISA-Technik.
- Mit dem Array ist eine Identifizierung der Immunglobulin-Subklassen der beteiligten antigenspezifischen Autoantikörper möglich (z.B. sind beim systemischen Lupus erythematosus (SLE) IgG1 und IgG3-Antikörper beteiligt).

#### **4.3.2. Ergebnisse der Proteinmikroarrays**

Auf den Proteinchips erfolgte ein Plasmascreening mit denselben Plasmen von Patienten und Kontrollen, sowie noch vier zusätzlichen Kontrollen und anschließend mit den jeweiligen ersten Antikörpern (IgG und IgG3). Mit Hilfe dieses Versuches konnte eine noch engere Eingrenzung der potentiellen DCM-Markern erfolgen. Der Grund dafür war, dass durch Chip-Hybridisierungen eine quantitative Auswertung erfolgen konnte, anders als bei Hybridisierungen auf den großen Filtern der hEX1-Bibliothek. Hier kann zum einen durch das Scannen mit einem Laser und zum anderen durch die Verwendung einer Image Software eine genauere Auswertung der Signalintensitäten aufgrund der höheren Pixelanzahl pro Spot erfolgen. Bei den Mikroarrays konnte ein Faktor zwischen den einzelnen Signalwerten der Proteine ermittelt werden, der sich aus dem Verhältnis der Signalwerte von Patientenplasma zu Kontrollplasma errechnete. Es wurden am Ende die Proteine ausgewählt, bei denen die Patienten gegenüber den Kontrollen einen erhöhten Faktor von mindestens 1,5 aufwiesen. Dabei konnten im ersten Versuch mit dem IgG-Antikörper sechs potentielle Kandidaten identifiziert werden und beim zweiten Versuchsansatz mit IgG3 waren es sieben Kandidaten.

Bei den gefundenen Proteinen handelte es sich zum einen um zytoplasmatische Proteine wie Tubulin und das paraneoplastische Antigen MA3. Zum anderen traten einige zelluläre Proteine auf wie die Histon-Deacetylase, das Cyclin G1 interagierende Protein, das RAD23-Protein sowie auch das paraneoplastische Antigen MA3, das zytoplasmatisch auftritt. Desweiteren kamen auch zwei membranassoziierte Proteine vor, das Kalium-Kanal-interagierende Protein 1 (KChIP) und das Fas-Ligand assoziierte Protein (FADD). Im Folgenden werden die Kandidatengene einzeln diskutiert.

#### **4.3.2.1. Vergleich der Ergebnisse mit bereits identifizierten krankheitsrelevanten Autoantigenen**

Unter den in dieser Arbeit identifizierten potentiellen DCM-Autoantigenen findet sich kein Protein, das in der Literatur bereits als DCM-Marker bekannt ist. Die Gründe hierfür werden im folgenden diskutiert.

Da es sich bei der hEX1-Bibliothek um eine cDNA aus fötalem Hirngewebe handelte, lag zwar eine große Quantität und Diversität an mRNA vor, allerdings ist es hierbei nicht klar, wie hoch der Anteil an herzspezifischen Proteinen liegt. Darüber hinaus können aufgrund bereits einsetzender Differenzierungsvorgänge einige mRNAs nicht präsent sein, und Proteine, die für *E. coli* toxisch sind, werden nicht exprimiert und damit in der Expressionsbibliothek nicht enthalten sein.

Ein weiterer Grund besteht in der denaturierten Form, in der die Proteine auf den Filtern vorliegen. Dadurch können mögliche Epitope, die nur in der nativen Form existieren nicht vorhanden sein. Zudem liegen nicht alle Proteine in ihrer Gesamtlänge vor, wie man es auch an den in dieser Arbeit identifizierten Proteinen sehen kann, sodass dadurch ebenfalls Antikörper-bindende Epitope nicht vorhanden sind. Trotzdem kann dieser Versuchs-Ansatz des Screenens von Plasma auf einer Expressionsbibliothek wichtige Einblicke in bestimmte Krankheiten bieten.

