

1. Einleitung.....	1
1.1. Das Immunsystem.....	1
1.1.1. Die Rolle der T-Zellen, B-Zellen und Antikörper.....	2
1.2. Autoimmunität und ihre Krankheiten.....	5
1.2.1. Das Vorkommen von natürlichen Autoantikörpern.....	5
1.2.2. Die Selbst-Toleranz-Mechanismen.....	6
1.2.3. Autoimmunerkrankungen.....	8
1.3. Dilatative Kardiomyopathie (DCM).....	10
1.3.1. Spezifische Autoantikörper gegen kardiale Proteine.....	13
1.3.2. Immunadsorptions- und IgG-Substitutionstherapie (IA/IgG).....	15
1.3.4. Welche Rolle spielt IgG3 bei der autoimmunen DCM?.....	16
1.4. Detektionsmethoden zur Erkennung von Autoantikörpern.....	17
1.4.1. Proteinarrays und Serumscreening.....	18
1.5. Herstellungsverfahren von Antikörpern.....	20
1.5.1. Phage Display.....	21
1.5.1.1. Möglichkeiten von Quellen für Phagen-Bibliotheken.....	23
1.5.1.2. Die Phagen-Selektion.....	24
1.6. Zielsetzung.....	26
2. Material und Methoden.....	28
2.1. Methoden.....	28
2.1.1. Stämme.....	28
2.1.2. Klonierung, Expression und Antikörperentwicklung aus differentiell exprimierten Genen.....	28
2.1.2.1. Polymerase-Ketten-Reaktion und DNA-Sequenzierung.....	28
2.1.2.2. Agarose-Gelelektrophorese.....	29
2.1.2.2.1. Elution von DNA aus Agarose-Gelen.....	30
2.1.2.2.3. Restriktion und Ligation.....	30
2.1.2.4. Herstellung von elektrokompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	31
2.1.2.5. Transformation.....	31
2.1.2.5.1. Elektroporation.....	31
2.1.2.5.2. Hitzeschock.....	32

2.1.3. Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i>	32
2.1.4. Proteinanalyse.....	32
2.1.4.1. Proteinisolierung aus Gewebe.....	32
2.1.4.2. Proteinbestimmung nach Biorad.....	33
2.1.4.3. SDS-PAGE.....	33
2.1.4.4. Western-Blot-Analyse.....	33
2.1.5. Phage Display.....	34
2.1.5.1. Detaillierte Übersicht über den Ablauf des Phage Display.....	35
2.1.5.1.1. Bestimmung des Phagentiters.....	37
2.1.5.2. Polyklonaler ELISA.....	39
2.1.5.3. Monoklonaler ELISA.....	39
2.1.5.4. Phagenpräparation.....	40
2.1.6. Proteinexpressions-Bibliothek.....	41
2.1.6.1. Screening von autoimmunem DCM-Plasma und Kontrollplasma.....	42
2.1.6.1.1. Behandlung der Filtermembranen der hEX1-Bibliothek.....	42
2.1.6.2. Rearray und Induktion von Klonen aus der hEX1-Bibliothek.....	43
2.1.7. Proteinaufarbeitung.....	44
2.1.7.1. Native Proteinaufreinigung.....	44
2.1.7.2. Denaturierende Proteinaufreinigung.....	44
2.1.8. Spotten der aufgereinigten hEX1-Proteine auf Glasobjektträger.....	45
2.1.8.1. Hybridisierung der Chips mit DCM-Patientenplasma und Kontrollplasma.....	45
2.2. Material.....	47
2.2.1. Geräte.....	47
2.2.2. Chemikalien, Enzyme und Antikörper.....	47
2.2.2.1. Chemikalien.....	47
2.2.2.2. Enzyme.....	49
2.2.2.3. Antikörper.....	49
2.2.3. Oligonukleotide.....	49
2.2.4. Kits.....	50
2.2.5. Weitere Materialien.....	50
2.2.6. Software.....	51
2.2.7. Online Datenbanken; DNA- und Protein-Analyse Tools.....	51

