

4 Diskussion

Die Herstellung von Proteinarrays erlaubt die gleichzeitige Analyse vieler Target-Moleküle in einem Experiment. Durch Anordnung in definierten Positionen kann z.B. die Identifizierung der Moleküle nach Hybridisierung der Arrays mit komplexen Lösungen erleichtert werden. Das Ermitteln von krankheitsspezifischen Proteinen ist ein wichtiges Ziel der biomedizinischen Forschung. Solche Proteine besitzen medizinisches, diagnostisches sowie kommerzielles Potential als Marker für Krankheiten (Cahill 2001).

In der vorliegenden Arbeit wird die Erstellung und Anwendung von Hochdichte-Proteinarrays für Untersuchungen von Autoimmunerkrankungen beschrieben. Dabei lässt sich die Arbeit in die drei folgenden Abschnitte unterteilen.

Im ersten Abschnitt erfolgte die Herstellung einer cDNA-Expressionsbibliothek aus murinen TH1-Zellen. Diese kann als Quelle von klonal exprimierten rekombinanten Proteinen für das Screening von Antikörpern zur Identifizierung von Antigen-Antikörper-Bindungen verwendet werden. Der zweite Abschnitt umfasst den Einsatz von Proteinarrays humaner Proteine für die Analyse menschlicher Autoantikörper in Seren von Patienten, die an rheumatoider Arthritis (RA) erkrankt sind. Im dritten Abschnitt wurde das Screening von Seren eines Mausmodells für Systemischen Lupus erythrematosus (SLE) auf Proteinarrays der TH1-Bibliothek durchgeführt.

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

cDNA-Bibliotheken repräsentieren die Gesamtheit der exprimierten Gene eines Gewebes oder Zelltyps in einem bestimmten Entwicklungsstadium. Die Analyse kann tiefere Einblicke in biologische Prozesse geben. Neben der Möglichkeit, neue Gene und ihre Spleißprodukte zu identifizieren, spielen cDNA-Bibliotheken auch eine wichtige Rolle bei der Analyse der Transkriptionsintensität. Somit können auch Erkenntnisse über die Menge ihrer Expressionsprodukte im ausgehenden Material gewonnen werden (Clark *et al.* 1999).

Durch Klonierung von cDNA-Bibliotheken in ein Expressionsvektoren können cDNA-Expressionsbibliotheken generiert werden. Diese stellen eine Quelle rekombinanter Proteine des jeweiligen Gewebes oder Zelltyps dar. Dabei ermöglicht die Technologie der angeordneten

Expressionsbibliothek die direkte Verbindung zwischen Klonen und exprimierten Proteinen (Schmidt *et al.* 2002). Bestimmte Klone, die durch Sequenzierung oder Inkubation mit Antikörpern identifiziert werden, können direkt für die Expression und Aufreinigung ihrer Proteine verwendet werden. Dadurch ist die Subklonierung bestimmter Gene in einen Expressionsvektor nicht mehr notwendig. Dies ist besonders bei der Analyse vieler Proben von Vorteil. Die Anwendungsgebiete solcher Protein-Expressionsbibliotheken liegen unter anderem in der Detektion von Antigen-Antikörper-Interaktionen sowie Protein-Protein- oder Protein-DNA-Wechselwirkungen. Die Analyse der in diesem Rahmen identifizierten Targets auf Proteinebene kann anschließend erfolgen, wobei hierfür keine weiteren Klonierungsschritte notwendig sind.

Büssow *et al.* (1998) entwickelten eine cDNA-Bibliothek aus humanem fötalen Hirngewebe mit 37.830 Expressionsklonen. Es wurden Proteinarrays dieser Bibliothek auf PVDF-Membranen erstellt und für das Screening spezifischer Antikörper verwendet (Büssow *et al.* 1998).

4.1.1 Erstellung der cDNA-Bibliothek aus murinen TH1-Zellen und Analyse auf DNA-Ebene

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte cDNA-Expressionsbibliothek aus murinen TH1-Zellen stellt eine weitere Quelle rekombinanter Proteine dar. T-Zellen gehören wie auch die B-Zellen zu den antigenspezifischen Lymphozyten, auf deren Aktivität die erworbene Immunantwort beruht. Die Reaktion von T-Zellen basiert auf ihrer Fähigkeit, Zellen zu erkennen, die Krankheitserreger oder ihre Produkte aufgenommen haben und diese auf ihrer Oberfläche, gebunden an Moleküle des MHC, präsentieren. T-Helferzellen, die sich in zwei funktionell verschiedene Klassen unterteilen lassen, erkennen Peptide, welche an MHCII-Moleküle gebunden sind und aus dem vesikulären System der präsentierenden Zellen stammen. TH1-Zellen aktivieren Makrophagen, die intravesikulären Bakterien in ihrem Inneren zu töten (Janeway and Travers 1997). Da TH1-Zellen an immunbiologischen Reaktionen beteiligt sind, stellt es eine interessante Möglichkeit dar, Krankheiten, die durch eine veränderte Immunreaktion charakterisiert sind, mit Hilfe dieser cDNA-Bibliothek näher zu untersuchen.

In den letzten 40 Jahren wurde die Maus zu einem wichtigen genetischen Modellorganismus für die Studien der humanen Entwicklung und menschlichen Krankheiten. Verschiedene einzelne Gene und polygene Modelle humaner Funktionsstörungen wurden bei der Maus charakterisiert. Oft sind die charakteristischen Phänotypen ähnlich denen der analogen humanen Krankheit

(Bedell *et al.* 1997a, Bedell *et al.* 1997b). Für die Entdeckung von Genen und die Identifizierung der dazugehörigen Proteine können parallele Studien an Maus und Mensch durchgeführt werden. Diese Studien können auch für die phänotypische Charakterisierung genutzt werden (West *et al.* 2000). Mit den Fortschritten im Sequenzieren der Genome von Mensch und Maus besteht ein großes Interesse an der Entwicklung von Hochdurchsatz-Methoden für ihre funktionelle Analyse (Perkins 2002).

Für die Herstellung der cDNA-Expressionsbibliothek (vgl. 3.1) wurde die cDNA muriner TH1-Zellen direkt in den *E. coli* Expressionsvektor pQE30NASTattB kloniert. Dieser ermöglicht die rekombinante Proteinexpression in *E. coli*, über Induktion des T5-Promotors mit IPTG.

Von vielen alternativen Organismen und Expressionssystemen, die für rekombinante Proteinexpression genutzt werden, stellt *E. coli* aufgrund von guter Charakterisierung auf genetischer und biochemischer Ebene stabiles und weit verbreitetes Expressionssystem dar, dessen Ergebnisse gut reproduzierbar sind. Der prokaryotische Organismus ist einfach in der Handhabung und bietet eine hohe und kosteneffektive Produktionsrate heterologer Proteine.

Unter Berücksichtigung der etablierten Versuchsbedingungen für das Picking und Spotting einer cDNA-Expressionsbibliothek in *E. coli* wurde dieser Wirtsorganismus für die Herstellung der TH1-Bibliothek gewählt. Der verwendete Vektor besitzt neben einer multiplen Klonierungsstelle und einem RGSHis₆-Epitop zwei attB-Seiten für „Gateway“-Klonierung (Invitrogen). Diese ermöglichen die gerichtete Umklonierung spezifischer Gene in andere Expressionssysteme über einen vom Phagen Lamda übernommenen Rekombinationsmechanismus. So könnten Gene, die in *E. coli* nur schwach exprimiert werden, oder unlösliche Aggregate bilden, in einem anderen Expressionssystem Proteine exprimieren. Das System bietet auch die Möglichkeit, in ein eukaryotisches System wie z.B. Hefe oder Säugerzellen zu wechseln. Diese Systeme wiederum bieten den Vorteil, dass Proteine ähnlich wie in humanen Zellen eine posttranslationale Modifizierung erfahren.

Wie oben erwähnt, enthält der verwendete Expressionsvektor eine für RGSHis₆ kodierende Sequenz. Dadurch werden die Proteine als Fusionsproteine mit einem N-terminalen RGSHis₆-Epitop exprimiert. Diese Technik kann für die Aufreinigung von Proteinen sowohl unter denaturierenden als auch unter nativen Bedingungen verwendet werden. Über Antikörper gegen den RGSHis₆-Tag können Proteine mittels Western-Blot, ELISA oder anderen Proteinspezifischen Trennverfahren z.B. in zellulären Extrakten nachgewiesen werden. Durch die geringe Größe dieses Tags ist dieser nur wenig immunogen, weshalb die Fusionsprodukte direkt

als Antigen für eine Antikörperproduktion eingesetzt werden können. Es besteht nicht die Notwendigkeit, den Tag vorher zu entfernen. Weiterhin ist auch nicht zu erwarten, dass die Fusionspartner in ihrer Struktur und Funktion durch den RGSHis₆-Tag beeinträchtigt werden.

Die TH1-cDNA-Bibliothek wurde durch reverse Transkription von mRNA mittels Oligo(dT)-Primer synthetisiert. Hierbei werden die Moleküle vom 3`- zum 5`-Ende generiert, indem die Primer am PolyA-Ende binden. Nachteil dieser Methode ist, dass ein Verlust der N-terminalen Regionen größerer Moleküle vorkommen kann, was eine geringere Anzahl an Proteinepitopen zur Folge hat. Dadurch können wichtige Antikörperbindungsstellen fehlen. Eine Möglichkeit, dieses zu verhindern, wäre die Synthese von cDNA-Bibliotheken durch „*random primer*“. Hierbei werden 5`-Enden der mRNA mit der gleichen Wahrscheinlichkeit revers transkribiert wie die 3`-Enden. Hierbei kann aber keine gerichtete Klonierung erfolgen.

