

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.1.1	Aufgaben und Zusammensetzung des Immunsystems.....	1
1.1.2	T-Lymphozyten .....	3
1.1.2.1	T-Zell-Differenzierung .....	3
1.1.2.2	Klonale Deletion als Mechanismus für Selbsttoleranz.....	6
1.1.3	T-Helferzellen.....	9
1.2	Autoimmunität .....	11
1.2.1	Natürliche Autoantikörper .....	11
1.2.2	Autoimmunkrankheiten .....	12
1.2.3	Rheumatoide Arthritis .....	13
1.2.3.1	Krankheitsbild.....	13
1.2.4	Targetidentifizierung .....	15
1.3	Proteinarrays .....	17
1.4	Expressionssysteme.....	19
1.5	Zielsetzung.....	22
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.1	Material .....	24
2.1.1	Laborgeräte .....	24
2.1.2	Chemikalien und Enzyme.....	25
2.1.3	Antikörper.....	26
2.1.4	Oligonukleotide .....	26
2.1.5	Kits.....	26
2.1.6	andere Materialien .....	27
2.1.7	Puffer und Medien .....	27
2.1.8	Seren .....	30
2.1.9	Stämme .....	30
2.1.10	cDNA.....	31
2.1.11	Plasmide.....	31
2.1.12	Proteinfilter der Expressionsbibliothek aus humanem fötalen Hirngewebe (hEX1)..	31
2.1.13	Software.....	31

2.1.14	Online Datenbanken DNA- und Protein-Analyse Tools .....	31
2.2	Methoden.....	32
2.2.1	Plasmid isolation aus <i>E. coli</i> .....	32
2.2.2	Restriktion.....	32
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	33
2.2.3.1	Elution von DNA aus Agarose-Gelen.....	33
2.2.4	Ligation.....	33
2.2.5	Transformation .....	34
2.2.5.1	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen .....	34
2.2.5.2	Transformation durch Elektroporation .....	35
2.2.6	„Polymerase-Chain-Reaction“ (PCR) und DNA-Sequenzierung .....	35
2.2.7	Picking von Kolonien .....	36
2.2.8	Hochdichte Filter für Proteindetektion .....	36
2.2.8.1	Spotting auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen.....	36
2.2.8.2	Proteininduktion und Prozessieren der Filter.....	37
2.2.9	Screening auf Proteinfiltren.....	38
2.2.9.1	Antikörperscreening.....	38
2.2.9.2	Serumscreening.....	38
2.2.10	Auswertung der gescreenten Proteinfiltren .....	39
2.2.11	Herstellung eines Expressionssubsets.....	39
2.2.12	Proteinexpression und Aufreinigung in Mikrotiterplatten.....	40
2.2.13	SDS-Page.....	40
2.2.14	Western-Blot.....	41
2.2.15	Proteinchips .....	42
2.2.15.1	Spotting von aufgereinigten Proteinen auf FASTTMslices .....	42
2.2.15.2	Screening von Antikörpern und Seren.....	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
3.1	Herstellung und Applikation einer cDNA Expressionsbibliothek aus murinen T-Helferzellen Typ 1.....	44
3.1.1	Erstellung der cDNA Expressionsbibliothek.....	44
3.1.1.1	DNA-Analyse von 100 Klonen.....	48
3.1.2	Charakterisierung der Expressionsbibliothek .....	53
3.1.2.1	Erstellung des Expressionssubsets.....	53
3.1.2.2	Antikörperscreening des Expressionssubsets .....	57
3.2	Targetidentifizierung von Proteinen, die für rheumatoide Arthritis spezifisch sind.....	64
3.2.1	Serumscreening auf PVDF-Membranen.....	64
3.2.2	Analyse der potentiell krankheitsbeteiligten Proteine .....	67

3.2.3	Validierung der ausgewählten Proteine mittels Serumscreening auf beschichteten Glaschips.....	68
3.2.3.1	Spotting der Proteine auf Glaschips und Screening mit Seren .....	68
3.2.3.2	Auswertung der Screens mit GenePix .....	70
3.3	Serumscreening auf Proteinarrays des Expressionssubsets der TH1-Bibliothek.....	75
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>81</b>
4.1	Herstellung und Applikation einer cDNA-Expressionsbibliothek aus murinen T-Helferzellen Typ 1.....	81
4.1.1	Erstellung der cDNA-Bibliothek aus murinen TH1-Zellen und Analyse auf DNA-Ebene .....	82
4.1.2	Identifizierung und Analyse potentieller Expressionsklone .....	87
4.1.3	Screening von Proteinarrays des Expressionssubsets mit spezifischen Antikörpern .	90
4.2	Identifizierung von Targetproteinen für die Autoimmunkrankheit rheumatoide Arthritis (RA).....	92
4.2.1	Autoimmunität und RA .....	92
4.2.2	Proteinarrays .....	93
4.2.3	Serumscreening.....	94
4.2.3.1	Inkubation von Filtermembranen der hEX1-Bibliothek mit Seren.....	94
4.2.3.2	Verifizierung potentieller Markerproteine mittels Screening auf Glaschips .....	97
4.2.3.3	Mittels Serumscreening identifizierte potentielle Markerproteine .....	98
4.3	Serumscreening auf Proteinarrays des Expressionssubsets der TH1-Bibliothek.....	102
4.4	Fazit und Ausblick .....	105
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>106</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>129</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>130</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>133</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>134</b>