

3 Ergebnisse

Die im Folgenden präsentierten Ergebnisse lassen sich in drei Bereiche unterteilen. Zunächst werden die Daten zu der Herstellung und Charakterisierung einer cDNA Bibliothek aus murinen T-Helferzellen Typ1 (TH1) sowie deren Applikation unter Verwendung von Proteinarrays beschrieben. Der zweite Teil umfasst die Ergebnisse des Serumscreenings mit Seren von Patienten, die an rheumatoider Arthritis (RA) erkrankt sind. Die Seren wurden hierbei auf Proteinarrays einer schon existierenden Expressionsbibliothek aus menschlichem fötalen Hirngewebe (hEX1) hybridisiert. Im dritten Abschnitt werden die Ergebnisse des Screenings von Seren eines Mausmodells für Systemischen Lupus erythematosus (SLE) auf Proteinarrays der murinen TH1-cDNA-Bibliothek dargestellt.

3.1 Herstellung und Applikation einer cDNA Expressionsbibliothek aus murinen T-Helferzellen Typ 1

Zunächst werden die Daten zur Konstruktion der cDNA-Expressionsbibliothek mit der Herstellung eines Expressionssubsets beschrieben. Im Weiteren folgt die Beschreibung der Ergebnisse, die aus der Applikation von Proteinarrays dieses Expressionssubsets generiert wurden.

3.1.1 Erstellung der cDNA Expressionsbibliothek

Die Expressionsbibliothek wurde aus cDNA von murinen TH1-Zellen generiert. In Abb. 10 sind die einzelnen Schritte der Durchführung dargestellt. Zunächst wurde cDNA in einen Expressionsvektor ligiert, der die rekombinante Proteinexpression in *E. coli* ermöglicht. Die nach Transformation der DNA in *E. coli* erhaltenen Klone wurden mittels eines Roboters gepickt und in Flüssigmedium überführt und auf Filtermembranen (PVDF) angeordnet. Nach Induktion der Proteinexpression mit IPTG, erfolgte das Screening mit einem gegen den RGSHis₆-Tag der Proteine gerichteten Antikörper. Die so detektierten Expressionsklone wurden zusammengefasst und erneut auf PVDF-Filter gespottet, welche daraufhin für das Screening spezifischer Antikörper und Seren verwendet wurden.

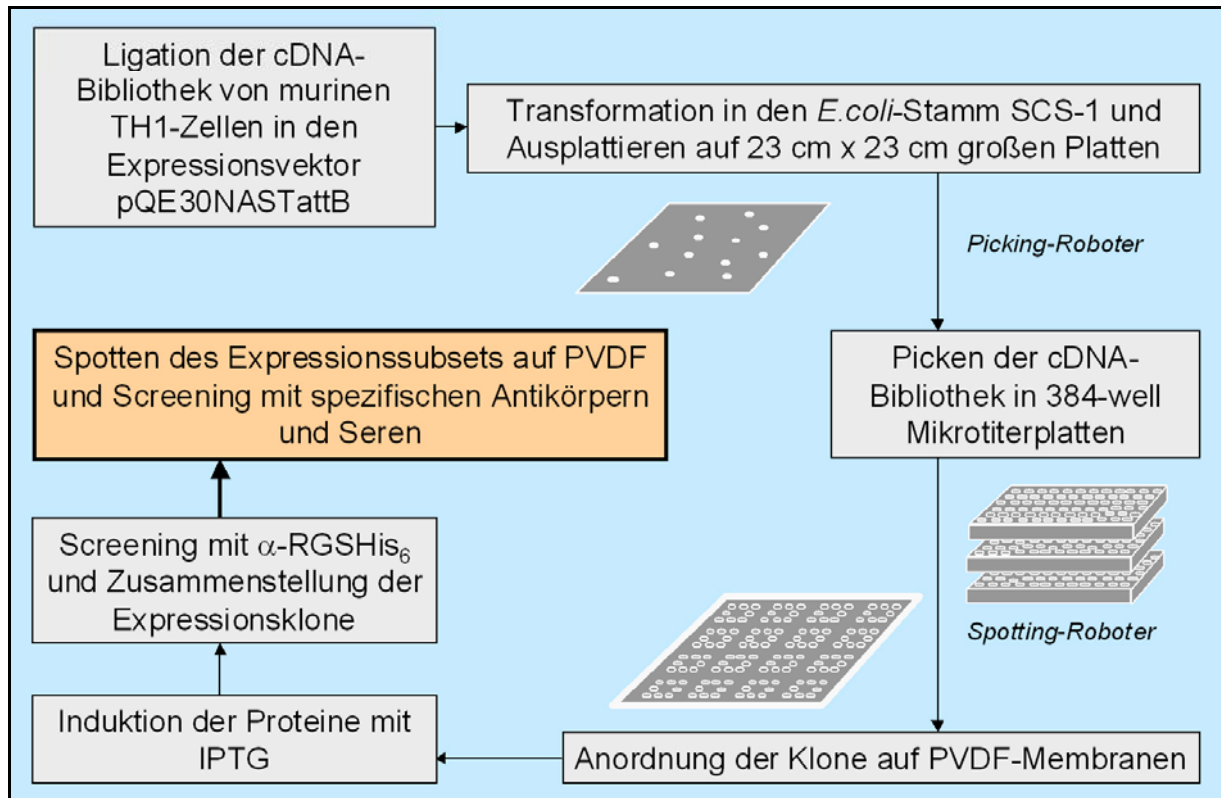


Abb. 10: Schematische Darstellung der Erstellung einer Expressionsbibliothek.

Nach Ligation der cDNA in einen *E. coli* Expressionsvektor und Transformation werden die Klone mittels eines Roboters in Flüssigmedium überführt. Daraufhin erfolgt die Anordnung auf PVDF-Membranen und die Induktion der Proteinexpression mit IPTG. Die potentiellen Expressionsklone werden durch Screening mit einem gegen den RGSHis₆-Tag gerichteten Antikörper ermittelt, zu einem Subset zusammengefasst und auf PVDF-Filter gespottet. Diese finden schließlich für die Hybridisierung mit Antikörpern oder Seren Verwendung.

Für die Erstellung der Bibliothek wurde cDNA aus murinen TH1-Zellen in den *E. coli* Expressionsvektor pQE30NASTattB (vgl. Abb. 11) unter Verwendung der Schnittstellen Sall und NotI kloniert. Bei dem Vektor pQE30NASTattB handelt es sich um ein pQE30-Derivat (Qiagen), in welchem die Gene mit einem N-terminalen RGSHis₆-Tag fusioniert werden.

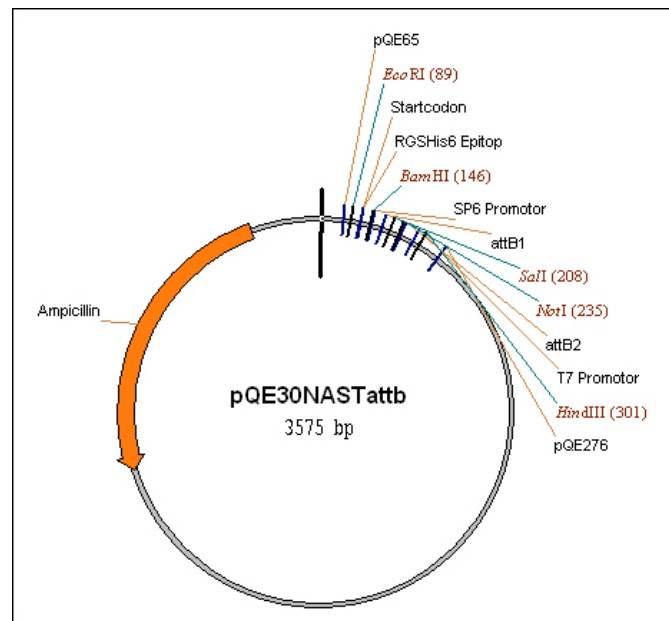


Abb. 11: Vektorkarte des *E. coli* Expressionsvektors pQE30NASTattB.

Der 3575 bp große Vektor besitzt eine Ampicillinresistenz, eine *multiple cloning site* mit den Schnittstellen SalI und NotI, ein RGSHis₆-Epitop und attB-sites.

Zunächst wurde ein Vektorderivat von pQE30NASTattB geschnitten, das zusätzlich ein über SalI/ NotI kloniertes, aus *Arabidopsis thaliana* stammendes Gen trug, welches für Phytochrom B (phyB) kodiert. Bei vollständiger Restriktion mit den Enzymen SalI und NotI erhielt man zwei Fragmente in den Größen 3575 bp (pQE30NASTattB) und 1665 bp (phyB), die auf einem 0,8%igen Agarosegel unterschieden werden konnten (vgl. Abb. 12). Darüber hinaus bietet das Genprodukt des phyB-Gens, unter Verwendung des entsprechenden Antikörpers (anti-phyB Pea 25, generiert von John Hughes, Freie Universität Berlin), die Möglichkeit Religanden zu identifizieren, die auf unvollständige Restriktion zurückzuführen sind. Die Vektor-korrespondierende 3575 bp große Bande wurde aus dem Agarosegel eluiert und für die nachfolgende Ligation mit der vorbereiteten cDNA verwendet.

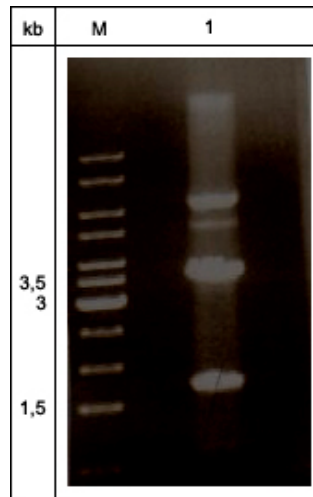


Abb. 12: Restriktion des Vektors pQE30NAStattB-phyB mit den Enzymen Sall und NotI.

Der Restriktionsansatz wurde auf einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Vektor-korrespondierende Bande läuft bei 3575 kb und die Bande des herausgeschnittenen Gens, welches für phyB kodiert bei 1,6 kb. Die Banden, welche über 5 kb laufen, repräsentieren ungeschnittenen Vektor.

Die ligierte cDNA-Bibliothek wurde in den *E. coli* Stamm SCS-1 transformiert, wobei die Transformationseffizienz zwischen $4,2 \times 10^5$ und $1,3 \times 10^6$ KBES/ μg cDNA lag. Zur Kontrolle der Ligation wurde eine Vektor-Religation durchgeführt. Aufgrund der Restriktion des Vektors mit zwei Enzymen, die jeweils einen 3'- bzw. einen 5'-Überhang zur Folge hat, sollte keine Religation zu erwarten sein. Nach Transformation des Religations-Ansatzes wurde jedoch 6% Religation festgestellt. Solche Religanden könnten auf eine Kontamination der Vektorbande mit der Insertbande zurückzuführen sein. Dadurch ist eine Ligation von dem Insert in den Vektor möglich.

Insgesamt wurden 65.000 Transformanden mittels eines Roboters in 384-well Mikrotiterplatten (Plattennummern 1-182) übertragen.

3.1.1.1 DNA-Analyse von 100 Klonen

Für eine erste Charakterisierung der Expressionsbibliothek wurden zunächst 100 Klone zufällig ausgewählt und auf DNA-Ebene analysiert. Die unter Verwendung des BioRobot 8000 (Qiagen) isolierte DNA wurde mit Vektor-spezifischen Primern (pQE65/ pQE276) über PCR amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Abb. 13). Es konnte eine durchschnittliche Größe der Amplifikate von 1,2 kb festgestellt werden, wobei die Größen der einzelnen zwischen 650 bp und 3 kb lagen. Davon musste der vom Vektor stammende Anteil von 211 bp abgezogen werden. Die durchschnittliche Größe der Inserts lag so bei 1 kb.

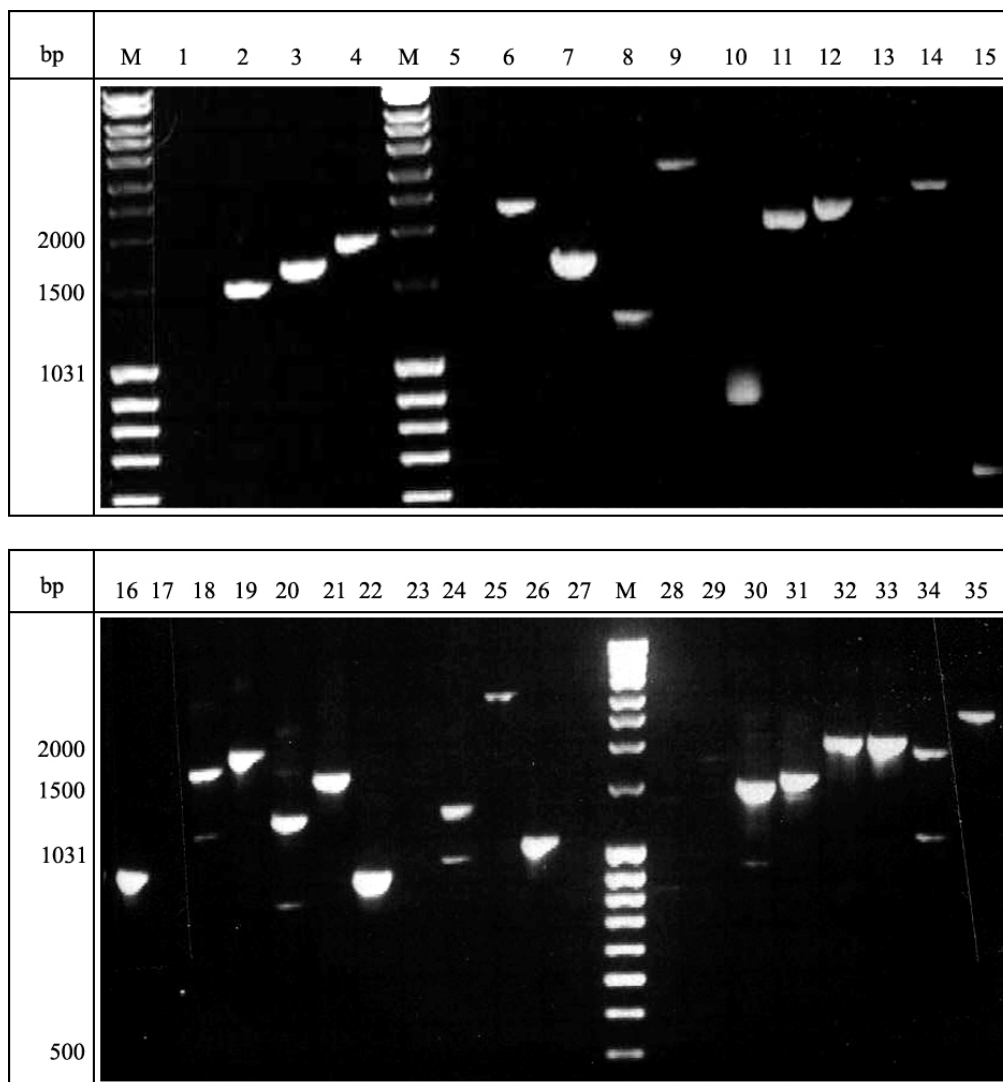


Abb. 13: Elektrophoretische Analyse von PCR-Amplifikaten aus DNA von 35 Klonen der TH1- Expressionsbibliothek.

Die Amplifikate wurden unter der Verwendung der Oligonukleotide pQE65 und pQE276 hergestellt. Ihre Größen variierten zwischen 650 bp und 3 kb, wobei die durchschnittliche Amplifikatgröße bei 1,2 kb lag. Nach Abzug von 211 bp, welche einen vom Vektor stammenden Anteil repräsentieren, ergab sich eine durchschnittliche Größe der Inserts von 1 kb.

