

Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie

Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. R. J. Ludwig

---

**Untersuchung der Autoreaktivität gegen G-Protein-  
gekoppelte Rezeptoren bei Patienten mit systemischer  
Sklerodermie**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von

Ann-Katrin Regensburger  
aus Fürth

Lübeck, 2020

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Recke

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Frohn

Tag der mündlichen Prüfung            31.08.2020

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 31.08.2020

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

# Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Aufbau des menschlichen Immunsystems.....	1
1.2	Autoimmunität - Autoimmunerkrankungen.....	3
1.3	Sklerodermie .....	5
1.4	Epidemiologie der systemischen Sklerose.....	5
1.5	Diagnostik .....	6
1.6	Klassifikation .....	7
1.7	Pathogenese der systemischen Sklerose.....	7
1.8	Therapie .....	9
1.9	Rolle der GPCRs.....	10
1.9.1	Aufbau von GPCR .....	10
1.9.2	Rolle von AT1R und ETAR .....	11
1.9.3	Rolle der Autoantikörper gegen CXCR3.....	12
1.10	Zielsetzung dieser Arbeit .....	13
2	Material und Methoden .....	15
2.1	Patientenseren .....	15
2.1.1	Patientenseren für das <i>Phage Display</i> .....	15
2.1.2	Peptide und Seren der Epitopkartierung .....	15
2.2	<i>Phage Display</i> -Technik.....	16
2.2.1	RNA-Aufreinigung aus PBMCs .....	16
2.2.2	cDNA-Synthese aus RNA .....	16
2.2.3	Herstellung der <i>scFv</i> -Fragmente mittels PCR .....	17
2.2.4	Präparation von <i>pComb3XSS</i> .....	21
2.2.5	<i>Sfi1</i> -Restriktionsverdau .....	22
2.2.6	Elektrokompetente <i>ER2537</i> -Bakterien .....	23
2.2.7	Präparation des Helferphagen <i>M13KO7</i> .....	26
2.2.8	Testligation der <i>scFv</i> -Fragmente in den Vektor <i>pComb3XSS</i> .....	27
2.2.9	Ligation der <i>scFv</i> -Bibliothek und Transformation.....	29
2.2.10	<i>Panning</i> der <i>scFv</i> -Bibliothek.....	32
2.2.11	Anzüchten von Bakterienkulturen auf Mikrotiterplatten.....	36
2.2.12	Dot Blot zum Nachweis der <i>scFv</i> -Expression in <i>E. coli</i> .....	37
2.2.13	Analyse der <i>scFv</i> -Fragment-exprimierenden Klone mittels ELISA.....	38
2.2.14	Sequenzierung von Klonen der ligierten <i>Overlap</i> -Bibliothek.....	38
2.3	Technik der Epitopkartierung.....	40
2.3.1	Lösen der Peptide.....	40

2.3.2	Peptid-ELISA zum Screenen von CXCR3-positiven Seren .....	40
2.3.3	Mischpeptid-ELISA .....	41
2.3.4	<i>In Silico</i> Vorhersage von Epitopen .....	41
2.3.5	Statistische Auswertung von Daten des Peptid-ELISAs .....	42
2.3.6	Statistische Auswertung von Daten des Mischpeptid-ELISAs .....	43
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Erstellung einer <i>scFv</i> -Antikörperbibliothek in <i>M13</i> -Phage ( <i>Phage Display</i> ).....	44
3.1.1	RNA Aufreinigung aus PBMCs.....	44
3.1.2	cDNA-Synthese aus RNA .....	44
3.1.3	Herstellung der <i>scFv</i> -Fragmente.....	45
3.1.4	Präparation von <i>pComb3XSS</i> .....	47
3.1.5	<i>Sfi1</i> -Restriktionsverdau .....	48
3.1.6	Testung der Elektrokompetenz der <i>ER2537</i> -Zellen.....	49
3.1.7	Herstellung von Helferphagen und Messung des Phagentiters .....	49
3.1.8	Testligation der <i>scFv</i> -Fragmente in den Vektor <i>pComb3XSS</i> .....	50
3.1.9	Ligation der <i>scFv</i> -Bibliothek und Transformation.....	50
3.1.10	Keine Anreicherung spezifischer Binder mittels des Phagen- <i>Pannings</i> .....	51
3.1.11	Nachweis korrekt exprimierter <i>scFv</i> mittels Dot Blot.....	53
3.1.12	Fehlender Hinweis auf eine Anreicherung spezifischer <i>scFv</i> -exprimierender Klone mittels ELISA .....	54
3.1.13	Sequenzierung zeigt ungenügendes ligiertes <i>Overlap</i> -Produkt .....	55
3.2	Epitopkartierung von CXCR3.....	57
3.2.1	Lösen der Peptide.....	57
3.2.2	CXCR3-Epitopdedektion mittels Peptid-ELISA.....	59
3.2.3	Mischpeptid-ELISA verifiziert zuvor detektierte Epitope mit einer guten Leistung .....	65
4	Diskussion .....	67
4.1	Erstellung der <i>scFv</i> -Antikörperbibliothek in <i>M13</i> -Phagen.....	67
4.2	Identifizierung der SSc-spezifischen Epitope auf CXCR3 .....	76
4.3	Klinische Relevanz und Ausblick .....	82
5	Zusammenfassung .....	83
6	Literaturverzeichnis.....	85
7	Danksagung.....	94
8	Eidesstattliche Erklärung.....	95
9	Lebenslauf .....	96
10	Anhänge .....	98
10.1	Materialien.....	98

10.1.1	Verwendete Kits.....	98
10.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	98
10.1.3	Verwendete Laborgeräte.....	99
10.1.4	Reagenzien und Chemikalien .....	101
10.1.5	Verwendete Medien und Lösungen.....	101
10.1.6	Antikörper .....	102
10.1.7	Enzyme.....	102
10.1.8	Bakterienstämme .....	102
10.1.9	Helferphage .....	103
10.1.10	Plasmide/ Vektor.....	103
10.1.11	Primer .....	103
10.2	Publikation der Arbeit .....	105

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Aufbau eines menschlichen IgG-Antikörpers. ....	3
Abbildung 2 – Rolle von Anti-AT1R und Anti-ETAR in der Pathogenese der SSc. ....	12
Abbildung 3 – pCOMB3xss. ....	21
Abbildung 4 – Agarosegelelektrophorese der VH-PCR. ....	46
Abbildung 5 – Agarosegelelektrophorese der V <sub>K</sub> -PCR. ....	46
Abbildung 6 – Agarosegelelektrophorese der V <sub>λ</sub> -PCR. ....	46
Abbildung 7 – Agarosegelelektrophorese der Overlap-PCRs. ....	47
Abbildung 8 – Agarosegelelektrophorese vor und nach Verdau des Vektors. ....	49
Abbildung 9 – M13KE-Phagenplaques auf LB-Medium. ....	50
Abbildung 10 – Die Titeranalyse des Phagen-Pannings zeigt keine Anreicherung von Phagen, die an AT1R binden. ....	52
Abbildung 11 – Die Titeranalyse des Phagen-Pannings zeigt keine Anreicherung von Phagen, die an ETAR binden. ....	53
Abbildung 12 – Kontrolle der Expression von scFv in E. coli-Klonen der scFv- Primärbibliothek. ....	54
Abbildung 13 – Sequenzierung der in den Vektor ligierten scFv mit Hilfe der Primer ompseq (VL) und HRML-F (VH). ....	56
Abbildung 14 – Roh-ELISA-Daten. ....	61
Abbildung 15 – Vergleich der Bindungsverhalten von Seren der SSc-Patienten und der Kontrollseren an die einzelnen Peptide. ....	62
Abbildung 16 – Serpentinmodell von CXCR3. ....	63
Abbildung 17 – Mischpeptid-ELISA. ....	65

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ACR/EULAR-Klassifikationskriterien für SSc 2013 .....	7
Tabelle 2: Übersicht über die SSC-Patientenseren für das <i>Phage Display</i> .....	15
Tabelle 3: Reaktionsansatz PCR - Vervielfältigung der leichten und schweren Ketten .....	18
Tabelle 4: Reaktionsansatz PCR - Overlap .....	20
Tabelle 5: Verdau .....	22
Tabelle 6: Komponenten des Minimal-Medium-Agars .....	24
Tabelle 7: Testligation der <i>scFv</i> -Fragmente in den Vektor <i>pComb3XSS</i> .....	28
Tabelle 8: Kontrollligation 1 ( <i>Insert</i> -Kontrolle).....	28
Tabelle 9: Kontrollligation 2 (Test für Selbstligation).....	29
Tabelle 10: Ligation der <i>scFv</i> in <i>pComb3XSS</i> .....	29
Tabelle 11: Auftragungsmuster der Peptide und Kontrollen .....	40
Tabelle 12: Konzentration der totalen RNA .....	44
Tabelle 13: Transformation in elektrokompetente <i>ER2537</i> .....	51
Tabelle 14: <i>AT1R-Panning</i> .....	52
Tabelle 15: <i>ETAR-Panning</i> .....	53
Tabelle 16: Charakteristik der Peptidfragmente von CXCR3 .....	57
Tabelle 17: Übersicht SSc-Patienten .....	59
Tabelle 18: Peptidfragmente von CXCR3 mit signifikantem Unterschied in der Regressionsanalyse und Auswahl für den Mischpeptid-ELISA .....	64

# Abkürzungsverzeichnis

ACE-Inhibitoren	<i>Angiotensin-Converting-Enzyme</i> -Inhibitoren
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ANA	Antinukleäre Antikörper
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
AT1R	Angiotensin II Typ I Rezeptor
AUC	<i>Area under the curve</i> (Fläche unter der Kurve)
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL18	<i>CC chemokine ligand 18</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (Komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CDRs	<i>Complementary determining regions</i> (komplementaritätsbestimmende Regionen)
CXCL9/10/11	<i>C-X-C motif chemokine 9/10/11</i>
CXCR3/4	<i>C-X-C motif chemokine receptor 3/4</i> (C-X-C motif chemokine-Rezeptor 3/4)
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dSSc	diffuse systemische Sklerose
E.coli	Escherichia coli
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinases 1/2 (extrazellulär-regulierte Kinase 1/2)
ETAR	Endothelin Typ A Rezeptor
ETBR	Endothelin Typ B Rezeptor
ET1	Endothelin 1
ET1AR	Endothelin-1 A Rezeptor
ET1BR	Endothelin-1 B Rezeptor
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
Fab	<i>fragment antigen binding</i> (Antigenbindungsstelle)
Fc	<i>fragment crystallizable</i> (kristallisierbare Fragmentregion)
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)

HLA	<i>human leukocyte antigens</i> (Histokompatibilitätsantigen)
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
ISSc	limitierte systemische Sklerose
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (Boten-RNA)
NaCl	Natriumchlorid
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor-kappaB</i>
NK	Negativkontrolle
NLRP3	<i>NOD-like Receptor family, Pyrin domain containing 3</i>
NLR	<i>NOD-like Rezeptor</i>
OD450/600	Optische Dichte bei 450/600 nm
PAH	Pulmonale arterielle Hypertonie
Pai-1	Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate buffered saline-Tween</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDGFR	<i>platelet derived growth factor receptor</i> (aus Blutplättchen stammender Wachstumsrezeptor)
PDE5-Inhibitoren	Phosphodiesterase-5-Inhibitoren
Pfu	Plaque Forming Unit (Plaque formende Einheit)
pI	isoelektrischer Punkt
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (reaktive Sauerstoffradikale)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
Rpm	<i>rounds per minute</i> (Runden pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SSc	systemische Sklerose
scFv	<i>single chain variable fragments</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLR	<i>Toll-like Rezeptor</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird auf die gleichzeitige Verwendung geschlechtsspezifischer Sprachformen verzichtet.

Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichermaßen für alle Geschlechter.

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau des menschlichen Immunsystems

Unsere Immunität wird in zwei Arten von Abwehrmechanismen, die zelluläre und die humorale Immunität, eingeteilt. Die Ausführung dieser Abwehrmechanismen erfolgt durch miteinander in Kontakt stehende Abwehrsysteme. Es gibt das unspezifische, angeborene und das spezifische, erworbene System. Diese beiden Systeme kommunizieren durch lösliche Faktoren wie Zytokine und Zell-Zell-Kontakte und sind dadurch im ständigen Austausch (Böcker et al. 2012).

Das angeborene Immunsystem bildet mit anatomischen und chemischen Barrieren die erste Abwehrlinie. Bei deren Durchbrechen kommt es durch molekulare Strukturen der Mikroorganismen und chemische Signale, wie zum Beispiel das Vorhandensein von Adenosintriphosphat im extrazellulären Raum als Zeichen der Zellschädigung, zur Aktivierung von Sensorzellen. Diese Aktivierung geschieht über angeborene Mustererkennungsrezeptoren wie beispielsweise die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und die NOD-like-Rezeptoren (NLRs). Bei den TLRs handelt es sich um Transmembranproteine, während die NLRs zytoplasmatische Proteine sind, die eine intrazelluläre Invasion von Bakterien erkennen können. Die Sensorzellen sind Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen oder dendritische Zellen. Diese können mittels Effektoraktivitäten, etwa durch die Abtötung von Zellen oder durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Zytokinen und Chemokinen, wirken. Es gibt Zytokine, welche eine direkte antivirale Aktivität besitzen. Zudem beeinflussen die Entzündungsmediatoren andere Immunzellen wie angeborene natürliche Killerzellen und lymphatische Zellen, welche ins Zielgewebe geleitet werden. Dies wird als Chemotaxis bezeichnet. Chemotaktisch aktive Zytokine werden auch Chemokine genannt. Alle Rezeptoren der Chemokine sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Chemokine initiieren einen Signalweg, welcher zu Veränderungen der Zelladhäsion und des zellulären Zytoskelettes führt; es kommt zu einer gerichteten Bewegung. Eine Produktion von Chemokinen findet nicht nur durch Zellen des Immunsystems, sondern auch durch viele andere Zellen statt. So gibt es auch Chemokine, welche an der Entwicklung und Wanderung der Lymphozyten oder bei dem Wachstum neuer Blutgefäße beteiligt sind (Böcker et al. 2012, Murphy und Weaver 2018).

Das erworbene Immunsystem ist ein spezifisches System und hat ein immunologisches Gedächtnis, was bei einem Zweitkontakt mit einem fremden Antigen eine schnellere Reaktion ermöglicht. Auch das erworbene Immunsystem weist zelluläre und humorale

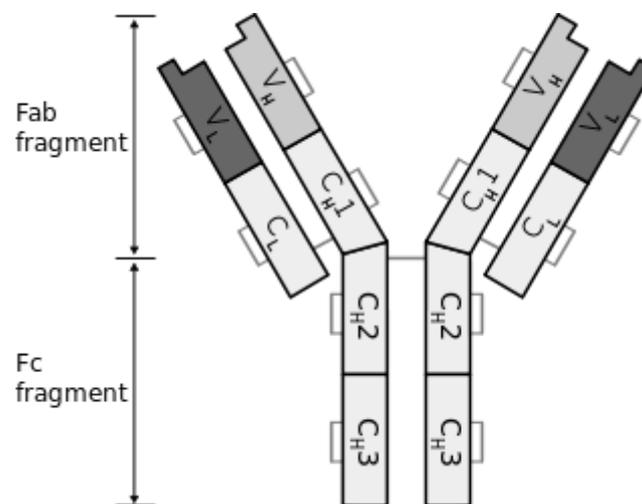
Abwehrmechanismen auf. Wichtige Komponenten der zellulären Immunität sind unter anderem T-Zell-Subpopulationen. Diese eliminieren infizierte Zellen direkt oder aktivieren Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen und damit die Phagozytose. Die humorale Immunität basiert im Wesentlichen auf der Produktion von Antikörpern durch B-Zellen (Böcker et al. 2012). Nach dem Binden eines Antigens an den B-Zell-Rezeptor bildet die B-Zelle mittels Proliferation und Differenzierung Plasmazellen. Diese sind die Effektorform der B-Zelle, welche Antikörper mit derselben Antigenpezifität wie der Spezifität des B-Zell-Rezeptors der Plasmazelle produziert (Murphy und Weaver 2018).

Antikörper sind von besonderer Bedeutung bei der Abwehr extrazellulärer Erreger. Sie sind heterodimere Proteine und bestehen in ihrer monomeren Form aus zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen leichten Ketten. Diese Ketten werden durch Disulfidbrücken zusammengehalten. Es gibt zwei Typen von leichten Ketten,  $\kappa$  und  $\lambda$ , welche nach ihrer konstanten Region eingeteilt werden (Böcker et al. 2012). Je Immunglobulin findet sich nur eine Art von leichter Kette. Es konnten keine funktionellen Unterschiede zwischen Antikörpern mit  $\kappa$ - und solchen mit  $\lambda$ -Ketten festgestellt werden (Murphy und Weaver 2018). Schwere und leichte Ketten setzen sich jeweils aus einer konstanten Region und einer variablen Region zusammen, wobei die Spezifität der Bindung an Oberflächenstrukturen durch den variablen Teil bestimmt wird. Der antigenbindende Bereich der Antikörper besteht aus sechs komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDRs) oder hypervariablen Regionen, drei in der leichten und drei in der schweren Kette (Hoogenboom 2005).

Eine hohe Variabilität an Antikörpern wird durch ein Genarrangement während der Reifung der B-Zell-Vorläuferzellen im Knochenmark erreicht (Böcker et al. 2012). Es gibt vier grundlegende Mechanismen, welche für die Erzeugung einer Vielfalt an Immunglobulinen von Bedeutung sind. Zum einen können die verschiedenen Genabschnitte unterschiedlich kombiniert werden. Dies nennt man kombinatorische Diversität oder V(D)J-Rekombination. Die V-, D- und J-Gen-Segmente liegen in zahlreichen Kopien vor. Jede dieser Kopien kann Teil eines Gens für eine variable Immunglobulinregion werden. Durch unterschiedliche Segmentkombinationen entstehen sehr viele diverse variable Regionen (Murphy und Weaver 2018). Bei den schweren Ketten findet eine Rekombination aus unterschiedlichen V-, D- und J-Gen-Segmenten, bei den leichten Ketten aus unterschiedlichen V- und J-Gen-Segmenten statt (Hoogenboom 2005). Zudem wird durch das Hinzufügen und Entfernen von Nukleotiden während der Rekombination eine junktionale Diversität erzeugt. Die Vielfalt wird durch unterschiedliche paarige Kombinationen der variablen Regionen der schweren und leichten Ketten zur Bildung der Antigenbindungsstelle zusätzlich erhöht. Zuletzt kommt es zu einer

somatischen Hypermutation, welche nach Auslösen einer Immunantwort, bei B-Zellen stattfindet und zu Punktmutationen in den ungeordneten Genen der variablen Regionen führt. Bei der konstanten Region, auch Fragment, kristallisierbar (Fragment, crystallizable (Fc))-Fragment genannt, werden lediglich fünf Formen, welche man auch als Klassen oder Isotypen bezeichnet, unterschieden (Murphy und Weaver 2018).

Die konstante Region ist entscheidend für die funktionelle Eigenschaft, also den ausgelösten Effektormechanismus, eines Antikörpers. Die fünf durch die konstante Region definierten Klassen sind Immunglobulin M, Immunglobulin D, Immunglobulin G, Immunglobulin A und Immunglobulin E (Murphy und Weaver 2018). Der exemplarische Aufbau eines IgG-Antikörpers ist in der Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1 – Aufbau eines menschlichen IgG-Antikörpers.**

IgG-Antikörper sind etwa 150 kDa groß. Sie bestehen aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, welche durch inter- und intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert werden. Die schweren Ketten enthalten eine variable Domäne ( $V_H$ ), ein Schanier und drei konstante Domänen ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ ). Die leichten Ketten bestehen aus einer variablen Domäne ( $V_L$ ) und einer konstanten Domäne ( $C_L$ ). Der Aufbau des IgG-Antikörpers kann auch in eine *Fab*-Region und eine *Fc*-Region gegliedert werden. Die *Fab*-Region besteht aus einer konstanten und einer variablen Domäne sowohl der leichten Kette ( $V_L$  und  $C_L$ ) als auch der schweren Kette ( $V_H$  und  $C_{H1}$ ). Die *Fc*-Region besteht aus zwei konstanten Domänen ( $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ ). Die Spezifität der Antikörper wird durch ihre variablen Domänen vermittelt und durch die Antigenbindungsstelle (*Fab*-)Region repräsentiert. Die variablen Domänen können weiter unterteilt werden in hypervariable Regionen oder komplementaritätsbestimmende Regionen (*CDR*), die direkt an das Antigen binden, und Rahmenregionen, die als Gerüst für die Kontaktaufnahme der *CDR*s dienen (Bildquelle: (Wikimedia 2018)).

## 1.2 Autoimmunität - Autoimmunerkrankungen

Etwa 4,6–20,4 % der Bevölkerung scheinen eine Autoimmunerkrankung zu entwickeln (Lerner et al. 2015). Die Autoimmunität ist eine Immunantwort gegen Komponenten, Autoantigene, des eigenen Körpers, welche über autoreaktive T-Zellen und Autoantikörper vermittelt wird (Böcker et al. 2012). Autoimmunerkrankungen werden häufig durch den Verlust der immunologischen Selbsttoleranzmechanismen beschrieben

(Goodnow et al. 2005). Es kommt zum Verlust der Erkennung von „körpereigen“ und „körperfremd“. Die genaueren Mechanismen sind noch kaum bekannt (Böcker et al. 2012). Die meisten Immunologen glauben, dass, um wirklichen Fortschritt im Verständnis und der Therapie von Autoimmunerkrankungen zu erwirken, geklärt werden muss, weshalb manche Proteine Autoantigene sind und andere nicht (Carl et al. 2005).

Autoimmunerkrankungen sind durch die Produktion einer breiten Palette an Autoantikörpern gekennzeichnet. Es wird angenommen, dass zur Entwicklung der Autoimmunität verschiedene genetische, mikrobielle und immunologische Faktoren beitragen. Ein bekannter prädisponierender Faktor ist eine unverhältnismäßig hohe Frequenz bestimmter Allele für Gewebsantigene, sogenannte Histokompatibilitätsantigene (HLAs). Diese HLAs sind in der Zellmembran von Leukozyten verankerte Glykoproteine und von besonderer Bedeutung in der Erkennung von Selbst- und Fremdproteinen. Auch Infektionen oder eine fehlerhafte T-Zell-Toleranz können die Entstehung von Autoimmunität beeinflussen. So kann es zum Beispiel zu *molekularer Mimikry* kommen, also einer Kreuzreaktion zwischen mikrobiellen Antigenen und ähnlichen Selbstpeptiden, was zur Aktivierung autoreaktiver T-Zell-Klone führt. Hinzu kommt die Beeinflussung der Immunreaktion durch hormonelle Veränderungen. Frauen leiden im Vergleich zu Männern wesentlich häufiger an Autoimmunerkrankungen. Ein Teil dieses Phänomens könnte über die immunstimulierende Wirkung der Östrogene erklärbar sein. Um der Definition einer Autoimmunerkrankung zu entsprechen, muss die Autoimmunreaktion zur Gewebeschädigung führen. Autoimmunerkrankungen können sowohl organ- oder gewebespezifische Schäden als auch eine generalisierte Erkrankung hervorrufen. Das Spektrum an Autoimmunerkrankungen ist weit (Böcker et al. 2012).

Auch die systemische Sklerose (SSc) ist eine Autoimmunerkrankung. Sie wird zu der Gruppe der Kollagenosen gezählt. Die Kollagenosen sind systemische Autoimmunerkrankungen, welche sich insbesondere am Bindegewebe manifestieren. Sie führen zur Beteiligung innerer Organe, zeigen ein typisches Muster in der Kapillarmikroskopie, betreffen häufiger Frauen und weisen im Labor typischerweise antinukleäre Antikörper (ANAs), Autoantikörper gegen Bestandteile des körpereigenen Zellkerns, auf. Auch das Raynaud-Syndrom, bei dem es sich um einen Vasospasmus in den Akren als Antwort auf Kälte handelt, ist ein typisches Krankheitszeichen. Zu den Kollagenosen werden der systemische Lupus erythematoses, das Sjögren-Syndrom, die Polymyositis und die Dermatomyositis, die Sklerodermie sowie Mischkollagenosen gezählt. Die SSc gehört zu der Untergruppe der Sklerodermie (Böcker et al. 2012, Herold 2014).

## 1.3 Sklerodermie

Sklerodermie wird definiert durch die Anwesenheit von verdickten fibrotischen Läsionen. Man unterscheidet lokalisierte und systemische Formen. Lokalisierte Formen sind die lineare Sklerodermie, die zirkumskripte Sklerodermie vom Typ „en coup de sabré“, die lokalisierte Morphea und die generalisierte Morphea. Die Morphea ist eine umschriebene Sklerodermie der Haut. Typischerweise zeigt sie lilafarbene Ringe und betrifft keine inneren Organe. Während die fibrotischen Prozesse in der lokalisierten Sklerose oft auf Haut und Hautanhangsgebilde beschränkt sind, können in der systemischen Form verschiedenste Organe involviert sein. Die SSc ist eine Systemerkrankung des Bindegewebes. Sie ist gekennzeichnet durch Endotheldysfunktionen, mikrovaskuläre Schäden, chronische Entzündungen und eine exzessive Ansammlung von strukturell normalerweise extrazellulär liegenden Matrixproteinen in der Haut und den Organen der betroffenen Patienten. Es kommt zu einer Obliteration kleiner Gefäße mit Haut- und Organinfarkten (Klein-Weigel et al. 2011, Herold 2014). Zudem ist die SSc gekennzeichnet durch eine erhöhte Mortalität aufgrund der Nieren- oder Lungenbeteiligung (van den Hoogen et al., 2013).

## 1.4 Epidemiologie der systemischen Sklerose

Die Prävalenz der SSc ist 5-24:100 000 und die jährliche Inzidenz ist 1-5:100 000. Hierbei ist die Prävalenz von der SSc in den Vereinigten Staaten mit etwa 240 pro Millionen erwachsene Einwohner höher als in Kontinentaleuropa, im Vereinigten Königreich und in einigen Gebieten Asiens. Meist tritt sie zwischen dem 30. – 50. Lebensjahr auf (Mayes 2003, Lawrence et al. 2004, Klein-Weigel et al. 2011). Man unterscheidet fünf Verlaufsformen der SSc: Etwa 33 % der Patienten haben eine diffuse und 45 % eine limitierte systemische Sklerose, das Overlap-Syndrom und die undifferenzierte Sklerodermie kommen je zu etwa 10 %, die Sclerosis sine Scleroderma zu 2 % vor (Herold 2014). Frauen sind etwa fünfmal häufiger betroffen als Männer (Böcker et al. 2012). Bei der limitierten Form der SSc können die Hände, Unterarme, Füße, Unterschenkel sowie das Gesicht und der Hals, bei der diffusen Form zusätzlich die Oberarme, die Oberschenkel und der Rumpf betroffen sein. Zudem schreitet die diffuse Form schneller fort und hat eine schlechtere Prognose. Es gibt jedoch auch Varianten der limitierten Form, welche mit einer pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH), einer signifikanten Lungenfibrose oder einer Nierenkrise, wobei es sich um eine anfallsartige Verschlechterung der Nierenfunktion handelt, einhergehen. Diese Varianten zeigen eine schlechtere Prognose, für welche insbesondere das Ausmaß der Beteiligung von Lunge

und Niere entscheidende Parameter darstellen. Das CREST-Syndrom gilt als eine Variante der limitierten Form und ist definiert durch das Vorhandensein von Kalkablagerungen in der Haut, dem Raynaud-Phänomen, einer Dysmotilität des Ösophagus, Sklerodaktylie und Teleangiektasien (Klein-Weigel et al. 2011).

## 1.5 Diagnostik

Die Diagnose der SSc erfolgt zunächst über die Klinik mit den klassischen Hautveränderungen und dem Raynaud-Syndrom. Ein weiterer wichtiger Parameter ist das Vorhandensein typischer Antikörper im Labor. Diverse ANAs können als Biomarker für die Klassifikation und als Prognoseindikator genutzt werden. Ihre Rolle in der Entwicklung der Gewebepathologie und den Organdysfunktionen ist jedoch unklar (Berger und Steen 2017). Die am häufigsten gefundenen Antikörper sind Anti-Centromer- bei 15 %–43 %, Anti-Topoisomerase I- (Anti-Scl70) bei 21 %–34 %, Anti-RNA Polymerase III- bei 5 % und anti-RNP-Antikörper bei 5 % der Patienten. Anti-Centromer-Antikörper sind mit den limitierten kutanen Formen und einer längeren Zeit bis zum Auftreten viszeraler Komplikationen assoziiert. Anti-Centromer-Antikörper-positive Patienten haben häufiger eine PAH, jedoch treten viele andere Manifestationen seltener auf. Zudem haben sie eine geringere Sterblichkeitsrate. Anti-Topoisomerase I- (Anti-Scl70-) Antikörper sind mit den diffusen kutanen Formen der SSc assoziiert. Außerdem haben Patienten mit diesen Antikörpern eine schlechtere Prognose aufgrund einer verstärkten Beteiligung der Lunge und des Herzens. Sie entwickeln früher ein Raynaud-Syndrom und haben ein ausgeprägteres kutanes Erscheinungsbild. Antikörper gegen Anti-RNA Polymerase I und III sind mit den diffusen kutanen Formen, der Nierenkrise und dem Auftreten von Sehnenkontrakturen assoziiert. Anti-U1RNP Antikörper werden zu 90 % bei Mischkollagenosen gefunden und sind oft mit dem Auftreten von weiteren Antikörpern (anti-SSA, anti-SSB) verbunden (Desbois und Cacoub 2016).

Außerdem findet bei der Diagnostik der SSc die Kapillarmikroskopie Anwendung. Hier können sich unter anderem dilatierte Rieskapillaren, eine Rarefizierung der Kapillaren oder auch die Zunahme von avaskulären Feldern und das Auftreten von Einblutungen zeigen (Herold 2014).

Die Organbeteiligung wird über die Kreatinin-Clearance, einen Urinstatus, die Lungenfunktion mit Diffusionskapazität, die Echokardiografie und die Ösophagusdiagnostik untersucht (Herold 2014).

## 1.6 Klassifikation

Die im Jahr 2013 vorgestellten gemeinsamen Klassifikationskriterien des *American College of Rheumatology* (ACR) und der *European League Against Rheumatism* (EULAR) (Tabelle 1) für die SSc erlauben die Klassifikation einer SSc ab 9 Punkten mit einer Sensitivität und einer Spezifität von etwa 90 %. Sie dienen der Klassifizierung von Patienten für Studien, nicht als Diagnosekriterien (van den Hoogen et al. 2013, Herold 2014).

**Tabelle 1: ACR/EULAR-Klassifikationskriterien für SSc 2013**

Kriterien	Subkriterien	Punkte
Hautverdickung beider Hände proximal der Fingergrundgelenke	-	9
Hautverdickung der Finger (nur höheren Wert zählen)	Geschwollene Finger	2
	Sklerodaktylie der Finger (distal der Fingergrundgelenk)	4
Fingerspitzenläsionen (nur höheren Wert zählen)	Digitale Ulzerationen	2
	Grübchenförmige Narben der Fingerspitzen	3
Teleangiektasien	-	2
Abnormale Nagelfalzkapillaren	-	2
Lungenbeteiligung	PAH <sup>1</sup> u./o. interstitielle Lungenerkrankung <sup>2</sup>	2
Raynaud-Syndrom	-	3
Sklerodermie assoziierte Antikörper	Anti-Centromere-, Anti-Topoisomerase I- (Anti-Scl-70) oder anti-RNA-Polymerase III-AK	3

1) Die PAH wird durch eine Rechtsherzkatheterisierung nachgewiesen.

2) Die interstitielle Lungenerkrankung ist entweder als eine Lungenfibrose in der Bildgebung, oder als ein spezielles Auskultationsgeräusch, welches nicht auf eine kongestive Herzinsuffizienz zurückzuführen ist, definiert.

## 1.7 Pathogenese der systemischen Sklerose

Die Ätiologie der SSc ist unbekannt. Es finden sich Assoziationen zu bestimmten HLA-Allelen und eventuell spielen Umweltfaktoren eine Rolle (Klein-Weigel et al. 2011, Herold 2014). Es gibt drei entscheidende Prozesse, welche an der Pathophysiologie beteiligt sind. Diese sind die mikrovaskulären Dysfunktionen und Schäden, die Störungen der zellulären und humoralen Immunität und die Überproduktion von extrazellulären Matrixproteinen (Klein-Weigel et al. 2011).

Es existieren signifikante Hinweise auf eine Hochregulation der angeborenen Immunantwort über die Aktivität von Toll-like-Rezeptoren und dem *NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3-* (NLRP3)-Inflammasom. Inflammasome sind

zytosolische Proteinkomplexe des angeborenen Immunsystems, welche in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten durch unterschiedliche Reize aktiviert werden können. Diese gesteigerte Aktivität der Toll-like-Rezeptoren und des NLRP3-Inflammasoms scheint als Startpunkt in einer Kaskade von Signalereignissen zu dienen, welche in einer exzessiven extrazellulären Matrix-Proteinproduktion und damit Fibrose resultieren (Henderson et al. 2018).

Zudem enthalten die Seren von Patienten mit SSc vielfältige Antikörper, wie bereits unter 1.5 beschrieben. Es handelt sich unter anderem um ANAs gerichtet gegen Topoisomerase I-, RNA Polymerase III und Zentromerprotein. Die Prävalenz dieser Antikörper unterscheidet sich auch geografisch, wobei die beschriebenen klinischen Assoziationen weitgehend gleich bleiben. Die Relevanz der ANAs für die Diagnosestellung und die Beteiligung innerer Organe wird auch durch ihre Aufnahme in die Klassifikationskriterien (Tabelle 1) deutlich. Es konnte eine Assoziation zwischen Antikörpern gegen die RNA Polymerase III und vaskulären Ektasien des Magenantrums festgestellt werden. Zudem scheint ein zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Antikörpern gegen die RNA Polymerase III und einer Krebsdiagnose bei einem Teil der Patienten zu bestehen, was auch eine pathogenetische Relevanz einiger ANAs vermuten lässt (Domsic 2014).

Bei der Entstehung rheumatologischer Erkrankungen scheint jedoch insbesondere das Auftreten von spezifischen, funktionell aktiven Autoantikörpern gegen GPCR und Tyrosinkinase-gekoppelte Rezeptoren von entscheidender pathogenetischer Bedeutung (Loebel et al. 2016).

Das Vorhandensein von funktionellen Autoantikörpern gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wurde erstmals 1980 in einer Studie berichtet. Hier zeigte sich eine Beeinflussung der Rezeptorsensitivität mittels antagonistischer Autoantikörper gegen den gekoppelten  $\beta$ 2-Rezeptor bei Patienten mit Rhinitis und Asthma (Venter et al. 1980).

Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren scheinen die Funktion der Rezeptoren zu regulieren und das Ausmaß der Autoimmunerkrankung zu beeinflussen. So konnten bei dem chronischen Fatigue-Syndrom erhöhte Autoantikörperspiegel gegen GPCRs wie  $\beta$ 2-Rezeptoren und muskarinische Rezeptoren gefunden werden (Loebel et al. 2016). Auch das Sjögren-Syndrom scheint mit dem Vorhandensein von funktionellen Autoantikörpern gegen muskarinische Rezeptoren einherzugehen (Kovács et al. 2005).

Charakteristische GPCR-Autoantikörper bei SSc sind gegen Angiotensin II Typ I Rezeptor (AT1R), Endothelin Typ A Rezeptor (ETAR), *C-X-C motif chemokine*-Rezeptor 3 (CXCR3), *C-X-C motif chemokine*-Rezeptor 4 (CXCR4) und muskarinische Rezeptoren gerichtet. Typische Antikörper gegen Thyrosinkinase-gekoppelte Rezeptoren sind

Antikörper gegen den aus Blutplättchen stammenden Wachstumsrezeptor (PDGFR). Die Antikörper gegen AT1R und ETAR scheinen dabei dieselben Signalwege aktivieren zu können wie ihre endogenen Liganden (Riemekasten et al. 2011, Riemekasten und Cabral-Marques 2016, Berger und Steen 2017, Cabral-Marques und Riemekasten 2017, Weigold et al. 2018). Man findet Autoantikörper gegen GPCRs auch bei gesunden Patienten, wobei die Konzentration bei diesen typischerweise niedriger ist als bei SSc-Erkrankten (Riemekasten et al. 2011, Cabral-Marques und Riemekasten 2017). Außerdem scheinen sie bei Glaukom, Herzerkrankungen wie der Peri- und Myokarditis, Präeklampsie, Alzheimer, Sjögren-Syndrom, einigen Fällen des metabolischen Syndroms, Nierenerkrankungen und auch bei Nierentransplantationen von Bedeutung zu sein. So konnte unter anderem in einer Studie festgestellt werden, dass ein nicht-HLA, AT1R-vermittelter Weg zur refraktären vaskulären Abstoßung bei Nierentransplantation beitragen könnte und betroffene Patienten eventuell von der Entfernung von AT1R-Antikörpern profitieren würden (Dragun et al. 2005, Dragun 2013, Wallukat und Schimke 2014).

## 1.8 Therapie

Derzeit existiert keine kausale Therapie der SSc. Von großer Bedeutung ist eine symptomatische Therapie, zum Beispiel in Form von physikalischen Maßnahmen wie Krankengymnastik, Massage und Hautpflege mittels spezieller Bäder zur Vermeidung von Kontrakturen und Ulzerationen oder auch durch Prokinetika bei gastrointestinalen Motilitätsstörungen. Eine Prophylaxe der Beschwerden des Raynaud-Syndroms ist durch einen konsequenten Kälteschutz, ein striktes Rauchverbot, einen Verzicht auf Betablocker sowie durch medikamentöse Maßnahmen möglich (Herold 2014).

Medikamentös werden unter anderem Glukokortikoide eingesetzt. Diese kommen insbesondere in der Frühphase der SSc zum Einsatz. Sie werden möglichst nur für kurze Zeit gegeben, da sie das Risiko einer renalen Krise erhöhen. Bei besonders schweren Verläufen finden Immunsuppressiva wie Methotrexat oder Cyclophosphamid Verwendung. Eventuell kann bei therapierefraktärem Verlauf mit ungünstiger Prognose auch eine autologe Stammzelltransplantation indiziert sein. Kalziumantagonisten werden zur Verbesserung der Durchblutung bei Raynaud-Syndrom eingesetzt. Die arterielle Hypertonie bei SSc wird in der Regel mit ACE-Inhibitoren behandelt, welche nephroprotektiv wirken und bei Auftreten einer renalen Krise essentiell sind. N-Acetylcystein soll möglicherweise die Perfusion verbessern. Bei PAH oder trophischen akralen Störungen kommen Prostaglandinanaloga, Phosphodiesterase-5-Inhibitoren sowie Endothelin-Rezeptorantagonisten, zum Beispiel Bosentan, Sitaxsentan und

Ambrisentan, zum Einsatz (Herold 2014). Bosentan verdrängt als Antagonist das Endothelin-1 von seinen Rezeptoren, sowohl ET1AR und ET1BR, und führt so zur Gefäßdilatation und Senkung des Blutdrucks, während Sitaxsentan und Ambrisentan selektiv den ET1AR blockieren. Der Einsatz der Endothelin-Rezeptorantagonisten zeigte in Studien ein verbessertes Überleben der Patienten (Keogh et al. 2011, Shetty und Derk 2011).

