

### **3. Ergebnisse**

Die Ergebnisse dieser Arbeit gliedern sich in zwei Teile. Es wurden zum einen Antikörper generiert zur Verifikation von Genexpressionsprofilen und zum anderen wurden neue Targets identifiziert. Dazu wurden im ersten Teil Daten der Selektion von Phagen-Antikörpern gegen differentiell exprimierte Gene bei der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie (DCM) präsentiert und im zweiten Teil Autoantikörper bzw. die Autoantigene der autoimmunen Form der DCM, die mit Hilfe des Plasmascreenings identifiziert werden konnten. Die im Plasma enthaltenen Autoantikörper erkannten dabei spezifische Proteine auf einem Proteinexpressions-Array, wodurch Rückschlüsse auf potentiell krankheitsassoziierte, bzw. diagnostische Proteine oder Marker möglich waren.

#### **3.1. Proteinexpression und Phagenantikörper-Herstellung von differentiell exprimierten Genen aus menschlicher Herz-cDNA**

Eine Vielzahl von Genen, die bei der idiopathischen DCM eine Rolle spielen, wurden durch die Analyse von Genexpressionsprofilen der Arbeitsgruppe Patrizia Ruiz identifiziert (Grzeskowiak *et al.*, 2003).

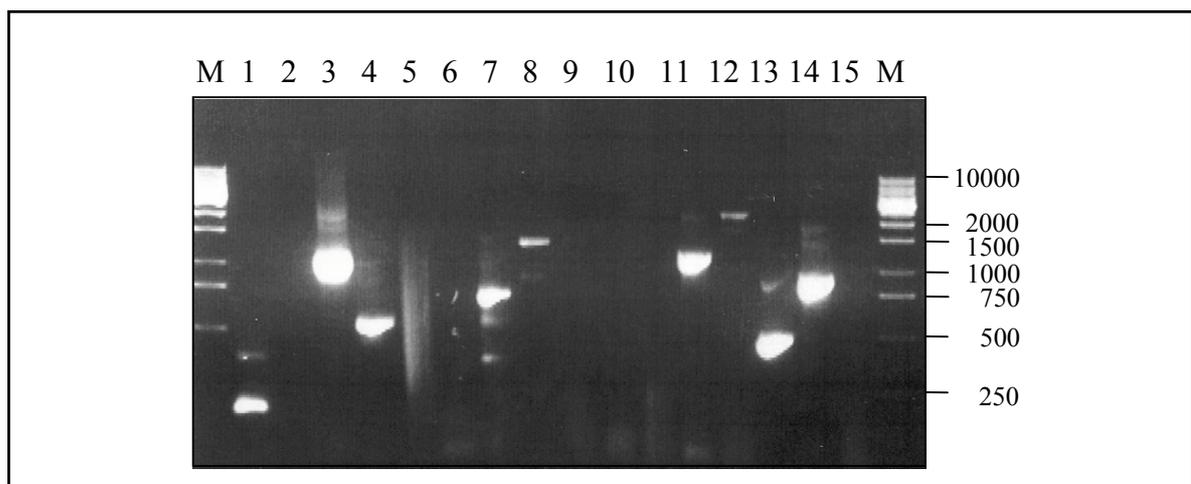
Zur weiteren Validierung dieser Gene auf Proteinebene wurden 30 Gene, die den größten Faktor zu den Kontrollen aufwiesen, ausgewählt. Diese Kandidatengene wurden kloniert, exprimiert und schließlich sollten durch ein Hochdurchsatzverfahren Phagen-exprimierte humane Antikörper gegen diese Proteine mittels Phage Display selektiert werden.

##### **3.1.1. Amplifikation, Restriktion, Ligation und Transformation der Kandidatengene aus menschlicher Herz-cDNA**

Zu den 30 Kandidatengenen (vgl. Tab. 2), von denen gezeigt worden war, dass sie bei dem Vergleich von DCM erkrankten Patienten und gesunden Kontrollen differentiell exprimiert wurden (Grzeskowiak *et al.*, 2003), wurden sequenzspezifische Primer ermittelt. Das Ziel war die Amplifizierung von Voll-Länge-Genen, sodass bei späterer Expression dieser Gene der Großteil der möglichen Epitope der einzelnen Proteine erhalten werden konnte. Der am 5'-Ende der cDNA liegende Primer, im folgenden als 5'-Primer bezeichnet, wurde versucht so auszuwählen, dass er mit dem Codon, das für die erste Aminosäure nach dem

Translationsinitiationscodon Methionin kodiert, beginnt. Die Sequenz des am 3' Ende der cDNA gelegenen Primers, bezeichnet als 3'-Primer, ergab sich daraus, dass sie zum einen stromabwärts vom Gen-eigenen Terminationscodon liegen sollte und zum anderen mußte sie eine zum 5'-Primer korrespondierende Annealing-Temperatur aufweisen. Weiterhin wurden zusätzliche Sequenzen an die Primer angehängt: An das 5'-Ende des 5'-Primers wurde die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym SalI angefügt, während am 3'Ende des 3'-Primers die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym NotI angefügt wurde. Die Primer wurden so gelegt, dass sie im allgemeinen eine Annealing-Temperatur von 60°C aufwiesen.

Die Gene wurden mittels PCR aus der oligo-dT geprimten cDNA aus humanem Herzgewebe amplifiziert, wobei sich 26 Gene erfolgreich amplifizieren ließen. Alle Amplifikate korrespondierten dabei mit der erwarteten, theoretisch berechneten Größe (vgl. Abb. 12).



**Abb. 12: 1 %iges Agarosegel mit spezifisch amplifizierten Genen aus cDNA aus humanem Herzgewebe.** Gelspur: M:1kb Genmarker 1: PPLA (158 bp), 3: ATPMB (1440 bp), 4: CVHSP (512 bp), 7: CD81 (711 bp), 8: GDI-1 (1441 bp), 12: ACTS (1133 bp), 13: HS1B (2175 bp), 14: MYL-2 (515 bp), 15: KCRS (884 bp). Die Größen der Gene stimmen mit den aus dem Blast-Search ermittelten Größen überein.

Die PCR-Produkte wurden mit den oben angegebenen Restriktionsenzymen verdaut, aufgereinigt und in den SalI/NotI restringierten Expressionsvektor pZPARS-T7-32-NST-BT ligiert.

Es folgte die Transformation in den Klonierungsstamm SCS1, der erfahrungsgemäß eine sehr hohe Transformationseffizienz aufweist und daher zur primären Vektorvermehrung

genutzt wurde, um eine höhere Menge rekombinantes Plasmid für die sekundäre Transformation zu gewinnen.

Korrekte Transformanden wurden über PCR unter Verwendung von Vektorprimern kontrolliert und im positiven Fall für die weitere Behandlung in Betracht gezogen. Die Vektor-DNA, der als positiv bestimmten Transformanden, wurde dann über DNA-Mini-Präparation isoliert und in den Expressionsstamm BL21(DE3)pLysS transformiert. Korrekte Transformanden wurden anschließend über PCR unter Verwendung spezifischer Vektorprimer identifiziert. Abschließend läßt sich zusammenfassen, dass aus insgesamt 30 ausgewählten Kandidatengen 26 spezifische Amplifikate über PCR erhalten werden konnten. Davon ließen sich 19 in den Klonierungsstamm transformieren und 18 konnten im Expressionsstamm BL21(DE3)pLysS erhalten werden. Die entsprechenden Expressionsklone wurden im folgenden für die Expression und die anschließende native, bzw. denaturierende Aufreinigung eingesetzt.

### **3.1.2. Expression und Aufreinigung der klonierten Kandidatengene im Expressionsvektor pZPARS-T7-32-NST-BT**

Für die verschiedenen molekularbiologischen Untersuchungen wie der Western-Blot-Analyse, der Herstellung von Proteinmikroarrays oder für die Selektion von Antikörpern mittels Phage Display wurden ausreichende Proteinmengen benötigt.

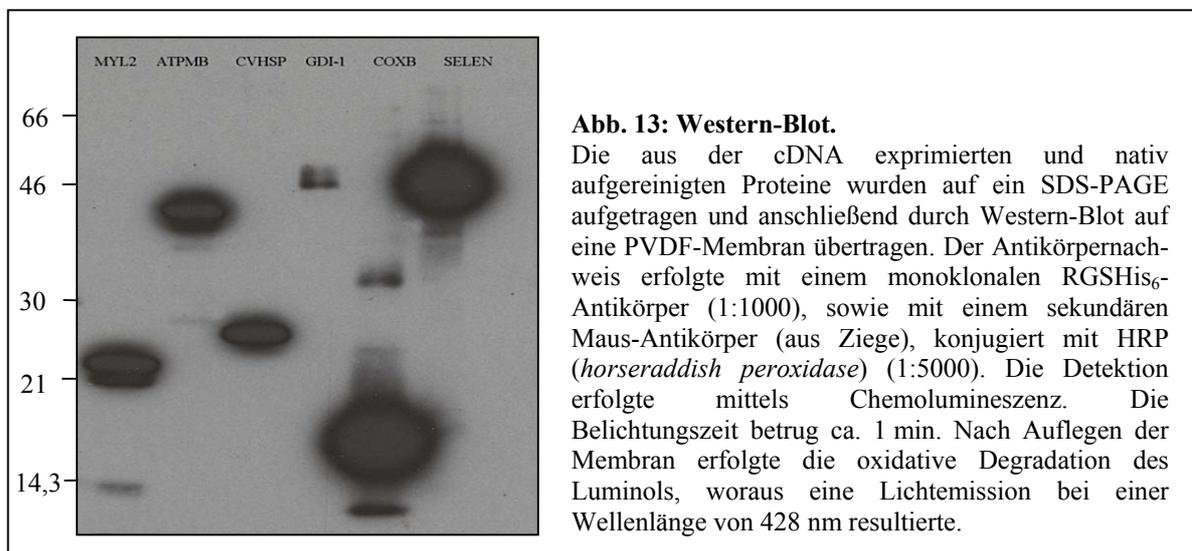
Als Expressionsvektor diente pZPARS-T7-32-NST-BT (Lueking *et al.*, 2000; Lueking *et al.*, 2003). Dieser Vektor verfügt unter anderem über einen kombinierten RGSHis<sub>6</sub>-Tag und eine *in vivo* Biotinylierungssequenz. Diese führt zu einer spezifischen Biotinylierung im N-terminalen Bereich des rekombinanten Proteins. Dieser kombinierte Tag ermöglicht zum einen die spezifische Aufreinigung über IMAC (vgl. Abb. 13) und zum anderen die spätere Immobilisierung des Proteins an die magnetischen Trägerpartikel. Eine Immobilisierung über NiNTA-Trägermatrix ist in Verbindung der gewählten Phagenbibliothek nicht möglich, da diese die scFv's in Fusion mit dem RGSHis<sub>6</sub>-Tag exprimieren.

Weiterhin ist der Vektor ein modifiziertes Derivat des Vektors pPICZa (Invitrogen) und erlaubt eine Expression sowohl in *E. coli* als auch in *Pichia pastoris*. Es wurde beschrieben, dass *P. pastoris* in der Lage ist, mehr unterschiedliche Proteine löslich zu exprimieren, während bei der Expression in *E. coli* ungefähr 60 % der eukaryotischen Gene aggregieren,

in unlöslichen *inclusion bodies* lokalisiert sein können und falsch gefaltet vorliegen können (Lueking *et al.*, 2000).

Dabei wird in Hefe aber häufiger nur eine geringere Menge an rekombinantem Protein erhalten (0,1-5 µg/ml). Da diese Ausbeute für den Einsatz im Phage Display zu gering war, wurde ausschließlich das bakterielle System verwendet. Der Vorteil des bakteriellen Systems bei der rekombinanten Proteinexpression sind die einfache Handhabung, die Kosteneffektivität, die Produktion von großen Mengen an heterologen Proteinen (1,5-20 µg/ml) und die Etablierung im Hochdurchsatz-Verfahren.

Die hier exprimierten Proteine verfügten damit über einen RGSHis<sub>6</sub>-Tag (sechs aufeinander folgende Histidin Reste) sowie einen Biotin-Tag am N-terminalen Ende, der spezifisch an die NiNTA-Agarose, bzw. Streptavidin-Beads bindet und somit eine schnelle und einfache Aufreinigung über Standardmethoden ermöglichte. Die Induktion der Proteine erfolgte mit 1 mM IPTG in *E. coli*. Nach der folgenden Aufreinigung der Proteine unter nativen bzw. denaturierenden Bedingungen wurden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen, um sie dann mit dem Antikörper anti-RGSHis<sub>6</sub> (QIAGEN) bezüglich Reinheit und Größe zu kontrollieren (vgl. Abb. 13).



**Abb. 13: Western-Blot.**

Die aus der cDNA exprimierten und nativ aufgereinigten Proteine wurden auf ein SDS-PAGE aufgetragen und anschließend durch Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Antikörpernachweis erfolgte mit einem monoklonalen RGSHis<sub>6</sub>-Antikörper (1:1000), sowie mit einem sekundären Maus-Antikörper (aus Ziege), konjugiert mit HRP (*horseradish peroxidase*) (1:5000). Die Detektion erfolgte mittels Chemolumineszenz. Die Belichtungszeit betrug ca. 1 min. Nach Auflegen der Membran erfolgte die oxidative Degradation des Luminols, woraus eine Lichtemission bei einer Wellenlänge von 428 nm resultierte.

Insgesamt konnten 12 Gene exprimiert werden, die in die Selektion für die Phagen-Antikörperproduktion durch Phage Display eingesetzt wurden (vgl. Tab. 2).