Die Klone wurden dann hinsichtlich ihrer Sequenz analysiert. In Tab. 1 sind die Sequenz-ergebnisse nach Vergleich mit der GenBank-Datenbank dargestellt. Dabei wird deutlich, dass die Bibliothek mit Sequenzen angereichert ist, die für T-Zell-typische Proteine kodieren (21%), wie z.B. Interferon-gamma (IFN- γ) (8%), und T-Zell-Rezeptoren (9%). Auch Gene (10%), die für Proteine kodieren, welche dem Immunsystem assoziiert sind, kommen vor. Darunter sind z.B. solche, welche am Entzündungsprozess beteiligt sind, wie „*macrophage inflammation Protein-1 β* “ (MIP-1 β) (4%) und Thymosin (1%). Weiterhin sind Gene zu finden, die für Transkriptionsfaktoren (1%), für Wachstums- und Entwicklungsproteine (4%) und für Proteine, welche mit Proteasomen und Lysosomen assoziiert sind (3%), kodieren. 22% der Gene assoziieren mit ribosomalen Proteinen, 6% mit mitochondrialen Proteine und 15% mit Zellzyklus-, Transport- und Zytoskelettproteinen. 15% der Sequenzen stammen von Genen, die für funktionell uncharakterisierte Proteine kodieren, 2% sind homolog zu humanen Sequenzen und 1% zu Maussequenzen. Unter den 100 Sequenzen sind 71 verschiedene, wobei davon 55% einfach, 12% doppelt und 4% mehrfach vorkommen.

Tab. 1: Sequenzergebnisse von 100 Klonen der TH1-Bibliothek.

Die DNA von 100 Klonen der TH1-Bibliothek wurde sequenziert und mittels des Suchprogrammes BLAST (Altschul, 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) bekannten gegen die Datenbank GenBank verglichen. In der Bibliothek sind Gene angereichert, deren Expressionsprodukte typisch für T-Zellen sind (IFN- γ , T-Zell-Rezeptoren, etc.). 10% der Gene kodieren für Proteine, welche mit dem Immunsystem assoziiert sind. Auch Gene, die für Transkriptionsfaktoren (1%), für Wachstums- und Entwicklungsproteine (4%) und für Proteine, welche mit Proteasomen und Lysosomen assoziiert sind (3%), kodieren, sind zu finden. 22% der Gene assoziieren mit ribosomalen Proteinen, 6% mit mitochondrialen Proteine und 15% mit Zellzyklus-, Transport- und Zytoskelettproteinen. Etwa 15% der Sequenzen sind mit uncharakterisierten oder unbekannt Proteinen assoziiert. 2% sind homolog zu humanen Sequenzen und 1% zu Maussequenzen.

Sequenzergebnisse	Anzahl	Accession-Nr.
T-Zell-assoziierte Proteine		
interferon gamma (MuIFN-gamma)	8	M28621
T-cell receptor beta chain	4	AJ000158
basic transcription factor 3 (STAT 3)	2	BC008233
rearranged T-cell antigen receptor beta chain V8 region	2	M19404
TCR beta locus from bases 501860 to 700960 (section 3 of 3) of the complete sequence	1	AE000665/ AE000522
T-cell receptor alpha chain A413s3	2	U07877
rearranged lck gene encoding lymphocyte-specific protein	1	BC011474
strain C57BL/6 chemokine receptor CXCR6	1	AF301018
Zellen des Immunsystems assoziierte Proteine		
retinoic acid-inducible E3 protein	2	U29539
beta-2 microglobulin (B2m)	1	NM_009735
secretory granule proteoglycan core protein	1	J04549
major histocompatibility complex region containing the Q region of	1	AF111103

Sequenzergebnisse	Anzahl	Accession-Nr.
Zellen des Immunsystems assoziierte Proteine		
macrophage inflammatory protein (MIP)	4	X12531/ M19382
thymosin, beta 4, X chromosome	1	BC018286
Transkriptionsfaktoren		
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100	1	NM_019408
Wachstum und Entwicklung		
activity-dependent neuroprotective protein (Adnp)	1	NM_009628
platelet derived growth factor, B polypeptide (Pdgfb)	1	NM_011057
stromal cell derived factor 4	1	BC005715
multiple exotoses 2 protein (EXT2)	1	U72141.1
Proteasomen/ Lysosomen		
lysosomal-associated protein transmembrane 4A (Laptm4a)	1	NM_008640
proteasome subunit, alpha type 5	1	BC010709
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal (vacular proton pump)16 kDa	1	NM_009729
Zytoskelett-, Zellzyklus- und Transportproteine/ Enzyme		
chaperonin subunit 6a (zeta) (Cct6a)	1	NM_009838
chaperonin subunit 8 (theta)	1	BC009007
core 1 UDP-galactose:N-acetylgalactosamine-alpha-R beta 1,3-galactosyltransferase	1	NM_052993
PDZ-RGS3 protein mRNA	1	AF350047
prenylated SNARE protein	1	BC006760
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 8 (Ptpn8) mRNA.	1	NM_008979
tetratricopeptide repeat domain 1, clone MGC:7871	1	NM_133795
SH3-domain kinase binding protein 1 (Sh3kbp1)	1	NM_021389
Rab GDP dissociation inhibitor alpha	1	AF251042
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation proteinmus	1	NM_009536
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine acetylgalactosamineyltransferase (Galgt 1)	1	NM_008080
calcium-binding protein Cab45a	1	BC005715
caspase 1	1	BC008152
gly96	1	X67644
V17HG gene	1	AJ006836
ribosomale Proteine		
ribosomal protein L13	2	NM_016738
ribosomal protein L17	2	BC003896
11days embryo-ribosomal protein s15	2	AK012618.1
pyruvat kinase 3	2	BC016619
acidic ribosomal phosphoprotein PO (Arbp)	2	BC003833
ribosomal protein S6	1	NM_009096
ribosomal protein S3	1	BC010721

Sequenzergebnisse	Anzahl	Accession-Nr.
ribosomale Proteine		
heterogenous nuclear ribonucleoprotein D-like	1	NM_016690
eukaryotic translations initiations factor 3 p42 subunit	1	AF108214
ribosomal protein L12	1	BC018321
eukaryotic translations initiations factor 1 (alpha 1)	2	BC018223
ribosomal protein L5, clone 2811648	1	BC005790
60s ribosomal protein A52 mRNA	1	U28917
ribosomal protein S4	1	BC009100
eukaryotic translation elongation factor 1 delta nucleotide exchange protein (Eef1d)	1	NM_023240.1
ribosomal protein S12, mRNA (cDNA clone MGC:6234 IMAGE:3489757), complete cds	1	BC002079
funktionell uncharakterisierte Proteine		
RIKEN cDNA 943008	2	NM_026565
hypothetical protein FLJ12949 (FLJ12949), mRNA.	2	NM_145416
mus musculus, clone 19264	2	BC002079.1
RIKEN cDNA1110003A02 gene	1	NM_025380
mRNA from 18 days embryo	1	AK004041
clone MGC:7002 (hypothetical Protein)	1	AK044394
ES cells cDNA, RIKEN full-length enriched library clone	1	AK010314
ES cells cDNA, RIKEN full-length enriched library	1	AK010734
RIKEN cDNA	1	BC003459
pescadillo homolog 1, containing BRCT domain (zebrafish) clone MGC:18823	1	BC011142
adult male thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library clone 5830400A04	1	AK017885
DNA sequence from clone RP23-467J12 on chromosome 11	1	AL604063
Homologe		
similar to transducin (beta)-like 3	1	BC004624
similar to putative (H. sapiens) (LOC135861), mRNA.	1	XM_059808
homo sapiens SeC-like	1	NM_018261
mitochondriale DNA		
mitochondrial DNA, genomic DNA	5	AB42432
similar to ATP synthase 6, mitochondrial	1	BC008260

Durch die Verwendung des Expressionsvektors pQE30NASTattB exprimieren Klone, in denen die rekombinante cDNA und die Sequenz für das RGSHis₆-Epitop im gleichen Leserahmen vorliegen, die Proteine als Fusionsproteine mit einem N-terminalen RGSHis₆-Tag. Für die Identifizierung dieser Klone wurden die gepickten Kolonien der Ausgangsbibliothek mittels eines Roboters auf proteinbindenden PVDF-Membranen in Duplikaten gespottet. Durch die Verwendung eines 5 x 5-Patterns konnten 27.648 unterschiedliche Klone pro Membran

(22,2 cm x 22,2 cm) angeordnet werden. Insgesamt wurden für die 65.000 Klone 2,5 Membranen angefertigt. Diese übertragenen Klone wurden über Nacht auf den Membranen durch Inkubation auf Vollmedium angezogen, worauf die Induktion der Proteinexpression durch IPTG erfolgte. Durch Lyse der Bakterien wurden die Proteine freigesetzt. Aus den stark Protein-bindenden Eigenschaften der PVDF-Membran resultierte eine Immobilisierung der Proteine. Nach Screening der erstellten Proteinfiler mit einem gegen den RGSHis₆-Tag gerichteten Antikörper (anti-RGSHis₆, Qiagen) (vgl. Abb. 14), erfolgte die Auswertung der gescreenten Filter mit der Software „*Visual Grid*“. Als Bezugspunkte für die Auswertung dienten die gespotteten Tintenpunkte. Durch Anordnung der Klone in Duplikaten wurden bei der Auswertung nur Doppelspots als positiv gewertet. Diese müssen an zwei bestimmten, durch das Pattern vorgegebenen, Positionen leuchten.

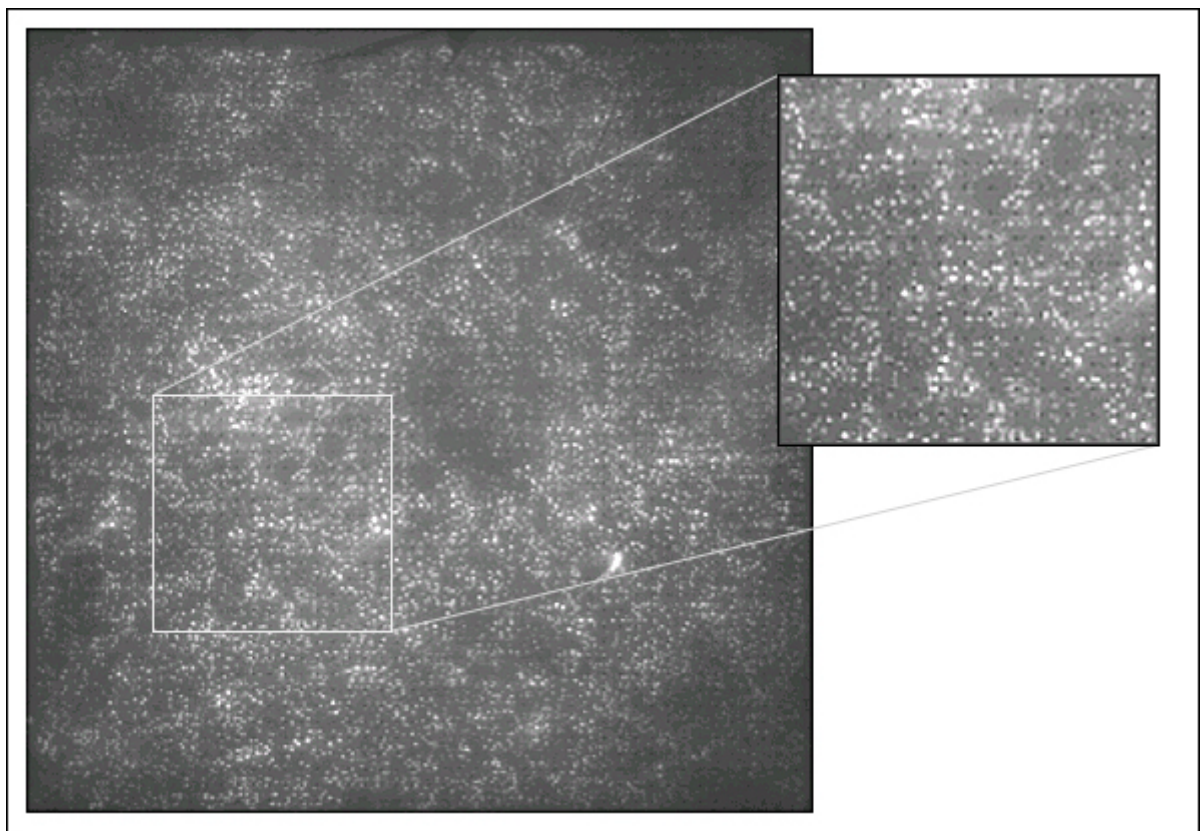


Abb. 14: Proteinfiler mit 27.648 Klonen der cDNA Expressionsbibliothek aus murinen T-Helferzellen Typ 1. Die Klone wurden auf die proteinbindende PVDF-Membran in Duplikaten gespottet. Dabei erfolgte die Anordnung in einem 5 x 5 Pattern. Nach Wachstum und Proteininduktion erfolgte die Lyse der Kolonien. Der Filter mit den denaturierten Proteinen wurde mit einem gegen den RGSHis₆-Tag gerichteten Antikörper gescreent. Es konnten 12.100 Expressionsklone detektiert werden. Dabei wurden nur Doppelspots in einer durch das Pattern vorgegebenen Position als positiv gewertet. Als Bezugspunkt für die Auswertung dienten die zentralen Tintenpunkte.

Es konnten 12.100 Expressionsklone identifiziert werden. Dieses entspricht einem Anteil von 18,6% aller Klone. Die Hybridisierung mit dem gegen den RGSHis₆-Tag gerichteten Antikörper wurde in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt und zeigte eine 80%ige Übereinstimmung.

Wie beschrieben wurde die cDNA-Bibliothek in einen Vektor ligiert, aus dem durch die Restriktion mit Sall/ NotI das pflanzliche Gen, welches für Phytochrom B kodiert, herausgeschnitten wurde. Da das Gen im Leserahmen kloniert wurde, exprimierten Religanden bei Induktion das Protein Phytochrom B. Um diese Klone unter den T-Zell Klonen zu identifizieren, wurden die erstellten Proteinfiler mit einem Antikörper gescreent, der gegen Phytochrom B gerichtet war. Unter den 12.100 Expressionsklonen wurden 850 (7%) Klone detektiert, die Phytochrom B exprimierten. Diese Klone wurden bei der Erstellung des Expressionssubsets nicht berücksichtigt.

3.1.2 Charakterisierung der Expressionsbibliothek

3.1.2.1 Erstellung des Expressionssubsets

11.250 potentielle Expressionsklone (17,3% der Originalbibliothek), die beim Screening mit dem RGSHis₆-Antikörper detektiert werden konnten, wurden (nach Abzug der durch den Phytochrom B-Antikörper detektierten Klone) mit Hilfe eines Roboters in eine neue Subbibliothek rearrayed (Plattenummern 200-229), die im Folgenden als Expressionssubset bezeichnet wird.

Die DNA von 100 zufällig ausgewählten Klonen (Platte 219 Quadrant A1 und B1) dieses Expressionssubsets wurde sequenziert und die Sequenzen mit bekannten in GenBank verglichen. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt: 88% der Klone tragen Gene, die für Proteine kodieren, deren Funktion charakterisiert ist. Darunter sind T-Zell-assoziierte Proteine (14%), wie z.B. IFN- γ (1%), T-Zell-Rezeptor- β -Locus (1%) und CD6 (2%). 9% der Gene kodieren für Proteine, die mit dem Immunsystem assoziiert sind, wie Gene des „*major histocompatibility complex*“ (MHC) (4%), MIP1- β (1%) und IL-1-Rezeptor (1%). Neben den Genen, die unter anderem für Zytoskelett, Zellzyklus und Transport kodieren (45%), sind auch 13% ribosomale Proteine und 2% Transkriptionsfaktoren zu finden. 12% kodieren für funktionell uncharakterisierte Proteine und 3% sind homologen Sequenzen anderer Organismen zugeordnet.

Unter den 100 Sequenzen sind 81 verschiedene, von denen 11 doppelt und eine dreifach auftreten.