So ermöglicht die Identifizierung von Schlüsselmolekülen und –prozessen zunehmend auch den Einsatz einer so genannten zielgerichteten Therapie. Entscheidende Ziele scheinen hierbei bei der SSc insbesondere die funktionell aktiven Autoantikörper gegen GPCRs und die GPCRs selbst zu sein (McLaughlin 2006, Keogh et al. 2011, Shetty und Derk 2011).

## 1.9 Rolle der GPCRs

Aufgrund der eingeschränkten Therapiemöglichkeiten der SSc ist es dringend notwendig die Ätiologie besser zu verstehen und entsprechend verbesserte Therapien zu entwickeln. In den letzten Jahrzehnten ist eine Vielzahl funktioneller Autoantikörper gegen GPCRs bei SSc-Patienten identifiziert worden. Unter anderem wurden erhöhte Antikörperkonzentrationen gegen AT1R, ETAR und CXCR3 und CXCR4 gefunden (Cabral-Marques und Riemekasten 2017, Weigold et al. 2018).

In einer Studie von Weigold *et al.* waren hohe Antikörpertiter gegen CXCR3 und CXCR4 mit einer verbesserten Prognose hinsichtlich der Lungenbeteiligung assoziiert. Allerdings wurden in dieser Studie nur N-terminale extrazelluläre Fragmente von CXCR3 beziehungsweise CXCR4 verwendet, weshalb möglicherweise pathogene intrazellulär bindende Antikörper nicht erfasst werden konnten (Weigold et al. 2018).

Die Anzahl an Antikörpern gegen AT1R und ETAR scheint bei SSc stark zu korrelieren und es scheint eine Kreuzreaktivität für beide Rezeptoren vorhanden zu sein. Zudem scheinen diese Autoantikörper eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der SSc zu spielen, indem sie unter anderem physiologische Prozesse wie zum Beispiel die Produktion von Kollagen durch Fibroblasten der Haut und die Angiogenese entscheidend regulieren. Ein besseres Verständnis der Mechanismen hinter den Antikörpern könnte zu neuartigen Therapien für SSc-Patienten führen (Cabral-Marques und Riemekasten 2016).

### 1.9.1 Aufbau von GPCR

Alle GPCRs haben eine gemeinsame funktionelle Einheit in Form von sieben  $\alpha$ -helikalen Transmembranregionen, die durch abwechselnde intra- und extrazelluläre Schleifenbereiche getrennt sind. Dadurch entstehen eine extrazelluläre N-terminale und

eine intrazelluläre C-terminale Domäne sowie drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen. Der N-Terminus ist sehr variabel und viele GPCRs enthalten verschiedene funktionelle Domänen insbesondere in diesem Bereich. GPCRs sind die größte Familie von Membranproteinen und vermitteln die meisten zellulären Reaktionen auf Neurotransmitter und Hormone. Sie sind für die Verarbeitung von Licht-, Geruchs- und eine Vielzahl von Geschmacksreizen verantwortlich. GPCRs können nach dem GRAFS-Klassifikationssystem in fünf Gruppen, genannt Glutamat-, Rhodopsin-, Adhäsions-, Frizzled/Taste2- und Secretin-Gruppe, eingeteilt werden. Die Rhodopsin-Familie ist die größte und bildet vier Hauptgruppen mit 13 Untergruppen (Fredriksson et al. 2003, Bjarnadóttir et al. 2006). Die Rezeptoren AT1R, ETAR, CXCR3 und 4 sind alle GPCRs der Rhodopsin-Familie (Vassilatis et al. 2003). Nach dem klassischen A-F-System können GPCRs in 6 Klassen eingeteilt werden, basierend auf Sequenzhomologie und funktioneller Ähnlichkeit. Klasse A (Rhodopsin-ähnlich), Klasse B (Sekretin-Rezeptor-Familie), Klasse C (Metabotrop/Glutamat/Pheromon), Klasse D (Fungal pheromone), Klasse E (cyclische AMP-Rezeptoren) und Klasse F (Frizzled/Smoothened) werden unterschieden (Xiao et al. 2009).

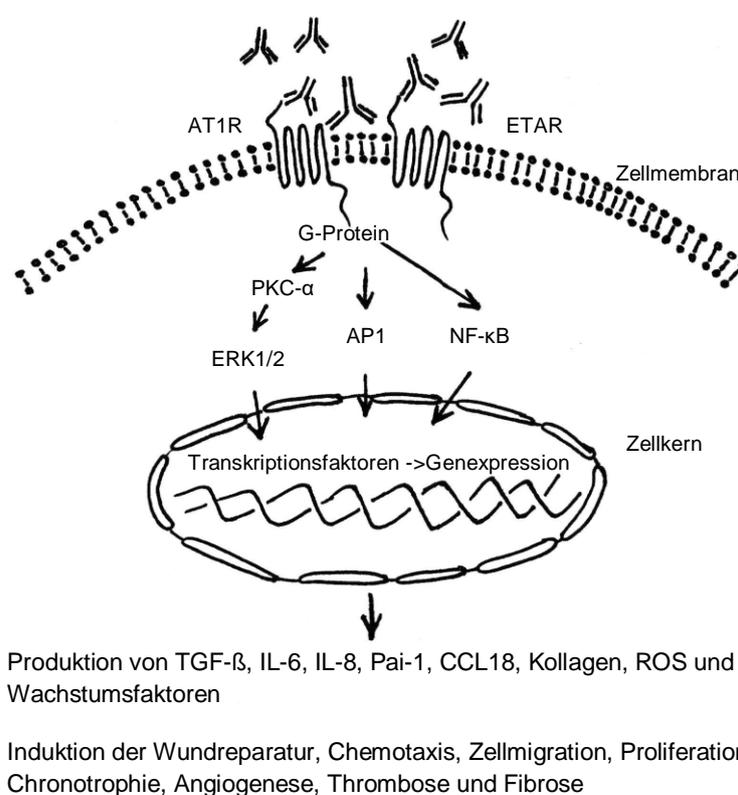
### **1.9.2 Rolle von AT1R und ETAR**

Etwa 85 % der Patienten mit SSc haben erhöhte Spiegel von Antikörpern gegen AT1R und ETAR, wobei die Level der Antikörper stark zu korrelieren und eine Kreuzreaktivität zu zeigen scheinen (Riemekasten et al. 2011). Die Identifikation des genauen Angriffspunktes dieser Antikörper an ihren Rezeptoren war ein wesentliches Forschungsziel dieser Arbeit. AT1R und ETAR werden sowohl auf Zellen des Gefäß- als auch des Immunsystems exprimiert. Diese beiden Moleküle gehören zur Familie der GPCR.

Das Binden von stimulierenden Antikörpern an AT1R und ETAR kann multiple zelluläre und systemische Geschehen triggern. Die Aktivierung des ERK1/2 Signalwegs und die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B wird induziert. Unter anderem kommt es, wie in Abbildung 2 dargestellt, zur Produktion von TGF- $\beta$ , IL-6, IL-8, Pai-1, CCL18, Kollagen, ROS und Wachstumsfaktoren sowie zur Induktion von Wundheilung, Chemotaxis, Zellmigration, Proliferation, Chronotropie, Angiogenese, Thrombose und Fibrose. Erhöhte Spiegel des inflammatorischen Zytokins IL-8 werden in Zusammenhang mit der Aktivierung von mononukleären Phagozyten, Neutrophilen, Fibroblasten und Endothelzellen gesehen. Außerdem können erhöhte Spiegel von zirkulierendem IL-8 während inflammatorischer Zustände zu Gewebeschäden führen. TGF- $\beta$  ist ein pleiotropisches Zytokin, welches zur Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten und Hochregulierung der Synthese von Kollagen und extrazellulärer Matrix führt und somit zu

einem fibrotischen Status wie er in der SSc zu sehen ist (Cabral-Marques und Riemekasten 2016).

Bei Patienten mit SSc sind die ETBR auf Endothelzellen herunterreguliert, wodurch ihr vasodilatatorischer Effekt verringert wird. Auf glatten Muskelzellen hingegen sind sie heraufreguliert, wodurch es zu Zellproliferation, Hypertrophie, Entzündung, Fibrose und Vasokonstriktion kommt (Abraham et al. 1997, Bauer et al. 2002). ETAR ist sowohl in frühen als auch in späten Stadien der SSc überexprimiert. Man kann erhöhte Niveaus an ET1 und ETAR in präsklerotischen und frühen diffusen Hautläsionen finden. Außerdem wurden erhöhte Level an ET1 in Blutgefäßen, Lungen, Nieren und Haut von SSc-Patienten gefunden (Vancheeswaran et al. 1994, Abraham et al. 1997).



### Abbildung 2 – Rolle von Anti-AT1R und Anti-ETAR in der Pathogenese der SSc.

Überblick über zelluläre und systemische Ereignisse, welche durch die Stimulation des AT1R und des ETAR durch Autoantikörper, auftreten. Es kommt zur Induktion des ERK1/2- Signalwegs und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF-κB (Bildquelle: verändert nach Cabral-Marques & Riemekasten, 2016).

### 1.9.3 Rolle der Autoantikörper gegen CXCR3

CXCR3 ist ein GPCR, welcher auf aktivierten naiven T-Zellen und CD4+ TH1 Helferzellen, CD8+ zytotoxischen Lymphozyten und nativen Lymphozyten wie natürlichen Killerzellen und natürlichen Killer-T-Zellen exprimiert wird. T-Zellen, welche aus entzündetem peripherem Gewebe isoliert wurden, waren im Vergleich zu T-Zellen im Blut auf ihrer Oberfläche stark angereichert mit der Expression von CXCR3. CXCR3 bindet drei

Chemokine: CXCL9, CXCL10 und CXCL11 (Domsic 2014). Das CXCR3-Rezeptor-Liganden-System ist an zwei wesentlichen biologischen Mechanismen beteiligt, der Chemotaxis der Immunzellen und der Angiogenese (Lacotte et al. 2009).

In den letzten Jahren haben sich starke experimentelle und klinische Hinweise ergeben, dass der CXCR3-Signalweg bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen eine bedeutende Rolle spielt. Es konnte festgestellt werden, dass der CXCR3-Signalweg zu einer Verstärkung der Entzündung bei dem systemischen Lupus erythematoses und der rheumatoiden Arthritis führt (Lacotte et al. 2009). Zudem wurden signifikant erhöhte Serumkonzentrationen aller CXCR3-Liganden bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden. In der Biopsie waren CXCL9 und CXCL10 positiv mit dem Schweregrad der Leberfibrose, gemessen anhand der Histologie und der Serummarker, assoziiert. Für CXCL11 traf dies nicht zu (Tacke et al. 2011).

Vor kurzem konnte in einer Studie festgestellt werden, dass sich die Höhe der Autoantikörpertiter gegen CXCR3 und CXCR4 zwischen SSc-Patienten mit stabiler und SSc-Patienten mit abnehmender Lungenfunktion unterscheiden zu scheinen und diese somit zur Risikostratifizierung eingesetzt werden könnten (Weigold et al. 2018). Auch der genaue Angriffspunkt der Autoantikörper gegen CXCR3 bei SSc war ein wesentliches Forschungsthema dieser Arbeit.

## 1.10 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel meiner Doktorarbeit war es funktionell aktive Autoantikörper bei SSc rekombinant herzustellen. Anschließend sollte eine Charakterisierung dieser Autoantikörper stattfinden. Zudem sollte eine Epitopkartierung zur Evaluation der Angriffsstelle von Autoantikörpern gegen CXCR3 erfolgen.

Zum einen sollte eine Bibliothek an *single chain variable fragments (scFv)* aus der Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) der Patienten mit SSc konstruiert werden. *ScFvs* stellen ein Fusionsprotein der Antigen-erkennenden variablen Domänen der schweren und leichten Ketten dar; Affinität und Spezifität des Antikörpers bleiben dabei erhalten. Die Herstellung dieser Bibliothek sollte mittels *reverse Transkription* und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgen. Die *reverse Transkription* stellt die Umschreibung der RNA in Desoxyribonukleinsäure (DNA) dar. Die PCR stellt eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen dar. Aus dieser Bibliothek sollten mittels *Phage Display*-Technik *scFv* gegen ETAR und AT1R selektiert werden. Die *Phage Display*-Technik wurde unter anderem von *George Smith* entwickelt. Diesem gelang es im Jahre 1985 erstmals einen

Bakterienphagenvektor für die Expression rekombinanter Peptidmoleküle an der Phagenoberfläche zu entwickeln (Smith 1985). Der Phage hat, während er die *scFv*-DNA durch den Vektor in sich trägt, das Potential das *scFv*-Fragment über das Mantelprotein *pIII* an seiner Oberfläche zu exprimieren. Durch das Phagen-*Panning* werden *scFv*-tragende Phagen mit hoher Affinität und Spezifität zum Zielantigen selektiert, während unspezifische Phagenklone durch mehrere Waschprozesse eliminiert werden (Barbas et al. 2001). Nach Selektion und Rekonstruktion der Autoantikörper sollten diese charakterisiert werden. Die in diesem Projekt erzeugten Autoantikörper und die entsprechenden Sequenzen sollten zudem in separaten Projekten in *in vitro* und in *in vivo* Modellen angewendet werden.

Zum anderen sollte über eine Epitopkartierung die Angriffsstelle der Autoantikörper gegen CXCR3 genauer untersucht werden. Die Epitopkartierung sollte mittels eines *Peptid-Arrays* in Form eines ELISAs durchgeführt werden. Dies ist ein relativ einfacher Ansatz um lineare, von Autoantikörpern erkannte Epitope zu detektieren (Forsström et al. 2015).

Beide Teilprojekte sollten zum weiteren Verständnis der Pathophysiologie der SSc dienen und zu Fortschritten bei der Entwicklung von Medikamentenmolekülen und speziellen Diagnosesystemen führen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenseren

Alle Studien mit menschlichem Material folgten den ethischen Prinzipien der Deklaration von Helsinki und wurden durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt (AZ16/199). Alle Teilnehmer gaben ihre schriftliche Zustimmung nach Aufklärung und Bedenkzeit. Die Diagnose der SSc-Patienten wurde entsprechend der ACR/EULAR-Klassifikationskriterien gestellt (van den Hoogen et al. 2013, Herold 2014). Als Kontrolle dienten nicht selektierte, gesunde Blutspender.

#### 2.1.1 Patientenseren für das *Phage Display*

In dieser Arbeit wurden isolierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von Patienten-K-EDTA-Vollblut verwendet. Diese wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. med. G. Riemekasten bereitgestellt. Es handelte sich um vier an SSc erkrankte Patienten der Charité Berlin.

**Tabelle 2: Übersicht über die SSc-Patienten für das *Phage Display***

#	ID	SSc-Variante <sup>1</sup>	ENA <sup>2</sup>	Geburtsjahr	Geschlecht
1	A SKL 169	diffus	anti-Sc170	1962	weiblich
2	B SKL 169				
3	C SKL 828	limitiert	anti-Sc170	1952	männlich
4	D SKL 284	diffus	anti-Sc170	1935	weiblich
5	E SKL 748	n.n.	n.n.	1939	weiblich

1) *Limitierte oder diffuse SSc. n.n., non nominatus (nicht bekannt).*

2) *Reaktivität gegen spezifische extrahierbare nukleäre Antigene (ENA). n.d., nicht differenziert. Alle SSc-Patienten waren ANA-positiv. n.n., non nominatus (nicht bekannt).*

#### 2.1.2 Peptide und Seren der Epitopkartierung

##### 2.1.2.1 Humane CXCR3 Peptide

36 biotinylierte 20mer Peptide, welche die komplette Sequenz von CXCR3 (isoform 1, aa 1-368) abdecken, wurden von *peptides & elephants* (Henningsdorf, Deutschland) synthetisiert (UNIPROT 2018). Die Peptide wurden mit Überlappungen von 10 Aminosäuren zu den benachbarten Peptiden stromaufwärts und stromabwärts der Proteinsequenz hergestellt. Die Peptide wurden als lyophilisierte Trifluoracetatsalze geliefert.

### 2.1.2.2 Patientenseren und Kontrollen für den Peptid-ELISA und Mischpeptid-ELISA

In dieser Studie wurden Seren von Patienten mit SSc (N=32) mit Seren von gesunden Blutspendern (N=96) verglichen. Das Alter der SSc-Patienten lag im Bereich von 38 bis zu 76 Jahren mit 15 weiblichen und 5 männlichen Personen. Das Alter der gesunden Blutspender lag im Bereich von 20 bis 60 Jahren, wobei der Anteil der Männer höher war als der der Frauen. In allen Seren der SSc-Patienten wurden positive CXCR3-Antikörper-Titer detektiert. Die Seren nicht selektierter, gesunder Blutspender wurden vom Institut für Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck bereitgestellt.

## 2.2 Phage Display-Technik

Die Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Zunächst sollten funktionelle Autoantikörper gegen ETAR und AT1R hergestellt werden. Hierzu sollte mittels *Phage Display*-Technik eine Bibliothek aus *scFv*-Antikörpern aus Blutzellen von Patienten mit SSc generiert werden.

Ein Großteil der Methoden erfolgte auf das Projekt angepasst und abgewandelt nach Anleitung aus dem Buch *Phage Display: A Laboratory Manual* (Barbas et al. 2001).

### 2.2.1 RNA-Aufreinigung aus PBMCs

Zunächst erfolgte die Aufreinigung der Gesamt-RNA in je vier separaten Ansätzen pro Patienten-Serum. Zur RNA-Aufreinigung wurden PBMCs, welche an der Charité Berlin isoliert wurden, verwendet. Die Isolierung erfolgte analog zur Beschreibung von Günther *et al.* (Günther et al. 2014). Die isolierten PBMC-Zellen wurden in *RLT*-Puffer aus dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Deutschland) gelöst und bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurde die RNA mittels des *RNeasy Mini Kits* isoliert. Die Durchführung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. Alle im Herstellerprotokoll als optional gekennzeichneten Schritte wurden durchgeführt. Auch ein optionaler *DNase*-Verdau wurde mit Hilfe des *RNase-Free DNase Kit* durchgeführt. Die RNA wurde in *ddH<sub>2</sub>O* aufgenommen und die Konzentration mittels eines *Nanodrop*-Photometers bestimmt. Anschließend wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

### 2.2.2 cDNA-Synthese aus RNA

Zur Produktion der komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA) aus der Boten-RNA (mRNA) mittels *reverser Transkription* wurde ein kommerziell erhältliches cDNA Synthese Kit (Invitrogen/Life Technologies, USA) verwendet. Die mRNA ist eine einzelsträngige RNA, welche als Vorlage für die Proteinbiosynthese dient. Die Durchführung der *reversen Transkription* erfolgte nach den Anweisungen des Kit-Herstellers. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.2.3 Herstellung der *scFv*-Fragmente mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht eine Vervielfältigung der DNA *in vitro*. Dabei erfolgen wiederholte Temperaturzyklen aus jeweils drei Phasen. Die Produkte der vorherigen Zyklen fungieren jeweils als Ausgangsstoffe für die folgenden Zyklen. Auf diese Weise findet eine exponentielle Vervielfältigung statt. Als Startpunkt der DNA-Replikation dienen kurze Oligonukleotide, sogenannte Primer, deren Basensequenz zu ausgewählten Abschnitten der Ausgangs-DNA revers-komplementär ist. Um ein Binden der Primer zu ermöglichen, muss die DNA zunächst in der *Denaturierungs*-Phase mittels Hitze in ihre Einzelstränge aufgebrochen werden. In der *Annealing*-Phase binden die Primer spezifisch an die erzeugten Einzelstränge. Anschließend erfolgt die *Elongations*-Phase, in welcher die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden vom 3'-Ende aus auffüllt (Mullis und Faloona 1987, Naeim et al. 2013).

#### 2.2.3.1 Erste Runde *scFv*-PCR: Amplifizierung leichter und schwerer Ketten

Die hergestellte, gereinigte cDNA wurde zur separaten Amplifikation der leichten und schweren Ketten verwendet. Zur Herstellung der humanen *scFv*-Bibliothek wurden Primer zur Generierung von *Long Linkern* im *scFv* verwendet. Es wurden 18 verschiedene Primerkombinationen für  $V_H$ , 16 für  $V_K$  und 27 für  $V_L$  verwendet.

##### 2.2.3.1.1 Vervielfältigung der humanen $V_H$ -Regionen aus der cDNA

Zur Amplifikation der schweren Ketten wurde jeder der  $V_H$ -Sense-Primer mit jedem  $V_H$ -Reverse-Primer kombiniert. Die Reverse-Primer sind spezifisch für das 5' Ende der  $C_H$ -Regionen der verschiedenen Immunglobulinisotypen. Meist ist die Verwendung der IgG- und IgM-spezifischen Primer ausreichend. Die Sense-Primer haben einen Sequenzschwanz, welcher mit der *Linker*-Sequenz korrespondiert. Dieser Sequenzschwanz wird in der *Overlap*-PCR verwendet. Jeder Reverse-Primer hat einen Sequenzschwanz, der eine *Sfi1*-Stelle enthält. Dieser Sequenzschwanz wird in der *Second-Round*-PCR durch die *Reverse-Extensionsprimer* erkannt.

##### 2.2.3.1.2 Vervielfältigung der humanen $V_K$ -Regionen aus der cDNA

Die leichten Ketten wurden in zwei Ansätzen amplifiziert. Zur Vervielfältigung der  $V_K$ -Regionen wurde jeder  $V_K$ -Sense-Primer mit jedem  $V_K$ -Reverse-Primer kombiniert. Die Sense-Primer haben einen 5' Schwanz, welcher eine *Sfi1*-Stelle enthält. Dieser Schwanz wird durch die *Sense-Extensionsprimer* erkannt. Die Reverse-Primer haben einen Schwanz mit einer *Linker*-Sequenz, welcher die *Overlap*-Erweiterung mit den  $V_H$ -Produkten in der *Second-Round*-PCR ermöglicht.

2.2.3.1.3 Vervielfältigung der humanen  $V_{\lambda}$ -Regionen aus der cDNA

Zur Vervielfältigung der  $V_{\lambda}$ -Regionen wurde jeder der  $V_{\lambda}$ -Sense-Primer mit jedem  $V_{\lambda}$ -Reverse-Primer kombiniert. Der Aufbau der  $V_{\lambda}$ -Primer entspricht dem Prinzip der  $V_{\kappa}$ -Primer.

Für jede PCR wurde folgender Reaktionsansatz vorbereitet:

**Tabelle 3: Reaktionsansatz PCR - Vervielfältigung der leichten und schweren Ketten**

Substanz	Jeweilige Probe	Kontrolle
<i>Phire 5x Puffer</i>	4,0 $\mu$ l	4,0 $\mu$ l
<i>10 mM dNTPs</i>	0,4 $\mu$ l	0,4 $\mu$ l
<i>Primer 5´sense</i>	1,0 $\mu$ l	1,0 $\mu$ l
<i>Primer 3´sense</i>	1,0 $\mu$ l	1,0 $\mu$ l
<i>Template</i>	1,5 $\mu$ l	0 $\mu$ l
<i>Phire Polymerase</i>	0,4 $\mu$ l	0,4 $\mu$ l
<i>ddH<sub>2</sub>O</i>	11,7 $\mu$ l	13,2 $\mu$ l
<b>gesamt</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

Zu Beginn der PCR wurde die DNA zur *Denaturierung* für 30 s auf 98 °C erhitzt. Ein PCR-Zyklus bestand aus 5 s bei 98 °C zur *Denaturierung*, gefolgt von 5 s bei 62,6 °C als *Annealing*-Phase, in der sich die Primer an die DNA-Einzelstränge anlagern, und 15 s bei 72 °C zur *Elongation* der DNA-Fragmente. Die Anzahl der PCR-Zyklen variierte je nach Primerkombination. Für  $V_H$  wurden für alle Kombinationen mit dem Primer *HSCM-B* 30 Zyklen und alle Kombinationen mit dem Primer *HSCG-1234-5* oder dem Primer *HSCA-B* 33 Zyklen verwendet. Für  $V_{\kappa}$  wurden für alle Kombinationen 33 Zyklen verwendet. Für  $V_{\lambda}$  wurden für alle Kombinationen mit dem Primer *HSCJLam4* 35 Zyklen und alle weiteren Kombinationen 33 Zyklen verwendet. Zum Schluss wurde die Reaktion 1 min bei 72 °C gehalten und anschließend auf 4 °C abgekühlt.

## 2.2.3.1.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung der DNA nach ihrer Größe. Die DNA wird mittels eines elektrischen Feldes zum Pluspol gezogen. Dabei dient das Gel als Sieb, welches größere Moleküle stärker zurückhält. Durch Vergleich mit DNA-Strängen bekannter Größe in einem Längenstandard kann die Größe des Produktes ermittelt werden (Coates 2006). Für die Kontrolle der einzelnen PCR-Ansätze wurden je 5  $\mu$ l pro Ansatz in einen 6x DNA-Probenpuffer (Thermo Scientific/Thermo Fisher Scientific, USA) aufgenommen, indem 1/6 Volumen des 6x DNA-Probenpuffers zugegeben wurde. Dies

wurde anschließend auf ein Gel aus 2 % Agarose geladen. Dem Gel wurde vor dem Gießen *GelStar® Nucleic Acid Gel Stain* (Ionza, Schweiz) 1:10000 verdünnt beigemischt, um später die replizierten DNA-Fragmente im UV-Licht sichtbar machen zu können. Außerdem wurde eine Tasche mit dem Längenstandard *Mass Ruler Low Range DNA Ladder* (Thermo Scientific/Thermo Fisher Scientific, USA) befüllt. An das Gel wurde in einer Elektrophoresekammer für 45 min eine Spannung von 90 V angelegt. Anschließend wurde das Agarosegel zur Analyse auf die UV-Bank *UV-Transilluminator TFX-20 M BRL* gelegt und unter UV-Licht betrachtet. Erwartet wurde ein etwa 400 bp Produkt für die  $V_H$ -Reaktionen und ein etwa 350 bp Produkt für die  $V_K$ - und  $V_L$ -Reaktionen.

### 2.2.3.1.5 Reinigung der DNA mittels *Gel Extraktion Kit*

Nach dem Nachweis der erfolgreichen PCR auf der UV-Bank wurden die PCRs erneut gefahren und anschließend in einem 6x DNA-Probenpuffer aufgenommen, indem 1/6 Volumen des 6x DNA-Probenpuffers zugegeben wurde. Sie wurden erneut auf ein 2 % Agarosegel geladen. Nach 45 min elektrophoretischer Auftrennung wurde das Gel wieder auf der UV-Bank betrachtet und die entsprechenden Banden mit Hilfe eines sterilen Einmal-Skalpells aus dem Gel herausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA anhand eines *Gel Extraktion Kits* (Thermo Scientific/Thermo Fisher Scientific, Deutschland) aus dem Gel isoliert. Die Extraktion wurde gemäß dem Protokoll des Kits durchgeführt. Ein optionaler Schritt der Zugabe von Isopropanol wurde durchgeführt.

### 2.2.3.1.6 Reinigung der DNA mittels *PCR Purification Kit*

Für die Reinigung der DNA wurde zusätzlich ein kommerziell erhältliches *PCR Purification Kit* (Fermentas/Thermo Fisher Scientific, Deutschland) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. Die gereinigte DNA wurde mittels *NanoPhotometer* quantifiziert und bei -20 °C gelagert. Es wurden etwa 2-4 µg jedes Produkts benötigt um fortzufahren.

## 2.2.3.2 Zweite Runde *scFv*-PCR, *Overlap* leichter Ketten mit schweren Ketten

### 2.2.3.2.1 PCR

Zur Verbindung der  $V_L$ - mit den  $V_H$ -Produkten wurden *Overlap*-PCRs durchgeführt. Hierzu wurden die geeigneten Produkte der *First-Round*-PCR zu gleichen Mengen gemischt. Die *Sense*- und *Reverse*-Primer, welche in der *Overlap*-PCR verwendet wurden, erkennen die in der *First-Round*-PCR erzeugten Sequenzschwänze. Die Primer der *First-Round*-PCR erzeugen komplementäre Sequenzen in der *downstream*-Region der variablen Bereiche der leichten Kette und der *upstream*-Region der variablen Regionen der schweren Ketten. Diese dienen als Überlappung für die Erweiterung zu den Vollängenprodukten. Die  $\kappa$ - und

$\lambda$ -scFv-Produkte wurden zunächst separat hergestellt und erst in späteren Schritten zusammengefügt.

Für jede PCR wurde folgender Reaktionsansatz vorbereitet:

**Tabelle 4: Reaktionsansatz PCR - Overlap**

Substanz	Jeweilige Probe	Kontrolle
<i>Phire 5x Puffer</i>	20,0 $\mu$ l	20,0 $\mu$ l
10 mM <i>dNTPs</i>	0,4 $\mu$ l	0,4 $\mu$ l
<i>RSC-F sense primer 60 pmol</i>	6,0 $\mu$ l	6,0 $\mu$ l
<i>RSC-B reverse primer 60 pmol</i>	6,0 $\mu$ l	6,0 $\mu$ l
$V_H$ -Kette	100 ng	0 $\mu$ l
$V_L$ -Kette ( $V_\lambda$ oder $V_\kappa$ )	100 ng	0 $\mu$ l
<i>Phire Polymerase</i>	2,0 $\mu$ l	2,0 $\mu$ l
<i>ddH<sub>2</sub>O</i>	Ad 100,0 $\mu$ l	Ad 100,0 $\mu$ l
<b>gesamt</b>	<b>100,0 <math>\mu</math>l</b>	<b>100,0 <math>\mu</math>l</b>

Zunächst wurde die DNA zur *Denaturierung* für 30 s auf 98 °C erhitzt. Ein PCR-Zyklus bestand aus 5 s bei 98 °C zur *Denaturierung*, gefolgt von 5 s bei 56 °C zum *Annealing*, dem Anlagern der Primer an die DNA-Einzelstränge, und 30 s bei 72 °C zur *Elongation* der DNA-Fragmente. Die Anzahl der PCR-Zyklen wurde auf 30 festgelegt. Zum Schluss wurde die Reaktion 1 min bei 72 °C gehalten und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Um eine hohe Diversität zu erreichen wurden die *Overlap*-PCRs mit einer hohen Anzahl an Ansätzen durchgeführt.

#### 2.2.3.2.2 Agarosegelelektrophorese

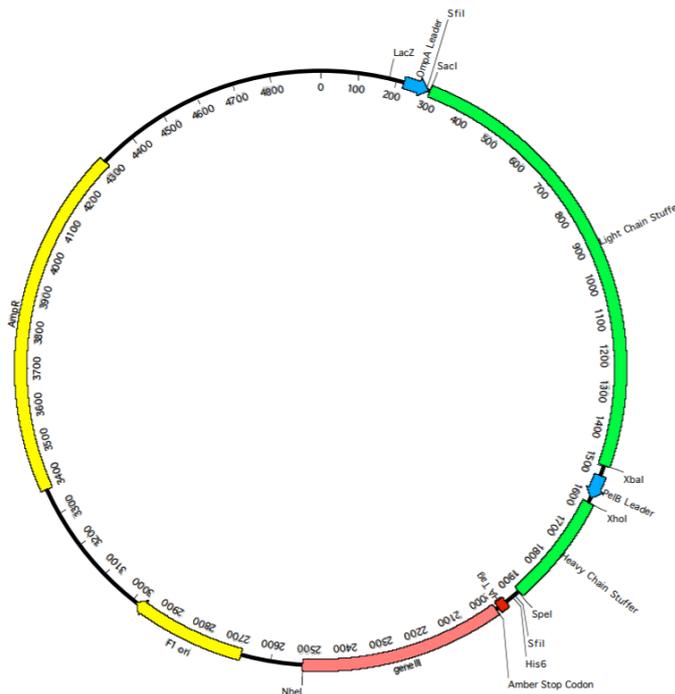
Für die Kontrolle der einzelnen PCR-Ansätze wurde anschließend erneut eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die Durchführung erfolgte wie oben beschrieben nur, dass der Längenstandart *Fast Ruler Middle Range DNA ladder* (Thermo Scientific/Thermo Fisher Scientific, USA) verwendet wurde. Erwartet wurde ein 750-800 bp Produkt.

#### 2.2.3.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten mittels des *Gel Extraktion Kits*

Nachdem der Erfolg der PCR auf der UV-Bank nachgewiesen worden war, wurden die PCRs erneut gefahren und die entsprechenden Banden, wie oben beschrieben, herausgeschnitten und mittels des *Gel Extraktion Kits* extrahiert.

### 2.2.4 Präparation von *pComb3XSS*

Es sollte eine große Menge des Vektors *pComb3XSS* (Carlos Barbas Lab Plasmids/Addgene, Großbritannien) mittels Plasmid-Preparation hergestellt werden, um anschließend die *scFv*-Produkte in diesen ligieren zu können und die Replikation des Plasmids in *E. coli* zu ermöglichen. *pComb3XSS* ist ein Phagemid-Vektor. Dies ist ein Plasmid, welches sowohl einen Replikationsursprung von *E. coli* als auch einen Replikationsursprung eines filamentösen Phagen trägt. *pComb3XSS* trägt ein Gen für das Enzym Beta-Laktamase, was in einer Carbenicillin-Resistenz resultiert und so eine gezielte Selektion *scFv*-exprimierender *E. coli* erlaubt (Barbas et al. 2001).



**Abbildung 3 – pCOMB3xss.**

Sequenz des Vektors mit zwei Stufferfragmenten (Light Chain Stuffer, Heavy Chain Stuffer), welche durch *SfiI*-Verdau entfernt werden können. Auf diese Weise ist die Klonierung eines Zielgens möglich; *ompA* und *pelB* sind Signalsequenzen für den Transport in das Periplasma von *E. coli*; HA: Hemagglutinin-tag; gene III: kodiert die C-terminale Domäne des Hüllproteins p3; F1 ori: Replikationsursprung eines Phagen; AmpR: Ampicillin-Resistenzgen (Andris-Widhopf et al. 2000).

Zunächst wurden der Vektor und die methylationsdefizienten *dam-/dcm- E. coli* (New England Biolabs GmbH, Deutschland) auf Eis aufgetaut. 5 µl des Vektors *pCombX3SS* wurden mit 50 µl der methylationsdefizienten *dam-/dcm- E. coli* gemischt und für 20 min auf Eis gestellt. Nun wurde die Mischung für 30 s auf 42 °C erhitzt und im Anschluss erneut für 5 min auf Eis gestellt. Dann wurden 950 µl SOC-Medium in RT zugegeben und die Mischung für 60 min bei 37 °C und 250 rpm mit dem Inkubationsschüttler *Certomat IS* geschüttelt. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen mit SOC-Medium (1:1000, 1:100, 1:10) erstellt und auf auf 37 °C vorgewärmte *LBC*-Platten ausgestrichen. Diese wurden bei 37 °C im Miniinkubator *B15 COMPACT INCUBATOR* bebrütet.

Nach Anwachsen der transformierten Bakterienkulturen auf eine adäquate Größe wurden Übernachtkulturen in *LBC*-Medium mit 100 µg/ml Carbenicillin angelegt. Dazu wurden je 10 ml Medium in ein 50 ml Röhrrchen gegeben. Mit einem Zahnstocher wurde je eine Kultur gepickt und der Zahnstocher in das Röhrrchen gegeben. Anschließend wurden die Kulturen für 12-16 h bei 250 rpm und 37 °C mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt. Am Folgetag wurden die Zahnstocher mit einer sterilen Pinzette entfernt und die Röhrrchen für 10 min bei 4500 × g und RT mit der großen Tischzentrifuge *Centrifuge 5804 R* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und übrig gebliebenes Medium entfernt. Das in dem Röhrrchen verbliebene Pellet wurde nach dem Protokoll des *QIAprep Spin Mini Prep Kits* behandelt. Auf diese Weise wurde die Plasmid-DNA isoliert.

### 2.2.5 *Sfi*1-Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind in der Lage doppelsträngige DNA sequenzspezifisch zu schneiden. Die Schnittstellen des Restriktionsenzym *Sfi*1 wurden in der Amplifikation der  $V_H$ - und  $V_L$ -Ketten mittels PCR eingefügt. Die *scFv*-Produkte und der Vektor *pComb3XSS* wurden mittels *Sfi*1 verdaut, um komplementäre Enden zur Ligation zu erzeugen (Barbas et al. 2001).

#### 2.2.5.1 Inkubation des Verdau

Für den Verdau wurden folgende drei Reaktionen angesetzt: Ein Restriktionsverdau der *scFv*-Produkte, ein Restriktionsverdau des Vektors und eine Kontrollreaktion.

**Tabelle 5: Verdau**

Substanz	1. Insert	2. Vektor	3. Kontrolle
Aufgereinigtes <i>scFv</i> Produkt	10,0 µg	-	-
<i>pComb3XSS</i>	-	20 µg	-
<i>Sfi</i> 1-RO Roche 1	10,0 µl	4,0 µl	2,0 µl
Fast digest buffer	20,0 µl	20,0 µl	10,0 µl
ddH <sub>2</sub> O	Ad 200,0 µl	Ad 200,0 µl	Ad 100,0 µl
<b>gesamt</b>	<b>200,0 µl</b>	<b>200,0 µl</b>	<b>100,0 µl</b>

Die Reaktionen wurden jeweils in einem 1,5 ml Röhrrchen gemischt und für 5 h bei 50 °C inkubiert.

