

1 Einleitung

Der in der Einleitung beschriebene theoretische Hintergrund umfasst eine allgemeine Einführung in die Grundlagen des Immunsystems sowie eine nähere Beschreibung von T-Lymphozyten sowie ihrer Differenzierung und Mechanismen der Selbsttoleranz. In dem folgenden Abschnitt über Autoimmunität wird die rheumatoide Arthritis als Beispiel einer autoimmunen Erkrankung beschrieben. Die nächsten Abschnitte umfassen Darstellungen über Proteinarrays und Expressionssysteme.

1.1 Das Immunsystem

1.1.1 Aufgaben und Zusammensetzung des Immunsystems

Zum Immunsystem gehören Gewebe, Zellen und Zellprodukte, deren physiologische Hauptaufgabe in der Abwehr von Infektionen liegt. Substanzen, die als körperfremd erkannt werden, aktivieren die spezifischen Wirkungsmechanismen des Immunsystems. Dabei unterscheidet man zwischen der adaptiven (erworbenen) und der natürlichen (angeborenen) Immunantwort. Die angeborene Immunität dient der ersten Abwehr. Sie kann jedoch Krankheitserreger nicht spezifisch erkennen und keinen gezielten Schutz gegen eine neue Infektion bieten. Im Rahmen der adaptiven Immunantwort wird eine Anpassung an einen spezifischen Krankheitserreger entwickelt. In vielen Fällen verleiht die Anpassung eine lebenslange Immunität gegen eine erneute Infektion mit demselben Pathogen (Janeway and Travers 1997). Sowohl die angeborenen als auch die erworbenen Immunreaktionen basieren auf den Reaktionen von Leukozyten. Die angeborene Immunantwort nutzt phagozytierende Zellen, wie Neutrophile und Makrophagen, Zellen, die primär sekretorisch tätig sind, wie Basophile, Eosinophile und Mastzellen, und die natürlichen Killerzellen (NK Zellen). Die molekularen Komponenten des angeborenen Immunsystems umfassen Komplementsystem, Akut-Phase-Proteine und Zytokine, wie z.B. Interferone (Delves and Roitt 2000a). Vom angeborenen Immunsystem gehen Signale aus, die zur Aktivierung des erworbenen Immunsystems führen. Die erworbene Immunantwort beruht auf den antigenspezifischen Lymphozyten, den B- und den T-Lymphozyten, die an der Oberfläche hochvariable Rezeptormoleküle (vgl. Abb. 1) tragen. Dabei unterscheidet man zwischen den Immunglobulinen (Antikörpern), die auf der Oberfläche

der B-Zellen als Rezeptoren dienen, und den antigenspezifischen Rezeptoren der T-Zellen. Die Rezeptormoleküle interagieren mit speziellen antigenpräsentierenden Zellen.

Antikörper bestehen aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Der N-Terminus jeder Kette bildet eine variable Domäne, die Antigene über drei hypervariable Bereiche bindet. Der C-Terminus der Ketten bildet konstante Regionen, die die Klassen und Subklassen der Antikörper bestimmen. Es lassen sich fünf Klassen von Antikörpern biochemisch und funktionell unterscheiden, die mit IgM, IgG, IgD, IgA und IgE bezeichnet werden (Edelman 1973; Porter 1973).

Im Gegensatz zu den bivalenten Antikörpern mit zwei Antigenbindungsstellen werden die monovalenten T-Zell-Rezeptoren mit einer Antigenbindungsstelle nur als Transmembranmoleküle produziert. Sie bestehen aus α/β - oder γ/δ -Heterodimeren, wobei die Ketten über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede Kette besteht aus einer konstanten und einer variablen Domäne. Die beiden variablen Regionen bilden die Antigenbindungsstelle (Garcia *et al.* 1999).

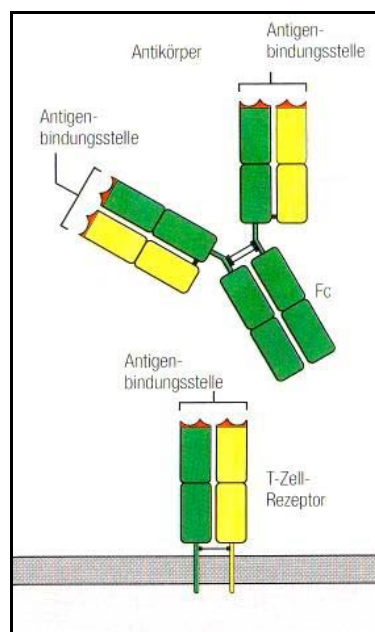


Abb. 1: Schematische Darstellung der hochvariablen Rezeptormoleküle von B- und T-Lymphozyten.

Beide Moleküle bestehen aus konstanten und variablen Domänen, wobei die Antigenbindungsstelle am N-terminalen Ende der variablen Domäne liegt. Der Antikörper besteht aus zwei identischen schweren Ketten (grün) und zwei identischen leichten Ketten (gelb), die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die monovalenten T-Zell-Rezeptoren werden nur als Transmembranmoleküle produziert. Sie bestehen aus α (grün)/ β (gelb)- oder γ (grün)/ δ (gelb)-Heterodimeren. Die Ketten des T-Zell-Rezeptors sind auch durch Disulfidbrücken verknüpft. Ihre beiden Domänen ähneln den konstanten und variablen Immunglobulindomänen. Die Antigenbindungsstelle wird durch die beiden variablen Regionen gebildet (Abb. nach Janeway and Travers 1997).

Die von aktivierten B-Zellen sezernierten Immunglobuline binden Pathogene oder ihre toxischen Produkte in extrazellulären Räumen des Körpers. Phagozyten und Komplementsystem erkennen und zerstören die durch diese Antikörperbindung markierten Krankheitserreger. T-Zellen übernehmen Schlüsselfunktionen in der Aktivierung von B-Zellen zur Antikörperproduktion und aktivieren Makrophagen zur Immunabwehr. Dabei binden T-Zell-Rezeptoren nur Peptide, die auf der Zelloberfläche, gebunden an ein MHC-Molekül („*major histocompatibility complex*“), präsentiert werden. So können intrazelluläre Pathogene, wie Viren oder Bakterien, erkannt werden, wenn die infizierten Zellen auf ihrer Oberfläche Peptide präsentieren, die aus Proteinen von Krankheitserregern stammen (Delves and Roitt 2000a, Delves and Roitt 2000b, Janeway and Medzhitov 2002).

1.1.2 T-Lymphozyten

1.1.2.1 T-Zell-Differenzierung

T-Zellen stammen wie die B-Zellen von einer lymphatischen Vorläuferzelle ab. Sie werden im Knochenmark gebildet, gelangen als T-Vorläuferzellen in den Thymus und entwickeln sich dort zu den verschiedenen T-Zell-Populationen. Bei der Differenzierung der einzelnen Populationen kommt es zur Ausbildung verschiedener Oberflächenmoleküle, aufgrund derer man funktionelle Klassen von T-Effektorzellen unterscheiden kann. Die CD4- und CD8-Moleküle bilden zusammen mit der CD3-Molekülgruppe einen wichtigen Bestandteil des T-Zell-Rezeptorkomplexes (Delves and Roitt 2000a, Delves and Roitt 2000b). CD4 bindet an unveränderliche Teile des MHC-II-Komplexes und CD8 an unveränderliche Teile des MHC-I-Moleküls (Janeway 1992). Zytotoxische T-Zellen tragen den Oberflächenmarker CD8 und erkennen Peptide, die an den MHC-I-Komplex gebunden sind und von Pathogenen stammen, welche sich im Zytoplasma der Zelle vermehren. CD4-positive ($CD4^+$) Zellen werden als T-Helferzellen bezeichnet und erkennen Antigene, die von MHC-II-Molekülen präsentiert werden. In der frühen T-Zell-Entwicklung exprimieren die unreifen T-Zellen sowohl CD4 als auch CD8 (Ellmeier *et al.* 1999).

T-Zellen durchlaufen während ihrer Proliferation und Reifung verschiedene Stadien, die durch die temporäre koordinierte Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle, insbesondere CD4, CD8, CD44 und CD25, gekennzeichnet sind. Dabei durchwandern sie den Thymus, der aus drei physisch getrennten Bereichen besteht (vgl. Abb. 2), nämlich der äußeren subkapsulären Zone, dem Cortex und dem inneren Mark (Picker and Butcher 1992).