Tab. 2: Sequenzanalyse der DNA von 100 Klonen aus dem Subset potentieller Expressionsklone.

88% der Gene kodieren für funktionell charakterisierte Proteine, unter denen z.B. T-Zell-assoziierte Proteine, wie IFN- γ und CD6, zu finden sind. 9% der Gene kodieren für Proteine, die mit dem Immunsystem assoziiert sind. 45% der Gene kodieren für Proteine, die unter anderem am Zellzyklus und Zytoskelett beteiligt sind. Weiterhin sind 2% Gene für Transkriptionsfaktoren unter den Sequenzen zu finden. 13% assoziieren mit ribosomalen Proteinen. 12% der Gene kodieren für funktionell uncharakterisierte Proteine. 3% der Gene stimmen mit homologen anderer Organismen überein.

Sequenzergebnisse	Anzahl	Accession-Nr.
T-Zell-assoziiert Proteine		
CD6 antigen (Cd6)	2	NM_009852
cytokine inducible kinase (Cnk)	1	BC031180
interferon gamma	1	XM_125899
lymphocyte protein tyrosine kinase (Lck)	1	XM_204039
Kruppel-like protein Klf6	1	AY027436
notch 1 protein mRNA	1	AF508809
Mouse secretory granule proteoglycan core protein, complete cds	1	J04549
TCR beta locus from bases 1 to 250611 (section 1 of 3) of the complete sequence	1	AE000663 AE000522
signal transducer and activator of transcription 6 (STAT 6)	1	NM_009284
Y box protein 1	1	U33197
integrin alpha V	1	NM_008402
nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor	2	BC021938
Zellen des Immunsystems assoziierte Proteine		
major histocompatibility complex region containing the Q region of class I	2	AF111103
MHC class I H2-L-d glycoprotein	1	M33151
high mobility group AT-hook 1 (Hmga1)	1	BC008125
macrophage inflammatory protein 1-beta	1	M35590
histocompatibility 2, Q region locus 5 (H2-Q5), mRNA	1	NM_010393
X-box binding protein 1	1	BC029197
V kappa 8-16 gene	1	Y15977
interleukin 1 receptor, type II (Il1r2)	1	NM_010555
Transkriptionsfaktoren		
Mad protein (mad) mRNA, complete cds	1	U20614
transcription factor LRG-21	1	U19118
Proteasomen		
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 4 (Psm4)	2	XM_131064
Zytoskelett-/ Zellzyklus-/ Transportproteine		
actin beta, cytoplasmic (Actb)	1	NM_007393

Sequenzergebnisse	Anzahl	Accession-Nr.
Zytoskelett-/ Zellzyklus-/ Transportproteine		
actin related protein 2/3 complex subunit 1B	1	NM_023142
ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 1 (Arfgap1)	1	NM_145760
apoptosis inhibitor 5 (Api5)	1	BC007133
BIT, exon 2	1	AB024501
cation-dependent mannose-6-phosphate receptor	1	BC046956
cellular nucleic acid binding protein (Cnbp)	1	NM_013493
chaperonin subunit 2 (beta)	2	BC026918
DEAD (aspartate-glutamate-alanine-aspartate) box polypeptide 5 (Ddx5)	3	NM_007840
Dr1 associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha) (Drap1)	1	NM_024176
dual specificity phosphatase 2 (Dusp2)	2	BC048696
dynein-associated protein RKM23	1	BC029172
EH-domain containing 1 (Ehd1)	1	BC037094
enolase 1	1	BC024644
ethanol induced 6 (Etoh6)	1	BC042717
ferritin heavy chain	1	BC012314
guanine nucleotide binding protein, alpha 13	1	NM_010303
heat shock cognate protein 70	1	BC006722
hepatoma-derived growth factor, related protein 2 (Hdgfrp2)	1	NM_008233
hnRNP-associated with lethal yellow (Raly)	1	BC004851
homeodomain interacting protein kinase 1 (Hipk1)	1	AF170304
makorin, ring finger protein, 1 (Mkrn1)	1	BC003329
MAP kinase-activated protein kinase 2	1	XM_203771
mDj4, DnaJ (Hsp40) homolog	1	AB028854
nucleophosmin 1	2	NM_008722
osteopontin precursor	1	J04806 X14882
peptidylprolyl isomerase A (Ppia), mRNA.	1	NM_011992
phosphoglycerate kinase (Pgk1-ps2) processed pseudogene.	1	M23962
phosphoinositide 3 kinase P110delta (Pik3cd) gene	1	AF532989
proviral integration site 1 (Pim1)	1	BC053019
Rab19	1	XM_133061
RAD23b homolog	1	BC027747
reticulocalbin 2	1	NM_011992
reticuloendotheliosis viral oncogene	1	BC019765
SH2 domain containing 3C (Sh2d3c), mRNA	1	AF168364
SIG-92 mRNA	1	X81443
spermidine synthase	1	BC005566
thioredoxin-like 2 (Txnl2)	1	NM_023140
Thy-1.2 glycoprotein gene	1	M12379
tumor protein, translationally-controlled 1 (Tpt1)	1	NM_009429
ribosomale Proteine		
ribosomal protein L6	1	NM_011290
ribosomal protein S16	2	XM_289707
ribosomal protein L3	1	BC009655
ribosomal protein L7	2	BC025909
28S ribosomal RNA	1	X00525
eukaryotic translation initiation factor 4A1 (Eif4a1), mRNA	1	NM_144958
ribosomal protein 10 (Rpl10)	1	NM_052835

Sequenzergebnisse	Anzahl	Accession-Nr.
ribosomale Proteine		
ribosomal protein L8 (Rpl8), mRNA	1	NM_012053
ribosomal protein S13 (Rps13)	1	NM_026533
ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	1	BC054413
glutamyl-prolyl-tRNA synthetase (Eprs), mRNA.	1	XM_129647
funktionell uncharakterisierte Proteine		
adult female placenta cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:1600028A20 product:splicing factor, arginine/serine-rich 5 (SRp40, HRS)	2	AK005552
DNA sequence from clone RP23-112C19 on chromosome 11	1	AL606480
Mus musculus, clone MGC:11769 IMAGE:3486626	1	BC005710
RIKEN cDNA 3110001N18 gene, clone MGC:35646 IMAGE:5030430, mRNA	1	BC026533
chromosome 4 clone rp22-298k22 strain 129S6/SvEvTac	2	AC118466
adult male cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:1500003H20:homolog to MYOSIN REGULATORY LIGHT CHAIN, full insert sequence	1	AK005133
RIKEN cDNA 1110004G24 gene, clone MGC:28551 IMAGE:4206019	1	XM_181420
RIKEN cDNA 2610315E15 gene (2610315E15Rik)	1	NM_145968
RIKEN cDNA 1110004G24 gene, clone MGC:28551 IMAGE:4206019	1	XM_181420
RIKEN cDNA 3110001N18 gene, clone MGC:35646 5030430	1	BC026533
Homologe		
similar to eukaryotic initiation factor 5	1	BC039275
Similar to small protein effector 1 of Cdc42, clone MGC:36221	1	NM_172395
similar to C3G protein, clone IMAGE:4238904	1	BC034081

Die Sequenzen wurden daraufhin mittels des Programms „*Vector NTI*“ auf ihren Leserahmen überprüft. Dabei wurde festgestellt, dass 54% der Sequenzen im gleichen Leserahmen wie der RGSHis₆-Tag vorliegen.

Parallel dazu wurden diese Klone hinsichtlich ihrer Expression analysiert. Hierfür erfolgte das Wachstum der Klone und die Proteininduktion in 96-well Mikrotiterplatten in 1 ml Kultur. Die Proteine wurden mittels NiNTA Agarose über 96-well Filterplatten aufgereinigt und die Eluate durch Western-Blot auf PVDF-Membran übertragen. Die Analyse erfolgte durch Screening mit einem Antikörper gegen den RGSHis₆-Tag (vgl. Abb. 15).

Von 48 aufgetragenen Proteinen konnten mittels des RGSHis₆-Antikörpers 31 detektiert werden. Dieses entspricht einem Anteil von 64%. Die Größe der Proteine variierte dabei zwischen 6 kDa und 80 kDa.



Abb. 15: Western-Blot-Analyse von 48 aufgereinigten Proteinen aus dem Expressionssubset der TH1-Bibliothek.

Die Proteine wurden auf einer 12,5%igen SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend durch Western-Blot auf PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mit einem gegen den RGSHis₆-Tag gerichteten Antikörper (Qiagen), einem mit Alkalischer Phosphatase gekoppeltem Antikörper gegen Maus-IgG und dem Substrat b-cip (Sigma). 64% der Proteine (31) wurden vom Antikörper erkannt. Die Größe variierte zwischen 6 kDa und 80 kDa.

3.1.2.2 Antikörperscreening des Expressionssubsets

Zur weiteren Bestimmung der Qualität der Bibliothek bezüglich beispielsweise Redundanz oder Repräsentation von schwach exprimierten Proteinen und daher in kleiner Kopiezahl vorliegenden Genen, wurden verschiedene Antikörper gegen Proteine im Expressionssubset getestet. Hierfür wurden Proteinfilter dieses Subsets erstellt. Durch die Möglichkeit, 27.648 Klone unter Verwendung des oben beschriebenen 5 x 5 Patterns auf eine Membran zu spotten, konnte das potentielle Expressionssubset der TH1-Bibliothek mit 11.250 Klonen zweimal auf eine 22,2 cm x 22,2 cm große Membran in Duplikaten gespottet werden. Die unter denaturierenden Bedingungen prozessierten Proteinfilter wurden sowohl zum Screening spezifischer Antikörper als auch wie unter Punkt 3.3 beschrieben, zum Serumscreening verwendet.

Das Screening der Proteinfilter erfolgte mit Antikörpern, die sich spezifisch gegen T-Zell-Proteine richten, wie beispielsweise IFN- γ , und Interleukin 12-Rezeptor (IL-12-R) sowie das Immunzell assoziierte Protein MIP-1 β . Hierbei wurden die Antikörper so ausgesucht, dass sie die denaturierte Form des Proteins, also lineare Epitope, erkennen sollten (Western-Blot geprüft). Die Auswertung erfolgte mit der Software „Visual Grid“, wobei auch hier nur Doppelspots als positive Signale gewertet wurden.

Bei der Hybridisierung mit dem Antikörper gegen IFN- γ (vgl. Abb. 16) wurden 5 Klone, mit dem Antikörper gegen IL-12-R (vgl. Abb. 17) 18 Klone und mit dem Antikörper gegen MIP-1 β (vgl. Abb. 18) 23 Klone detektiert.

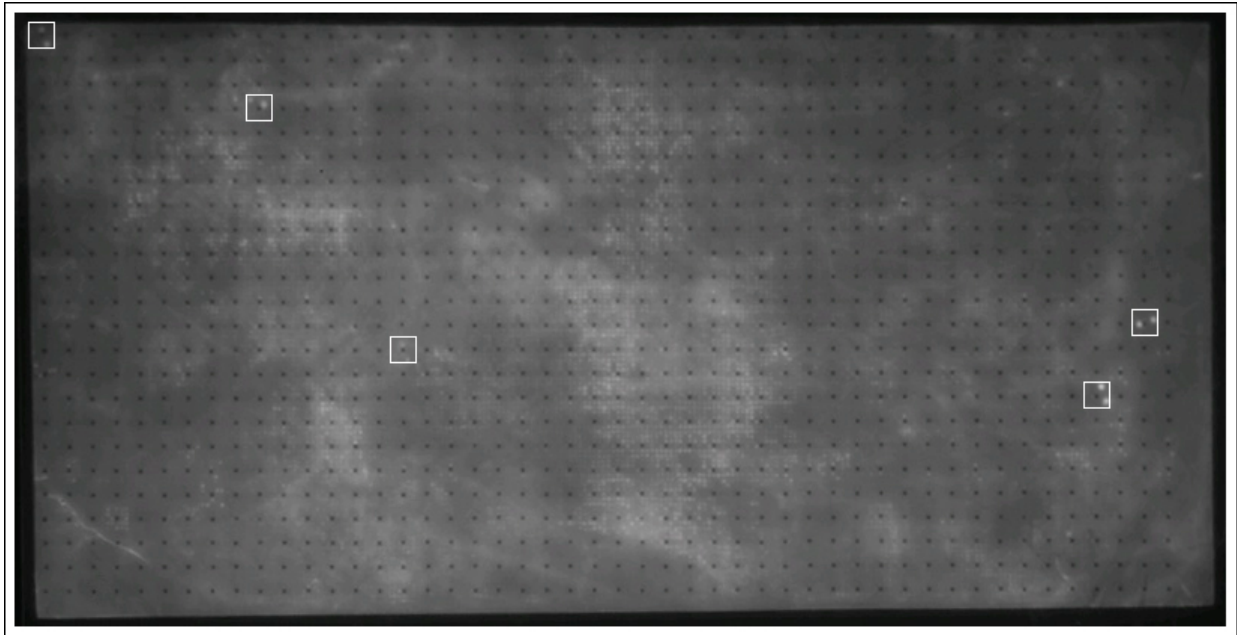


Abb. 16: Proteinfiler des Expressionssubsets der TH1-Bibliothek, der mit einem spezifischen Antikörper gegen IFN- γ gescreent wurde.

Auf dem Filter sind 11.250 Klone in Duplikaten unter Verwendung eines 5 x 5 Patterns angeordnet. Durch Hybridisierung mit anti-IFN- γ und eines mit alkalischer Phosphatase konjugierten zweiten Antikörpers konnten durch Inkubation mit dem Substrat Attophos fünf Klone detektiert werden (Rahmen). Dabei wurden nur die Klone als positiv gewertet, deren Duplikate in einer durch das Pattern vorgegebenen Position leuchteten.

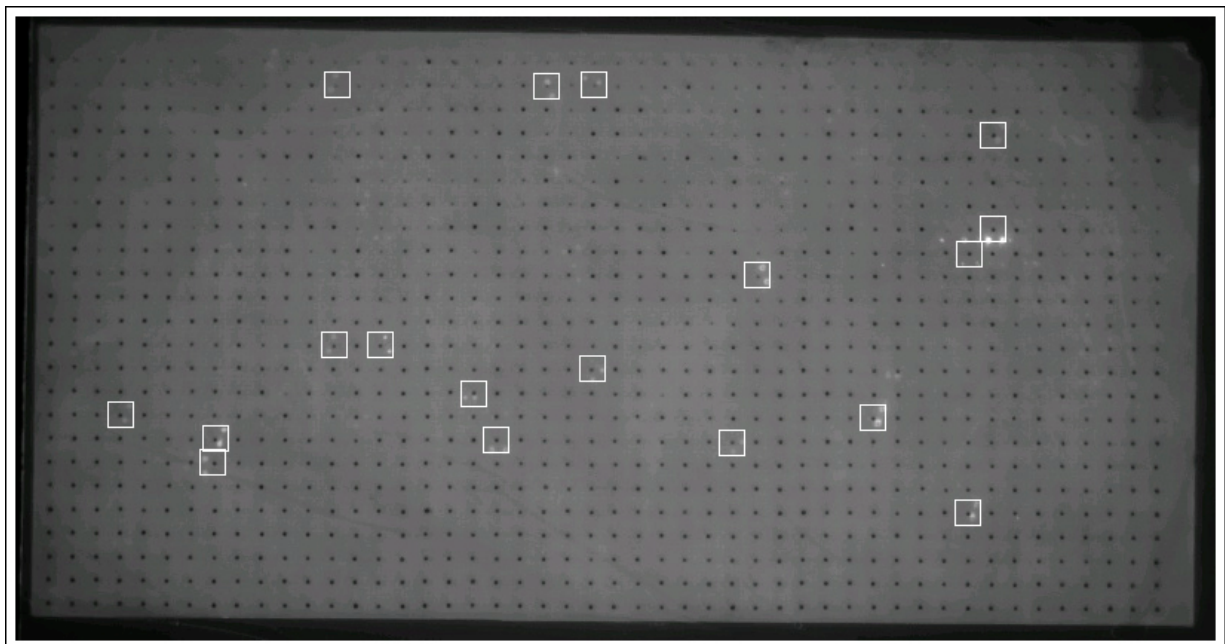


Abb. 17: Proteinfiler des Expressionssubsets der TH1-Bibliothek, der mit einem spezifischen Antikörper gegen IL-12-R gescreent wurde.