#### 2.2.5.2 Agarosegelelektrophorese der *scFv*- und Vektor-DNA

Für die Kontrolle und Aufreinigung der Verdau wurden anschließend Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Dazu wurde je ein Gel mit den geschnittenen

PCR-Produkten und ein Gel des geschnittenen Vektors hergestellt. Der Verdau der *scFv*-Produkte wurde auf ein 2 % Agarosegel, der Verdau des Vektors auf ein 1 % Agarosegel geladen. Es wurde eine *high quality NEEO Agarose* (Carl Roth GmbH & Co., Deutschland) verwendet. Dem Gel wurde vor dem Gießen *GelStar® Nucleic Acid Gel Stain* beigemischt, um die replizierten DNA-Fragmente später im UV-Licht sichtbar machen zu können. Zusätzlich wurde dem Gel 1 mM Guanosin zugegeben, um die DNA vor dem UV Licht zu schützen. Eine Tasche wurde mit dem Längenstandart *Middle Range DNA ladder* befüllt. Die Produkte des Verdau wurden je in einen 6x DNA-Probenpuffer aufgenommen, indem 1/6 Volumen des 6x DNA-Probenpuffers zugegeben wurde. An das Gel der PCR Produkte wurde in einer Gelelektrophoresekammer für 45 min eine Spannung von 90 V angelegt, während an das Gel des Vektorverdau für 90 min eine Spannung von 90 V angelegt wurde. Anschließend wurde das Agarosegel zur Analyse auf die UV-Bank gelegt und unter UV-Licht betrachtet. Für die *scFv*-Produkte wurde ein 750-800 bp Produkt erwartet. Der Vektor wurde durch den Verdau in ein Vektorfragment und ein *Stufferfragment* geschnitten. Erwartet wurde ein doppelt geschnittenes Vektorfragment bei 3400 bp und ein *Stufferfragment* bei 1600 bp.

### 2.2.5.3 Isolierung der *scFv*- und Vektor-DNA mittels *Gel Extraktion Kits*

Die einzelnen Banden wurden separat mithilfe eines sterilen Einmal-Skalpells aus dem Gel herausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA anhand eines *Gel Extraktion Kits* aus dem Gel isoliert. Die Durchführung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. Im Schritt der Gelauflösung wurde zusätzlich eine pH-Anpassung durchgeführt, um das Binden der DNA an die *Gel Purification Columns* zu optimieren. Das *Stufferfragment* wurde gesondert aufgereinigt und bei der späteren Kontrollligation verwendet. Die Konzentration der Vektor-DNA wurde mittels eines *Nanodrop*-Photometers bestimmt.

## 2.2.6 Elektrokompente *ER2537*-Bakterien

### 2.2.6.1 Transformation

Zur Transformation elektrokompenter *E. coli*-Bakterien für das Bibliotheksscreening werden Bakterien benötigt, welche den *F'-Faktor* besitzen. Der *F'-Faktor* kodiert für Proteine, welche die Pili formen über welche Filamentöse Bakteriophagen *E. coli* infizieren. Es ist nötig die Bakterien mit dem *F'-Faktor* zu selektieren, da dieser dazu tendiert, sich von den Zellen zu trennen (Barbas et al. 2001). Ohne den *F'-Faktor* sind die Bakterien unsensitiv gegenüber der Infektion durch filamentöse Bakteriophagen. Die Selektion erfolgte auf *Minimal-Medium-Agar* mit Thiamin und ohne Prolin.

Zur Herstellung des *Minimal-Medium-Agars* wurden die folgenden Komponenten zunächst getrennt vorbereitet:

**Tabelle 6: Komponenten des Minimal-Medium-Agars**

Substanz	Menge
Agarose	7,5 g
5xM9-Salze, bestehend aus 45 mM NaCl, 95 mM NH <sub>4</sub> Cl, 120 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in ddH <sub>2</sub> O ohne pH-Einstellung	100 ml
1 M MgSO <sub>4</sub> , sterilfiltriert	2,5 ml
1 M CaCl <sub>2</sub> , sterilfiltriert	50 µl
20 % w/v Glucose, sterilfiltriert	20 ml
1 % w/v Thiamin, sterilfiltriert	5 ml

Zusätzlich wurden ein Wasserbad bei 50-60 °C und Petrischalen benötigt.

Zunächst wurden die 7,5 g Agar mit 100 ml der 5xM9-Salze in 492 ml ddH<sub>2</sub>O gemischt und bei 120 °C und 2 bar für 20 min autoklaviert. Daraufhin wurde die Mischung im Wasserbad auf etwa 50 °C abgekühlt. Es wurden 2,5 ml des 1 M MgSO<sub>4</sub>, 50 µl des 1 M CaCl<sub>2</sub>, 20 ml der 20 % Glucose und 5 ml des 1 % Thiamins hinzugegeben. Zuletzt wurden die Petrischalen befüllt. Nach Ausdünsten und Abkühlen des Agars wurden *ER2537*-Bakterien (New England Biolabs GmbH, Deutschland) darauf ausgestrichen. Das Anwachsen der Bakterien im Miniinkubator bei 37 °C benötigte etwa drei Tage. Anschließend wurden die Platten bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

*ER2537*-Bakterien sind resistent gegen die in der Umwelt persistent vorkommenden lytischen Phagen des Typs T1. Es wurde für ein möglichst phagenfreies Umfeld gesorgt, indem die Arbeitsfläche mit 10 % HOCl behandelt wurde und nur phagenfreie Schüttler, Pipetten, Kulturflaschen und Zentrifugenflaschen verwendet wurden.

Es wurde, jeweils am Tag bevor die elektrokompenten Bakterien benötigt wurden, eine Übernachtskultur angesetzt. Dazu wurde zunächst eine Kultur der *ER2537*-Bakterien gepickt, welche zuvor auf *Minimal-Medium-Agar* gezüchtet worden waren, und in ein 50 ml Röhrchen mit 15 ml vorgewärmten *SB*-Medium gegeben. Diese Mischung wurde über Nacht bei 37 °C und 250 rpm mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde zunächst 2000 ml *SB*-Medium mit 5 ml 20 % Glucose und 2,5 ml 1 M MgCl auf 37 °C erwärmt. Es wurde ein Blank entnommen, um später das Anwachsen der Bakterien beobachten zu können. 2 ml der Übernachtskultur wurden in das angewärmte *SB*-Medium gegeben und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 anwachsen gelassen. Dann wurde die Kultur 5 min in eiskaltes Wasser gestellt. Die 2000 ml wurden in sechs 500 ml Zentrifugenflaschen aufgeteilt und für 15 min mit 2000 x g bei 4 °C in der Stand-Kühlzentrifuge *Avanti J-E Centrifuge* mit dem *JA 10 Rotor* zentrifugiert. Die Pellets wurden

mit insgesamt 40 ml *Ampuwa* gelöst und in zwei 500 ml Zentrifugenflaschen aufgeteilt. Es wurden 12 ml 4 °C warmes 20 % Glycerol und 1,5 % Mannitol pro Röhrchen zugegeben. Dann wurde für 15 min mit 2000 x g bei 4 °C ohne Bremse in der Stand-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette entfernt. Die Bakterien waren bereit und konnten sofort weiterverwendet werden.

### 2.2.6.2 Testung der Elektrokompetenz der *E. coli*-Bakterien

Zunächst wurden 1 µl des 10 pg/µl *pComb3XSS* Vektors und eine Elektroporationsküvette auf Eis gestellt. Nach etwa 10 min wurden 50 µl der frisch hergestellten *ER2537*-Bakterien in der Elektroporationsküvette (Breite 1 cm) durch einmaliges auf- und abpipettieren mit dem Vektor gemischt. Anschließend wurden die mit dem Plasmid gemischten Bakterien für 30 min auf Eis inkubiert und daraufhin durch Elektroporation transformiert. Die Elektroporation erfolgte mit den Einstellungen 2,5 kV/cm für die Spannung pro Küvettenbreite, 25 µF für die Kapazität des Kondensators und 200 Ω für den Shunt-Widerstand im *Easyject Optima EquiBio Elektroporator*. Die durch das Gerät gemessene Impulsdauer wurde im Bereich von 4,6-4,7 msec erwartet. Direkt nach der Elektroporation wurden die Bakterien mit 1 ml und dann mit 2 ml SOC-Medium bei 37 °C ausgespült und die Flüssigkeit in einem 50 ml Falconröhrchen aufgefangen. Zu den 3 ml wurden weitere 7 ml SOC-Medium hinzugefügt und die Mischung für 1 h bei 250 rpm und 37 °C mit dem Inkubationsschüttler bebrütet. Zur Bestimmung der Kompetenz wurden 1 µl, 10 µl und 100 µl dieses Ansatzes auf eine *LBC*-Platte ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht im Miniinkubator bebrütet und die Elektrokompetenz als Anzahl der Kolonien in Relation zur eingesetzten Plasmidmenge (in µg) mittels Formel 1 bestimmt.

$$\text{Kompetenz} = \text{Koloniezahl} \times \frac{\text{Kulturvolumen}}{\text{Ausplattierungsvolumen}} \times \frac{1}{10 \text{ pg}} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{1 \text{ µg}} \quad (1)$$

*Koloniezahl*: Anzahl der infizierten Bakterien (cfu) auf der Platte

*Ausplattierungsvolumen*: Volumen, das ausgestrichen wurde, 1 µl, 10 µl oder 100 µl

*Kulturvolumen*: Gesamtvolumen der transformierten Kultur, 10.000 µl

Nur Bakterien, die eine Elektrokompetenz von  $1 \times 10^9$  *Kolonien/µg Plasmid* aufwiesen, sollten für die nachfolgenden Experimente verwendet werden. Bakterien, die keine ausreichende Elektrokompetenz aufwiesen, eigneten sich als Starterkulturen für die Phagenamplifikation und wurden bei -80 °C gelagert.

### 2.2.6.3 Kontaminationstest

Um zu überprüfen, ob eine Kontamination mit *pComb3*-Phagmiden oder davon abgeleiteten Phagen stattgefunden hat, wurden 25 µl der präparierten *ER2537*-Bakterien direkt auf einer *LBC*-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Miniinkubator bebrütet. Es sollten keine Kolonien anwachsen.

Um zu überprüfen, ob eine Kontamination mit Helferphagen stattgefunden hatte, wurden 25 µl der präparierten *ER2537*-Bakterien auf eine *LBK*-Platte gegeben und über Nacht bei 37 °C Miniinkubator bebrütet. Es sollten keine Kolonien anwachsen.

Um zu überprüfen, ob eine Kontamination mit lytischen Phagen (und zweiter Test auf eine Kontamination mit Helferphagen) stattgefunden hatte, wurden 25 µl der präparierten *ER2537*-Bakterien mit 3 ml verflüssigten *LB-Top*-Agar gemischt und auf einer *LB*-Platte ausplattiert. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C Miniinkubator bebrütet. Es sollten keine Kolonien anwachsen.

### 2.2.7 Präparation des Helferphagen *M13K07*

Die Präparation des Helferphagen ist essentiell, da die *pComb3*-Phagmide nur den Replikationsursprung des filamentösen Bakteriophagen *f1* enthalten und ihnen alle weiteren zur Replikation und zum Zusammenbau von Phagenpartikeln benötigten Gene fehlen. So benötigt man zum Screenen von *pComb3*-Phagmid-Bibliotheken einen Helferphagen. Der Helferphage *MK13K07* (New England Biolabs GmbH, Deutschland) ist besonders geeignet, da er ein für eine Kanamycinresistenz kodierendes Gen enthält. Daher kann Kanamycin verwendet werden, um die mit dem Phagen infizierten *E. coli* zu selektieren. Eine Mutation im Replikationsursprung macht die Produktion der Helferphagen weniger effizient als die der *pComb3*-Phagen. Bei Hinzufügen des Helferphagens zu den mit *pComb3*-Phagmid transformierten Zellen entsteht eine gemischte Phagenpopulation, welche vor allem *pComb3*-Phagen enthält (Barbas et al. 2001).

Zunächst wurden 2 ml *SB*-Medium mit 2 µl *ER2537*-Bakterien beimpft. Dieser Ansatz wurde etwa 1 h bei 37 °C und 250 rpm mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt bis eine optische Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von 0,5 erreicht war. Es wurden verschiedene Verdünnungen des Helferphagen in *SB*-Medium hergestellt. Je 1 µl jeder dieser Verdünnungen wurden zu 50 µl der *ER2537*-Bakterien gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Dann wurden 3 ml verflüssigter *LB-top*-Agar, kälter als 50 °C, zugefügt und die Mischung auf *LB*-Platten gegeben. Diese wurden über Nacht bei 37 °C im Miniinkubator bebrütet. Ziel war es, eine Platte zu erhalten, von welcher einzelne Plaques gepickt werden konnten.

Am nächsten Tag wurde in ein 50 ml Röhrchen 10 ml auf 37 °C vorgewärmtes *SB*-Medium gegeben und mit 10 µl der *ER2537*-Bakterien beimpft. Dies wurde etwa 1 h bei 37 °C und 250 rpm mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt, bis eine OD von 0,5 erreicht wurde. Eine Pipettenspitze wurde verwendet, um eine einzige Plaque der Helferphagen in die frisch angewachsene Kultur zu geben. Diese Mischung wurde weitere 2 h bei 37 °C und 250 rpm mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt. Die infizierte 10 ml Kultur wurde in

einen 2 l Erlenmeyerkolben mit 500 ml auf 37 °C vorgewärmten *SB*-Medium überführt. Es wurden 700 µl einer 50 mg/ml Kanamycin-Lösung zugegeben. Anschließend wurde die Kultur über Nacht bei 37 °C und 250 rpm mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt. Die Kultur wurde in zehn 50 ml Röhrrchen tranferiert und für 15 min bei 2500 x g und RT mit der großen Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden in frische 50 ml Röhrrchen überführt und für 20 min in einem 70 °C warmen Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Röhrrchen für 15 min bei 2500 x g und 4 °C mit der großen Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden in frische 50 ml Röhrrchen überführt und bei 4 °C gelagert.

Für die Bestimmung des Titors der Helferphagen in der Helferphagensuspension (Herstellung siehe oben) wurde die Technik des *Plaque-Assays* verwendet. Hierfür wurden ER2537-Starterkulturen in 10 ml warmes *SB*-Medium ohne Selektionsantibiotikum gegeben, sodass eine initiale OD600 von 0,01 gegeben war. Dann wurden diese Kulturen für ca. 1-2 h bei 37 °C und 250 rpm im Inkubationsschüttler bebrütet, bis eine OD600 von 0,4-0,6 erreicht war. Bei dieser OD sind die Bakterien in der optimalen Wachstumsphase (frühe Phase logarithmischen Wachstums) für die Infektion.

Zur Phagentitrierung wurden Stichproben der Helferphagensuspension im Faktor  $10^7$ ,  $10^8$  und  $10^9$  in frischem *SB*-Medium verdünnt. Zur Infektion wurde je 1 µl dieser Verdünnungen zu 50 µl der Bakterienkultur gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde *LB-TOP*-Agar durch Aufkochen in der Mikrowelle verflüssigt und im Wasserbad in Proben von je 3 ml in 15 ml Falconröhrrchen auf eine Temperatur von 50 °C abgekühlt. Die 50 µl infizierten Bakterien wurden mit jeweils 3 ml flüssigem *LB-TOP*-Agar vermischt und zügig auf einer 37 °C warmen *LB*-Agarplatte verteilt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Anzahl der Plaques gezählt.

Der Titer wurde mittels Formel **2** berechnet. Für die Helferphagensuspension für nachfolgende Experimente wurde ein Titer von  $10^{12}$ – $10^{13}$  pfu/ml benötigt.

$$\text{Titer} = \text{Anzahl der Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \frac{1}{\text{Eingabevolumen}} \times \frac{1000 \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} \quad (2)$$

*Anzahl der Plaques*: Anzahl der Phagen (pfu) auf der Platte

*Eingabevolumen*: Volumen der Phagensuspension zur Infektion, hier 1 µl

*Verdünnungsfaktor*:  $1:10^7$ ,  $1:10^8$ ,  $1:10^9$

### 2.2.8 Testligation der *scFv*-Fragmente in den Vektor *pComb3XSS*

Die Ligation ist die Verknüpfung zweier DNA-Abschnitte mithilfe des Enzyms Ligase an ihren Enden. Die entsprechenden Enden wurden zuvor durch den Restriktionsverdau des Vektors und des Inserts, welches das *scFv-Overlap*-PCR-Produkt darstellt, erzeugt

(Barbas et al. 2001). Zunächst wurden Ligationen mit geringen Mengen durchgeführt, um die Eignung des Vektors und des *Inserts* zur effizienten Ligation und Transformation zu testen. Es wurden drei Ligationen angesetzt. Es wurden eine Testligation mit geringen Mengen an Vektor und dem *scFv-Overlap*-PCR-Produkt, eine Kontrollligation 1 mit dem Vektor und dem *Stufferfragment* und eine Kontrollligation 2 mit ausschließlich dem Vektor angesetzt. Die Ligationseffektivität des Vektors wurde durch das Ligieren mit dem gelaufgereinigten *Stufferfragment* geprüft. Die Menge an gering geschnittener oder nur einfach geschnittener DNA sollte möglichst gering sein und wurde über eine Ligungsreaktion, die nur Vektor-DNA enthält, kontrolliert.

Die Testligation der *scFv*-Fragmente in den Vektor *pComb3XSS* enthielt Folgendes:

**Tabelle 7: Testligation der *scFv*-Fragmente in den Vektor *pComb3XSS***

Substanz	Menge
Verdauter und aufgereinigter <i>pComb3XSS</i>	140 ng
Verdautes und aufgereinigtes <i>scFv-Overlap</i> -PCR-Produkt	70 ng
<i>T4 DNA Ligase</i>	1 µl
<i>5x Ligase Puffer</i>	4 µl
<i>ddH<sub>2</sub>O</i>	Ad 20 µl
<b>gesamt</b>	<b>20 µl</b>

Die Kontrollligation, welche die Ligationseffektivität des Vektors mittels *Stufferfragment* prüfte, enthielt Folgendes:

**Tabelle 8: Kontrollligation 1 (*Insert*-Kontrolle)**

Substanz	Menge
Verdauter und aufgereinigter <i>pComb3XSS</i>	140 ng
Verdautes und aufgereinigtes <i>Stufferfragment</i>	140 ng
<i>T4 DNA Ligase</i>	1 µl
<i>5x Ligase Puffer</i>	4 µl
<i>ddH<sub>2</sub>O</i>	Ad 20 µl
<b>gesamt</b>	<b>20 µl</b>

Die Kontrollligation, welche auf eine Selbstligation, beziehungsweise auf gering geschnittene oder nur einfach geschnittene DNA, testete, enthielt Folgendes:

**Tabelle 9: Kontrollligation 2 (Test für Selbstligation)**

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Verdauter und aufgereinigter <i>pComb3XSS</i>	140 ng
<i>T4 DNA Ligase</i>	1 µl
<i>5x Ligase Puffer</i>	4 µl
<i>ddH<sub>2</sub>O</i>	Ad 20 µl
<b>gesamt</b>	<b>20 µl</b>

Die Ligationen wurden über Nacht bei RT inkubiert. Je 50 µl zuvor frisch hergestellter elektrokompetenter *ER2537*-Bakterien wurden mit 1 µl jeder Reaktion durch Elektroporation transformiert. Die transformierten Kulturen wurden mit vorgewärmtem SOC-Medium 10-fach und 100-fach verdünnt und jeweils 100 µl davon auf *LBC*-Platten ausgestrichen. Anschließend wurden die Platten über Nacht bei 37 °C im Bakterieninkubator Miniinkubator bebrütet. Die Kolonien der Testligation mit dem Vektor und dem *scFv*-PCR-Produkt wurden gezählt und daraus die Zahl der Transformierten pro µg pf Vektor-DNA berechnet. Die Zahl  $1 \times 10^7$  musste überschritten werden, um mit der eigentlichen Ligation fortzufahren. Auch die Kolonien der Kontrollligation 1 wurden gezählt, um Informationen über die Qualität des Vektors und die Ligationseffektivität zu erhalten. Hier lag die Grenze um fortzufahren bei  $10^8$  *Kolonie-bildende-Einheiten* pro µg Vektor-DNA und weniger als 10 % Hintergrundligation. Die Hintergrundligation kann anhand der *Kolonie-bildenden-Einheiten* pro µg Vektor-DNA der Kontrollligation 2 bestimmt werden.

## 2.2.9 Ligation der *scFv*-Bibliothek und Transformation

### 2.2.9.1 Ligation der Bibliothek

Es sollten genug Reaktionen durchgeführt werden um  $5 \times 10^7$  Transformierte zu erhalten.

Folgende Ligationsreaktion wurde angesetzt:

**Tabelle 10: Ligation der *scFv* in *pComb3XSS***

Verdauter und aufgereinigter <i>pComb3XSS</i>	1,4 µg
Verdautes und aufgereinigtes <i>scFv-Overlap</i> -PCR-Produkt	700 ng
<i>T4 DNA Ligase</i>	10 µl
<i>5x Ligase Puffer</i>	40 µl
<i>ddH<sub>2</sub>O</i>	Ad 200 µl

**Gesamt****200 µl**

Die Ligationsreaktion wurde über Nacht bei RT inkubiert. Dann wurde die Ligation gefällt. Dazu wurde der Ansatz in zwei 1,5 ml Röhrchen aufgeteilt. Es wurden jeweils 1000 µl 1-Butanol zugegeben und gevortext. Anschließend wurde für 5 min bei 13000 x g und RT mit der Mikrozentrifuge *MicroStar 17R* zentrifugiert. Nun wurde alles abpipettiert bis nur noch die Pellets verblieben. Dann wurden 200 µl 70 % EtOH zugegeben und leicht geschüttelt. Es wurde nochmals für 5 min in der Mikrozentrifuge bei RT zentrifugiert und alles bis auf die Pellets abpipettiert. Zuletzt wurden die Pellets in je 10 µl *ddH<sub>2</sub>O* gelöst.

### 2.2.9.2 Transformation der scFv-Phagenbibliothek und Bestimmung der Diversität

Die Qualität der Antikörperbibliothek wird im Wesentlichen durch den Faktor ihrer Diversität bestimmt. Die Diversität entspricht der Anzahl an verschiedenen Antikörpern in der Bibliothek. Eine größere Anzahl verschiedener Antikörper erhöht die Wahrscheinlichkeit Antikörper mit der gewünschten Affinität und Spezifität zu selektieren. Die Bestimmung der absoluten Diversität der Antikörperbibliothek ist nicht möglich. Die Anzahl der verschiedenen Antikörper kann jedoch nicht größer sein als die Anzahl an unabhängigen Transformierten nach der Bibliotheksligation und -transformation. Zur Vereinfachung wird deshalb die Anzahl an unabhängigen Transformierten minus des Hintergrundes, auch Bibliotheksgröße genannt, verwendet, um die Diversität der Bibliothek zu beschreiben. Der Hintergrund ist durch die Kontrolligation 2 abschätzbar. Der Zielbereich der Bibliotheksgröße liegt bei mindestens  $10^7$  bis  $10^8$  unabhängigen Transformierten. Um diese Zahl zu erreichen, können mehrere Ligationen nötig sein (Barbas et al. 2001).

Nachdem die *scFv*-DNA über Nacht in den Vektor ligiert wurde (Ligation siehe oben), folgte am nächsten Morgen zunächst eine Fällung des Ansatzes. Die Fällung diente der Aufkonzentrierung sowie der Entfernung von Verunreinigungen wie beispielsweise störenden Salzen. Dazu wurden pro 100 µl Ligationsprodukt 100 µl 1-Butanol zugegeben, gevortext und für 5 min bei 13000 x g in der Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und 200 µl 70 % EtOH zugegeben. Dann wurde 5 min bei 13000 x g in der Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in 10 µl *ddH<sub>2</sub>O* gelöst.

Am Tag der Ligation war auch eine Übernachtkultur von *ER2537*-Bakterien in *SB*-Medium angesetzt worden, um am Folgetag frische elektrokompetente *E. coli* für die Transformation bereitzuhaben.

Die ligierte gefällte Bibliothek und zwei leere Elektroporationsküvetten wurden für 10 min auf Eis gestellt. 300  $\mu$ l elektrokompetenten *E. coli* wurden mit den 10  $\mu$ l Ligationsprodukt mittels einer Pipette vermischt und in eine der Elektroporationsküvetten gegeben und eine weitere Minute erneut auf Eis gestellt. In die zweite Elektroporationsküvette wurden 300  $\mu$ l elektrokompetenten *E. coli* gegeben. Diese Küvette diente als Kontrolle. Dann wurde die Elektroporation mit den Einstellungen 2,5 kV, 25  $\mu$ F und 200  $\Omega$  durchgeführt und die Küvette einmal mit 1 ml und dann zweimal mit 2 ml 37 °C warmen SOC-Medium ausgespült. Die ausgespülte Flüssigkeit wurde in ein 50 ml Röhrchen transferiert. Für die zweite Elektroporationsküvette wurde der Vorgang wiederholt.

Die Röhrchen wurden für 1 h bei 37 °C und 250 rpm mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt. Dann wurden in das Röhrchen, welches die Bibliothek enthielt, 10 ml auf 37 °C vorgewärmtes SB-Medium und 3  $\mu$ l einer 100 mg/ml Carbenicillinlösung gegeben. Zu der Kontrolle wurde nur 1 ml des SB-Mediums gegeben.

Um die Diversität zu erhalten, wurden 2  $\mu$ l der Kultur abgenommen und mit 2000  $\mu$ l SB-Medium um den Faktor  $10^3$  verdünnt. Davon wurden einmal 10  $\mu$ l und einmal 100  $\mu$ l auf LB-Platten ausplattiert. Auch von der Kontrolle wurden 2  $\mu$ l mit 2000  $\mu$ l SB-Medium um den Faktor  $10^3$  verdünnt und einmal 10  $\mu$ l und einmal 100  $\mu$ l auf LB-Platten ausplattiert. Der Rest des Tests wurde verworfen. Alle vier LB-Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Miniinkubator bebrütet.

Die 15 ml Kultur der transformierten Bibliothek wurde für 1 h bei 37 °C und 250 rpm mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt. Dann wurden 4,5  $\mu$ l 100 mg/ml Carbencellinlösung zugegeben. Die Kultur wurde erneut für 1 h bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. Es wurden 2 ml Helferphagen zugegeben und die Kultur in einen 500 ml Erlenmeyerkolben mit 183 ml vorgewärmtem SB-Medium und 92,5  $\mu$ l einer 100 mg/ml Carbenicillinlösung transferiert. Anschließend wurde die Kultur für 1,5 h bei 37 °C und 250 rpm mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt.

Dann wurden 280  $\mu$ l einer 50 mg/ml Kanamycinlösung zugegeben und die Mischung über Nacht bei 37 °C und 250 rpm mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt.

Die Berechnung der Diversität der transformierten Bibliothek, also die Anzahl von separaten Klonen, wurde am nächsten Morgen mithilfe der über Nacht bebrüteten LB-Platten und Formel 3 berechnet. Für ein erfolgreiches Panning wurde eine Diversität von mindestens  $10^6$  benötigt. Optimalerweise sollte die Diversität  $10^8$ - $10^9$  betragen. Die Bestimmung der Diversität ist nur ein Anhaltspunkt, da die Klonzahl durch die Zeit von einer Stunde zwischen der Elektroporation und der Probenentnahme verzerrt ist: Es können bereits Zellteilungen stattgefunden haben. Die Inkubationszeit von einer Stunde im SOC-Medium ist jedoch notwendig, um die Überlebensfähigkeit der Bakterien

sicherzustellen. Ohne diese Vorinkubation würde die Diversität also unterschätzt werden. Die Vorinkubationszeit von 1 h wurde empirisch ermittelt.

$$\text{Diversität} = \text{Koloniezahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \frac{\text{Kulturvolumen}}{\text{Ausplattierungsvolumen}} \quad (3)$$

*Koloniezahl*: Anzahl der infizierten Bakterien (cfu) auf der Platte

*Ausplattierungsvolumen*: Volumen, das ausgestrichen wurde, 1 µl, 10 µl oder 100 µl

*Verdünnungsfaktor*: hier 1:10<sup>3</sup>

*Kulturvolumen*: Gesamtvolumen der infizierten Kultur, 15.000 µl

Am nächsten Morgen wurden zudem die Phagen gefällt. Dazu wurde die Kultur bei 3000 x g und 4 °C für 15 min in der Stand-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden in eine saubere 500 ml Zentrifugenflasche für den *JA 10 Rotor* überführt und 8 g PEG-8000 und 6 g NaCl zugefügt. Die Feststoffe wurden durch etwa 5 min schütteln bei 37 °C und 250 rpm gelöst und die Kultur anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Nun wurde für 15 min bei 4 °C und 15000 x g in der Stand-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Becher umgedreht, gut abtropfen gelassen und für 10 min getrocknet. Die Phagenpellets wurden in 2 ml 1 % BSA in PBS gelöst, je in ein 2 ml Röhrchen gegeben und für 5 min bei 13000 x g mit der kleinen Tischzentrifuge *Centrifuge 5415 C* zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit einem 0,2 µm Filter in ein steriles 2 ml Röhrchen gefiltert. Die Phagenbibliothek kann direkt zum Phagen-*Panning* verwendet werden. Sie sollte allerdings nur frisch zubereitet für das Phagen-*Panning* genutzt werden.

## 2.2.10 *Panning* der scFv-Bibliothek

### 2.2.10.1 Bibliotheksreamplifikation

Die ligierten Bibliotheken müssen reamplifiziert werden, wenn sie nicht direkt zur Transformation weiter verwendet werden. Daher wurden alle an vorherigen Tagen produzierten Bibliotheksligationen reamplifiziert, außer die Ligation desselben Tages, welche direkt zur Transformation verwendet werden konnte. Zur Reamplifikation wurden zunächst 50 ml auf 37 °C vorgewärmtes *SB*-Medium mit 1 % Glucose in einem 250 ml Erlenmeyerkolben gegeben und mit 50 µl elektrokompetenten *ER2537*-Bakterien beimpft. Dies wurde für 2,5 h bei 37 °C und 250 rpm mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt, bis eine OD<sub>600</sub> von 1,0 erreicht war. 10 µl einer Mischung der zu reamplifizierenden Phagenbibliotheken wurde zugegeben und gut durchgeschüttelt. Die Kultur wurde 15 min bei RT ohne Schütteln inkubiert. Dann wurden 10 µl einer 100 mg/ml Carbenicillinlösung hinzugefügt. Um die durch Phagen infizierten Bakterien zu titrieren, deren Zahl weit über der der Bibliotheksgröße liegen sollte, wurde nun eine Probe gezogen. 10 µl der infizierten Kultur wurden mit *SB*-Medium auf 10<sup>-4</sup> verdünnt und davon einmal 1 µl und einmal 10 µl

auf *LBC*-Agar-Platten ausplattiert. Die 50 ml Kultur wurde in eine 500 ml Zentrifugenflasche für den *JA 10 Rotor* überführt und bei 37 °C und 250 rpm für 1 h mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt. Dann wurden 15 µl einer 100 mg/ml Carbenicillinlösung hinzugegeben und erneut für 1 h geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur bei RT und 3000 x g für 10 min bei 4 °C in der Stand-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 ml auf 37 °C vorgewärmtem *SB*-Medium mit 200 µl einer 100 mg/ml Carbenicillinlösung gelöst. Es wurden 2 ml der *M13K07*-Helferphagen zugegeben und für 1,5 h bei 37 °C und 250 rpm mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt. Dann wurden 280 µl einer 50 mg/ml Kanamycinlösung zugegeben und die Kultur über Nacht bei 30 °C und 250 rpm mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die Phagen gefällt. Dazu wurde die Kultur bei 3000 x g und 4 °C für 15 min in der Stand-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden in eine saubere 500 ml Zentrifugenflasche überführt und 8 g PEG-8000 und 6 g NaCl zugefügt. Die Feststoffe wurden durch etwa 5 min schütteln bei 37 °C und 250 rpm mit dem Inkubationsschüttler gelöst und die Kultur anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Nun wurde für 15 min bei 4 °C und 15000 x g in der Stand-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Becher umgedreht und gut abtropfen gelassen. Das Phagenpellet wurden in 2 ml 1 % BSA in PBS gelöst, in ein 2 ml Röhrchen gegeben und für 5 min bei 13000 x g mit der kleinen Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit einem 0,2 µm Filter in ein steriles 2 ml Röhrchen gefiltert.

### 2.2.10.2 Phagen-Panning

Zur Selektion von scFv-tragenden Phagenpartikeln, die an das AT1R oder ETAR binden, wurden Mikrotiterplatten (Eagle Biosciences, USA) benutzt. Diese Platten wurden im Vorfeld mit Membranextrakten von CHO-Zellen beschichtet, welche mit den genannten Rezeptoren transfiziert worden waren. Nach Amplifikation der Phagen wurden diese, wie oben beschrieben, mittels PEG/NaCl gefällt und in 2 % Magermilchpulver in PBS aufgenommen. Für die erste Selektionsrunde wurden 4 Wells der Mikrotiterplatte mit je 50 µl Phagensuspension befüllt. In späteren Runden wurde die Zahl der Wells erst auf 2, dann auf 1 Well reduziert. Während jeder Runde sollten spezifisch bindende Klone selektiert und vermehrt werden. Diese Klone sollten nach drei bis vier Runden dominieren. Jegliche Phagen-enthaltende Substanzen wurden in einen gesonderten Wastekontainer gegeben und mit Hypochlorit versetzt.

Um die Anreicherung spezifisch bindender Phagen zu beurteilen, wurde die Anzahl der infektiösen Phagen bestimmt, die in das Panning hineingegeben wurden (Input-Titer) bzw. nach dem Waschen eluiert wurden (Output-Titer). Der *Input* jeder Runde sollte im Bereich von  $10^{12}$  Phagen und der Output im Bereich von  $10^5$ - $10^8$  Phagen liegen. Der Output ist

abhängig von der Anzahl der Waschschrirte und dem Grad der Anreicherung in einer bestimmten Runde. Ein 10 bis 100-facher Anstieg des *Outputs* nach 3 oder 4 Runden ist typisch.

Jeder Panning-Zyklus bestand aus vier Schritten: (I) Blocken der Mikrotiterplatte, um unspezifische Bindungen zu vermeiden, (II) Inkubation mit der Eingabephagensuspension, (III) Wegwaschen unspezifisch bindender Phagen und (IV) Elution der spezifisch gebundenen Phagen.

Zum Blocken der Mikrotiterplatter wurden die gewünschten Wells mit 200 µl 2 % Milchpulver in PBS befüllt und für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Plattformschüttler *Duomax 1030* bei 700 rpm geschüttelt. Alle Schritte auf dem Plattformschüttler erfolgten bei 700 rpm. Danach wurde der Inhalt abgesaugt und die Platten trocken geklopft. Zur Inkubation mit der Eingabephagensuspension wurden jeweils 50 µl Phagensuspension mit 50 µl 2 % Milchpulver in PBS auf die vorbereiteten Mikrotiterplatten-Wells gegeben. Danach wurde die Platte bei Raumtemperatur für 1 h auf dem Plattformschüttler inkubiert und anschließend für 0,5 h stehen gelassen.

Parallel zum durchgeführten *Panning*-Zyklus wurden 20 µl elektrokompetente *ER2537*-Bakterien in 20 ml *SB*-Medium angesetzt, welche etwa 2,5 h bei 37 °C und 250 rpm mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt wurden, bis eine OD600 von 1,0 erreicht wurde.

Nach den 1,5 h wurde die Phagemischung mit Filterspitzen aus den befüllten Feldern der ELISA-Platte abgesaugt. Dann wurde jedes Feld mit 300 µl PBS-T durch auf- und abpipettieren gewaschen und anschließend mit PBS-T befüllt für 5 min inkubiert. Danach wurde das PBS-T vollständig mit Filterspitzen abgesaugt. Dieser Waschprozess erfolgte in der ersten Phagen-*Panning* Runde 5-mal und in allen weiteren 10-mal.

Anschließend wurde eluiert. Dazu wurde zunächst je 100 µl einer 100 mM Triethylaminlösung in jedes Feld gegeben und die Platte danach für etwa 10 min auf dem Plattformschüttler geschüttelt. Diese 400 µl wurden dann in einem 1,5 ml Röhrchen gesammelt und 1mM Tris-HCL (pH 7,4) im Verhältnis 2:1 zugegeben. In der ersten Panningrunde wurden also 200 µl zugegeben, in der zweiten Runde 100 µl und in der dritten und vierten Runde 50 µl.

Die bei 37 °C in 20 ml *SB*-Medium auf eine OD600 von 1,0 herangezogene *E. coli ER2537*-Kultur wurde nun mit der jeweiligen Phagensuspension infiziert. Von der Inputphagensuspension wurden 10 µl für ein Kulturvolumen von 10 ml verwendet. Das Eluat nach Phagenpanning wurde komplett verwendet, um 10 ml Bakterien zu infizieren. Nach Infektion wurden die Bakterien für 45 min bei 37 °C und 250 rpm in dem Inkubationsschüttler inkubiert.

Anschließend wurde der Output titriert, indem 10 µl der 10 ml Kultur in 10 ml *SB*-Medium gegeben wurde. Dies wurde einmal 1:1, 1:10<sup>2</sup> und 1:10<sup>4</sup> in *SB*-Medium verdünnt und auf eine *LBC*-Platte gegeben. Der Rest der Kultur wurde auf einer großen *LBC*-Platte ausgestrichen. Die *Input*-Titrierung erfolgte aus der eingesetzten Phagenlösung. 10 µl davon wurden in 10 ml *SB*-Medium anwachsen gelassen und anschließend auf 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>4</sup>, und 1:10<sup>6</sup> verdünnt und auf eine *LBC*-Platte gegeben.

Die Berechnung des *Input*-Titers erfolgt mittels der Formel 4.

$$\text{Input} = \text{Koloniezahl} \times \frac{\text{Eingabevolumen}}{\text{Infektionsvolumen}} \times \frac{\text{Kulturvolumen}}{\text{Ausplattierungsvolumen}} \times \text{Verdünnungsstufe} \quad (4)$$

Die Berechnung des *Output*-Titers erfolgt mittels der Formel 5.

$$\text{Output} = \text{Koloniezahl} \times \frac{\text{Eluat}}{\text{Infektionsvolumen}} \times \frac{\text{Kulturvolumen}}{\text{Ausplattierungsvolumen}} \times \text{Verdünnungsstufe} \quad (5)$$

*Input*: Anzahl der infektiösen Phagenpartikel, die in das Panning gegeben wurden

*Output*: Anzahl der infektiösen Phagenpartikel, welche nach dem Waschen eluiert wurden

*Koloniezahl*: Anzahl der infizierten Bakterien (cfu) auf der Platte

*Kulturvolumen*: Gesamtvolumen der infizierten Kultur, 10.000 µl

*Verdünnungsstufe*: 1:1, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>4</sup>, 1:10<sup>6</sup>

*Ausplattierungsvolumen*: Volumen, das ausgestrichen wurde, 10 µl

*Eingabevolumen*: Volumen der Phagensuspension, die zum Panning in die Mikrotiterplatte gegeben wurde

*Infektionsvolumen*: Volumen der Phagensuspension, mit dem die Bakterienkultur beimpft wurde

*Eluat*: Volumen des Eluats nach dem *Phagenpanning*

### 2.2.10.3 Verpacken der Phagen von einer Riesenplatte mit Bakterien

Zu einer Bakterienplatte wurden einfach 5 ml *SB*-Medium mit 10 % steril filtriertem Glycerol gegeben. Danach wurden die über Nacht angewachsenen Bakterienkolonien mit einem *Drigalski*-Spatel vorsichtig abgekratzt. Die entstandene Bakteriensuspension wurde in ein 10 ml Falcon-Röhrchen gefüllt. 50 ml auf 37 °C vorgewärmtes *SB*-Medium mit 50 µl einer 100 mg/ml Carbencellinlösung und 1 % Glukose wurden nun mit etwa 20-80 µl dieser Bakteriensuspension versetzt, bis zu einer optischen Dichte im Bereich von 0,05-0,1 bei 600 nm. Dann wurde die Kultur bei 37 °C und 250 rpm mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt. Die restlichen Bakterien wurden in 100 µl Portionen aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Als eine OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 erreicht war, wurden 10 ml der 50 ml Bakterienkultur in ein 15 ml Röhrchen gegeben und mit 4 ml der *M13K07*-Helferphagen versetzt. Dabei wurde in etwa eine 20:1-Ratio von Phagen zu Bakterien erreicht. Dies wurde für 30-40 min im Miniinkubator bei 37 °C bebrütet, um die Bakterien

durch die Phagen infizieren zu lassen. Dann wurde bei 3000 x g für 10 min bei RT mit der großen Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml *SB*-Medium mit 66,7 µl einer 50 mg/ml Kanamycinlösung und 100 µl einer 100 mg/ml Carbenicillinlösung aufgenommen und über Nacht bei 30 °C und 250 rpm mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt.