Die Analyse der DNA von 100 zufällig ausgewählten Klonen (vgl. 3.1.1.1) ergab eine durchschnittliche Insertgröße von 1 kb. Bei der Untersuchung von 60.770 Voll-Länge cDNAs aus dem Mausgenom konnten Okazaki *et al.* (2002) eine durchschnittliche Insertgröße von 1,97 kb feststellen. Der im Fall der hier durchgeführten Untersuchung vorliegende geringere Durchschnitt von 1 kb kann darauf zurückzuführen sein, dass kürzere DNA-Moleküle bei der cDNA-Synthese effektiver transkribiert werden als längere, die für größere Proteine kodieren. Findet eine Degradation der mRNA statt, oder läuft die reverse Transkriptase-Reaktion unvollständig ab, so entstehen z.T. verkürzte cDNA-Moleküle. Somit ist das Resultat eine verminderte Häufigkeit des Vorkommens großer Proteine in der cDNA-Bibliothek, was sich in einer Verminderung der Expressionshäufigkeit dieser Proteine und damit geringerer Diversität der Bibliothek auswirkt. Für die Anwendung der Bibliothek ist die vollständige Expression nicht zwingend notwendig, da auch verkürzte C-terminale Teilproteine Epitope für die Bindung von Antikörpern oder für Protein-Protein-Interaktionen enthalten können.

Zusätzlich zur Insertgröße wurde die DNA der 100 Klone auch hinsichtlich ihrer Sequenz überprüft (vgl. 3.1.1.1, Tab. 1). Unter den 71 verschiedenen Sequenzen waren Gene zu finden, die für charakteristische T-Zell-Proteine kodieren, wie z.B. IFN- γ , Bestandteile von T-Zell-Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren wie STAT 3, die Lymphozyten-spezifische Tyrosin-Kinase und den Chemokinrezeptor CXCR6. Auch kodierende Sequenzen für solche Proteine, welche mit Zellen des Immunsystems assoziiert sind, wie z.B. MIP1- β und Thymosin, konnten nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um Proteine, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind.

Auffällig ist, dass der Anteil der Gene, welche für IFN- γ kodieren, mit 8% besonders hoch liegt. Dieses kann dadurch erklärt werden, dass die Bibliothek aus cDNA von TH1-Zellen synthetisiert wurde. Diese Untergruppe der CD4⁺-Zellen (T-Helferzellen) sezerniert insbesondere IFN- γ , woraus sich die Häufigkeit dieses Gens ableiten lässt. Während ihrer Entwicklung kommt es bei T-Zellen zu der Ausbildung verschiedener Oberflächenrezeptoren. Dabei lassen sich zwei Typen unterscheiden: Der eine Typ besteht aus α/β -Ketten und der andere Typ aus γ/δ -Ketten. Diese Rezeptoren werden von funktionell verschiedenen T-Zell-Linien ausgebildet, wobei die Anzahl der α/β -T-Zellen überwiegt. Dies erklärt die Häufigkeit der Gene in der Bibliothek, die für die α - und β -Kette der T-Zell-Rezeptoren kodieren. In der Thymozytenreifung durchlaufen Gene für die T-Zell-Rezeptoren eine genau festgelegte Umordnung, wobei zunächst die β -Kette gebildet wird. Für das Einleiten der Proliferation von T-Zellen und der Expression der CD4- und CD8-Corezeptoren wird die Lck-Tyrosinkinase benötigt (Dudley *et al.* 1994), deren Gen ebenfalls unter den 100 untersuchten Sequenzen zu finden ist. Auch Sequenzen, die für den Chemokinrezeptor CXCR6 sowie für den Transkriptionsfaktor STAT-3 kodieren, sind in den 100 Sequenzen vertreten. Die Expression des Chemokinrezeptors CXCR6 auf der Oberfläche von TH1-Zellen wird nach Aktivierung durch dendritische Zellen induziert (Thomas *et al.* 2003; Langenkamp *et al.* 2003). Der Transkriptionsfaktor STAT-3 wird für die Differenzierung der T-Zell-Linie benötigt (Gregoire and Romeo 1999). Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie sind durch ihr konserviertes Zink-Finger-Motiv verwandt, welches an eine Konsensus-DNA-Sequenz bindet (Orkin 1992). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass STAT-3 auch während der Entwicklung anderer Zellen und Gewebe, wie z.B. der Plazenta und der Niere, exprimiert wird (George *et al.* 1994). Im Gegensatz zu der ubiquitären, gewebsunspezifischen Expression während der Entwicklung, wird die mRNA von STAT-3 in adulten Individuen meist in Thymozyten, T-Zellen und in Zellen des zentralen Nervensystems gefunden (Arnone and Davidson 1997).

Wie erwähnt, befinden sich unter den Sequenzen auch Gene, welche für Proteine kodieren, die mit Zellen des Immunsystems assoziiert sind. Das Makrophagen inflammatorische Protein (MIP)-1 β gehört zu einer Gruppe von Chemokinen, die die Monozytenwanderung unterstützen. Es wird vorwiegend durch Monozyten, Makrophagen, Neutrophile und Endothelzellen sekretiert, aber auch durch T-Zellen. Bei MHC-Molekülen handelt es sich um Glykoproteine an der Zelloberfläche, die aufgrund ihrer Struktur fähig sind, ein großes Spektrum von Peptiden aus pathogenen Organismen zu binden. Dabei lassen sich zwei funktionelle Klassen unterscheiden, die MHC-I- und MHC-II-Moleküle, welche auf unterschiedlichen Zelltypen vorkommen.

MHC-I-Moleküle präsentieren Peptide, welche von Krankheitserregern, meist Viren, aus dem Zytosol stammen. Da Viren jede Zelle infizieren können, die einen Zellkern besitzt, exprimieren fast alle kernhaltigen Zellen MHC-I-Moleküle. Am höchsten ist die Expression jedoch auf hämatopoetischen Zellen. Das MHC-I-Molekül wird so auch auf T-Zellen als Heterodimer einer α -Kette exprimiert, die nicht kovalent mit β_2 -Mikrotubulin assoziiert ist. Dies erklärt das Vorkommen der Sequenzen, welche für eine Region des MHC-I-Moleküls und für β_2 -Mikrotubulin kodieren (Madden 1995; Rammensee 1995, Song and Harding 1996). Unter den Sequenzen der Bibliothek befindet sich auch ein Gen, welches für ein sekretorisches Granula-Proteoglykan Kernprotein kodiert. In vielen Zellen hämatopoetischen Ursprungs, unter anderem in T-Zellen, Eosinophilen und Makrophagen, findet man bestimmte Zuckermoleküle, die Proteoglykane, die spezifisch in diesen Zellen exprimiert werden. Sie können von anderen Proteoglykanen der extrazellulären Matrix sowie der Plasmamembran durch das Vorkommen eines serin-/glycinreichen Peptidkerns unterschieden werden (Avraham *et al.* 1992). Weiterhin wurde auch die Sequenz, die für Thymosin beta kodiert, unter den 100 Genen der Bibliothek identifiziert. Das Hormon Thymosin beta wird als Protein mit diversen Funktionen beschrieben, unter anderem ist es an der Ausbildung des Zytoskeletts sowie an antiinflammatorischen Reaktionen beteiligt (Bubb 2003). Weiterhin zeigen Studien, dass Thymosin Einfluss auf die Aktivierung von Makrophagen im Verlauf der Antigenpräsentation haben kann (Tzevalou *et al.* 1989). Die Anwesenheit der Sequenz für den Transkriptionsfaktor Nuklearfaktor (NF) κ B kann folgendermaßen erklärt werden: Nach Bindung eines Antigens an den T-Zell-Rezeptor werden in der Zelle eine Reihe biochemischer Veränderungen ausgelöst. Durch den T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplex und costimulatorische Moleküle werden in der Zelle Signalkaskaden in Gang gesetzt. Im Zuge dessen kommt es zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, welche auf die Chromosomen der T-Zelle einwirken. Einer dieser Faktoren ist der Transkriptionsfaktor (NF) κ B. Das Ergebnis dieses Aktivierungsprozesses ist die Transkription verschiedener Gene, die z.B. für verschiedene Zytokine kodieren. Dieses führt dann zu Proliferation, Differenzierung und zu Effektorreaktionen der T-Zelle (Girdlestone and Wing 1996, Cantrell 1996). Des Weiteren sind Klone in der Bibliothek enthalten, deren Gene für Proteine kodieren, die in jeder Zelle zu finden sind. Darunter sind Proteine, die am Aufbau und der Funktion von Ribosomen beteiligt sind, Transportproteine, wie z.B. Rab 19 (Seabra *et al.* 2002), Chaperonine, die für eine stabile Konformation vieler Proteine wichtig sind (Fares and Wolfe 2003) sowie Proteine, die Wachstum und Entwicklung der Zellen regulieren. Auch Sequenzen, die für Proteine aus Zellkompartimenten, wie Proteasomen, Lysosomen und Mitochondrien kodieren, sind nach-

weisbar. 15% der Gene aus der TH1-Bibliothek konnte bis jetzt keine Funktion zugeordnet werden.