T-Zellen gelangen aus dem Knochenmark in die subkapsuläre Zone des Thymus als doppelt negative Thymozyten, denen beide charakteristischen Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 fehlen ($CD4^-$, $CD8^-$) (Petrie *et al.* 1990). Im weiteren Verlauf wandern die Zellen tiefer in den Cortex. Über Zwischenstadien, in denen sie zunächst CD44 exprimieren ($CD44^+$), dann CD44 und CD25 ($CD44^+$, $CD25^+$) und anschließend CD25 ($CD25^+$) (Lind *et al.* 2001), differenzieren diese unreifen Thymozyten während einer Phase starker Proliferation zu doppelt positiven Zellen ($CD4^+$, $CD8^+$). Diese tragen beide Corezeptormoleküle und wenige T-Zell-Rezeptoren. Dabei entwickeln sich zwei T-Zell-Linien, die durch die Ausbildung zweier verschiedener T-Zell-Rezeptoren, des α/β - bzw. des γ/δ -T-Zell-Rezeptors gekennzeichnet sind (Raulet *et al.* 1991, Shortman and Wu 1996, von Boehmer 1990).

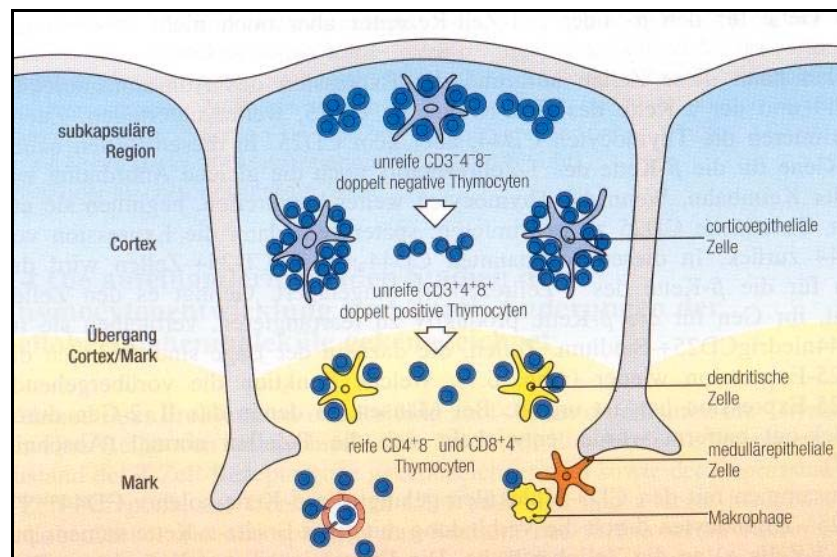


Abb. 2: In verschiedenen Bereichen des Thymus befinden sich Thymozyten unterschiedlicher Entwicklungsstadien.

Die ersten Zellen, die in den Thymus einwandern, befinden sich in der subkapsulären Region des Cortex. Nach der Proliferation und Reifung zu doppelt positiven Thymozyten dringen sie tiefer in den Thymuscortex vor. Das Mark enthält nur einfach positive T-Zellen, die mit der Zeit den Thymus verlassen und in den Blutkreislauf gelangen (Abb. aus Janeway and Travers 1997).

Die T-Zellen durchlaufen im Folgenden zwei selektive Prozesse (vgl. Abb. 3). Während der positiven Selektion werden sie auf Selbst-MHC-Restriktion geprüft. Das bedeutet, es sind nur die T-Zellen an der adaptiven Immunantwort beteiligt, die körpereigene MHC-Moleküle erkennen. Die cortikulären Epithelzellen des Thymus sind notwendig für den Prozess der positiven Selektion, da sie den T-Zellen Selbst-Peptid-MHC-Komplexe präsentieren und essentielle Differenzierungsfaktoren zur Verfügung stellen (Anderson *et al.* 1993).

Die doppelt positiven Zellen, die Selbst-MHC-Moleküle erkennen, wandern in das Mark. Hier reifen sie, exprimieren im Folgenden große Mengen an T-Zell-Rezeptoren und beenden anschließend die Expression eines der beiden Corezeptormoleküle. Diese differenzierten T-Zellen wandern aus dem Thymus in die peripheren lymphoiden Organe, wo sie in der Lage sind, auf Fremd-Peptid-MHC-Komplexe zu reagieren (Ashton-Rickardt *et al.* 1993, Hogquist *et al.* 1993, Janeway and Travers 1997, Sprent and Webb 1995).

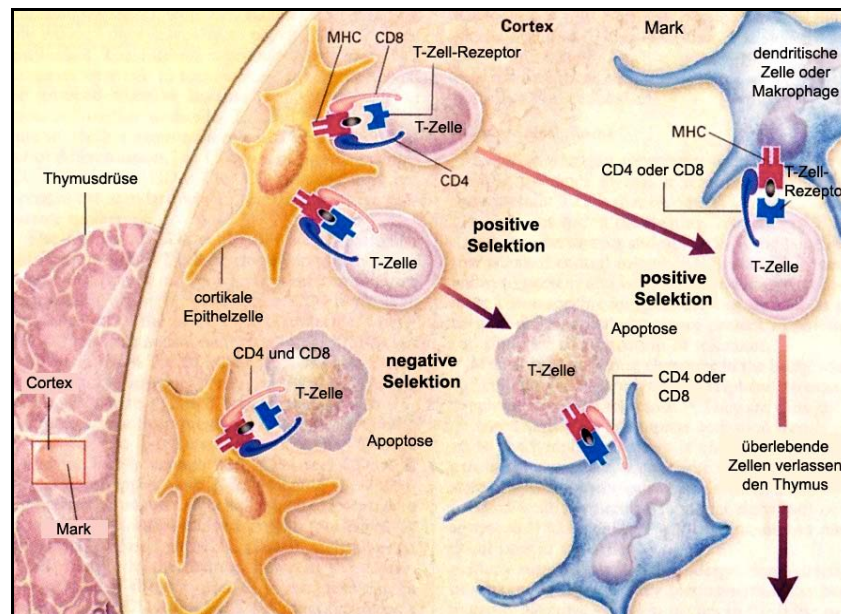


Abb. 3: Positive und negative Selektion im Thymus.

T-Zellen durchlaufen während ihrer Reifung im Thymus selektive Prozesse. Während der positiven Selektion werden sie an cortikulären Epithelzellen auf Selbst-MHC-Restriktion geprüft. Die Zellen, die von dendritischen Zellen oder Makrophagen aus dem Mark präsentierte körpereigene Peptide erkennen, werden durch Apoptose negativ selektiert (Abb. nach Delves and Roit 2000a).

Die Population der positiv selektierten Zellen enthält auch solche, deren Rezeptoren einen MHC-Peptid-Komplex sehr stark binden. Diese potentiell autoreaktiven T-Zellen können in allen Stadien ihrer Entwicklung die negative Selektion durchlaufen. Hierbei gibt es eine Vielzahl von Mechanismen, die zur Inaktivierung führen. Ein Beispiel ist die klonale Deletion, die zu einem frühen Zeitpunkt der Entwicklung im Thymus stattfindet. Hierbei werden solche T-Zellen mittels Apoptose eliminiert, deren Rezeptoren im Thymus exprimierte Antigene zu stark binden (Kappler *et al.* 1987, Nossal 1994, Robey and Fowlkes 1994). Zu welchem Zeitpunkt der Entwicklung die Eliminierung stattfindet, hängt davon ab, wo die Zelle, die den Peptid-MHC-Komplex präsentiert, lokalisiert ist (Sprent and Webb 1995). Werden T-Zellen im frühen doppelt-positiven Stadium eliminiert, wird der relevante Komplex wahrscheinlich von cortikulären Epithelzellen präsentiert. In einigen Fällen, wenn T-Zellen im Mark eliminiert

werden, wird das bestimmte Antigen meist dort von antigenpräsentierenden Zellen produziert (Surh and Sprent 1994) oder von ihnen aus dem Serum aufgenommen (Zal *et al.* 1994). Es verlassen einerseits gereifte T-Zellen den Thymus, die Rezeptoren exprimieren, welche spezifisch an fremde Antigene binden. Andererseits verlassen auch T-Zellen, die eigene Peptide erkennen, den Thymus. Diese stammen von Proteinen, die nicht im Thymus exprimiert werden (Mondino *et al.* 1996).