#### **4.3.2.2. Versuche mit IgG**

##### 1) *Histon-Deacetylase 3*:

Es sind vier Mitglieder der Klasse 1-Histon-Deacetylasen beschrieben. Histone spielen eine entscheidende Rolle in der Transkriptionsregulation, im Ablauf des Zellzyklus und bei der Entwicklung. Ihre Funktion besteht in einer Transkriptionsunterdrückung durch Deacetylierung von acetylierten N-terminalen Enden der Kern-Histone (Wen *et al.*, 2003). Acetylierungen bzw. Deacetylierungen haben einen starken Einfluß auf die Genexpression in eukaryotischen Zellen (Yang *et al.*, 2002). Das Histon-Deacetylase 3-Protein kann zudem die Funktion des p53 herunterregulieren, wodurch Zellwachstum und die Induktion der Apoptose abgestimmt werden.

Robinson *et al.* haben z.B. in Serumproben von SLE-Patienten Autoantikörper gegen DNA und Histone gefunden (Robinson *et al.*, 2002). Hier stellt sich die Frage, ob es einen

Zusammenhang zu den Histon-Deacetylasen gibt, da diese in der Signalkette in direkter Verbindung mit den Histonen stehen und diese wiederum mit der DNA assoziiert sind, und sie deshalb möglicherweise auch einen Einfluß bei Autoimmunvorgängen haben könnten.

Bei diesem Protein könnte daher ein Zusammenhang für das Auslösen der DCM aufgrund der Zellzyklus-Regulation und der Apoptose bestehen, da bereits in anderen Autoimmunkrankheiten Autoantigene gegen Apoptose-Moleküle identifiziert werden konnten, bzw. Mutationen in Apoptose assoziierten Molekülen Gründe für ein Auslösen einer Autoimmunkrankheit sein können.

### 2) *DRR1 (downregulated in renal cell carcinoma):*

Beim DRR1-Protein handelt es sich höchstwahrscheinlich um ein Tumorsuppressor-Gen aus dem Chromosomen-Segment 3p21.1, das bei verminderter Expression eine Rolle bei der Entwicklung von renalem Zellkarzinom und wahrscheinlich auch noch bei anderen Tumoren spielt (Wang *et al.*, 2000). Dieser Chromosomenabschnitt enthält vermutlich mehrere Tumorsuppressor-Gene, da bei verschiedensten Karzinomen u.a. in Lunge, Niere und Brust Deletionen in diesem Chromosomenabschnitt festgestellt werden konnten (Killary *et al.*, 1992). Am stärksten wird dieses Protein im Gehirn exprimiert, tritt aber auch im Herz auf (Wang *et al.*, 2000).

Aufgrund dieser hypothetischen Funktion und der noch nicht eindeutigen Charakterisierung dieses Proteins ist es schwer, einen Zusammenhang zur DCM herzustellen.

### 3) *Zinc finger, HIT domain containing 1 (ZNHIT1) /Cyclin G1 interacting protein:*

Das HIT Zinkfinger Motiv enthält bis zu 6 Cystein-Reste, die das Zink koordinieren können. Diese Domäne wird z.B. auch im *Thyroid Receptor interacting protein 3* (TRIP-3) gefunden, das mit der Ligand-Binde-Domäne des Thyroid Rezeptors interagiert.

Das Protein wird in großem Maße in der Skelettmuskulatur in den Ovarien und in der Niere exprimiert (Horne *et al.*, 1996). Cyclin G1 wird während des Zellzyklus von der frühen G1 zur S/G1-Phase hochreguliert. Zhao *et al.* haben herausgefunden, dass das Cyclin G1 eine wachstumsinhibitorische Aktivität besitzt und durch die Bindung an p53 und andere Tumorsuppressoren mit dem Tumorsuppressor-Signalweg verbunden ist (Zhao *et al.*, 2003). Es wird beispielsweise induziert bei Schädigung der DNA in Abhängigkeit von p53. Daher ist es auch an vielen Funktionen beteiligt, die durch p53 reguliert werden, wie Apoptose,

Wachstumskontrolle und Kontrolle der Regulierung von DNA-Schädigungen (Kimura *et al.*, 2002).

Auch bei diesem Protein könnte ein Zusammenhang zur DCM über die Apoptose induzierende Funktion des Proteins hergestellt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Apoptose bei Herzinsuffizienz eine Rolle spielt (Narula *et al.*, 1996).