4.1.2 Identifizierung und Analyse potentieller Expressionsklone

Im Anschluss an die DNA-Analyse folgte die Detektion der Expressionsklone der Bibliothek (vgl. 3.1.2). Bei Klonierung der cDNA besteht nicht die Möglichkeit, einen Einfluss auf den Leserahmen der cDNA-Inserts auszuüben. Aufgrund der Existenz von drei möglichen Leserahmen ist zu erwarten, dass maximal ein Drittel der Klone Gene im korrekten Leserahmen enthält. Diese sollten als Fusionsproteine mit dem RGSHis₆-Tag exprimiert werden und so durch den spezifischen Antikörper gegen diesen Tag detektierbar sein. Nach dem Spotting von Klonen in Flüssigmedium auf PVDF-Membranen wurde die *in situ*-Expression der rekombinanten Fusionsproteine induziert. Durch das Screening der klonalen Proteinfiler konnten 11.250 Expressionsklone detektiert werden (vgl. 3.1.1.1, Abb. 14). Dieses entspricht einem Anteil von 17,3% der 65.000 Klone der Originalbibliothek. Der Grund für die Abweichung von der erwarteten Anzahl von Expressionsklonen kann einerseits in Stopkodons im untranslatierten 5'-Bereich vor dem offenen Leserahmen seine Ursache haben. Andererseits könnten die cDNA-Inserts auch nur 3'-untranslatierte Sequenzen enthalten. Weiterhin war es möglich, dass die klonierten Gene für Proteine kodierten, die toxisch auf *E. coli* wirkten oder durch die Zelle degradiert wurden.

Bei Analyse der Sequenzen konnte festgestellt werden, dass die Klone, deren cDNA-Inserts nicht in ihrem korrekten Leserahmen exprimiert werden, gehäuft Stopkodons im korrekten Leserahmen enthalten. Dieses führt zur Expression von kurzen instabilen Polypeptiden, die wahrscheinlich in *E. coli* degradiert wurden.

Der Schritt, die Expressionsklone in der Bibliothek zu identifizieren und in ein Subset zusammenzufassen, ist sehr aufwendig. Durch die Verwendung von „*open reading frame*“ (ORF)-selektierenden Vektoren für die Erstellung einer Expressionsbibliothek könnte die Prozedur verkürzt werden. Dabei wird das cDNA-Insert in den Vektor direkt in Fusion mit einem Selektionsmarker kloniert. *E. coli*-Vektoren wurden auf der Basis der Sequenz von β -Galactosidase entwickelt (Gray *et al.* 1987). Mit diesem System konnten aber nur Inserte zwischen 100 und 1000 bp angereichert werden. In einem weiteren System für *E. coli* wurden die Inserte in Fusion mit einer Resistenz gegen Kanamycin kloniert. Aber auch hierbei konnten nur kleine Inserte (100-300 bp) als ORF-Klone angereichert werden (Davis and Benzer 1997).

Für die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde ein ORF-Vektorsystem konstruiert, welches auf C-terminaler Fusion eines HIS3-Markers basiert. Mit diesem System konnten Proteine zwischen 36 kDa (Anteil vom HIS3-Gen) und 118 kDa exprimiert werden. (Holz *et al.* 2001).

Auch vom Subset der Expressionsklone der Bibliothek wurden 100 Klone im Hinblick auf ihre Sequenz analysiert (vgl. 3.1.2.1, Tab.2). Beim Betrachten der Analyse fällt auf, dass sich die Anzahl der Klone mit gleicher Sequenz verringert hat. Es ist nunmehr nur eine Sequenz dreifach vorhanden und neun doppelt. Daraus resultiert ein erhöhter Anteil der verschiedenen Sequenzen von 81% im Expressionssubset im Gegensatz zu 71% in der Originalbibliothek.

22% der Sequenzen kodieren für Proteine, die mit T-Zellen (12%) bzw. mit Zellen des Immunsystems (19%) assoziiert sind. Neben den bereits in der Originalbibliothek erwähnten T-Zell-assoziierten Sequenzen, beispielsweise solche, die für IFN- γ (1%), Bestandteile des T-Zell-Rezeptors (1%), und eine Lymphozyten-Protein-Tyrosin-Kinase (1%) kodieren, konnten im Expressionssubset weitere identifiziert werden. Darunter befinden sich z.B. die Sequenzen der Oberflächenmoleküle CD6 und IL-1 Rezeptor, sowie einer Zytokin-induzierbaren Kinase (CNK) und Integrin- α . Murines CD6 wird besonders von T-Zellen, aber auch von Neuronen exprimiert. Dieses Oberflächenmolekül interagiert mit einem Liganden, dem Zelladhäsionsmolekül auf aktivierten Leukozyten (ALCAM). Es wird angenommen, dass die Interaktionen dieser beiden Moleküle die Proliferationskapazität von T-Zellen reguliert (Starling *et al.* 1996). Zytokine beeinflussen ihre Zielzellen, indem sie an spezifische Rezeptoren binden, welche aus zwei oder mehr Molekülen bestehen. Bei Bindung eines Zytokins kommt es zur Aggregation der Rezeptormoleküle. Darauf folgt in der Zelle eine Signalkaskade, die über Aktivierung von Kinasen zur Phosphorylierung und Aktivierung der der STAT-Moleküle („*signal transducers and activators of transcription*“), führt. Diese dienen der Genregulation (Ihle *et al.* 1995; Karnitz and Abraham 1995). STAT-6 wird aktiviert, wenn sich IL-4 an den IL-4 Rezeptor anlagert. In die Signalübertragung einiger Zytokinrezeptoren sind auch andere Signalmoleküle involviert. *Ras* ist an der Signalgebung des IL-2-Rezeptors beteiligt. Zur Initiierung dieser Signalkaskade sind auch weitere Proteine notwendig, unter anderem die Zytokin induzierbare Kinase (CNK) (Anselmo *et al.* 2002). Das „*kruppel-like*“ Protein (Klf) 6 gehört zu einer Gruppe von Zink-Finger-Proteinen, die an GC-reiche Regionen des Promotors eines T-Zell-Rezeptorgens binden (Yang *et al.* 2003). Das Protein Notch 1 ist an der Differenzierung von T-Zell-Linien aus lymphoiden Vorläuferzellen beteiligt (Huang *et al.* 2003). Integrin- α ist ein Oberflächenmolekül, welches an der Wanderung von T-Zellen zu Geweben beteiligt ist (Janeway and Travers 1997).

Unter den Sequenzen des Expressionssubsets, die mit Zellen des Immunsystems assoziiert sind, findet man - wie für die Originalbibliothek beschrieben - solche, die für Proteine des MHC kodieren. Weiterhin ist auch die Sequenz von MIP-1 β vorhanden. Zusätzlich treten die Sequenzen für „*high mobility group AT-hook 1*“ (HMGA1), X-Box bindende Protein 1, Y-Box-Protein (YB). HMGA1-Proteine spielen eine Rolle bei der Differenzierung lymphoider aus hämatopoetischen Zellen (Battista *et al.* 2003). Das X-Box bindende Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Differenzierung von Plasmazellen beteiligt ist. Weiterhin spielt er eine Rolle bei der Differenzierung von B-Zellen und bei der Regulation der Produktion von IL-6 beteiligt (Iwakoshi, 2003). Das Y-Box (YB)-Protein unterstützt die inhibitorischen Effekte von IFN- γ bei der Kollagensynthese (Higashi *et al.* 2003).

Die Analyse der Sequenzen hat gezeigt, dass in der Bank sowohl Gene vorhanden sind, die für T-Zell-spezifische Proteine kodieren, als auch Gene, die für Proteine kodieren, welche mit dem Immunsystem assoziiert sind. Des Weiteren sind Gene enthalten, die für Proteine kodieren, welche ubiquitär zu finden sind, wie Zellzyklusproteine, ribosomale und mitochondriale Proteine. Um eine definierte Aussage über die Repräsentativität der Bibliothek treffen zu können, müsste das komplette Expressionssubset analysiert werden.

Durch Untersuchung der Leserahmen der potentiellen Expressionsklone wurde festgestellt, dass 54% der Sequenzen im gleichen Leserahmen wie der RGSHis₆-Tag vorlagen. Im Gegensatz dazu konnten mittels Western-Blot bei 64% der Klone ein Expressionsprodukt nachgewiesen werden. Diese Differenz könnte dadurch zustande gekommen sein, dass bei mangelnder Sequenzqualität Verschiebungen im Leserahmen entstehen. Des Weiteren stellen einige der kleinen Proteine (ca. 6-14 kDa) vermutlich keine korrekten Expressionsprodukte dar. Es könnte sich hierbei um Fragmente im falschen Leserahmen handeln, die erst weit hinter dem RGSHis₆-Epitop Stopkodone aufweisen.

4.1.3 Screening von Proteinarrays des Expressionssubsets mit spezifischen Antikörpern

Für die weitere Charakterisierung der TH1-Expressionsbibliothek wurden Proteinarrays des Expressionssubsets mit spezifische Antikörper gegen IFN- γ , IL-12-R und MIP1- β inkubiert (vgl. 3.1.2.2).