Nachdem die T-Zellen den Thymus verlassen haben, zirkulieren sie zwischen Blut und Lymphe mit intermediären Aufenthalten in den sekundären lymphoiden Geweben, den Lymphknoten, der Milz, sowie den darmassoziierten lymphatischen Geweben (GALT), von denen die Peyerschen Plaques am höchsten organisiert sind. Weniger organisierte Ansammlungen von Lymphozyten schützen das Atmungsepithel (bronchienassoziierte lymphatische Gewebe, BALT) und die Schleimhäute (mucosaassoziiert, MALT). Hier treffen Antigene, antigenpräsentierende Zellen und naive T- und B-Zellen aufeinander (Mackay *et al.* 1990, Picker and Butcher 1992).

1.1.2.2 Klonale Deletion als Mechanismus für Selbsttoleranz

Die klonale Deletion von autoreaktiven Lymphozyten ist wichtig für die Selbsttoleranz eines Organismus. Der Prozess läuft jedoch unvollständig ab, denn es können aus jedem Individuum Zellen isoliert werden, die auf Autoantigene reagieren (Kretz-Rommel and Rubin 2000, Lehmann *et al.* 1998, Steinman 1995). Gereifte T-Zellen können im Körper auf Selbstantigene treffen, die nicht im Thymus exprimiert werden. Ein Ziel des Immunsystems ist es, die Fähigkeit zu behalten, periphere T-Zellen, die spezifisch auf mikrobielle Antigene reagieren, zu aktivieren, aber die Funktion von selbstreaktiven T-Zellen zu unterdrücken (Van Parijs and Abbas 1998).

Fremde Antigene können passiv durch afferente Lymphbahnen in die nächstgelegenen Lymphknoten wandern oder sie werden im jeweiligen Gewebe von antigenpräsentierenden Zellen, z.B. dendritischen Zellen, aufgenommen, die dann in die sekundären Lymphgewebe wandern (Cumberbatch and Kimber 1995, Larsen *et al.* 1990, Macatonia *et al.* 1987, Picker and Butcher 1992). Das Zusammentreffen von naiven T-Zellen und dendritischen Zellen in den sekundären lymphatischen Geweben erhöht die Chancen, dass naive T-Zellen mit ihrem Rezeptor auf das passende Antigen treffen. Naive T-Zellen sind kleine, ruhende Zellen, die nach Aktivierung wieder in den Zellzyklus eintreten und sich schnell teilen. Die Nachkommen differenzieren dann zu Effektorzellen.

Die Proliferation und Differenzierung wird durch Interleukin-2 (IL-2) gesteuert. Dieses Zytokin wird von den aktivierten T-Zellen selbst gebildet (Jain *et al.* 1995). Eine wichtige Rolle für die klonale Expansion der T-Zellen spielen Costimulatoren und Zytokine. Die am besten definierten Costimulatoren für T-Zellen sind zwei Mitglieder der B7 Familie, B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86). Deren Expression auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen wird durch Mikroben und die bei der angeborenen Immunreaktion produzierten Zytokine induziert (Lenschow *et al.* 1996). Der auf T-Zellen exprimierte CD28-Rezeptor interagiert mit den B7-Molekülen und liefert Aktivierungssignale (June *et al.* 1994). Da antigenspezifische und costimulatorische Signale bei der Aktivierung naiver T-Zellen gleichzeitig von der Zelle ausgesendet werden müssen, können nur professionelle antigenpräsentierende Zellen die T-Zell-Antworten auslösen (Janeway and Travers 1997). Durch dendritische Zellen aktiviert, proliferieren T-Zellen und werden kompetent für die weitere Aktivierung durch Makrophagen und B-Zellen (Steinman 1991). Ein zweites System der Costimulation ist das CD40-Molekül auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen, das mit dem Liganden auf der T-Zell-Oberfläche interagiert (Foy *et al.* 1996). CD40-Signale sind wichtig für die Stimulation der B-Zell-Proliferation und deren Antikörperproduktion, sowie für die Verstärkung der T-Zell-costimulatorischen Aktivität von B-Zellen (Liu *et al.* 1989, Noelle *et al.* 1992, Ranheim and Kipps 1993). Es konnte gezeigt werden, dass der CD40-Ligand ein Aktivierungssignal für die klonale Expansion von T-Zellen ist (Grewal *et al.* 1995, van Essen *et al.* 1995).

Treffen gereifte T-Zellen in der Peripherie auf Selbstantigene, die nicht im Thymus präsentiert wurden, muss die Immunantwort verhindert werden. Durch Experimente wurde ermittelt, dass Antigene nur dann eine Immunantwort hervorrufen, wenn sie mit sogenannten Adjuvantien zusammen auftreten. Hierbei handelt es sich um mikrobielle Komponenten, z.B. Lipopolysaccharide. Andererseits induzieren Proteine ohne Adjuvantien Toleranz (Chiller *et al.* 1971, Dresser 1961, Warren *et al.* 1986).

Die Aktivierung von Lymphozyten erfordert sowohl die Anwesenheit eines Antigens als auch costimulatorische Signale. Antigenerkennung ohne sekundäre Signale führt zu einem Zustand, der als Anergie bezeichnet wird. In diesem reagiert die Zelle nicht auf eine Aktivierung (Schwartz 1990). Es wird angenommen, dass der anergische Zustand einerseits durch fremde Antigene ohne Adjuvantien induziert wird. Andererseits können auch körpereigene Gewebeanigene, die durch T-Zellen erkannt werden, aber ohne Costimulation keine Immunantwort hervorrufen, Anergie auslösen (Matzinger 1994).

Ein Kennzeichen von Lymphozyten ist die Autoregulation der Immunantwort. Die Aktivierung ist an Mechanismen gekoppelt, die ihre Proliferation und Differenzierung limitieren. In T-Zellen gibt es verschiedene Rückkopplungsmechanismen. IL-2 spielt unter anderem für die Rückkopplung eine entscheidende Rolle. Die Veränderung des IL-2-Gens führt nicht zur angenommenen Immundefizienz, sondern zu einer unkontrollierten Anhäufung von aktivierten Lymphozyten und einer Manifestierung von Autoimmunität (Sadlack *et al.* 1993). Das Fehlen des IL-2-Rezeptors führt zu den gleichen Erscheinungen (Suzuki *et al.* 1995, Willerford *et al.* 1995).

Die Stimulation von naiven T-Lymphozyten durch Antigene und sekundäre Signale führt neben der Differenzierung zu Effektorzellen, die Antigene eliminieren sollen, auch zur Differenzierung in regulatorische Zellen. Diese haben die Funktion, Zytokine zu produzieren, welche immunsuppressiv wirken. Zum Beispiel inhibiert TGF- β 1 („*transforming growth factor- β 1*“) die Lymphozytenproliferation (Wahl 1994), und die Produktion von IL-10 inhibiert die Makrophagenaktivierung sowie die Expression von Costimulatoren (Groux *et al.* 1997, Moore *et al.* 1993).

Wie oben beschrieben, werden T-Zellen während ihrer Entwicklung im Thymus einer negativen Selektion unterzogen. Dieser Vorgang läuft nicht vollständig ab, so dass T-Zellen, die Selbst-Peptide erkennen können, aus dem Thymus in die Peripherie gelangen. Eine wichtige Frage der Immunologie ist, wie diese potentiell selbstreaktiven T-Zellen reguliert werden. Für die periphere Toleranz sind verschiedene Mechanismen verantwortlich. Mit Ignoranz wird der Zustand bezeichnet, der Autoantigene, die zum Beispiel durch Apoptose frei werden, hinter vaskulären oder zellulären Barrieren zurückhält. Dabei spielen auch Signalmoleküle auf der Oberfläche von potentiell autoreaktiven T-Zellen eine Rolle, die das Eintreten der Zellen ins Gewebeparenchym verhindern (Mackay 1993). Nach dem Treffen auf ein Antigen ohne costimulatorische Signale können autoreaktive T-Zellen in einem anergischen Zustand, also funktionell inaktiv, vorliegen, oder sie sterben. Daneben fungieren einige T-Zellen als regulatorische Zellen, die aktiv die Proliferation und Aktivierung der selbstreaktiven T-Zellen herunterregulieren (Sakaguchi 2000b).