#### 4) RAD23 / HHR23A:

Das Protein ist eines von zwei humanen Homologen zum *Saccharomyces cerevisiae* RAD23 Protein. Dabei handelt es sich um ein hochkonserviertes Protein, das für Nukleotid Exzisionsreparaturen zuständig ist, vor allem auch bei geschädigter DNA durch UV-Strahlung (Elder *et al.*, 2002). Es enthält zwei Ubiquitin-assoziierte Domänen, die in der Protein-Ubiquitinierung, DNA-Exzisionsreparatur und im Zell-Signalweg über Proteinkinasen involviert sind (Mueller *et al.*, 2002). Das RAD23 Protein spielt eine Rolle beim Xeroderma Pigmentosum Syndrom, bei dem ein Defekt im Exzisions-Reparaturmechanismus vorliegt (van der Spek *et al.*, 1996).

DNA-Schäden können Apoptose auslösen, wenn der Schaden nicht mehr reparierbar ist, sodass bei diesem Protein ebenfalls ein Zusammenhang zur DCM über die Apoptose herzustellen wäre.

#### 5) Paraneoplastisches Antigen MA3:

Es gibt drei Mitglieder dieser Proteinfamilie, wobei die Proteine hohe Homologien aufweisen und variable Expressionsmuster in Neuronen, Keimzellen vom Testis und Tumoren besitzen. Oftmals treten Kreuzreaktionen zwischen Mitgliedern derselben Proteinfamilie auf (Rosenfeld *et al.*, 2001). Sie spielen eine Rolle bei paraneoplastischen Syndromen, wobei limbische, hypothalämische und Hirnstamm-Strukturen betroffen sind. Es treten zudem oftmals Tumore vor allem in den Keimzellen auf, wenn im Serum Antikörper gegen Ma-Proteine vorhanden sind (Rosenfeld *et al.*, 2001). Daher wurde das Protein auch als paraneoplastisches *cancer-testis-brain* Antigen bezeichnet. Ma-Proteine treten im Nukleoplasma und im Zytoplasma auf (Lewis *et al.*, 2000) und könnten aufgrund ihrer Sequenz (sie enthalten z.B. Zinkfinger Motive, die typisch sind für Transkriptionsfaktoren) eine Rolle bei der mRNA Biogenese spielen (Rosenfeld *et al.*, 2001). Die Ma-Proteine werden im Gehirn, Testis, Niere, Trachea und in geringerem Ausmaß auch im Herz exprimiert (Rosenfeld *et al.*, 2001).

Anhand der oben beschriebenen Studien ist im ersten Anschein kein Zusammenhang zu einem potentiellen DCM-Marker auszumachen. Dies muss aber, wie bei allen anderen gefundenen Proteinen auch erst noch durch eine funktionelle Charakterisierung bestätigt werden.

6) Kalium-Kanal-interagierendes Protein 1 (KChIP):

Es gibt insgesamt vier Kalium-Kanal-interagierende Proteine, wobei KChIP1, -3 und -4 vor allem im Gehirn exprimiert werden, nur das KChIP2 vorwiegend im Herz. Die KChIPs binden an die cytoplasmatische N-terminale Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit des Kaliumkanals Kv4 (An *et al.*, 2000). Die Mitglieder dieser Familie sind  $\text{Ca}^{2+}$  bindende Proteine, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungs Motive besitzen. Die verschiedenen Mitglieder unterscheiden sich voneinander vor allem im N-terminalen Bereich (Pourrier *et al.*, 2003). Die KChIPs regulieren A-Typ-Strömungen und damit die neuronale Erregbarkeit als Antwort auf Änderungen des intrazellulären Calciums (An *et al.*, 2000). Bei den Myozyten ist der ausgleichende  $\text{K}^+$ -Auswärtsstrom  $I_{\text{to}}$  verantwortlich für die frühe Phase der Repolarisation des kardialen Aktionspotentials, dabei spielt das KChIP2 eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle von  $I_{\text{to}}$  (Kuo *et al.*, 2001).