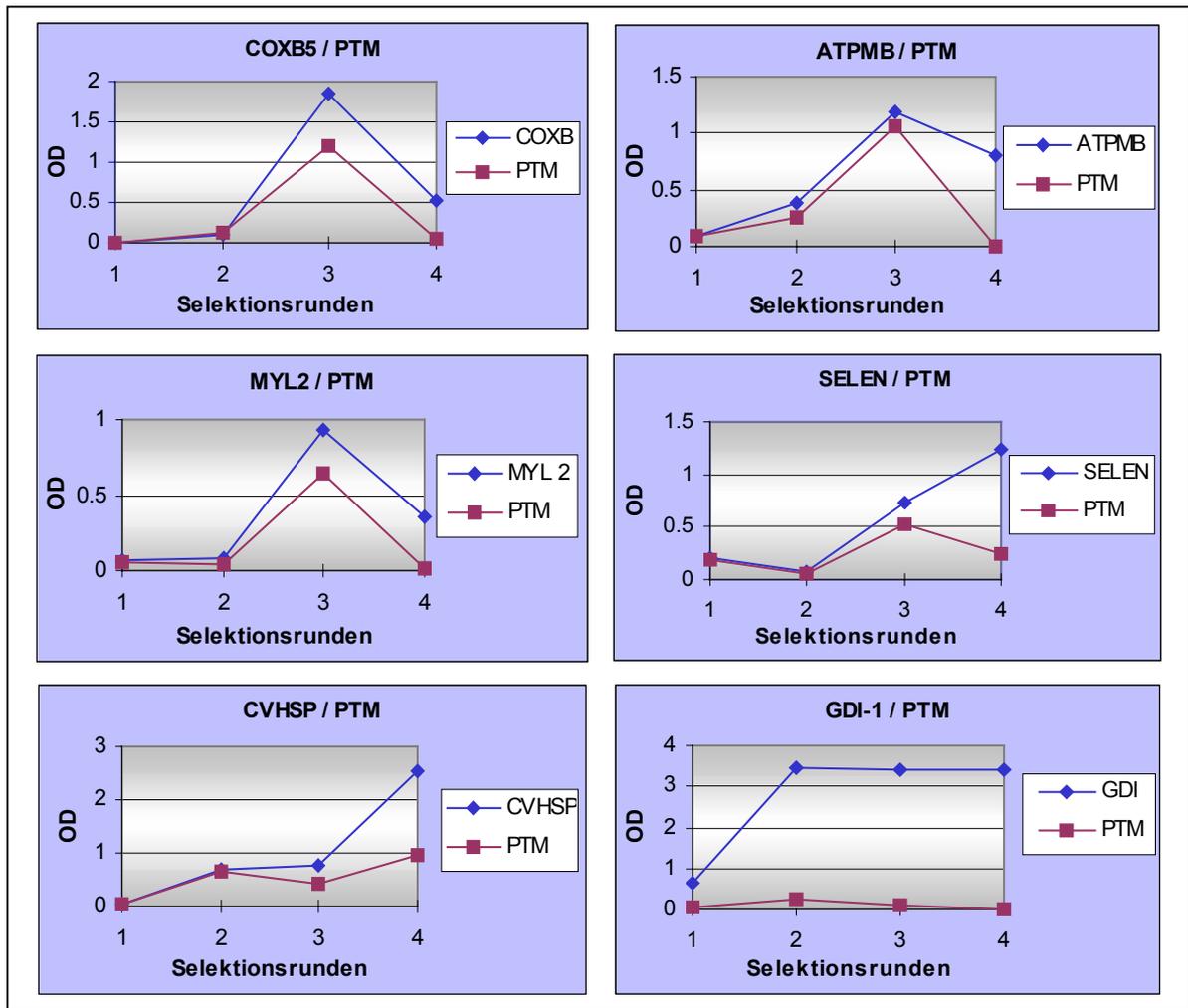
### **3.1.3. Phage Display mit exprimierten Proteinen aus *E. coli***

Beim Phage Display wurde ein Antikörper-Fragment auf der Oberfläche des filamentösen Bakteriophagen M13 in Form einer Fusion mit dem Phagenhüllprotein P3 präsentiert. Die verwendete Bibliothek wies ein Phagemid / scFv-Format auf und wurde vorgescreent gegen Protein A und Protein L, sodass die Mehrzahl der Klone in der unselektierten Bibliothek funktionell waren und sowohl eine schwere als auch eine leichte Kette enthielten (Holt *et al.*, 2000).

Für die Selektion der Phagen, wurden die exprimierten Proteine aus der humanen Herz-cDNA über ihren Biotin-Tag an Streptavidin-Beads gebunden. Anschließend konnten die Antikörper, die auf der Oberfläche des Bakteriophagen präsentiert wurden, spezifisch an die immobilisierten Proteine binden. Dieser Selektionsvorgang wurde viermal durchlaufen, um die spezifisch bindenden Phagen mit den entsprechenden Proteinen anzureichern. Die Phagen stammten aus einer Phagen Bibliothek ( $\sim 1 \times 10^{12}$  Phagenpartikel/ml) aus der Arbeitsgruppe von Ian Tomlinson. Eine Beschreibung des genauen Ablaufes der Phagen-Selektion ist unter Material und Methoden, Punkt 2.1.5. zu finden.

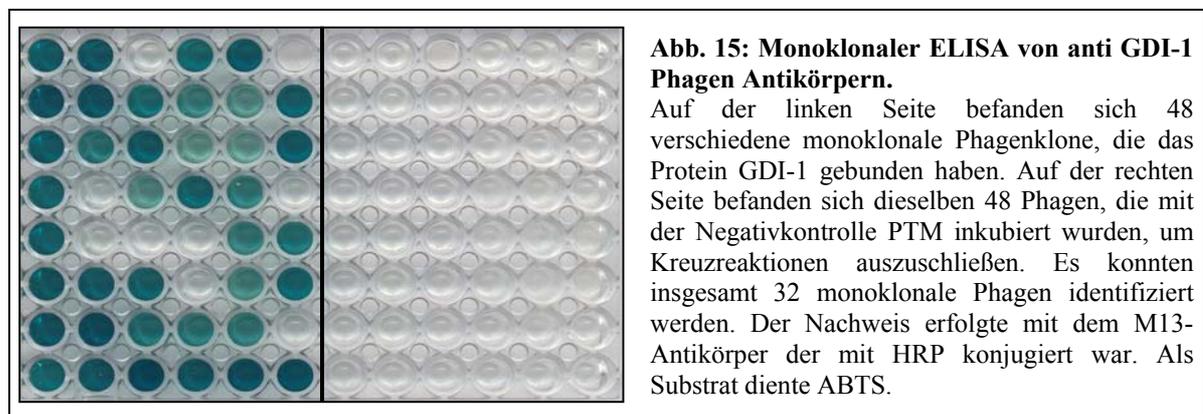
#### **3.1.3.1. Polyklonaler und monoklonaler Phagen-ELISA**

Im Folgenden wurden die oben genannten 12 exprimierten Proteine in der Phagen-Selektion eingesetzt. Nach den vier Selektionsrunden wurde die Anreicherung spezifischer Phagen-Antikörper mittels ELISA kontrolliert. Bei der Selektion der Phagen-Antikörper konnten gegen sechs verschiedene Proteine (ATPMB, SELEN BP1, COXB5, CVHSP, GDI-1 und MYL2) (vgl. Abb. 14) eine spezifische Anreicherung in Form von polyklonalen Phagen hergestellt werden, sowie gegen zwei Proteine (GDI-1 und MYL2) eine Anreicherung in Form von monoklonalen Phagen (vgl. Abb. 15).



**Abb. 14: 4 Selektionsrunden von spezifischen Phagenantikörpern der Phagen-Bibliothek.** Gezeigt ist die Selektion von Phagenantikörpern gegen die aus der cDNA exprimierte Proteine: ATPMB, SELEN, COXB5, CVHSP, GDI-1, MYL2, wobei 1xPTM als Kontrolle diente. Das Verhältnis der spezifischen Antikörper gegen PTM stieg während der vier Selektionsrunden gegen die jeweiligen Proteine an.

Nach der 4. Selektionsrunde wurden die polyklonalen, bzw. monoklonalen spezifischen Phagen-Antikörper durch ELISA identifiziert (vgl. Abb. 15).



**Abb. 15: Monoklonaler ELISA von anti GDI-1 Phagen Antikörpern.** Auf der linken Seite befanden sich 48 verschiedene monoklonale Phagenklone, die das Protein GDI-1 gebunden haben. Auf der rechten Seite befanden sich dieselben 48 Phagen, die mit der Negativkontrolle PTM inkubiert wurden, um Kreuzreaktionen auszuschließen. Es konnten insgesamt 32 monoklonale Phagen identifiziert werden. Der Nachweis erfolgte mit dem M13-Antikörper der mit HRP konjugiert war. Als Substrat diente ABTS.

Die 32 positiven Klone wurden sequenziert, um unterschiedliche monoklonalen Phagenantikörper zu bestimmen. Insgesamt konnten 2 unterschiedliche Phagenantikörper gegen das Protein GDI-1 identifiziert werden. Bei den restlichen 16 Klonen waren die jeweiligen monoklonalen Phagen wahrscheinlich nicht spezifisch gegen ein Epitop des Proteins. Nach der 4. Selektion kann es durchaus vorkommen, dass noch unspezifische Phagen auftreten. In Tabelle 2 sind alle Gene der differentiellen Expression abgebildet, die amplifiziert, transformiert, exprimiert und in die Phagen-Selektion eingesetzt wurden.

**Tab. 2: Tabelle aller amplifizierten, bzw. differentiell exprimierten Gene.**

18 von 26 Genen wurden in *E.coli* transformiert. 12 der Gene konnten fast alle nativ in *E. coli* exprimiert werden. Von 6 Proteinen konnten polyklonale Phagen produziert werden und von zwei Proteinen (GDI-1 und MYL2) wurden zudem monoklonale Phagen hergestellt.

<i>Protein aus cDNA</i>	<i>PCR Produkt</i>	<i>Transformation in BL21 (E.coli)</i>	<i>Expression in BL21 (E.coli)</i>	<i>Phage Display</i>
Actin, alpha 1 (ACTS)	Ja	Nein		
ATP synthase, H <sup>+</sup> -transporting, mitochondrial F1 complex, betapolypeptide (ATPMB)	Ja	Ja	Nativ	Polyklonal
Transcription factor BTF3	Ja	Nein	Nein	
Calreticulin (CALR)	Ja	Ja	Denaturiert	
CD81 antigen, target of antiproliferated antibody 1 (CD81)	Ja	Ja	Nativ	
Cytochrome c oxidase subunit VIc (COX6C)	Ja	Ja		
Calcineurin-binding protein calsarcin-1 (CS1)	Ja	Ja	Nativ	
Cardiovascular heat shock protein (CVHSP)	Ja	Ja	Nativ	Polyklonal
Cytochrome c oxidase subunit Vb (COX5B)	Ja	Ja	Nativ	Polykloal
Dynamin 1-like (DNM1L)	Ja	Nein		
Fatty acid binding protein 3, muscle and heart (FABP3)	Ja	Ja		
GDP dissociation inhibitor 1 (GDI-1)	Ja	Ja	Nativ	Monoklonal
G protein-coupled receptor 72 (GPR72)	Ja	Nein		
Creatine kinase, mitochondrial 2 (KCRS)	Ja	Ja	Denaturiert	
Leptin (LEP)	Ja	Ja		
Matrix gla protein (MGP)	Ja	Ja		
Myosin, light polypeptide 2 (MYL2)	Ja	Ja	Nativ	Monoklonal
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 3 (NDUFB3)	Ja	Ja		
Phospholamban (PPLA)	Ja	Ja	Nativ	
prostaglandin-D synthase gene (PTGDS)	Ja	Nein		
Requiem, apoptosis response zinc finger gene (REQ)	Ja	Nein		
SCL	Ja	Ja		
Selenium-binding protein 1 (SELEN BP1)	Ja	Ja	Nativ	Polyklonal
Small muscle protein, X-linked (SMPX)	Ja	Ja	Nativ	
Vesicle-associated membrane protein2 (VAMP2)	Ja	Nein		
Zinc finger protein 9 (ZNF9)	Ja	Nein		

### **3.1.3.2. Validierung der selektierten Phagenantikörper**

#### **3.1.3.2.1. Anwendung der Phagenantikörper auf einer Expressionsbibliothek**

Zur weiteren Validierung dieser Ergebnisse wurden monoklonale GDI-1 und Ubiquitin Phagen auf der hEX1-Bibliothek getestet (Versuchsdurchführung entspricht dem des Plasmascreenings, vgl. 2.1.6.1.). Der Nachweis erfolgte mit einem M13-Antikörper, der mit HRP konjugiert war. Da die zu detektierende Lichtemission des HRP-Substrates bei 428 nm lag, was mit der CCD-Kamera jedoch nicht nachzuweisen war, wurde ein weiterer Antikörper, der mit AP konjugiert war verwendet, der den aus Maus stammenden M13-Antikörper erkannte. Die identifizierten Klone wurden hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht. Es zeigte sich dass der eingesetzte GDI-1-Phagenantikörper von den insgesamt sieben Proteinen eines gebunden hatte, welches aus der Rab-Familie stammte. Rab-Proteine wechseln zwischen dem Zytosol und der Membran durch die Regulierung von GDI-Proteinen (Shisheva *et al.*, 1994). Es sind aber keine Homologien zwischen Rab- und GDI-Proteinen bekannt. Daher stellt sich die Frage, ob es Zufall ist, dass ein Protein identifiziert wurde, das mit GDI intrazellulär interagiert. Bei den anderen gebundenen Proteinen lassen sich ebenfalls keine Sequenz-Homologien zu GDI-1 finden. Demnach handelte es sich wahrscheinlich um Hintergrundsignale vom zweiten oder dritten Antikörper oder aber um Kreuzreaktionen, die von den Phagen verursacht wurden.