1.1.3 T-Helferzellen

Treffen $CD4^+$ -T-Helferzellen (TH) auf mikrobielle Antigene, die an den MHC-II-Komplex von antigenpräsentierenden Zellen gebunden sind, werden sie aktiviert und differenzieren in zwei funktionell unterschiedliche Gruppen, die TH1- und TH2-Zellen (vgl. Abb. 4). Diese Gruppen entstehen aus den gleichen Vorläuferzellen über einen komplexen Entwicklungsprozess. Dabei haben die Menge des Antigens, die Signalstärke über den T-Zell-Rezeptor und weitere costimulatorische Effekte Einfluss auf die Einleitung der T-Zell-Differenzierung (Abbas *et al.* 1996, Constant and Bottomly 1997). Wird eine naive $CD4^+$ -Zelle (Vorläuferzelle) durch die Präsentation eines Antigens durch eine entsprechende Zelle über den T-Zell-Rezeptor aktiviert, kommt es zur Vermehrung, IL-2-Sekretion und Expression des IL-12-Rezeptors. Bei ansteigender Konzentration von IL-12 durch Sekretion aus Makrophagen oder dendritischen Zellen wird das Programm zur Differenzierung in TH1-Zellen initiiert. IL-4 induziert die Differenzierung von TH2-Zellen (Lavender *et al.* 2000). Die für TH1- und TH2-Zellen spezifischen Zytokine können Wachstum und Differenzierung ihrer eigenen Klasse fördern und die Entwicklung der anderen Klasse unterdrücken. IFN- γ inhibiert die Vermehrung von TH2-Zellen und IL-10 inhibiert die Zytokinproduktion von TH1-Zellen (Fiorentino *et al.* 1989).

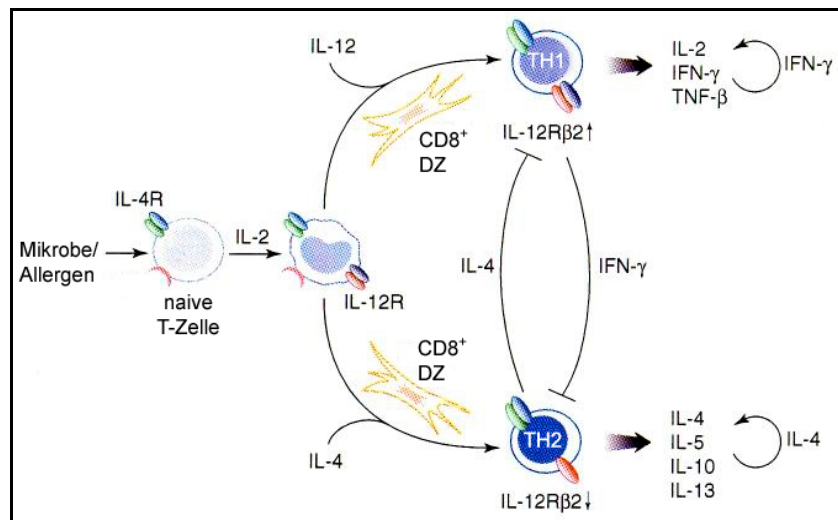


Abb. 4: Überblick über die Differenzierung von T-Helferzellen.

Werden $CD4^+$ -T-Zellen durch ein mikrobielles Antigen aktiviert, kommt es zur Produktion von IL-2, Präsentation des IL-12-Rezeptors und zur Bildung von zwei funktionell unterschiedlichen Gruppen, den TH1- und TH2-Zellen. Die Differenzierung in TH1-Zellen wird durch IL-12 und in TH2-Zellen durch IL-4 initiiert. Die Funktion wird durch die Ausschüttung verschiedener Zytokine bedingt. TH1-Zellen sekretieren Interferon- γ , IL-2 und Tumor Nekrosis Faktor β . TH2-Zellen bilden IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 (Abb. nach Rengarajan *et al.* 2000).

Die Funktion korreliert mit der Ausschüttung verschiedener Zytokine. TH1-Zellen sekretieren Interleukin (IL)-2, Interferon- γ (IFN- γ) und Tumor Nekrosis Faktor β (TNF- β , auch Lymphotoxin LT). TH2-Zellen hingegen sekretieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Murine und menschliche T-Zellen produzieren gleiche Zytokine, obwohl die Synthese von IL-2, IL-6, IL-10 und IL-13 in menschlichen Zellen nicht so stark auf eine Untergruppe beschränkt ist wie im Maussystem (Cherwinski *et al.* 1987, Del Prete *et al.* 1991, Mosmann *et al.* 1986).

TH1- und TH2-Zellen bedingen durch ihre Zytokinsekretion bestimmte Immunantworten (vgl. Abb. 5). TH1-Zellen aktivieren durch die Zytokine IFN- γ und TNF- β Makrophagen, welche daraufhin intrazelluläre Pathogene wie Bakterien, Parasiten, Hefen und Viren bekämpfen. Eine TH1-Antwort wird oft von der Produktion komplementfixierender Antikörper (IgG2a Isotyp) und der Aktivierung von NK-Zellen und zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen begleitet (Abbas *et al.* 1996, Mosmann and Sad 1996, O'Garra 1998, O'Garra and Arai 2000, Sher and Coffman 1992). Auch an der Entstehung von Autoimmunkrankheiten, wie Diabetes Typ-1 und Multipler Sklerose können TH1-Zellen beteiligt sein (Liblau *et al.* 1995, O'Garra *et al.* 1997, Powrie and Coffman 1993).

TH2-Zellen hingegen sind an der Bekämpfung von extrazellulären Parasiten und Helminthen beteiligt, indem sie die Mastzellen und Eosinophile aktivieren und naive antigenspezifische B-Zellen zur IgE-Antikörperproduktion anregen. Sie lösen so eine humorale Immunantwort aus (Mosmann *et al.* 1986, Sher and Coffman 1992, Urban *et al.* 1992). Fehlsteuerung kann zu allergischen Reaktionen führen (O'Garra 1998).

Die beiden T-Helferzelltypen kreuzregulieren einander. Dieser Mechanismus ermöglicht eine ausgewogene Zytokinproduktion.

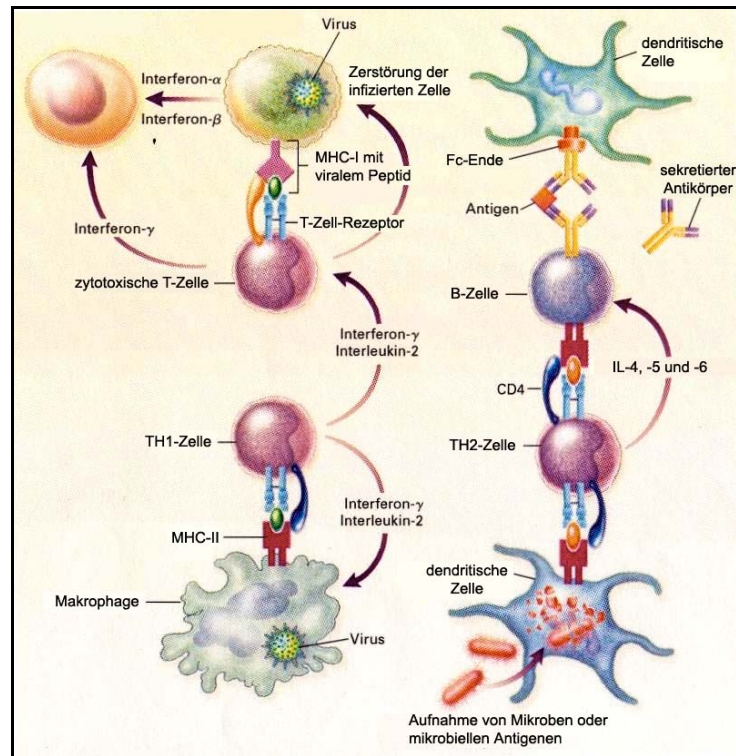


Abb. 5: Überblick über die Immunantwort der T-Lymphozyten.

T-Zellen produzieren Rezeptoren, die prozessierte Antigene, gebunden an MHC-Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen, erkennen. Zytotoxische T-Zellen exprimieren CD8 und erkennen Antigene, die durch MHC-I präsentiert werden. Sie zerstören infizierte Zellen und verhindern so die Virusreplikation. CD4 positive T-Helferzellen erkennen Peptide, die von MHC-II-Molekülen präsentiert werden. Sie können in zwei Populationen unterteilt werden. TH1-Zellen sekretieren Interferon- γ und Interleukin-2, welche Makrophagen und zytotoxische T-Zellen aktivieren, intrazelluläre Pathogene zu zerstören. TH2-Zellen sekretieren Interleukin-4, -5, und -6, welche B-Zellen zur Antikörperproduktion aktivieren (Abb. nach Delves and Roitt 2000b).

1.2 Autoimmunität

1.2.1 Natürliche Autoantikörper

Antikörper im Serum gesunder Individuen in Abwesenheit eines immunisierenden Antigens werden als natürliche Antikörper bezeichnet. Reagieren diese mit Selbstantigenen, heißen sie natürliche Autoantikörper (Coutinho *et al.* 1995).