Am nächsten Morgen wurden die Phagen geerntet. Dazu wurde die 100 ml Kultur bei 3000 x g und 4 °C mit der großen Tischzentrifuge für 15 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in eine saubere 500 ml Zentrifugenflasche für den *JA 10 Rotor* überführt und 20 ml 20 % PEG/ 2 M NaCl zugefügt. Anschließend wurde die Mischung für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde für 30 min bei 4 °C mit 15000 x g in Stand-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Becher umgedreht, gut abtropfen gelassen und für 10 min getrocknet. Das Phagenpellet wurde in 80 ml *Ampuwa* gelöst und 10 ml 20 % PEG/ 2 M NaCl zugefügt. Die Mischung wurde weitere 30 min auf Eis gestellt und anschließend erneut für 15 min bei 4 °C mit 15000 x g in der Zentrifuge *Avanti J-E* zentrifugiert. Die Pellets wurden in 1 ml 1 % BSA in PBS gelöst, in ein 2 ml Röhrchen gegeben und für 5 min bei 13000 x g mit der kleinen Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und konnte direkt für die nächste Runde des Phagen-Pannings weiter verwendet werden.

Kommentar zur Handhabung von M13-Phagen und gentechnisch veränderten Bakterien: Phagen oder gentechnisch veränderte Bakterien enthaltender Müll sollte in einem gesonderten Abfallbehälter entsorgt und mit 10 % HOCl versetzt werden.

### 2.2.11 Anzüchten von Bakterienkulturen auf Mikrotiterplatten

Zur anschließenden Testung diverser Klone durch einen Dot Blot bzw. ELISA wurden Bakterienkulturen in 96-Well-Mikrotiterplatten angezüchtet. pComb3XSS beinhaltet einen induzierbaren Promotor *lacZ*. Dieser ermöglicht eine Induktion mit IPTG. Zudem ist ein Amber-Stoppcodon enthalten, welches eine Herstellung von löslichen *scFv* durch die Verwendung bestimmter *E. coli*-Stämmen, welche dieses als Stoppcodon lesen, ermöglicht (Barbas et al. 2001).

Zunächst wurde jedes Well der 96-Well-Mikrotiterplatte mit 200 µl *SB*-Medium mit 0,1 % Glucose und 100 µg/ml Carbenicillin belegt. Die Platte wurde mit Parafilm abgedeckt. Mit Zahnstochern wurden einzelne Kolonien des *Outputs* gepickt. In jedes Well der Mikrotiterplatte kam jeweils eine andere Kolonie. Um zu wissen wo bereits inokuliert wurde, wurden die Zahnstocher stecken gelassen. Nicht inokulierte Felder dienten als Negativkontrolle. Anschließend wurde 3 h bei 37 °C und 250 rpm mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt. Dann wurde von der Induktion eine Replikatplatte genommen. Dazu wurde eine neue U-Boden-Mikrotiterplatte mit 40 µl 40 %-Glycerol in

*SB*-Medium pro Well belegt und jeweils 40 µl der angeschüttelten Bakterien auf die neue Platte übertragen. Diese Platte wurde bei -70 °C eingefroren. Die angeschüttelten Bakterien wurden dann mit 40 µl 5 mM IPTG in *SB*-Medium mit 100 µl/ml Carbenicillin pro Well versetzt. Nun wurde über Nacht bei 30 °C mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Bakterienplatte bei 3500 rpm für 10 min bei 4 °C mit der großen Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden benötigt.

### 2.2.12 Dot Blot zum Nachweis der *scFv*-Expression in *E. coli*

Zum einfachen Nachweis von *scFv* im Überstand von *E. coli* wurde eine Dot Blot-Technik angewandt. Es handelt sich um eine Blotting-Technik, bei der ein spezifischer Antikörper verwendet wurde, um das Vorhandensein eines Proteins in der Probe nachzuweisen. Der Dot Blot ähnelt dem Western Blot, jedoch ohne elektrophoretische Auftrennung der Moleküle. Analog zum Western-Blot wird geprüft, ob die gesuchten Proteine in der Probe vorhanden sind. Als Antikörper diente ein peroxidase-gekoppelter *anti-HA-Tag*-Antikörper gegen das *HA-Tag* des pComb3XSS. Das *HA-Tag* befindet sich vor dem Amber-Stoppcodon und kann so auch bei der Herstellung von löslichen *scFv* auf diesen nachgewiesen werden. Der Dot Blot liefert keine Informationen über die korrekte Faltung des Proteins (Andris-Widhopf et al. 2000, Hauk 2013, Naeim et al. 2013).

Es wurden 94 *E. coli*-Klone der Primärbibliothek gepickt und wie oben beschrieben auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte angezüchtet. Ein Well wurde markiert, und diente als Negativkontrolle. Dieses sollte nicht inokuliert werden. Ein weiteres Well diente zur Positivkontrolle.

Zur Durchführung des Dotblots wurde zunächst eine trockene Nitrozellulosemembran in den Dot Blot-Apparat eingespannt. Dann wurde die Vakuumpumpe angeschlossen und 100 µl PBS in jedes Well gefüllt. Das PBS wurde abgesaugt und anschließend 50 µl des Bakterienüberstandes in jedes Well übertragen. Dann wurde der Bakterienüberstand abgesaugt. Die Membran wurde ausgespannt und für 1 h in 1 % BSA in PBS-T eingeweicht. Dabei wurde es auf einer Elektrowippe geschaukelt. Im Anschluss wurde die Membran gewaschen, indem sie dreimalig für 5 min in PBS-T eingeweicht wurde. Die Membran wurde in eine kleine flache Tüte eingespannt und in 10 ml 1 % BSA in PBS-T und 5 µg/ml peroxidase-gekoppeltem *anti-HA-Tag*-Antikörper für eine weitere Stunde eingeweicht. Anschließend wurde die Membran erneut durch dreimaliges für 5 min in PBS-T Einweichen gewaschen. Die Membran wurde wieder in eine kleine flache Tüte eingespannt und mit 10 ml 1 % BSA in PBS-T und 1:2000 HRP-Streptavidin eingeweicht. Dies wurde für eine Stunde bei RT in einer Wanne inkubiert. Dann wurde die Membran erneut durch dreimaliges für 5 min in PBS-T Einweichen gewaschen. Die Membran wurde unter einem Abzug mit einer Diaminobenzidin-Färbelösung inkubiert. Bei ausreichender

Färbung wurde das Anfärben durch Waschen der Membran in *ddH<sub>2</sub>O* gestoppt. Dazu wurde sie für etwa 5 min in *ddH<sub>2</sub>O* eingeweicht und anschließend in noch feuchtem Zustand fotografiert. Dann wurde die Membran auf Whatman-Filterpapier getrocknet.

### 2.2.13 Analyse der *scFv*-Fragment-exprimierenden Klone mittels ELISA

Sobald spezifisch bindende Phagen auftreten, werden einzelne Klone gescreent. Eine besonders schnelle und einfache Methode ist ein ELISA. Dabei werden Antikörper enthaltende Überstände von induzierten Kulturen getestet. Wenn *pComb3XSS* für die Bibliothekskonstruktion verwendet wurde, können Antikörperfragmente, die das Antigen binden, mit einem peroxidase-gekoppelten *anti-HA-Tag*-Antikörper detektiert und mittels kolimetrischer Farbreaktion gemessen werden. Es wurden einzelne Kolonien der *Output*-Titerplatte des Pannens mit Zahnstochern gepickt und in jeweils 5 ml *SB*-Medium mit 0,1 % Glucose und 100 µg/ml Carbenicillin in einem 15 ml Röhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden anschließend für 3 h bei 37 °C und 250 rpm mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt. Dann wurden je 5 µl einer 1000-fachen Grundlösung IPTG zugegeben und bei 30 °C über Nacht mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde zunächst eine ELISA-Mikrotiterplatte mit dem ELISA-Waschautomaten viermal mit PBS-T bei RT gewaschen. Auch zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde die ELISA-Mikrotiterplatte jeweils mittels des ELISA-Waschautomaten viermal mit PBS-T bei Raumtemperatur gewaschen. Nach dem ersten Waschvorgang wurde 50 µl 1 % BSA in PBS-T und 50 µl des Bakterienüberstandes in jedes Well gegeben. Dies wurde 60 min bei RT auf dem Plattformschüttler bei 700 rpm geschüttelt. Dann wurde erneut gewaschen. Es wurden 100 µl einer Grundlösung mit 12 ml 1 % BSA in PBS-T und 30 µl *Anti-HA-Biotin* in jedes Well gegeben und 60 min bei RT geschüttelt. Daraufhin wurde erneut gewaschen und im Anschluss 100 µl einer Grundlösung mit 12 ml 1 % BSA in PBS-T und 6 µl HRP-Streptavidin in jedes Well gegeben. Nun wurde erneut gewaschen. Anschließend wurden 100 µl *1-step Turbo™-ELISA* in jedes Well gegeben. Unter Schütteln wurde die Farbentwicklung beobachtet, wobei bis zu 10 min geschüttelt wurde. Dann wurde die Farbreaktion durch die Zugabe von 100 µl 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Well gestoppt. Im ELISA-Plattenleser *VICTOR 3™* wurde die Extinktion der Platte bei 450 nm bestimmt.

### 2.2.14 Sequenzierung von Klonen der ligierten *Overlap*-Bibliothek

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma *Eurofins* durchgeführt.

Zunächst wurden mit Phagen infizierte Bakterien der Bibliothekstransformation auf einer *LB*-Platte ausgestrichen und im Miniinkubator bei 37 °C bebrütet. Nach Anwachsen der Bakterienkulturen auf eine adäquate Größe wurden mittels Zahnstocher einzelne Klone gepickt und in je ein 50 ml Röhrchen mit 10 ml *LBC*-Medium mit 100 µg/ml Carbenicillin

gegeben. Die Röhren wurden über Nacht bei 37 °C und 250 rpm mit dem Inkubationsschüttler geschüttelt. Am Folgetag wurden die Zahnstocher mit einer sterilen Pinzette entfernt und die Röhren für 10 min bei 4500 × g und 4 °C mit der großen Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und übrig gebliebenes Medium entfernt. Das in dem Röhren verbliebene Pellet wurde nach Protokoll des *QIAprep Spin Mini Prep Kit* behandelt. Auf diese Weise wurden die Plasmide isoliert. Die isolierten Plasmide wurden zu *Eurofins* geschickt, wo mittels der *scFv*-Primer  $V_L$ : *ompseq* und  $V_H$ : *HRML-F* die Sequenzanalyse erfolgte.

## 2.3 Technik der Epitopkartierung

Im zweiten Abschnitt der Arbeit sollten über eine Epitopkartierung die Angriffsstellen der Autoantikörper auf CXCR3 genauer untersucht werden. Hierzu wurden *Peptid-Arrays* in Form von ELISAs durchgeführt.

### 2.3.1 Lösen der Peptide

Zunächst sollten die Peptide, welche die komplette Sequenz von CXCR3 in überlappender Form abdeckten, gelöst werden. Dazu wurden sie für 1 min bei 13000 x g mit der Mikrozentrifuge zentrifugiert. Dann wurden sie entsprechend ihrer Hydrophobizität und ihres isoelektrischen Punktes in NaOH, HCL oder DMF aufgelöst. Die gelösten Peptide wurden in PBS weiter verdünnt. Anschließend wurde bei den schlecht löslichen Peptiden jeweils einmal der Überstand und einmal das Sediment verwendet, um die Platten zu belegen.

### 2.3.2 Peptid-ELISA zum Screenen von CXCR3-positiven Seren

In einem Peptid-ELISA sollte untersucht werden an welche Abschnitte der Peptidsequenz von CXCR3 die Patientenseren binden. Zu Beginn wurden die bindenden Streptavidin-beschichteten 96-Well-Platten mit einem *Columbus Pro Plattenwascher* gewaschen. Alle Waschschriffe erfolgten bei Programm 9 (Normal) mit PBS-T. Pro Well wurden 50 µl der mit PBS-T auf eine Konzentration von 20 µg/ml verdünnten Peptid-Lösung aufgetragen. Für jedes Well wurde nur ein Peptid verwendet. Als Positivkontrolle wurde *biotinyliertes Anti-Human-IgG1* eingesetzt, Negativkontrollen wurden leer gelassen. Jede Kontrolle und jedes Peptid wurden zweimal auf einer einzigen 96-Well-Platte platziert, um je zwei einzelne Seren pro Platte zu testen.

**Tabelle 11: Auftragungsmuster der Peptide und Kontrollen**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	7*	7	13	19	25	31	7*	7	13	19	25	31
<b>B</b>	IgG1	11*	14	20	26	32	IgG1	11*	14	20	26	32
<b>C</b>	1	12*	15*	21	27	33	1	12*	15*	21	27	33
<b>D</b>	2	8	16*	17*	28	34	2	8	16*	17*	28	34
<b>E</b>	3	9	15	23*	24*	35	3	9	15	23*	24*	35
<b>F</b>	4	10	16	22	26*	Leer	4	10	16	22	26*	Leer
<b>G</b>	5	11	17	23	29	31*	5	11	17	23	29	31*
<b>H</b>	6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36

Die Markierung \* bedeutet Überstand.

Die Platten wurden für 1 h bei RT auf dem Plattformschüttler mit den Peptidlösungen inkubiert. Anschließend wurden die Platten erneut gewaschen. Nun wurden pro Well 100 µl der 1:100 in PBST-1 % BSA verdünnten SSc-Patientenseren oder Kontrollseren aufgetragen. Pro Platte wurden jeweils 2 Seren aufgetragen. Die Platten wurden für 1 h bei RT auf dem Plattformschüttler mit 100 µl/Well SSc-Patientenseren oder Kontrollseren 1:100 in PBS-T inkubiert. Anschließend wurden die Platten nach einem weiteren automatischen Waschschrift für 1 h bei RT mit je 50 µl eines *Peroxidase-konjugierten polyklonalen Anti-Human-IgG-Antikörpers* in PBST-1 % BSA 1:1000 auf dem Plattformschüttler inkubiert. Daraufhin folgte ein weiterer Waschschrift. Zur Visualisierung wurden nun 50 µl/Well des *1-step™ Turbo-TMB-ELISA* verwendet. Unter Beobachtung der Farbentwicklung zu blau wurden die Platten für 5 min auf dem Plattformschüttler inkubiert. Dann wurde pro Well 50 µl 1 M Schwefelsäure als Stopplösung zugegeben. Die OD450 des ELISA-Signals  $\times$  wurde von dem ELISA-Plattenleser erfasst.

### 2.3.3 Mischpeptid-ELISA

Der Mischpeptid-ELISA wurde durch Andreas Recke durchgeführt. Er sollte die durch den zuvor durchgeführten Peptid-ELISA detektierten Epitope verifizieren. Dazu wurden die bindenden Streptavidin-beschichteten 96-Well-Platten zunächst mit einem *Columbus Pro* Plattenwascher gewaschen. Alle Waschschriffe erfolgten bei Programm 9 (Normal) mit PBS-T. Pro Well wurden 50 µl der mit PBS-T auf eine Konzentration von 20 µg/ml verdünnten Mischpeptid-Lösung aufgetragen. Dazu wurden die Peptide 17, 24, 25, 33 und 34 in PBS-T mit einer Gesamtkonzentration von 20 µg/ml kombiniert und mit Streptavidin-beschichteten 96-Well-Platten, wie oben beschrieben, inkubiert. Alle SSc-Patientenseren, 16 gesunde Kontrollen des vorherigen Peptid-ELISAs und 31 bisher nicht verwendete gesunde Kontrollen, wurden als Duplikate gemessen. Die experimentellen Verfahren für diesen Test wurden mit genauem Timing durchgeführt, um die Vergleichbarkeit der Werte der optischen Dichte bei 450 nm zwischen den Platten zu gewährleisten.

### 2.3.4 *In Silico* Vorhersage von Epitopen

Es wurden zwei verschiedene Software-Ansätze verwendet, um kontinuierliche Epitope in der CXCR3-Sequenz vorherzusagen. Zum einen wurde *Antigenic* aus dem EMBOSS-Paket mit einer Fenstergröße von 6 Aminosäuren verwendet. *Antigenic* basiert auf der Mittelwertbildung der Antigenität von Aminosäuren in der Sequenz der Proteine (EMBOSS explorer 2018). Zum anderen wurde die Software *ABCpred*, basierend auf einem trainierten neuronalen Netzwerk, das einen Score für Untersequenzen von Proteinsequenzen in einem Schiebefenster ermittelt, verwendet (Saha und Raghava 2006). Es wurde eine Fenstergröße von 20 Aminosäuren gewählt.

### 2.3.5 Statistische Auswertung von Daten des Peptid-ELISAs

Die Daten des Peptid-ELISAs wurden durch Andreas Recke statistisch ausgewertet. Zur Analyse diente eine bayesische Statistik. Lineare Peptide haben nicht die gleiche Konformation im Vergleich zu einem vollständig gefalteten Protein, das durch eine Zellmembran weiter stabilisiert wird (Banik und Doranz 2010, Flanagan 2011, Murphy und Weaver 2018). Dies ist eine potentielle Quelle unspezifischer Bindungssignalvariationen, die bei der Datenanalyse berücksichtigt werden müssen. Zusätzliche Variation entsteht, weil Seren von Patienten und gesunde Kontrollen nicht nur gegen CXCR3 gerichtete Antikörper, sondern eine ganze Reihe verschiedener Antikörper enthalten, die unspezifisch an die Peptide binden können. Um ein SSc-spezifisches Bindungssignal vom Hintergrundrauschen zu trennen, wurde eine bayesische Statistik verwendet. Es wurde ein gemischtes Modell unter Verwendung von *R Open-Source-Statistik-Software* zusammen mit dem Zusatzpaket *R-INLA* erstellt (Rue 2009, Rue et al. 2009, R Team 2012, The R Foundation 2012, Martins et al. 2013). Die Peptideigenschaften wurden mit dem *R*-Paket *peptides* berechnet. Der Faktor von 1,1 wurde willkürlich festgelegt um gültige *logit* ( $x$ ) Werte für alle gemessenen Werte zu erhalten. Der normierte Wert  $\hat{x} = (x - u)/(o - u)$  wurde berechnet.

Um das ELISA-Signal  $x$  pro Platte zu normieren, wurde ein oberes  $o = \max(x) * 1,1$  und ein unteres Limit  $u = \min(x)/1,1$  festgelegt. Der Logitwert von ELISA-Signalen wurde

berechnet mit 
$$\text{logit}(x) = \ln \left( \frac{\hat{x}}{1 - \hat{x}} \right).$$

Um nicht aussagekräftige Plattenmessungen von der weiteren Verarbeitung auszuschließen, wurde folgende Regel angewandt: Die Varianz der Messwerte auf dieser Platte muss größer sein als das 25 %-Quantil der Varianzen aller anderen ELISA-Platten.

Zur Analyse der ELISA-Signale wurde ein gemischtes Modell, unter Verwendung des *INLA*-Paketes mit *logit*( $x$ ) als die abhängige Variable und dem isoelektrischen Punkt ( $pI$ ) sowie der Hydrophobie der Peptide als fixe Effekte mit einer standardmäßig eingestellten *a-priori*-Verteilung, konstruiert. Als Zufallseffekte wurden Platten-ID und Serum-ID mit einem *iid*-Modell und die Peptidzahlen mit einem speziellen autoregressiven Modell der Ordnung 1 (*ar1*) aufgenommen. Mittels autoregressiver Modelle wurden Nachbarschaftsstruktur, das heißt die Überlappungen von Peptiden, berücksichtigt. Die unspezifische Bindung von Seren und sekundären Nachweisantikörpern an die Peptide wurde durch ein einfaches autoregressives Modell einbezogen. Eine SSc-spezifische Bindung wurde durch die Kombination des autoregressiven Modells mit einem

Gewichtungsfaktor modelliert. Es wurde ein einfaches *ar1*-Modell mit einem gewichteten *ar1*-Modell kombiniert. Für SSc-Patienten wurde der Gewichtungsfaktor auf 1 gesetzt, für gesunde Kontrollen auf 0. Für alle Zufallseffektmodelle wurden die im Programmpaket voreingestellten vagen *a-priori*-Verteilungen der jeweiligen Hyperparameter gewählt. Diese zusätzlichen zufälligen und fixen Effekte dienten in erster Linie dazu, das Rauschen aus dem SSc-spezifischen Bindungssignal zu entfernen. Ein bayesisches Analogon eines p-Wertes (*pBayes*) wurde wie beschrieben berechnet (Koch 2000, Recke et al. 2015). Für eine gegebene *a-posteriori*-Verteilung der Regressionskoeffizienten wurde die größte  $\alpha \in [0;1]$  so bestimmt, dass das Glaubwürdigkeitsintervall mit der höchsten posterioren Dichte (*hpd*-Intervall) von  $\alpha$  nicht den Punkt 0 enthält. *pBayes* wurde dann als  $pBayes = (1-\alpha)$  berechnet. Der *R*-Code und die Angaben zum Datensatz sind in den ergänzenden Methoden und ergänzenden Informationen im Datenblatt *S1* des Papers im Anhang ausführlich beschrieben.

### 2.3.6 Statistische Auswertung von Daten des Mischpeptid-ELISAs

Die Daten des Mischpeptid-ELISAs wurden durch Andreas Recke statistisch ausgewertet. Mischpeptid-ELISA Daten wurden als OD450-Rohdaten mithilfe von *R Open-Source*-Statistik-Software mit den zusätzlichen Paketen *beeswarm* für die visuelle Darstellung von Daten (gestapelte Streudiagramme) und *ROCR* für die Analyse der Empfänger-Betreiber-Charakteristik (*receiver operator characteristic/ROC*) ausgewertet. Der *Cut-off*-Wert wurde durch Optimierung des *Korrelationskoeffizienten von Matthew* berechnet (Baldi et al. 2000). Der *Korrelationskoeffizient von Matthews* wurde berechnet als:

$$MCC = \frac{TP * TN - FP * FN}{\sqrt{(TP + FP)(TP + FN)(TN + FP)(TN + FN)}}$$

*TP* ist die Anzahl der echt Positiven, *TN* die Anzahl der echt Negativen, *FP* die Anzahl der falsch Positiven und *FN* die Anzahl der falsch Negativen. Für die Parameter Sensitivität, Spezifität, positive Likelihood ratio (*LR*)<sup>+</sup> und negative (*LR*)<sup>-</sup> wurden mittels *Clopper-Pearson Methode* binominale 95 % Konfidenzintervalle (95 % CI) berechnet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Erstellung einer scFv-Antikörperbibliothek in M13-Phage (*Phage Display*)

Um funktionelle Autoantikörper gegen ETAR und AT1R herzustellen, sollte eine Bibliothek aus scFv-Antikörpern aus Blutzellen von Patienten mit SSc generiert werden.

#### 3.1.1 RNA Aufreinigung aus PBMCs

PBMCs wurden in der Charité Berlin aus je 50 ml (**A-D**) oder 17 ml (**E**) K-EDTA-Vollblut von Patienten mit SSc isoliert. Insgesamt wurden die Seren von 4 Patienten (Patient 1 = **A** & **B**, Patient 2 = **C**, Patient 3 = **D** und Patient 4 = **E**) verwendet. Die isolierten PBMCs wurden bei -80 °C gelagert.

Aus diesen Zellen sollte nun die Gesamt-RNA isoliert werden. Hierfür wurde das *RNeasy Mini Kit* verwendet. Um kontaminierende genomische DNA zu entfernen, wurde der optionale *DNase*-Verdau durchgeführt. Die RNA wurde schließlich in *ddH<sub>2</sub>O* aufgenommen und bei -80 °C gelagert. Weil eine große Menge an RNA für die nachfolgenden Arbeiten benötigt wurde, wurden sie in je vier separaten Ansätzen aufgereinigt.

Die Konzentration der RNA wurde mittels eines *Nanodrop*-Photometers durch Auslesung der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Konzentration der totalen RNA**

Patient	Konzentration der RNA [ng/µl]			
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
<b>A (SKL 169)</b>	53,7	88,8	71,2	61,8
<b>B (SKL 169)</b>	82,6	75,9	107,2	69,3
<b>C (SKL 828)</b>	116,8	96,6	44,0	85,2
<b>D (SKL 284)</b>	59,3	52,7	48,6	55,5
<b>E (SKL 748)</b>	82,2	105,1	75,3	95,7

#### 3.1.2 cDNA-Synthese aus RNA

Die Produktion der stabileren cDNA aus der mRNA mittels *reverser Transkription* wurde mithilfe eines kommerziell erhältlichen cDNA Synthese Kits durchgeführt. Zunächst wurde ein Test mit nur einer Probe durchgeführt, welche direkt für eine *First-Round-PCR*

verwendet und anschließend anhand einer Agarosegelelektrophorese kontrolliert wurde. Nachdem der Erfolg der Synthesereaktion auf diese Weise nachgewiesen worden war, wurde die cDNA Synthese mit mehreren Proben gleichzeitig durchgeführt und dabei eine Negativkontrolle der PCR ohne Enzym und eine Negativkontrolle ohne RNA durchgeführt. Die Kontrolle ohne Enzym erfolgte, um eventuelle Reste genomischer DNA in der RNA-Präparation nachzuweisen. Die Kontrolle ohne RNA wurde durchgeführt um eventuelle Kreuzkontaminationen, welche während des Ansetzens der *reversen Transkription* zustande kommen können, nachzuweisen. Alle Negativkontrollen waren negativ.

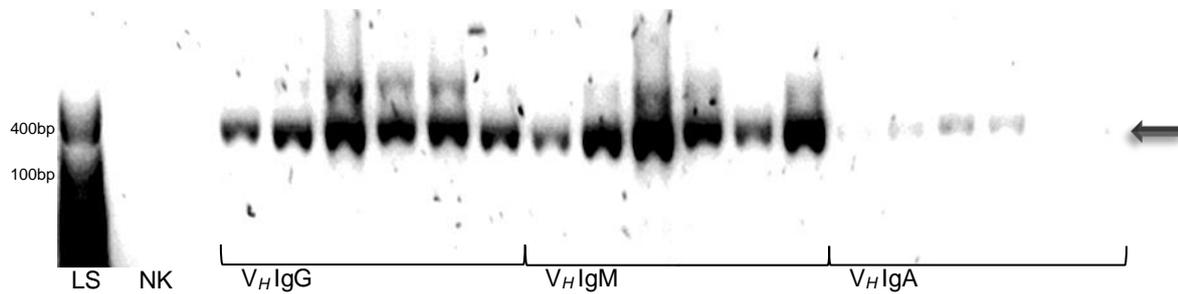
### 3.1.3 Herstellung der *scFv*-Fragmente

#### 3.1.3.1 Erste Runde *scFv*-PCR: Amplifizierung leichter und schwerer Ketten

Zur Herstellung der humanen *scFv*-Bibliothek wurden *Long Linker* verwendet. Verschiedene *Linker* bedingen unterschiedliche Grade an Oligomerisation und können auch die Grenzflächen der  $V_H$  und  $V_L$ -Regionen verändern. Die Entscheidung fiel auf die Verwendung von Primern in Form von *Long Linkern*, da bei deren Verwendung meist Monomere entstehen und weniger ungewollte, niedrigaffine Binder selektiert werden. Zunächst wurden Testläufe mit je einer Primerkombination von  $V_H$ ,  $V_K$  und  $V_L$  (z.B.: *HSCVH1-FL/HASCG1234-B* für  $V_H$ ) durchgeführt und anschließend der Erfolg der PCR anhand der Agarosegelelektrophorese überprüft. Die Negativkontrollen (Negativkontrolle der cDNA Synthese und Negativkontrolle der PCR) waren stets negativ. Zunächst zeigten sich jedoch bei der Analyse der Gele auf der UV-Bank Doppelbanden als Produkt und es fanden sich zum Teil Primer-Dimere. Verschiedene Protokolle wurden getestet, um die PCR zu optimieren. Unter anderem wurde ein Lauf mit einer *Touchdown*-PCR, eine Durchführung der PCR mit DMSO, verschiedene Polymerasen, variable Zahlen an Zyklen und eine *Gradienten-PCR* getestet. Als optimale *Annealing*-Temperatur wurden 62,6 °C ermittelt: Die Doppelbande oberhalb der Zielbande verschwand ab etwa 58 °C und ein gutes PCR Produkt wurde auch bei höheren Temperaturen erreicht, was wahrscheinlich an der *Phire Polymerase* lag. Eine mögliche Alternative wäre die Verwendung von DMSO bei niedrigeren Temperaturen gewesen. Es erfolgte eine Festlegung auf eine *Annealing*-Temperatur von 62,6 °C mit der *Phire Polymerase*. Für  $V_H$  wurden für alle Kombinationen mit *HSCM-B* 30 Zyklen und alle Kombinationen mit *HSCG-1234-5* oder *HSCA-B* nach den Testläufen 33 Zyklen festgelegt. Für  $V_K$  wurden 33 Zyklen festgelegt. Für  $V_L$  wurden für alle Kombinationen mit *HSCJLam4* 35 Zyklen und alle weiteren Kombinationen 33 Zyklen festgelegt.

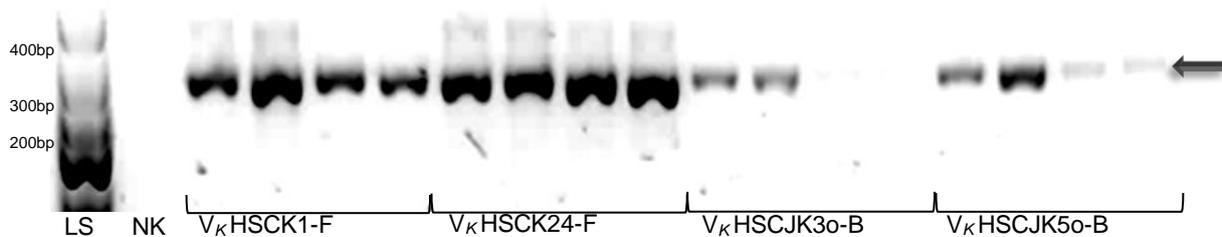
Die  $V_H$  Reaktionen zeigten ein 400 bp Produkt. Ein Agarosegel der verschiedenen Primerkombinationen einer  $V_H$ -PCR ist in Abbildung 4 zu sehen. Die  $V_L$  Reaktionen zeigten

ein 350 bp Produkt. Ein Agarosegel einer  $V_K$ -PCR ist in Abbildung 5 und ein Agarosegel einer  $V_\lambda$ -PCR ist in Abbildung 6 zu sehen.



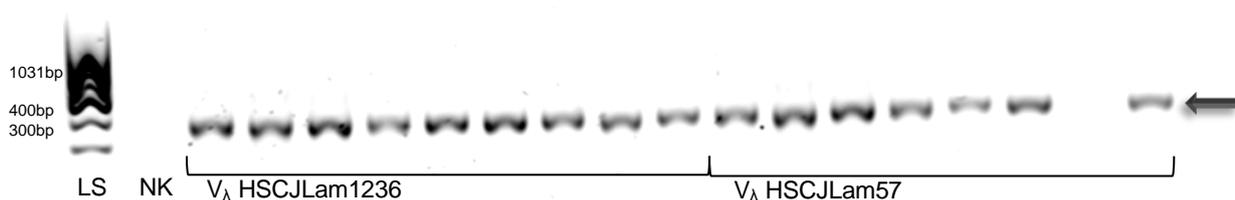
**Abbildung 4 – Agarosegelelektrophorese der  $V_H$ -PCR.**

Die Produkte der ersten PCR mit 18  $V_H$ -spezifischen Primerkombinationen wurden in 6x DNA-Probenpuffer aufgenommen und über 45 min und 90 V auf 2 % Agarose elektrophoretisch aufgetrennt. Die Zielprodukte in der Größe von 400 bp sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. NK bezeichnet die Negativkontrolle und LS den Längendstandard. Ein Längenstandard dient als einheitliches Maß bei der Gelelektrophorese, wobei jeder Bande eine bestimmte bp-Größe zugeordnet werden kann. Es wurde jeweils das korrespondierende Immunoglobulin zu den  $V_H$ -Primer 3' Reverse genannt (HSCG1234-B/IgG; HSCM-B/IgM; HSCA-B/IgA). Es wurde jeder 3' Reverse Primer mit den 6  $V_H$ -Primern 5' Sense (HSCVH1-FL; HSCVH2-FL; HSCVH35-FL; HSCVH3a-FL; HSCVH4-FL; HSCVH4-FL; HSCVH4a-FL) kombiniert.



**Abbildung 5 – Agarosegelelektrophorese der  $V_K$ -PCR.**

Die Produkte der ersten PCR mit 16  $V_K$ -spezifischen Primerkombinationen wurden in 6x DNA-Probenpuffer aufgenommen und über 45 min und 90 V auf 2 % Agarose elektrophoretisch aufgetrennt. Die Zielprodukte in der Größe von 350 bp sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. NK bezeichnet die Negativkontrolle und LS den Längendstandard. Es wurde jeweils der  $V_K$ -Primer 5' Sense genannt, welcher mit jedem der  $V_K$ -Primer 3' Reverse (HSCJK14o-B; HSCJK20o-B; HSCJK30o-B; HSCJK50o-B) kombiniert wurde.



**Abbildung 6 – Agarosegelelektrophorese der  $V_\lambda$ -PCR.**

Die Produkte der ersten PCR mit 27  $V_\lambda$ -spezifischen Primerkombinationen wurden in 6x DNA-Probenpuffer aufgenommen und über 45 min und 90 V auf 2 % Agarose elektrophoretisch aufgetrennt. Die Zielprodukte in der Größe von 350 bp sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. NK bezeichnet die Negativkontrolle und LS den Längendstandard. Es wurde jeweils der  $V_\lambda$ -Primer 3' Reverse genannt, welcher mit jedem der  $V_\lambda$ -Primer 5' Sense (HSLam1a; HSLam1b; HSLam2, HSLam3; HSLam4; HSLam5; HSLam78; HSLam9; HSLam10) kombiniert wurde. Aufgrund der Anzahl der Kombinationen wurde die Agarosegelelektrophorese auf 2 separaten Gelen durchgeführt. Das Gel ist eine repräsentative Abbildung, welche die Kombinationen mit HSCJLam1236 und HSCJLam57 darstellt.

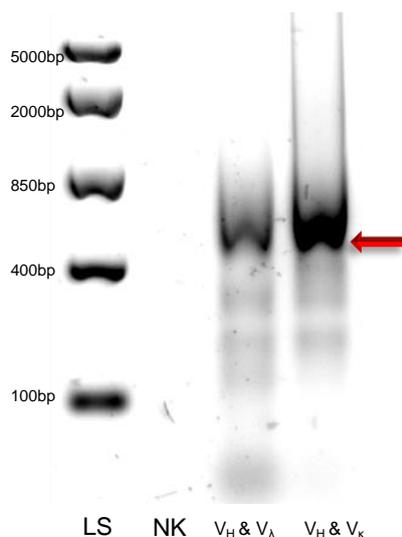
Nach dem Nachweis des Erfolges der PCR auf der UV-Bank, wurden die PCRs erneut gefahren. Die PCR-Produkte wurden mittels des *Gel Extraktion Kits* aus dem 2 % Agarosegel extrahiert und anschließend mit dem *PCR Purification Kit* gereinigt.

Es wurden etwa 13,5 µg  $V_H$ , 17,2 µg  $V_K$  und 18,6 µg  $V_\lambda$  hergestellt. Die Menge wurde mit dem Spektrophotometer *NanoPhotometer* gemessen.

### 3.1.3.2 Zweite Runde *scFv*-PCR, *Overlap*

Zunächst wurden Testläufe mit geringen DNA-Mengen durchgeführt und anschließend der Erfolg der PCR anhand der Agarosegelelektrophorese überprüft. Die Negativkontrollen waren stets negativ. Zu Beginn zeigten sich multiple Banden als Produkt, weshalb verschiedene Protokolle getestet wurden, um die PCR zu optimieren. Durch eine *Gradienten-PCR* wurde eine optimale *Annealing*-Temperatur von 56,4 °C ermittelt. Um eine hohe Diversität zu erreichen, wurde eine hohe Anzahl an PCRs durchgeführt. Die Banden des *Overlaps* zeigten sich teilweise unscharf.

Die Produkte der *Overlap*-PCRs waren im Bereich von 750-800 bp. Ein Agarosegel zweier *Overlap*-PCRs ist in Abbildung 7 zu sehen.



**Abbildung 7 – Agarosegelelektrophorese der *Overlap*-PCRs.**

Die Produkte der ersten PCR mit 2 Primerkombinationen ( $V_H$  mit  $V_\lambda$ ,  $V_H$  mit  $V_K$ ) wurde mit 6x DNA-Probenpuffer aufgenommen und über 45 min und 90 V auf 2 % Agarose elektrophoretisch aufgetrennt. Die Zielprodukte in der Größe von etwa 750-800 bp sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. LS (Längenstandard); NK (Negativkontrolle).

Nach dem Nachweis der erfolgreichen PCR, wurden die PCRs erneut gefahren und anschließend mittels des *Gel Extraktion Kits* aus dem 2 % Agarosegel extrahiert und mit dem *PCR Purification Kit* gereinigt.

Es wurden etwa 13,5 µg *Overlap*-Produkt hergestellt. Die Konzentrationen wurden mit dem Spektrophotometer gemessen.

### 3.1.4 Präparation von *pComb3XSS*

Es sollte eine große Menge an durch das Restriktionsenzym *Sfi1* verdautem Vektor *pComb3XSS* mit möglichst geringem Re-Ligationshintergrund hergestellt werden. Zunächst wurden für die Präparation des Vektors *E. coli Nova blue*-Bakterien verwendet.