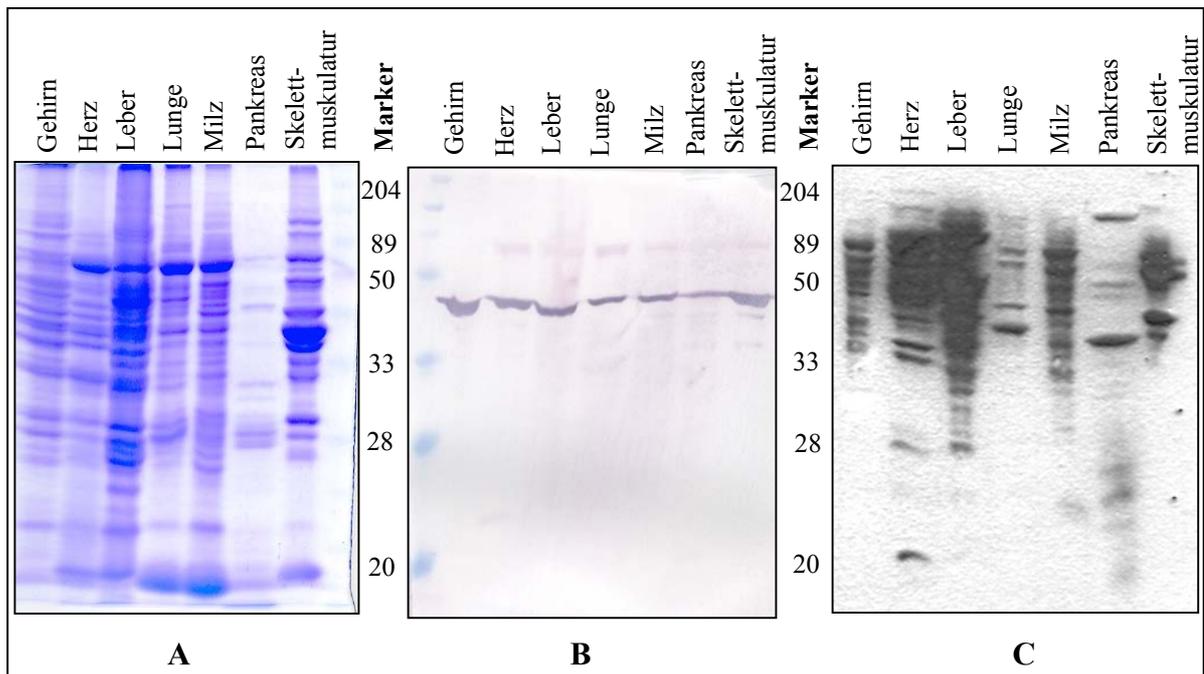
Beim Testen des monoklonalen Ubiquitin-Phagen konnte im Gegensatz zu GDI-1 eine höhere Spezifität ausfindig gemacht werden. Die Ubiquitin-Phagenantikörper banden insgesamt 27 Klone, wobei es sich bei 21 Klonen um Ubiquitin-Proteine handelte.

Mit Hilfe des Screenings der Phagen auf einer Expressionsbibliothek ist es möglich, die Qualität und damit die Spezifität der identifizierten monoklonalen Phagenantikörper zu testen und damit weitere Verwendungen dieser Phagen abzuwägen.

#### **3.1.3.2.2. Anwendung der Phagenantikörper an isolierten Proteinen aus Mausegewebe auf Western-Blots**

Zur weiteren Untersuchung dieser Phagen wurden Mäusen verschiedene Organe wie Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Milz, Pankreas und Skelettmuskulatur entnommen und daraus die Proteine extrahiert. Es erfolgte eine Proteinbestimmung nach Bradford, bei der die Konzentrationen der Gewebeproteine zwischen 1,5 und 2 mg/ml lagen. Die Gewebeproteine

wurden auf ein SDS-PAGE in einer 1:10-Verdünnung aufgetragen (vgl. Abb. 16) und das Gel durch Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die monoklonalen Phagenantikörper, die spezifisch gegen GDI-1 gerichtet waren wurden auf dem Western-Blot 1:2500 eingesetzt, sodass sie eine Konzentration von ungefähr  $10^9$  besaßen (Ausgangskonzentration betrug  $2 \times 10^{12}$ ). Als Testantikörper wurde anti-GAPDH verwendet, mit dem eine positive Durchführung des Versuches gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 16).



**Abb. 16: SDS-PAGE mit verschiedenen Mausgeweben und Detektion mit verschiedenen Antikörpern.**

Die Proteine wurden aus den Mausgeweben isoliert, 1:10 verdünnt und auf ein SDS-PAGE aufgetragen. **A:** Das Gel wurde mit einer Coomassie-Blaulösung angefärbt, **B:** Detektion mit einem GAPDH-Antikörper und **C:** Detektion mit einem monoklonalen GDI-1-Phagenantikörper.

Die Proteinextrakte wurden mit Mercaptoethanol reduziert und bei  $100^{\circ}\text{C}$  denaturiert. Der GAPDH-Antikörper wurde als Kontrolle verwendet (1:1000). Als Sekundärantikörper diente anti Maus-AP (1:5000). Der monoklonale Phagenantikörper wurde 1:2500 eingesetzt und mit dem Zweitantikörper anti-M13-HRP (1:5000) detektiert.

Bei dem GDI-1-Phagenantikörper handelte es sich um denselben Klon wie bei den Versuchen auf den großen Expressionsfiltern. Die große Zahl an detektierten unterschiedlichen Proteinen deutet auf eine Unspezifität des Antikörpers hin. Dies würde die Ergebnisse auf den großen Filtern bestätigen. Alle zusätzlich getesteten monoklonalen Phagenantikörper ergaben ähnliche Ergebnisse.

Da es sich bei den monoklonalen Phagenantikörpern um unterschiedliche Klone handelt, ist es möglich, dass sie auch verschiedene Epitope binden. Daher besteht auch die Möglichkeit, dass einige Phagenantikörper an das GDI-2 binden, das eine ähnliche Größe und Homologie besitzt wie das GDI-1 und, abhängig um welche Transkriptvariante es sich handelt, die Größen zwischen 40 und 50 kDa annehmen kann. Anhand der Hybridisierungs-Ergebnisse auf dem Western-Blot, ist es schwierig zu sagen, ob es sich bei den angefärbten Banden, die in dem Größenbereich liegen, um GDI-Moleküle handelt oder nicht. Um eine genaue Aussage über die gebundenen Proteine zu machen, müßten diese aus dem Gel isoliert werden und nach einem Trypsinverdau massenspektroskopisch untersucht werden.

### **3.2. Identifizierung krankheitsspezifischer Proteine aus Patientenplasma mittels Screening auf der human fetal brain (hEX1)-Bibliothek**

Im zweiten Teil der Arbeit wurden mittels Plasmascreening, durch die im Plasma enthaltenen Autoantikörper, Proteine identifiziert, die möglicherweise krankheitsrelevant für den autoimmunen Subtyp der DCM sind. Hierzu wurden Plasmen von Patienten und gesunden Kontrollprobanden eingesetzt.

#### **3.2.1. Screening von Patienten- und Kontrollplasma auf der hEX1-Bibliothek**

Zur Identifizierung von möglichen Autoantigenen von DCM-Patienten, die eine autoimmune Krankheitsform aufwiesen, wurden die entsprechenden Plasmen auf klonalen Hochdichte-Protein-Filtern hybridisiert. Dabei handelte es sich um PVDF-Membranen mit immobilisierten Genprodukten einer oligo-dT-geprägten cDNA-Expressionsbibliothek aus humanem fötalen Hirngewebe, deren cDNA-Fragmente in einen für *E. coli* generierten Expressionsvektor (pQE30NST, QIAGEN-Derivat) kloniert wurde. Der für die Expression verwendete Vektor zeichnet sich dadurch aus, dass er einen induzierbaren Promotor trägt, mit dem sich der Zeitpunkt der Proteinexpression steuern lässt, und Sequenzen für ein sogenanntes Affinitätsepitop RGSHis<sub>6</sub>-Tag, der zum einen den spezifischen Nachweis der rekombinanten Fusionsproteine mittels eines gegen das Affinitätsepitop gerichteten

Antikörpers erlaubt, zum anderen wird die spezifische Aufreinigung über Affinitätschromatographie (IMAC) ermöglicht.

Diese im folgenden als "hEX1" bezeichnete Bibliothek enthält 37.830 größtenteils redundante Expressionsklone. Die Charakterisierung der Bibliothek mittels Oligo-Fingerprinting (Büssow, 1998) zeigte, dass mindestens 12.500 unterschiedliche Proteine repräsentiert wurden (Cahill *et al.*, in Vorbereitung). Die Proteine lagen auf den klonalen Proteinfiltren denaturiert vor und waren in Duplikaten angeordnet. Damit kann eine Doppelbestimmung durchgeführt werden, konnte mit der eine höhere Datensicherheit erzielt wird.

In den folgenden Screening-Experimenten sollten durch die spezifische Bindung an die linearen Epitope der denaturierten Proteine die Autoantikörper bzw. die korrespondierenden Autoantigene bestimmt werden.

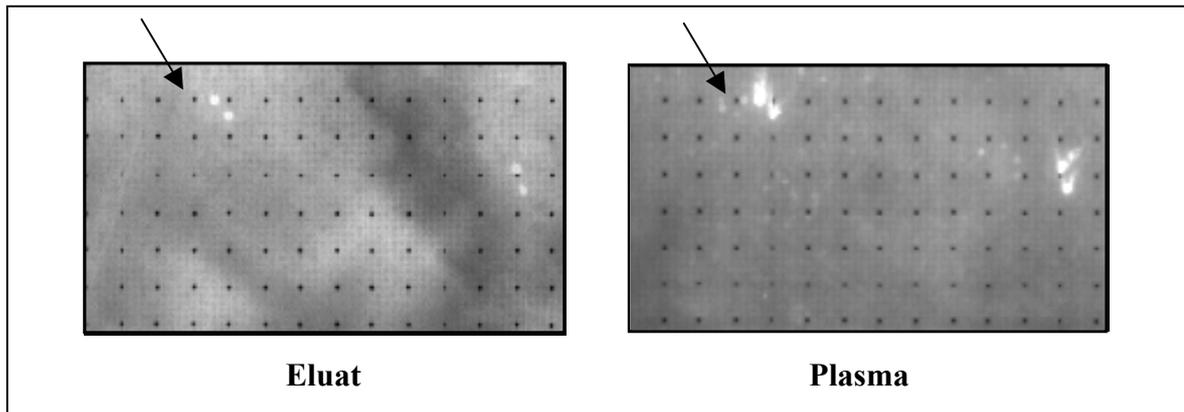
### **3.2.1.1. Auswahl geeigneter humaner Körperflüssigkeiten für die Anwendung auf Protein-Hochdichte-Filtern**

Im ersten Vorversuch wurden verschieden behandelte Blutproben auf Hochdichte-Filtern getestet, um die optimale Quelle an spezifischen Autoantikörpern zu identifizieren. Dabei wurden vor allem die eingesetzte Menge, die Signalstärke und die Spezifität der Signale miteinander verglichen. Als "Blutvarianten" wurden Serum, Plasma, sowie das bei der Immunadsorption (IA) (vgl. 1.3.2.) anfallende Eluat, das in Puffer verdünnte Immunglobuline enthält, zunächst in Betracht gezogen.

Es wurde jedoch erkannt, dass die Ergebnisse von Serum und Plasma kompatibel waren. Beide Blutproben-Arten ergaben spezifische Signale mit gleich starker Intensität.

Die aus dem Verfahren der Immunadsorption anfallenden Probenvolumina waren sehr groß. Hierdurch lagen die Immunglobuline stark verdünnt vor. Es konnte gezeigt werden, dass Antigene, die über die aus der IA gewonnenen Immunglobuline detektiert wurden, auch in dem Screeningversuch mit Plasma identifiziert wurden. Jedoch ist die Anzahl der insgesamt detektierten Antigene basierend auf den mittels Immunadsorption isolierten Immunglobulinen deutlich niedriger als bei der Verwendung von Plasma (vgl. Abb. 17). Beispielsweise konnten unter Verwendung von Plasma eines Patienten etwa 100 Antigene identifiziert werden. Im Gegensatz dazu wurden nur 44 Antigene beim Einsatz von

isolierten Immunglobulinen desselben Patienten detektiert, also weniger als 50 % an detektierten Klonen im Vergleich zum Plasma. Darüber hinaus ist die Signalstärke unter Verwendung der isolierten Immunglobuline deutlich niedriger als bei Einsatz von Blutplasma. Dies ist wahrscheinlich auf die nach der IA-Therapie stark verdünnt vorliegenden Immunglobuline zurückzuführen (Felix *et al.*, 2000; Staudt *et al.*, 2001).



**Abb. 17: Vergleich von Blutplasma und Immunadsorptionseuat.**

Ausschnitt eines Hochdichte Proteinfilters. Der linke Filter wurde mit dem Eluat aus der Immunadsorption des Patienten Nr. 6 inkubiert und der rechte Ausschnitt zeigt einen inkubierten Filter mit dem Plasma desselben Patienten.

Die Pfeile markieren den Unterschied der beiden verwendeten Blutvarianten auf den Protein-Filtern. Bei der Inkubation mit Plasma trat ein positives Signal auf, wohingegen das Immunadsorptions-Eluat dieses Protein nicht detektieren konnte.