Immunglobulin produzierende B-Zellen werden kontinuierlich durch Interaktionen von Lymphozyten mit Selbst- und Fremdanitgenen selektiert. Aufgrund der klonalen Selektion, bei der Lymphozyten, die während der Entwicklung auf Selbstantigene treffen, eliminiert werden, wäre zu erwarten, dass Autoantikörper nur in pathologischen Situationen auftreten (Guilbert *et al.* 1982).

In mehreren Studien konnte aber die Existenz natürlicher Autoantikörper in gesunden Individuen gegen verschiedene Antigene, wie z.B. Gehirnproteine (Martin and Martin 1975a), Thymuszellen (Martin and Martin 1975b) und Tubulin (Karsenti *et al.* 1977) gezeigt werden. Des Weiteren wurde die Anwesenheit von natürlichen Autoantikörpern gegen Aktin, Thyroglobulin, Myoglobin, Fetuin, Transferrin, Albumin, Cytochrom C und Kollagen beschrieben (Guilbert *et al.* 1982).

1.2.2 Autoimmunkrankheiten

Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Organismus vor fremden pathogenen Substanzen zu schützen und dabei die Reaktion auf körpereigene Stoffe zu vermeiden. Es muss also selbsttolerant sein (Van Parijs and Abbas 1998). Bei der Autoimmunität versagt die Selbsttoleranz, entsprechend wird eine spezifische Immunantwort gegen körpereigene Antigene ausgelöst. Dies kann zur Ausbildung von Autoimmunkrankheiten mit charakteristischen Gewebeschädigungen führen, von denen 5% der Bevölkerung in Europa und Nordamerika betroffen sind, davon 2/3 Frauen. Autoimmune Funktionsstörungen umfassen mehr als 50 Krankheiten und Syndrome (Persidis 1999). Dabei unterscheidet man abhängig vom Vorkommen der autoimmunen Reaktionen zwischen organspezifischen Krankheiten, wie z.B. Insulin-abhängiger Diabetes mellitus, und systemischen, wie z.B. Lupus erythematosus. Obwohl die Entstehung von autoimmunen Erkrankungen und besonders der Schritt der Initiation noch weitgehend unbekannt ist, wird angenommen, dass T-Zellen eine zentrale Rolle spielen, besonders bei organspezifischen Krankheiten, wie z.B. Insulin-abhängiger Diabetes mellitus, Multipler Sklerose, Alopecia, und Sjogren`s Syndrom (Kaufman *et al.* 1993, Sakaguchi 2000a, Tisch *et al.* 1993).

Es gibt umwelt- und genetisch bedingte Risikofaktoren, die als Gründe für die Entstehung autoimmuner Erkrankungen angesehen werden können. Infektionen stellen ein hohes Risiko dar. Durch Zerstörung der vaskulären und zellulären Barrieren können Selbstantigene dem Immunsystem präsentiert werden, wodurch die periphere Toleranz beeinträchtigt wird. Zelltod durch Nekrose verursacht große Mengen zellulären Abfalls, die von Phagozyten beseitigt werden müssen (Mackay 2000). Des Weiteren gibt es den Prozess der molekularen Mimikry, bei dem ein Antigen eines Mikroorganismus einem Selbstantigen ähnelt und so eine kreuzreaktive Autoimmunantwort induzieren kann (Oldstone 1998). Weitere Umweltfaktoren können durch Gewebsschädigung Autoimmunität initiieren, wie z.B. Sonnenlicht in Systemischem Lupus

erythematosus (Vaishnaw *et al.* 1999). Indirekt ist auch der allgemeine körperliche Zustand relevant, da z.B. Hormone die weibliche Anfälligkeit für autoimmune Erkrankungen beeinflussen. Höchstwahrscheinlich sind an der Entstehung von Autoimmunkrankheiten auch genetische Veränderungen beteiligt. Veränderte Gene bei fehlender Autoimmunität können z.B. solche sein, die für den MHC-Komplex kodieren und damit festlegen, welche Antigene dem Immunsystem präsentiert werden. Des Weiteren beeinflussen Gene der T- und B-Zell-Rezeptoren, welche Moleküle angegriffen werden. Auch Gene, die an Toleranz, Apoptose oder Entzündungsreaktionen beteiligt sind, können die Anfälligkeit für die Entstehung einer Autoimmunerkrankung erhöhen (Mackay 2000).

Als Beispiel einer autoimmunen Erkrankung wird im Folgenden die rheumatoide Arthritis näher beschrieben.

1.2.3 Rheumatoide Arthritis

1.2.3.1 Krankheitsbild

Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine autoimmune Erkrankung, von der etwa 1% der Bevölkerung betroffen ist. Hierbei erkranken Frauen häufiger als Männer. Die Krankheit kann Personen jeden Alters treffen, tritt aber gewöhnlich in der Altersgruppe zwischen 40 und 70 Jahren auf, wobei das Vorkommen mit zunehmendem Alter ansteigt (Lee and Weinblatt 2001; Ziff 1990). RA ist charakterisiert durch chronische Entzündung der synovialen Gewebe mit Einwanderung von aktiven Blutzellen, wie T-Zellen, Makrophagen und Plasmazellen (Cush and Lipsky 1988, Janossy *et al.* 1981). In den meisten Fällen führen die Entzündungsreaktionen zu zunehmender Zerstörung von Knorpel und Knochen. Die vorherrschenden Symptome sind Schmerz, Steifheit und Schwellung der peripheren Gelenke. Typischerweise sind Grund- und Mittelgelenke der Finger betroffen. Im weiteren Krankheitsverlauf können sich als typische Veränderungen der Gelenke z.B. Abrutschender Finger nach außen (Ulnardeviation) (vgl. Abb. 6A) sowie Abknicken des letzten Fingerglieds nach unten (Schwanenhalsdeformität) (vgl. Abb. 6B) entwickeln. Obwohl im Frühstadium nur wenige Gelenke angegriffen sind, entwickelt sich fast immer nach einer gewissen Zeit eine Polyarthritits, das heißt eine Entzündung vieler großer und kleiner Gelenke des Körpers. Neben den Gelenken können auch andere Organe wie die Lunge, das Herz, die Augen sowie die Haut betroffen sein. Der klinische Verlauf der Erkrankung ist sehr unterschiedlich und reicht von leichter bis hin zu stark fortschreitender systemischer Entzündung mit Sterblichkeit (Lee and Weinblatt 2001).

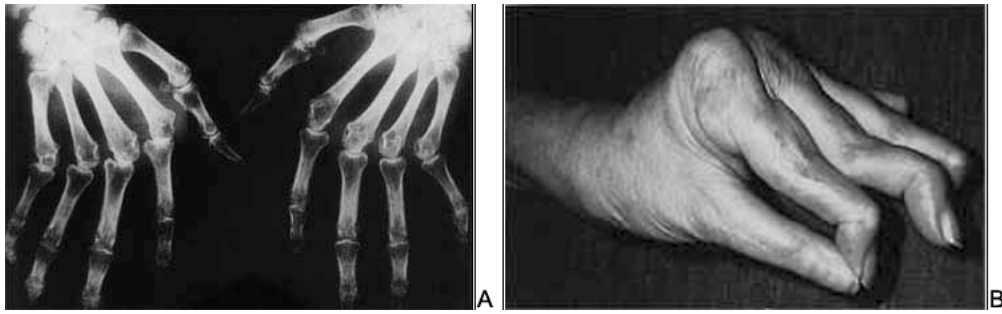


Abb. 6: Typische Veränderungen der Gelenke bei Patienten mit RA.

A: Röntgenaufnahme der Hand eines Patienten mit RA: Zu erkennen sind die Abweichung der Finger nach außen (Ulnardeviation), die gelenknahen röntgendurchlässigen Areale ober- und unterhalb der Fingergrundgelenke und kleine Knochendefekte an den Köpfchen der Mittelhandknochen.

B: Hand eines Patienten, bei dem das letzte Fingerglied nach unten abknickt (Schwanenhalsdeformität).
(Abb. nach <http://www.m-ww.de/krankheiten/rheuma/rheumatoide.html>)

Histologisch auffallend sind die Einwanderung inflammatorischer Leukozyten sowie die Veränderung der Expression von Adhäsionsmolekülen der Zellwand, Proteinasen, Proteinase-Inhibitoren und vieler Zytokine. Synoviale Veränderungen variieren mit dem Fortschreiten der Krankheit. In den ersten Wochen sind Gewebsödeme und Fibrinablagerungen auffallend und können sich klinisch als Schmerzen und Schwellung des Gelenkes darstellen. Verschiedene Zelltypen wie dendritische Zellen, Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten sowie B-Zellen sind an der fortschreitenden Gelenkzerstörung beteiligt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass T-Zellen eine zentrale Rolle beim Entstehen und Fortschreiten der Krankheit spielen (Breedveld 1998). Ein Grund zu der Annahme liegt in der Beobachtung, dass viele der an RA erkrankten Patienten eine veränderte Aminosäuresequenz in der antigenbindenden Region des HLA-DR-Locus (MHC-II-Komplexes) exprimieren, welcher für die Peptidpräsentation für CD4⁺-T-Zellen wichtig ist (Gregersen *et al.* 1988, Winchester *et al.* 1992).