Die 11.250 Klone sind in Duplikaten unter Verwendung eines 5 x 5 Pattern angeordnet. Durch Hybridisierung mit anti-IL-12-R und eines mit alkalischer Phosphatase konjugierten Zweitantikörpers konnten nach Inkubation mit dem Substrat Attophos 18 Klone detektiert werden (Rahmen). Es wurden nur die Klone als positiv gewertet, deren Duplikate in einer durch das Pattern vorgegebenen Position leuchteten.

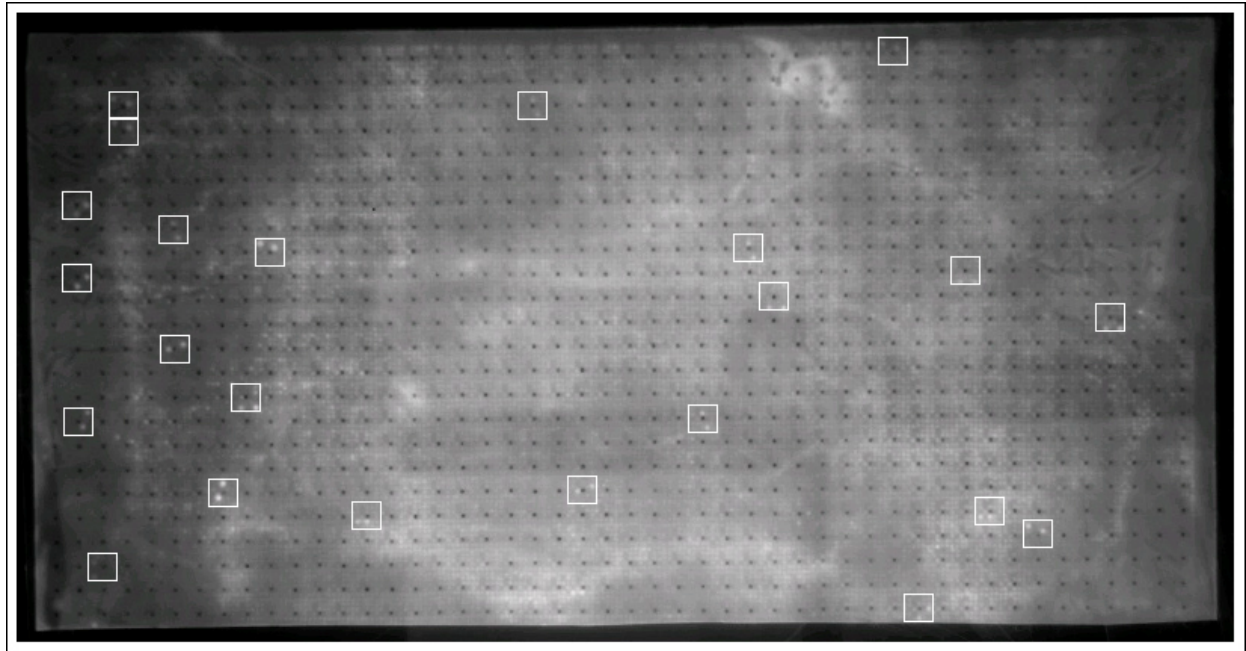


Abb. 18: ProteinfILTER des Expressionssubsets der TH1-Bibliothek, der mit einem spezifischen Antikörper gegen MIP-1 β gescreent wurde.

11.250 Klone wurden in Duplikaten unter Verwendung eines 5 x 5 Patterns auf dem Filter angeordnet. Nach Wachstum der Kolonien erfolgte die Proteininduktion und schließlich die Lyse der Bakterien. Es konnten 23 Klone mittels eines mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörpers und Inkubation mit dem Substrat Attophos detektiert werden (Rahmen). Hierbei wurden nur die Klone als positiv gewertet, deren Duplikate in einer durch das Pattern vorgegebenen Position leuchteten.

Die durch das Antikörperscreening detektierten Klone wurden gepickt und die Sequenzen durch Vergleich mit Sequenzen in der Datenbank GenBank analysiert (vgl. Tab. 3). Die Sequenzanalyse der fünf durch anti-IFN- γ detektierten Klone ergab, dass zwei Klone das Insert für IFN- γ tragen. Weiterhin wurde ein Klon durch diesen Antikörper detektiert, dessen Gen für Galactosidase- β -1 kodiert, einer, der die Sequenz für die Glutathione Peroxidase 4 trägt und einer, dessen Sequenz keine Übereinstimmung mit Sequenzen aus der Datenbank zeigte. Unter den 23 Klonen, die durch den anti-MIP-1 β detektiert wurden, waren 22 Klone, deren DNA mit der Sequenz von MIP1- β übereinstimmt. Außerdem erkannte der anti-MIP1- β einen Klon mit dem Insert, das für eine Phosphoserin Aminotransferase „*Psat-pending*“ kodiert. Der Antikörper gegen den IL-12-Rezeptor erkannte 18 Klone, von denen kein Klon das Insert für diesen Rezeptor trug. Diese Klone kodieren unter anderem für Tubulin- β , für die beta-Kette des IL-2-Rezeptor und für Proteine mit bisher uncharakterisierter Funktion.

Tab. 3: Sequenzergebnisse von potentiellen Expressionsklonen, die durch Screening der Antikörper IFN- γ , IL-12-R und MIP-1 β auf Proteinarrays des Expressionssubsets der TH1-Bibliothek detektiert wurden.

Unter den fünf Klonen, die durch anti-IFN- γ erkannt wurden, tragen zwei die Sequenz für IFN- γ . Keiner der Klone, die von dem Antikörper gegen IL-12-R erkannt wurden, besitzt die Sequenz für IL-12 -R. Unter den 23 Klonen, die durch den anti-MIP-1 β detektiert wurden, waren 22 Klone, deren DNA mit der Sequenz von MIP-1 β übereinstimmt.

Sequenzergebnisse	Anzahl	Accession-Nr.
IFN-γ		
Mus musculus interferon gamma (IFN- γ), mRNA.	2	XM_125899
Mus musculus, galactosidase, beta 1, clone MGC:25403	1	BC028875
Mus musculus glutathione peroxidase 4 (Gpx4)	1	NM_008162
Mouse Ig rearranged kappa-chain mRNA V-region	1	M63550
IL12-R		
Mus musculus ubiquitin-like 1 (sentrin) activating enzyme E1B	1	NM_016682
Mus musculus, tubulin, beta 5, clone MGC:6228 IMAGE:3601177,	4	BC003825
Mus musculus, MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 2	2	BC010256
Mus musculus, FK506 binding protein 4 (59 kDa), clone MGC:6528	1	BC003447
Mus musculus, similar to RIKEN cDNA 2410004N11 gene, clone	1	BC048161
Mus musculus component of oligomeric golgi complex 2 (Cog2)	1	NM_029746
Mus musculus interleukin 2 receptor, beta chain (Il2rb), mRNA.	1	NM_008368
Mus musculus RIKEN cDNA 3930401K13 gene (3930401K13Rik),	1	XM_148577
Mus musculus cytokine-like nuclear factor n-pac (Npac-pending),	1	NM_028720
Mus musculus RIKEN cDNA 6330437E22 gene (6330437E22Rik),	1	XM_132389
Mus musculus metastasis associated 1-like 1 (Mta11), mRNA.	1	NM_011842
Mus musculus RIKEN cDNA 1300018J18 gene (1300018J18Rik)	1	XM_128007
Mouse mRNA for cellular thyroid hormone binding protein p55.	1	X06453
Mus musculus, similar to polypyrimidine tract binding protein	1	BC007472
MIP1-β		
Mouse macrophage inflammatory protein 1-beta (MIP1- β)	22	M35590
Mus musculus phosphoserine aminotransferase (Psat-pending)	1	BC004827

Zur Bestätigung der Antikörperbindung an die Proteine erfolgte die Analyse mittels Western-Blot. Hierzu wurden die über NiNTA-Agarose aufgereinigten Proteine auf einer SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Anschließend fand eine Hybridisierung der Membranen mit den jeweiligen Antikörpern statt.

Durch Hybridisierung des Western-Blots mit dem Antikörper gegen Interferon- γ (vgl. Abb. 19) konnten in den Spuren eins und vier etwa 20 kDa große Proteine detektiert werden, deren DNA-Sequenzen für IFN- γ kodieren. In der Spur zwei wurde eine Bindung an ein etwa 15 kDa großes und in Spur drei an ein etwa 6 kDa großes Expressionsprodukt nachgewiesen werden. In Spur zwei ist das Protein aufgetragen, dessen DNA-Sequenz für eine murine Galaktosidase beta 1 kodiert. Die Sequenz des Proteins in Spur drei kodiert für eine Glutathion Peroxidase (Gpx 4). Die Proteingrößen stimmen mit den Sequenzdaten überein.

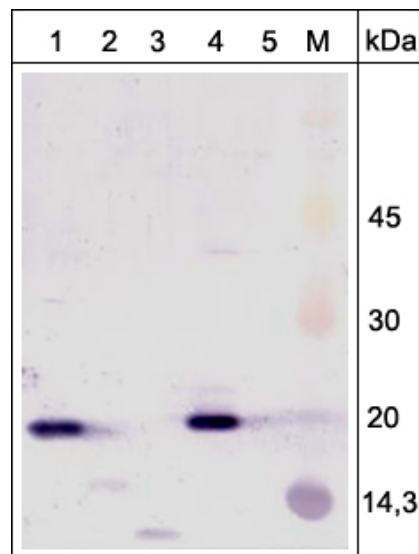


Abb. 19: Western-Blot von Proteinen, die beim Antikörperscreening mit anti-IFN- γ detektiert wurden.

Die aufgereinigten Proteine wurden in den Spuren eins bis fünf auf einem 12,5%igen SDS-Gel gelelektrophoretisch in folgender Reihenfolge aufgetrennt: In den Spuren 1 und 4 sind Proteine aufgetragen, deren Sequenzen mit der von IFN- γ übereinstimmen. In Spur 2 wurde das Protein aufgetragen, dessen Sequenz für die Galactosidase beta 1 und in Spur 3 das Protein, dessen Sequenz für eine Glutathione Peroxidase kodiert. Die Sequenz des Proteins in Spur 5 kodiert für *eine* κ -Kette eines IgG. Nach Transfer mittels Western-Blot auf PVDF-Membran erfolgte eine Hybridisierung mit dem gegen IFN- γ gerichteten Antikörper. Es wurde ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Zweitantikörper eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit dem Substrat BCIP/NBT.

Beim Hybridisieren des Western-Blots mit dem Antikörper gegen IL-12-R konnte bei 10 von 18 Proteinen eine Antikörperbindung nachgewiesen werden (vgl. Abb. 20). In Spur 1 ist ein Protein aufgetragen, dessen Sequenz für ein Ubiquitin-ähnliches Aktivierungsenzym kodiert, und an welches der Antikörper bindet. Die Sequenzen der Proteine in den Spuren 2, 4, 5 und 15 stimmen mit der von Tubulin beta und die in den Spuren 3 und 18 mit der einer MAP Kinase (interagierende Serine-/ Threonine-Kinase 2) überein. Der Antikörper erkannte nur die Proteine in den Spuren 2, 3 und 18. In Spur 6 ist ein Protein aufgetragen, dessen Sequenz mit der eines FK506 Bindeproteins übereinstimmt, und welches vom Antikörper erkannt wurde. Die Sequenzen der Proteine in den Spuren 7 und 17 kodieren für homologe Proteine und die in den

Spuren 10, 11, 13 und 14 für Proteine mit unbekannter Funktion. Hierfür konnte in den Spuren 7, 11 und 14 eine Bindung des Antikörpers detektiert werden. Spur 8 enthält ein Protein mit der Sequenz für eine Komponente des Golgi-Apparates, Spur 9 für die beta-Kette des IL-2-Rezeptors, Spur 12 für ein „*metastasis associated 1-like 1*“-Protein und Spur 16 für ein zelluläres Thyroid-Hormon Bindeprotein p55. Das Protein in Spur 9 wurde vom Antikörper erkannt.

Basierend auf diesen Ergebnissen deutet sich eine höhere Unspezifität bzw. Crossreaktivität des Antikörpers unter den getesteten Bedingungen ab.

Eine Kontrolle der Leserahmen ergab, dass die Proteine, welche auf dem Blot durch den Antikörper gegen IL-12-R nicht detektiert worden sind, in einem anderen Leserahmen als der RGSHis₆-Tag vorliegen. Die Größen der detektierten Proteine korrelieren mit den Sequenzdaten.

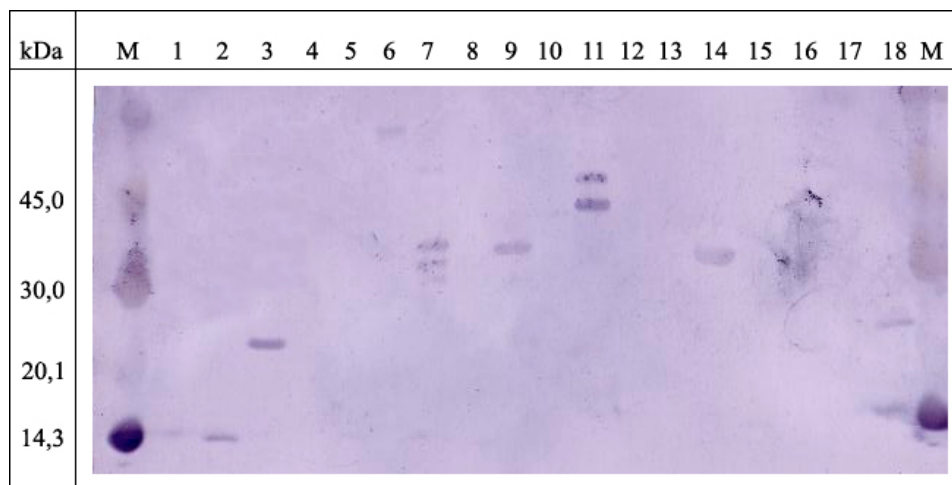


Abb. 20: Western-Blot von Proteinen, die beim Antikörperscreening mit anti-IL-12-R detektiert wurden.

Die Klone, welche beim Screening mit dem Antikörper gegen IL-12-R auf Proteinfiltren der TH1-Bibliothek detektiert worden sind, wurden zur Proteinexpression induziert. Die mittels NiNTA aufgereinigten Proteine wurden auf einer 12,5%igen SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt. Ihre Sequenzen kodieren für folgende Proteine: Spur 1: Ubiquitin-ähnliches Aktivierungsenzym; Spuren 2, 4, 5, 15: Tubulin beta; Spuren 3 und 18: MAP Kinase (interagierende Serine-/ Threonine-Kinase 2); Spur 6: FK506 Bindeprotein; Spuren 7 und 17: homologe Proteine; Spuren 10, 11, 13 und 14: unbekannte Funktion; Spur 8: Komponente des Golgi-Apparates; Spur 9: beta-Kette des IL-2-Rezeptors; Spur 12: „*metastasis associated 1-like 1*“-Protein; Spur 16: zelluläres Thyroid-Hormon Bindeprotein p55. Die Proteine wurden mittels Western-Blot auf PVDF-Membran übertragen, welche daraufhin mit dem Antikörper gegen IL-12-R hybridisiert wurde. Die Detektion erfolgte mittels eines Zweitantikörpers, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war und dem Substrat BCIP/NBT.