Aufgrund vieler sequenzieller Übereinstimmungen zwischen den verschiedenen Mitgliedern der Kalium-Kanal-interagierenden Proteine (vgl. Abb. 34), besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass es übereinstimmende Epitope gibt und dass es zu Kreuzreaktionen kommen kann. Dies würde auch die Tatsache erklären, dass die Autoantikörper das im Gehirn exprimierte KChIP1 detektiert haben, obwohl sie spezifisch sind für das KChIP2. Zudem ist es wahrscheinlich, dass in der hEX1-Bibliothek kein KChIP2 existiert, was allerdings zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht bestätigt werden konnte, da noch nicht die gesamte Bibliothek sequenziert worden ist.

<b>KChIP1</b>	737 EEMMDIVKAIYDMMGKYTYPVLKEDTPRQHVDVFFQ 844
<b>Übereinstimmungen</b>	+EM+ DI+K+ IYDMMGKYTYP L+E+ PR+HV+ FFQ
<b>KChIP2</b>	1259 QEMLDIMKSIYDMMGKYTYPALREEAPREHVESFFQ 1366

**Abb. 33: Sequenzvergleich zwischen den Proteinen KChIP1 und 2.**

Abgebildet ist ein Genausschnitt des Proteins KChIP1 zwischen Aminosäure 737 und 844, sowie ein Ausschnitt des Proteins KChIP2 zwischen Aminosäure 1259 und 1366, sowie deren übereinstimmenden Aminosäuren.

Die KChIP2 mRNA ist typischerweise in hoher Konzentration im Epikard und in geringerer Konzentration im Endokard exprimiert (Rosati *et al.*, 2001). Die KChIP2 mRNA Expression ist in adulten Herzen höher als in embryonalen Herzen. In einer Studie von Kuo *et al.* haben Untersuchungen an KChIP2-Knockout-Mäusen zu der Feststellung geführt, dass diesen Tieren  $I_{to}$  völlig fehlt und sie dadurch besonders anfällig für eine ventrikuläre Tachykardie waren. Es wurde auch festgestellt, dass beispielsweise Mutationen in kardialen Ionen-Kanälen der anfängliche Grund für ventrikuläre Arrhythmien sein können, aufgrund des Verlustes von  $I_{to}$  und des damit verbundenen anhaltenden Aktionspotentials (Kuo *et al.*, 2001). Eine Reduktion des  $I_{to}$  ist ein wichtiges und frühes Charakteristikum einer Herzinsuffizienz (Käab *et al.*, 1996).

Bei der DCM konnte zudem eine Veränderung bei der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Homöostase festgestellt werden (Schwinger *et al.*, 1999).

Aufgrund der beschriebenen Untersuchungsergebnisse könnte das Kalium-Kanal interagierende Protein möglicherweise eine wichtige Rolle als ein potentieller DCM-Marker besitzen.

#### 4.3.2.3. Versuche mit IgG3

##### 1) und 2) Unbekannte Proteine:

Bei den ersten beiden Proteinen des IgG3-Versuches konnte in der NCBI-Datenbank kein übereinstimmendes Ergebnis der erhaltenen Sequenz zu bereits existierenden Sequenzen gefunden werden. Deshalb ist eine weitere Analyse dieser Proteine notwendig, um eine Rolle als mögliches Autoantigen bei der DCM auszuschließen oder zu bestätigen.

##### 3) Fas (TNFRSF6)-associated death domain (FADD):

FADD ist ein Adapter-Protein, der die *death*-Rezeptoren der Tumor-Nekrosis-Faktor (TNF)-Rezeptor-Familie aktiviert. Dabei bindet die C-terminale Death Domäne an aktivierte Rezeptoren wie Fas und die N-terminale FADD *Death*-Effektor Domäne an die Procaspase 8, wodurch die Apoptose initiiert wird. Knockout-Studien an Mäusen lassen zudem vermuten, dass FADD eine wichtige Rolle in der frühen T-Zell-Entwicklung spielt. Der Fas Fas-Ligand Signalweg ist hochreguliert in den Lungenepithelzellen und spielt vermutlich eine Rolle bei der idiopathischen pulmonaren Fibrose (Maeyama *et al.*, 2001).