Zytokine sind kleine, lösliche Proteine, die von einer Zelle gebildet werden und die Eigenschaften dieser Zelle oder anderer beeinflussen. Eine Gruppe der Zytokine, die Interferone, spielt bei der Antigenpräsentation durch MHC-I-Moleküle eine zentrale Rolle. Sie erhöht die Expression dieser Moleküle sowie induziert sie die Produktion von wichtigen Bestandteilen des intrazellulären Apparates, der für die Beladung der MHC-I-Moleküle mit Peptiden zuständig ist (Janeway and Travers 1997). Die beiden Gruppen der T-Helferzellen, die TH1- und TH2-Zellen unterscheiden sich in der Bildung und Sezernierung ihrer Zytokine, woraus eine unterschiedliche Funktion resultiert. IFN- γ , das wichtigste Makrophagen-aktivierende Zytokin, wird sowohl von zytotoxischen Lymphozyten als auch von TH1-Zellen gebildet. IFN- γ ist ein wichtiger Regulator der Immunantwort *in vivo* (Farrar and Schreiber 1993). Die Expression des Gens für IFN- γ ist auf transkriptioneller Ebene streng kontrolliert (Penix *et al.* 1993). IFN- γ kann die Expression von MHC-II-Molekülen bei bestimmten Zelltypen auslösen, die diese Moleküle normalerweise nicht herstellen. Dieses hat bedeutende Folgen für die Autoimmunität.

Wie unter 4.1.2 sowie 4.1.3 beschrieben, tragen 8% der Klone der Originalbibliothek ein Insert, das für IFN- γ kodiert. Dagegen liegt die Häufigkeit der für IFN- γ kodierenden Klone unter 100 Sequenzen des Expressionssubsets nur noch bei 1%. Möglicherweise ist das Protein mit dem verwendeten Expressionssystem in *E. coli* nicht löslich exprimierbar. Mittels des Antikörpers gegen IFN- γ konnten auf Proteinfiltren des Expressionssubsets fünf Klone detektiert werden (vgl. 3.1.2.2, Abb. 16) von denen zwei die für IFN- γ kodierende Sequenz trugen. Die Bindung des Antikörpers der beiden Klone konnte auf einem Western-Blot bestätigt werden (vgl. 3.1.2.2, Abb. 19). Auch die Bindung des Antikörpers an die beiden Proteine Galactosidase- β -1 sowie Glutathione Peroxidase 4 konnte wie auf dem Proteinfilter auch mittels Western-Blot bestätigt werden. Die Sequenzen zeigten aber kein übereinstimmendes lineares Epitop.

IL-12 ist ein Zytokin, welches vorwiegend von antigenpräsentierenden Zellen, besonders bei bakteriellen Infektionen, gebildet wird (Macatonia *et al.* 1995). IL-12 ist ein wesentlicher Verstärker der Expression von IFN- γ (Magram *et al.* 1996). Die Aktivierung durch IL-12 programmiert naive CD4⁺-Zellen für eine Differenzierung zu TH1-Zellen (Wurster *et al.* 2000).

Die cDNA, die in der vorliegenden Studie für die Herstellung der Expressionsbibliothek eingesetzt wurde, stammt aus TH1-Zellen. Diese differenzierten aus naiven CD4⁺-Zellen nach Stimulation mit dem Zytokin IL-12. Zytokine reagieren mit Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen. Aufgrund der vorherigen Stimulation mit IL-12 wurde angenommen, dass die T-Zellen den entsprechenden Rezeptor ausbilden und die kodierenden Sequenzen aus diesem Grunde in der Bibliothek vorliegen. Es konnten 18 Klone detektiert werden, an welche der Antikörper gegen den IL-12 Rezeptor auf den Proteinfiltren gebunden hatte (vgl. 3.1.2.2, Abb. 17). Die Analyse der Sequenzen ergab allerdings, dass keiner dieser Klone das vollständige Insert für den IL-12-Rezeptor trug (vgl. 3.1.2.2, Tab. 3). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass eventuell nur Teilfragmente in der Bibliothek exprimiert werden, welche kein lineares Epitop für die Bindung dieses Antikörpers enthalten. Die detektierten Klone, von denen mittels Western-Blot acht verifiziert werden konnten (vgl. 3.1.2.2, Abb. 20), wurden auf Übereinstimmungen analysiert. Hierbei konnte kein übereinstimmendes lineares Epitop identifiziert werden. Wie von Holzinger *et al.* (Holzinger *et al.* 1996) beschrieben, ermöglicht TBS eine teilweise Rückfaltung, wodurch native Epitope entstehen können. Dieses Phänomen kann bei der Detektion auf den Proteinfiltren der Fall gewesen sein.

MIP-1 β gehört zu einer Familie verwandter Proteine, den Chemokinen. Diese kleinen Polypeptide, welche als Reaktion auf eine Infektion sezerniert werden, werden nicht nur von Phagozyten, sondern auch von Endothelzellen gebildet. MIP-1 β wird von Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und Endothelzellen gebildet und fungiert als chemotaktischer Faktor für CD8⁺-Zellen (Janeway and Travers 1997). Der L-Tryptophan Katabolit „*picolinic acid*“ (PA) ist ein Aktivator der Effektorfunktionen von Makrophagen besitzt und induziert die Proteine Makrophagen inflammatorische Proteine-1 α und -1 β (MIPs). IFN- γ ist mit der Hemmung der Produktion intrazellulärer Zytokine assoziiert. Dieses zeigt, dass die Produktion der MIPs ein regulierter Prozess ist, der von den Interaktionen zwischen hemmenden Stimuli aus dem Immunsystem und stimulatorischen Signalen nicht-immunologischen Ursprungs abhängt (Rapisarda *et al.* 2002). MIP1- β stellt ein häufig repräsentiertes Protein in der TH1-Bibliothek dar (vgl. 3.1.1.2, Abb. 18, Abb. 21), obwohl es nicht von T-Zellen sezerniert wird. Die hohe Anzahl der Transkripte könnte auf die geringe Größe des Proteins (10 kDa) zurückzuführen sein.

4.2 Identifizierung von Targetproteinen für die Autoimmunkrankheit rheumatoide Arthritis (RA)

4.2.1 Autoimmunität und RA

Ein zentrales Forschungsgebiet der Immunologie beschäftigt sich mit der Fragestellung, wie das Immunsystem zwischen eigenen und fremden Molekülen unterscheidet. In normalen, gesunden Individuen ist das Immunsystem in der Lage, Stoffe fremder Organismen zu eliminieren, ohne dabei das körpereigene Gewebe oder zelluläre Komponenten anzugreifen. Ist dieser Mechanismus gestört, kommt es zur Aktivierung und Proliferation autoreaktiver Lymphozyten. Dieses kann zur Ausbildung einer autoimmunen Erkrankung führen (Tan 1989). Die meisten autoimmunen Erkrankungen sind durch eine polyklonale B-Zell-Antwort charakterisiert, die gegen verschiedene Autoantigene gerichtet ist. Diese Immunantworten sind häufig nicht spezifisch für eine bestimmte Krankheit (van Boekel *et al.* 2002). Im Falle der organspezifischen Autoimmunität sind die produzierten Autoantikörper gegen bestimmte Proteine gerichtet, welche nur in einem bestimmten Gewebe oder Zelltyp exprimiert werden. Im Gegensatz dazu richten sich bei der systemischen Autoimmunität Antikörper gegen Antigene aus verschiedenen Geweben oder Zellstadien (Tan 1989).

RA ist eine weltweit verbreitete Autoimmunerkrankung. Obwohl ihre Ursache noch unbekannt ist, konnten verschiedene Risikofaktoren identifiziert werden. Aufgrund des häufigeren Auftretens bei Frauen wird angenommen, dass Hormone einen Einfluss auf die Entstehung der Krankheit haben. Wie genetische Studien zeigten, bedeutet eine spezifische Expression von HLA-DR-Genen, dass eine genetische Prädisposition vorliegt. Weiterhin wird angenommen, dass auch umweltbedingte Faktoren wie infektiöse Agentien einen Einfluss haben (Gabriel 2001).

Der Verlauf der RA ist von Fall zu Fall variabel, wobei auch die Symptome veränderlich sind. Spontane Verschlimmerung bzw. Verbesserung der Symptome sind typisch. Die Diagnose von RA basiert in erster Linie auf einer klinischen Symptomatik. Dadurch ist es oft schwierig, RA in sehr frühen Stadien zu erkennen. Chemotaktische Peptide sowie Adhäsionsmoleküle auf aktivierten Synovialzellen bedingen die Einwanderung einer großen Anzahl aktivierter Leukozyten in die synoviale Membran, wodurch eine Hyperplasie sowie eine Entzündung des betroffenen Gelenkes entsteht. Dieses führt in den meisten Fällen zu einer fortschreitenden Zerstörung von Knorpel und Knochen. Schwellung und Schmerzen in den Gelenken stehen

hierbei im Vordergrund, häufig sind mehrere Gelenke betroffen. Die Krankheit ist jedoch nicht nur auf die Gelenke beschränkt. Da RA eine systemische Autoimmunerkrankung ist, können andere Teile und Organe des Körpers in einem späteren Stadium betroffen sein. Es gibt noch keine Heilung, nur die Möglichkeit, Entzündung und Schmerzen zu reduzieren und die Funktionalität der Gelenke zu erhalten. Um der starken Zerstörung des Gelenkgewebes vorzubeugen, ist der Diagnose in einem frühen Stadium der RA große Bedeutung zuzumessen. Ein krankheitsspezifischer Autoantikörper, der als serologischer Marker verwendet werden könnte, wäre hierfür sehr nützlich (van Boekel *et al.* 2002). Für die Identifizierung von Autoantikörpern, welche bei der RA eine Rolle spielen, wurde in der vorliegenden Arbeit Serumscreening auf Proteinarrays durchgeführt.