Der Western-Blot, der mit dem Antikörper gegen MIP-1 β hybridisiert wurde (vgl. Abb. 21), zeigt in 19 von 23 Spuren eine Antikörperbindung. Dabei liegen die Proteingrößen in 18 Spuren bei 15 kDa. In Spur 11 ist das Signal bei etwa 16 kDa zu sehen. In den Spuren eins bis vier und sechs bis 23 sind die Proteine aufgetragen, deren Sequenzen mit der von MIP-1 β übereinstimmen. In Spur fünf ist das Protein aufgetragen, dessen Sequenz für eine Phosphoserin Aminotransferase kodiert. In dieser Spur konnte keine Antikörperbindung nachgewiesen werden. Bei Analyse der Sequenzen wurde festgestellt, dass alle Klon Sequenzen tragen, welche im gleichen Leserahmen wie der RGSHis₆-Tag vorliegen. Die Sequenzen der Proteine, welche in den Spuren zwei und drei aufgetragen sind, enthalten Stopkodone, zeigen aber ein Expressionsprodukt auf dem Western-Blot.

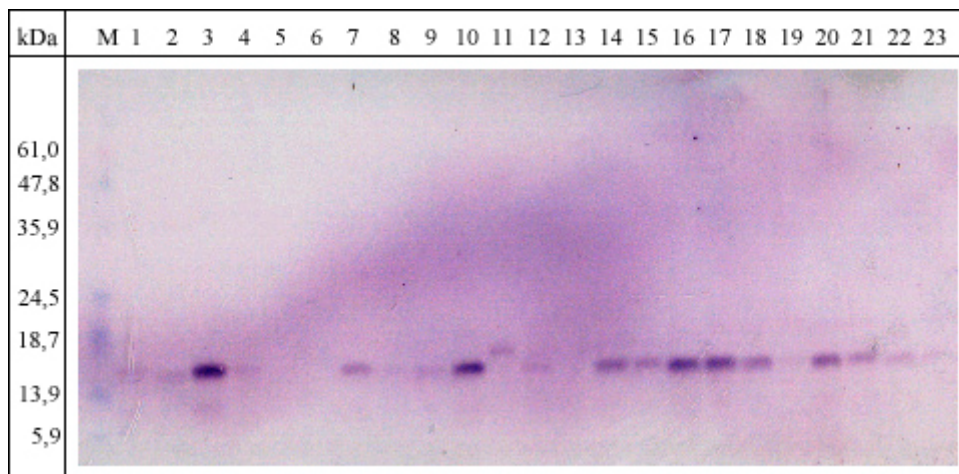


Abb. 21: Western-Blot von Proteinen, die beim Antikörperscreening mit anti-MIP-1 β detektiert wurden.

Die 23 auf dem Proteinfiler detektierten Proteine wurden aufgereinigt und mittels einer 12,5%igen SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt. In den Spuren 1 bis 4 sowie 6 bis 23 wurden die Proteine aufgetragen, deren Sequenz für MIP-1 β kodiert. Die Sequenz des Proteins in Spur 5 stimmt mit der einer Phosphoserin Aminotransferase überein. Die Proteine wurden mittels Western-Blot auf PVDF-Membran übertragen. Die Hybridisierung der Membran erfolgte mit einem Antikörper gegen MIP1- β und einem mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Zweitantikörpers und dem Substrat BCIP/NBT.

3.2 Targetidentifizierung von Proteinen, die für rheumatoide Arthritis spezifisch sind

Im folgenden Abschnitt werden die Daten beschrieben, die durch Screening von humanen Seren auf Proteinarrays der Expressionsbibliothek aus humanem fötalen Hirngewebe (hEX1) generiert worden sind. Die Seren von an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten sowie von Kontrollpatienten wurden zunächst auf PVDF-Membranen hybridisiert und die detektierten Klone zu einem Subset zusammengefasst. Von diesem Subset wurden Proteine exprimiert, aufgereinigt und zur weiteren Validierung auf beschichteten Glaschips gespottet. Diese wurden dann ebenfalls mit den Seren hybridisiert.

3.2.1 Serumscreening auf PVDF-Membranen

Zur Identifizierung von Proteinen, die möglicherweise einen Einfluß auf eine Autoimmunkrankheit haben, wurden Proteinarrays von einer Expressionsbibliothek aus humanem fötalen Hirngewebe (hEX1) mit humanen Seren gescreent. Diese Expressionsbibliothek besteht aus 37.830 Klonen, welche auf den 22,2 cm x 22,2 cm großen Membranen unter Verwendung eines 5 x 5 Pattern in Duplikaten gespottet sind. Bei der Auswertung wurden nur Doppelspots, in der durch das Pattern vorgegebenen Position, als positiv gewertet. Für die Detektion der gebundenen Antikörper aus den Seren wurden ein aus Maus isolierter Antikörper gegen humanes IgG und als sekundärer Antikörper ein aus Ziege gegen Maus-IgG gerichteter sekundärer Antikörper, welcher mit alkalischer Phosphatase konjugiert war, verwendet. Die Detektion erfolgte mit Attophos, das durch die alkalische Phosphatase umgesetzt wird und bei Anregung durch UV-Licht (Detektion bei λ 470 nm) leuchtet (vgl. Abb. 22). Aufgrund der Durchführung eines Screenings mit humanem IgG konnte der durch den Zweitantikörper hervorgerufene Hintergrund ermittelt werden.

Das Screening erfolgte mit Seren von siebzehn Patienten, die an RA erkrankt waren. Da RA eine Autoimmunkrankheit ist, die bis zu fünf mal häufiger Frauen als Männer betrifft, sind unter diesen Patienten 13 Frauen und einem Mann zu finden (Tab. 4). Die Patienten waren bei Blutabnahme 42-74 Jahre alt. Von drei Patienten sind Alter und Geschlecht nicht bekannt. Von neun Probanden, deren Seren als Kontrollen verwendet wurden, litten vier unter Osteoarthritis (OA), vier an Fibromyalgia und einer war gesund. Die Kontrollprobanden waren gleichen Alters

und gleichen Geschlechts wie die Patienten. Durch den Vergleich mit Osteoarthritis Patienten, bzw. Patienten mit Fibromyalgia sollen allgemeine Arthritis-Faktoren ausgeschlossen werden, die nicht auf eine autoimmune Reaktion des Körpers zurückzuführen sind.

Tab. 4: Daten der Patienten, deren Seren auf Proteinfiltren der hEX1-Bibliothek gescreent wurden.

Die Seren der erkrankten 17 Patienten stammen von 13 Frauen und einem Mann. Die Personen waren bei Blutabnahme 42-78 Jahre alt. Von drei Patienten sind Alter und Geschlecht nicht bekannt. Unter den neun Kontrollpatienten sind acht Frauen und ein Mann, die bei Blutabnahme zwischen 43 und 75 Jahre alt waren.

Patienten-Nr.	Geburtsjahr	Geschlecht	Krankheit
40	1944 (2000)	f	RA
42	1950 (2000)	f	RA
61	nicht bekannt	nicht bekannt	RA
2	1928 (2002)	f	RA
4	1944 (2002)	f	RA
7	1927 (2002)	f	RA
8	1932 (2002)	f	RA
13	1924 (2002)	f	RA
22	1951 (2002)	f	RA
23	1960 (2002)	f	RA
24	1931 (2002)	f	RA
25	1957 (2002)	f	RA
26	1940 (2002)	m	RA
31	nicht bekannt	nicht bekannt	RA
36	nicht bekannt	nicht bekannt	RA
37	1942 (2002)	f	RA
39	1944 (2002)	f	RA
Kontrolle 1	1927 (2002)	f	OA
Kontrolle 4	1955 (2002)	f	Fibromyalgia
Kontrolle 5	1933 (2002)	f	OA
Kontrolle 5s	1941 (2002)	m	keine
Kontrolle 7	1940 (2002)	f	Fibromyalgia
Kontrolle 8	1951 (2002)	f	Fibromyalgia
Kontrolle 9	1943 (2002)	f	OA
Kontrolle 11	1950 (2002)	f	OA
Kontrolle 15	1959 (2002)	f	Fibromyalgia

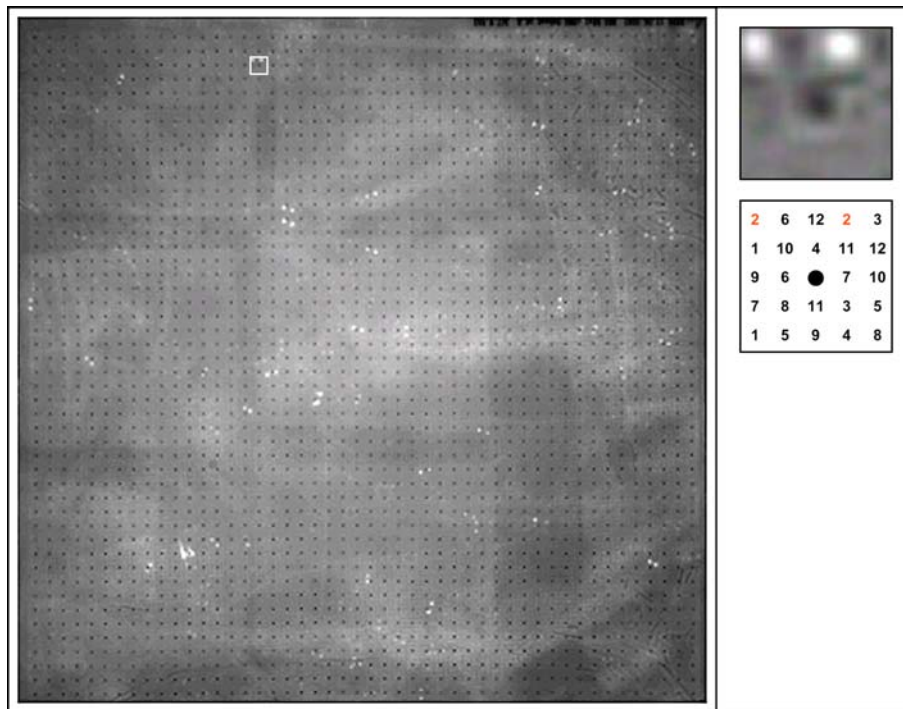


Abb. 22: Proteinfiler der hEX1-Bibliothek, der mit einem Serum eines an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten gescreent wurde.

Das Serum stammt von einer 42 Jahre alten Frau. Die gebundenen Antikörper aus dem Serum wurden mittels eines anti-humanen IgG und eines mit alkalischer Phosphatase konjugierten anti-Maus detektiert. Positive Klone werden jeweils durch Doppelspots in bestimmter Anordnung repräsentiert.

Alle Seren wurden doppelt in zwei unabhängigen Experimenten gescreent, wobei eine Reproduzierbarkeit der Screeningergebnisse von 70-80% ermittelt werden konnte (Abb. 23). In die weitere Auswertung gingen nur die Klone ein, deren Detektion reproduziert werden konnte und welche nicht durch humanes IgG erkannt wurden.

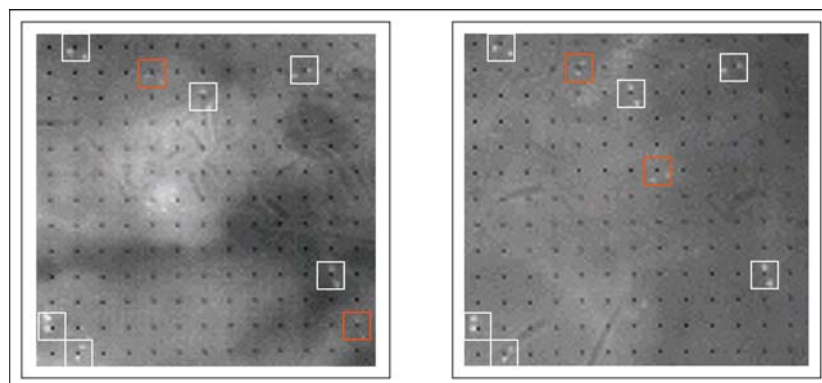


Abb. 23: Gleicher Ausschnitt zweier Proteinfiler der hEX1-Bibliothek, die mit dem gleichen Serum hybridisiert wurden.

Das Serum stammt von einer 70 Jahre alten Frau. Die weißen Rahmen umgeben die Klone, welche auf beiden Filtern erkannt wurden. Die Klone, welche nur auf einem Filter detektiert werden konnten, wurden rot eingerahmt. Diese Reproduktionskontrolle des Screenings dieses Serums ergab 70-80%ige Übereinstimmung.

Im folgenden wurden die Ergebnisse aller Seren untereinander verglichen. Insgesamt sind 424 Klone beim Screening von 29 Seren detektiert worden. Davon wurden Antikörperbindungen gegen 95 Proteine ausschließlich bei Patienten nachgewiesen. Hiervon wurden 80 Proteine bei dem Screening von zwei Patienten, 10 Proteine beim Screening von drei Patienten und fünf beim Screening von vier und mehr Patienten detektiert. 19 Proteine wurden von Antikörpern aus mindestens drei Patienten und einer Kontrolle erkannt.

3.2.2 Analyse der potentiell krankheitsbeteiligten Proteine

Im Anschluß wurde ein Subset aus potentiell krankheitsbeteiligten Proteinen zusammengestellt. Hierfür wurden die Klone aus der Bibliothek in Flüssigmedium gepickt, an die Antikörper von mindestens zwei Patientenseren und höchstens einem Kontrollserum gebunden hatten. Diese 114 Klone wurden hinsichtlich ihrer DNA-Sequenz analysiert.

Für die Proteinexpression der Klone wurden diese in Mikrotiterplatten mit 1 ml Kulturvolumen angezogen und die Proteinexpression mit IPTG induziert. Die Aufreinigung erfolgte über NiNTA-Agarose. Die Expressionsprodukte wurden auf 12,5%igen SDS-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Coomassie angefärbt (Abb. 24) konnten 86% der aufgereinigten Proteine (96) visualisiert werden.

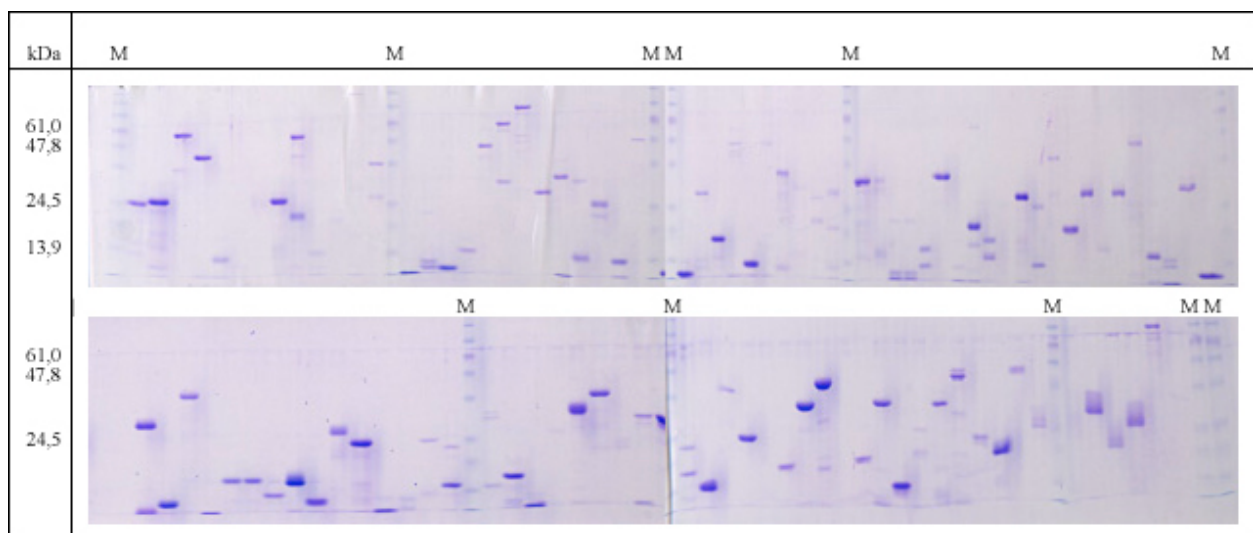


Abb. 24: 12,5%iges SDS-Gel mit 114 Proteinen aus der hEX1-Bibliothek.