FADD ist wahrscheinlich bei dem autoimmunen lymphoproliferativen Syndrom beteiligt (Kim *et al.*, 1996). Bei dieser Krankheit erfolgt keine ordnungsgemäße Beseitigung der Immunzellen mehr, es liegt eine defekte Herunterregulierung von Hyperimmunantworten vor, wie sie bei Autoimmunkrankheiten beobachtet werden. Untersuchungen von Hsu *et al.* belegen, dass Fas-assoziierte Apoptose-Moleküle eine wichtige Funktion in der Entwicklung des Immunsystems spielen und sie besitzen vermutlich auch eine zentrale Rolle bei Autoimmunkrankheiten (Hsu *et al.*, 2001). Wie in der Einleitung in Punkt 1.2.3. erwähnt, bewirken Mutationen in den Fas-assoziierten Molekülen Lymphadenopathien und eine Unterbrechung der Lymphozyt-Homöostase aufgrund der fehlenden Apoptose (Vaishnav *et al.* 1999).

Aufgrund dieser Zusammenhänge kann dieses Protein ein potentieller Kandidat für einen DCM-Marker sein. Allerdings könnte auch angenommen werden, dass dieses Protein generell bei Autoimmunerkrankungen vorkommen kann, aufgrund seiner wichtigen Funktion bei der Entwicklung des Immunsystems.

#### 4) Vesicle amine transport protein 1 homolog (*T californica*):

Synaptische Vesikel sind verantwortlich für die Regulierung der Lagerung und Abgabe von Neurotransmittern in den Nervenenden. Das Protein kommt als integrales Membranprotein der cholinergen synaptischen Vesikel vor und ist in den vesikulären Transport involviert.

Das Herz wird sowohl autonom über den Sinusknoten und Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) stimuliert als auch neuronal über den *Nervus vagus* und das darüber freigesetzte Acetylcholin, das die Herzaktivität beeinflusst. Acetylcholin erhöht die Intervalle zwischen den Aktionspotentialen, sodass die Herzfrequenz herabgesetzt wird. Die Catecholamine Adrenalin und Noradrenalin werden aus adrenergen Nervenfasern freigesetzt und innervieren den Sinus-, den AV-Knoten und den Ventrikel. Diese Catecholamine steigern die Herzfrequenz und die Kontraktionskraft. Daher könnten mögliche Autoantikörper gegen das identifizierte *Vesicle amine transport protein 1 homolog* eine Funktionsstörung bei der Herzkontraktion auslösen.

#### 5) Tubulin, alpha:

Tubulin ist ein Heterodimer und fungiert als strukturelle Untereinheit der Mikrotubuli, die für den intrazellulären Transport und die Zellteilung in allen Eukaryoten verantwortlich sind (Nogales *et al.*, 1998). Tubulin konnte z.B. als Autoantigen bei der Autoimmunkrankheit,

die das Innenohr betrifft identifiziert werden (Du *et al.*, 2003), sowie bei dem SLE (Adyel *et al.*, 1996) und bei autoimmunen Thyroid-Funktionsstörungen (Rousset *et al.*, 1983).

Alpha-Tubulin gehört zu den Proteinen, gegen die es im Blut natürliche Autoantikörper gibt (Pashov *et al.*, 2002; Bernier-Valentin *et al.*, 1988), jedoch ist es in diesem Zusammenhang wahrscheinlich ohne Bedeutung und besitzt keinen Einfluss auf die Möglichkeit, dass zudem auch pathogene Autoantikörper gegen Tubulin bei DCM-Patienten existieren könnten. Dies scheint sich, anhand der Detektion von Tubulin mit Antikörpern des Subtyps IgG3, zu bestätigen. Auch für das Strukturprotein Myosin gegen welches natürliche Autoantikörper existieren, konnten bereits von Warraich *et al.* pathogene Autoantikörper gegen kardiales Myosin identifiziert werden (Warraich *et al.*, 2002; 2000).