Beim Vergleich der T-Zell-Rezeptorketten von synovialen und peripheren T-Zellen konnten trotz Überrepräsentation einzelner Rezeptorketten heterogene Rezeptoren im entzündeten Synovium identifiziert werden. Dies spricht gegen die Existenz eines einzelnen pathogenen T-Zell-Rezeptor-Allels (Jenkins *et al.* 1993, Uematsu *et al.* 1991).

Die Analyse synovial einwandernder T-Zellen zeigt keine starke Proliferation dieser Population (Nykanen *et al.* 1986). Ein Vergleich des Oberflächenmoleküls CD45 synovialer T-Zellen mit dem peripherer Blutzellen zeigt im Synovium eine Anhäufung von Zellen, die eine Isoform von CD45 exprimieren, welche für die Gedächtniszellen charakteristisch ist. Dieser Phänotyp lässt vermuten, dass hier stimulierte und gereifte T-Zellen in das Gewebe einwandern und nicht erst im Gewebe reifen (Koch *et al.* 1990, Kohem *et al.* 1996).

Unter den Zytokinen, die vermehrt bei RA auftreten, sind (neben IL-2, IL-17 und IFN- γ aus T-Zellen) besonders TNF- α und IL-1 in hohen Konzentrationen in der synovialen Flüssigkeit und im Synovialgewebe zu finden (Chu *et al.* 1991; Wood *et al.* 1992). Auch die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 sowie der Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulationsfaktor (GM-CSF) werden in erhöhter Konzentration bei RA gefunden (Harney *et al.* 2003).

Synoviozyten produzieren bei RA in hohem Maße Metalloproteinasen, eine Familie von Enzymen, welche die extrazelluläre Matrix umgestalten und zerstören. Die Aktivität dieser Enzyme wird durch Moleküle wie Gewebeinhibitoren von Metalloproteinasen (TIMPs), Serine-Proteinase-Inhibitoren (SERPINS) und α_2 -Macroglobulin gehemmt. Es wird angenommen, dass die hohe Konzentration der Metalloproteinasen bei RA an der Zerstörung von Knorpel und Knochen beteiligt ist (McCachren *et al.* 1990, Gravallesse *et al.* 1991, Martel-Pelletier *et al.* 1994).

1.2.4 Targetidentifizierung

Die Vorgänge, welche die Entstehung autoimmuner Erkrankungen auslösen, und sowohl Typ, Anzeichen als auch Fortschreiten festlegen, sind noch weitgehend ungeklärt. Verursacht werden die Krankheiten durch das Zusammenspiel verschiedener genetischer, hormoneller und umweltbedingter Faktoren, die zur Immunantwort gegen körpereigene Strukturen führen (Andreakos *et al.* 2002). Die molekularen und zellulären Prozesse dieser komplexen Krankheiten werden mittels genomischer und funktioneller Analyse untersucht.

Für Untersuchungen auf genetischer Ebene das führte Aufkommen von DNA Mikroarray-Technologien zu einer Vielzahl von Studien Diese haben das Ziel der Identifizierung neuer *messenger* RNA (mRNA)-Moleküle, welche in bestimmten Krankheiten oder Phänotypen transkriptional hoch- oder herunterreguliert werden (Khan *et al.* 1999). Diese Methode ist jedoch allein nicht ausreichend, um autoimmune Erkrankungen zu erforschen. Krankheiten zeigen sich häufig zuerst auf Proteinebene. Des Weiteren besteht nicht immer eine Korrelation zwischen RNA-Expression und Proteinexpression mit der daraus resultierenden Funktion, da Proteine häufig durch Spleißvariation und posttranslationale Vorgänge modifiziert werden. Autoimmunantworten werden durch autoantigenspezifische T- und B-Lymphozyten reguliert, die sehr heterogene Rezeptoren exprimieren. Diese sind auf transkriptionaler Ebene schwer zu untersuchen (Futcher *et al.* 1999, Varshavsky 1996).

Auf dieser Grundlage beruht das Ziel der Proteomforschung, eine umfassende Charakterisierung von Proteinen und Proteinnetzwerken in Zellen, Geweben, Organen und biologischen Flüssigkeiten zu erhalten. Dabei müssen sowohl die große Anzahl verschiedener Proteine als auch die verschiedenen physiko-chemischen Eigenschaften und die Vielfalt der Proteinexpression mit den verschiedenen posttranslationalen Modifikationen (Corthals *et al.* 2000, Nalivaeva and Turner 2001) berücksichtigt werden. Eine gängige Methode hierfür ist die Separation komplexer Proteingemische, z.B. Zell-Lysaten, primären Zellkulturen oder Geweben durch zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE). Einzelne Proteine können daraufhin mittels Western-Blot-Analyse durch Screening mit spezifischen Antikörpern oder autoimmunen Serumproben visualisiert werden. Die Technik ist hoch standardisiert und erleichtert die Aufreinigung reaktiver Proteine durch Ausschneiden eines bestimmten Spots. Die Sequenz des Proteins kann dann mittels Massenspektrometrie (MS) untersucht werden. Die MS ersetzt die klassische Technik, den Edman-Abbau, da sie eine sensitivere Methode darstellt, mit Proteingemischen umgehen und einen hohen Durchsatz an Proben erlaubt. Für MS werden die Proteine durch eine sequenzspezifische Protease, z.B. Trypsin, in Peptide zerlegt (Pandey and Mann 2000).

Mikrofluide Techniken wurden entwickelt, um das Screening von biomolekularen Interaktionen im hohen Durchsatz zu ermöglichen. Diese Techniken verwenden Mikrokanäle, in denen Lösungen mit verschiedenen Molekülen gemischt werden, um Interaktionen dieser Moleküle zu untersuchen. Kleine Volumina der Reaktionslösungen werden in einem Netzwerk von Kanälen einem elektrokinetischen Fluss ausgesetzt und so mit den anderen Molekülen zusammengebracht (Robinson *et al.* 2002b). Bindungen werden als Veränderungen in der elektrophoretischen Mobilität der Moleküle detektiert (Kawaoka and Gomez 1998). Ein Vorteil dieser Techniken, bei denen sich die zu untersuchenden Moleküle in Lösung befinden, liegt darin, dass keine immunologisch wichtigen Epitope durch Bindung an eine Oberfläche verloren gehen (Robinson *et al.* 2002b).

Eine weitere Technik für die Untersuchung von Interaktionen zwischen bestimmten Molekülen ist das „*phage-display*“. Hierbei werden von Bakteriophagen bestimmte Moleküle (z.B. Proteine, Peptide oder „*single chain variable fragments*“: scFv's) fusioniert an Phagenhüllproteine exprimiert. Durch Klonierung einer cDNA- oder Peptidbibliothek in das Phagen genom bietet diese Methode auch die Möglichkeit, nach bestimmten Peptiden oder Proteinen zu suchen (Cwirla *et al.* 1990, Devlin *et al.* 1990).

Für das Screening einer Vielzahl einzelner Proteine mit einer geringen Menge an Serum wurden Peptid-, Antikörper- und Proteinarrays entwickelt. Hierbei werden die Moleküle an bestimmte Positionen in Vertiefungen oder auf planare Oberflächen gebunden. Eine Anwendung der Protein-Array-Technologie findet sich in klinischen Diagnostiktests. So basieren z.B. viele rheumatologische Tests auf der ELISA („*enzyme-linked immunosorbent assay*“)-Technologie (von Muhlen and Tan 1995). Ein Vorteil im Vergleich zu den oben beschriebenen aus 2D-Gelen separierten Proteinen ist der Wegfall der aufwendigen Identifizierung von detektierten Proteinen über massenspektrometrische Methoden.