Diese Proteine wurden durch das Screening von Seren auf PVDF-Membranen detektiert. Die Aufreinigung erfolgte mittels NiNTA. 86% (96 Klone) der aufgereinigten Proteine konnten mit Coomassie visualisiert werden.

3.2.3 Validierung der ausgewählten Proteine mittels Serumscreening auf beschichteten Glaschips

3.2.3.1 Spotting der Proteine auf Glaschips und Screening mit Seren

Die 114 zu einem Subset zusammengefaßten potentiell krankheitsbeteiligten Proteine, welche beim Screening von Seren auf PVDF-Membranen der hEX1-Bibliothek (vgl. 3.2.2) detektiert werden konnten, wurden auf Nitrozellulose-beschichteten Glaschips (FAST slides) angeordnet. Hierfür wurde jedes Protein in Duplikaten und in den Verdünnungsstufen unverdünnt (1:1), 1:2 und 1:5 gespottet. Zusätzlich wurde ein Antikörper gegen humanes IgG in den Verdünnungsstufen 1:100, 1:500, 1:1000 und 1:2000 gespottet, der als interner Standard dienen sollte. Für die daraus resultierende Anzahl von 692 Proben wurde ein 8 x 8 Pattern ausgewählt (vgl. 2.3.14.1, Abb. 9). Durch die Verwendung eines 16-Pin Gadgets besteht so die Möglichkeit, 1024 Spots in einem Feld anzuordnen. Die Proben wurden so gespottet, dass die Duplikate untereinander und die Verdünnungsstufen nebeneinander angeordnet waren. Auf jeden Chip wurden zwei identische Felder gespottet. Die Detektion erfolgte mit einer Antikörperkaskade bestehend aus einem anti-humanem IgG und einem anti-Maus-Antikörper, der mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Cy5 konjugiert war. Dieser kann durch einen Laser mit 649 nm Wellenlänge angeregt und visualisiert werden. Für den Nachweis der Proteine auf den Slides fand die Inkubation mit einem Antikörper gegen den RGSHis₆-Tag (vgl. Abb. 25) statt.

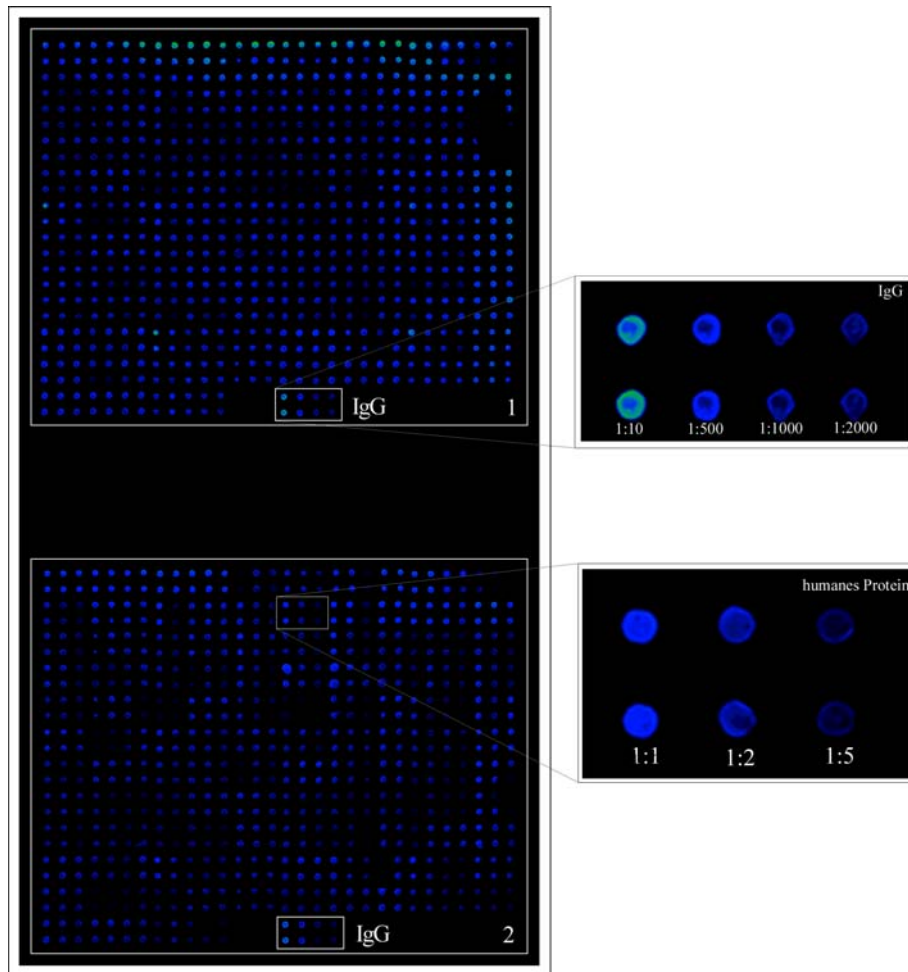


Abb. 25: Glaschip mit 114 humanen Proteinen aus der hEX1-Bibliothek, der mit einem Antikörper gegen RGSHis₆ gescreent wurde.

Der Chip ist mit Nitrozellulose beschichtet. Die Proteine sind in Duplikaten und drei Verdünnungsstufen (1:1, 1:2, 1:5) angeordnet worden. Es wurden zwei identische Felder (1+2) auf den Chip gespottet. 100% der Proteine konnten detektiert werden. Als Kontrolle wurde humanes IgG in vier Verdünnungsstufen (1:10, 1:500, 1:1000, 1:2000) gespottet (Spots im weißen Kasten). Die Detektion erfolgte mittels eines Cy5 konjugierten Antikörpers. Die Spots wurden bei 649 nm visualisiert.

Bei der Hybridisierung mit dem anti-RGSHis₆ stellte sich heraus, dass die beiden Felder auf einem Chip bedingt durch die technischen Eigenschaften des Scanners unterschiedlich belichtet wurden. Damit die verschiedenen Chips miteinander verglichen werden konnten, wurde jeweils das Feld 2 ausgewertet.

Es wurden die Seren auf den Chips hybridisiert, welche auch für das Screening auf den PVDF-Membranen eingesetzt wurden. Jedes der Seren wurde auf zwei Chips in unabhängigen Experimenten hybridisiert, um die Anzahl der auszuwertenden Datenpunkte zu erhöhen. Abb. 26 zeigt zwei Proteinchips, von denen ChipA mit dem Serum eines an RA erkrankten Patienten und ChipB mit dem Serum eines Kontrollpatienten gescreent wurde

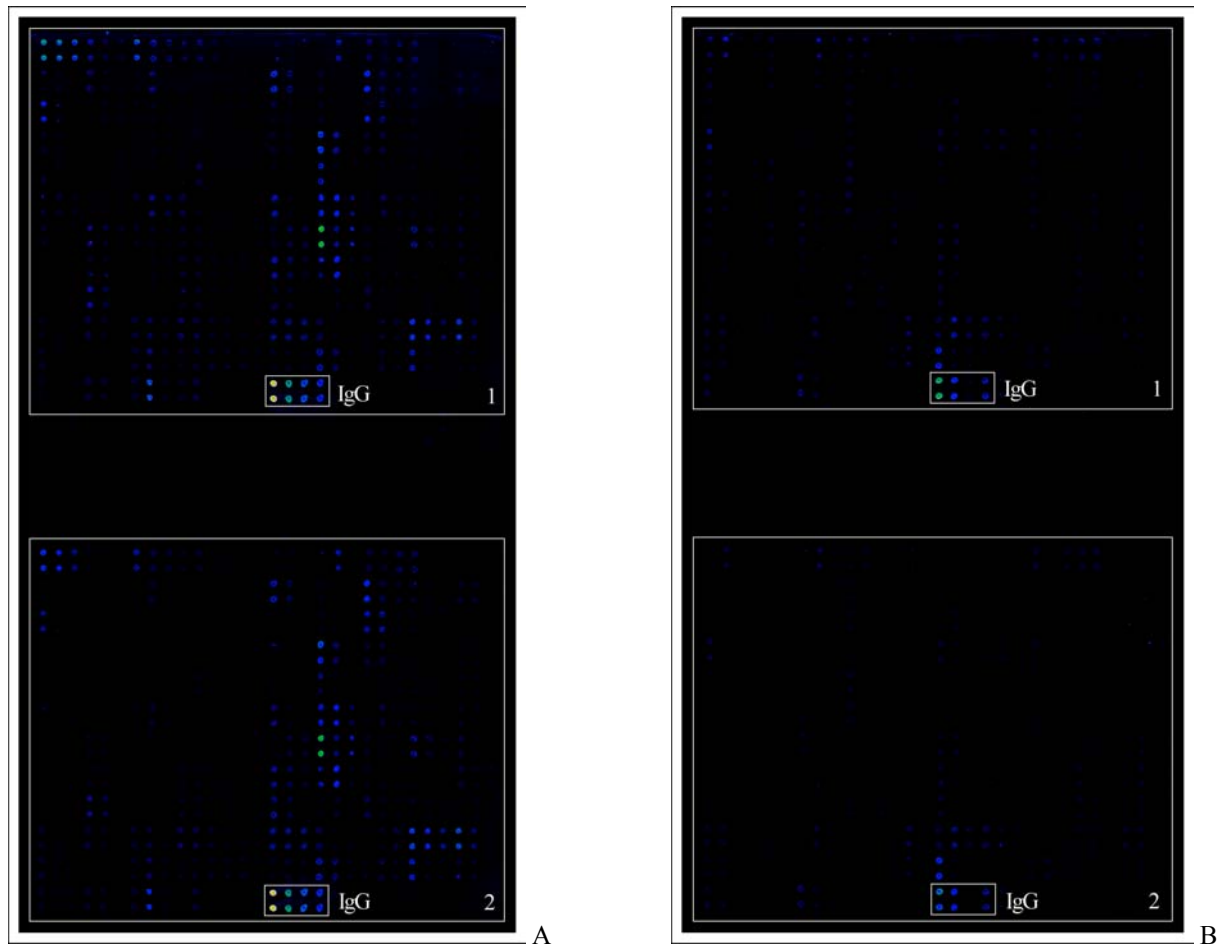


Abb. 26: Proteinchips mit 114 humanen Proteinen, welche mit Seren gescreent wurden.

Die Proteine wurden in zwei identischen Feldern auf dem Chip angeordnet und jeweils in drei Verdünnungsstufen gespottet. Zwei untereinander liegende Spots repräsentieren jeweils Duplikate einer Verdünnungsstufe eines Proteins. Die Hybridisierung erfolgte sowohl mit dem Serum eines an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten (A) als auch mit dem Serum eines Kontrollpatienten (B). Die aus dem Serum gebundenen Antikörper wurden mittels eines anti-human IgG und eines mit Cy5 konjugierten Antikörper gegen Maus-IgG detektiert. Durch Bestrahlung mit einem Laser der Wellenlänge 649 nm konnten die Spots visualisiert werden.

3.2.3.2 Auswertung der Screens mit GenePix

Die Auswertung der hybridisierten Chips erfolgte mit der Software GenePix Pro 4.1 (Axon Laboratories). Hierbei wird die Signalstärke der Spots im Vergleich zum Hintergrund um das Signal bestimmt. In der weiteren Auswertung wurden nur Proteine berücksichtigt, deren Signalstärke über 500 lag.

Zunächst wurde ein Vergleich der verschiedenen Chargen von Proteinchips durchgeführt. Die Proteine dieser Chargen stammten aus unterschiedlichen Aufreinigungen. Von jeder Charge wurde ein Chip mit RGSHis₆ hybridisiert. Um die Signalstärken untereinander vergleichen zu können, wurden die Werte der Proteine zunächst durch ihren RGSHis₆-Wert geteilt. Daraufhin

wurde der Durchschnitt der Signalstärke jedes Proteins von den zwei Chips gebildet, welche jeweils mit dem gleichen Serum inkubiert wurden. Aus diesen Mittelwerten wurde pro Protein ein Gesamtdurchschnittswert für die Kontrollen errechnet. Die Werte der einzelnen Patienten wurden durch den Gesamtdurchschnittswert der Kontrollen des jeweiligen Proteins dividiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 im Anhang aufgeführt. Zusätzlich wurde ein Gesamtdurchschnittswert für die Patienten pro Protein errechnet. Im Folgenden wurde der Durchschnittswert der Patienten durch den der Kontrollen geteilt. Als relevant berücksichtigt wurden die Proteine, welche (in mindestens einer Verdünnungsstufe) ein Patienten/Kontroll-Verhältnis größer als zwei aufwiesen. Von den 114 Proteinen, welche auf den Proteinfiltren der hEX1-Bibliothek detektiert wurden, konnten durch Screening der gleichen Seren auf den Chips neun als signifikant bestätigt werden (vgl. Tab. 7). Die Sequenz eines Klones kodiert für einen „neuro-D-verwandten Factor“, die eines weiteren für ein hypothetisches Protein. Die Sequenz eines Klones stimmt mit der eines „G-Protein-Signal-Regulator 19“ überein, eine weitere mit der der Komplement-Komponente C3. Weiterhin sind Exemplare unter den relevanten Klonen, deren Sequenzen für ein „heterologes Kern-Ribonukleoprotein A1 (hnRNP)“ eine „ribosomale DNA Wiederholungseinheit“, einen „NFκB (Nuklearfaktor kappaB)-Aktivator der TRAF-Familie assoziiert“ sowie die „Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase 1b (IRAK)“.

Tab. 5: Sequenzergebnis der Klone, welche durch das Screening der Seren auf Proteinchips detektiert werden konnten.

Für jedes Protein wurden Durchschnittswerte aller Patienten sowie aller Kontrollen errechnet. Hier sind die Klone aufgeführt, deren Verhältnis (in mindestens einer Verdünnungsstufe des entsprechenden Proteins) Patientendurchschnitt/Kontrolldurchschnitt größer als zwei war (grüne Zellen).

Verhältnis Patientendurchschnitt/ Kontrolldurchschnitt			Sequenz	Accession- Nr.
1:1	1:2	1:5		
5,53	2,08	1,78	NDRF gene for neuro-D-related factor	AB021742
3,07	2,74	3,47	clone IMAGE:4826767	BC031877
1,01	1,38	6,63	hypothetical protein FLJ30901 (FLJ30901).	XM_086857
0,95	3,21	11,03	regulator of G-protein signalling 19, clone MGC:5531 IMAGE:3454625	BC001318
2,64	0,51	3,06	complement component 3 (C3)	NM_000064
3,10	3,10	1,61	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, clone MGC:45574 IMAGE:4420039	BC033714
2,33	1,63	0,22	Human ribosomal DNA complete repeating unit	U13369
2,34	1,44	1,55	Homo sapiens TRAF family member-associated NFκB activator (TANK), transcript variant 1	NM_004180
4,24	2,60	9,97	Homo sapiens interleukin-1 receptor associated kinase 1b (IRAK)	AF346607

Für die Bestätigung der Bindung von Antikörpern aus den Seren an die oben aufgeführten Proteine (Tab. 7) wurden diese auf einer 12,5%igen SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot auf PVDF-Membranen übertragen. Durch Screening mit einem gegen den RGSHis₆-Tag gerichteten Antikörper wurden die Proteine auf dem Blot bestätigt (vgl. Abb. 27).

