

7. Zusammenfassung

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist eine Herzmuskelerkrankung, die gekennzeichnet ist durch fortschreitende Senkung der myokardialen Kontraktilität und der ventrikulären Dilatation (Richardson *et al.*, 1995). Die Ursachen sind zum einen idiopathisch, genetisch, viral, autoimmun oder immunbedingt, assoziiert mit einer viralen Infektion (Caforio *et al.*, 2002). Die Arbeit wurde in zwei Bereiche unterteilt, wobei es sich zum einen um die Verifizierung und zum anderen um die Identifizierung von Targets, die an der DCM beteiligt sein könnten, handelt.

Im ersten Teil der Arbeit wurden gegen Gene, die bei DCM-Patienten differentiell exprimiert wurden, Antikörper über Phage Display Technologie selektiert. 26 Gene wurden hierzu in einen Expressionsvektor kloniert. Davon konnten 12 Proteine exprimiert und nativ in *E. coli* aufgearbeitet werden. Gegen sechs der Proteine ließen sich Phagen-Antikörper mittels Phage Display isolieren. Die Phagenantikörper wurden auf Western-Blots mit isolierten Proteinen aus Mausgeweben getestet. Hierbei zeigten die untersuchten Phagenantikörper eine hohe Kreuzreaktivität.

In der weiteren experimentellen Phase wurden Proteine potentiell relevanter Autoantigene, der autoimmunen DCM, durch Plasmascreening identifiziert. Dazu wurden in einem ersten Schritt Plasmen von DCM-Patienten auf einer humanen fötalen Expressionsbibliothek, die 37.830 redundante Expressionsklone enthielt, untersucht. Es konnte ein Subset von 48 Proteinen identifiziert werden, die durch einen humanen IgG-Antikörper detektiert wurden, sowie ein Subset von 32 IgG3 spezifischen Proteinen. Diese Subsets wurden anschließend für eine qualitative und quantitative Auswertung in aufgereinigter Form auf Proteinchips aufgebracht und mit den zuvor verwendeten DCM-Plasmen untersucht. Dabei konnten bei den Versuchen mit IgG sechs, bzw. bei den IgG3-Versuchen sieben Proteine identifiziert werden, die sich nach bild- und datenanalytischer Auswertung von den gesunden Kontrollen abhoben. Die identifizierten Proteine FADD, BAT3 und Tubulin wurden schon bei anderen Autoimmunerkrankungen beschrieben, sind aber bisher noch nicht in Verbindung mit der DCM gebracht worden. Weiterhin wurden auch neue Proteine identifiziert wie das Protein KChIP1, Ma3, Cyclin G1, RAD23 oder die Histon-Deacetylase3. Der vielversprechendste Kandidat scheint das KChIP-Protein zu sein, da es bei 9 von 10 Patienten identifiziert werden konnte und eine wichtige Funktion bei der Erregungsleitung im Herzen besitzt. Störungen dieser Proteine können zu ventrikulären Tachykardien und Arrhythmien führen.

8. Summary

Dilated cardiomyopathy (DCM) is a heart muscle disease characterised by impaired dilation and contraction of the left ventricle or both (Richardson, 1995). Twenty percent of DCM belongs to the familiar/genetic form, the rest may be idiopathic, viral, auto-immune or immune-mediated associated with a viral infection (Caforio *et al.*, 2002). The present work is divided into two parts. The first part shows the screening of phage antibodies to allow verification of previously identified targets. The following part of the work combines an expression library with protein array technology to identify new putative disease relevant auto-antigens.

First, antibodies were selected against differential expressed genes of DCM patients using phage display. 26 genes were cloned in an expression vector, followed by successful expression and purification of twelve of these genes. Phage antibodies against six of these recombinant expressed gene products have been selected. The incubation of these phage antibodies against protein extracts from mouse shows high cross reactivity.

In the second part of the current work, we profile the auto-antibody repertoire of DCM patients of the auto-immune subtype. First, we screened a human high density protein array containing 37,830 recombinant proteins deriving from a human fetal brain expression library with plasma. A subset specific for IgG consisting of 48 proteins and a subset specific for the IgG3 subtype containing 32 proteins has been identified. Following high-throughput expression and purification, protein microarrays were generated and incubated with the previously used patient and control plasmas. Following image and data analysis, significant differences between patient and control plasmas have been determined for six proteins on the IgG specific and seven genes on the IgG3 subtype specific protein microarray. We have identified new proteins such as KChIP1, Ma3, cyclin G1, RAD23 and the histone deacetylase 3 as putative specific for DCM, as well as the proteins FADD, BAT3 and tubulin, which have been additionally described in other auto-immune diseases. The potassium channel interacting protein 1 (KChIP1) was detected in 9 of 10 patient plasmas. Regarding its function in transient outward current and that defects in the highly homologous KChIP2 protein causes arrhythmias and ventricular tachycardia by absence of the transient outward current, KChIP1 seems to be a very promising candidate.