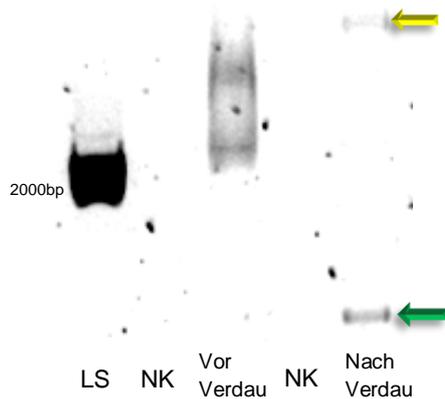
Es zeigte sich jedoch im Gel ein lediglich teilweise verdauter Vektor. Da die Methylierungssensitivität von *Sfi1* eine mögliche Ursache war, wurde auf methylationsdefiziente *dam-/dcm- E. coli*-Bakterien umgestellt. Zudem wurden zur Behandlung der Pellets, welche nach Zentrifugation der Übernachtskultur und Verwerfen des Überstandes in den Röhrcchen verblieben, verschiedene Kits getestet. Die Entscheidung fiel, aufgrund der besten Ausbeute, auf das *QIAprep Spin Mini Prep Kit*.

Mit den optimierten Methoden konnten zwischenzeitliche Erfolge erzielt werden. So konnten am 04.02.16 6,8 µg, am 05.02.16 11,7 µg, am 9.02.16 19,1 µg und am 10.02.16 12,4 µg *pComb3XSS* hergestellt werden.

### 3.1.5 *Sfi1*-Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau der *Overlap-scFv*-Produkte und des *pComb3XSS*-Vektors wurde durchgeführt, um komplementäre Enden zur Ligation zu erzeugen. Der Verdau erfolgte bei 50 °C über 5 h. Zuvor waren diverse kürzere Inkubationszeiten und Enzyme verschiedener Marken getestet worden. Die Ergebnisse wurden anhand von Agarosegelen optisch kontrolliert. Der Verdau der *scFv*-Produkte wurde auf ein 2 % Agarosegel, der Verdau des Vektors auf ein 1 % Agarosegel geladen. Die Entscheidung fiel auf das Enzym *Sfi1-RO Roche 1* und eine Inkubationszeit von 5 h. Eine Agarosegelelektrophorese vor und nach Verdau des Vektors ist in Abbildung 8 zu sehen.

Aufgrund hoher Verluste an Vektor von über 90 % während der Gelaufreinigung wurde dem Gel zum Schutz der DNA vor dem UV-Licht 1 mM Guanosin zugefügt. Zudem wurde eine *high quality NEEO Agarose* verwendet und der pH während des Schrittes der Gelaufklärung angepasst, um ein Binden der DNA an die *Gel Purification Columns* zu garantieren. Mit den optimierten Methoden konnten die Verluste während des Verdaus reduziert werden. Jedoch schien einem wesentlichen Anteil an den Verlusten mutmaßlich eine Austrocknung der Spinsäulen zugrunde zu liegen. Hierbei handelt es sich um einen Mangel der verwendeten Kits, die nach dem Aufbrechen schneller austrocknen als vom Hersteller spezifiziert.



**Abbildung 8 – Agarosegelelektrophorese vor und nach Verdau des Vektors.**

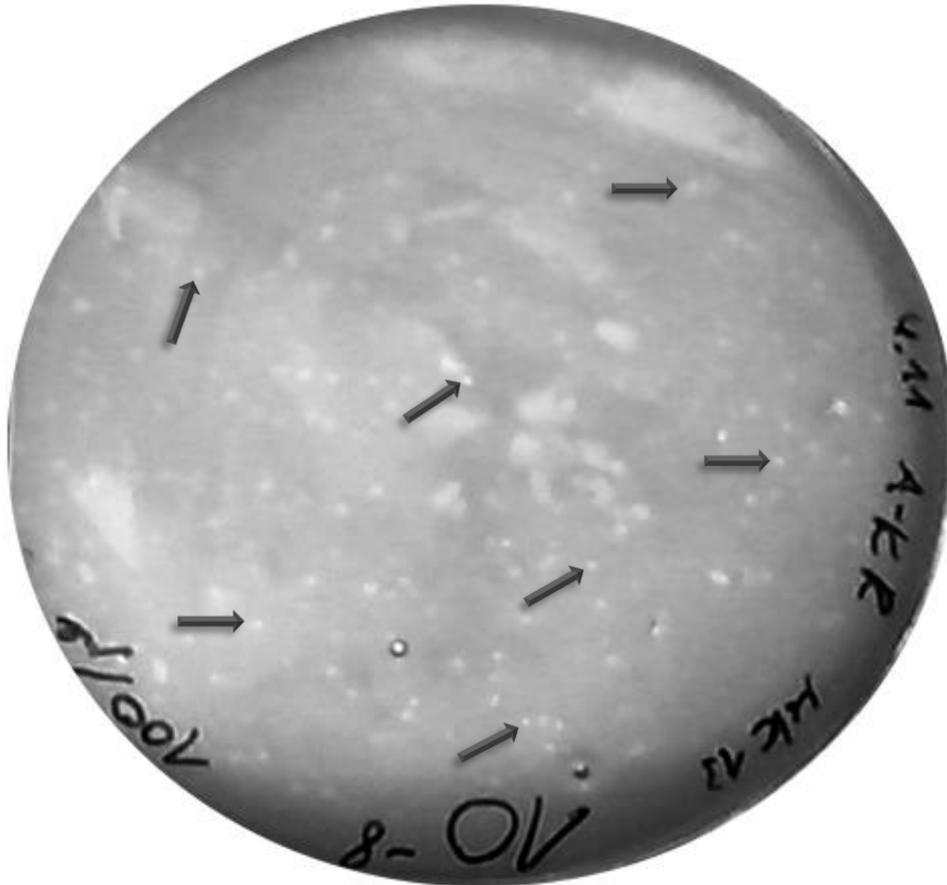
Die Produkte wurden mit 6x DNA-Probenpuffer aufgenommen und über 90 min und 90 V auf 1 % Agarose elektrophoretisch aufgetrennt. Zum einen ist der Vektor vor Verdau bei etwa 2800-3000 bp zu sehen, zum anderen ist der doppelt geschnittene Vektor (gelber Pfeil) bei etwa 3400 bp und das *Stufferfragment* bei 1600 bp (grüner Pfeil) zu erkennen. LS (Längenstandard); NK (Negativkontrolle).

### 3.1.6 Testung der Elektrokompetenz der *ER2537*-Zellen

Es wurden verschiedene Protokolle zur Herstellung elektrokompetenter *ER2537*-Bakterien getestet. Aufgrund der höchsten Kompetenzleistung bei am selben Tag frisch hergestellten Bakterien, fiel die Entscheidung auf ein Protokoll, welches eine Herstellung am jeweiligen Tag erlaubte. Die erzielte Kompetenz von  $\frac{1 \times 10^9}{1 \mu g}$  konnte auf diese Weise erreicht werden.

### 3.1.7 Herstellung von Helferphagen und Messung des Phagentiters

Die Herstellung der Helferphagen ist essentiell, um alle benötigten Gene zur Replikation und zum Zusammenbau der Phagenpartikel zu erhalten. Dazu wurden zunächst  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  und  $10^{-10}$  Verdünnungen des kommerziell erworbenen Helferphagen *M13KE*-Phage in *SB*-Medium hergestellt, welcher zuvor  $1 \times 10^{13}$  pfu/ml hatte. Das Protokoll der Phagenvermehrung wurde zunächst mit diesem Phagen durchgeführt. Es zeigte sich keine Trübung in der Kultur und kein Überstand. Daher wurde ein erneuter Versuch mit *M13KE*-Phagen gestartet, welche bereits früher von Andreas Recke für ein *Phage Display* verwendet worden waren. Diese konnten erfolgreich vermehrt und ein geeigneter Phagen-Titer erreicht werden. In Abbildung 9 sind ausplattierte *M13KE*-Phagenplaques auf *LB*-Medium zu sehen.



**Abbildung 9 – M13KE-Phagenplaques auf LB-Medium.**

Ausschnitt aus einer LB-Agarplatte mit einer  $10^{-8}$  Verdünnung einer MK13K07-Präparation in ER2537 nach Inkubation über Nacht bei 37 °C. Einzelne Phagenplaques sind exemplarisch mit Pfeilen markiert.

**3.1.8 Testligation der scFv-Fragmente in den Vektor pComb3XSS**

Die Testligation wurde durchgeführt, um die Eignung des Vektors und der *Inserts* für eine effiziente Ligation und Transformation zu überprüfen. Die Kolonien der Testligation wurden gezählt und daraus die Zahl der Transformierten pro  $\mu\text{g}$  Vektor DNA berechnet. Da die Zahl  $1 \times 10^7$  überschritt, konnte fortgefahren werden. Ebenso wurden die Kolonien der Testligation 1 gezählt, um Informationen über die Qualität des Vektors und die Ligationseffektivität zu erhalten. Auch hier konnte die Grenze von  $10^8$  *Kolonie-bildenden-Einheiten* pro  $\mu\text{g}$  Vektor DNA und weniger als 10 % Hintergrundligation eingehalten werden.

**3.1.9 Ligation der scFv-Bibliothek und Transformation**

Die eigentliche Ligation der Bibliothek mit größeren DNA Mengen wurde mehrmals durchgeführt. Es mussten genug Reaktionen durchgeführt werden, um mindestens  $5 \times 10^7$  Transformierte zu erhalten. Trotz mehrfacher Transformation konnte der Zielwert nicht erreicht werden. In Tabelle 13 sind die durchgeführten Transformationen aufgeführt. Bei

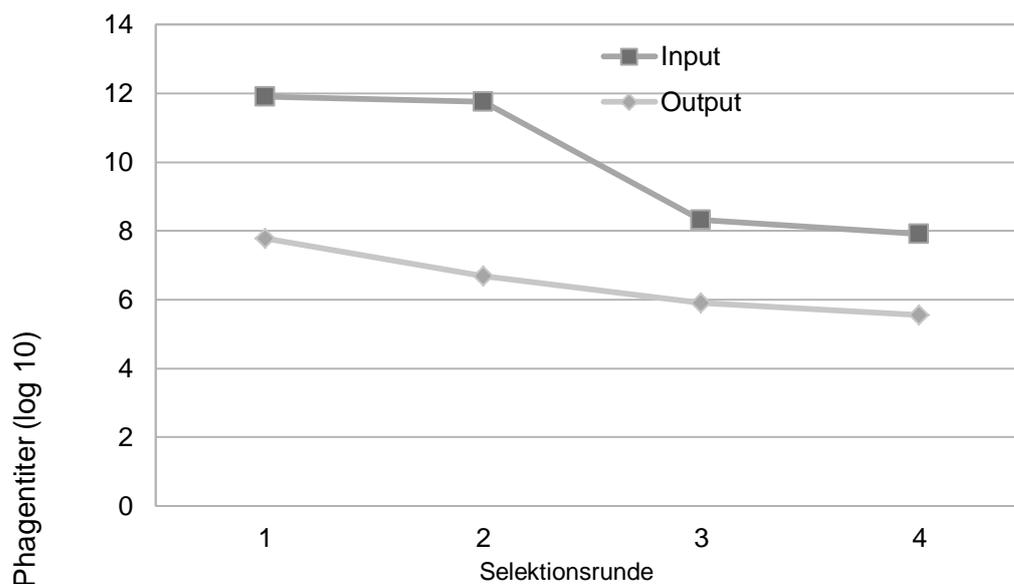
Erreichen von  $2,6 \times 10^7$  Transformierten wurde im Protokoll mit dem Phagen-*Panning* weiter fortgefahren.

**Tabelle 13: Transformation in elektrokompetente ER2537**

Datum der Transformation	Anzahl der Transformierten/Diversität
06.01.2016	$1,0 \times 10^5$
17.02.2016	$1,5 \times 10^7$
18.02.2016	$2,7 \times 10^6$
20.02.2016	$7,2 \times 10^6$
08.03.2016	$9,0 \times 10^6$

### 3.1.10 Keine Anreicherung spezifischer Binder mittels des Phagen-*Pannings*

Phagen sollten in mehreren Runden des Phagen-*Pannings* an ein in den Vertiefungen der ELISA-Platten immobilisiertes Antigen gebunden werden. Spezifische *scFv*-Klone sollten nach drei bis vier Runden von Selektion und Amplifikation ausreichend angereichert sein. Der *Input*-Titer wurde durch das Ausplattieren von ER2537-Zellen, die mit der Phagenlösung infiziert worden waren, in diversen Verdünnungen bestimmt. Zur Ermittlung des *Output*-Titers wurden die eluierten Phagenkulturen in unterschiedlichen Verdünnungen ausplattiert. Der *Input*-Titer zeigt die Anzahl der Phagen an, welche auf die ELISA-Platten mit dem immobilisierten Antigen aufgetragen werden. Der *Output*-Titer zeigt die Anzahl der eluierten Phagen an. Der *Input*-Titer jeder Runde sollte im Bereich von  $10^{12}$  Phagen und der *Output*-Titer gewöhnlich im Bereich von  $10^5$ - $10^8$  Phagen liegen. Entsprechend der Entfernung der meisten unspezifisch bindenden Phagen kommt es typischerweise nach der ersten Selektionsrunde zu einem erheblichen Abfall des Phagentiters, der jedoch im Verlauf durch Anreicherung der spezifischen und Aussonderung der unspezifischen Klone wieder ansteigen sollte. Zunächst wurde gegen den AT1R selektiert. Ab der dritten *Panning*-Runde wurde parallel gegen den ETAR selektiert. Im Phagen-*Panning* gegen AT1R zeigten sich die *Output*-Titer leicht absinkend, es wurde jedoch kein Plateau oder Anstieg im Verlauf erreicht. Auch die *Input*-Titer, welche sich etwa gleichbleibend zeigen sollten, fielen ab (Abbildung 10, Tabelle 14). Es war somit weder eine Anreicherung noch ein Plateau zu erkennen. Daher erfolgte die Analyse der *scFv*-Fragment-exprimierenden Klone mittels ELISA.



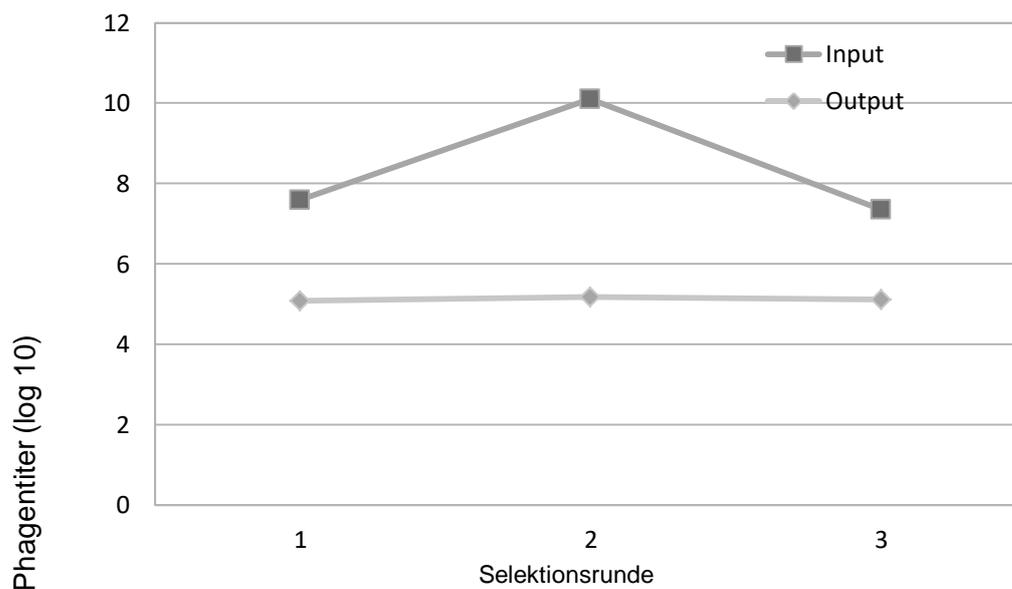
**Abbildung 10 – Die Titeranalyse des Phagen-Pannings zeigt keine Anreicherung von Phagen, die an AT1R binden.**

Titerverlauf (*Phagentiter (log 10)*) des Phagen-Pannings über die vier aufeinanderfolgenden Selektionsrunden (*Selektionsrunde*). *Input*-Titer, Anzahl der infektiösen scFv-tragenden Phagenpartikel vor den Selektionsschritten. *Output*-Titer, Anzahl der infektiösen scFv-tragenden Phagenpartikel nach den Selektionsrunden. Siehe auch Tabelle 14.

**Tabelle 14: AT1R-Panning**

<i>Panning-Runde</i>	<i>Input – Phagen (pfu/ml)</i>	<i>Output – Phagen (pfu/ml)</i>	<i>Input / Output</i>
<b>1. Runde</b>	$8,0 \times 10^{11}$	$6,0 \times 10^7$	$1,3 \times 10^4$
<b>2. Runde</b>	$5,8 \times 10^{11}$	$4,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$
<b>3. Runde</b>	$2,1 \times 10^8$	$8,0 \times 10^5$	$2,6 \times 10^2$
<b>4. Runde</b>	$8,0 \times 10^7$	$3,6 \times 10^5$	$2,2 \times 10^2$

Auch in dem Phagen-*Panning* gegen den ETAR zeigten sich die *Output*-Titer im Verlauf des Phagen-*Pannings* leicht absinkend. Es wurde weder eine Anreicherung noch ein Plateau erreicht. Die *Input*-Titer zeigten sich inkonstant (Abbildung 11, Tabelle 15).



**Abbildung 11 – Die Titeranalyse des Phagen-Pannings zeigt keine Anreicherung von Phagen, die an ETAR binden.**

Titerverlauf (*Phagentiter (log 10)*) des Phagen-Pannings über die drei aufeinanderfolgenden Selektionsrunden (*Selektionsrunde*). *Input*-Titer, Anzahl der infektiösen scFv-tragenden Phagenpartikel vor den Selektionsschritten. *Output*-Titer, Anzahl der infektiösen scFv-tragenden Phagenpartikel nach den Selektionsrunden. Siehe auch Tabelle 15.

**Tabelle 15: ETAR-Panning**

<i>Panning-Runde</i>	<i>Input – Phagen (pfu/ml)</i>	<i>Output – Phagen (pfu/ml)</i>	<i>Input / Output</i>
<b>1. Runde</b>	$4,0 \times 10^7$	$1,2 \times 10^5$	$3,3 \times 10^2$
<b>2. Runde</b>	$1,2 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^5$	$8,0 \times 10^4$
<b>3. Runde</b>	$2,3 \times 10^7$	$1,3 \times 10^5$	$1,7 \times 10^2$

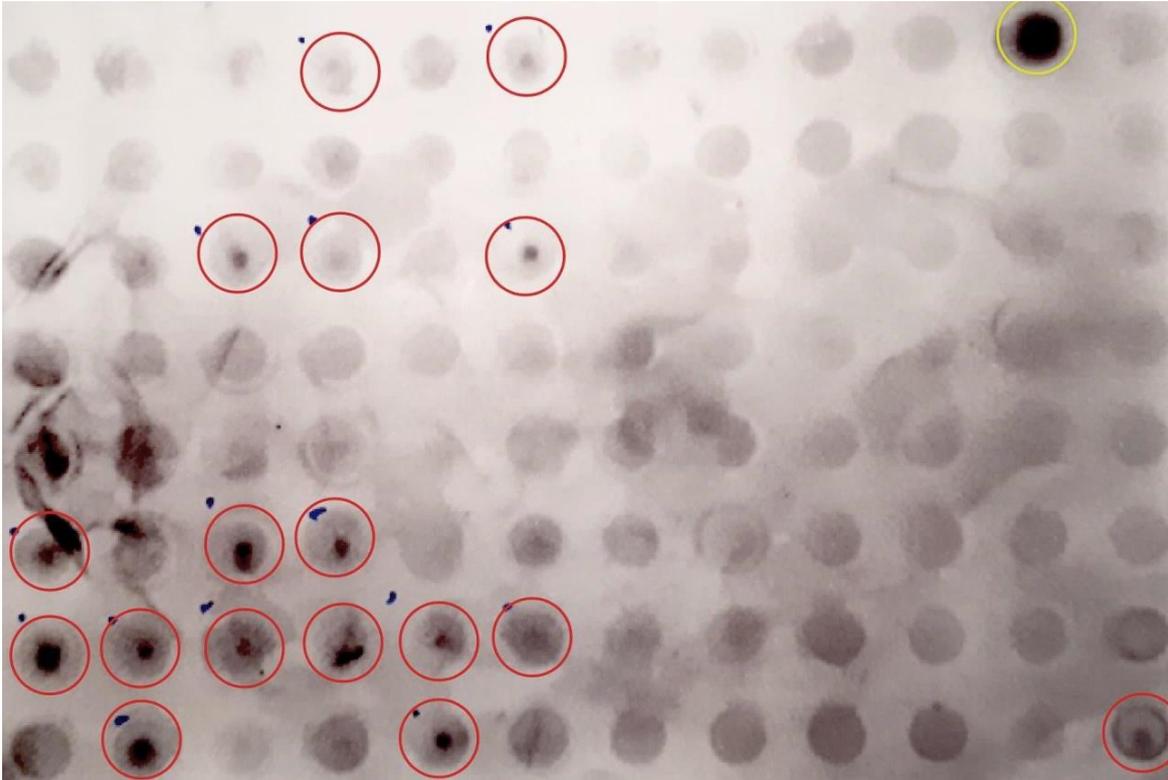
### 3.1.11 Nachweis korrekt exprimierter scFv mittels Dot Blot

Es sollte nachgewiesen werden, ob die Phagenklone korrekt exprimierte scFv tragen. pComb3 enthält *HA-Tags*, welche einen Nachweis mit einem peroxidase-gekoppelten *anti-HA-Tag*-Antikörper ermöglichen. Zudem ist ein Amber-Stoppcodon enthalten, welches eine Herstellung von löslichen scFv durch die Verwendung von bestimmten E. coli-Stämmen, welche dieses als Stoppcodon lesen, ermöglicht. Der Promotor *lacZ* erlaubt eine Induktion mit IPTG (Barbas et al. 2001).

Um nun die Expression von scFv-Protein verschiedener Phagen- bzw. Bakterienklone zu prüfen, wurden 94 Bakterienklone aus der Bibliothek gepickt und mit IPTG inkubiert.

Der Überstand wurde mittels eines Dot Blot-Apparates auf eine Nitrozellulosemembran fixiert. Diese wurde dann mit einem peroxidase-gekoppelten *anti-HA-Tag*-Antikörper inkubiert und mit einer Diaminobenzidin-Färbelösung gefärbt (Abbildung 12). 12 der 30

Überstände enthielten sicher richtig exprimierte *scFv*, zu erkennen anhand des dunklen Punktes im Zentrum des Kontrollfeldes auf der Nitrozellulosemembran.



**Abbildung 12 – Kontrolle der Expression von *scFv* in *E. coli*-Klonen der *scFv*-Primärbibliothek.**

Dot Blot der Überstände von 94 *E. coli*-Klonen der Primärbibliothek. Die *scFv* wurden anhand ihres *HA-Tags* immunologisch nachgewiesen. Positive Klone (roter Kreis) wiesen eine deutliche Färbung im Zentrum des Probenareals auf. Gelber Ring, Positivkontrolle. Negativkontrolle rechts oben.

### 3.1.12 Fehlender Hinweis auf eine Anreicherung spezifischer *scFv*-exprimierender Klone mittels ELISA

Bei dem ELISA wurden Antikörper enthaltende Überstände von induzierten Kulturen aus den Phagenpools der eluierten, an das Antigen bindenden Phagen getestet. Dazu wurden Klone der *Output*-Platte des letzten Phagen-*Pannings* zufällig gepickt, danach kultiviert, mit IPTG induziert und die Überstände im ELISA eingesetzt. Der Phagenpool wurde auf einer antigenbeschichteten Platte inkubiert und nach dem Waschen mit einem peroxidase-gekoppelten *anti-HA-Tag*-Antikörper und einem für das gewählte Enzym spezifischen chromogenen Substrat, dem 1-step Turbo™-ELISA, entwickelt. Nach dem Stoppen der Farbentwicklung mittels  $H_2SO_4$  wurde die Platte im ELISA-Plattenleser bei 450 nm gelesen. Das Enzym sollte eine Farbänderung bewirken, die auf eine Anreicherung der Phagen-Bindung des spezifischen Antigens hingewiesen hätte. Die Intensität der Farbänderung korreliert hierbei mit der Anreicherung spezifischer Binder. Beim Lesen der Platten zeigte sich jedoch im Gegensatz zur Erwartung kein Anstieg des Signals. Daher wurde beschlossen eine Sequenzierung durchführen zu lassen.

### 3.1.13 Sequenzierung zeigt ungenügendes ligiertes *Overlap*-Produkt

Die Sequenzierung der *scFv* aus mit Phagen infizierten Bakterien der Bibliothekstransformation erfolgte mit Hilfe der Primer *ompseq* ( $V_L$ ) und *HRML-F* ( $V_H$ ). Sie zeigte ein nicht zufriedenstellendes ligiertes *Overlap*-Produkt, was Probleme bei vielen Methoden erklärte. Durch die Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, dass die DNA teilweise anscheinend nur die *V<sub>k</sub>*-Kette enthielt.

Eine Analyse der Sequenz mittels BLAST-Search (NCBI) zeigte, dass es sich teilweise um bakterielle genomische DNA handelte. Diese wurde vermutlich durch Reparaturmechanismen bei Transformation mit insuffizient ligiertem Plasmid inseriert. Nur wenige Sequenzen schienen geeignete *scFv* zu sein.

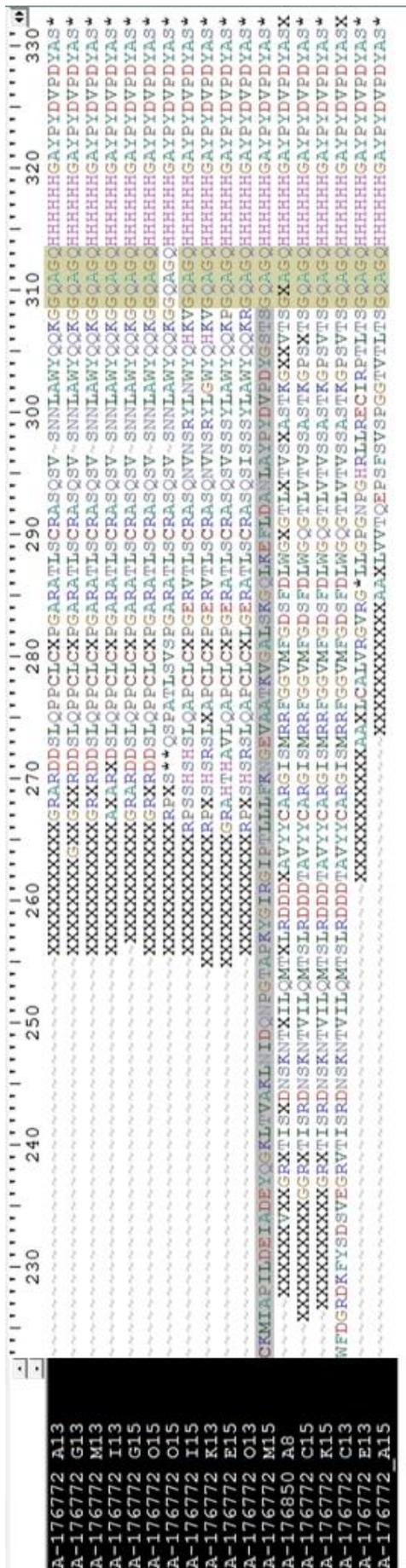


Abbildung 13 – Sequenzierung der in den Vektor ligierten scFv mit Hilfe der Primer ompseq (V<sub>L</sub>) und HRML-F (V<sub>H</sub>).

Die obersten 11 Sequenzen (A13-O13) enthielten lediglich die V<sub>L</sub>-Kette. Bei der Sequenz M15 schien eine Rekombination mit bakterieller DNA stattgefunden zu haben. Die Sequenzen A6-C13 schienen größtenteils identisch zu sein. C13 schien dabei eine korrekte scFv-Sequenz zu sein.

## 3.2 Epitopkartierung von CXCR3

Die Angriffsstelle der Autoantikörper gegen CXCR3 sollten über eine Epitopkartierung mittels ELISA genauer untersucht werden.

### 3.2.1 Lösen der Peptide

Die Peptide, welche die komplette Sequenz von CXCR3 abdeckten, sollten zunächst gelöst werden. Das Lösen der Peptide gestaltete sich teilweise als schwierig, weshalb bei den schlecht löslichen Peptiden einmal der Überstand und einmal das Sediment verwendet wurde, um die Platten zu belegen. Zudem wurden Streptavidin-belegte Platten verwendet, welche Biotin-konjugierte Peptide in Position für die folgenden Assays ziehen. Die Hydrophobizität sowie der isoelektrischen Punkt (pI) der Peptide wurden beim Lösen in HCL, NaOH, DMSO oder DMF beachtet. Peptide mit basischem pI wurden in 0,1 M HCL, Peptide mit saurem pI in 0,1 M NaOH, Peptide mit neutralem pI mit DMSO und Peptide mit Cysteinresten in DMF gelöst. Die gelösten Peptide wurden in PBS weiter verdünnt. Die Peptide durften nicht zu hoch konzentriert sein, um Präzipitationen zu vermeiden. Die Sequenzen und genauere Charakteristik der einzelnen Peptidfragmente sind in Tabelle 16 aufgeführt.

**Tabelle 16: Charakteristik der Peptidfragmente von CXCR3**

#	Sequenz <sup>1</sup>	Länge	Rückst ände <sup>2</sup>	MW <sup>3</sup>	Hydroph obie <sup>4</sup>	pI <sup>5</sup>	Ladung <sup>6</sup>
1	MVLEVSDHQVLNDAEVAAL L	20	1-20	2392.3	0.72	3.74	-3.92
2	LNDAEVAALLENFSSSYDY G	20	11-30	2441.0	-0.13	3.30	-4.09
3	ENFSSSYDYGENESDSCC TS	20	21-40	2486.8	-1.26	3.23	-5.18
4	ENESDSCCTSPPCPQDFS LN	20	31-50	2435.7	-0.96	3.30	-4.23
5	PPCPQDFSLNFDRAFLPAL Y	20	41-60	2536.5	-0.06	4.11	-1.14
6	FDRAFLPALYSLLFLLGLLG	20	51-70	2464.9	1.50	6.33	-0.09
7	SLLFLLGLLGNGAVAVLLS	20	61-80	2188.8	2.04	6.10	-0.09
8	NGAVAVLLSRRTALSSTD T	20	71-90	2228.4	0.31	10.40	0.91
9	RRTALSSTDTFLLHLAVAD T	20	81-100	2413.6	0.20	7.55	0.08
10	FLLHLAVADTLLVLTPLWA	20	91-110	2446.1	1.82	5.29	-0.92
11	LLVLTPLWAVDAAVQWVF G	20	101-120	2476.0	1.63	3.75	-1.09
12	VDAAVQWVFGSGLCKVAG AL	20	111-130	2215.7	1.16	6.16	-0.14
13	SGLCKVAGALFNIFYAGA L	20	121-140	2255.0	1.06	8.52	0.86

#	Sequenz <sup>1</sup>	Länge	Rückst ände <sup>2</sup>	MW <sup>3</sup>	Hydroph obie <sup>4</sup>	pI <sup>5</sup>	Ladung <sup>6</sup>
14	FNINFYAGALLLACISFDRY	20	131-150	2538.0	0.90	6.16	-0.14
15	LLACISFDRYLNIVHATQLY	20	141-160	2579.6	0.75	7.35	0.03
16	LNIVHATQLYRRGPPARV L	20	151-170	2500.9	-0.11	12.20	3.07
17	RRGPPARVTLTCLAWWGL CL	20	161-180	2408.2	0.62	10.52	2.81
18	TCLAWWGLCLLFFALPDFIFL	20	171-190	2501.5	2.07	3.75	-1.18
19	LFALPDFIFLSAHHDERLNA	20	181-200	2551.7	0.31	5.36	-1.75
20	SAHHDERLNATHCQYNFP QV	20	191-210	2592.7	-1.13	6.78	-0.64
21	THCQYNFPQVGRTALRVL QL	20	201-220	2571.2	-0.20	9.50	2.03
22	GRTALRVLQLVAGFLLPLL V	20	211-230	2375.3	1.50	12.50	1.91
23	VAGFLLPLLVMAYCYAHILA	20	221-240	2404.6	1.93	7.35	0.02
24	MAYCYAHILAVLLVSRGQR R	20	231-250	2546.0	0.51	10.13	3.02
25	VLLVSRGQRRLRAMRLVV VV	20	241-260	2545.8	0.85	13.10	4.91
26	LRAMRLVVVVVAFALCWT P	20	251-270	2471.0	1.85	10.53	1.86
27	VVAFALCWTPYHLVVLVDIL	20	261-280	2497.5	1.92	5.29	-0.97
28	YHLVVLVDILMDLGALARN C	20	271-290	2454.4	1.21	5.41	-0.97
29	MDLGALARNCGRESRVDV AK	20	281-300	2388.1	-0.36	8.55	0.86
30	GRESRVDVAKSVTSGGLY MH	20	291-310	2374.9	-0.43	9.30	1.08
31	SVTSGGLYMHCCLNPLLYA F	20	301-320	2415.2	0.85	7.25	-0.02
32	CCLNPLLYAFVGVKFRERM W	20	311-330	2672.8	0.50	8.80	1.81
33	VGVKFRERMWMLLRLGCP N	20	321-340	2644.2	0.25	11.38	2.86
34	MLLRLGCPNQRGLQRQP SS	20	331-350	2492.9	-0.49	12.20	2.86
35	QRGLQRQPSSRRDSSW SET	20	341-360	2574.1	-2.01	12.02	1.91
36	SRRDSSWSETSEASYSGL	18	351-368	2229.0	-1.27	4.43	-1.09

- 1) Sequenz der Peptide im Buchstabenformat. Jedes aufgelistete Peptid ist am N-Terminus biotinyliert.
- 2) Die Rückstände sind gemäß dem Uniprot Eintrag P (CXCR3\_HUMAN) Isoform 1 nummeriert.
- 3) MW (Molekulargewicht) wie es durch massenspektrometrischen Qualitätsbericht des Herstellers determiniert wurde.
- 4) Die Hydrophobiewerte wurden mit der Funktion hydrophobicity des R-Packets peptides durch die methode von Kyte und Doolittle kalkuliert (Kyte und Doolittle 1982).
- 5) pI (isoelektrischer Punkt) Werte wurden mit der Funktion pI des R-Packets peptides berechnet mit der Standard-EMBOSS Methode.
- 6) Die Summe der Peptidladungen wurde bei pH 7,2 mit der Funktion charge des R-Packets peptides anhand der Methode Stryer berechnet.

### 3.2.2 CXCR3-Epitopdedektion mittels Peptid-ELISA

#### 3.2.2.1 Rohdaten

Peptide, welche die gesamte Autoantikörpersequenz von CXCR3 abdecken, wurden verwendet, um die Epitope von CXCR3 zu bestimmen, die durch Autoantikörper im Serum von Patienten mit SSc angegriffen werden. Es wurden Seren von Patienten mit verschiedenen Formen der SSc sowie von Patienten mit *Overlap*-Syndrom verwendet. Eine Übersicht über die Patientenseren findet sich in Tabelle 17.

**Tabelle 17: Übersicht SSc-Patienten**

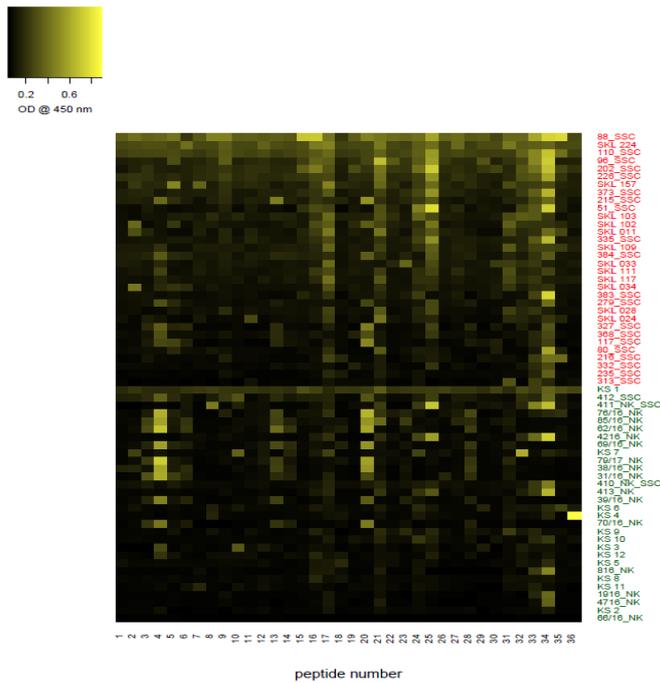
#	ID	SSc Variante1	ENA2	CXCR3 Ab (U/ml)
1	51_SSC	limited	anti-Sc170	15.213
2	80_SSC	limited	anti-Sc170	3.775
3	88_SSC	Diffus mit Myositis Overlap	anti-Ro52	5.156
4	96_SSC	diffus	anti-Sc170	4.008
5	110_SSC	limitiert	anti-CENP-B	5.023
6	117_SSC	limitiert	anti-CENP-B	6.950
7	202_SSC	limitiert	anti-Sc170	15.399
8	215_SSC	diffus	anti-Sc170	3.853
9	216_SSC	limitiert	anti-CENP-B	3.805
10	226_SSC	limitiert	anti-CENP-B	5.295
11	235_SSC	limitiert	anti-CENP-B	6.982
12	279_SSC	limitiert	anti-RNP/sm + anti-Sm + anti-PmSc175	7.984
13	313_SSC	diffus	anti-Sc170	6.080
14	327_SSC	limitiert	anti-CENP-B	7.770
15	332_SSC	limitiert	anti-Sc170	4.350
16	335_SSC	diffus	anti-Sc170	4.828
17	368_SSC	limitiert	anti-Sc170	4.299
18	373_SSC	limitiert	anti-CENP-B	4.084
19	383_SSC	diffus	dense fine speckled pattern	8.065
20	384_SSC	limitiert	anti-Sc170	5.381
21	SKL011	limitiert	anti-CENP-B	6.577

#	ID	SSc Variante1	ENA2	CXCR3 Ab (U/ml)
22	SKL024	limitiert	anti-CENP-B	2.948
23	SKL028	diffus	anti-Scl70	2.876
24	SKL033	diffus	n.d.	12.163
25	SKL034	diffus	anti-Scl70	6.542
26	SKL102	limitiert	anti-CENP-B	25.575
27	SKL103	UCTD	n.d.	18.678
28	SKL109	limitiert	anti-CENP-B	4.042
29	SKL111	MCTD	n.d.	13.025
30	SKL117	limitiert	anti-CENP-B	38.758
31	SKL157	limitiert	anti-CENP-B	11.802
32	SKL224	limitiert	anti-CENP-B	3.717

1) *Limitierte oder diffuse SSc, undifferenzierte Bindegewebserkrankung (UCTD), gemischte Bindegewebserkrankung (MCTD)*

2) *Reaktivität gegen spezifische extrahierbare nukleäre Antigene (ENA). n.d., nicht differenziert. Alle SSc-Patienten waren ANA-positiv.*

Die Messungen wurden im Vergleich zu Seren von gesunden Kontrollblut-Spendern analysiert. Das Auftragungsmuster findet sich in Tabelle 11. Pro Platte konnte hier ein SSc und ein Kontrollserum appliziert werden. Es wurden immer mehrere Platten gleichzeitig mit den gleichen Entwicklungszeiten behandelt und immer das identische Peptidschema verwendet, was die Konsistenz und die Reproduzierbarkeit erhöhen sollte. Zudem wird auf diese Weise eine elektronische Verarbeitung vereinfacht. Die Roh-ELISA-Signaldata des *Peptid-Arrays* sind der Abbildung 14 dargestellt.