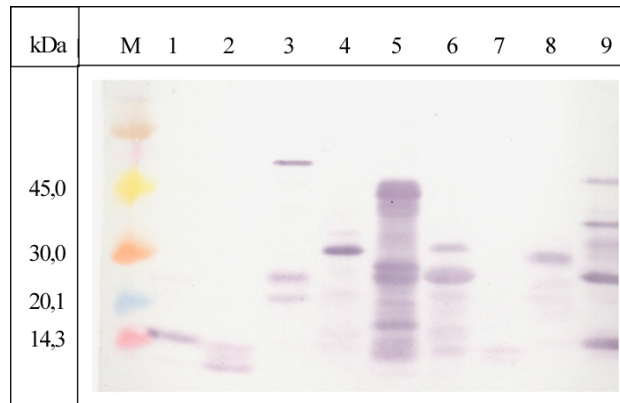


Abb. 27: Western-Blot mit potentiell krankheitsbeteiligten Proteinen, der mit einem gegen den RGSHis₆-Tag gerichteten Antikörper gescreent wurde.

Von 114 Proteinen, die beim Screening von Seren auf Proteinfiltren der hEX1-Bibliothek detektiert wurden, konnten neun durch Screening der gleichen Seren auf Proteinchips bestätigt werden. Die Proteine wurden aufgereinigt, auf einer 12,5%igen SDS-Page gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Sequenzen kodieren für folgende Proteine: Spur 1: „Homo sapiens Neuro-D-verwandten Faktor“; Spur 2: „Homo sapiens, Klon IMAGE:4826767“; Spur 3: „Homo sapiens hypothetisches Protein FLJ30901 (FLJ30901)“; Spur 4: „Homo sapiens, G-Protein-Signal-Regulator 19“; Spur 5: „Homo sapiens Komplement-Komponente-C3“; Spur 6: „Homo sapiens, heterologes Kern-Ribonukleoprotein A1 (hnRNP)“; Spur 7: „Human ribosomal DNA Wiederholungseinheit“; Spur 8: „Homo sapiens NFκB (Nuklearfaktor kappaB)-Aktivator der TRAF-Familie assoziiert“; Spur 9: „Homo sapiens Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase 1b (IRAK)“.

In Spur eins ist ein 15 kDa großes Protein zu sehen, dessen Sequenz für den „Homo sapiens NDRF gene für einen Neuro-D-verwandten Faktor“ kodiert. In Spur zwei wurden zwei Banden mit den Größen 14 kDa und 8 kDa aufgetrennt. Die Sequenz dieser Proteine kodiert für einen „Homo sapiens, Klon IMAGE:4826767“. In Spur drei sind Banden bei 20 kDa, 25 kDa und 50 kDa zu sehen, deren Sequenz für ein hypothetisches Protein kodiert. Das Protein, dessen Sequenz mit der des „Homo sapiens, G-Protein-Signal-Regulator 19“ übereinstimmt, ist in Spur vier mit einer Größe von 30 kDa zu sehen. Spur fünf zeigt verschiedene Banden zwischen 14 und 45 kDa mit der Sequenz für die „Homo sapiens Komplement-Komponente-C3“. In Spur sechs ist das Protein mit der Sequenz für das „Homo sapiens, heterologe Kern-Ribonukleoprotein A1 (hnRNP)“ aufgetragen. Hier sind zwei Banden um 30 kDa zu erkennen. Spur sieben zeigt schwach ein Protein bei 10 kDa, dessen Sequenz für eine „Human ribosomale DNA Wiederholungseinheit“ kodiert. In Spur acht ist ein 30 kDa großes Protein zu erkennen mit der Sequenz für einen „Homo sapiens NFκB (Nuklearfaktor kappaB)-Aktivator der TRAF-Familie

assoziiert“ zu erkennen. Die Sequenz des Proteins in Spur neun kodiert für die „Homo sapiens Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase 1b (IRAK)“. Hier sind vier Banden zwischen 14 und 45 kDa zu sehen.

Im Folgenden wurden alle Seren auf Western-Blots gescreent, um die Bindungen der Antikörper an die Proteine zu bestätigen. Die folgenden Abbildungen zeigen Western-Blots, welche mit Seren von Patienten mit RA (vgl. Abb. 28 A und B) hybridisiert wurden. Die Kontrollseren wurden gepoolt und ebenfalls auf einem Western-Blot hybridisiert (vgl. Abb. 29). Bei den Patienten konnten Antikörperbindungen an folgende Proteine festgestellt werden: „NDRF Gen für Neuro-D-verwandten Faktor“ (vgl. Spur 1, Abb. 28 A), den „G-Protein-Signal-Regulator 19“ (vgl. Spur 4, Abb. 28 B) , die „Komplement-Komponente-C3“ (vgl. Spur 5, Abb. 28 A), das „heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1“ (vgl. Spur 6, Abb. 28 A und B) die „ribosomale DNA Wiederholungseinheit“ (vgl. Spur 7, Abb. 28 B) sowie eine „Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase 1b (IRAK)“. (vgl. Spur 9, Abb. 28 A und B).

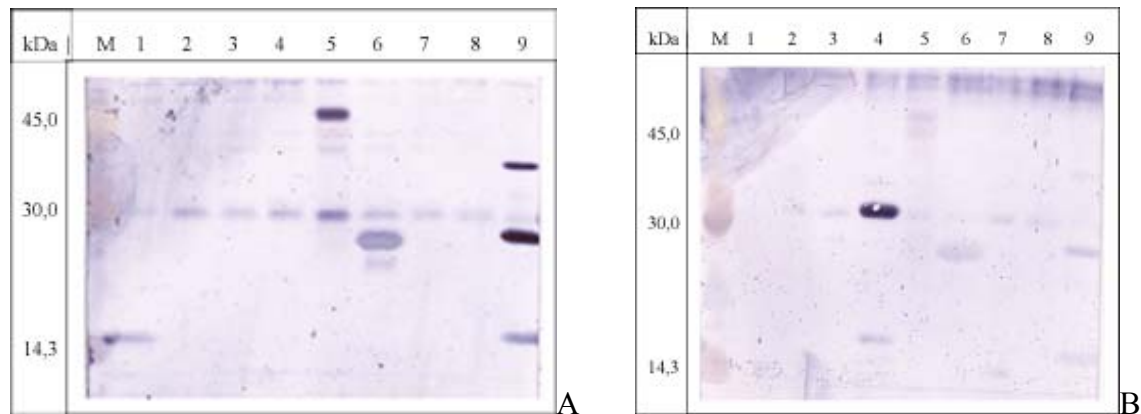


Abb. 28: Zwei Western-Blots mit potentiell krankheitsbeteiligten Proteinen, die mit Seren an RA erkrankten Patienten hybridisiert wurden.

Von 114 Proteinen, die beim Screening von Seren auf Proteinfiltren der hEX1-Bibliothek detektiert wurden, konnten neun durch Screening der gleichen Seren auf Proteinchips bestätigt werden. Die Proteine wurden aufgereinigt, auf einer 12,5%igen SDS-Page gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Western-Blot A und B wurden mit jeweils einem Serum eines an RA erkrankten Patienten inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörper und dem Substrat BCIP/NBT. Die Sequenzen kodieren für folgende Proteine: Spur 1: „Homo sapiens Neuro-D-verwandten Faktor“; Spur 2: „Homo sapiens, Klon IMAGE:4826767“; Spur 3: „Homo sapiens hypothetisches Protein FLJ30901 (FLJ30901)“; Spur 4: „Homo sapiens, G-Protein-Signal-Regulator 19“; Spur 5: „Homo sapiens Komplement-Komponente-C3“; Spur 6: „Homo sapiens, heterologes Kern-Ribonukleoprotein A1 (hnRNP)“; Spur 7: „Human ribosomal DNA Wiederholungseinheit“; Spur 8: „Homo sapiens NFκB (Nuklearfaktor kappaB)-Aktivator der TRAF-Familie assoziiert“; Spur 9: „Homo sapiens Interleukin-1-Rezeptor-assozierte Kinase 1b (IRAK)“.

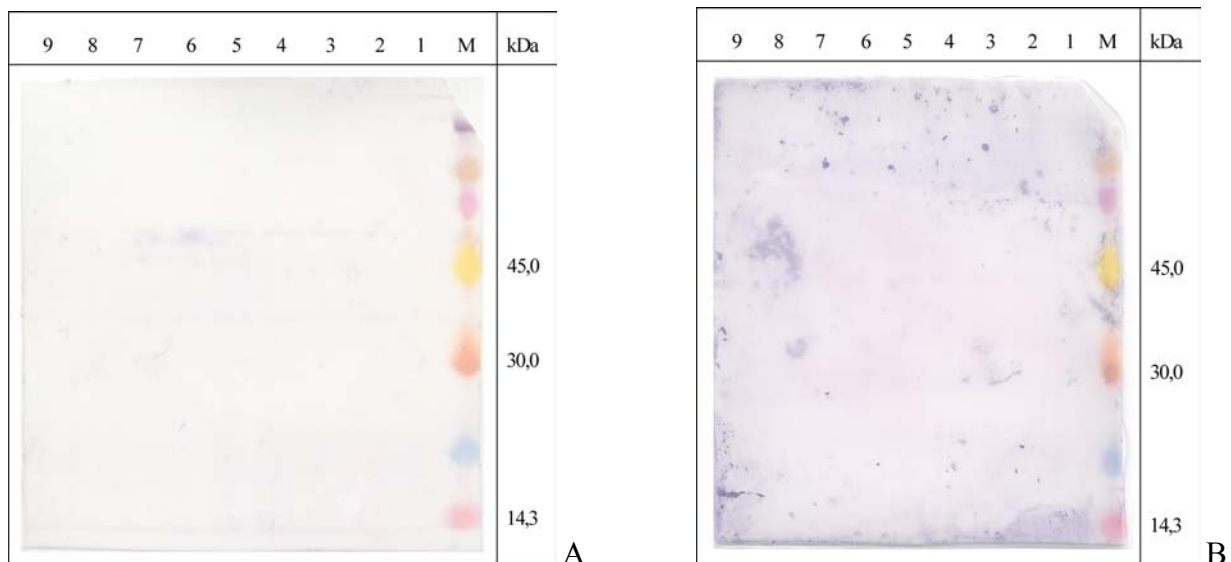


Abb. 29: Zwei Western-Blots, der mit je einem Kontrollserum hybridisiert wurden.

Von 114 Proteinen, die beim Screening von Seren auf Proteinfiltren der hEX1-Bibliothek detektiert wurden, konnten neun durch Screening der gleichen Seren auf Proteinchips bestätigt werden. Die Proteine wurden aufgereinigt, auf einer 12,5%igen SDS-Page gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Blots wurden mit je einem Kontrollserum inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörper und dem Substrat BCIP/NBT. Die Sequenzen kodieren für folgende Proteine: vgl. Abb. 28.

3.3 Serumscreening auf Proteinarrays des Expressionssubsets der TH1-Bibliothek

Das Screening von Seren eines Mausmodells für Systemischen Lupus erythematosus (SLE) erfolgte ebenso wie das unter 3.1.2.2 beschriebene Screening spezifischer Antikörper auf Proteinfiltren des Expressionssubsets der TH1-Bibliothek. Verwendet wurde ein Pool von Seren aus drei bis vier Monate alten weiblichen Mäusen des Stammes New Zealand Black x New Zealand White (NZB x NZW). Dieser ist ein häufig untersuchtes Mausmodell für SLE. Mehr als 90% dieser Hybridmäuse entwickeln spontan SLE-ähnliche Symptome mit vergleichbarer Heterogenität und eignen sich so für die Untersuchung der menschlichen Krankheit (Rahman, 2002). Als Kontrolle wurde ein Pool von Seren des Mausstammes NZW x Balbc verwendet, die das gleiche Alter und das gleiche Geschlecht besaßen. Die als positiv zu wertenden Signale werden durch Doppelspots in bestimmter Anordnung repräsentiert.

Mit dem Serenpool des SLE-Mausmodells (vgl. Abb. 30) konnten 34 Klone detektiert werden mit dem Serenpool der Kontrolle (vgl. Abb. 31) keiner.

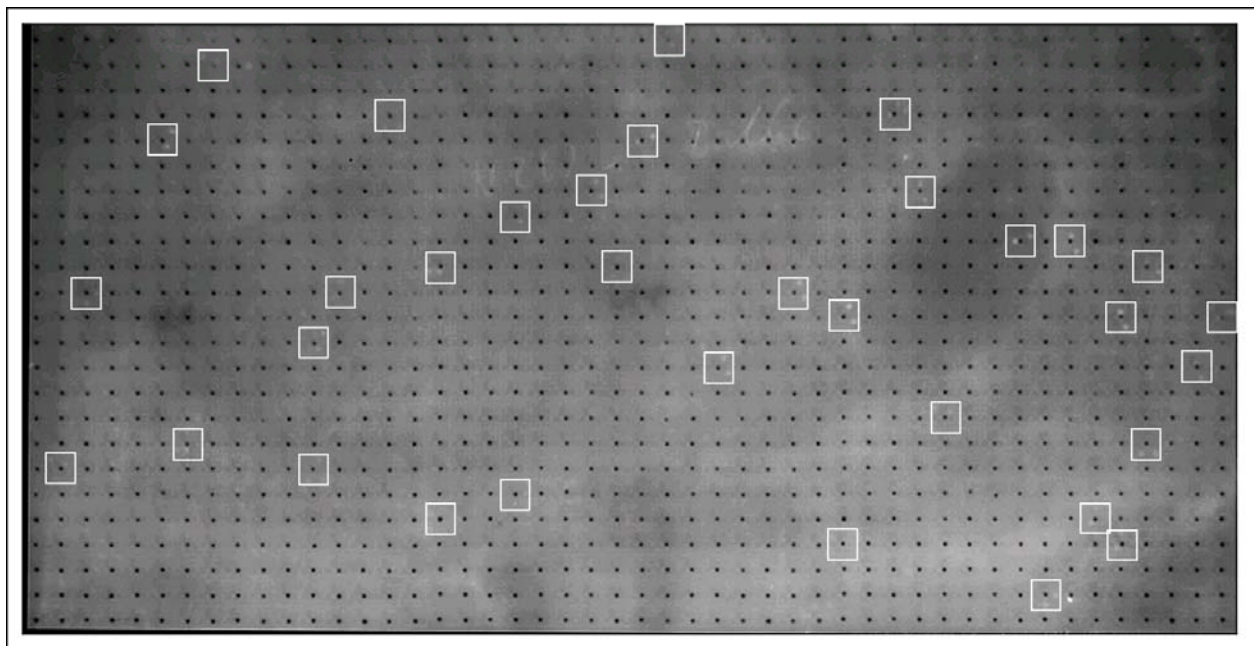


Abb. 30: Proteinfiltren des Expressionssubsets der TH1-Bibliothek, welcher mit einem Serumpool eines Mausmodells für Systemischen Lupus erythematosus (SLE) hybridisiert wurde.

Die Seren stammen von drei bis vier Monate alten weiblichen Mäusen vom Stamm NZB x NZW. Die Detektion der gebundenen Antikörper aus dem Serenpool erfolgte mittels eines Zweitantikörpers, welcher mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war. Es konnten 34 Klone detektiert werden (Rahmen).