Desweiteren konnte anhand dieses Versuches die höhere Signalintensität beim Plasma gegenüber dem Eluat verdeutlicht werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen ist es empfehlenswert, entweder Blutserum oder Blutplasma zu verwenden. Da jedes einzelne Screening eine relativ große Menge an Probenmaterial benötigt, wurde entschieden, die nachfolgenden Versuche mit dem leichter in größeren Mengen zu generierenden Blutplasma durchzuführen.

### 3.2.1.2. Reproduktionsversuche auf der hEX1-Bibliothek

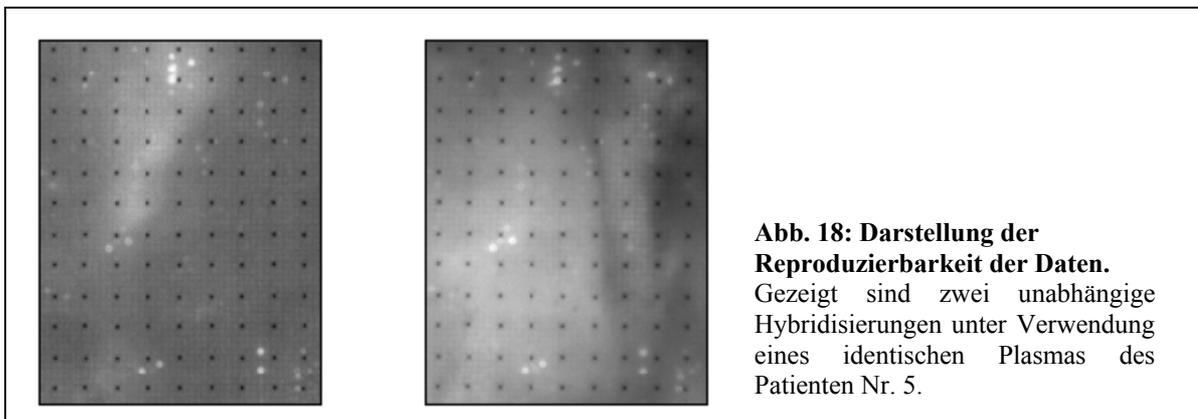
Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden alle Plasmen (sowohl von Patienten als auch von den Kontrollen) mindestens zweimal auf den Filtern der hEX1-Bibliothek getestet, um alle potentiell krankheitsassoziierten Proteine aus der Bibliothek zu isolieren.

Zur Verdeutlichung der Reproduzierbarkeit wurden jeweils Ausschnitte von Hochdichte-Filtern beispielhaft dargestellt, die mit dem Plasma eines Patienten inkubiert worden waren (vgl. Abb. 18).

Die positiven Signale auf den Filtern zeigten, wo Antikörper des Plasmas an die rekombinanten Proteine auf dem Proteinarray gebunden haben. Jedes Antigen ist zweimal in einem 5x5 Pattern auf dem Array angeordnet, sodass explizit positive Klone in der entsprechenden Anordnung dieses Patterns ein Signal ergaben.

Die Reproduzierbarkeit der Plasmascreenings auf den Hochdichte-Filtern lag im Durchschnitt bei 80 % und in Einzelfällen sogar bei 100 %. Bei keinem Ansatz lag die Reproduzierbarkeit unter 60 %.

Basierend auf dieser hohen Reproduzierbarkeit wäre es für nachfolgende Applikationen, beispielsweise mit Plasma einer anderen Autoimmunkrankheit, nicht mehr zwingend erforderlich, jede Hybridisierung als Doppelansatz durchzuführen.



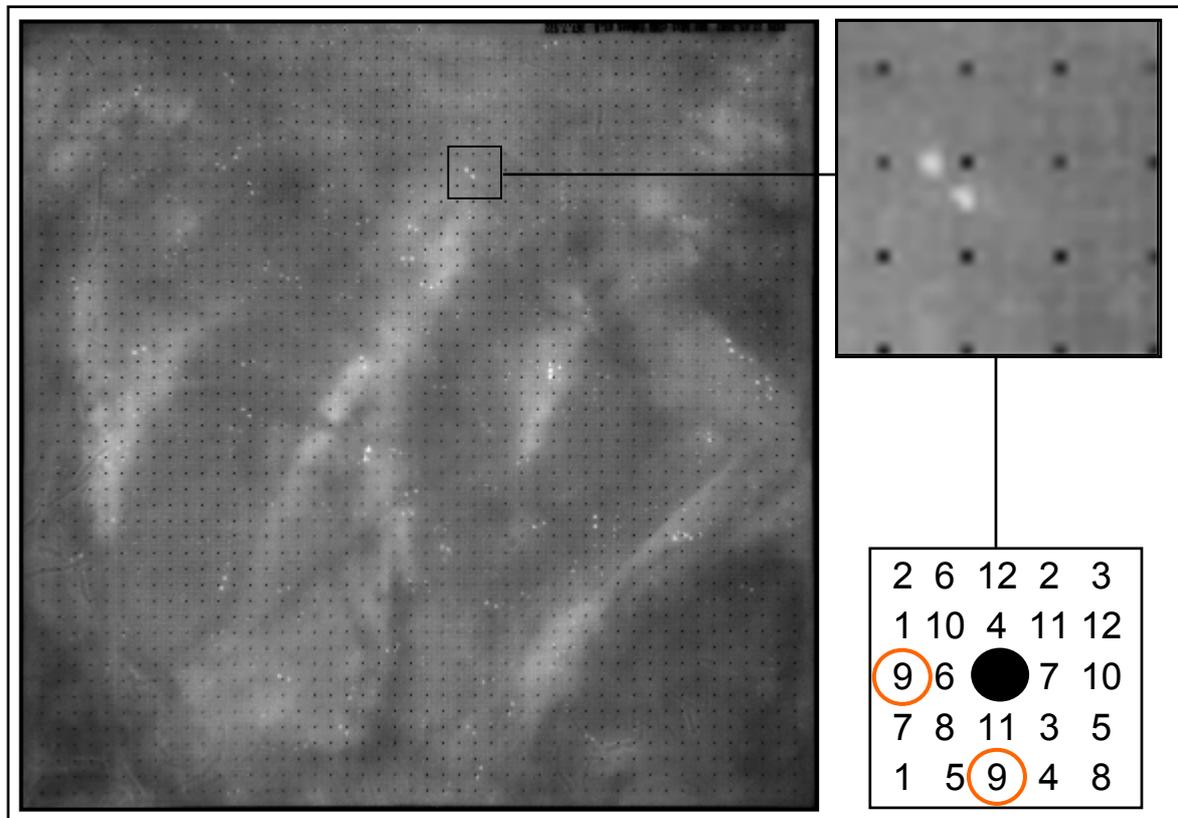
### 3.2.1.3. Darstellung eines hEX1-Hochdichte Filters anhand eines Patientenbeispiels

Für die anschließenden Versuche des Plasmascreenings wurden insgesamt 10 Patientenplasmen und 6 Plasmen von gesunden Kontrollen gegen die hEX1-Bibliothek gescreent. Die ausgewählten Kontrollen korrespondierten bezüglich Geschlecht und Alter mit den Patienten.

Wie in der Abbildung 19 zu erkennen ist, wurden verschiedene im Plasma enthaltene Autoantikörper spezifisch an potentielle Autoantigene gebunden.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte über die Software Visual Grid (GPC). Die jeweiligen Reproduktionsversuche wurden im direkten Vergleich analysiert und die verschiedenen Patienten und Kontrollen untereinander verglichen.

Im Durchschnitt wurden bei den Patienten 126 Antigene detektiert, verglichen mit 111 durchschnittlich vorkommenden Antigenen in den Plasmen der gesunden Kontrollen.



**Abb. 19: Proteinfiler (Set 8) inkubiert mit Patienten-Plasma von Patient Nr. 5.**

Plasma von 10 Patienten, bei denen die autoimmune Form von DCM diagnostiziert wurde und 6 Kontrollen, wurden auf Hochdichte Proteinfilern der hEX1-Bibliothek gescreent.

Als Kontrollversuch zur Bestimmung des unspezifischen Hintergrundes wurde nur der Zweit-Antikörper auf den Filtern getestet.

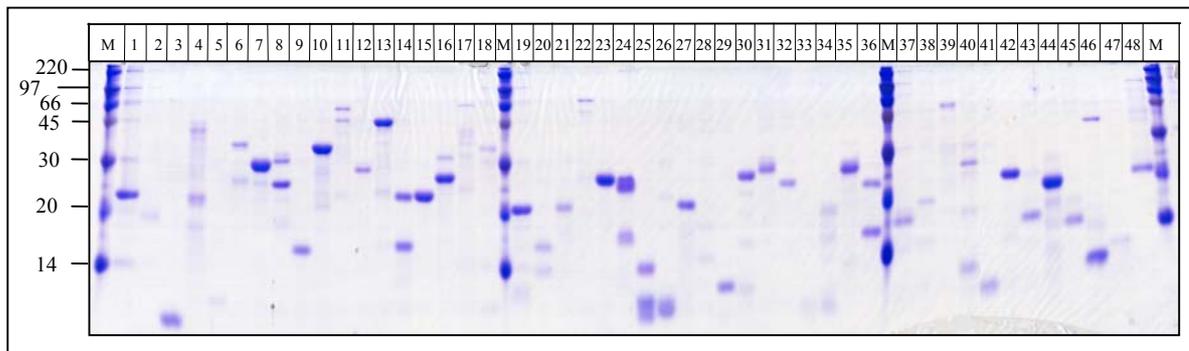
### 3.2.2. Analyse der positiv detektierten Klone der hEX1-Bibliothek

Der Vergleich aller Plasmen führte zu über 1000 verschiedenen Antigenen, wovon 228 Klone identifiziert wurden, die in mindestens 2 verschiedenen Plasmen gefunden wurde. Hierbei wurde anfänglich keine Unterscheidung zwischen Kontrollen und Patienten gemacht. Alle Klone wurden hinsichtlich ihrer Proteinexpression näher untersucht, d.h., alle Antigene wurden gepickt, sequenziert und die rekombinanten Proteine exprimiert und aufgereinigt. Die Sequenzdaten wurden gegen Genbank und Swissprot Datenbanken verglichen.

Nach der Aufreinigung der Proteine zeigte sich, dass für 214 Klone ein Genprodukt erhalten wurde. Die restlichen 7 % (14 Klone) wiesen wahrscheinlich den falschen Leserahmen auf, wodurch vermutlich nur kleine und instabile Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert wurden, die daher nicht mehr auf dem Gel zu sehen waren.

Die Sequenzanalyse der 214 Klone und der anschließende Datenvergleich mit Genbank/Swissprot identifizierte u.a. zytoskeletale (z.B. Myosin, Stathmin), mitochondriale (z.B. *Isocitrat Dehydrogenase*) oder ribosomale (z.B. *Translation initiation factor 4A, isoform*) Proteine. Es wurden aber auch viele Antigene detektiert, deren Funktion bislang noch unklar ist. Diese waren jedoch von besonderem Interesse als potentielle DCM-Marker, wenn sie nur in Patientenplasmen auftraten (vgl. Tab. 3).

Es konnten von diesen 214 Proteinen insgesamt 48 Proteine identifiziert werden, die in mindestens zwei Patienten aber keiner Kontrolle auftraten, bzw., in mindestens vier oder fünf Patienten und höchstens in einer Kontrolle (vgl. Tab. 3 und Abb. 20). Diese Proteine dienen zur weiteren Verifizierung.



**Abb. 20: 12,5 %iges SDS-PAGE mit aufgereinigten Proteinen vom DCM-Plasmascreening auf Hoch-Dichte-Filtern.**

Als Abbildung eines SDS-PAGE dienten die Proteine, die nur bei DCM-Patienten auftraten. Dabei handelte es sich um 48 Proteine, die zu 100 % im SDS-PAGE über Coomassie-Blau Färbung nachgewiesen werden konnten und mindestens in zwei Patienten positiv waren. Die durchschnittliche Größe der rekombinanten Proteine lag bei 30 kDa und einer Konzentration von ca. 100 µg/ml.

### 3.2.2.1. Sequenzerggebnisse der detektierten Klone in Kontrollen und Patienten

**Tab. 3: 48 potentielle DCM-Autoantigene.**

Sequenzierte Gene, die beim Plasmascreening auf den hEX1-Proteinfiltern bei mindestens zwei Patienten oder bei mindestens vier Patienten aber nicht mehr als einer Kontrolle positiv waren.