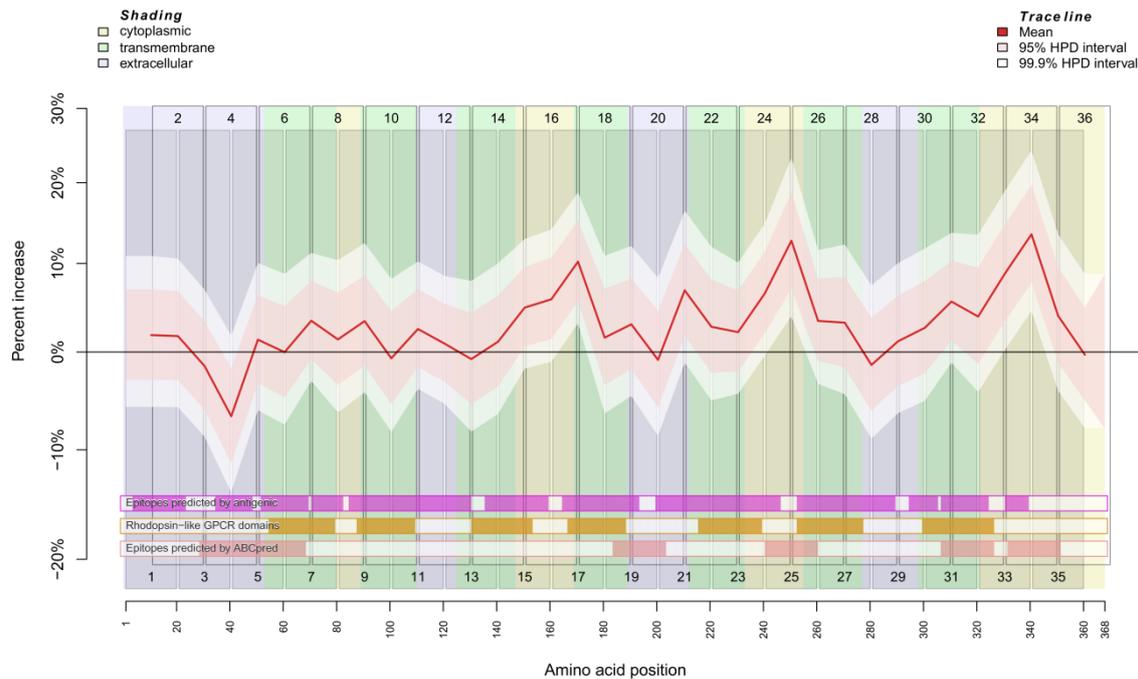


#### Abbildung 14 – Roh-ELISA-Daten.

Alle Seren in roter Schrift sind SSC-Seren und alle Seren in grüner Schrift Negativkontrollen. Die Peptide sind in der x-Achse aufgetragen. Anhand der *heat-map* kann das Ausmaß der gemessenen Extinktion im ELISA-Plattenleser abgeschätzt werden. Man kann sehen, dass das Signal der SSC-Seren im Allgemeinen verstärkt ist im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Zudem liegen die verstärkten Signale in anderen Bereichen.

### 3.2.2.2 Statistische Auswertung lokalisiert intrazelluläre Regionen als Epitope und ABCpred zeigt eine zuverlässige in Silico Epitop-Vorhersage

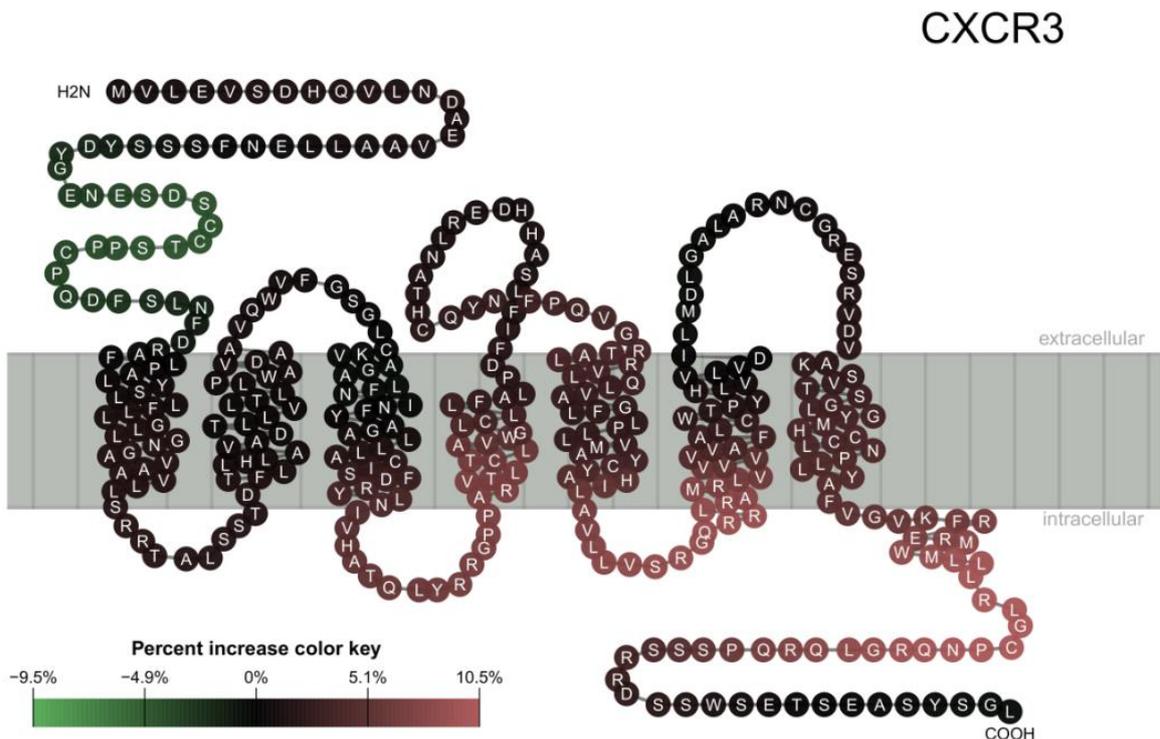
Es wurde eine bayesische Statistik angewandt. Die SSC-spezifische Bindung wurde durch die Kombination des autoregressiven Modells mit einem Gewichtungsfaktor modelliert. Es wurde davon ausgegangen, dass durch die überlappende Peptidsequenz von 10 Aminosäuren zwischen aufeinander folgenden Peptiden eine ähnliche Bindung an aufeinanderfolgende Peptide besteht. Die unspezifische Bindung von Serumproben und die Variabilität zwischen den Platten wurden als zusätzliche Zufallseffekte, Isoelektrischer Punkt und Hydrophobie jedes Peptids wurden als fixe Effekte, ausgedrückt; das heißt sie wurden als feste, nicht zufällige Größen betrachtet.



**Abbildung 15 – Vergleich der Bindungsverhalten von Seren der SSc-Patienten und der Kontrollseren an die einzelnen Peptide.**

Annotiertes Liniendiagramm der Posteriorverteilung des SSc-Patienten-spezifischen ELISA-Signals nach Peptiden und Aminosäureresten von CXCR3. Mittels der Funktionen des R-Paketes INLA wurde ein Zufallseffekt-Modell erstellt, in welchem das logarithmierte ELISA-Signal in Abhängigkeit von dem isoelektrischen Punkt (pI-Wert) und der Hydrophobizität des betreffenden Peptides (als fixe Effekte), der individuellen Serum-ID und Platten ID (jeweils als Zufallseffekte mittels des iid-Modells) sowie des Peptides (als native Zufallseffekte und als nur bei Patienten wirksame Zufallseffekte mittels des autoregressiven ar1-Modells) berechnet wurde. Als Priorverteilung wurde die Standardeinstellung verwendet. Mathematisch entspricht dieses Modell der Weiterentwicklung eines einfachen linearen Modells, wo das ELISA-Signal in Abhängigkeit von der Gruppe (Patient versus gesunde Kontrolle als Referenzgruppe) berechnet wird. Der Vorteil des Zufallseffekt-Modells besteht darin, dass die Ähnlichkeit und Nachbarschaft von Peptiden als Information mit berücksichtigt wird. Das dargestellte SSc-Patienten-spezifische ELISA-Signal entspricht der Veränderung des ELISA-Signales zur gesunden Kontrolle. Die dicke rote Linie entspricht dem Erwartungswert der Posteriorverteilung, Das 95 % und 99,9 % Konfidenzintervall des SSc-Patienten-spezifischen Antikörperbindungssignals sind in rosa und weißer Schattierung visuell wiedergegeben. Die x-Achse stellt die Aminosäurereste 1-368 dar. Die Peptidlokalisationen werden durch gestaffelte Rechtecke angezeigt, die die Peptidnummern enthalten. Der prozentuale Anstieg gibt die Zunahme oder Abnahme des Bindungssignals bei SSc-Patienten im Gegensatz zu einem gemittelten Signal an. Enthält das 95 % (99,9 %) Glaubwürdigkeitsintervall der prozentualen Erhöhung nicht den Nullwert, welcher durch die schwarze Linie dargestellt ist, wird das entsprechende Peptid als ein Epitop betrachtet, das signifikant mit SSc assoziiert ist. Im unteren Teil der Abbildung zeigen drei Heat Maps die Positionen von vermeintlichen Epitopen, die durch Antigenic (magenta), ABCpred (rosa) und das Vorhandensein von rhodopsinähnlichen Domänen (orange) vorhergesagt wurden. Die Hintergrundfarben zeigen die Positionen der Aminosäurereste an. Intrazelluläre Bereiche sind in gelbem, transmembranöse Bereiche in grünem und extrazelluläre Bereiche in blauem Farbton gehalten.

Das in Abbildung 15 beschriebene Ergebnis wurde zur Visualisierung in Form eines Serpentinmodells von CXCR3 abgebildet (Abbildung 16).



**Abbildung 16 – Serpentinmodell von CXCR3.**

Das in Abbildung 14 beschriebene Ergebnis wurde zur Visualisierung als Serpentinmodell von CXCR3 abgebildet. Jede Perle repräsentiert einen einzelnen Aminosäurerest, der Buchstabe innerhalb jeder Perle die Aminosäure im 1-Buchstaben-Code. Die Farbe jeder Perle gibt den prozentualen Anstieg des SSc-spezifischen Bindungssignals an, das dem jeweiligen Aminosäurerest zugeordnet ist.

Zum Vergleich wurden die *logit*-Werte der ELISA-Signale peptidweise mit unabhängigen klassischen linearen Modellen analysiert, was im *supplementary material* des Papers im Anhang nachgelesen werden kann (Recke et al. 2018). Die Regressionsanalyse ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Bindungssignalen der gesunden Kontrollen und der SSc-Patienten für Peptid 4 ( $p_{\text{Bayes}}=0,00879$ ), Peptid 15 ( $p_{\text{Bayes}}=0,0225$ ), Peptid 16 ( $p_{\text{Bayes}}=0,00684$ ), Peptid 17 ( $p_{\text{Bayes}}=0,000977$ ), Peptid 21 ( $p_{\text{Bayes}}=0,00488$ ), Peptid 24 ( $p_{\text{Bayes}}=0,00293$ ), Peptid 25 ( $p_{\text{Bayes}}=0,000977$ ), Peptid 31 ( $p_{\text{Bayes}}=0,00879$ ), Peptid 33 ( $p_{\text{Bayes}}=0,000977$ ) und Peptid 34 ( $p_{\text{Bayes}}=0,000977$ ). Unter Verwendung einer strengeren Schwelle von  $p < 0,00138 = 0,05/36$  zur Berücksichtigung von multiplen Testungen, blieben die Peptide 17, 25, 33 und 34 als mögliche Epitope erhalten (Tabelle 18). Bei all diesen Peptiden war das Bindungssignal von SSc-Patienten höher als bei gesunden Kontrollen, mit Ausnahme der Peptide 4 und 15, die sich an der N-terminalen extrazellulären Stabdome befinden. Mit Ausnahme von Peptid 21 befinden sich alle anderen Peptide, die wir identifiziert haben, intrazellulär. Das heißt bei der Epitopkartierung wurden Epitope von Autoantikörpern der SSc-Patienten in intrazellulären Regionen lokalisiert.

**Tabelle 18: Peptidfragmente von CXCR3 mit signifikantem Unterschied in der Regressionsanalyse und Auswahl für den Mischpeptid-ELISA**

#	Sequenz	pBayes	Auswahl für Mischpeptid-ELISA 1
4	ENESDSCCTSPPCPQDFSLN	0,00879	-
15	LLACISFDRLNIVHATQLY	0,0225	-
16	LNIVHATQLYRRGPPARVTL	0,00684	-
17	RRGPPARVTLTCLAVWGLCL	0,000977	+
21	THCQYNFPQVGRTALRVLQL	0,00488	-
24	MAYCYAHILAVLLVSRGQRR	0,00293	-
25	VLLVSRGQRRLRAMRLVVVV	0,000977	+
31	SVTSGLYMHCCLNPLLYAF	0,00879	-
33	VGVKFRERMWMLLRLGCPN	0,000977	+
34	MLLRLGCPNQRLQRQPSS	0,000977	+

1) + Signifikant bei strengerer Schwelle von  $p < 0,00138 = 0,05/36$  und Auswahl für Mischpeptid-ELISA; - nicht signifikant bei strengerer Schwelle und keine Verwendung im Mischpeptid-ELISA

Um die Reaktivität von SSc-Autoantikörper auf die Peptide mit der durch die Primärstruktur von CXCR3 vorhergesagten Epitope zu vergleichen, wurde die *Antigenic*-Software von *EMBOSS* angewandt. Diese Software führt eine von *Kolaskar und Tongaonkar* (Kolaskar und Tongaonkar 1990) beschriebene Methode aus. Allerdings scheint es keine wirkliche Übereinstimmung zwischen der vorhergesagten Epitopen und der Reaktivität von SSc-Autoantikörpern zu geben.

Im Gegensatz zu *Antigenic* hat die auf neuronalen Netzwerken basierende *ABCpred*-Software Epitope auf den Aminosäureresten *Y29-L68*, *L184-C203*, *V241-V260*, *G307-R326* und *L332-S351* vorhergesagt. Von diesen Epitopen entsprachen alle, außer *L184-C203*, den Peptiden, die experimentell als mögliche Epitope identifiziert wurden. Sie unterschieden sich also in der Bindung zwischen SSc-Patienten und gesunden Kontrollen. Umgekehrt entsprechen die experimentell identifizierten Peptide 17 und 21 keinem von *ABCpred* vorhergesagtem Epitop. Es kann festgestellt werden, dass das Peptid 20, das dem *ABCpred*-Epitop *L184-C203* entspricht, einer Spitze der Reaktivität im Hintergrundsignal entsprach. Dies ist Abbildung S2 im *supplementary material* des Papers im Anhang nachvollziehbar.

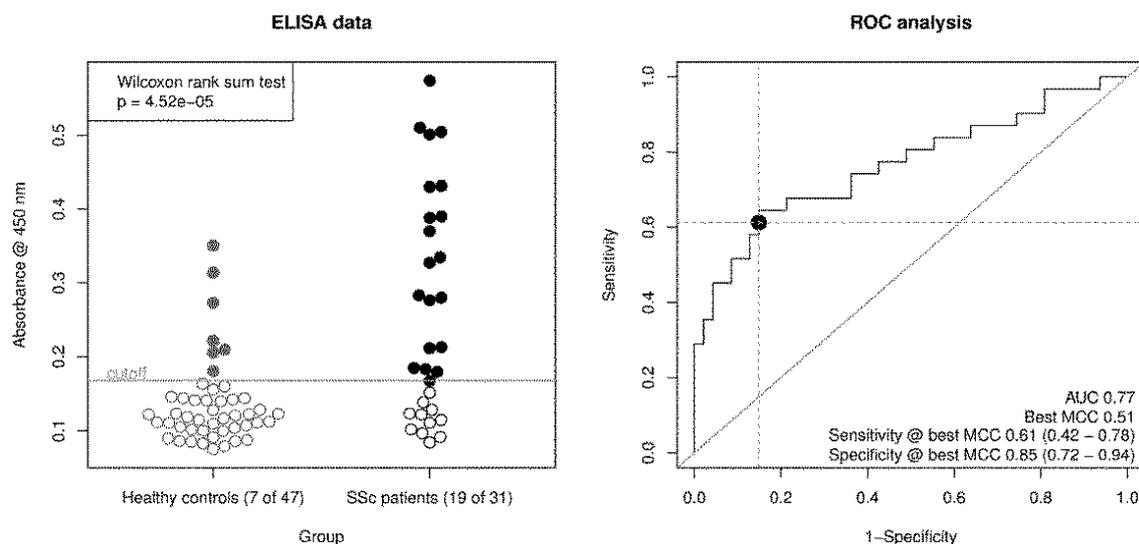
Weiterhin wurde geprüft, ob die Reaktivität von SSc-Autoantikörpern den konservierten Rhodopsin-ähnlichen GPCR-Domänen entspricht. Diese Domänen befinden sich meist in transmembranösen Regionen des Proteins. Allerdings wurde kein Unterschied zwischen

SSc-Seren und gesunden Kontrollseren in der Reaktivität gegenüber Peptiden, die Rhodopsin-ähnlichen GPCR-Domänen entsprechen, gefunden.

### 3.2.3 Mischpeptid-ELISA verifiziert zuvor detektierte Epitope mit einer guten Leistung

Es sollten die Epitope verifiziert werden, welche durch den Peptid-ELISA detektiert worden waren. Hierzu wurden die Peptide 17, 24, 25, 33 und 34, welche positiv mit den SSc-Seren korreliert hatten, in einer ELISA-Platte kombiniert. Mit diesem ELISA-Design wurden die Rohwerte der Messung der optischen Dichte bei 450 nm der 32 SSc-Patientenseren mit 16 der gesunden Kontrollseren und 31 zusätzlichen gesunden Kontrollseren aus einer neuen Kohorte verglichen. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in den Werten von SSc-Seren und gesunden Kontrollseren (*Wilcoxon-Rangsummentest*  $p = 4,52 \times 10^{-5}$ ).

Eine Fläche unter der Kurve (*AUC*) von 0,77 bei *ROC*-Analyse weist auf eine gute Fähigkeit zur Klassifikation hin. Ein *Cut-off* für den Wert der optischen Dichte bei 450 nm konnte durch Optimierung des *Korrelationskoeffizienten von Matthew* auf einen Wert von 0,51 ermittelt werden. Unter Verwendung dieses *Cut-offs* betrug die Sensitivität dieses Assays 0,61 (95 % CI: 0,42-0,78) mit einer Spezifität von 0,85 (95 % CI: 0,72-0,94). Dies entspricht einem *LR+* von 3,98 (95 % CI: 2,06-9,28) und einem *LR-* von 0,46 (95 % CI: 0,27-0,68). In Abbildung 17 ist zum einen die Streuung der ELISA Werte der gesunden Kontrollblutspender und der SSc-Patienten bei OD450 und zum anderen die *ROC* Analyse des Mischpeptid-ELISA dargestellt.



#### Abbildung 17 – Mischpeptid-ELISA

Das linke Diagramm ist ein Streudiagramm der Roh-ELISA-Auslesewerte (OD450) mit einem durch Maximierung des *Matthew-Korrelationskoeffizienten (MCC)* optimierten *Cut-Off*-Wert. Die SSc-Patienten zeigten ein signifikant höheres ELISA-Signal als gesunde Kontrollseren (*Wilcoxon-Rangsummentest*  $p = 4,52 \times 10^{-5}$ ). Das rechte Diagramm stellt die *ROC*-Analyse der ELISA-Werte dar. *AUC* 0,77, bester *MCC* 0,51, Sensitivität 0,61 und Spezifität 0,85 bei optimalem *MCC* werden als

Leistungsindikatoren angezeigt. Der Punkt zeigt die optimale *Cut-Off*-Position in der *ROC*-Kurve an.

## 4 Diskussion

### 4.1 Erstellung der scFv-Antikörperbibliothek in

#### M13-Phagen

Ziel dieser Arbeit war es rekombinante Antikörper gegen AT1R und ETAR aus Patientenmaterial zu generieren. Hierzu wurde das sogenannte Antikörper-*Phage Display* angewandt. Auf diese Weise sollten die Sequenz und die funktionellen Bindungseigenschaften der Antikörper ermittelt werden.

Zunächst wurde eine Bibliothek an scFv in dem Vektor *pComb3XSS* generiert. Hierzu wurde RNA aus PBMC-Zellen mittels *reverser Transkription* in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden die Gene der  $V_H$ - und der  $V_L$ -Ketten mittels PCR vermehrt und durch eine *Overlap-PCR* miteinander zu scFv verbunden. Die entstandenen scFv wurden mit dem verkürzten Gen des Hüllproteins *pIII* des M13-Phagen in einem speziellen Phagemid-Vektor, dem Vektor *pComb3XSS*, ligiert. Die Phagemid-Vektoren enthalten einen bakteriellen Replikationsursprung zur Vermehrung des Plasmids in *E. coli* und einen F1-Phagenursprung zur Replikation und zum Verpacken von einzelsträngiger DNA (Frei und Lai 2016). Die *pComb3*-Vektoren, wie der Vektor *pComb3XSS*, tragen ein Gen für die Expression des Enzyms Beta-Laktamase. Durch die daraus resultierende Carbenicillin-Resistenz können später gezieht scFv-exprimierende *E. coli* selektiert werden (Barbas et al. 2001).

Anschließend wurden *E. coli*-Bakterien vom Typ *ER2537* mit dem Ligationsprodukt aus dem Phagemid-Vektor und den scFv transformiert. Bibliotheksligationen, welche nicht direkt weiter verwendet wurden, mussten vor der Transformation reamplifiziert werden. Es ist anzunehmen, dass dies zu einer Verringerung der Diversität führte. Die Produktionsrate von antikörperpräsentierenden Phagen wird beeinflusst durch die Variationen in den Antikörpersequenzen, sodass Phagen, welche verschiedene Antikörper präsentieren, in unterschiedlicher Anzahl produziert werden. Die Reamplifikation war jedoch nötig, da einige Phagenpräparationen nicht direkt am selben Tag zur Bibliotheksselektion verwendet werden konnten. Wird die Präparation nicht direkt weiter verwendet können vorhandene Proteasen die präsentierten Antikörper schneiden.

Die Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA erfolgte mittels Elektroporation. Die Größe der Antikörperbibliothek ist im Wesentlichen durch die Effizienz ihrer Übersetzung in *E. coli* abhängig. Elektroporation stellt dabei die effektivste Methode der Transformation dar. Für die Elektroporation ist es notwendig, dass die Bakterien in einer Lösung mit

minimaler Ionenstärke vorliegen. Hierzu wurde 10 % Glycerol mit 4 % Mannitol verwendet. Das letztere soll hierbei die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass die Bakterien die Prozedur überleben. Da sich durch das Einfrieren die Kompetenz der Bakterien verringert, fiel die Entscheidung auf ein vereinfachtes, kürzeres Protokoll, welches die Herstellung der elektrokompetenten *E. coli* am Tag der Transformation erlaubte (Barbas et al. 2001).

Anschließend wurde eine Phagenbibliothek konstruiert. Um die Information zur Replikation und zum Zusammenbau von Phagenpartikeln zu erhalten, wurde mit Helferphagen koinfiziert. Der Zusammenbau der Bakteriophagen erfolgt in den Bakterien. Das Ergebnis ist eine Bibliothek von Phagen, welche jeweils auf ihrer Oberfläche ein individuelles Antikörpermolekül exprimieren, welches in dem Plasmids im Inneren des Phagen als DNS-Sequenz kodiert ist (Hammers und Stanley 2014). Es wird also eine Kopplung des Phänotyps mit dem Genotyp ermöglicht. Dadurch kann man Antikörperfragmente anhand ihrer Bindung an das Zielantigen im Rahmen der Phagenselektion anreichern und hat anschließend einen einfachen Zugang zur Antikörpersequenz (Rader et al. 2000). Die Bibliothek wurde auf Phagenbindung an die Antigene AT1R und ETAR mittels des Phagen-*Pannings* untersucht.

Das Phagen-*Panning* erfolgte in mehreren Runden an ein in den Vertiefungen der ELISA-Platte immobilisiertes Antigen. Auf diese Weise sollten spezifisch bindende Phagen selektiert und nicht bindende Phagen gewaschen werden. Nach etwa drei bis vier Runden sollte eine spezifische Bindung stattfinden. Oftmals ist in den ersten Selektionsrunden nur eine sehr geringe Anreicherung zu sehen. Im Idealfall werden Anreicherungsverhältnisse von 10-fach oder mehr beobachtet. Oft tritt dies auch erst in den späteren Runden auf. Sobald die Hintergrundanreicherung nicht mehr beobachtet wird, kann die Fortsetzung der Selektion zu einer Überselektion führen. Die Anreicherung wird mittels der *Input*- und *Output*-Titrierung kontrolliert. Im Verlauf der Selektionsrunden sollte der Output geringer werden (Barbas et al. 2001, Frei und Lai 2016).

Nach dem zyklischen Phagen-*Panning* wurden die resultierenden Phagenpools mittels eines ELISAs getestet. Zudem wurden ein Dot Blot und eine Sequenzierung durchgeführt.

Alternativ hätte die *Phage Display*-Technik auch mit *Fab*-Fragmenten durchgeführt werden können. Die *Fab*-Fragmente sind stabiler und werden leichter in ganze Antikörper konvertiert als die *scFv*. Allerdings lassen sich die *Fab*-Fragmente schwieriger assemblieren. Die *scFv* neigen zur Dimerisierung, lassen sich von Bakterien jedoch besser exprimieren. Infolgedessen binden Antikörper, die als *scFv* ausgewählt wurden, ihr Antigen in der Regel nicht gut, wenn sie in das *Fab*-Format umgewandelt werden (Holliger et al. 1993, Rader et al. 2000, Barbas et al. 2001). Es wurde die Methode mit *scFv*-

Fragmenten gewählt. Dabei kamen, als Primer, *Long Linker* zum Einsatz. Bei der Verwendung von *Long Linkern* entstehen meist Monomere und es werden weniger ungewollte, niedrigaffine Binder selektiert (Barbas et al. 2001).

Das Ziel dieser Arbeit, rekombinante Antikörper gegen AT1R und ETAR sowie andere GPCRs zu generieren, ist ein bisher ungelöstes Problem. Bei bisherigen Studien wurde aufgereinigtes IgG anstatt spezifischer Antikörpern eingesetzt, weshalb die Effekte teilweise von anderen Antikörpern stammen könnten (Günther et al. 2014). Die *Phage Display*-Technik hat diverse Vorteile wie die direkte Zugänglichkeit der Antikörpersequenzen und die gute Nachvollziehbarkeit, dadurch, dass die Antikörper direkt aus Patientenmaterial generiert werden. Zusätzlich zu der Möglichkeit Phagen zu produzieren, welche den monoklonalen Antikörper auf der Oberfläche tragen, kann der *Phage Display*-Vektor verwendet werden, um den monoklonalen Antikörper selbst, ohne Bindung an die Capsid-Proteine des Phagen, in bestimmten *E. coli* Stämmen herzustellen (Barbas et al. 2001). Die *Phage Display*-Technik ermöglicht eine *in vitro* Selektion von humanen monoklonalen Antikörpern mit nahezu beliebiger Spezifität und Affinität. Anschließend besteht die Möglichkeit der genetischen und funktionellen Analyse des ausgewählten Antikörpers.

Es gibt jedoch auch Limitationen der *Phage Display*-Technik. So können wichtige Klone durch eine schlechte RNA-Isolation aus den PBMCs oder durch die wiederholten DNA-Aufreinigungen verloren gehen. Zudem präsentieren *Phage Display*-Bibliotheken möglicherweise nicht alle Antikörper vollständig und die Paarung der  $V_H$ - und  $V_L$ -Ketten beim Aufbau der *scFv*-Bibliothek stellt möglicherweise nicht die *in vivo* Antikörperpaarung dar (Hammers und Stanley 2014).

Die mittels *Phage Display*-Technik abgeleiteten *scFvs* haben in Experimenten jedoch die gleichen Epitope an den Desmogleinen wie polyklonale Patienten-IgGs gebunden und einige Daten zeigen, dass sowohl beim *Heterohybridom* als auch bei der *Phage Display*-Technik die gleichen Gene für  $V_H$  und  $V_L$  erkannt werden (unveröffentlichte Beobachtung) (Hammers und Stanley 2014). Hybridzellen, auch *Hybridome* genannt, sind Zellen, welche durch die Fusion eines B-Lymphozyten mit einer Tumorzelle hergestellt werden. Hierzu werden die entsprechenden B-Zellen aus der Milz eines Tieres entfernt, das mit dem entsprechenden Antigen immunisiert wurde. Die Technik wurde entwickelt, um einen gewünschten Antikörper in großen Mengen zu produzieren. Die fusionierten Hybridzellen vermehren sich schnell und unbegrenzt und produzieren große Mengen des gewünschten Antikörpers. Die Methode monoklonale Antikörper mittels Hybridzellen, also durch Tierversuche, herzustellen, kann mittels *Phage Display*-Technik umgangen werden (Pandey 2010). Die zuvor erwähnte Tatsache, dass sowohl beim *Heterohybridom* als

auch bei der *Phage Display*-Technik die gleichen Gene für  $V_H$  und  $V_L$  erkannt werden, deutet darauf hin, dass die mittels *Phage Display*-Technik abgeleiteten monoklonalen Antikörper den Antikörpern der Patienten entsprechen.

Die Immunisierung von Mäusen war bei den Rezeptoren *AT1R* und *ETAR* aufgrund der Immuntoleranz keine gute Alternative. Es ist in der Regel sehr schwierig funktionell aktive monoklonale Antikörper mittels Immunisierung herzustellen. Wichtige Proteinstrukturen sind zwischen Menschen und Mäusen konserviert. Bei der Herstellung von Antikörpern wird die natürliche Abwehrreaktion des Körpers gegenüber immunogenen Fremdmolekülen ausgenutzt. Es besteht allerdings beispielsweise eine 94 % Homologie zwischen dem *AT1R* von Menschen und Mäusen (EnsemblOrg 2018). So ist keine ausreichende Abwehrreaktion zu erwarten.

Anhand unserer Qualitätskontrollen mittels Dot Blot, ELISA-Analyse der *scFv*-Fragment-exprimierenden Klone und Sequenzierung konnten wir feststellen, dass es nicht gelungen ist, eine Phagenbibliothek mit ausreichendem Anteil an funktionellen *scFv*-Antikörpern zu generieren. Ursachen hierfür könnten ein bereits nicht zufriedenstellendes *Overlap*-Produkt nach der PCR, eine partielle Verdauung des Plasmids durch kontaminierende DNAsen und hohe Verluste während der Gelaufreinigung sein.

Bei der *Overlap*-PCR zeigten sich zunächst multiple Banden als Produkt. Daher wurden durch eine *Gradienten*-PCR unterschiedliche *Annealing*-Temperaturen getestet. Anschließend wurde die *Annealing*-Temperatur auf 56 °C festgelegt. Trotz allem zeigte sich in einer späteren Sequenzierung ein unbefriedigendes *Overlap*-Produkt. Für die PCRs wurde die *Phire Hot Start II DNA Polymerase* von *Thermo Scientific* verwendet. Die *Hot-Start*-Technologie ermöglicht eine sehr schnelle komplette Reaktivierung des Enzyms bei Standard-Zyklustemperaturen, verhindert die Amplifikation unspezifischer Produkte und verstärkt Targets mit geringer Häufigkeit. Sie enthält eine dsDNA-bindende Domäne, was kurze Verlängerungszeiten ermöglicht, die Ausbeute verbessert und eine erhöhte Klangtreue, um das Doppelte im Vergleich zur *Taq-DNA-Polymerase*, erzeugt. Die *Phire Hot Start II DNA-Polymerase* besitzt eine  $5' \rightarrow 3'$  *DNA-Polymerase*-Aktivität und eine schwache  $3' \rightarrow 5'$  *Exonuklease*-Aktivität. Sie ist frei von kontaminierenden Endo- und Exonukleasen (Thermo Scientific 2014). Das nicht zufriedenstellende *Overlap*-Produkt könnte aus einer zu großen Anzahl an Zyklen der PCR resultieren. Zu viele Zyklen können zu einem Selbstverdau durch die Verdauereigenschaften von Polymerasen, wie im Fall der *Phire Hot Start II DNA-Polymerase* die  $3' \rightarrow 5'$  *Exonuklease*-Aktivität, führen. Daher wäre ein Lösungsansatz entweder mit viel Template und wenigen Zyklen, oder wenig Template und vielen Zyklen zu arbeiten. Eine geringere Zyklenzahl erzeugt zwar saubere und scharfe Banden, birgt jedoch das Risiko eines geringen *Outputs*. Eine Option wäre

eventuell während der PCR eine Pause einzulegen und das aktuelle Produkt mittels Agarosegelelektrophorese zu kontrollieren. Alternativ könnten längere Zykluszeiten gewählt werden.

Während der Arbeiten fiel auf, dass es schwierig war, eine ausreichende Menge an *pComb3XSS*-Plasmidvektor herzustellen. Hierfür wurden zunächst Übernachtskulturen mit Volumina von wenigen Millilitern transformierter *E. coli* NovaBlue, einem Klonierungsstamm, verwendet. Zur Isolation des Plasmides wurde ein Kit der Firma Qiagen verwendet. Es konnte jedoch nie mehr als 10 % der erwarteten Menge an Plasmid isoliert werden. Zudem zeigte sich das isolierte Plasmid auch als resistent gegenüber dem Restriktionsverdau mit Sfi I, was auf einen hohen Grad an Methylierung hinwies. Aus letzterem Grund wurde versucht einen methylationsdefizienten *dam-/dcm-E. coli*-Stamm zu verwenden, was jedoch das Problem der geringen Plasmidmenge nicht beheben konnte.

Versuche mit neuen Kits, anderen Inkubationsbedingungen und anderen Schüttlern führten nicht oder immer nur kurzfristig zu einer höheren Ausbeute. In einer retrospektiven Fehlersuche nach Abschluss der Arbeiten wurde schließlich festgestellt, dass offensichtlich die Lagerbedingungen für das Kit sowie das Raumklima für den Bakterieninkubationsschüttler das Problem darstellten: Die Lager- und Laborräume waren durch Kühlschränke und sommerliche Temperaturen so warm geworden, dass die vorgesehene Lagertemperatur von 15-25 °C teilweise zu mehr als 10 °C überschritten wurde. Es ist zu vermuten, dass die geringe Ausbeute unter anderem durch mikrobielle Kontamination der Puffer für das Plasmidreinigungskit bedingt war, wodurch die aufgereinigte DNA schlicht durch DNasen verdaut wurde.

Zusätzlich traten Komplikationen mit dem *Gel Extraktion Kit* zur Gelaufreinigung auf. Bei dieser kam es zu hohen Materialverlusten. Bei dem verwendeten Kit wird eine silica-basierte Membrantechnologie angewandt. Es wird in der Anleitung darauf hingewiesen die Verpackung der *Purification Columns* stets gut zu verschließen. Dies wurde allzeit ordnungsgemäß durchgeführt (Thermo Scientific 2015). Der Flüssigkeitsfilm der *Purification Columns* scheint im Verlauf jedoch trotz gewissenhaften Verschlusses der Verpackung nach der erstmaligen Öffnung zunehmend verdampft zu sein. Aufgrund der hohen Materialverluste durchgeführte Nachforschungen ergaben, dass anscheinend die Silicamatratzen durch Austrocknung inaktiviert wurden. Diese Recherchen wurden durch den technischen Service der Herstellerfirma des Kits unterstützt. Aufgrund der Austrocknungsproblematik arbeiten Konkurrenzprodukte teilweise mit anderen technischen Spezifikationen. Bei der Firma *Quiagen* würden daher einzeln verpackte *Purification Columns* verkauft. Die Information, dass die Silicamatratzen durch

Austrocknung inaktiviert wurden, würde zwischenzeitliche Erfolge mit neu erworbenen und erstmals geöffneten Kits erklären. Probleme mit Kits sind schwer durchschaubar, da primär davon ausgegangen wird, dass sie ihre beschriebene Leistung erfüllen. Durch diese technischen Probleme kam es neben den Materialverlusten auch zu einer starken Zeitverzögerung.

Es wurde eine einfache Alkoholfällung des Ligationsproduktes mit Butanol und Ethanol durchgeführt. Alternativ hätte man eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchführen können, welche eine Reinigung der DNA von Proteinen bewirkt. Auch die Alkoholfällung bewirkt jedoch bereits eine gute Reinigung der Nukleinsäuren und ist sehr einfach in der Handhabung. Bei erneuter Durchführung eines Phage Displays könnte die Phenol-Chloroform-Extraktion erwogen werden, um eine Elimination von Sfi1 und somit ein Weiterschneiden zu erreichen. Diese Form der Extraktion ist auch für kleine DNA-Mengen besser geeignet (Mülhardt 2013).