2.2.8. Puffer und Medien.....	51
3. Ergebnisse.....	57
3.1. Proteinexpression und Phagenantikörper-Herstellung von differentiell exprimierten Genen aus menschlicher Herz-DNA.....	57
3.1.1. Amplifikation Restriktion, Ligation und Transformation der Kandidatengene aus menschlicher Herz-cDNA.....	57
3.1.2. Expression und Aufreinigung der klonierten Kandidatengene im Expressionsvektor pZPARS-T7-32-NST-BT.....	59
3.1.3. Phage-Display mit exprimierten Proteinen aus <i>E. coli</i>	61
3.1.3.1. Polyklonaler und monoklonaler Phagen-ELISA.....	61
3.1.3.2. Validierung der selektierten Phagenantikörper.....	64
3.1.3.2.1. Anwendung der Phagenantikörper auf einer Expressionsbibliothek....	64
3.1.3.2.2. Anwendung der Phagenantikörper an isolierten Proteinen aus Mausgewebe auf Western-Blots.....	64
3.2. Identifizierung krankheitsspezifischer Proteine aus Patientenplasma mittels Screening auf der human fetal brain (hEX1)-Bibliothek.....	66
3.2.1. Screening von Patienten- und Kontrollplasma auf der hEX1-Bibliothek...66	
3.2.1.1. Auswahl geeigneter humaner Körperflüssigkeiten für die Anwendung auf Protein-Hochdichte-Filtern.....	67
3.2.1.2. Reproduktionsversuche auf der hEX1-Bibliothek.....	68
3.2.1.3. Darstellung eines hEX1-Hochdichte Filters anhand eines Patientenbeispiels.....	69
3.2.2. Analyse der positiv detektierten Klone der hEX1-Bibliothek.....	70
3.2.2.1. Sequenzergebnisse der detektierten Klone in Kontrollen und Patienten.....	72
3.2.2.2. Western-Blot als Kontrollmethode.....	73
3.3. Validierung der putativ DCM-spezifischen Proteine unter Verwendung von Proteinmikroarrays.....	74
3.3.1. Qualitätskontrolle des Protein-Chips mit einem RGSHis ₆ -Antikörper.....	76
3.3.2. Profilerstellung mittels IgG-Antikörper und Bestätigung durch Western-Blot-Analyse.....	77

3.3.3. Detektion von spezifischen autoimmunen DCM-Antikörpern mit IgG3 auf Filtern der hEX1-Bibliothek.....	81
3.3.3.1. Validierung der hEX1-Bibliothek Ergebnisse mit IgG3 auf Protein- Chips und Bestätigung mittels Western-Blot-Analyse.....	82
4. Diskussion.....	87
4.1. Proteinexpression und Phagenantikörper-Selektion differentiell exprimierter Gene aus menschlicher Herz DNA.....	87
4.1.1. Fazit.....	89
4.2. Untersuchung der dilatativen Kardiomyopathie mit Hilfe einer menschlichen fötalen Expressionsbibliothek.....	90
4.2.1. Auswertung der Ergebnisse vom Plasmascreening auf der Expressionsbibliothek.....	91
4.2.2. Das Vorkommen von natürlichen Autoantikörpern.....	92
4.3. Protein-Mikroarrays.....	94
4.3.1. Erzeugung eines Proteinchips mit potentiell relevanten DCM-Proteinen..	95
4.3.2. Ergebnisse der Proteinmikroarrays.....	98
4.3.2.1. Vergleich der Ergebnisse mit bereits identifizierten krankheitsrelevanten Autoantigenen.....	99
4.3.2.2. Versuche mit IgG.....	99
4.3.2.3. Versuche mit IgG3.....	103
4.3.3. Vergleich der potentiellen DCM-Marker untereinander.....	106
4.3.4. Fazit und Ausblick.....	108
5. Literaturverzeichnis.....	110
6. Abkürzungen.....	126
7. Zusammenfassung.....	128
8. Summary.....	129
9. Danksagung.....	130
10. Lebenslauf.....	131