1.3 Proteinarrays

Das Spotting von DNA oder Proteinen in hoher Dichte auf planare Oberflächen erlaubt die gleichzeitige Analyse vieler Moleküle in einem Experiment. Ein Vorteil des Mikroarray-Formats ist der Gebrauch einer festen Oberfläche, die die präzise geordnete Positionierung von Proben in hoher Dichte ermöglicht (Cahill 2000). DNA-Mikroarraying ist eine wichtige Technik, um Genfunktionen zu analysieren (Blohm and Guiseppi-Elie 2001). Einzelgen-Sets in Form von „*polymerase-chain-reaction*“ (PCR)-Produkten werden oft für die Herstellung von DNA-Mikroarrays verwendet, um die transkriptionale Regulation zu untersuchen (MacBeath and Schreiber 2000). Im Gegensatz zur DNA sind die Bedingungen für die Hybridisierung von Proteinarrays nicht einheitlich. Weiterhin können das Bindungsverhalten und die Stabilität der Proteine auf der jeweiligen Oberfläche nicht vorausgesagt werden (Cutler 2003). Trotz der technischen Herausforderungen besitzen Proteinarrays Vorteile gegenüber anderen Methoden, insbesondere durch die parallele Analyse von Proteinen im hohen Durchsatz, Automatisierung und einfache Handhabung (Skena and Davis 2000). Des Weiteren wird die Kontrolle der Schlüsselparameter, wie Temperatur, pH-Wert und Konzentration von Cofaktoren im Gegensatz zu zellbasierten Systemen ermöglicht (MacBeath 2002).

Proteine können auf flachen, festen Oberflächen oder in kapillaren Systemen angeordnet werden (Jain 2001). Aufgrund ihres geringen fluoreszierenden Hintergrundes werden als feste Oberflächen bevorzugt modifizierte Glasoberflächen (Haab *et al.* 2001, Madoz-Gurpide *et al.* 2001, Zhu *et al.* 2001), Filtermembranen wie Nitrozellulose (Madoz-Gurpide *et al.* 2001) oder Polyvinyliden Difluorid (PVDF) (Büssow *et al.* 1998) verwendet. Die Bindung der Proteine kann kovalent durch chemische Linker oder nicht kovalent über hydrophobe van der Waals-,

ionische oder andere Interaktionen erfolgen. Ladung, Viskosität, pH-Wert, Porengröße der Membran, Bindungskapazität und nicht spezifische Bindung sind entscheidende Parameter für die Erstellung von Proteinarrays (Walter *et al.* 2002). Ein Ziel ist es, die Proteine in ihrer biologischen Form zu erhalten. Durch gerichtete Bindung an die Oberfläche über einen Tag (z.B. Histidin-Tag) wird dieses erleichtert (Zhu *et al.* 2001, He and Taussig 2001). Das Spotting der Proteinarrays erfolgt meist über Pin-basierte Systeme, die Lösungen im Nanoliter-Bereich transferieren. Die Detektionssysteme für Proteinarrays basieren häufig auf Fluoreszenz, wobei entweder direkt konjugierte Moleküle eingesetzt werden, oder die Detektion über markierte Antikörper erfolgt (Zhu *et al.* 2001, Büssow *et al.* 1998, Madoz-Gurpide *et al.* 2001, Haab *et al.* 2001, MacBeath and Schreiber 2000).

Eine Anwendung von Proteinarrays ist die Untersuchung von Antigen-Antikörper-Interaktionen. Dabei können einerseits die Antikörper und andererseits die Antigene immobilisiert werden (Robinson *et al.* 2002a). Die relativ hohe Stabilität von Antikörpermolekülen führt zu einer häufigen Anwendung von Antikörper-Arrays. Hierbei werden Antikörper sowohl als bakterielle Klone als auch in aufgereinigter Form angeordnet (de Wildt *et al.* 2000, Haab *et al.* 2001, Huang 2001). Detektiert wird entweder mit direkt Fluoreszenz-konjugierten Antigenen (Haab *et al.* 2001) oder durch Screening mit sekundären konjugierten Antikörpern (Huang 2001).

Die Wurzeln von Protein-identifizierenden Mikroarrays liegen in der Entwicklung des Immunoassay. Beim Sandwich-Immunoassay werden Antikörper auf einer Oberfläche immobilisiert. Die gebundenen Proteine werden mittels eines sekundären Antikörpers detektiert, welcher mit einem Detektionsmolekül konjugiert ist. Mittels dieser Methode konnten z.B. auf der einen Seite Zytokinkonzentrationen (Moody *et al.* 2001) ermittelt und auf der anderen Seite Zytokine in Seren identifiziert werden (Huang *et al.* 2001). In einem alternativen Versuchsansatz ist es möglich, gebundene Antigene ohne den Einsatz eines sekundären Antikörpers zu detektieren. Hierbei werden alle Proteine in einer Probe chemisch konjugiert (Haab *et al.* 2001). Eine weitere Möglichkeit, Proteinprofile zu untersuchen, stellt der direkte Immunoassay dar. Dieser besteht darin, Proben direkt auf Oberflächen zu immobilisieren. Spezifische Proteine in diesen Proben können dann mit konjugierten Antikörpern detektiert werden (Paweletz *et al.* 2001).

1.4 Expressionssysteme

Für das Verständnis eines komplexen Systems wie das der Zelle oder ganzer biologischer Prozesse (z.B. Entwicklung, Wachstum, Krankheit) ist es notwendig, neben der Analyse auf DNA-Ebene auch die Genprodukte zu untersuchen. Hierbei sollen Informationen über die Expression und Regulation sowie über mögliche Interaktionspartner gewonnen werden, um daraus Hinweise auf die Funktion zu erhalten (Anderson and Anderson 1998). Bezüglich einer Analyse auf Proteinebene gewinnt die Wahl des Expressionssystems für die heterologe Expression als ein Mittel, das Genprodukt in hoher Konzentration und sauber zu erhalten, eine herausragende Bedeutung (Anderson and Anderson 1998, Patton 1999). Die Expression einzelner Genprodukte wurde erfolgreich in verschiedenen Organismen, beispielsweise in einigen Einzellern wie den Bakterien *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* (de Vos 1999) und *Escherichia coli* (*E. coli*) sowie niederen Eukaryonten wie der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), durchgeführt. Aber auch höhere Eukaryonten wie Säugetier-, Pflanzen- und Insektenzellen dienen als Wirtsorganismen. Weiterhin sind für einige Phagen Proteinexpressionssysteme entwickelt worden. Für heterologe Proteinexpression wird die DNA des jeweiligen Gens in einen Expressionsvektor kloniert und durch Transformation in den Wirtsorganismus eingebracht.

E. coli ist als prokaryotisches System zur Expression von heterologen Proteinen weit verbreitet. Dieser Organismus ist auf genetischer und biochemischer Ebene gut charakterisiert und kann relativ leicht genetisch manipuliert werden. Weiterhin besitzt er eine kurze Verdopplungszeit und ist leicht zu kultivieren. Ein prokaryotischer Expressionsvektor beinhaltet genetische Elemente, die für Proteinexpression, also für Transkription und Translation, wichtig sind. Eine Antibiotikaresistenz vereinfacht die phänotypische Selektion, und ein Replikationsursprung („*origin of replication*“: ORI) ermöglicht die Vervielfältigung des Vektors in der Wirtszelle unabhängig vom Wirtsgenom (Hannig and Makrides 1998).

Für die Expression eukaryontischer Proteine besitzt Hefe einige Vorteile gegenüber prokaryontischen Expressionssystemen. Als eukaryontischer Wirt ist Hefe im Gegensatz zu Bakterien in der Lage, Proteine posttranslational zu modifizieren, z.B. durch aminoterminal Acetylierung, Phosphorylierung, Myristylierung, Isoprenylierung sowie Glycosylierung. Allgemein ist beobachtet worden, dass Hefe in der Lage ist, einen Großteil der heterologen Proteine löslich zu exprimieren (Harashima 1994). Die in *E. coli* häufige Bildung von

„*inclusionbodies*“ ist in Hefe eher selten (Mackay and Kelleher 1996). Neben zytoplasmatisch löslichen Proteinen können auch solche exprimiert werden, die, wie in ihrem natürlichen Wirt, nach außen sekretiert werden. Die Sekretion von heterologen Proteinen ist oft für die korrekte Faltung notwendig. Die zu sekretierenden Proteine werden mit aminoterminalen Sequenzen ausgestattet, den sogenannten „Sekretionsleadern“, so dass sie aus der Zelle exportiert werden können. Der sekretorische Weg gleicht dem in Säugerzellen (Mackay and Kelleher 1996). Verschiedene Hefe- und Pilzarten wurden für heterologe Proteinexpression getestet, wobei die Technik für die Bäckerhefe *S. cerevisiae* die älteste und am weitesten entwickelte ist.