4.2.2 Proteinarrays

Die hier verwendete Methode ist eine Kombination zwischen dem Screening nach unbekanntem Zielproteinen auf Makroarrays der hEX1-Bibliothek und Screening auf Mikroarrays mit bereits identifizierten Proteinen. Hierbei besteht die Möglichkeit, neben der Bestätigung von bekannten Antigen-Antikörper-Interaktionen, auch neue, unbekannte Bindungs epitope zu identifizieren.

Nach der vollständigen Sequenzierung des menschlichen Genoms liegt das Hauptziel jetzt in der Erforschung des Proteoms. Array-Technologie repräsentiert hierfür ein vielversprechendes Werkzeug, z.B. um die Pathophysiologie und die Spezifität autoimmuner Erkrankungen zu untersuchen (Robinson *et al.* 2002b). Die Anordnung von Peptiden und Proteinen auf planaren Oberflächen mit bekannter Position erlaubt die Analyse einer Vielzahl von Proben in einem einzigen Experiment. Mikroarray-Technologie wird auch für quantitative Proteom-Forschung eingesetzt, z.B. über Protein-identifizierende Mikroarrays. Eine solche Anordnung kann verschiedene Affinitäts-Reagentien in hoher Dichte enthalten, insbesondere Antikörper. Zielmoleküle aus einer komplexen Lösung wie Serum oder Zell-Lysat werden durch die immobilisierten Proteine gebunden und daraufhin detektiert und quantifiziert (Kodadek 2001, MacBeath 2002). Mikroarrays von definierten Antigenen stellen einen speziellen Typ des direkten Immunoassays dar. Diese finden eine Anwendung in der Untersuchung komplexer Lösungen, welche Immunglobuline enthalten. Mikroarrays mit aufgereinigten Antigenen bzw. Antigen enthaltenden Extrakten wurden für Serumanalysen verwendet. So wurden unter anderem Seren auf Allergen-spezifische IgEs untersucht (Wiltshire *et al.* 2000). Auch die Quantifizierung und Charakterisierung von Autoantikörper-Antworten in Individuen mit Autoimmun-

erkrankungen (Joos *et al.* 2000, Robinson *et al.* 2002a) sowie die Serodiagnose bei Parasitenbefall und viralen Infektionen (Mezzasoma *et al.* 2002) konnten mittels der direkten Immunoassays durchgeführt werden.

4.2.3 Serumscreening

4.2.3.1 Inkubation von Filtermembranen der hEX1-Bibliothek mit Seren

Mit dem Ziel der Identifizierung von Autoantikörpern, die bei RA auftreten, wurden in der vorliegenden Studie Proteinarrays einer cDNA-Expressionsbibliothek mit Seren von 19 erkrankten Patienten sowie von neun Kontrollpatienten inkubiert (vgl. 3.2). Diese wurde von Büssow *et al.* (1998) durch Klonierung der cDNA aus humanem fötalen Hirngewebe in einen bakteriellen Expressionsvektor generiert und enthält 37.830 Expressionsklone. Während der Embryonalentwicklung werden besonders im Gehirn viele Gene exprimiert, so dass eine hieraus gewonnene cDNA-Expressionsbibliothek viele menschliche Proteine repräsentiert. Die hier verwendeten Hochdichte-Makro-Proteinarrays wurden durch Anordnung der Klone auf PVDF-Membranen erstellt, welche Proteine durch Adsorption passiv binden. Durch den Gebrauch dieser klonalen Proteinfiler steht eine Vielzahl von Proteinen gleichzeitig für die Analyse zur Verfügung, wobei die Aufreinigung der einzelnen Proben umgangen wird (Büssow *et al.* 1998).

Die biologische Funktion von Antikörpern besteht darin, an Pathogene und ihre Produkte zu binden und ihre Entfernung aus dem Körper zu erleichtern. In den meisten Fällen sind Proteine die Antigene, welche eine Immunantwort auslösen. Antikörper erkennen und binden Protein-Epitope. Werden diese Epitope durch verschiedene Teilbereiche der Sequenz gebildet, welche in der nativen Form des Proteins nebeneinander liegen, spricht man von diskontinuierlichen (bzw. Konformations-) Epitopen. Dagegen besteht ein kontinuierliches (bzw. lineares) Epitop aus einem einzigen Segment einer Polypeptidkette. Antikörper, die diskontinuierliche Epitope erkennen, binden häufig auch Peptidfragmente. Antikörper gegen lineare Epitope binden teilweise auch an das native Protein (Davies and Cohen 1996).

Die Proteine sind auf den hEX1-Membranen in denaturierter Form gebunden. Serumscreening sowie die Charakterisierung von Antikörpern können mit dem hier verwendeten Arrayformat mit denaturierten Proteinen durchgeführt werden. Hingegen ist es für weitere Anwendungen wie z.B. der Untersuchung von Protein-Protein- und Protein-Ligand-Interaktionen von Nachteil, wenn die Proteine in denaturierter Form vorliegen (Cahill 2001). Für die Untersuchung von Protein-

Funktionen mittels Mikroarrays ist es notwendig, Proteine in ihrer natürlichen gefalteten Konformation zu immobilisieren. Hierfür wurde eine Methode entwickelt, bei welcher Proteine kovalent auf Glasoberflächen gebunden werden. Die Proteine wurden im hiesigen Fall in PBS mit 40% Glycerin auf die Oberfläche aufgebracht, um die Evaporation zu verhindern (MacBeath and Schreiber 2000).

Für das Screening, der auf den Proteinfiltren detektierten potentiellen Markerproteine auf Mikroarrays, wurden die rekombinanten Proteine in denaturierter Form auf die mit Nitrozellulose beschichteten Glasoberflächen aufgebracht. Ein wesentlicher Unterschied im Screening der hEX1-Filter und der Glaschips lag darin, dass die Proteine auf den Chips in aufgereinigter Form vorlagen. Im Gegensatz dazu wurden die rekombinanten Proteine auf den Filtern direkt in den gespotteten Kolonien exprimiert und durch Lyse der Bakterien auf dem Filter gebunden. Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass durch die Bindung der Proteine an die Membran möglicherweise Antikörper-Bindungsepitope verloren gehen. Außerdem können auch durch verbleibende Zellbestandteile Epitope verdeckt werden, so dass sie für die Antikörper nicht zugänglich sind. Des Weiteren können diese Zellbestandteile durch die Bindung von Antikörpern Kreuzreaktionen hervorrufen.

Aus dem Einsatz eines Drittantikörpers, welcher für die Detektion mit alkalische Phosphatase konjugiert war, resultierte eine Signalverstärkung der gebundenen Antikörper aus den Seren. Für die Ermittlung des durch den Zweitantikörper hervorgerufenen Hintergrundes wurde eine Hybridisierung mit humanem IgG ohne Seruminkubation durchgeführt. Dieses Immunglobulin erkennt das Fc-Fragment der Antikörper und sollte keine Proteine binden. Entgegen dieser Erwartung konnte festgestellt werden, dass einige Proteine durch den Antikörper erkannt werden. Diese müssen daher ähnliche bzw. gleiche Bindungsepitope wie das Fc-Fragment besessen haben, so dass es zu Kreuzreaktionen kommen konnte. Die erkannten Proteine wurden in den folgenden Versuchen nicht weiter berücksichtigt.

Wie bereits erwähnt, wurden die Proteinarrays mit Seren von an RA erkrankten Patienten sowie von Kontrollpatienten inkubiert. Um altersbedingte sowie geschlechtsspezifische Faktoren auszuschließen, welche möglicherweise Einfluss auf das Immunsystem ausüben, wurden Kontrollpatienten gleichen Alters und gleichen Geschlechts ausgewählt. Auch in den Seren der Kontrollpatienten ist ein Pool von Antikörpern zu erwarten. Neben solchen, die durch Impfungen oder Infektionen gebildet worden sind, existieren auch in gesunden Personen die sogenannten natürlichen Antikörper (vgl. 1.2.1) sowie die natürlichen Autoantikörper. Als charakteristischer Bestandteil des normalen Immunsystems können natürliche Autoantikörper nicht als Kriterium

genutzt werden, um zwischen krankem und gesundem Zustand zu unterscheiden (Coutinho *et al.* 1995).