Das Phagen-*Panning* erfolgte gegen ein in den Vertiefungen der ELISA-Platten immobilisiertes Antigen. Ein Nachteil ist, dass dieser Ansatz eventuell Antikörper auswählen kann, die das native Protein in einem physiologischen Kontext wie auf der Oberfläche von Zellen, nicht erkennen. Man unterscheidet Konformations- oder diskontinuierliche Epitope von kontinuierlichen oder linearen Epitopen. Diskontinuierliche Epitope liegen nur durch Faltungsvorgänge nebeneinander, also in der dreidimensionalen Struktur des Antigens. Kontinuierliche Epitope bestehen aus einem einzigen Segment einer Polypeptidkette. Die Bindung von Antikörpern gegen native Proteine findet meist an Abschnitten des Moleküls statt, welche in der Primärstruktur nicht nebeneinander liegen, also im Bereich von diskontinuierlichen Epitopen. Insbesondere Membranrezeptoren wie GPCRs weisen oft kurze antigene Regionen auf, die sich nur im Rahmen einer Lipid-Doppelschicht korrekt falten. Infolgedessen sind Epitope, welche von Antikörpern angegriffen werden, auf diesen Rezeptoren oft konformationell (Banik und Doranz 2010, Flanagan 2011, Murphy und Weaver 2018). So kann es sein, dass die gewünschten Epitope bei dem genutzten Verfahren mit immobilisiertem Antigen in Vertiefungen der ELISA-Platten nicht geboten waren. Alternativ zum Phagen-*Panning* gegen immobilisierte Antigene ist ein Phagen-*Panning* gegen eukaryotische Zellen möglich. Das Phagen-*Panning* gegen immobilisierte Antigene ist einfacher in der Durchführung, manchmal ist der Einsatz eukaryotischer Zellen jedoch nötig. Beim Einsatz eukaryotischer Zellen kann es problematisch sein, dass diese eine breite Anzahl unterschiedlicher Oberflächenantigene exprimieren und so eventuell unerwünschte Klone angereichert werden können. Daher ist eine hohe Hintergrundbindung von unspezifischen Phagen vorhanden. Zudem sind mehr *Panning*-Runden nötig, da der Anreicherungsfaktor pro

Runde aufgrund der relativ geringen Bindung von spezifischen Phagen geringer ist (Barbas et al. 2001, Heitner et al. 2001).

Die Analyse der *scFv*-Fragmente mittels eines ELISAs erfolgte nach mehreren Runden des Phagen-*Pannings*. Die ELISA-Platte zeigte lediglich ein schwaches Signal im ELISA-Plattenleser. Daher wurde eine Sequenzierung durchgeführt, welche bereits ein nicht zufriedenstellendes Ligationsprodukt der *scFv* in den Vektor *pComb3XSS* nachwies. Ein zuvor durchgeführter Dot Blot hatte in 12 der 30 Überstände *scFv* nachgewiesen. Bei erneuter Durchführung könnte eine frühere Analyse der *scFv*-Fragmente mittels Dot Blot oder ELISA erwogen werden.

Die *Phage Display*-Technik wurde in den letzten Jahren technisch stets verbessert, ist jedoch noch keine Routinemethode. Ein möglicher Lösungsansatz, um alle aufgetretenen Probleme zu umgehen, wäre die Verwendung einer gekauften Bibliothek, solche werden mittlerweile von mehreren Firmen, zum Beispiel *Antibody Design Laboratory*, angeboten (Antibody Design Laboratories 2018). Eine andere Option wäre das Zurückgreifen auf alternative Strategien zur Generierung von Antikörpern. Es gibt inzwischen viele verschiedene molekulare Selektionsstrategien für die Isolierung und Generierung von humanen Antikörpern. Die drei Hauptselektionsmethoden mittels Phagen, Ribosomen/mRNA und mikrobiellem Zellen-Display ähneln sich zwar in ihrer Anwendung, bleiben aber alle hinter dem Ideal zurück: Ein Selektionssystem, das innerhalb weniger Tage eine große Gruppe an Antikörper gegen eine hohe Anzahl an Epitopen auf dem Zielantigen der Wahl produziert, welche eine hohe Affinität, eine ausreichende Stabilität sowie eine genau abgestimmte Sequenzvielfalt besitzen. Unter anderem müssten die Amplifikation und Selektion normiert werden, um unerwünschte Variablen, wie zum Beispiel die bevorzugte Replikation mancher Gene bei der PCR, bevorzugte Infektion oder bevorzugtes Wachstum, zu reduzieren (Hoogenboom 2005).

Natürliche Autoantikörper können bei allen Menschen gefunden werden und sind physiologisch niedrig konzentriert. Wie bisher bekannt, tragen viele der in SSc gefundenen Autoantikörper nicht direkt zur Pathogenese bei, sondern werden als Routinemarker für die Diagnose und Prognose der Organbeteiligung verwendet. Antikörper gegen AT1R und ETAR scheinen jedoch wesentlichen Beitrag an der Pathogenese zu haben. Daher wäre ihre Herstellung als rekombinante Antikörper von hoher Relevanz (Günther et al. 2015). Das Vorhandensein von Antikörpern gegen beide Rezeptoren bei den meisten SSc-Patienten wurde in einer Studie mit Sensitivitäten von 82-85 % und Spezifitäten von 75-78 % im Vergleich zu 700 Kontrollen bestätigt (Riemekasten et al. 2011). Beide Autoantikörper wirken agonistisch und induzieren unter anderem die ERK 1/2-Phosphorylierung und die erhöhte Expression des

Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ . Die klassische agonistische Stimulation von GPCRs führt zur Aktivierung der Signalkaskaden, gefolgt von einer Desensibilisierung und Internalisierung des Rezeptors, was zu einer Beendigung der Stimulation führt. Unter diesen physiologischen Bedingungen sind die Rezeptoren kaum anfällig für neue Stimulationen. Im Gegensatz dazu hemmt die Aktivierung von GPCRs mit agonistischen Autoantikörpern die Desensibilisierung und Internalisierung des Rezeptors, was zu einer permanenten Stimulation der Signalkaskaden führt. Dieser Mangel an Desensibilisierung wurde für alle agonistischen Antikörper gegen GPCR beobachtet und könnte ein Schlüsselmechanismus in der Pathogenese von GPCR-Autoantikörper-assoziierten Krankheiten sein (Günther et al. 2015). Das Vorhandensein von Antikörpern gegen AT1R und ETAR scheint mit einer ausgeprägteren Krankheitsschwere und Todesfällen bei SSc sowie anderen spezifischen Gefäßkomplikationen wie digitalen Ulzerationen verbunden zu sein. Die Blockade von AT1R und ETAR scheint einige vaskuläre Manifestationen der SSc lindern zu können. Dies scheint über eine reine Induktion der Vasodilatation hinauszugehen (Avouac et al. 2015). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass gereinigtes IgG von SSC-Patienten, welches AT1R-Antikörper und ETAR-Antikörper enthielt, zur Induktion der Aktivierung einer humanen mikrovaskulären endothelialen Zellkulturlinie führte. Dadurch kam es zu einer Erhöhung an IL-8-mRNA und -Protein sowie VCAM-1-mRNA. Zudem kam es zur Anregung der Neutrophilenmigration und der ROS-Produktion. Zusätzlich führten die gereinigten Patienten-IgGs konzentrationsabhängig zu einer Erhöhung der Kollagenproduktion gesunder Spenderhautfibroblasten und zur Reduktion der Wundreparatur. Allerdings erlauben diese Daten keine sichere Aussage, ob die Auswirkungen tatsächlich rein auf AT1R- und ETAR-Antikörper oder auf weitere Antikörper in den IgG-Präparaten der Patienten zurückzuführen waren, da gereinigte IgG-Präparate an Stelle von speziellen AT1R- und ETAR-Antikörpern verwendet wurden (Kill et al. 2014). Eine Entwicklung rekombinanter Antikörper gegen AT1R und ETAR mittels *Phage Display*-Technik würde diese Aussage, nach Wiederholung der Experimente mit diesen, eventuell erlauben. Nach Überwinden der methodischen Probleme bei der Klonierung und pComb3XSS-Ligierung könnte die Entwicklung erreicht werden. Die Bestätigung der Rolle dieser Antikörper und die Identifizierung der Signalwege, durch die sie die Zellfunktionen verändern, hätten erhebliche Auswirkungen auf die Behandlung der SSc. Spezifische Rezeptorblockaden durch sogenannte Biologika könnten eventuell zu einer wesentlichen Verbesserung der Therapieoptionen führen, denn momentan existiert noch keine kausale Therapie der SSc. Die *Phage Display*-Technik bleibt weiterhin eine sehr sinnvolle Option. Es handelt sich um ein effizientes und relativ kostengünstiges Verfahren. Es ist zu erwarten, dass die

Rolle der *Phage Display*-Technik in der Medizin weiter zunehmen wird (Bazan et al. 2012).

## 4.2 Identifizierung der SSc-spezifischen Epitope auf CXCR3

Mittels einer Epitopkartierung sollten die Epitope auf dem CXCR3 identifiziert werden, welche von Autoantikörpern der SSc-Patienten angegriffen werden. Dabei wurde die komplette Sequenz von CXCR3 mittels überlappender Peptide abgedeckt. Es wurde die Epitopspezifität von 32 SSc-Patientenseren und 20 gesunden Kontrollen verglichen und das Bindungsverhalten mittels ELISA bestimmt.

Zusätzlich wurden zwei verschiedene Software-Ansätze angewandt, um eventuelle Epitope vorherzusagen. Zum einen wurde die *Antigenic*-Software verwendet, welche auf einer Mittelwertbildung der Antigenität von Aminosäuren in der Sequenz der Proteine basiert. Die Software beruht auf einer Datenanalyse, welche analysiert hatte, welche Aminosäurereste häufig Teile antigener Stellen bilden. Zum anderen wurde *ABCpred* verwendet, welches auf Datensätzen beruht, welche B-Zell-Epitope untersucht haben (Saha und Raghava 2006, EMBOSS explorer 2018).

Um ein spezifisches Autoantikörper-bindendes Signal zu isolieren, wurde das bayesische Gerüst des Packets *R-INLA* zur Erstellung eines gemischten Modells verwendet. Dieses separiert ein Autoantikörper-bezogenes Bindungssignal von interexperimentellen Variationen. Interexperimentelle Variationen sind Variationen aufgrund physikalisch-chemischer Eigenschaften einzelner Peptide wie die Hydrophobie und der isoelektrische Punkt, sowie unspezifische Patienten- oder Kontrollserumeigenschaften (Martins et al., 2013; Rue et al., 2009).

Die durch SSc-Patientenserum verstärkt gebundenen Peptide wurden in einem zweiten *Mischpeptid*-ELISA kombiniert, um die Ergebnisse aus der Epitopkartierung durch den *Peptid*-ELISA weiter zu überprüfen. Anders als bei der vorherigen Epitopkartierung, bei der nur zwei Proben pro Mikrotiterplatte verarbeitet werden konnten, war mit diesem ELISA die Bestimmung von 48 Proben in Duplikaten pro Platte möglich. Das Auslesen dieses ELISAs ermöglichte die Unterscheidung zwischen SSc-Patienten und gesunden Kontrollseren mit einer guten Leistung, ausgedrückt durch einen *Matthew-Korrelationskoeffizienten* von 0,51 und einer *AUC* von 0,77. Die Sensitivität des ELISAs betrug 0,61 und die Spezifität 0,85. Die meisten der in diesem *Mischpeptid*-ELISA verwendeten gesunden Kontrollseren stammen aus einer unabhängigen Kohorte, die nicht zuvor zur Identifizierung von Epitopen verwendet worden war. Zusätzlich wurde evaluiert, ob auf diese Weise eine Unterscheidung zwischen der limitierten und der diffusen Form der SSc möglich ist, was nicht der Fall war.

*Peptid-Arrays*, wie der durchgeführte ELISA, bieten einen einfachen Ansatz zur Lokalisierung linearer Epitope, die von Autoantikörpern erkannt werden (Herrero-González et al. 2006, Dworschak et al. 2012, Forsström et al. 2015). Die Epitopkartierung ist der Prozess der experimentellen Identifizierung der Bindungsstellen von Antikörpern auf ihren Zielantigenen. Die Bestimmung und Charakterisierung der Bindungsstellen oder Epitope von Antikörpern ist der Schlüssel zum Verständnis ihrer unterschiedlichen Effekte und kann zur Entdeckung und Entwicklung neuer Therapeutika, Impfstoffe und Diagnostika beitragen (Westwood und Hay 2001, Gershoni et al. 2007).

Vorteilhaft ist, dass dieses Verfahren schnell und relativ kostengünstig ist. Es eignet sich speziell für die Epitopkartierung von Antikörpern einer hohen Anzahl an Probanden gegen ein definiertes Ziel.

Der Epitopkartierungs-Ansatz mittels ELISA hat jedoch den Nachteil, dass Peptide in ihrer tertiären Struktur flexibler sind und dazu neigen Antikörper mit geringerer Spezifität zu binden als vollständig gefaltete Proteine. Auch bei der Epitopkartierung besteht die Problematik, dass Epitope, welche von Antikörpern angegriffen werden häufig konformationell, also diskontinuierlich, sind. (Banik und Doranz 2010, Flanagan 2011, Murphy und Weaver 2018). Solche Epitope können durch die Epitopkartierung mittels ELISA nicht detektiert werden, so entgeht ein Großteil der relevanten Epitope dieser Methode. Eine Möglichkeit sowohl kontinuierliche als auch diskontinuierliche Epitope zu erkennen, ist zum Beispiel die Anwendung der Röntgen-Kristallstrukturanalyse. Es kann auch eine Wechselwirkung im Bereich von Peptidfragmenten des Proteins stattfinden. Diese Areale können mittels der Epitopkartierung detektiert werden. Die Antikörper, die lineare Epitope erkennen, binden an eine bestimmte Konformation des linearen Epitops und erkennen somit bei nativen Proteinen weiterhin ein konformationsspezifisches Epitop. Eine sorgfältige statistische Auswertung ist notwendig, um ein spezifisches Bindungssignal zu erkennen (Dworschak et al. 2012, Forsström et al. 2015, Murphy und Weaver 2018).

Zur statistischen Auswertung wurde eine bayesische Statistik verwendet. In der bayesischen Statistik wird eine bestehende Erkenntnis in Form der *a-priori*-Verteilung mit einbezogen und mit neuen Erkenntnissen kombiniert. Daraus resultiert die *a-posteriori*-Verteilung. Interexperimentelle Variationen wurden in einem gemischten Modell von einem Autoantikörper-bezogenen, spezifischen Bindungssignal separiert. Ein bemerkenswerter Vorteil des angewendeten bayesischen Gerüsts ist die Möglichkeit die Nachbarschaftsstrukturen in das Modell zu integrieren. Das heißt man erwartet, dass zwei 20mer-Peptide, die eine 10mer-Überlappung haben, ein ähnliches Signal liefern. Ein weiterer Vorteil der bayesischen Statistik ist, dass sie auch bei kleineren Datenmengen

anwendbar ist. Allerdings ist die bayesische Statistik rechnerisch aufwändig. Man könnte kritisieren, dass die im Vorfeld getroffenen Vorerwartungen das Resultat der statistischen Berechnung beeinflussen könnten. Bei korrekter Anwendung und nur sinnvollen Annahmen kann das Ergebnis durch die bayesische Statistik jedoch verbessert werden (Koch 2000).

Um die Ergebnisse aus der Epitopkartierung weiter zu validieren, wurde der *Mischpeptid*-ELISA durchgeführt. Auch dies war eine Epitopkartierung und es gelten die oben genannten Vor- und Nachteile. Dadurch, dass mit diesem ELISA 48 Proben in Duplikaten pro Platte bestimmt wurden, war eine bessere Vergleichbarkeit der Proben vorhanden, da die plattenweise Variation der ELISA-Methoden empirisch relativ hoch ist. Die Ergebnisse werden zusätzlich verifiziert durch die Tatsache, dass die verwendeten gesunden Kontrollseren aus einer unabhängigen Kohorte, die nicht zur Identifizierung von Epitopen verwendet wurde, kamen.

Bei der Datenauswertung des Mischpeptid-ELISAs wurde der Korrelationskoeffizienten von *Matthew* angewandt. Dieser ist für duale Klassifikationen geeignet und kann selbst dann verwendet werden, wenn sich die beiden Klassen in der Größe stark unterscheiden. Der *Matthew-Korrelationskoeffizienten* ist im Grundprinzip ein Korrelationskoeffizient zwischen den beobachteten und vorhergesagten dichotomen Klassifikationen (Boughorbel et al. 2017).

Mittels der Epitopkartierung von CXCR3 und deren statistischer Auswertung konnte eine erhöhte Bindung von Antikörpern der SSc-Patienten an Peptide, die intrazelluläre Domänen von CXCR3 darstellen, festgestellt werden. Diese Bindung fand insbesondere im Bereich der C-terminale Stabdomäne statt. Im Gegensatz dazu schien die Bindung an die extrazellulären Domänen einschließlich der N-terminalen Stabdomäne bei Autoantikörpern von Patienten mit SSc zu fehlen.

Autoantikörper gegen GPCRs wie CXCR3 können die Signalfunktion dieser Rezeptoren beeinflussen (Riemekasten et al. 2011, Cabral-Marques und Riemekasten 2017). Es ist sehr wahrscheinlich, dass die unterschiedlichen Epitope auf CXCR3, welche von den Autoantikörpern angegriffen werden, die verschiedenen funktionellen und pathophysiologischen Effekte determinieren. Bei Antikörpern, die an Rezeptoren binden, entscheidet die Auswahl der Zielepitope, ob sie aktivierende, hemmende, die Internalisierung induzierende oder neutrale, also nicht messbare, Effekte zeigen (Horn-Lohrens et al. 1995, Fredriksson et al. 2003, Riemekasten et al. 2011, Xia und Kellems 2013).

Interessanterweise überschneiden sich die identifizierten Epitope nicht mit den Epitopen, die von der *Antigenic*-Software des *EMBOSS* Bioinformatik-Pakets vorhergesagt wurden.

*Antigenic* prognostiziert potenziell antigene Regionen anhand der *Methode von Kolaskar und Tongaonkar*, welche auf einem einzigen Parameter basiert und daher sehr einfach zu bedienen ist. Es ist eine semi-empirische Methode, welche auf der Analyse von Daten aus experimentell bestimmten antigenen Stellen an Proteinen beruht. Diese hat gezeigt, dass die hydrophoben Reste Cystein, Leucin und Valin, wenn sie auf der Oberfläche eines Proteins vorkommen, eher Teil von antigenen Stellen sind (Kolaskar und Tongaonkar 1990, EMBOSS explorer 2018). Nur zwei der von *Antigenic* vorhergesagten Epitope, eines innerhalb der N-terminalen Stabdomäne (entsprechend Peptid 4) und eines innerhalb der C-terminalen intrazellulären Stabdomäne (entsprechend Peptid 34), scheinen übereinzustimmen. Im Gegensatz zu *Antigenic* zeigte sich bei der Epitopvorhersage durch *ABCpred* eine ausgeprägte Übereinstimmung. Ziel des *ABCpred*-Servers ist es B-Zell-Epitope innerhalb einer Antigensequenz unter Verwendung eines künstlichen neuronalen Netzwerks vorherzusagen. Es ist der erste Server, der auf der Grundlage eines wiederkehrenden neuronalen Netzwerks mit Mustern fester Länge entwickelt wurde. Diese maschinelle Technik benötigt festgelegte Längen der zu untersuchenden Muster, während B-Zell-Epitope zwischen Längen von 5 bis 30 Aminosäureresten variieren. Um dieses Problem zu lösen wurde versucht Datensätze mit festen Längenmustern zu erzeugen, indem Aminosäurereste an den terminalen Enden bekannter B-Zell-Epitope entfernt oder hinzugefügt wurden. Der verwendete Datensatz besteht aus 700 B-Zell-Epitopen und 700 Nicht-B-Zell-Epitopen (Zufallspeptide) mit einer maximalen Länge von 20 Aminosäureresten. Unter Verwendung eines wiederkehrenden neuronalen Netzwerks wurde eine Genauigkeit der Vorhersage von 65,93 % erreicht. Es können die Fenstergrößen von 10, 12, 14, 16 und 20 Aminosäuren als vorhergesagte Epitoplänge gewählt werden. In dieser Arbeit fiel die Entscheidung auf eine Fenstergröße von 20 Aminosäuren. Es zeigte sich, dass 4 von 5 vorhergesagten Epitopregionen Peptiden mit einer signifikant unterschiedlichen Bindung zwischen SSc-Patienten und gesunden Kontrollen entsprachen (Raghava 2006, Saha und Raghava 2006). Die eine von *ABCpred* vorhergesagte Epitopregion, welche keine unterschiedliche Bindung zeigte, korrespondierte mit einem Peak im Hintergrundsignal. Obwohl die Studie darauf ausgelegt ist, Epitope mit einer unterschiedlichen Reaktivität zwischen SSc-Patienten und gesunden Kontrollen nachzuweisen, zeigt dies, dass alle von *ABCpred* vorhergesagten Epitope mit unseren experimentellen Daten übereinstimmten. Die rhodopsinähnlichen GPCR-Motive scheinen verschont geblieben zu sein, was durch ihren höheren Konservierungsgrad im Vergleich zu den anderen Teilen der CXCR3-Sequenz erklärt werden könnte (Rosenbaum et al. 2009).

Autoantikörper gegen CXCR3 und eventuell auch gegen CXCR4 scheinen zusätzlich zu den Antikörpern gegen AT1R und ETAR eine Rolle bei der Zellmigration zu spielen. Es

wurden bereits Sequenzhomologien zwischen CXCR3- und CXCR4-Autoantikörpern sowie zwischen CXCR4- und AT1R-Autoantikörpern beschrieben. Dementsprechend könnten CXCR3- und 4-Autoantikörper-Spiegel sowie eine hohe Rezeptorexpression die Auswirkungen von AT1R- und ETAR-Autoantikörper auf die Zellmigration beeinträchtigen (Weigold et al. 2018).

Es wurden bereits erniedrigte, normale und erhöhte Spiegel an CXCR3 bei SSc beschrieben (Fujii et al. 2002, Jiang et al. 2004, Shimizu et al. 2007). In einer früheren Studie waren erhöhte Antikörperspiegel gegen CXCR3 und CXCR4 mit dem Vorhandensein einer Lungenfibrose bei SSc und der diffusen Form der SSc assoziiert. Dagegen prognostizierten niedrige Antikörperspiegel gegen ein N-terminales Fragment von CXCR3 eine zunehmende Verschlechterung der Lungenfunktionsparameter, beziehungsweise eine erhöhte Reaktivität einen gutartigen Verlauf. Dies weist auf eine eventuell schützende Wirkung der Antikörper hin (Weigold et al., 2018). So wurde eine geringere Reaktivität gegenüber linearen Epitopen innerhalb der N-terminalen Stabdomäne in unserer SSc-Studienpopulation erwartet, was mit unserer Epitopkartierung tatsächlich nachgewiesen werden konnte.

Im Gegensatz zu extrazellulären Epitopen ist die biologische Relevanz intrazellulärer Epitope oder Antigene schwer nachweisbar, da sie den Autoantikörpern in der Regel nicht direkt zugänglich sind. ANAs, die typisch für Kollagenosen sind, richten sich gegen intrazelluläre Antigene. Obwohl sie allgemein als funktionell irrelevant angesehen werden, können einige ANAs, wie Anti-Ro, sogar die Plazenta überqueren und neonatalen Lupus verursachen (Scofield 2004). Hier ist zu beachten, dass Anti-Ro-Autoantikörper mit einem extrazellulären Epitop des 5-Hydroxytryptaminergen (5-HT<sub>4</sub>)-Rezeptors 4, einem GPCR wie CXCR3, interagieren (Kamel et al. 2005). Neuere Arbeiten mit PCA-1-Autoantikörpern deuten darauf hin, dass die Aufnahme dieser Antikörper und die Interaktion mit ihren Targets zum Purkinje-Zelltod in Kleinhirnscheiben führen kann, was bedeuten würde, dass diese Autoantikörper auch direkt pathogen sein können. Der Purkinjezell-Tod war nicht nur auf intraneuronale Antikörperakkumulation zurückzuführen (Greenlee et al. 2015). Neben intrazellulären Antigenen haben sich intrazelluläre Domänen von Transmembranproteinen als Angriffsziele von Autoantikörpern wie BP180 und Aquaporin-4 erwiesen (Dresow et al. 2009, Kampylafka et al. 2011). Als Ausnahme von der Regel, dass intrazelluläre Antigene und Epitope nicht zugänglich sind, hat sich gezeigt, dass bestimmte Autoantikörper in der Lage sind die Zellmembran zu durchdringen und anschließend an intrazelluläre Epitope zu binden und pathogene Mechanismen auszulösen. Lymphozyten gehören zu den Zellen in die Autoantikörper eindringen können und dadurch Einfluss auf die Immunregulation nehmen und eventuell die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Autoimmunerkrankung erhöhen können. Die

eindringenden Autoantikörper können zusätzlich einen Zellschaden bewirken, entweder direkt oder über das Freiwerden von nukleosomaler DNA als Ergebnis der Apoptose. Durch das Auslösen der Apoptose von autoreaktiven Zellklonen könnten natürliche Autoantikörper aber auch die Toleranz beeinflussen und so zur Prävention von Autoimmunerkrankungen beitragen (Alarcón-Segovia et al. 1996, Avrameas et al. 1998). In einer Studie konnten Anti-DNA monoklonale Antikörper, die von nicht immunisierten Mäusen mit spontanem Lupus erythematoses abgeleitet waren, in die Kerne einer Vielzahl von kultivierten Zellen eindringen und akkumulieren. Nur polyreaktive Antikörper konnten in die Zellen eindringen. Ursächlich schienen in diesem Fall spezifische Eigenschaften der Sequenz der CDR2- und CDR3-Regionen der schweren Kette. Diese Antikörper scheinen Klone von natürlichen polyreaktiven Autoantikörpern zu repräsentieren, die sich der normalen Kontrolle entziehen und sich bei Lupus erythematoses ausbreiten. Polyreaktive Anti-DNA-Antikörper sollen im Vergleich zu monoreaktiven Antikörpern über eine erhöhte Fähigkeit zur Bindung an Zellmembranen verfügen (Vlahakos et al. 1992).

Die Beobachtung, dass in Zellen eindringende Antikörper zur Apoptose führen können, führte zur Konstruktion von *TransMabs*. Diese Antikörper wurden entwickelt, um mittels einer kurzen (17 Aminosäuren) Membran-Translokationssequenz die Zellmembranen zu durchdringen. Auf diese Weise können Antikörper in lebendige Zellen eindringen, ohne ihnen Schaden zuzufügen. Solche zelldurchdringenden Antikörper eröffnen neue diagnostische und therapeutische Fenster. Ein solcher *TransMab*-Antikörper hemmte *in vitro* signifikant apoptosebedingte Ereignisse (Muller et al. 2005). Es ist möglich, dass Anti-GPCR-Autoantikörper die Fähigkeit besitzen, Zellmembranen zu durchdringen und wichtige pathogene Mechanismen durch Bindung an intrazelluläre Epitope zu initiieren. Dies ist jedoch schwer nachweisbar. Autoantikörper gegen CXCR3 sind nicht nur bei SSc, sondern auch bei gesunden Personen zu finden. Ein interessanter Befund ist allerdings der Verlust der Autoreaktivität an der N-terminalen Stabdomäne von CXCR3 bei Patienten mit SSc (Riemekasten et al. 2011).

Es gibt Autoantikörper gegen GPCRs, welche sich als funktionell aktiv erwiesen haben (Riemekasten et al. 2011, Riemekasten und Cabral-Marques 2016, Berger und Steen 2017, Cabral-Marques und Riemekasten 2017, Weigold et al. 2018). Es ist möglich, dass dies von physiologischer Bedeutung ist. Daher erscheint es sinnvoll die fehlenden Autoantikörper gegen CXCR3 und andere GPCRs durch intravenöse Immunglobuline zu ersetzen, obwohl es nur begrenzte Hinweise auf eine positive Wirkung von intravenösen Immunglobulinen bei SSc gibt (Baleva und Nikolov 2011).

Abschließend konnten wir zeigen, dass Autoantikörper gegen CXCR3 in SSc-Patientenseren ein anderes Bindungsmuster als gesunde Kontrollseren mit erhöhter Bindung an intrazelluläre Epitope und Verlust der Bindung an die extrazelluläre N-terminale Stabdomäne aufweisen. Die Ergebnisse werden durch die *in silico* Vorhersage von linearen Epitopen auf CXCR3 unterstützt. Basierend auf unseren Ergebnissen konnten wir ein neuartiges ELISA-Konzept entwickeln, das für die Überwachung von SSc-Patienten hilfreich sein könnte. Dieses neuartige ELISA-Konzept könnte vielversprechend für die Entwicklung von diagnostischen Instrumenten sein, die eine genauere Prognose der Verschlechterung der Lungenfunktion, des pulmonalen Hypertonus oder der Niereninsuffizienz ermöglichen und somit helfen die optimale Behandlung für Patienten mit SSc zu wählen.

### 4.3 Klinische Relevanz und Ausblick

Sollte es in der Zukunft gelingen die rekombinanten Antikörper mittels *Phage Display*-Technik herzustellen, könnten deren Eigenschaften und Effekte genauer analysiert werden. Möglicherweise könnten sie zu neuen diagnostischen Methoden führen, um pathogenetische Antikörper zu detektieren. Auch der Einsatz in Experimenten, zum Beispiel *in vivo*-Mausmodellen, wäre denkbar. Außerdem wäre die Entwicklung kleiner Moleküle, welche die Effekte der Autoantikörper inhibieren, möglich. Und somit wäre der Einsatz als biologischer Arzneistoff denkbar. In den letzten drei Jahrzehnten haben monoklonale Antikörper einen dramatischen Wandel von wissenschaftlichen Werkzeugen zu leistungsstarken menschlichen Therapeutika vollzogen. Derzeit werden in den USA und Europa zunehmend therapeutische monoklonale Antikörper in verschiedenen Indikationen vermarktet, wobei allein in den USA der Umsatz im Jahr 2010 rund 18,5 Milliarden US-Dollar erreichte (Buss et al. 2012). Die Einführung einer solchen effektiven Behandlung der SSc könnte zu einer wesentlichen Prognoseverbesserung der Patienten führen.

Die Epitopkartierung hat zu der Entwicklung eines neuartigen ELISA-Konzeptes geführt. Die Identifizierung relevanter prädiktiver Biomarker könnte helfen die Prognose der Patienten besser beurteilen zu können. Dies ist wichtig um eventuelle Kandidaten für ein spezifisches Management zu detektieren und so eventuelle präventive therapeutische Strategien zu ermöglichen.

## 5 Zusammenfassung

SSc ist eine ernste Autoimmunkrankheit mit einer ausgeprägten Morbidität und Mortalität. Die Seren von SSc-Patienten enthalten eine große Vielfalt an Autoantikörpern. Unter diesen sind funktionell aktive Autoantikörper, welche an GPCRs binden. Sie binden unter anderem an AT1R, ETAR, CXCR3 und CXCR4. Die Autoantikörper gegen GPCRs bewirken eine funktionelle Aktivität über Stimulation oder Inhibition der Rezeptorsignalwege. Die spezielle funktionelle Aktivität hängt auch von der Bindungsposition ab.

AT1R und ETAR werden sowohl auf Zellen des Gefäß- als auch des Immunsystems exprimiert. Das Binden von stimulierenden Antikörpern an AT1R und ETAR kann multiple zelluläre und systemische Geschehen triggern. Unter anderem kommt es zur Produktion von TGF- $\beta$ , IL-6, IL-8, Pai-1, CCL18, Kollagen, ROS, und Wachstumsfaktoren und zur Induktion von Wundheilung, Chemotaxis, Zellmigration, Proliferation, Chronotropie, Angiogenese, Thrombose und Fibrose. IL-8 kann während entzündlichen Zuständen zu Gewebeschäden führen. TGF- $\beta$  trägt zur Fibrose, welche im Rahmen der SSc zu sehen ist, bei. Die Generierung von funktionellen monoklonalen Antikörpern gegen AT1R und ETAR sowie gegen andere GPCRs ist ein bisher ungelöstes Problem.

Aufgrund der hohen Relevanz der Antikörper gegen AT1R und ETAR sollten in dieser Arbeit rekombinante Antikörper gegen sie hergestellt werden. Es wurde eine Bibliothek an *scFv* aus der Gesamt-RNA der Patienten mit SSc konstruiert. Aus dieser Bibliothek sollten mittels *Phage Display*-Technik *scFv* gegen ETAR und AT1R selektiert werden. Es kam zu vielen Problemen, sowohl aufgrund ungeeigneter Räumlichkeiten, als auch Materialien. Das Ziel der Herstellung rekombinanter Antikörper konnte nicht erreicht werden. Sollte es noch gelingen die rekombinanten Antikörper mittels *Phage Display*-Technik herzustellen, könnte dies zu einer wesentlichen Verbesserung der Therapie und Diagnostik der SSc führen.

Weitere funktionell aktive Autoantikörper, welche genauer charakterisiert werden sollten, waren Antikörper gegen CXCR3. Autoantikörper gegen den N-Terminus der Rezeptoren CXCR3 und CXCR4 waren in einer zuvorigen Studie mit einer langsameren Progression der SSc, insbesondere der Verschlechterung der Lungenfunktion, verbunden. In einer Epitopkartierung sollten die Angriffspunkte der Antikörper an CXCR3 evaluiert werden. Um die Epitope auf dem CXCR3 zu identifizieren, welche von Autoantikörpern der SSc-Patienten angegriffen werden, wurden 36 überlappende 18-20mer Peptide, welche zusammen die komplette CXCR3 Sequenz abdecken, bestellt. Durch diese wurde die

Epitopspezifität von SSc-Patientenseren (N=32, mit bekannten Auto-AK gegen CXCR3) und gesunden Kontrollen (N=30) verglichen. Das Bindungsverhalten von SSc-Patientenseren und Kontrollseren zu diesen Peptiden wurde mittels ELISA bestimmt.

Zur Auswertung wurde eine bayesische Statistik verwendet. Es wurde eine verstärkte Bindung der SSc-Patientenseren an Peptide, welche intrazellulären Epitopen des CXCR3 entsprechen, festgestellt. Die Bindung an extrazelluläre Bereiche war hingegen reduziert. Die experimentell bestimmten Epitope zeigten eine gute Korrespondenz zu den durch *ABCpred* vorhergesagten Epitopen.

Um diese Ergebnisse zu überprüfen und sie in einen neuen diagnostischen ELISA zu übersetzen, wurden die Peptide, die SSc-assoziierten Arealen entsprachen, in einem einzigen ELISA kombiniert und sein Potential, SSc-Patienten (N=31) von normalen gesunden Kontrollen (N=47) zu unterscheiden, evaluiert. Dieser ELISA hatte eine Sensitivität von 0,61 und eine Spezifität von 0,85. Unsere Daten zeigen, dass SSc-Seren preferentiell intrazelluläre Epitope von CXCR3 binden, während extrazelluläre Epitope im N-Terminus, welche die Targets in gesunden Individuen zu sein scheinen, nicht von SSc-Seren gebunden werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen, konnte ein neues ELISA Konzept konstruiert werden, welches hilfreich sein könnte die Krankheitsprognose von SSc-Patienten zu kontrollieren.

## 6 Literaturverzeichnis

Abraham, D., R. Vancheeswaran, M. Dashwood, V. Rajkumar, P. Pantelides, S. Xu, d. B. RM and C. Black (1997). "Increased levels of endothelin-1 and differential endothelin type A and B receptor expression in scleroderma-associated fibrotic lung disease." American journal of pathology **151**(3): 831-841.

Alarcón-Segovia, D., L. Llorente and A. Ruíz-Argüelles (1996). "The penetration of autoantibodies into cells may induce tolerance to self by apoptosis of autoreactive lymphocytes and cause autoimmune disease by dysregulation and/or cell damage." Journal of Autoimmunity **9**(2): 295-300.

Andris-Widhopf, J., C. Rader, P. Steinberger, R. Fuller and C. Barbas (2000). "Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display." Journal of Immunological Methods **242**(1-2): 159-181.

Andris-Widhopf, J., C. Rader, P. Steinberger, R. Fuller and C. Barbas (2000). "Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display." Journal of Immunological Methods: 159-181.

Antibody Design Laboratories (2018). "gekaufte Phagenbibliothek." Aufgerufen am 29.08.2018, von <http://www.abdesignlabs.com/services/immunized-libraries/>.

Avouac, J., G. Riemekasten, C. Meune, B. Ruiz, A. Kahan and Y. Allanore (2015). "Autoantibodies against Endothelin 1 Type A Receptor Are Strong Predictors of Digital Ulcers in Systemic Sclerosis." The Journal of rheumatology: 1801-1807.

Avrameas, A., T. Ternynck, F. Nato, G. Buttin and S. Avrameas (1998). "Polyreactive anti-DNA monoclonal antibodies and a derived peptide as vectors for the intracytoplasmic and intranuclear translocation of macromolecules." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(10): 5601-5606.

Baldi, P., S. Brunak, Y. Chauvin, C. Andersen and H. Nielsen (2000). "Assessing the accuracy of prediction algorithms for classification: an overview." Bioinformatics (Oxford, England): 412-424.

Baleva, M. and K. Nikolov (2011). "The role of intravenous immunoglobulin preparations in the treatment of systemic sclerosis." International journal of rheumatology **2011**: 829751.

Banik, S. and B. Doranz (2010). "Mapping Complex Antibody Epitopes." Aufgerufen am 06.09.2018, von <https://www.genengnews.com/gen-articles/mapping-complex-antibody-epitopes/3161/>.

Barbas, C., D. Burton, J. Scott and G. Silverman (2001). Phage Display: A Laboratory

Bauer, M., H. Wilkens, F. Langer, S. Schneider, H. Lausberg and H. Schäfers (2002). "Selective Upregulation of Endothelin B Receptor Gene Expression in Severe Pulmonary Hypertension." Circulation **105**(9): 1034-1036.

Bazan, J., I. Całkosiński and A. Gamian (2012). "Phage display-A powerful technique for immunotherapy." Human Vaccines & Immunotherapeutics **12**(8): 1817-1828.

Berger, M. and V. Steen (2017). "Role of anti-receptor autoantibodies in pathophysiology of scleroderma." **16**(10): 1029-1035.

Bjarnadóttir, T., D. Gloriam, S. Hellstrand, H. Kristiansson, R. Fredriksson and H. Schiöth (2006). "Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse." Genomics **88**(3): 263-273.

Böcker, W., H. Denk, P. Heitz, G. Höfler, H. Kreipe and H. Moch (2012). Pathologie. 5. Auflage. München, URBAN & FISCHER.

Boughorbel, S., F. Jarray and M. El-Anbari (2017). "Optimal classifier for imbalanced data using Matthews Correlation Coefficient metric." PLOS ONE: e0177678.

Buss, N., S. Henderson, M. McFarlane, J. Shenton and L. De Haan (2012). "Monoclonal antibody therapeutics: History and future." Current Opinion in Pharmacology: 615-622.

Cabral-Marques, O. and G. Riemekasten (2016). "Reviews Vascular hypothesis revisited : Role of stimulating antibodies against angiotensin and endothelin receptors in the pathogenesis of systemic sclerosis." Autoimmunity Reviews **15**: 690-694.

Cabral-Marques, O. and G. Riemekasten (2017). "Functional autoantibodies targeting G protein-coupled receptors in rheumatic diseases." Nature Reviews Rheumatology **13**(11): 648-656.