Diese Hefe ist auf genetischer, molekular- und zellbiologischer Ebene gut charakterisiert, so dass sie häufig als Modellorganismus in der rekombinanten Proteinexpression verwendet wird (Mackay and Kelleher 1996). Für das Expressionssystem *S. cerevisiae* stehen im kommerziellen Umfeld eine Reihe von Basisvektoren mit einer Kopienanzahl von 1- 200 Molekülen pro Zelle zur Verfügung. Für die Hefen *S. cerevisiae* und *Pichia pastoris* sind Methoden für die parallele Expression vieler heterologer Proteine entwickelt worden (Boettner *et al.* 2002, Cereghino and Cregg 2000, Holz *et al.* 2002). Um Proteine sowohl in Hefe als auch in *E. coli* exprimieren zu können, ist für *Pichia pastoris* ein duales Vektorsystem entwickelt worden, welches die Expression rekombinanter Proteine in beiden Wirtsorganismen ermöglicht (Lueking *et al.* 2000).

Durch die Technik des „*phage display*“ wird es ermöglicht, auch Phagen als ein Expressionssystem für heterologe Proteine zu nutzen. Dafür wird das Gen des zu exprimierenden Peptids oder Proteins in das Phagengenom kloniert und mit dem Gen eines der Phagenhüllproteine verknüpft. Das fremde Peptid wird so auf der Oberfläche des Phagen präsentiert (Smith 1985). Es können auch ganze cDNA- oder Peptidbibliotheken in das Phagengenom kloniert werden (Devlin *et al.* 1990). Häufig verwendet werden die *phage-display*-Systeme des filamentösen Phagen M13 (Felici *et al.* 1995; Malik *et al.* 1996) und des Bakteriophagen Lambda (Mikawa *et al.* 1996, Sternberg and Hoess 1995).

Neben der Klonierung einzelner Gene sind Techniken entwickelt worden, die die parallele Expression vieler Proteine ermöglichen (Büssow *et al.* 1998; Lüking *et al.* 1999). Menschliche cDNA wurde sowohl direkt in einen bakteriellen (Büssow *et al.* 1998) als auch in einen eukaryontischen (Holz *et al.* 2001) Expressionsvektor kloniert.

Für die Vereinfachung der Aufreinigung rekombinanter Proteine werden diese im Allgemeinen als Fusionsprodukte mit einem Protein- oder Peptidtag exprimiert. Eine Reihe von Tags wurde hierfür entwickelt. Die entscheidende Eigenschaft von Affinitäts-Tags liegt in der spezifischen,

hoch affinen Bindung an bestimmte Trägermaterialien (Nilsson *et al.* 1997). Fusion mit Glutathion S-Transferase ermöglicht z.B. Affinitäts-Chromatographie über immobilisierte Glutathion-Agarose. Durch Fusion mit dem Maltose-Bindeprotein kann die Löslichkeit der fusionierten Proteine erhöht werden (Kapust and Waugh 1999). Für Immunpräzipitation und -detektion werden oft Epitop-Tags, wie c-myc (Evan *et al.* 1985) oder Hämagglutinin (HA) (Wilson *et al.* 1984) verwendet. Der StrepII-Tag (Voss and Skerra 1997) sowie der Biotin-Tag (Schatz 1993) sind Peptide mit Affinität zu Streptavidin, die einer effizienten Reinigung von Proteinen über speziell entwickelte wiederverwendbare Säulen dienen (Voss and Skerra 1997). Ein weiteres Beispiel ist die Fusion von rekombinanten Proteinen mit einem His-Tag. Diese Aminosäuren binden an immobilisierte Metallionen. Die Aufreinigung erfolgt über Metall-Chelat-Affinitätschromatographie. Das hier verwendete System der Proteinaufreinigung über die sechs Histidine basiert auf der Verwendung eines Trägermaterials („nitrilotriacetic acid“, NTA), welches Ni²⁺-Ionen über kovalente Bindungen immobilisiert (Hochuli *et al.* 1987).

1.5 Zielsetzung

Das Ziel von „Proteomics“ ist es, eine umfassende Beschreibung von Proteinexpression und ihrer Veränderung in verschiedenen biologischen Prozessen, z.B. unter dem Einfluss von Krankheit oder Medikamentenbehandlung zu erhalten. Die Anforderungen durch die große Anzahl der Gene und ihrer Genprodukte führten zur Entwicklung einer Reihe von Hochdurchsatz-Methoden. Eine davon ist die Arraytechnologie. Diese erlaubt die parallele Analyse einer Vielzahl von Molekülen in einem Experiment. DNA oder Proteine können dabei als Mikrosots in definierten Positionen angeordnet werden (Walter *et al.* 2002). Besonders für die Diagnostik gewinnen Proteinarrays an Bedeutung (Stoll *et al.* 2002).

Büssow *et al.* (1998) entwickelten geordnete cDNA-Expressionsbibliotheken für die Hochdurchsatz-Expression und Analyse die unbekannter Proteine. Hierbei wurde die Notwendigkeit umgangen, für jedes Protein ein individuelles Expressionssystem zu konstruieren. Durch Anordnung der Klone in hoher Dichte auf Membranen konnten die Proteine der gesamten Bibliothek parallel hybridisiert und bestimmte Klone identifiziert werden (Büssow *et al.* 1998, Büssow *et al.* 2000).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen Proteinarrays für Untersuchungen am Immunsystem entwickelt werden. Zunächst soll eine cDNA-Expressionsbibliothek aus murinen TH1-Zellen erstellt werden. Von dieser können dann Hochdichte-Proteinarrays generiert werden, die für die Analyse von Antigen-Antikörper-Interaktionen zum Einsatz kommen. Daran anschließend soll das Screening mit spezifischen Antikörpern gezeigt werden.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit steht die Anwendung von Hochdichte-Proteinarrays humaner Proteine für die Analyse von menschlichen Autoantikörpern im Vordergrund. Die zugrundeliegenden Mechanismen der meisten Autoimmunantworten sind noch kaum untersucht. Die Bildung von Autoantikörpern spielt aber eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten (von Muhlen and Tan 1995). Das Verständnis der Spezifität und Pathogenese von Autoantikörperantworten ist wichtig für die Diagnose, Klassifizierung und Prognose vieler Krankheiten. Robinson *et al.* (2000) haben Autoantigenarrays hergestellt und diese mit Seren von Patienten mit autoimmunen Erkrankungen hybridisiert. Sie konnten zeigen, dass sich diese Methode eignet, um Antikörper gegen spezifische Autoantigene in Seren nachzuweisen.

Die Untersuchungen im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit fokussieren sich auf die Analyse von im Menschen vorkommenden Autoantikörpern, die bei rheumatoider Arthritis eine Rolle spielen.

Bei der rheumatoiden Arthritis handelt es sich um eine weit verbreitete Autoimmunkrankheit. Die Krankheit ist charakterisiert durch chronische Entzündung der synovialen Gewebe. RA wird begleitet durch das Auftreten von vielen Autoantikörpern im Serum der Patienten. Eine Reihe dieser Antikörper sind nicht spezifisch für RA, sie treten auch unter anderen entzündlichen Bedingungen auf, während andere Antikörper vermutlich spezifischer sind (van Boekel *et al.* 2002). Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet scheint das Zielantigen in RA noch unbekannt zu sein. Multiplexe Screening-Technologien, besonders Arrays repräsentieren wichtige Möglichkeiten, die Pathophysiologie autoimmuner Erkrankungen zu untersuchen (Robinson *et al.* 2002a).

In der vorliegenden Arbeit sollen potentielle Autoantigene, die bei rheumatoider Arthritis eine Rolle spielen, unter Verwendung von Protein-Makro- und -Mikroarrays identifiziert werden (Cahill 2000). Diese Arrays werden von Proteinen einer cDNA-Expressionsbibliothek aus humanem fötalen Hirngewebe (Büssow *et al.* 2000; Büssow *et al.* 1998) erstellt.

In einem dritten Abschnitt soll schließlich gezeigt werden, dass sich eine murine cDNA-Expressionsbibliothek im Prinzip für die Applikation des Serum-Screenings unter Verwendung eines Mausmodells, welches spezifisch für die Autoimmunerkrankung Systemischer Lupus erythematosus (SLE) ist, eignet. Basierend auf der großen Homologie von Maus und Mensch wäre es möglich, durch gemeinsame Anwendung des humanen und des murinen Systems zu einer höheren Datensicherheit zu gelangen.