#### 6) HLA-B-assoziiertes Transkript 3 (BAT3):

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) besteht aus drei Regionen, die viele verschiedene Gene enthalten, die für Immunfunktionen zuständig sind. Zu diesen Klasse III-Genen zählen zusätzlich zu den bereits bekannten Genen wie TNF alpha/beta, HSP70 auch das BAT3-Gen (Ozaki *et al.*, 1999). BAT3 enthält eine N-terminale ubiquitin-ähnliche Domäne sowie eine zentralgelegene prolinreiche Region (wie einige Nuklearproteine, Kollagene, Elastin und Synapsin) (Banerji *et al.*, 1990), sowie eine Zinkfinger ähnliche Domäne, wobei die Funktionen dieser Domänen noch unklar sind (Manchen *et al.*, 2001). Diese Domänen lassen aber auf Ähnlichkeiten zu einigen transkriptionalen regulatorischen Proteinen schließen (Banerji *et al.*, 1990). BAT3 ist ein Kernprotein und zudem bei der Kontrolle der Apoptose und der Regulierung von Hitzeschock-Proteinen beteiligt.

Den Genen des MHC-Komplexes ist wahrscheinlich eine Beteiligung bei der Induktion und Regulierung von Autoimmunantworten bei der insulinabhängigen Diabetes mellitus zuzuschreiben (Degli-Esposti *et al.*, 1992), wodurch auch ein möglicher Zusammenhang zur Auslösung der DCM angedeutet werden könnte.

#### 7) RAS-related on chromosome 22:

Aufgrund der Sequenz dieses Proteins besteht eine große Ähnlichkeit mit Proteinen der Ras (*ras sarcoma viral oncogene*)-Superfamilie. Sie besitzen als aktive Domäne die *small monomeric GTPase activity*, mit der sie die Reaktion  $GTP + H_2O = GDP + \text{Phosphat}$  katalysieren. Sie scheinen nur im zentralen Nervensystem exprimiert zu werden. Die Ras-

Subfamilie ist in der Zellwachstums-Regulation involviert. Ras-verwandte Gene sind Kandidaten, die an onkogenen Prozessen beteiligt sind (Zucman-Rossi *et al.*, 1996).

Ein möglicher Zusammenhang zur DCM bestünde möglicherweise darin, dass das Protein GDI-1 bei der Untersuchung von differentiell exprimierten Genen identifiziert wurde und Ras-Proteine mit ihrer GTPase-Aktivität vom GDI-1 in der Signalkaskade reguliert werden. Jedoch muß auch hier eine weitere funktionelle Analyse erfolgen, um einen direkten Zusammenhang zur DCM herstellen zu können.

#### **4.3.3. Vergleich der potentiellen DCM-Marker untereinander**

Einen direkten Zusammenhang zu autoimmunen Prozessen gibt es beim Fas-Ligand assoziierten Protein, beim HLA-B-assoziierten Transkript 3 (BAT3) und beim Tubulin, das zusätzlich auch als natürlicher Autoantikörper bekannt ist. Die Histon-Deacetylase 3 ist dahingehend interessant, als das für die Autoimmunerkrankungen SLE und MCTD (*mixed connective tissue disease*) das Histon-Typ II als Autoantigen detektiert wurde (Robinson *et al.*, 2002). Daraus resultierend könnte die Histon-Deacetylase möglicherweise einen eher allgemeinen Marker für verschiedene Autoimmunerkrankungen darstellen. Für die anderen Gene ist zunächst kein offensichtlicher Zusammenhang zu autoimmunen Prozessen zu sehen.

Das identifizierte KChIP stellt sich als der interessanteste potentielle Marker dar, was nicht zuletzt auf seine wichtige Funktion im Herz zurückzuführen ist. Zudem konnten die Daten der Literatur zeigen, was ein Ausfall, bzw. eine Beeinträchtigung der Funktion dieser Proteine für Auswirkungen auf das Herz haben können. Es kann beispielsweise zu ventrikulären Tachykardien und Arrhythmien kommen (Kuo *et al.*, 2001), die auch bei der DCM als Symptom auftreten können.