Carl, P., B. Temple and P. Cohen (2005). "Most nuclear systemic autoantigens are extremely disordered proteins: implications for the etiology of systemic autoimmunity." Arthritis research & therapy **7**(6).

Coates, J. (2006). "Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids." Encyclopedia of analytical chemistry: 10815-10837.

Desbois, A. and P. Cacoub (2016). "Systemic sclerosis: An update in 2016." Autoimmunity Reviews **15**: 417-426.

Domsic, R. (2014). "Scleroderma: the role of serum autoantibodies in defining specific clinical phenotypes and organ system involvement." Current Opinion in Rheumatology **26**(6): 646–652.

- Dragun, D. (2013). "The Detection of Antibodies to the Angiotensin II-Type 1 Receptor in Transplantation." Methods Molecular Biology **1034**: 331-333.
- Dragun, D., D. Müller, J. Bräsen, L. Fritsche, M. Nieminen-Kelhä, R. Dechend, U. Kintscher, B. Rudolph, J. Hoebeke, D. Eckert, I. Mazak, R. Plehm, C. Schönemann, T. Unger, K. Budde, H.-H. Neumayer, F. Luft and G. Wallukat (2005). "Angiotensin II Type 1–Receptor Activating Antibodies in Renal-Allograft Rejection." New England Journal of Medicine **352**(6): 558-569.
- Dresow, S., C. Sitaru, A. Recke, G. Oostingh, D. Zillikens and B. Gibbs (2009). "IgE autoantibodies against the intracellular domain of BP180." British Journal of Dermatology **160**(2): 429-432.
- Dworschak, J., A. Recke, M. Freitag, R. Ludwig, J. Langenhan, O. Kreuzer, D. Zillikens and E. Schmidt (2012). "Mapping of B cell epitopes on desmoglein 3 in pemphigus vulgaris patients by the use of overlapping peptides." Journal of Dermatological Science **65**(2): 102-109.
- EMBOSS explorer (2018). "Antigenic." Aufgerufen am 09.02.2018, von <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/antigenic>.
- EnsemblOrg (2018). "AT1R Homologie." Aufgerufen am 20.08.2018, von [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Comparative/Ortholog/Alignment?db=core;g=ENSG0000144891;r=3:148697784-148743008](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Comparative/Ortholog/Alignment?db=core;g=ENSG0000144891;r=3:148697784-148743008).
- Flanagan, N. (2011). "Mapping Epitopes with H/D-Ex Mass Spec: ExSAR Expands Repertoire of Technology Platform Beyond Protein Characterization." Aufgerufen am 06.09.2018, von <https://www.genengnews.com/gen-articles/mapping-epitopes-with-h-d-ex-mass-spec/3663>.
- Forsström, B., B. Bisławska Axnäs, J. Rockberg, H. Danielsson, A. Bohlin and M. Uhlen (2015). "Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes." PLOS ONE **10**(3): e0121673.
- Fredriksson, R., M. Lagerström, L.-G. Lundin and H. Schiöth (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." Molecular Pharmacology **63**(6): 1256-1272.
- Frei, J. and J. Lai (2016). "Protein and Antibody Engineering by Phage Display." Methods in enzymology: 45-87.
- Fujii, H., M. Hasegawa, K. Takehara, N. Mukaida and S. Sato (2002). "Abnormal expression of intracellular cytokines and chemokine receptors in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic sclerosis." Clinical and experimental immunology: 548-556.
- Gershoni, J., A. Roitburd-Berman, D. Siman-Tov, N. Freund and Y. Weiss (2007). "Epitope mapping: The first step in developing epitope-based vaccines." BioDrugs: 145-156.

Goodnow, C., J. Sprent, B. Groth and C. Vinuesa (2005). "Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity." Nature **435**: 590–597.

Greenlee, J., S. Clawson, K. Hill, B. Wood, S. Clardy, I. Tsunoda and N. Carlson (2015). "Anti-Yo Antibody Uptake and Interaction with Its Intracellular Target Antigen Causes Purkinje Cell Death in Rat Cerebellar Slice Cultures: A Possible Mechanism for Paraneoplastic Cerebellar Degeneration in Humans with Gynecological or Breast Cancers." PLOS ONE: e0123446.

Günther, J., A. Kill, M. Becker, H. Heidecke, J. Rademacher, E. Siegert, M. Radić, G.-R. Burmester, D. Dragun and G. Riemekasten (2014). "Angiotensin receptor type 1 and endothelin receptor type A on immune cells mediate migration and the expression of IL-8 and CCL18 when stimulated by autoantibodies from systemic sclerosis patients." Arthritis research & therapy: 1-14.

Günther, J., J. Rademacher, J. van Laar, E. Siegert and G. Riemekasten (2015). "Functional autoantibodies in systemic sclerosis." Seminars in Immunopathology: 529-542.

Hammers, C. and J. Stanley (2014). "Antibody phage display: technique and applications." The Journal of investigative dermatology: 1-5.

Hauk, A. (2013). "Die Dot-Blot-Technik." BIOLOGIE IN UNSERER ZEIT **43**(1): 20-20.

Heitner, T., A. Moor, J. Garrison, C. Marks, T. Hasan and J. Marks (2001). "Selection of cell binding and internalizing epidermal growth factor receptor antibodies from a phage display library." Journal of Immunological Methods: 17-30.

Henderson, J., S. Bhattacharyya, J. Varga and S. O'Reilly (2018). "Targeting TLRs and the inflammasome in systemic sclerosis." Pharmacology & Therapeutics.

Herold, G. (2014). Innere Medizin. Köln.

Herrero-González, J., J. Mascaró, C. Herrero, A. Dilling, D. Zillikens and C. Sitaru (2006). "Autoantibodies From Patients With BSLE Inducing Recruitment of Leukocytes to the Dermoepidermal Junction and Subepidermal Splits in Cryosections of Human Skin." Archives of Dermatology **142**(11): 1508.

Holliger, P., T. Prospero and G. Winter (1993). ""Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: 6444-6448.

Hoogenboom, H. (2005). "Selecting and screening recombinant antibody libraries." Nature Biotechnology: 1105-1116.

Horn-Lohrens, O., M. Tiemann, H. Lange, J. Kobarg, M. Hafner, H. Hansen, W. Sterry, R. Parwaresch and H. Lemke (1995). "Shedding of the soluble form of CD30 from the Hodgkin-analogous cell line L540 is strongly inhibited by a new CD30-specific antibody (Ki-4)." International Journal of Cancer **60**(4): 539-544.

Jiang, D., J. Liang, J. Hodge, B. Lu, Z. Zhu, S. Yu, J. Fan, Y. Gao, Z. Yin, R. Homer, C. Gerard and P. Noble (2004). "Regulation of pulmonary fibrosis by chemokine receptor CXCR3." The Journal of clinical investigation: 291-299.

Kamel, R., P. Eftekhari, S. Garcia, M. Berthouze, I. Berque-Bestel, J. Peter, F. Lezoualc'h and J. Hoebeke (2005). "A high-affinity monoclonal antibody with functional activity against the 5-hydroxytryptaminergic (5-HT4) receptor." Biochemical Pharmacology **70**(7): 1009-1018.

Kampylafka, E., J. Routsias, H. Alexopoulos, M. Dalakas, H. Moutsopoulos and A. Tzioufas (2011). "Fine specificity of antibodies against AQP4: epitope mapping reveals intracellular epitopes." Journal of Autoimmunity **36**(3-4): 221-227.

Keogh, A., G. Strange, K. McNeil, T. Williams, E. Gabbay, S. Proudman, R. Weintraub and D. B. Wlodarczyk J (2011). "The Bosentan Patient Registry: long-term survival in pulmonary arterial hypertension." Internal medicine journal **41**(3): 227-234.

Kill, A., C. Tabeling, R. Undeutsch, A. Kühl, J. Günther, M. Radic, M. Becker, H. Heidecke, M. Worm, M. Witzernath, G.-R. Burmester, D. Dragun and G. Riemekasten (2014). "Autoantibodies to angiotensin and endothelin receptors in systemic sclerosis induce cellular and systemic events associated with disease pathogenesis." Arthritis research & therapy: R29.

Klein-Weigel, P., C. Opitz and G. Riemekasten (2011). "Systemic sclerosis - a systematic overview: part 1 - disease characteristics and classification, pathophysiologic concepts, and recommendations for diagnosis and surveillance." VASA Zeitschrift für Gefässkrankheiten **40**(1): 6-19.

Koch, K.-R. (2000). Einführung in die Bayes-Statistik, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Kolaskar, A. and P. Tongaonkar (1990). "A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens." FEBS Letters **276**(1-2): 172-174.

Kovács, L., I. Marczinovits, A. György, G. Tóth, L. Dorgai, J. Pál, J. Molnár and G. Pokorny (2005). "Clinical associations of autoantibodies to human muscarinic acetylcholine receptor 3213–228 in primary Sjögren's syndrome." Rheumatology: 1021-1025.

Kyte, J. and R. Doolittle (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." Journal of Molecular Biology: 105-132.

- Lacotte, S., S. Brun, S. Muller and H. Ene Dumortier (2009). "CXCR3, Inflammation, and Autoimmune Diseases." Annals of the New York Academy of Sciences **1173**(1): 310-317.
- Lawrence, R., C. Helmick, F. Arnett, R. Deyo, D. Felson, E. Giannini, S. Heyse, R. Hirsch, M. Hochberg, G. Hunder, M. Liang, S. Pillemer, V. Steen and F. Wolfe (2004). "Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States." Arthritis & Rheumatology **41**(5): 778-799.
- Lerner, A., P. Jeremias and T. Matthias (2015). "The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing." International Journal of Celiac Disease: 151-155.
- Loebel, M., P. Grabowski, H. Heidecke, S. Bauer, L. Hanitsch, K. Wittke, C. Meisel, P. Reinke, H.-D. Volk, Ø. Fluge, O. Mella and C. Scheibenbogen (2016). "Antibodies to  $\beta$  adrenergic and muscarinic cholinergic receptors in patients with Chronic Fatigue Syndrome." Brain, Behavior, and Immunity: 32-39.
- Martins, T., D. Simpson, F. Lindgren and H. Rue (2013). "Bayesian computing with INLA: new features." Computational Statistics & Data Analysis: 68-83.
- Mayes, M. (2003). "Scleroderma epidemiology." Rheumatic Disease Clinics of North America **29**(2): 239-254.
- McLaughlin, V. (2006). "Survival in patients with pulmonary arterial hypertension treated with first-line bosentan." European journal of clinical investigation **36**(s3): 10–15.
- Mülhardt, C. (2013). Die Reinigung von Nucleinsäuren. Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics. Heidelberg, Springer-Verlag Berlin. **303**: 27-35.
- Muller, S., Y. Zhao, T. Brown, A. Morgan and H. Kohler (2005). "TransMabs: cell-penetrating antibodies, the next generation." Expert Opinion on Biological Therapy **5**(2): 237-241.
- Mullis, K. and F. Faloona (1987). "Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction." 335-350.
- Murphy, K. and C. Weaver (2018). Janeway Immunologie. Berlin, Springer-Verlag GmbH Deutschland.
- Naeim, F., N. RP, S. Song and W. Grody (2013). "Atlas of Hematopathology." 55-68.
- Pandey, S. (2010). "HYBRIDOMA TECHNOLOGY FOR PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES." International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research: 88-94.

- R Team, C. (2012). Team RDC.R: A Language And Environment For Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Rader, C., G. Ritter, S. Nathan, M. Elia, I. Gout, A. Jungbluth, L. Cohen, S. Welt, L. Old and C. Barbas (2000). "The rabbit antibody repertoire as a novel source for the generation of therapeutic human antibodies." The Journal of biological chemistry: 13668-13676.
- Raghava, G. (2006). "ABCpred." Aufgerufen am 10.09.2018, von <http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/>.
- Recke, A., A.-K. Regensburger, F. Weigold, A. Müller, H. Heidecke, G. Marschner, C. Hammers, R. Ludwig and G. Riemekasten (2018). "Peptide-Based Epitope Mapping Indicates Increased Binding to Cytoplasmic Domains of CXCR3." Frontiers in Immunology **428**.
- Recke, A., G. Vidarsson, R. Ludwig, M. Freitag, S. Möller, R. Vonthein, J. Schellenberger, O. Haase, S. Görg, A. Nebel, F. Flachsbart, S. Schreiber, W. Lieb, R. Gläser, S. Benoit, M. Sárdy, R. Eming, M. Hertl, D. Zillikens, I. König, E. Schmidt and S. Ibrahim (2015). "Allelic and copy-number variations of FcγRs affect granulocyte function and susceptibility for autoimmune blistering diseases." Journal of Autoimmunity: 36-44.
- Riemekasten, G. and O. Cabral-Marques (2016). "Antibodies against angiotensin II type 1 receptor (AT1R) and endothelin receptor type A (ETAR) in systemic sclerosis (SSc)-response." Autoimmunity Reviews **15**(9): 935.
- Riemekasten, G., A. Philippe, M. Näther, T. Slowinski, D. Müller, H. Heidecke, M. Matucci-Cerinic, L. Czirják, I. Lukitsch, M. Becker, A. Kill, J. van Laar, R. Catar, F. Luft, G. Burmester, B. Hegner and D. Dragun (2011). "Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis." Annals of the Rheumatic Diseases **70**(3): 530-536.
- Rosenbaum, D., S. Rasmussen and B. Kobilka (2009). "The structure and function of G-protein-coupled receptors." Nature **459**: 356–363.
- Rue, H. (2009). "The R-INLA project." Aufgerufen am 25.9.2017, von <http://www.r-inla.org/>
- Rue, H., S. Martino and N. Chopin (2009). "Approximate Bayesian inference for latent Gaussian models by using integrated nested Laplace approximations." Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology): 319-392.
- Saha, S. and G. Raghava (2006). "Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics: 40-48.
- Scofield, R. (2004). "Autoantibodies as predictors of disease." The Lancet **363**(9420): 1544-1546.

Shetty, N. and C. Derk (2011). "Endothelin Receptor Antagonists as Disease Modifiers in Systemic Sclerosis." Inflammation & Allergy **10**(1): 19-26.

Shimizu, S., T. Yoshinouchi, T. Niimi, Y. Ohtsuki, J. Fujita, H. Maeda, S. Sato, I. Yamadori, T. Eimoto and R. Ueda (2007). "Differing distributions of CXCR3- and CCR4-positive cells among types of interstitial pneumonia associated with collagen vascular diseases." Virchows Archiv: 51-58.

Smith, G. (1985). "Filamentous phage fusion: novel expression vectors that display cloned antigens on the surface of the virion." Science: 1315-1317.

Tacke, F., H. Zimmermann, M.-L. Berres, C. Trautwein and H. Wasmuth (2011). "Serum chemokine receptor CXCR3 ligands are associated with progression, organ dysfunction and complications of chronic liver diseases." Liver International **31**(6): 840-849.

The R Foundation (2012). "The R Project for Statistical Computing." Aufgerufen am 25.09.2017, von <http://www.r-project.org/>.

Thermo Scientific (2014). "Phire Hot Start II DNA Polymerase." Aufgerufen am 29.08.2018, von <https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-molecular-biology-products/phire.html>.

Thermo Scientific (2014). "Phusion and Phire DNA Polymerases."

Thermo Scientific (2015). "GeneJET Gel Extraction Kit."

UNIPROT (2018). "CXCR3\_HUMAN." Aufgerufen am 25.09.2017, von [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org).

Van den Hoogen, F., D. Khanna, J. Fransen, S. Johnson, M. Baron, A. Tyndall, M. Matucci-Cerinic, R. Naden, T. Medsger, P. Carreira, G. Riemekasten, P. Clements, C. Denton, O. Distler, Y. Allanore, D. Furst, A. Gabrielli, M. Mayes, J. van Laar, J. Seibold, L. Czirjak, V. Steen, M. Inanc, O. Kowal-Bielecka, U. Müller-Ladner, G. Valentini, D. Veale, M. Vonk, U. Walker, L. Chung, D. Collier, M. Ellen Csuka, B. Fessler, S. Guiducci, A. Herrick, V. Hsu, S. Jimenez, B. Kahaleh, P. Merkel, S. Sierakowski, R. Silver, R. Simms, J. Varga and J. Pope (2013). "2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative." Arthritis & Rheumatology **65**(11): 2737-2747.

Vancheeswaran, R., T. Magoulas, G. Efrat, C. Wheeler-Jones, I. Olsen, R. Penny and C. Black (1994). "Circulating endothelin-1 levels in systemic sclerosis subsets--a marker of fibrosis or vascular dysfunction?" The Journal of rheumatology **21**(10): 1838-1844.

Vassilatis, D., J. Hohmann, H. Zeng, F. Li, J. Ranchalis, M. Mortrud, A. Brown, S. Rodriguez, J. Weller, A. Wright, J. Bergmann and G. Gaitanaris (2003). "The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(8): 4903-4908.

Venter, J., C. Fraser and L. Harrison (1980). "Autoantibodies to  $\alpha_2$ -Adrenergic Receptors: A Possible Cause of

Adrenergic Hyporesponsiveness in Allergic Rhinitis and Asthma." Science **207**(4437): 1361-1363.

Vlahakos, D., M. Foster, A. Ucci, K. Barrett, S. Datta and M. Madaio (1992). "Murine monoclonal anti-DNA antibodies penetrate cells, bind to nuclei, and induce glomerular proliferation and proteinuria in vivo." Journal of the American Society of Nephrology: 1345-1354.

Wallukat, G. and I. Schimke (2014). "Agonistic autoantibodies directed against G-protein-coupled receptors and their relationship to cardiovascular diseases." Seminars in Immunopathology **36**(3): 351-363.

Weigold, F., J. Günther, M. Pfeiffenberger, O. Cabral-Marques, E. Siegert, D. Dragun, A. Philippe, A.-K. Regensburger, A. Recke, S. Yu, F. Petersen, R. Catar, R. Biesen, F. Hiepe, G. Burmester, H. Heidecke and G. Riemekasten (2018). "Antibodies against chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 predict progressive deterioration of lung function in patients with systemic sclerosis." Arthritis research & therapy **20**(1): 52.

Westwood, O. and F. Hay (2001). Epitope Mapping: A Practical Approach. Oxford, Oxford University Press.

Wikimedia (2018). Cartoon of an antibody. Yohan.

Xia, Y. and R. Kellems (2013). "Angiotensin receptor agonistic autoantibodies and hypertension: preeclampsia and beyond." Circulation research **113**(1): 78-87.

Xiao, X., P. Wang and K.-C. Chou (2009). "GPCR-CA: A cellular automaton image approach for predicting G-protein-coupled receptor functional classes." Journal of Computational Chemistry **30**(9): 1414-1423.

## 7 Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei meinem Mentor und Doktorvater Herr PD Dr. med. Andreas Recke, für die enge Betreuung und die Möglichkeit an dieser Thematik zu arbeiten, bedanken. Zudem möchte ich Herrn Dr. med. Christoph Hammers für das kritische Korrekturlesen meiner Doktorarbeit danken.

Von ganzem Herzen danke ich auch Miriam Freitag, Claudia Kauderer und all den anderen lieben Leuten im Labor für die Hilfe bei den Laborarbeiten und die wundervolle Zeit. Außerdem möchte ich Laura Sendrowski und Katharina Schluze Dieckhoff erwähnen, welche wesentlich dazu beigetragen haben, dass ich immer gerne ins Labor gegangen bin.

Ein weiterer Dank gilt Carla Dapper, Anna Berg und Clara Röhl, welche mir die Zeit des Schreibens sehr verschönt haben. Eure Unterstützung weiß ich sehr zu schätzen. Vielen Dank für die gemeinsamen Tage!

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich aus tiefstem Herzen, dass sie einfach immer da sind und mich in allem unterstützen.

## 8 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken wörtlich oder sinngemäß entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere weiterhin, dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen hat.

Würzburg, den 29.08.2019

---

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Vor / Nachname Ann-Katrin Regensburger  
 Geboren 14.05.1992 in Fürth  
 Staatsangehörigkeit deutsch



### Schulbildung und Studium:

Zeitraum	Tätigkeit/Institut
WS 2013 – SS 2018	Studium der Humanmedizin; Universität zu Lübeck 2. Staatsexamen 2017, Note: gut (2,0) 3. Staatsexamen 2018, Note: sehr gut (1,0)
WS 2015	Freisemester für GRK1710 geförderte Doktorarbeit, Titel: „Charakterisierung funktioneller Autoantikörper gegen G-Protein gekoppelte Rezeptoren bei Patienten mit systemischer Sklerodermie“; Universität zu Lübeck
WS 2014	Studium der Humanmedizin; Universität Bari (Italien)
WS 2011 – SS 2013	Studium der Humanmedizin; Universität Ulm 1. Staatsexamen 2013, Note: sehr gut (1,5)
Sep. 2002 – Mai 2011	Ostendorfer-Gymnasium; Neumarkt i.d.Opf. Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Note 1,4 Leistungskurse: Mathematik & Kunst
Sep. 1998 – Juli 2002	Grundschule Holzheim

### Klinische Erfahrung:

Zeitraum	Tätigkeit/Institut
Seit 11/2019	Assistenzärztin an der Augenklinik und Poliklinik Würzburg
12/2017-03/2018	PJ Chirurgie, Sana Klinik Lübeck
09-12/2017	PJ Innere Medizin, Universitätsklinikum Lübeck
05-09/2017	PJ Augenheilkunde, Universitätsklinikum Würzburg

11/2016	Hospitation Radiologie, UKS-H, Lübeck
10/2016	Hospitation Augenheilkunde, UKS-H, Lübeck
09-10/2016	Famulatur Anästhesie, HELIOS Ostseeklinik Damp GmbH, Ostseebad Damp
02-03/2016	Famulatur Dermatologie, UKS-H, Lübeck
02-03/2015	Famulatur Innere Medizin, Klinikum Neumarkt
02-03/2014	Famulatur Kinder- und Jugendmedizin, Praxis Dr. med. Harald Lodes und Kollegen, Neumarkt i.d.Opf.

### **Publikationen:**

Recke, A., A.-K. Regensburger, F. Weigold, A. Müller, H. Heidecke, G. Marschner, C. M. Hammers, R. J. Ludwig, G. Riemekasten (2018). "Peptide-Based Epitope Mapping Indicates Increased Binding to Cytoplasmic Domains of CXCR3." Frontiers in Immunology: 428.

Weigold, F., J. Günther, M. Pfeiffenberger, O. Cabral-Marques, E. Siegert, D. Dragun, A. Philippe, A.-K. Regensburger, A. Recke, S. Yu, F. Petersen, R. Catar, R. Biesen, F. Hiepe, G. Burmester, H. Heidecke and G. Riemekasten (2018). "Antibodies against chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 predict progressive deterioration of lung function in patients with systemic sclerosis." Arthritis research & therapy: 52.

Travel Grant: "Autoantibodies in serum of systemic scleroderma patients: peptide-based epitope mapping indicates increased binding to cytoplasmic domains of CXCR3." 2nd Symposium on Regulatory Autoantibodies Targeting G-Protein-Coupled Receptors; Lübeck, 2018 Sept 28-30

# 10 Anhänge

## 10.1 Materialien

### 10.1.1 Verwendete Kits

Name des Kits	Anbieter
Cloned AMV First Strand cDNA Synthesis Kit	Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
dNTP Mix, 2 mM each	Fermentas/Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Gene JET Gel Extraktion kit	Thermo Scientific/Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Gene JET PCR Purification kit	Fermentas/Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific/Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland
RNase-Free DNase Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Mini Prep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

### 10.1.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Anbieter
Anti Angiotensin II Receptor 1 (AT1R) IgG1 Antibody ELISA Assay Kit	Eagle Biosciences, Inc., Columbia, USA
Anti Endothelin Receptor A (ETAR) IgG1 Antibody ELISA Assay Kit	Eagle Biosciences, Inc., Columbia, USA
Elektroporationsküvette 2mm	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
ELISA-Tips: 2-200 µl; 20-300 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Streptavidin-beschichteten 96-Well-Platten <i>Immobilizer Streptavidin F96 Clear</i>	Thermo Fisher Scientific p/a Nunc, Langenselbold, Deutschland
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-Well Mikrotiterplatten/ <i>Mikrotiterplatten 96-Well, U-Boden</i>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Nitrocellulosemembran	Whatman, Dassel, Deutschland
Pipetten, serologisch 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Großkulturplatten (steril,	Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich/Merck KGaA,

unbehandelt) <i>Corning square bioassay dishes CLS431301</i>	Darmstadt, Deutschland
Skalpellsklingen	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Sterilin™ 90 mm – Standardpetrischalen	Thermo Scientific/Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Sterilfilter 0.2 µm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
1.5ml/2.0ml/15ml/50ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Wägebapier (MN 226, 90x115mm)	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
96-Well-Platte <i>96 Multiply 23 PCR-Platte</i>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Whatman-Filterpapier	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Zentrifugenflaschen aus Polypropylen 500 ml	Beckman Coulter, Inc., Indianapolis, USA

### 10.1.3 Verwendete Laborgeräte

Name des Geräts	Anbieter
Autoklav	WEBECO matachana group, Selmsdorf, Deutschland
Dot Blotter <i>SRC 96 D Minifold</i>	Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland
DURAN® Erlenmeyerkolben 1000 ml	DWK Life Sciences GmbH, Mainz, Deutschland
Elektrophoresekammer <i>Mini SUB Cell GT</i>	Bio Rad, München, Deutschland
Elektrophorese-Netzgerät <i>PEQPOWER 250</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
<i>Easyject Optima EquiBio Elektroporator</i>	Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA
Elektronische Analysenwaage <i>Analytical Plus</i>	OHAUS, Greifensee, Schweiz
ELISA-Plattenleser <i>VICTOR 3™</i>	PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA
Eppendorf Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Große Tischzentrifuge <i>Centrifuge 5804 R</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kleine Tischzentrifuge <i>Centrifuge 5415 C</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlraum (4°C)	Viessmann, Allendorf, Deutschland
Kühltruhe (-20°C)	Liebherr International AG, Bulle, Schweiz
Kühltruhe <i>Ultra Low Temperature Freezer</i>	New Brunswick Scientific, Edison, USA

Kühlschrank (4°C)	Liebherr International AG, Bulle, Schweiz
Mikrozentrifuge <i>MicroStar 17R</i>	VWR, Radnor, USA
Miniinkubator <i>B15 COMPACT INCUBATOR</i>	Heraeus, Hanau, Deutschland
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spektrophotometer, <i>NanoPhotometer</i>	Implen, München, Deutschland
PCR Cycler <i>Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler</i> <i>C1000 Touch™ Thermal Cycler</i>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland Bio-Rad, München, Deutschland
pH-meter <i>ph526</i>	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Pinzette	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Plattformschüttler <i>Duomax 1030</i>	Heidolph, Kelheim, Deutschland
ELISA-Waschautomat <i>Columbus Pro</i>	TECAN Group AG, Männedorf, Schweiz
Schütteltisch <i>TPM 4</i>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Inkubationsschüttler <i>Certomat IS</i>	B. Braun, Melsungen, Deutschland
<i>Scotsman Flockeneisbereiter AF 20</i>	Kälte-Berlin, Berlin, Deutschland
Spektrophotometer, <i>NanoPhotometer</i>	Implen, München, Deutschland
Stand-Kühlzentrifuge <i>Avanti J-E Centrifuge</i> mit <i>JA 10 Rotor</i>	Beckman Coulter, Inc., Indianapolis, USA
UV-Bank <i>UV-Transiluminator TFX-20 M BRL</i>	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Vortexer <i>Bio-Vortex V1</i> <i>Vortex-Genie 2</i> <i>Reac 2000 Vortex</i>	Hassa-Laborbedarf, Lübeck, Deutschland Scientific Industries, New York, USA Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze, Deutschland
Wasserbad <i>AQUAline AL 5</i>	LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO. KG, Lauda-Königshofen, Baden-Württemberg

Weitere Laborgeräte wurden von Omnilab und VWR erworben.

### 10.1.4 Reagenzien und Chemikalien

Name	Anbieter
ddH <sub>2</sub> O (doppelt destilliertes Wasser)	Fresenius Kabi France, Hamburg, Deutschland
6x DNA-Probenpuffer <i>DNA Gel Loading Dye (6X)</i>	Thermo Scientific/Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, USA
Ethanol 70%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fast Ruler Middle Range DNA ladder	Thermo Scientific/Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, USA
FITC-konjugiertes Streptavidin	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
GelStar® Nucleic Acid Gel Stain	Lonza, Basel, Schweiz
HRP-konjugiertes Streptavidin	Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, USA
LB-Kapseln	MP Biomedicals Europe, Ilkirch, Frankreich
Mass Ruler Low Range DNA Ladder	Thermo Scientific/Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, USA
1-step Turbo™-ELISA	Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, USA

Alle weiteren Chemikalien wurden von Sigma oder Carl-Roth in der Qualität pro analysi beschafft.

### 10.1.5 Verwendete Medien und Lösungen

Alle Medien und Lösungen wurden unter Verwendung von destilliertem H<sub>2</sub>O angesetzt.

Name	Präparation
Carbenicillin	(100 mg/ml): 5 g in 50 ml ddH <sub>2</sub> O lösen
Kanamycin	(50 mg/ml): 2,5 g in 50 ml ddH <sub>2</sub> O lösen
LB-Agar	2 Kapseln LB + 7,5 g Agar auf 500 ml ddH <sub>2</sub> O
LBC-Agar	<u>Kleine Platten:</u> 2 Kapseln LB + 7,5 g Agar auf 500 ml ddH <sub>2</sub> O, +500 µl einer 100 mg/ml Carbenicillinlösung nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf unter 50°C <u>Große Platten:</u> 2 Kapseln LB+ 5g Glucose 7,5 g Agar auf 500 ml ddH <sub>2</sub> O, +500 µl einer 100 mg/ml Carbenicillinlösung nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf unter 50°C
LBK-Agar	2 Kapseln LB + 7,5 g Agar auf 500 ml ddH <sub>2</sub> O, + 500 µl einer 50 mg/ml Kanamycinlösung nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf unter 50°C
LB-Medium	2 Kapseln LB auf 500 ml ddH <sub>2</sub> O
LB-Top-Agar	1 Kapsel LB + 1,75 g Agar auf 250 ml ddH <sub>2</sub> O
Phosphate buffered saline (PBS)	<u>10X PBS:</u> 8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 1.44g/L Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in destilliertem Wasser Endvolumen 1L, pH 7,2

	<u>1X PBS:</u> 100 ml 10X PBS + 900 ml H <sub>2</sub> O
Phosphat buffered saline-Tween (PBS-T)	PBS, pH 7,4 mit 0,05 % Tween-20, pH 7,2
SB-Medium	4 Kapseln SB auf 500 ml ddH <sub>2</sub> O
SOC-Medium	475 ml ddH <sub>2</sub> O + 10 g Trypton + 2,5 g Hefeextrakt + 0,25 g NaCl + 93 mg KCl; Einstellen des pHs mit NaOH
TRIS 1 M	121,1 g Tris base (Tris X) in 700 ml H <sub>2</sub> O, pH 7,4
YT-Medium	1 l ddH <sub>2</sub> O mit 1,6 % Peptone, 1 % Hefeextrakt und 0,5 % NaCl

Alle Agar wurden unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen und bei 4°C aufbewahrt.

### 10.1.6 Antikörper

Antikörpername	Anbieter
<i>Anti-HA-Tag-Antikörper Anti-HA-Biotin, High Affinity (3F10) from rat</i>	Roche, Basel, Schweiz
biotinyliertes Anti-Human-IgG1	Thermo Fisher Scientific, p/a Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Polyclonal rabbit anti-mouse IgG (HRP)	DAKO, Hamburg, Deutschland
Peroxidase-konjugierten polyklonalen Anti-Human-IgG-Antikörper	DAKO, Hamburg, Deutschland

### 10.1.7 Enzyme

Enzymname	Anbieter
FastDigest Sfi1	Thermo Scientific/Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Phire Hot start II DNA-Polymerase	Thermo Scientific/Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Sfi1-RO Roche 1,250 U (10 U/μl)	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland

### 10.1.8 Bakterienstämme

Bakteriename	Anbieter
ER2537 <u>Genotyp:</u> <i>tonA: F' proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup>, Δ(lacZ)M15 / fhuA2 (tonA) Δ(lac-proAB) supE thi-1 Δ(hsdMS-mcrB)5</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
E.coli Novablue <u>Genotyp:</u>	Novagen/Merck, Darmstadt, Deutschland

<i>endA1 hsdR17 (rK12- mK12+) supE44</i> <i>thi1recA1 gyrA96 relA1 lac</i> <i>F[proA+B+lacIqZΔM15::Tn10] (Tet<sup>R</sup>)</i>	
Methylierungs-defiziente ( <i>dam</i> <sup>-</sup> / <i>dcm</i> <sup>-</sup> ) E. coli Genotyp: <i>ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2</i> <i>galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1</i> <i>R(zgb210::Tn10) Tet<sup>S</sup> endA1 rspL136 (Str<sup>R</sup>)</i> <i>dam13::Tn9 (Cam<sup>R</sup>) xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1</i> <i>hsdR2</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland

### 10.1.9 Helferphage

Helferphagenname	Anbieter
M13KE Phage	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
MK13K07	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland

Die gentechnischen Arbeiten wurden von der Ethikkommission genehmigt (AZ13/05).

### 10.1.10 Plasmide/ Vektor

Plasmidname	Anbieter
pComb3XSS	Carlos Barbas Lab Plasmids/Addgene, Teddington, Großbritannien

### 10.1.11 Primer

#### 10.1.11.1 Design der PCR-Primer zur Amplifizierung der VH und VL DNA

*V<sub>H</sub>*-Primer, 5' Sense, Long Linker.

<b>HSCVH1-FL</b> 5'GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC TCC TCT GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT GGC TCG GGC GGT GGT GGG CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG 3'
<b>HSCVH2-FL</b> 5'GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC TCC TCT GGT GGC GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT GGT GGG CAG ATC ACC TTG AAG GAG TCT GG 3'
<b>HSCVH35-FL</b> 5'GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC TCC TCT GGTGGC GGT GGC TCG GGC GGT GGT GGG GAG GTG CAG CTG GTG SAG TCT GG 3'
<b>HSCVH3a-FL</b> 5'GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC TCC TCT GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT GGT GGG GAG GTG CAG CTG CAG CTG KTG GAG TCT GG 3'
<b>HSCVH4-FL</b> 5'GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC TCC TCT GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT GGT GGG CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG 3'
<b>HSCVH4a-FL</b> 5'GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC TCC TCT GGT GGC GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT GGT GGG CAG GTG CAG CTA CAG CAG TCC GG 3'

*V<sub>H</sub>-Primer, 3'Reverse, Short and Long Linker*

<b>HSCG1234-B</b> (korrespondierend zu den menschlichen IgG-Isotypen 1-4) 5'CCT GGC CGG CCT GGC CAC TAG TGA CCG ATG GGC CCT TGG TGG ARG C 3'
<b>HSCM-B</b> (korrespondierend zur CH1-Domäne des menschlichen IgM) 5'CCT GGC CGG CCT GGC CAC TAG TAA GGG TTG GGG CGG ATG CAC TCC C 3'
<b>HSCA-B</b> (korrespondierend zur CH1-Domäne des menschlichen IgA) 5'CCT GGC CGG CCT GGC CAC TAG TGA CCT TGG GGC TGG GGC TGG TCG GGG ATG C 3'

*V<sub>K</sub>-Primer, 5'Sense, Short and Long Linker.*

<b>HSCK1-F</b> 5'GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCC AGA TGA CCC AGT CTC C 3'
<b>HSCK24-F</b> 5'GGG CCC AGG CGG CCTG AGC TCG TGA TGA CYC AGT CTC C 3'
<b>HSCK3-F</b> 5'GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG TGW TGA CRC AGT CTC C 3'
<b>HSCK5-F</b> 5'GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCA CAC TCA CGC AGT CTC C3'

*V<sub>K</sub>-Primer, 3'Reverse, Short und Long Linker.*

<b>HSCJK14o-B</b> 5'GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC TTT GAT YTC CAC CTT GGT CCC 3'
<b>HSCJK2o-B</b> 5'GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC 3'
<b>HSCJK3o-B</b> 5'GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC TTT GAT ATC CAC TTT GGT CCC 3'
<b>HSCJK5o-B</b> 5'GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC TTT AAT CTC CAG TCG TGT CCC 3'

*V<sub>λ</sub>-Primer, 5'Sense, Short und Long Linker.*

<b>HSLam1a</b> 5'GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG TGB TGA CGC AGC CGC CCT C 3'
<b>HSLam1b</b> 5'GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG TGC TGA CTC AGC CAC CCT C 3'
<b>HSLam2</b> 5'GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG CCC TGA CTC AGC CTC CCT CCG T 3'
<b>HSLam3</b> 5'GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AGC TGA CTC AGC CAC CCT CAG TCT C 3'
<b>HSLam4</b> 5'GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG TGC TGA CTC AAT CGC CCT C 3'
<b>HSLam6</b> 5'GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCA TGC TGA CTC AGC CCC ACT C 3'
<b>HSLam78</b> 5'GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG TGG TGA CYC AGG AGC CMT C 3'
<b>HSLam9</b> 5'GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG TGC TGA CTC AGC CAC CTT C 3'

**HSCLam10**

5'GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG GGC AGA CTC AGC AGC TCT C 3'

 $V_{\lambda}$ -Primer, 3'Reverse, Short und Long Linker.**HSCJLam1236**

5'GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC GCC TAG GAC GGT CAS CTT GGT SCC 3'

**HSCJLam4**

5'GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC GCC TAA AAT GAT CAG CTG GGT TCC 3'

**HSCJLam57**

5'GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC GCC GAG GAC GGT CAG CTS GGT SCC 3'

**10.1.11.2 Design der Primer der Overlap-PCR**

Overlap-Extension-Primer:

**RSC-F** (sense)

5'GAG GAG GAG GAG GAG GAG GCG GGG CCC AGG CGG CCG AGC TC 3'

**RSC-B** (reverse)

5'GAG GAG GAG GAG GAG GAG CCT GGC CGG CCT GGC CAC TAG TG 3'

Primer der Sequenzierung der *scFv*:**VL: ompseq**

5'AAGACAGCTATCGCGATTGCAG 3'

**VH: HRML-F**

5'GGTGGTTCCTCTCTAGATCTTCC 3'

**10.2 Publikation der Arbeit**

Teile der Arbeit wurden für die Publikation *Autoantibodies in Serum of Systemic Scleroderma Patients: Peptide-Based Epitope Mapping Indicates Increased Binding to Cytoplasmic Domains of CXCR3* im *Frontiers in Immunology* verwendet.

Der Volltext dieser Publikation ist unter Open Access-Bedingungen verfügbar unter der DOI 10.3389/fimmu.2018.00428.