<i>Klon ID</i>	<i>Plasma</i>	<i>Sequenzierte Proteine</i>
505 C24	1, 5, 9	Histone Deacetylase 3
507 M16	1, 3, 4, 6, K4	PAP-2-like protein 2 (PHP2)
511 L 14	2, 4, 5, 6, 9, K3	Chromosome 7 Klon RP11-309L24.
511 O06	3, 8, 10	Hypothetisches Protein MGC15730
511 O18	1, 4, 8, 9	Poly(A) binding Protein, zytoplasmatisch 1 (PABPC1)
515 I 11	1, 3	Putative human HLA class II associated protein I,
515 M05	1, 9	Mitochondrialer Elongation-Faktor G (EFG1)
517 F03	1, 3, 4, 9, 10, K2	DRR1 mRNA
519 G21	6, 10	Similar to Rec8p, (a meiotic recombinant and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the rad21p family).
519 O20	7, 8, 9	Transforming acidic coiled coil 2, long isoform (TACC2)
520 J 04	4, 9	Nuklease sensitives element binding protein 1 (NSEP1).
521 G09	8, 9, 10	Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 (Fe65) (APBB1), transcript variant 1.
524 A11	1, 2, 6, 7, 9, K5	Kinesin 2 (60-70kD)
524 C13	1, 3	Putative cyclin G1 interacting protein (CG1I) / zinc finger, HIT domain containing 1 (ZNHIT1)
524 D06	2, 7, 9	Ubiquitin specific protease 47 (USP47)
534 J22	1, 3, 5	Isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial.
537 L18	3, 7, 9	Hypothetical protein FLJ14451.
541 E06	6, 8	Hypothetical protein DKFZp761O0113
541 H05	4, 9	HESB like domain containing 1 (HBLD1)
541 L03	1, 5	Zinc finger protein 142 (ZNF142)
541 O14	1, 3, 9	Neurogenic differentiation 2 (NEUROD2).
542 E11	2, 5, 8	BAC clone RP11-367J11 from 4.
542 C11	1, 3, 6, 8, 9	Peroxisome biogenesis factor 13 (PEX13)
543 L24	1, 2, 9	NAC alpha mRNA.
544 D23	3, 7, 8, 9	mRNA for KIAA1358 protein
549 A12	1, 5, 8, 9	Cask-interacting protein1 (CASKIN1)
549 M24	3, 6, 9	Neural proliferation, differentiation and control, 1 (NPDC1)
550 C21	1, 3	Polymerase (DNA directed), epsilon
552 J24	5, 6	RAD23 homolog A ( <i>S. cerevisiae</i> ).
554 E05	7, 8	Rapamycin binding protein (FK506) mRNA
557 E09	4, 5, 7, 9, 10	PCF11p homolog (PCF11)
557 P08	5, 6, 8	KIAA1598 protein.
561 I 19	3, 5, 8	Heat shock 70kD protein 4 (HSPA4).
561 L03	1, 4	DNA sequence from clone RP11-342C24 on chromosome 10
564 H23	2, 3	Hypothetical protein FLJ20203.
569 O05	8, 6, 9	Paraneoplastic antigen MA3 (PNMA3)
574 J16	6, 9	A1136596 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761F069 (from clone DKFZp761F069); complete cds. 3/2001
582 H11	1, 3, 4, 6	Similar to Zinc finger protein 184
582 J24	6, 7, 8	Praja 2, RING-H2 motif containing (PJA2)

582	N11	7, 8	RNA binding motif protein 6 (RBM6).
583	B14	1, 6	Citrate transport protein mRNA
585	M21	1, 8, 9	Kv channel interacting protein 1 (KCNIP1)
590	D24	1, 3, 6	Chromosome 7 clone RP11-148L5
591	K17	2, 4, 7	CDC37 cell division cycle 37 homolog (s.cerevisiae)
593	N16	1, 10	Human clone lambda 5 semaphorin mRNA
597	M19	2, 6	Low density lipoprotein-related protein associated protein 1 (LRPAP1).
598	A03	3, 4, 6	Chromosome 1 clone RP11-421L21
599	P10	1, 5, 8, 9	Capicua homolog (Drosophila)

Vorübergehende adaptive Autoimmunreaktionen kamen auch, wie Tab. 4 zeigt, bei den Kontrollen vor, jedoch führen diese nicht zu dauerhaften Gewebeschädigungen und damit auch nicht zu autoimmunen Erkrankungen (vgl. 1.2.1.) (Janeway *et al.*, 1997).

**Tab. 4: 14 potentielle „natürliche Autoantigene“.**

Sequenzierte Gene, die beim Screening von Patientenplasma und Kontrollplasma auf den hEX1-Proteinfiltern bei mindestens 5 Patienten und / oder Kontrollen positiv waren.

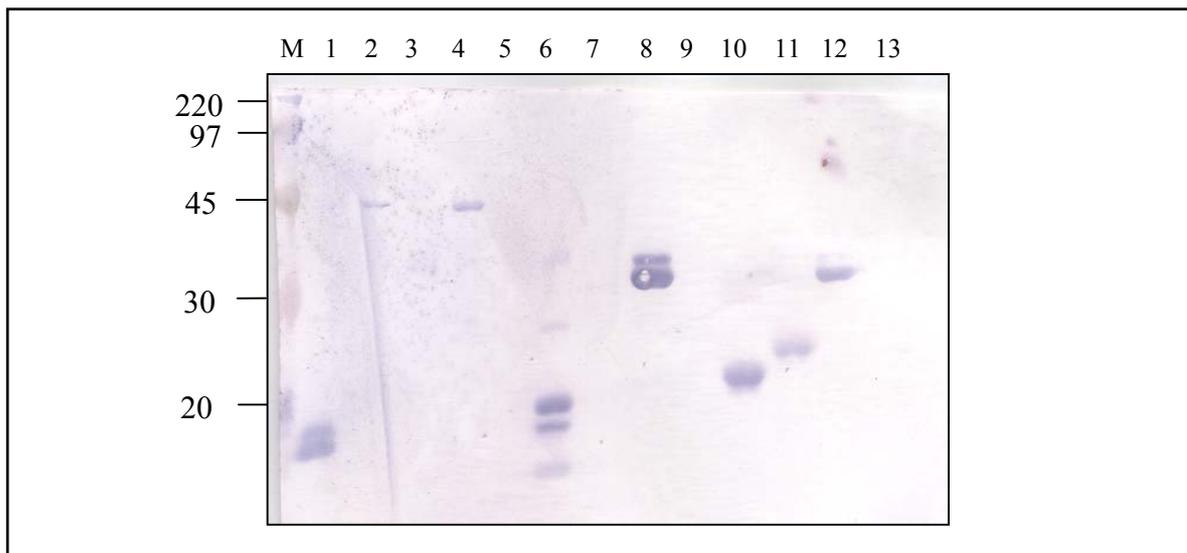
<i>Klon ID</i>	<i>Plasma</i>	<i>Proteine (Autoantikörper)</i>
578 I 17	1, 2, 3, 5, 7, 9, 10, K1, K2, K3, K4, K5, K6	Stathmin-like 4 (STMN4)
574 D01	1, 3, 5, 7, 9, 10, K1, K2, K3, K4, K5, K6	Stathmin-like 4 (STMN4)
548 A24	1, 3, 5, 7, 8, 10, K1, K2, K4, K5, K6	Tubulin, alpha 1
573 M18	1, 4, 5, 7, 8, 9, K1, K2, K3, K5	Candidate tumor suppressor p33 ING1 homolog (ING4)
517 F04	1, 2, 6, 9, K1, K2, K4, K5, K6	SHB (Src homology 2 domain containing) adaptor protein B (SHB)
568 M18	1, 3, 5, 7, K1, K2, K4, K5, K6	Drebrin F
541 H07	1, 3, 5, 7, 10, K1, K2, K5, K6	Human non-histone chromosomal protein HMG-14 mRNA
594 C21	1, 2, 4, 6, 9, K2, K3, K5, K6	Prefoldin 5 (PFDN5)
544 E09	4, 7, 9, (5, 6), K3, K5, K6	Dihydropyrimidinase-like 4 (DPYSL4)
573 P23	5, 6, 7, 9, 10, K1, K5, K6	HSPC212 mRNA
541 H09	2, 6, 9, (3, 5), K1, K4, K5	Myosin light chain 1 slow a (MLC1SA)
578 I 19	1, 4, 5, 8, 9, K1, K3, K5	Candidate tumor suppressor p33 ING1 homolog (ING4)
542 E06	1, 3, 5, 7, 10, K1, K5, K6	MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor) (MAZ)
553 C06	7, 9, 10, K2, K3, K5	Mitogen-activated protein kinase 11 (MAPK11), transcript variant 2

### 3.2.2.2. Western-Blot als Kontrollmethode

Der Western Blot diente als weitere Methode, um die Ergebnisse des Plasmascreenings zu bestätigen. Hierzu wurden einige Proteine aus den 214 exprimierbaren Proteinen zufällig

ausgewählt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Anschließend wurden verschiedene Patienten- und Kontrollplasmen auf den Blots auf ihre Übereinstimmung mit den zuvor erzielten Ergebnissen der hEX1-Filter untersucht.

Die Ergebnisse zeigten (vgl. Abb. 21), dass ein Plasmascreening im ausgewählten Format eine sensitive und hochparallele Methode darstellt, um Protein/Protein-Wechselwirkungen analog zu etablierten Western-Blot Techniken zu untersuchen.



**Abb. 21: Western-Blot-Analyse mit den selektierten rekombinanten Proteinen vom Plasmascreening.**

Auf dem Blot befinden sich aufgereinigte Proteine aus der hEX1-Bibliothek, die beim Screening sowohl in Patienten- als auch in Kontrollplasmen auftraten. Als Abbildungsbeispiel für die Detektion diente das Plasma der Kontrolle 2. Es konnte gezeigt werden, dass das Plasma mit einer Ausnahme (Protein 5) auf dem Western-Blot vergleichbare Signale zu den klonalen Hochdichte Filtern ergab.

Spur 1: SHB-Protein; 2: *High-mobility group nucleosome binding domain 1*; 3: *Myosin light chain 1 slow  $\alpha$* ; 4: *MYC-associated zinc finger protein*; 5: *Dihydropyrimidinase-like 4*; 6: Unbekannt; 7: Unbekannt; 8: *candidate tumor suppressor p33*; 9: HSPC212; 10: *Stathmin-like 4*; 11: *Stathmin-like 4*; 12: Unbekannt; 13: *Islet cell autoantigen 1*.

### 3.3. Validierung der putativ DCM-spezifischen Proteine unter Verwendung von Proteinmikroarrays

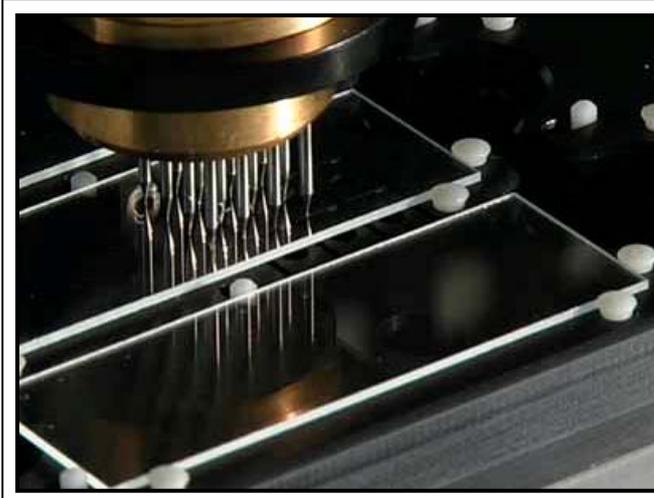
Die ersten Screeningversuche unter Verwendung der klonalen Filter, bestehend aus ca. 37.830 Klonen, führten zu der Identifizierung von 48 Proteinen, welche in mindestens zwei der 10 Patienten nachgewiesen wurden.

Diese putativ DCM-spezifischen Klone wurden aus der hEX1-Bibliothek gepickt und zur weiteren Analyse, nach Induktion mit IPTG, affinitätschromatographisch aufgereinigt und

auf Proteinmikroarrays immobilisiert (vgl. Abb. 22). Da die Proteine auf den Mikroarrays in aufgereinigter Form vorlagen, war diese Methodik weitaus sensitiver verglichen mit dem Screening unter Verwendung der klonalen Filter. Weiterhin wurden die Proteine in verschiedenen bekannten Konzentrationen immobilisiert, was einen breiteren Analysebereich ermöglicht hat und die positiven Signale dadurch zwischen den Kontroll- und Patientenplasmen besser verglichen und analysiert werden konnten. Zudem führte die Anordnung von Positiv- und Negativkontrollen auf den Chips zu einer größeren Datensicherheit.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass durch die Anwendung der Proteinmikroarrays eine deutlichere Einstufung krankheitsrelevanter Proteine möglich ist als bei den klonalen Filtern.

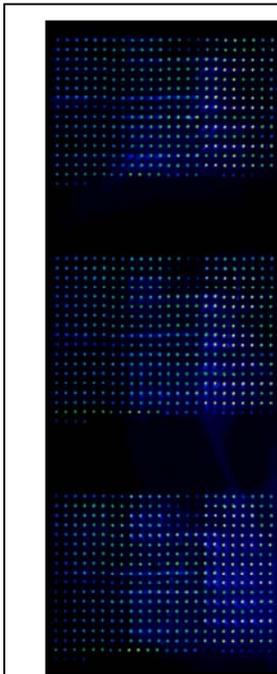
Die in Tabelle 3 aufgeführten 48 Proteine wurden in 4 verschiedenen Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:2, 1:5 und 1:10) auf die Mikroarrays gespottet. Zusätzlich wurden als Standardwerte IgG (1:500, 1:1000, 1:2000 und 1:5000) und IgG3 (1:50, 1:100, 1:500 und 1:1000) auf die Mikroarrays übertragen. Die Aufbringung der 48 Proteine mit den entsprechenden Verdünnungen erfolgte in einem 6 x 6 Pattern, wobei die Proteine immer in Duplikaten gespottet wurden. Diese Anordnung der Proteine erfolgte auf jedem Mikroarray in drei Feldern, sodass jedes Protein pro Mikroarray sechsmal auftrat und man somit eine interne Kontrolle bezüglich lokaler Effekte zur Verfügung hatte. Die Immunglobuline humanen Ursprungs dienten hierbei auch als Positivkontrollen. Da die Standardproteine von dem sekundären Antikörper erkannt werden, sollten die Signalstärken der Immunglobuline auf jedem Chip ähnlich sein. Damit konnten, wenn nötig bei größeren Varianzen, die Werte auch zur Normalisierung der verschiedenen Mikroarrays untereinander herangezogen werden. Weiterhin wurde mit der Detektion der Positivkontrollen durch die sekundären Antikörper gezeigt, dass der Versuchsaufbau, inklusive der verwendeten Reagenzien und Antikörper, erfolgreich durchgeführt wurde. Als zusätzliches Kontrollprotein wurde Myosin (Gemisch aus den leichten Myosin-Ketten aus Skelettmuskulatur, Sigma) in den gleichen Verdünnungen wie die anderen Proteine immobilisiert. Normalerweise stellt kardiales  $\alpha$ -Myosin einen spezifischen DCM-Marker dar, wohingegen das  $\beta$ -Myosin ventrikulär und skeletal vorkommt. Zudem besitzt fast jeder Mensch natürliche Autoantikörper gegen skeletales Myosin, weshalb das Myosin auf den Mikroarrays sowohl von Patienten- als auch von Kontrollplasma erkannt wurde und daher als Kontrollprotein fungierte.