Es konnten einige Transkriptionsfaktoren, die anscheinend im Bereich der apoptotischen Prozesse eine Rolle spielen, identifiziert werden, wie das Cyclin G1 und das FADD-Protein. Aber auch das BAT3-Protein und die Histon-Deacetylase sind an der Kontrolle der Apoptose beteiligt. Wie die Beteiligung beim FADD-Protein an autoimmunen Vorgängen aussieht, so können auch, aufgrund ihrer Einflüsse bei der Apoptose, Cyclin-G1, BAT3 oder Histon-Deacetylase von Bedeutung sein. Es wurde auch bereits an tierischen (Kubota *et al.*, 1997) und menschlichen Studien (Narula *et al.*, 1996) gezeigt, dass Apoptose bei der Herzinsuffizienz auftritt. Es wird angenommen, dass Apoptose eine pathophysiologische

Rolle bei der Herzinsuffizienz spielt, wobei die pathologische Relevanz der apoptose-induzierenden Faktoren noch nicht bekannt ist (Narula *et al.* 2000; Kubota *et al.*, 2001). Staudt *et al.* haben bei Untersuchungen an adulten Rattenkardiomyozyten festgestellt, dass Antikörper gegen die zweite extrazelluläre Schleife des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors Apoptose induzieren (Staudt *et al.*, 2003). Die schlechte Regenerationsfähigkeit bei adulten Myozyten läßt vermuten, dass bei einem Verlust dieser Zellen durch Apoptose die Herzinsuffizienz vorangetrieben wird. Auch andere Studien zu kardiovaskulären Erkrankungen lassen der Apoptose eine wichtige Rolle zukommen (Haunstetter und Izumo, 1998). Die Anzahl der apoptotischen Myozyten steigt im Myokardium bei Patienten mit Herzinsuffizienz im Endstadium oder mit DCM (Olivetti *et al.*, 1997). Generell ist der Vorgang der Apoptose in allen fundamentalen Prozessen des Immunsystems beteiligt (Du *et al.*, 2003). Daher wird auch der therapeutische Nutzen dieser apoptosebeteiligten Moleküle für die Behandlung autoimmuner Erkrankungen oder auch für das Abtöten von Krebszellen gesehen. Die gezielte Unterdrückung von apoptotischen Prozessen könnte bei bestimmten degenerativen Krankheiten helfen (Strasser *et al.*, 1999).

Ähnliche Domänen bei verschiedenen Proteinen wie z.B. die Ubiquitin-Domänen bei BAT3 und RAD23 dienen möglicherweise als Epitop der Autoantikörper. Für diese Annahme spricht zudem, dass unter den ursprünglich identifizierten 228 Proteinen dieser Arbeit aus der hEX1-Bibliothek zusätzlich drei weitere ubiquitin-ähnliche Klone identifiziert werden konnten, sowie möglicherweise noch Proteine, die ebenfalls in ihrer Sequenz Ubiquitin-Domänen besitzen. Einschränkend muss man aber sagen, dass reines Ubiquitin, welches mehrfach in der Bibliothek enthalten ist, nicht erkannt wurde. Es gibt zwei Komponenten, die bei der zellulären Proteinqualitäts-Kontrolle eine Rolle spielen: molekulare Chaperone und der Ubiquitin-Proteasom-Weg. Proteine, die degradiert werden müssen, werden mit einer Poly-Ubiquitin-Kette konjugiert (Ubiquitinierung), um vom Proteasom erkannt zu werden. Allgemein kann man sagen, dass Unstimmigkeiten in der Protein-Homöostase zur Entstehung von Krankheiten beiträgt (Berke *et al.* 2003). Der Ubiquitinierung wird neuerdings auch eine Schlüsselrolle bei post-translationalen Modifikationen zugewiesen, die eine Rolle in vielen zellulären Abläufen spielen, wie der Differenzierung, Endozytose, DNA-Reparatur, Apoptose u.a.

In einer Studie von Fukuda-Kamitani *et al.*, wurde die Ubiquitinierung von Ro52 untersucht, nachdem anti-Ro/SSA-Antikörper bei Patienten mit dem Sjogren's Syndrom

entdeckt wurden. Dabei konnte eine starke Konjugation von Ubiquitin-Molekülen an Ro52 in Zellen beobachtet werden und zwar sowohl mit mono- als auch mit Poly-Ubiquitin-Ketten. Jedoch ist die biologische Relevanz dieser mono-Ubiquitinierung noch nicht geklärt, wobei davon auszugehen ist, dass die Funktion des Proteins durch die mono-Ubiquitinierung modifiziert wird. Durch die Poly-Ubiquitinierung wird das Protein über den Ubiquitin-Proteasome Signalweg degradiert (Fukuda-Kamitani *et al.*, 2002).