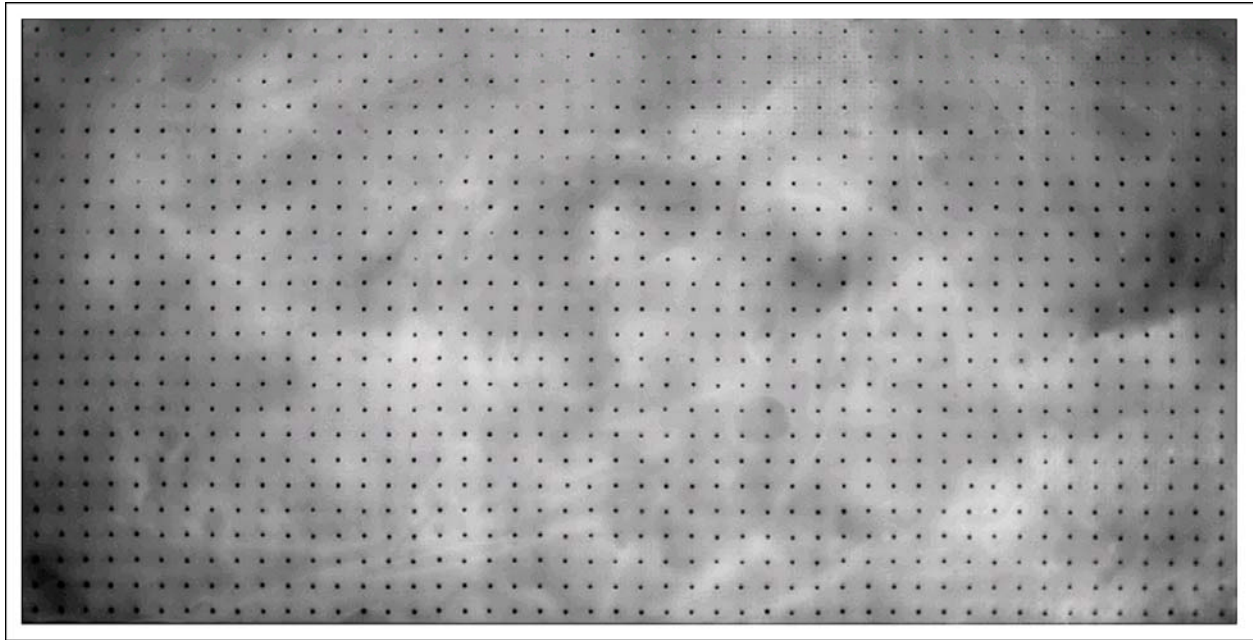


Abb. 31: Proteinfiter des Expressionssubsets der TH1-Bibliothek, welcher mit einem Serumpool eines Kontrollmausstammes hybridisiert wurde.

Die Seren stammen von drei bis vier Monate alten weiblichen Mäusen vom Stamm NZW x Balbc. Mittels eines Zweitantikörpers, welcher mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war, wurde kein Klon detektiert.

Die DNA der detektierten Klone wurde vom 5'-Ende mit dem Primer pQE65 sequenziert. Die Sequenzanalyse erfolgte in GenBank (vgl. Tab. 6). Die Sequenzen von sechs der 34 Klone zeigten keine Übereinstimmung mit bekannten Sequenzen. Acht Klone trugen ein Insert, dessen Sequenz die gleiche Übereinstimmung mit der einer „Proteasomuntereinheit alpha7/C8“ wie mit der des „T-cell-Rezeptor alpha/delta locus“ zeigte. Drei Klone trugen die Sequenz, die für einen Rezeptor einer Protein-Tyrosin-Phosphatase kodiert, und sieben Klone die für den „ATP Synthase, H⁺ Transport mitochondrialen F1 Komplex“ kodierende Sequenz. Die Sequenz eines Klones zeigte die größte Übereinstimmung mit der des „Lektin Galactose-Bindeprotein“ und eine Sequenz mit der des „CD27-Bindeproteins“. Zwei Klone besitzen die Sequenzen, welche für ribosomale Proteine kodieren und zwei die eines „Ubiquitin A-52 Rest (ribosomales Protein Fusionsprodukt) 1“. Die Sequenz eines Klones kodiert für den „endogenen ecotropic murinen leukemischen Proviral-Lokus 3“ und die Sequenzen der Inserts von drei Klonen für drei Proteine mit bisher nicht charakterisierter Funktion.

Tab. 6: Sequenzanalyse der DNA von Klonen der TH1-Bibliothek.

Die Klone wurden durch Screening von Proteinarrays des Expressionssubsets mit einem Serenpool eines Mausmodells für SLE detektiert. Die DNA wurde vom 5'-Ende mit dem Primer pQE65 sequenziert und die Sequenzen durch Vergleich mit GenBank analysiert.

Sequenzergebnisse	Anzahl	Accession-Nr.
proteasome alpha 7/C8 subunit mRNA, complete cds		AF055983
T-cell receptor alpha/delta locus section 1 of 4 of the complete region	8	AE008683/ AE007512
protein tyrosine phosphatase, receptor type, C polypeptide-associated protein, mRNA (cDNA clone MGC:13941 IMAGE:4208992), complete cds.	3	BC013273
ATP synthase, H ⁺ transporting mitochondrial F1 complex, beta subunit, mRNA (cDNA clone IMAGE:4920887), partial cds.	7	BC037127
lectin, galactose binding, soluble 3 (Lgals3), mRNA.	1	XM_127681
ribosomal protein S16 (Rps16), mRNA.	1	XM_289707
ribosomal protein S27a (Rps27a), mRNA.	1	NM_024277
ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1, mRNA (cDNA clone MGC:62591 IMAGE:2811993), complete cds.	2	BC054413
Cd27 binding protein (Hindu God of destruction), Siva-pending, mRNA.	1	BC037127
endogenous ecotropic murine leukemia proviral locus 3 (Emv-3) envelope glycoprotein (env) gene, complete cds; glycoprotein (gp70) gene; p15e gene	1	L37057
Proteine mit nicht charakterisierter Funktion		
RIKEN cDNA 3110006P09 gene, mRNA (cDNA clone MGC:63460 IMAGE:6834437), complete cds.	1	BC037127
ES cells cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:2410080P20 product:CDNA: FLJ21702 FIS, CLONE COL09874 homolog [Homo sapiens], full insert sequence.	1	AK075958
DNA sequence from clone RP23-42815 on chromosome 11, complete sequence.	1	AL645847

Im nächsten Schritt wurden die durch den Serenpool des SLE-Modells detektierten Klone zur Proteinexpression angezogen und induziert. Daraufhin erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der mittels NiNTA-Agarose aufgereinigten Proteine auf einer 12,5%igen SDS-Page (vgl. Abb. 32, A). In den Spuren 2, 3, 15, 22, 27, 28, 30 und 31 sind Proteine mit einer Größe von 12 kDa aufgetragen, deren Sequenz für eine ATP-Synthase kodiert. Die Spuren 5, 9, 14, 16, 19, 20, 21 und 24 enthalten Proteine der Größe 30 kDa, deren Sequenz mit der einer Proteasomuntereinheit bzw. dem Teil des T-Zell-Rezeptors übereinstimmen. In Spur 7 ist ein 20 kDa, in Spur 10 ein 10 kDa und in Spur 17 sowohl ein 10 kDa als auch ein 15 kDa großes Protein zu sehen, deren Funktionen bisher noch nicht bekannt sind. Die Proteine, deren Sequenzen für eine Tyrosin Phosphatase kodieren, sind in den Spuren 8, 25 und 26 aufgetragen

und haben eine Größe von 16 kDa. Das Protein in Spur 11 ist 16 kDa groß und die Sequenz kodiert für das ribosomale Protein S16. In Spur 12 ist ein 25 kDa großes Protein zu sehen, dessen Sequenz mit der des ribosomalen Proteins S27 übereinstimmt. Die Sequenzen der 20 kDa großen Proteine in den Spuren 18 und 32 kodieren für einen Ubiquitin A-52-Rest. Ein Protein mit der Sequenz für das CD27-Bindeprotein ist in Spur 23 aufgetragen, es besitzt die Größe von 20 kDa. In Spur 34 befindet sich ein 25 kDa großes Protein mit der Sequenz für Lektin. In den Spuren 1, 6, 29 und 33 konnten keine Proteine visualisiert werden. Ihre Sequenzen zeigten keine Übereinstimmung mit einem bekannten Protein. Auch in Spur 4 ist kein Expressionsprodukt zu erkennen. Die Sequenz kodiert für einen „endogenen ecotropic murinen leukemischen Proviral-Lokus 3“ In Spur 13 ist ein etwa 12 Kda großes Protein zu sehen, dessen Sequenz keine Übereinstimmung mit einem bekannten Protein zeigte.

Für die Bestätigung der Antikörperbindung wurden die Proteine mittels Western-Blot auf PVDF-Membranen übertragen. Durch Screening mit dem Serenpool des Mausmodells für SLE konnten an folgenden Proteinen Antikörperbindungen nachgewiesen werden: ATP-Synthase (Spuren 2, 3, 15, 22, 27, 28, 30 und 31); Proteasomuntereinheit bzw. Teil des T-Zell-Rezeptors (Spuren 5, 9, 14, 16, 19, 20, 21 und 24); Protein-Tyrosin-Phosphatase (Spuren 8, 25 und 26); Proteine unbekannter Funktion (Spuren 10, 17); ribosomales Protein S16 (Spur 11); ribosomales Protein S27 (Spur 12); Ubiquitinrest A52 (Spuren 18, 32); CD27 (Spur 23).

Antikörper aus dem Pool von Kontrollseren erkannten folgende Proteine: Proteasomuntereinheit bzw. Teil des T-Zell-Rezeptors (Spuren 5, 9, 14, 16, 19, 20, 21 und 24); ribosomales Protein S16 (Spur 11); ribosomales Protein S27 (Spur 12).

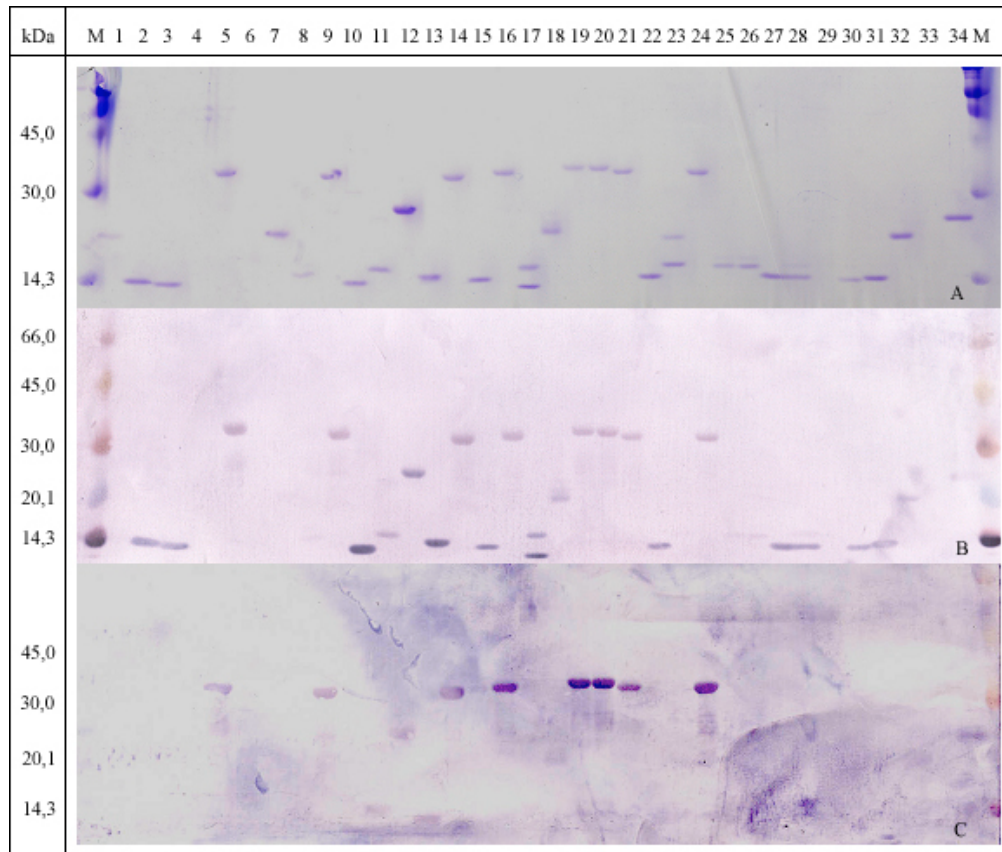


Abb. 32: SDS-Page und anschließender Western-Blot mit potentiell krankheitsbeteiligten Proteinen.

Die Proteine wurden beim Screening von Seren eines Mausmodells für SLE detektiert und sind in folgender Reihenfolge aufgetragen: Spuren 2, 3, 15, 22, 27, 28, 30 und 31: ATP-Synthase; Spuren 5, 9, 14, 16, 19, 20, 21 und 24: Proteasomuntereinheit/Teil des T-Zell-Rezeptors; Spuren 7, 10, 17: Proteine mit uncharakterisierter Funktion; Spuren 8, 25, 26: Protein Tyrosin Phosphatase; Spur 11: ribosomales Protein S16; Spur 12: ribosomales Protein S27; Spuren 18, 32: Ubiquitin A-52-Rest; Spur 23: CD27; Spur 34: Lektin.

A: 12,5%iges Proteingel mit Coomassie angefärbt

B: Western-Blot, der mit einem Serenpool eines Mausmodells für SLE (des Stammes NZB x NZW) hybridisiert wurde.

C: Western-Blot, der mit Pool von Kontrollseren des Stammes NZW x Balbc hybridisiert wurde.

Die Detektion auf den Westernblots erfolgte mittels eines Zweitantikörpers, welcher mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war, und dem Substrat BCIP/NBT.

Die Größen der Proteine, die durch die Sequenzen zu erwarten waren sowie die Größen, welche auf dem Western-Blot detektiert wurden, sind in Tab. 7 dargestellt.

Nach Analyse der Leserahmen konnte festgestellt werden, dass folgende Proteine nicht im gleichen Leserahmen vorliegen, wie der RGS_{HIS6}-Tag: ribosomales Protein S27 (Spur12); Ubiquitin A-52 Rest (Spuren 18, 32); ATP-Synthase (Spuren 2, 3, 15, 22, 27, 30, 31); Protein unbekannter Funktion (Spur 10); Ausserdem wurde festgestellt, dass die Proteine in den Spuren 25, 26 (Tyrosin Phosphatase) sowie 5 und 24 (Proteasom Untereinheit) nicht im gleichen Leserahmen wie der RGS_{HIS6}-Tag vorliegen. In diesen Spuren sind Produkte mit der gleichen Größe zu sehen wie in den Spuren, in denen Proteine mit der gleichen Sequenz aufgetragen sind,

welche aber im korrekten Leserahmen vorliegen. Aus diesem Grund kann von einem Sequenzierfehler ausgegangen werden.

Tab. 7: Erwartete und nachgewiesene Proteingrößen von Klonen der Th1-Bibliothek.

Die Klone sind durch Serumscreening auf Proteinarrays des Expressionssubsets der TH1-Bibliothek detektiert worden. Aufgeführt sind die durch die Sequenzen erwarteten und die auf dem Western-Blot detektierten Größen der Proteine.

Sequenz	Spur	erwartete Größe	Größe auf Western-Blot	Leserahmen
proteasome alpha 7/C8 subunit mRNA T-cell receptor alpha/delta locus section 1 of 4 of the complete region	5, 9, 14, 16, 19, 20, 21,24	32 kDa	32 kDa	korrekt: 9, 14, 16, 19, 20, 21 falsch: 5, 24
protein tyrosine phosphatase, receptor type,	8, 25, 26	16 kDa	16 kDa	korrekt: 26 falsch: 8,25
ATP synthase, H ⁺ transporting mitochondrial F1 complex, beta subunit	2, 3, 15, 22, 27, 28, 30, 31	43 kDa	14 kDa	falsch: alle
lectin, galactose binding, soluble 3 (Lgals3)	34	25 kDa	25 kDa	korrekt
ribosomal protein S16 (Rps16)	11	16 kDa	16 kDa	falsch
ribosomal protein S27a (Rps27a)	12	25 kDa	25 kDa	falsch
ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	18, 32	20 kDa	20 kDa	falsch
Cd27 binding protein	23	20 kDa	20 kDa	korrekt
endogenous ecotropic murine leukemia proviral locus 3 (Emv-3) envelope glycoprotein (env)	4	35 kDa	keine Bindung	falsch
RIKEN cDNA 3110006P09 gene	7	15 kDa	keine Bindung	korrekt
ES cells cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:2410080P20 product:CDNA: FLJ21702 FIS	10	31 kDa	10 kDa	falsch
DNA sequence from clone RP23- 42815 on chromosome 11	17	19 kDa	keine Bindung	korrekt