**Abb. 22: Die Aufbringung der Proteine erfolgte mit dem Roboter Qarray.** Abgebildet sind zwei Objektträger auf die die Proteine durch insgesamt 16 Pins aufgebracht wurden.

### 3.3.1. Qualitätskontrolle des Protein-Chips mit einem RGSHis<sub>6</sub>-Antikörper

Zur Überprüfung der Expression der Proteine auf den Mikroarrays, wurde ein RGSHis<sub>6</sub>-Antikörper verwendet, der an den N-terminalen RGSHis<sub>6</sub>-Tag der Proteine gebunden hat. Dabei zeigte sich, dass alle Proteine und ihre Verdünnungen auf dem Mikroarray mit dem RGSHis<sub>6</sub>-Antikörper detektiert werden konnten (vgl. Abb. 23).



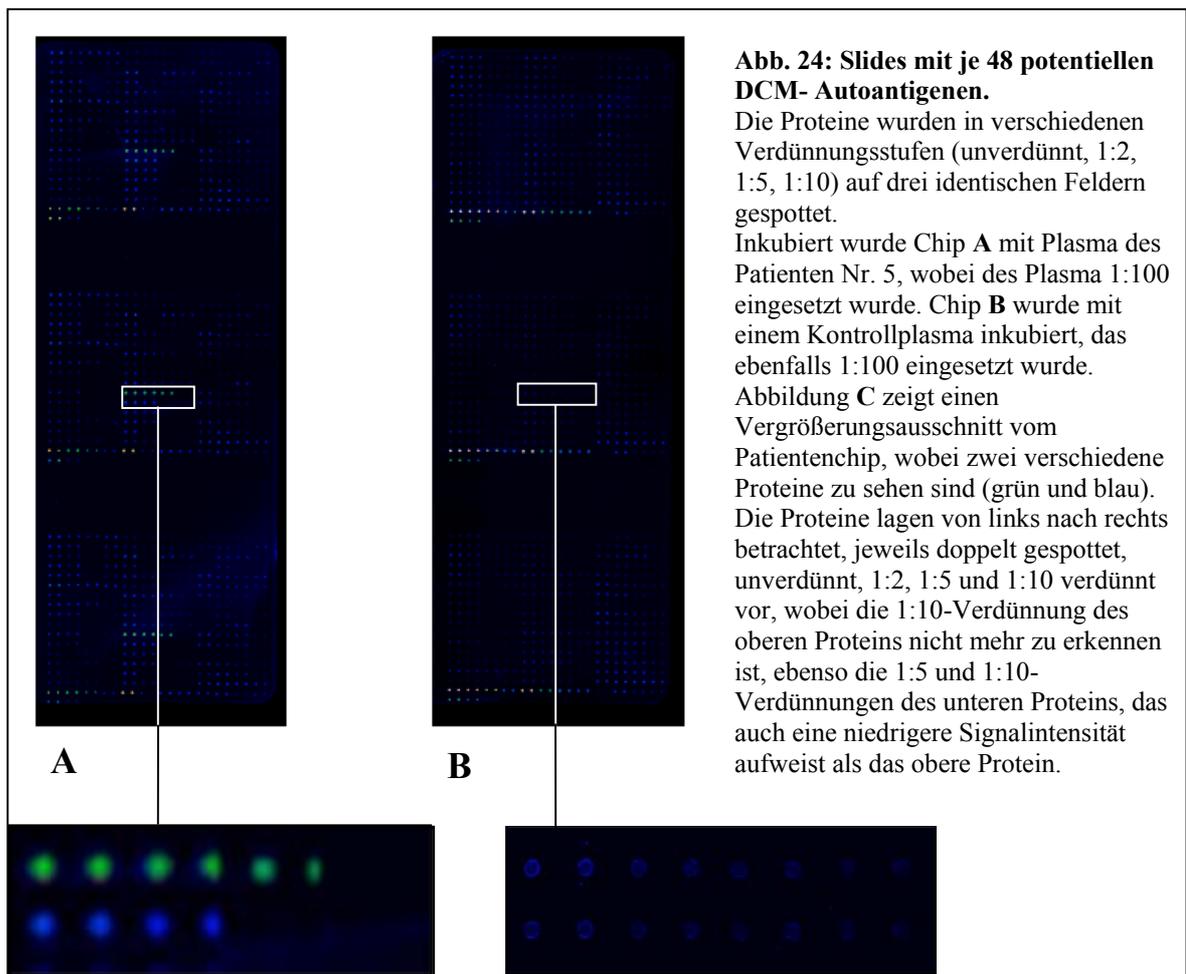
**Abb. 23: RGSHis<sub>6</sub>-Kontrollchip.**

Auf die Chips wurden jeweils 48 Proteine aus der hEX1-Bibliothek aufgebracht. Die Proteine wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:2, 1:5, 1:10) auf drei identische Felder gespottet und mit RGS-His<sub>6</sub> (1:1000) detektiert. Als Zweitantikörper diente ein anti-Maus-Cy5 konjugierter Antikörper (1:800).

Aufgrund von vereinzelt auftretenden Streuungen zwischen den drei Feldern, wurde zur Auswertung immer das mittlere Feld herangezogen, um eine bessere Reproduzierbarkeit zwischen den einzelnen Chips zu gewährleisten. Die Streuungen konnten mit keiner Regelmäßigkeit beobachtet werden, nur soweit, dass geringere Intensitäten bei dem Feld auftraten, das am nächsten zum Scannerausgang lag.

### 3.3.2.1. Profilerstellung mittels IgG-Antikörper und Bestätigung durch Western-Blot-Analyse

Im Folgenden wurden die Patienten- und Kontrollplasmen, jeweils in zwei unabhängigen Versuchen auf den Mikroarrays hybridisiert. Für diese Chip-Versuche konnten, im Gegensatz zu den Screeningversuchen auf der hEX1-Bibliothek, noch vier zusätzliche Kontrollplasmen erhalten werden, sodass 10 Patienten auch 10 Kontrollen gegenüberstanden. Sie wurden mit anti human-IgG detektiert, was den Versuchen der großen Filter entsprach und somit der Validierung der Ergebnisse diente.



Nach der Bildauswertung wurde von den Signalen aller Kontrollen in allen Verdünnungsstufen Durchschnittswerte gebildet und davon die einfache bzw. doppelte Standardabweichung berechnet. Es wurden dann die positiven Signale jedes einzelnen Patienten gegen die Kontrolldurchschnittswerte inklusive Standardabweichung verglichen und die Proteine bei den Patienten als positiv gewertet, die über dem Wert der Standardabweichung lagen. In der Tabelle 5 wurden die Werte, die über der doppelten Standardabweichung lagen oliv gekennzeichnet und die, die über der einfachen Standardabweichung lagen, mit grün markiert. Die nicht markierten Werte lagen unter den entsprechenden Kontrolldurchschnittswerten. Zusätzlich wurde noch der Faktor zwischen den Durchschnittswerten der Kontroll- und Patientensignale berechnet, um einen Vergleichswert und eine Bestätigung der vorher ermittelten Ergebnisse zu erhalten. Ein Problem kann darstellen, wenn beispielsweise nur eine Kontrolle bei einem Protein einen sehr hohen Signalwert aufweist, die anderen Proteine aber sehr niedrige Werte haben, dann handelt es sich um eine hohe Standardabweichung. Dabei kann es aber sein, dass die Patientenwerte bei diesem Protein zwar allgemein höher liegen als der durchschnittliche Wert der Kontrollen, aber nicht über der Standardabweichung zu liegen kommen und damit als nicht positiv gewertet werden würden.

Beim Vergleich der Signalstärken der Positivkontrollen wie den humanen IgG- und IgG3-Antikörpern, dem Myosin und dem Puffer zwischen Kontroll- und Patientenchips, ergab sich ein Faktor zwischen 0,6 und 1,1, sodass sich die Signalstärken der Proteine direkt miteinander vergleichen lassen konnten.

Nach Auswertung der Proteinchips wie beschrieben, konnten sechs Proteine identifiziert werden, die als potentielle DCM-Marker in Betracht gezogen werden könnten (vgl. Tab. 5). Die Sequenzen der sechs Klone wurden mit dem Programm VectorNTI 6 dahingehend untersucht, ob die Gene sich im richtigen Leserahmen befanden und ob es sich um Volllänge-Klone handelte. Wiesen die identifizierten Proteine einen falschen Leserahmen auf, wurden sie als artifizielle Epitope aussortiert.

Identifizierte Proteine:

1. Histon-Deacetylase 3; *Accession-No.*: BC000614
2. DRR1 (*downregulated in renal cell carcinoma*); *Accession-No.*: NM\_007177
3. *Zinc finger, HIT domain containing 1* (ZNHIT1); *Accession-No.*: BC017333

4. RAD23 homolog, bzw. HHR23A; *Accession-No.:* BC014026
5. Paraneoplastisches Antigen MA3; *Accession-No.:* NM\_013364
6. Kalium-Kanal-interagierendes Protein; *Accession-No.:* BC050375

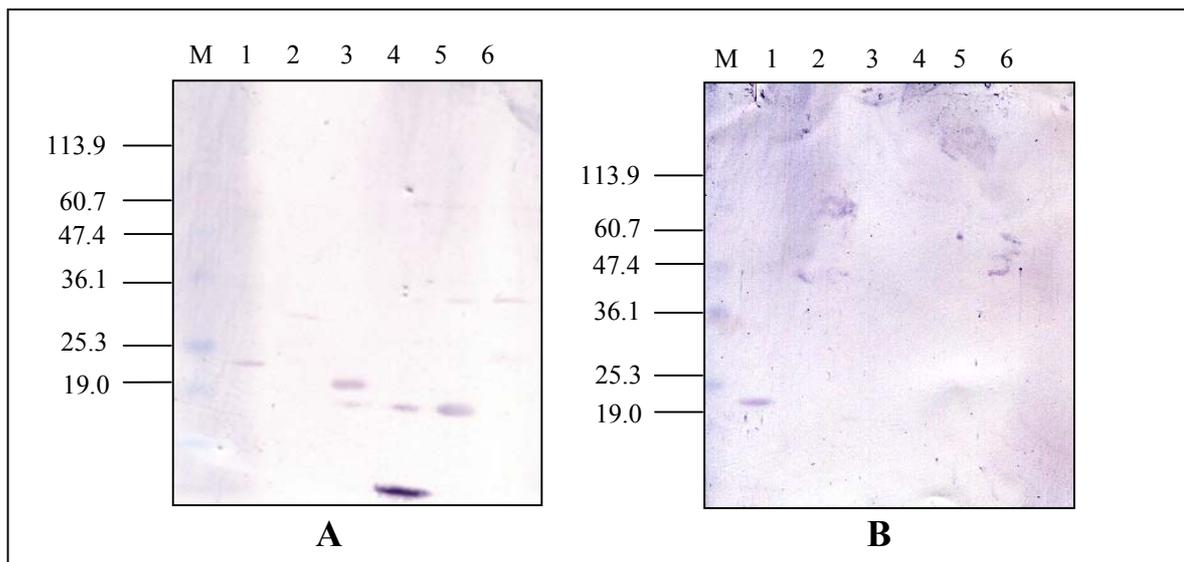
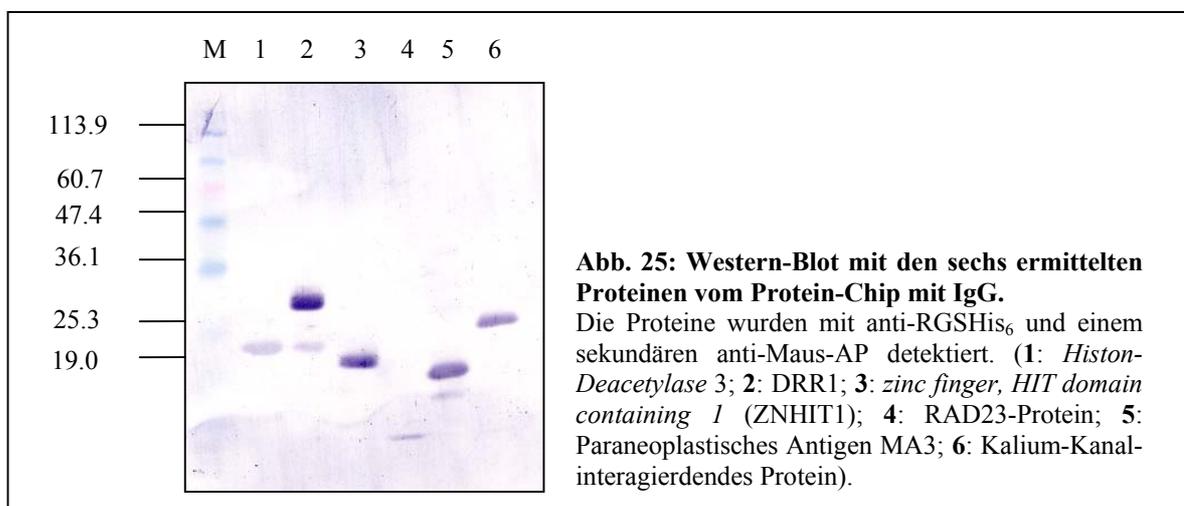
**Tab. 5: Die Tabelle zeigt die sechs Proteine, die nach Auswertung der Mikroarrays als positiv gewertet wurden.**

Es sind alle Mikroarrays dargestellt, die mit Patientenplasma inkubiert wurden, wobei die Reproduktionsversuche jedes einzelnen Patienten vorher gemittelt wurden. Die Werte in der Tabelle entsprechen bereits den ermittelten Faktoren. Dabei wurde der Durchschnitt der Kontrollen durch die Werte der Signalintensitäten von jedem Protein und Patienten dividiert, sodass in der Tabelle sowohl die Einzelfaktoren von jedem Patienten gegenüber dem Kontrollldurchschnitt (nicht gezeigt) angegeben sind sowie der Durchschnittsfaktor. Außerdem wurden die als positiv gewerteten „Treffer“ (*hits*) dargestellt. Markiert wurden die Werte, bei denen das entsprechende Protein ein höheres Signal aufweist als der Mittelwert plus der einfachen (grün) /doppelten (oliv) Standardabweichung der Kontrollen.