#### 4.3.4. Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse der Plasmascreening-Versuche dienen dazu, Proteine zu identifizieren, die möglicherweise als Marker für die autoimmune DCM in Frage kommen könnten. Für eine genauere Definition der Rolle, die die identifizierten Proteine bzw. die entsprechenden Autoantikörper in der Entwicklung der DCM spielen, müssten diese Kandidaten einer funktionellen Charakterisierung unterzogen werden (Fu *et al.*, 2002). Dies könnte beispielsweise an spontan schlagenden kultivierten Rattenkardiomyozyten erfolgen. Dazu müssten die Antikörper aus dem Plasma der Patienten isoliert werden und anschließend ihr Einfluss auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und die Zellkontraktion der Kardiomyozyten getestet werden. Hätten die Antikörper einen negativen Effekt auf die Kardiomyozyten, müsste sowohl der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient als auch die Zellkontraktion sinken. Eine andere Möglichkeit zur Charakterisierung wären *in vivo* Studien, bei denen die identifizierten Autoantikörper, bzw. Autoantigene von DCM-Patienten auf immundefiziente Mäuse übertragen werden, die daraufhin DCM-ähnliche Symptome ausbilden, wie beispielsweise eine Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion, ähnlich wie es bei Schwimmbeck mit Leukozyten beschrieben worden ist (Schwimmbeck *et al.*, 1996).

Die Identifizierung von Autoantikörpern, die als Marker für Autoimmunkrankheiten fungieren können, haben eine steigende Bedeutung bei der Diagnose und Prognose von Autoimmunkrankheiten. Sie können zum einen den Schweregrad einer Erkrankung markieren (Dayan *et al.*, 1996, Leslie *et al.*, 1999) und andererseits dienen sie der Definition und Klassifizierung von Erkrankungen (Toh *et al.*, 1997). Sind die Antigene bzw. die kreuzreagierenden Antigene bekannt, können entsprechende Diagnose- und Therapieverfahren entwickelt werden. Eine Möglichkeit bestünde in der Anwendung von individuell abgestimmten Therapien, wie beispielsweise einer Immunadsorptionstherapie

mit Säulen, die mit spezifischen Antigenen der Autoantikörper des jeweiligen Patienten beladen sind.

Das Verständnis des Prozesses der Apoptose, die eine wichtige Rolle bei der Herstellung der Homöostase des Immunsystems spielt, kann eine Hilfe sein bei der Suche nach Therapien für Autoimmunkrankheiten, aber auch bei Entzündungen und Infektionen (Mak *et al.*, 2002).

Es wurde z.B. von Caforio *et al.*, das Stressprotein HSP60 (*heat shock protein 60*) als potentieller DCM-Marker identifiziert. Hier stellt sich jedoch die Frage, ob es sich bei diesem Protein tatsächlich um einen Marker handelt. Beispielsweise wurde in dieser Arbeit das HSP70 nach Auswertung der hEX1-Filter identifiziert, jedoch konnte es auf der Chipoberfläche nicht als relevant bestätigt werden. Es besteht die Vermutung, dass Hitzeschock Proteine, da sie in Folge von Stresssituationen exprimiert werden, eher als Epiphänomen bei der DCM anzusehen sind. Gerade das HSP60 wird aufgrund von verschiedenen Stressfaktoren hochreguliert (Schafler *et al.*, 2003), z.B. aufgrund einer Ischämie oder nach Infektionen. Daraus könnte auch abgeleitet werden, dass die Dilatation der Myozyten ein Stressfaktor ist woraufhin das HSP-Molekül gebildet würde. Eine andere Erklärung, dass HSP60 keine Rolle als DCM-Marker spielt, ist die Tatsache, dass HSP60 eine Sequenzhomologie zum kardialen Myosin von 65 % besitzt und dadurch die Wahrscheinlichkeit von Kreuzreaktionen erhöht ist (Mandi *et al.*, 2000).

Weitere Untersuchungen an dieser Krankheit sind von großem Interesse, sowohl wissenschaftlich als auch volkswirtschaftlich.