Die Kontrollseren stammen von Patienten, welche an Osteoarthritis (OA) bzw. an Fibromyalgie leiden. Hierbei handelt es sich ebenfalls um rheumatische Erkrankungen. OA äußert sich in einem klinischen Zustand der Gelenke, der durch Veränderungen dieser charakterisiert ist. Dabei ist die Degeneration von Knorpel und Formation von neuem Knochen zu beobachten. Aus diesen Vorgängen resultieren Schmerzen und Steifheit der betroffenen Gelenke. Am häufigsten tritt OA in der Hand, der Hüfte und im Knie auf. Die Pathogenese von OA ist multifaktorial. Verletzungen im Knorpel können zu dessen Verlust führen. Veränderungen treten häufig in den gelenkverbindenden Knorpeln der Gewichts-tragenden Teile der großen Gelenke auf (Birchfield 2001). OA gehört mit RA zu den Haupttypen von Arthritis. Obwohl beide Krankheiten durch Gelenkzerstörung charakterisiert sind, ist ihre Entstehung verschieden. In RA sind die Interaktionen zwischen Synoviozyten, Makrophagen, polymorph-nukleären Leukozyten und Chondrozyten letztlich an der Zerstörung des Knorpels beteiligt (Muller-Ladner 1996). OA hingegen ist im Wesentlichen ein degenerativer Prozess (Jüsten *et al.* 2000). Fibromyalgie ist eine Erkrankung, die durch lang anhaltende Schmerzen im Bewegungsapparat (besonders in Sehnen und Muskeln) charakterisiert ist. Die Krankheit betrifft zumeist Frauen ab dem 35. Lebensjahr. Die Ursache ist noch unbekannt, es kommt jedoch zu keiner krankhaften Veränderung in Muskeln und Sehnen. Infolge einer Erkrankung wie z.B. RA kann sekundäre Fibromyalgie auftreten (<http://www.m-ww.de/krankheiten/rheuma/fibromyalgie.html>). Durch den Vergleich und die Charakterisierung des Antikörpergehaltes in den Seren der an RA erkrankten sowie denen der Kontrollpatienten sollten alle Faktoren ausgeschlossen werden, die nicht auf die autoimmune Erkrankung zurückzuführen sind. Hierbei spielen besonders die Seren der Kontrollpatienten mit OA eine Rolle, da die Krankheit ähnliche Symptome wie RA aufweist, an denen jedoch keine autoimmunen Reaktionen beteiligt sind.

Beim Screening der Seren auf PVDF-Membranen der hEX1-Bibliothek konnten 114 Proteine identifiziert werden, gegen welche mindestens zwei an RA erkrankte Patienten und höchstens ein Kontrollpatient Antikörper gebildet hatten (vgl. 3.2.2). Diese Proteine wurden zu einem Subset zusammengefasst. Aufgrund des komplexen Krankheitsverlaufs der rheumatoiden Arthritis kann nicht davon ausgegangen werden, dass alle möglichen Autoantikörper in jedem Stadium der Krankheit in allen Patienten gebildet werden. Für die Erfassung aller potentiellen Zielproteine wurden trotz der geringen Übereinstimmung auch die Proteine in das Subset aufgenommen, an welche Antikörper von nur zwei an RA erkrankten Patienten gebunden hatten. Aufgrund der

Redundanz der hEX1-Bibliothek konnte nicht ausgeschlossen werden, dass gleiche Proteine, die von verschiedenen Klonen exprimiert werden, durch Antikörper aus verschiedenen Seren erkannt werden. Die Proteine, welche auf den Membranen detektiert werden konnten, wurden exprimiert und aufgereinigt. 86% der Proteine konnten mit Coomassie Brilliant Blau visualisiert werden (vgl. 3.2.2, Abb. 24).

4.2.3.2 Verifizierung potentieller Markerproteine mittels Screening auf Glaschips

Zur Verifizierung der gebundenen Antikörper wurden die durch Serumscreening auf den klonalen Filtern identifizierten potentiellen Markerproteine auf Nitrozellulose beschichtete Glaschips platziert. Das Spotting aufgereinigter Proteine verspricht eine höhere Sensitivität der Detektion gegenüber der Verwendung von hEX1-Membranen, da keine klonalen Rückstände mögliche Bindungsepitope verdecken. Auch die Möglichkeit, Signalstärken von Spots zu quantifizieren, ist durch Mikroarrays gegeben.

Die Verwendung von Mikroarrays für die Analyse komplexer biologischer Lösungen bietet Vorteile gegenüber konventionellen Methoden. Für die Durchführung von ELISA, Western-Blot sowie Radioimmunoassays wird eine relativ große Menge an Antigen und Patientenprobe benötigt. Genetische Studien sind nicht geeignet, um Autoantikörper zu detektieren, welche post-translationalen Modifikationen erkennen. Bei der Verwendung von Mikroarrays hingegen sind nur geringe Mengen an potentiellen Proteintargets und Patientenserum für die Charakterisierung von Autoantikörperantworten notwendig. Durch den Gebrauch eines Fluoreszenz-markierten dritten Antikörpers ist es möglich, die spezifische Bindung von Autoantikörpern in Konzentrationen von Nanogramm pro Milliliter zu detektieren. Damit ist die Methode 4 bis 8 mal sensitiver als ein konventioneller ELISA. Des Weiteren bietet diese Methode die Möglichkeit, Isotypen-Unterklassen von Antigen-spezifischen Autoantikörpern zu identifizieren, wie am Beispiel des Screenings mit Seren von SLE-Patienten gezeigt werden konnte (Robinson *et al.* 2002b).

Nach Spotting der potentiellen 114 Markerproteine auf Nitrozellulose beschichtete Glaschips und wiederholtem Screening der Seren konnten neun Klone identifiziert werden, deren Antikörperbindung ein zwei- bzw. mehrfach stärkeres Signal gegenüber den Kontrollseren hervorrief (3.2.3.2). Diese wurden auf Western-Blots bestätigt (vgl. 3.2.3.2, Abb. 28). Mögliche Erklärungen, warum von den 114 Proteinen nur neun auf den Mikroarrays bestätigt werden konnten, werden im Folgenden diskutiert.

Befinden sich die Sequenzen der Proteine nicht im gleichen Leserahmen wie der RGSHis₆-Tag, können die Produkte nicht aufgereinigt werden. Auf den klonalen Filtern können hingegen durch die polycistronische Translation in den Bakterien neben dem RGSHis₆-Epitop auch Teilprodukte in anderen Leserahmen translatiert werden, welche möglicherweise Bindungsepitope für Antikörper liefern. Auch wenn in den kodierenden Sequenzen Stopkodone enthalten sind, besteht trotzdem die Möglichkeit, dass Teilfragmente mit potentiellen Epitopen nach dem Stopkodon translatiert werden. Durch die höhere Sensitivität der Mikroarrays können Proteine auch von Antikörpern aus Kontrollseren erkannt werden, an welche auf den hEX1-Membranen scheinbar nur Antikörper aus Patientenseren gebunden haben.

4.2.3.3 Mittels Serumscreening identifizierte potentielle Markerproteine

Unter den gerade erwähnten neun Klonen waren zwei, deren Sequenzen für Proteine mit bisher uncharakterisierter Funktion kodieren, ein Klon mit der Sequenz für einen der TRAF (TNF-Rezeptor assoziierter Faktor)-Familie assoziierten Nuklearfaktor-kappaB (NFκB)-Aktivator und ein weiterer mit der Sequenz für einen Neuro-D-verwandten Faktor. Die Sequenz eines weiteren Klones kodiert für eine Kinase, welche dem IL-1 Rezeptor assoziiert ist, eine für eine ribosomale DNA-Wiederholungseinheit und eine für einen G-Protein-Signal-Regulator 19. Die Sequenz eines Klons stimmt mit der eines heterologes Kern-Ribonukleoprotein A1 (hnRNP) und die eines anderen mit der Sequenz der Komplement-Komponente C3 überein. Bei einigen Proteinen wie z.B. dem G-Protein-Signal-Regulator 19 weisen die Spots der Verdünnungsstufen ein höheres Signal im Vergleich zu den Spots der unverdünnten Proteine auf (vgl. 3.2.3.2, Tab.5, Anhang Tab. 8). Dieses lässt sich dadurch erklären, dass durch den dichtgepackten Zustand der Moleküle in der unverdünnten Konzentration Bindungsepitope verdeckt sein können bzw. die erhöhte Harnstoffkonzentration Einfluss auf die Antikörperbindungen ausübt. Die Funktion der neun detektierten Klone wird im Folgenden näher erläutert:

- NFκB (Nuklearfaktor kappaB)-Aktivator der TRAF-Familie assoziiert

Der Transkriptionsfaktor NFκB wird im Zuge einer Signalkaskade aktiviert, die z.B. bei Bindung eines Antigens an einen Oberflächenrezeptor ausgelöst wird. Durch die Aktivierung wird die Transkription spezifischer Gene in der Zelle induziert. Einige dieser Oberflächenrezeptoren gehören zu der Familie der TNF (Tumornekrosefaktor)-Proteine (z.B. CD40-Ligand), welche auf der Oberfläche der meisten T-Effektorzellen exprimiert werden (Armitage 1994).

- neuro-D-verwandter Faktor

Der neuro-D-verwandter Faktor (NDRF) gehört zu den Helix-Schleife-Helix-Proteinen, die eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren darstellen. Die Transkription des NDRF ist in einigen Bereichen des adulten Zentralnervensystems besonders hoch, was für eine Beteiligung an der Differenzierung spricht (Schwab *et al.* 2000).

- Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase 1b (IRAK)

IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinasen (IRAKs) sind zentrale Komponenten des Toll/IL-1-Rezeptor Signalwegs. Die Mitglieder der Toll/IL-1-Rezeptorfamilie sind zentrale Komponenten des Abwehrsystems vieler Vertebraten und Invertebraten. Sie spielen sowohl eine Rolle in der angeborenen als auch in der erworbenen Immunantwort, indem sie einerseits Pathogene erkennen und andererseits als Rezeptoren für proinflammatorische Enzyme fungieren (Strelow *et al.* 2003).

- G-Protein-Signal-Regulator 19

Ein G-Protein besitzt die Fähigkeit, Guaninriphosphat zu binden. In seiner inaktiven Form besteht das G-Protein aus einem an GDP gebundenen Trimer. G-Proteine sind mit Rezeptoren in der Zellmembran assoziiert. Nach Bindung von Signalmolekülen an den Rezeptor bindet das G-Protein GTP und phosphoryliert als Überträger ein Folgemolekül (Lewin, 1998).

- heterologes Kern-Ribonukleoprotein A1 (hnRNP)

Die Komplexe aus hnRN-Proteinen sind wichtige Komponenten des Spleißosoms. Sie werden aus etwa 30 verschiedenen Proteinen zusammengesetzt, welche an die prä-mRNA binden können. Unter diesen bilden die hnRNP-A/B Proteine eine Untergruppe verwandter Proteine. Die N-terminalen Regionen enthalten zwei RNA Bindedomänen, während die C-terminalen zu 50% aus Glycinresten bestehen. Diese Proteine repräsentieren eine Gruppe von Antigenen, die als Ziel von Autoantikörpern in RA, SLE und „*mixed connective tissue disease*“ (MCTD) gelten. Als diagnostische Marker können anti-hnRNP-A/B Autoantikörper nicht ausschließlich verwendet werden. Sie könnten aber zusätzliche Informationen über die Pathogenese rheumatischer Erkrankungen liefern (Steiner *et al.* 1996).

- Komplement-Komponente-C3

Das Komplement ist ein System von Plasmaproteinen, die sich kaskadenartig gegenseitig aktivieren, so dass die letzte Komponente schließlich mit gebundenen Antikörpern und Oberflächenrezeptoren interagieren kann, um bei der Beseitigung von Krankheitserregern zu helfen. Eines der Plasmaproteine wird unmittelbar durch gebundene Antikörper aktiviert, was die Kaskade von Reaktionen auslöst. Einige der aktivierten Komplement-Proteine binden kovalent an Bakterien und markieren sie so, was zur Aufnahme durch Phagozyten führt. Kleine Fragmente locken Phagozyten an und aktivieren sie (Janeway and Travers 1997). In Studien konnten mittels ELISA stärkere Bindungen von Autoantikörpern an Teile der C3-Komplement-Komponente aus Seren von RA-Patienten und SLE-Patienten gegenüber Kontrollpatienten nachgewiesen werden (Bringuier *et al.* 1984).

Aus der Literatur ist bekannt, dass RA-Patienten Autoantikörper gegen verschiedene Autoantigene produzieren, von denen eine Reihe nicht hochspezifisch für RA ist. Weiterhin kommt es bei rheumatischen Erkrankungen zur Bildung von Anti-Antikörpern, den Rheumafaktoren (RF). RFs erkennen Epitope in der Fc-Region von IgG (Mannik *et al.* 1988). IgM- und IgG-RFs werden von Plasmazellen in entzündeten synovialen Geweben gebildet und formen Komplexe mit Autoantikörpern im synovialen Gewebe. Diese Komplexe können durch Aktivierung von Komplementfaktoren weitere Entzündungsreaktionen hervorrufen (Zvaifler 1973). Solche Antikörper sind nicht spezifisch für eine bestimmte rheumatische Erkrankung bzw. auch nicht für rheumatische Erkrankungen im Allgemeinen. RFs wurden bei an RA erkrankten Personen, aber auch bei jungen und älteren gesunden Individuen, Personen mit Infektionskrankheiten (z.B. Hepatitis und Tuberkulose) und Patienten mit anderen Autoimmunkrankheiten nachgewiesen (Carson *et al.* 1981). Die pathogenen RFs können von den physiologischen durch den Isotyp, die Spezifität, die Mutationsfrequenz und die Fähigkeit zur Komplementaktivierung unterschieden werden (Bonagura *et al.* 1993, Bonagura *et al.* 1998).

Antikörper gegen das A2-Protein des heterogenen nukleären Ribonukleoprotein-Komplexes (auch mit RA33 bezeichnet) konnten bei 36% der an rheumatoider Arthritis erkrankten Personen gefunden werden (Hassfeld *et al.* 1989, Steiner *et al.* 1992). In weiteren Studien wurde gezeigt, dass diese Autoantikörper auch bei einigen anderen Krankheiten, wie z.B. Systemischem Lupus erythematosus (SLE) vorkommen (Hassfeld *et al.* 1993, Skriner *et al.* 1997). Auch Antikörper gegen Calpastatin (Despres *et al.* 1995, Mimori, 1995) und das „low-density-lipoprotein-receptor-related protein 2“ (LRP2) wurden sowohl bei rheumatoider Arthritis als auch z.B. bei

SLE und systemischer Sklerosis gefunden (Yamamoto 1992, Szomor 1995, Ooka *et al.* 2003). Unter den unspezifischen Antikörpern sind unter anderem solche gegen Knorpelproteine, wie Kollagen und Fibronectin, die ebenfalls bei Patienten mit SLE nachgewiesen werden konnten (Atta *et al.* 1995, Rönnelid *et al.* 1994).

In der Literatur findet man auch Angaben zu folgenden RA-typischen Autoantikörpern: Bei 40% der Patienten konnten Antikörper gefunden werden, die gegen das Sa-Protein gerichtet sind (Despres *et al.* 1994; Hayem *et al.* 1999). Auch Antikörper gegen p68 (AK schwere Kette bindendes Protein, BiP) (Bläß *et al.* 2001) und solche gegen das Enzym Glucose-6-Phosphat-Isomerase (Schaller *et al.* 2001) scheinen spezifisch für RA zu sein. Weiterhin treten bei RA noch Autoantikörper gegen Filaggrin (AFA) auf, welches bei der Organisation von zytoskelettalen Strukturen eine Rolle spielt (Sebbag *et al.* 1995).

Diese Antikörper wurden jedoch mittels der in der vorliegenden Studie angewendeten Methode nicht identifiziert. Die möglichen Gründe hierfür werden im Folgenden aufgeführt. Wie oben erwähnt, wurde die Expressionsbibliothek aus humanem fötalen Hirngewebe erstellt, in dem eine Vielzahl an Genen, die im Menschen exprimiert werden vorliegen. Trotzdem können einige Transkripte nicht vorhanden sein. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass bestimmte Gene in *E coli* nicht exprimiert werden bzw. toxisch für die Zelle sind. Durch das Screening von denaturierten Proteinen können wichtige Bindungsepitope für Antikörper fehlen, welche nur in nativer Form vorliegen. Des Weiteren liegen nicht alle Proteine in voller Länge vor, was zum Verlust von Epitope führen kann.

Mittels des Screenings von RA Patientenseren auf Proteinarrays der hEX1-Bibliothek sowie auf Mikroarrays mit potentiellen Markerproteinen konnten auf der einen Seite Bindungen von Antikörpern detektiert werden, die bereits in der Literatur im Zusammenhang mit autoimmunen Erkrankungen beschrieben sind. Hierzu gehört der Nachweis der Antikörper gegen das heterologe Kern-Ribonukleoprotein A1 und gegen die Komplement-Komponente-C3. Auf der anderen Seite wurden neue Antikörperbindungen z.B. an einen G-Protein-Signal-Regulator 19 sowie einen Aktivator des nukleären Faktors kappaB (NFκB) detektiert, die bisher nicht in Verbindung mit Autoimmunerkrankungen erwähnt worden sind. Die Proteine stellen potentielle neue Markerproteine dar.

4.3 Serumscreening auf Proteinarrays des Expressionssubsets der TH1-Bibliothek

Zur Anwendung kam die TH1-Bibliothek bei der Analyse des Antikörperrepertoires eines Modellsystems für murinen Systemischen Lupus Erythematosus (SLE). Hierfür erfolgte das Screening von murinen Seren auf Proteinarrays des Expressionssubsets. Verwendet wurde ein Pool von Seren eines Mausmodells für SLE und als Kontrolle ein Pool von Seren eines Kontrollstammes (vgl. 3.3).

SLE ist eine polymorphe Autoimmunkrankheit mit bislang unbekannter Ursache, die verschiedene Gewebe des Körpers beeinträchtigen kann. Durch Abwehrreaktionen gegen körpereigene Proteine kommt es zu Entzündungen in verschiedenen Organen, insbesondere Haut, Blutgefäße, Nieren und Gelenke sind betroffen. Die Auswertung epidemiologischer Studien zeigt multifaktorielle Etiologie (Wallace 2002; Hochberg 1990). Die Untersuchungen ganzer Populationen und die Verteilung der Krankheit in Familien lassen die Annahme zu, dass genetische Faktoren die Anfälligkeit für SLE erhöhen. Die genetische Basis von SLE ist jedoch sehr komplex. In vergleichenden Studien zwischen SLE-Mäusen und Kontrollmäusen wurde festgestellt, dass die Aktivität der DNase 1 in den SLE-Seren reduziert war (Napirei *et al.* 2000). Des Weiteren ist SLE assoziiert mit Abnormalitäten von Zellen, die durch Apoptose sterben (Emlen *et al.* 1994; Lopez-Hoyos *et al.* 1996). Der Anstieg zellulärer Moleküle während der Apoptose resultiert in der Produktion von Autoantikörpern (Bockenstedt *et al.* 1995). Die Krankheit ist diagnostizierbar durch den Nachweis der Existenz von Autoantikörpern gegen verschiedene nukleäre und zytoplasmatische Antigene (Steinberg and Klinman 1988).