Protein	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P Ø	hits	Faktor Patient/ Kontrolle
<i>Histone deacetylase (unv.)</i>	2,78	1,58	1,09	1,31	3,20	1,15	1,65	0,00	13,98	1,20	2,79	5	3,0
(1:2)	4,40	1,47	1,37	1,37	2,84	1,30	0,95	0,00	11,33	1,44	2,65	7	2,9
(1:5)	5,70	0,00	1,08	0,00	2,78	0,00	0,00	0,00	10,58	0,00	2,01	3	4,7
(1:10)	4,42	0,00	2,03	1,96	2,80	0,00	1,96	0,00	8,88	0,97	2,30	6	3,0
<i>DRR1 (unv.)</i>	0,00	2,25	15,45	5,47	4,59	1,02	1,16	0,49	4,33	20,51	5,53	6	6,1
(1:2)	0,00	0,58	9,32	2,60	1,62	0,00	0,00	0,00	1,94	1,26	1,73	3	3,3
(1:5)	0,00	1,19	13,56	4,65	2,54	0,90	1,17	0,56	3,62	8,75	3,69	5	4,3
(1:10)	0,00	0,00	6,67	2,79	0,83	0,00	0,00	0,00	1,82	3,22	1,53	4	3,1
<i>zinc finger, HIT domain containing 1 (unv.)</i>	4,76	3,08	14,99	3,59	1,76	2,54	1,34	1,13	1,38	1,58	3,62	7	3,6
(1:2)	5,99	2,39	11,14	2,95	1,51	3,44	1,02	1,03	1,85	0,93	3,22	7	3,4
(1:5)	2,07	1,14	2,07	1,37	0,66	1,74	1,46	0,83	1,00	0,81	1,32	4	1,4
(1:10)	4,58	1,75	2,39	2,19	0,84	1,94	0,00	1,20	1,97	0,00	1,69	6	1,4
<i>RAD23-Protein (unv.)</i>	0,96	0,69	0,00	1,63	4,95	17,71	1,08	0,83	1,42	0,78	3,01	2	3,2
(1:2)	1,17	0,00	0,00	1,63	3,91	17,72	0,00	0,83	1,34	0,00	2,66	3	4,2
(1:5)	1,60	0,00	0,00	2,16	3,08	14,14	0,00	1,16	2,04	0,00	2,42	5	4,1
(1:10)	2,73	0,00	0,00	3,19	2,32	8,66	0,00	0,00	3,44	0,00	2,03	5	3,9
<i>Paraneoplastic antigen MA3 (unv.)</i>	5,57	3,28	13,93	3,73	1,35	3,10	1,68	1,91	1,71	1,44	3,77	7	3,8
(1:2)	4,85	2,07	7,57	2,64	0,92	2,45	1,22	1,50	1,42	1,55	2,62	8	2,6
(1:5)	4,13	1,57	2,65	1,81	0,83	1,94	1,13	1,14	0,98	1,28	1,75	5	1,7
(1:10)	1,14	0,00	0,90	1,29	0,00	0,96	0,89	0,00	0,00	1,03	0,62		1,1
<i>Kv channel interacting protein (unv.)</i>	3,43	3,18	19,08	3,18	1,24	4,58	1,56	1,86	1,76	1,76	4,16	9	4,2
(1:2)	5,19	2,87	19,65	3,15	0,95	3,63	1,42	1,69	1,62	1,84	4,20	9	4,2
(1:5)	5,69	2,02	11,50	2,16	0,74	2,50	1,06	1,39	1,03	1,31	2,94	6	3,1
(1:10)	1,21	0,00	2,24	1,17	0,00	1,44	0,00	0,84	0,00	0,77	0,77	4	1,3

Alle sechs Proteine befanden sich bezüglich des RGSHis<sub>6</sub>-Tags im richtigen Leserahmen. Bei Protein 4 konnte nur ein kurzes Stück von ca. 10 kDa exprimiert werden, da ein zufälliges Stop-Codon zum frühzeitigen Abbruch führte. Protein 2 und 6 lagen als Volllängeprotein vor. Von allen anderen Proteinen konnte ungefähr die Hälfte ihrer Volllänge exprimiert werden.

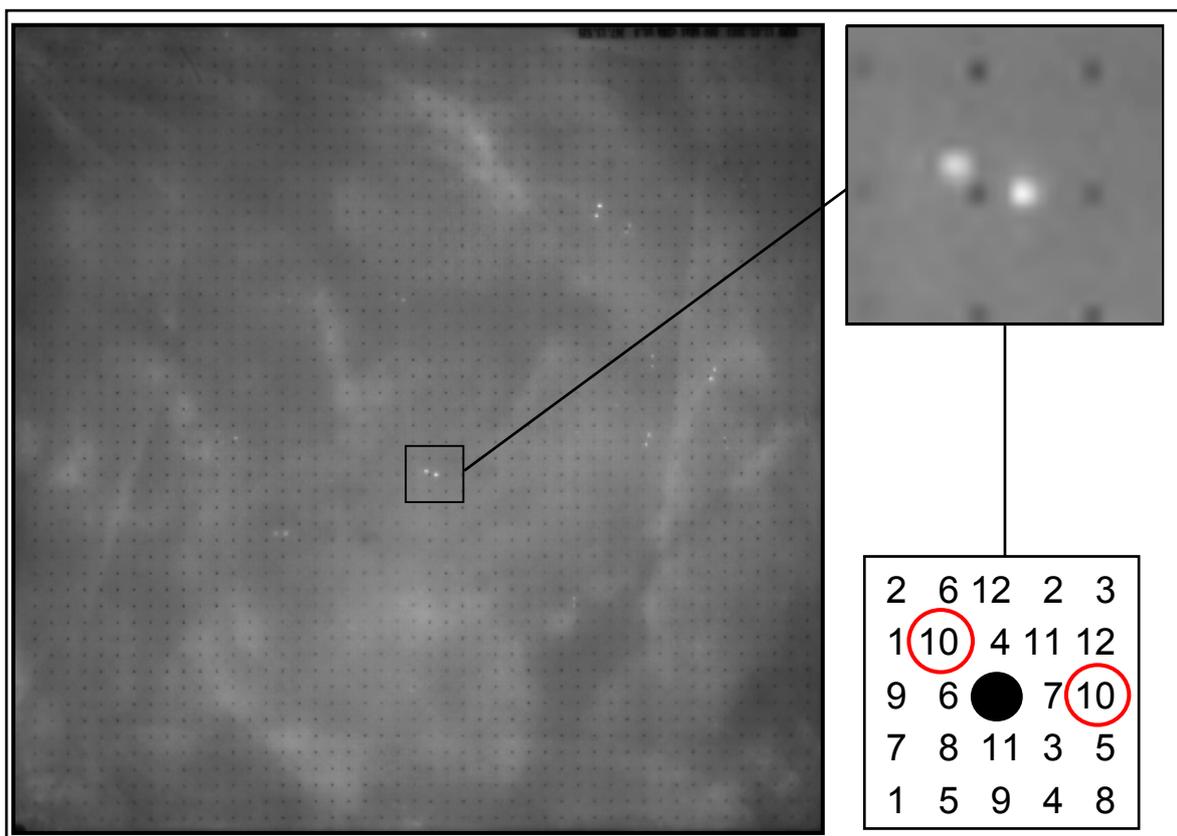
Die Ergebnisse der Chip-Experimente wurden mit Western-Blot Versuchen bestätigt. Dabei wurden die sechs ermittelten Proteine in aufgereinigter Form auf ein SDS-PAGE aufgetragen und anschließend auf PVDF-Membranen übertragen (vgl. Abb. 25 und 26).



### 3.3.3. Detektion von spezifischen autoimmunen DCM-Antikörpern mit IgG3 auf Filtern der hEX1-Bibliothek

Aufgrund von kürzlich beschriebenen Experimenten, sowohl von Warraich *et al.* als auch von Staudt *et al.*, wurde festgestellt, dass der Immunglobulin-Subtyp IgG3 möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der autoimmunen DCM spielen könnte (Warraich *et al.*, 2002; Staudt *et al.*, 2002). Wie auch bei der rheumatoiden Arthritis gezeigt wurde, ist nicht auszuschließen, dass IgG3 bei der DCM Entzündungsprozesse und Gewebeschädigungen nach sich ziehen kann.

Aufgrund dieser neueren Erkenntnisse wurden erneut hEX1-Expressionsfilter mit den selben Plasmen und Kontrollen inkubiert wie in dem vorherigen Versuch mit IgG, mit dem Unterschied, dass als erster Antikörper IgG3 (Verdünnung 1:400) eingesetzt wurde. Die endgültige Detektion erfolgte ebenfalls mit einem anti-Maus-AP-Antikörper (vgl. Abb.27).



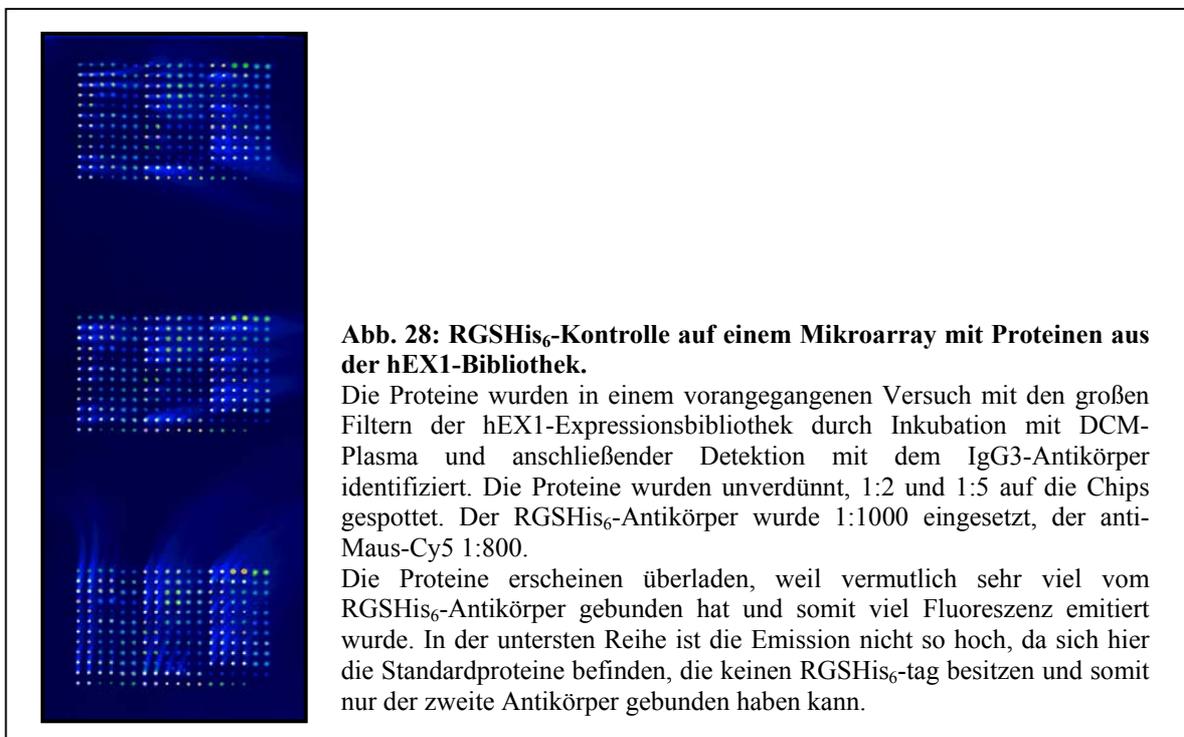
**Abb. 27: Proteinfilter (Set8) inkubiert mit Patienten-Plasma.**

Plasma von 10 Patienten, bei denen die autoimmune Form von DCM diagnostiziert wurde und von 10 Kontrollen wurden auf Hochdichte Proteinfilter der hEX1-Bibliothek gescreent und mit anti human-IgG3 detektiert. Als sekundärer Antikörper diente ein anti Maus, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert war.

Im Gegensatz zu den Filtern, die mit IgG inkubiert wurden, zeigte sich bei der Detektion mit IgG3, dass durchschnittlich zwei Drittel weniger Proteine identifiziert wurden, was mit der geringeren Konzentration von IgG3-Antikörpern im Plasma zu erklären ist. IgG1 hat im Gegensatz zu IgG3 eine 7fach höhere Konzentration. Zudem hat IgG3 eine zwei Drittel kürze Halbwertszeit im Serum als das IgG1. Mit Abzug der vom IgG3-Antikörper erkannten Antigene verblieben 32 putativ positive Kandidaten.

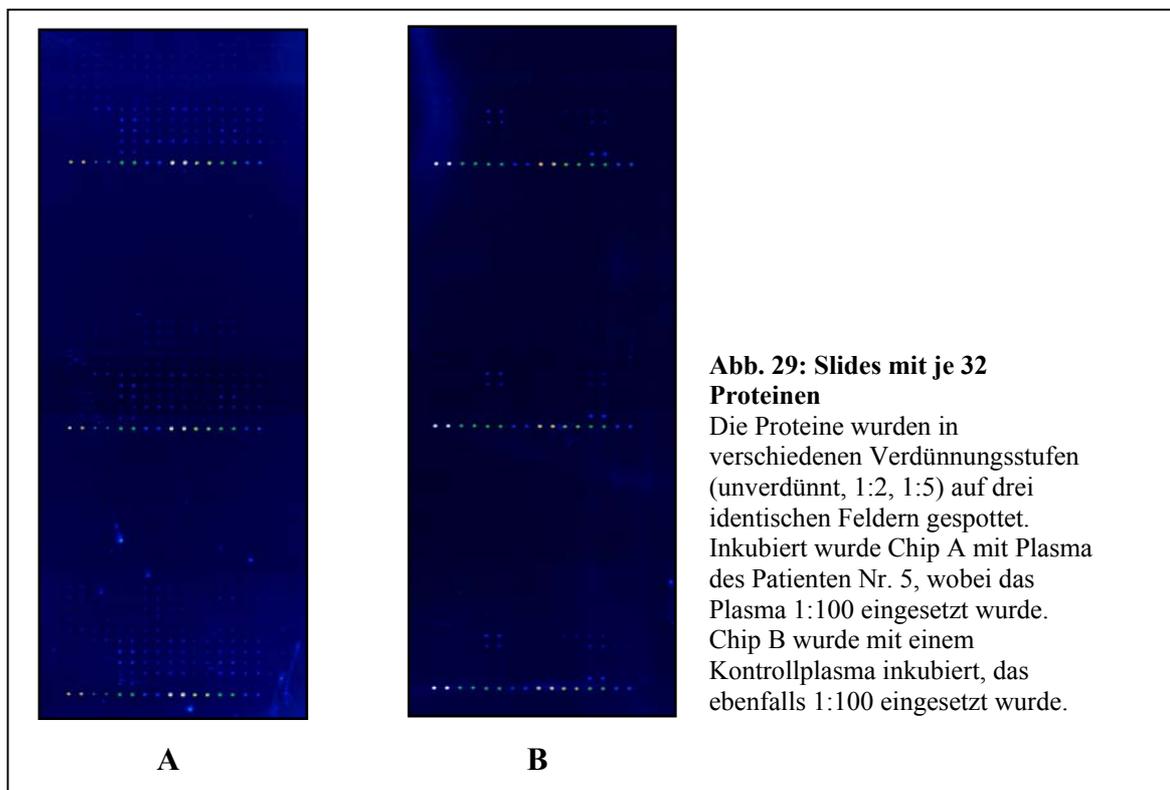
### 3.3.3.1. Validierung der hEX1-Bibliothek Ergebnisse mit IgG3 auf Protein-Chips und Bestätigung mittels Western-Blot-Analyse

Im weiteren wurden diese Kandidaten unter Verwendung der hochsensitiven Proteinchip-Technologie näher untersucht. Die Proteine wurden jeweils unverdünnt, 1:2 und 1:5 auf die Chips gespottet und als Standardwerte ebenfalls IgG (1:500, 1:1000, 1:2000 und 1:5000) und IgG3 (1:50, 1:100, 1:500 und 1:1000), die als Positivkontrollen verwendet wurden, eingesetzt. Die Aufbringung der 32 Proteine mit den entsprechenden Verdünnungen erfolgte in einem 6x6 Pattern, wobei die Proteine immer in Duplikaten gespottet wurden (vgl. 2.1.8.).



Alle Proben (10 Patienten und 10 Kontrollen) wurden jeweils dreimal auf den Mikroarrays inkubiert. Für die Auswertung wurden dann die entsprechenden Durchschnittswerte für jedes Protein ermittelt. Da das Spotten der Mikroarrays in zwei Chargen erfolgte, wurde in jeder Charge zusätzlich ein Mikroarray mit einem RGSHis<sub>6</sub>-Antikörper hybridisiert, der an den N-terminalen RGSHis<sub>6</sub>-Tag der Proteine gebunden hat und somit die Expression der Proteine bestätigte (vgl. Abb. 28). Es folgte eine Normalisierung der Signalintensitäten mithilfe der RGSHis-Arrays. Die Werte der Mikroarrays mit den Patienten-Proben wurden anschließend durch die RGSHis<sub>6</sub>-Mikroarray-Werte dividiert, sodass man die Chargen untereinander vergleichen konnte.

Bei den Signalwerten der Patienten konnte diesmal ein Durchschnittswert gebildet werden, da kein Schwellenwert gesetzt wurde wie beim IgG-Versuch, sodass für fast alle Patienten ein Wert vorlag und mit in den Durchschnitt eingerechnet werden konnte. Beim Vergleich der Signalstärken der Positivkontrollen (human IgG- und IgG3-Antikörper) und dem Puffer zwischen Kontroll- und Patienten-chips, ergab sich wie schon bei der IgG- Mikroarrays ein Faktor zwischen 0,6 und 1,1, sodass sich die Signalstärken der Proteine direkt miteinander vergleichen ließen (vgl. Abb. 29).



Auch bei diesem Versuch wurden die Sequenzen der positiv gewerteten Klone von den Proteinchips in der NCBI-Datenbank analysiert und mit dem Programm VectorNTI 6 auf den richtigen Leserahmen untersucht und überprüft, ob es sich um Volllänge-Klone handelte. Nach dieser Auswertung konnten noch sieben Proteine identifiziert werden, die als potentielle DCM-Marker in Betracht gezogen werden könnten (vgl. Tab. 6). Bei den identifizierten Proteinen handelte es sich um:

1. Homo sapiens chromosome 17; *Accession-No.:* AC073624
2. Homo sapiens cDNA FLJ45195 fis, *weakly similar to Putative ADP-ribosylation factor 2*; *Accession-No.:* AK127138
3. *Fas (TNFRSF6)-associated via death domain (FADD)*; *Accession-No.:* NM\_003824
4. *Vesicle amine transport protein 1 homolog (T californica)*; *Accession-No.:* NM\_006373
5. Tubulin, alpha 3; *Accession-No.:* NM\_006009
6. HLA-B-assoziiertes Transkript 3 (BAT3); *Accession-No.:* NM\_004639
7. *RAS-related on chromosome 22, mRNA*; *Accession-No.:* BC058077

Beim Protein 5, bzw. 6 konnte man nach Analyse der Sequenzen mit dem Programm VectorNTI einen Abbruch bei 280 bp, bzw. 320 bp, aufgrund eines Stopcodons feststellen. Beim BAT3-Protein wurde, wenn man die erhaltene Sequenz mit dem Blast-Search Ergebnis vergleicht, ungefähr nur ein Zehntel des Proteins exprimiert. Protein 4 ist bis zur Hälfte exprimiert worden und Protein 3 und 7 entsprechen der Volllänge des Proteins. Bei den Proteinen 1 und 2 konnte kein Blast-Ergebnis erzielt werden, da in der Datenbank noch keine vergleichbaren Sequenzen identifiziert werden konnten.

**Tab. 6: Die Tabelle zeigt 7 potentielle DCM-Autoantigene nach Auswertung der Mikroarrays mit IgG3.** Die Werte der Patienten (P1-P10) in der Tabelle setzen sich wie folgt zusammen: Es wurden die Signalwerte der einzelnen Patienten durch den Durchschnittswert der Kontrollen dividiert. Zuvor wurden die Signalwerte aller Chips auf die jeweiligen RGSHis<sub>6</sub>-Chargen angeglichen, um die Chips untereinander besser vergleichen zu können. Desweiteren sind abgebildet die Durchschnittswerte der Patienten vor der Division mit dem Kontrolldurchschnitt, die als positiv gewerteten "Treffer" (*hits*) der Patienten gegenüber der Kontrollen und der Faktor zwischen Patientendurchschnitt und dem Kontrolldurchschnitt. Die oliv markierten Werte entsprechen einem Faktor der Patienten zum Kontrolldurchschnitt von über 2 und die grünen Werte einem Faktor von über 1,5.

<i>Protein</i>	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>P3</i>	<i>P4</i>	<i>P5</i>	<i>P6</i>	<i>P7</i>	<i>P8</i>	<i>P9</i>	<i>P10</i>	<i>P Ø</i>	<i>hits</i>	<i>Faktor Patient/Kontrolle Ø</i>
<b><i>Protein unbekannt (unv.)</i></b>	0,62	0,87	0,98	2,16	1,42	2,17	1,03	1,30	0,93	1,27	0,047	2	1,3
<i>(1:2)</i>	1,86	1,97	2,55	6,48	4,60	6,36	2,26	3,97	1,59	3,47	0,026	10	3,5
<i>(1:5)</i>	1,02	1,01	1,99	4,34	2,38	4,14	1,41	2,93	1,58	2,24	0,038	7	2,3
<b><i>Protein unbekannt (unv.)</i></b>	0,49	0,56	0,73	1,80	1,28	2,89	0,82	0,87	0,87	1,11	0,071	2	1,1
<i>(1:2)</i>	2,48	1,17	2,18	4,31	2,81	6,48	1,33	2,04	1,19	2,55	0,038	7	2,7
<i>(1:5)</i>	0,78	0,63	1,57	2,99	1,93	4,93	1,20	1,65	1,07	2,24	0,044	5	1,9
<b><i>Fas-associating protein (unv.)</i></b>	0,90	0,79	1,33	1,99	1,60	2,22	1,04	1,24	0,96	1,32	0,073	3	1,3
<i>(1:2)</i>	1,31	1,42	2,57	4,15	2,46	4,17	1,73	2,50	1,45	2,35	0,066	8	2,4
<i>(1:5)</i>	1,18	0,98	2,31	3,33	1,76	3,45	1,32	2,09	1,37	1,91	0,074	6	2,0
<b><i>Vesicle amine transport protein (unv.)</i></b>	1,99	1,57	3,17	3,13	1,76	1,96	2,00	1,35	1,53	1,99	0,088	9	2,0
<i>(1:2)</i>	2,91	1,39	2,68	2,57	2,03	1,71	0,99	0,82	0,88	1,69	0,277	7	1,8
<i>(1:5)</i>	13,45	1,58	6,07	2,63	2,40	2,28	2,53	2,01	2,22	3,66	0,191	10	3,9
<b><i>Tubulin, alpha 3 (unv.)</i></b>	0,55	0,05	0,20	1,26	1,11	1,60	0,68	0,49	0,76	0,76	0,081	1	0,7
<i>(1:2)</i>	1,80	0,39	0,62	1,18	0,87	1,00	1,08	0,70	0,46	0,85	0,255	1	0,9
<i>(1:5)</i>	3,46	1,39	1,98	5,41	6,81	7,44	5,78	3,13	5,14	4,33	0,260	9	4,5
<b><i>HLA-B-associated transcript 3 (unv.)</i></b>	0,24	0,20	0,17	0,44	0,56	0,71	0,24	0,29	0,23	0,32	0,071		0,3
<i>(1:2)</i>	0,53	0,23	0,37	0,74	0,68	0,76	0,31	0,42	0,15	0,44	0,060		0,5
<i>(1:5)</i>	8,68	1,10	4,45	4,23	5,07	5,11	4,95	2,54	2,72	4,21	0,105	9	4,3
<b><i>RAS-related Protein (unv.)</i></b>	0,87	0,67	1,01	1,09	1,16	1,31	0,93	0,91	0,66	0,95	0,137		1,0
<i>(1:2)</i>	0,61	0,62	0,90	1,03	1,13	1,31	0,77	0,89	0,55	0,84	0,231		0,9
<i>(1:5)</i>	3,47	1,35	3,75	3,29	2,13	3,36	3,51	3,95	3,25	3,01	0,078	9	3,1

Das *Fas-associating protein* (FADD) und das *Vesicle amine transport protein* scheinen von ihren Signalwerten in allen Verdünnungen signifikant erhöht zu sein. Die Standardabweichungen bei den Kontrollen dieser Proteine lagen in der unverdünnten Form

unter 30 %. Sogar bei den Patientenwerten ist eine Abweichung der Einzelwerte vom Durchschnitt, von unter 40 % bei den unverdünnten Proteinen zu beobachten.

Wie auch bei den IgG-Versuchen, erfolgte eine Bestätigung der Mikroarray-Ergebnisse durch Western-Blot-Analyse. Dazu wurden die aufgereinigten Proteine, die aufgrund des höheren Faktors zu den Kontrollen als positiv gewertet wurden, mit Mercaptoethanol reduziert, auf SDS-PAGE aufgetragen und schließlich auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Proteine wurden zum einen mit einem RGSHis<sub>6</sub>-Antikörper dargestellt (vgl. Abb. 30) und zum anderen erfolgte die Bestätigung der Mikroarrays-Ergebnisse mit Patientenplasma und im Vergleich dazu auch mit Kontrollplasma (vgl. Abb. 31).