Mittels der hier verwendeten Methode des Screenings von systematisch angeordneten Proteinen sollten Antigene, an welche spezifische Autoantikörper aus dem SLE-Modell-Serenpool binden, identifiziert werden. Unter 34 detektierten Klonen (vgl. 3.3, Tab. 6) waren drei, deren Inserts die Sequenz für eine Protein-Tyrosinphosphatase tragen. Dieses Enzym ist an einer Signalkaskade beteiligt, die bei Bindung eines Antigens an einen Oberflächenrezeptor ausgelöst wird. Das Auftreten von Autoantikörpern gegen eine Protein-Tyrosin-Phosphatase ist bereits aus der Literatur bekannt. In Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit SLE IgM-Autoantikörper gegen verschiedene Isoformen von CD45 entwickeln. Das Membranprotein CD45 katalysiert die Dephosphorylierung und zeigt an seinem zytoplasmatischen Teil eine tyrosinspezifische Phosphataseaktivität (DeFranco 1995). Es handelt sich hierbei um die wesentliche Membran-Protein-Tyrosinphosphatase auf der Oberfläche von T-Zellen und anderen

kernhaltigen hämatopoetischen Zellen. Diese Autoantikörper könnten potentiell eine Rolle bei der Entwicklung der Fehlfunktionen spielen, die in dieser Krankheit auftreten (Fernsten *et al.* 1994, Mamoune *et al.* 1998). Die Bindung der Antikörper an die Protein-Tyrosin-Phosphatase konnte mittels Western-Blot bestätigt werden (vgl. 3.3, Abb. 32B). Auch die Bildung von Autoantikörpern gegen ribosomale Proteine ist aus der Literatur bekannt. Dabei sind Antikörper gegen P-Proteine gefunden worden (Caponi *et al.* 2002) sowie solche gegen Bestandteile der 60S und der 40S Untereinheit (Desbos *et al.* 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper gegen die ribosomalen Proteine S16 und S27a sowie gegen den Ubiquitinrest eines ribosomalen Proteins in murinen SLE-Seren detektiert. Diese ribosomalen Proteine sind Bestandteile der 40S-Untereinheit. Auch auf dem Western-Blot, der mit den Seren des Kontrollpools inkubiert wurde, sind schwache Antikörperbindungen an diese Proteine zu erkennen (vgl. 3.3, Abb.32C).

Es konnten Antikörper gegen ein Protein detektiert werden, dessen Sequenz eine Übereinstimmung mit einer Proteasom-Untereinheit sowie mit einem Teil des T-Zell-Rezeptors zeigte. Auf den Proteinarrays wurden diese Antikörper nur in dem Serenpool des SLE-Modells identifiziert (vgl. 3.3, Abb. 30), wohingegen im Western-Blot auch bei der Hybridisierung mit dem Kontroll-Serenpool Antikörperbindungen nachgewiesen werden konnten (vgl. 3.3, Abb. 32C). In verschiedenen Studien konnte die Anwesenheit von Autoantikörpern gegen Proteasom-untereinheiten gezeigt werden (Arribas *et al.* 1991). Die 20S Proteasom-Untereinheit repräsentiert ein in verschiedenen Autoimmunkrankheiten häufig auftretendes Antigen. Sie kann als Marker des autoimmunen Entzündungsprozesses und/oder der Zellzerstörung angesehen werden (Egerer *et al.* 2002). Die Untereinheit C9 alpha des 20S Proteasoms stellt ein Zielantigen in SLE-Seren dar (Feist *et al.* 1996). In der vorliegenden Untersuchung konnte nicht eindeutig bestätigt werden, dass die Untereinheit alpha7/C8 ein Marker für die Krankheit ist, da auch Antikörper aus dem Kontroll-Serenpool daran gebunden haben (vgl. 3.3, Abb. 32C). Dabei ist jedoch anzumerken, dass die quantitative Abschätzung der Affinität mittels Western-Blot-Analyse meist nicht genau ist. Darüber hinaus wurde der IgG-Gehalt der Seren nicht bestimmt, wodurch die quantitative Analyse erschwert wird. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um ein Markerprotein für SLE handelt. Dafür müssten weitere Untersuchungen, z.B. ein Bindungsnachweis mittels Proteinchips oder ELISA, durchgeführt werden.

Das Fortschreiten der Krankheit wird von verschiedenen Veränderungen in der Immunantwort begleitet. Um herauszufinden, welche Korrelation zwischen abnormaler B-Lymphozyten-Aktivität und der Krankheit besteht, wurden von Jacobi *et al.* (2003) verschiedene B-Zell-Untergruppen analysiert. Hierbei konnte eine hohe Anzahl von CD27-Plasmazellen identifiziert

werden. Mittels Screenings von Proteinarrays der TH1-Bibliothek konnten in der vorliegenden Arbeit Antikörperbindungen an das CD27-Bindungsprotein festgestellt und mittels Western-Blot bestätigt werden (vgl. 3.3, Abb 32B).

Auch Antikörper gegen die β -Untereinheit der F_1 -ATP Synthase konnten im Serenpool der SLE-Mäuse identifiziert werden. Aus der Literatur ist das Auftreten dieser Autoantikörper bei Patienten mit Leberzellenkarzinom (HCC) bekannt (Le Naour *et al.* 2002). Hierbei muss einschränkend gesagt werden, dass die ATP-Synthase nicht als RGSHis₆-Fusionsprotein vorliegt. Daher scheint es sich hier eher um eine Bindung an ein artifizielles Peptid zu handeln. Dies konnte auch durch Western-Blot-Analyse bestätigt werden (vgl. 3.3, Abb 32B). Es besteht aber die Möglichkeit, dass andere Proteine auch ein entsprechendes kurzes lineares Epitop aufweisen könnten. Beim Screening der TH1-Proteinarrays konnten Antikörperbindungen an das Protein Lektin gezeigt werden. Mittels Western-Blot wurden sowohl im Serum des SLE-Modells als auch des Kontrollstammes Antikörper detektiert, welche an Lektin binden. Demnach scheint Lektin als potentiell Markerprotein für SLE nicht in Frage zu kommen. Die Relevanz des Proteins für die Krankheit kann aber auch nicht vollständig ausgeschlossen werden, da wie schon erwähnt, die quantitative Abschätzung der Affinität mittels Western-Blot-Analyse meist nicht genau ist

In der vorliegenden Studie konnten Autoantikörper durch die Anwendung von Proteinarrays der TH1-Bibliothek auch in den Seren des Mausmodells identifiziert werden. Humane Autoantikörper gegen verwandte Proteine sind bereits in der Literatur bekannt. So sind z.B. Antikörper gegen die C9 Untereinheit des 20S-Proteasoms bekannt, in der vorliegenden Studie wurden welche gegen die C7/8-Untereinheit detektiert. Darüber hinaus wurden Gene identifiziert, deren Funktion bisher noch unbekannt ist. Diese müssten in weiteren Studien als potentielle Markerproteine für die Krankheit SLE bestätigt werden. Bei Betrachtung dieser Ergebnissen lässt sich der Schluss ziehen, dass die TH1-Bibliothek eine für Serumscreening geeignete Protein-Expressionsbibliothek darstellt, da durch sie eine Vielzahl potentieller Markerproteine exprimiert werden kann.

4.4 Fazit und Ausblick

Autoantigenarrays sind eine praktikable Methode für die Analyse komplexer biologischer Lösungen. Es besteht eine Vielzahl potentieller Anwendungen. Zum einen sollen sie die frühe Diagnose von Autoimmunerkrankungen durch Screening von Seren erleichtern und somit die Möglichkeit einer frühzeitigen Behandlung geben. Zum anderen wird die Charakterisierung der Spezifität, Diversifikation und des Spektrums von Autoantikörperantworten ermöglicht. Des Weiteren können auch Isotypen-Unterklassen Antigen-spezifischer Autoantikörper für die Einschätzung ihrer Pathogenität identifiziert werden. Zudem können mittels dieser Methode auch neue Autoantigene bzw. ihre Epitope identifiziert werden.

Proteinarrays einer cDNA-Expressionsbibliothek stellen die Quelle einer Vielzahl rekombinanter Proteine dar, unter denen durch das Screening von Seren neue potentielle Marker detektiert werden können. Dieses konnte in der vorliegenden Studie durch Serumscreening von Proteinarrays einer humanen sowie einer murinen cDNA-Expressionsbibliothek gezeigt werden. Mit der Generierung weiterer Expressionsbibliotheken sollte die Anzahl an Klonen mit vollständigen Leserahmen erhöht werden.

Ein möglicher Schwerpunkt für weiterführende Experimente könnte auf der Entwicklung nativer Autoantigenarrays für die Detektion natürlicher Bindungsepitope liegen.