

Aus dem Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. H. Busch

**Selektion, Expression und Charakterisierung humaner, monoklonaler
Autoantikörper gegen Nicht-Desmoglein-Antigene unter Verwendung
der Pemphigus vulgaris-Phagenbibliothek PV3a**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Jan-Gerrit Johns
aus Bremen

Lübeck 2020

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. vet. Jennifer Hundt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Tanja Lange

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2021

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 08.12.2021

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APD	Antikörper-Phagen- <i>Display</i>
BP	Blockpuffer
BP180	Bullöses Pemphigoid Antigen 1
BP230	Bullöses Pemphigoid Antigen 2
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
Ca.	Circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CB	Carbenicillin
(c)DNA	(Komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
CDR	<i>Complementarity-determining regions</i>
C _H / C _L	Konstante schwere / leichte Domäne
(c/m/n)meter	(Zenti/Milli/Nano)meter
CO ₂	Kohlendioxid
d	Tag
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DIF	Direkte Immunfluoreszenz
DIT	Dijodtyrosin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DP	Desmoplakin
(D)PBS	<i>(Dulbecco's) Phosphate-buffered saline</i>
Dsc	Desmocollin
Dsg1	Desmoglein 1
Dsg3	Desmoglein 3
E. coli	Escherichia coli Bakterium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ETA	Exfoliatin A
EP	Elutionspuffer
FBS	Fetales bovines Serum
h	Stunden
G	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

H ⁺	Wasserstoff
HaCaT-Zellen	Humane adulte niedriges Calcium hohe Temperatur Zellen
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
I ⁻	Jodidionen
Ig(G/M/A/D/E)	Immunglobulin (Klasse G/M/A/D/E)
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth medium</i>
m ²	Quadratmeter
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
(m/n/μ)g	(Milli/Nano/Mikro)gramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
MIT	Monojodtyrosin
(m)M	(Milli)molar
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
(m)RNA	(Messenger) Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat-Monohydrat
NK	Negativkontrolle
O.D.	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PF	<i>Pemphigus foliaceus</i>
PG	Plakoglobin
PKP-1	Plakophilin 1
PP	Probenpuffer
PV	<i>Pemphigus vulgaris</i>

qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunden
SB-Medium	<i>Super Broth medium</i>
scFv	<i>Single chain variable fragment</i>
SDS-Gel	Natriumdodecylsulfat Gel
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOC-Medium	<i>Super Optimal Broth Medium</i>
sog.	Sogenannte/r
SYBR	<i>SYBR® Select Master Mix</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Trishydroxymethylaminomethan-Acetat- Ethylendiamintetraessigsäure
Talon	<i>Talon Metal Affinty Resin</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TG	Thyreoglobulin
TPO	Thyreoperoxidase
T _{reg} -Zellen	Regulative T-Zellen
TSH-Rezeptor	Thyreotropin-Rezeptor
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
V _H / V _L	Variable schwere / leichte Domäne
VP	Verdünnungspuffer
WP	Waschpuffer
UDG	Uracil-Desoxyribonukleinsäure-Glycosylase
ÜN	Über Nacht
z.B.	Zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	i
1. Einleitung	1
1.1 Aufbau der Haut	1
1.1.1 Antigene der Haut	1
1.2 Antikörper	2
1.2.1 Autoimmunität	5
1.3 Pemphigus vulgaris	6
1.4 Thyreoperoxidase	9
1.4.1 Hashimoto Thyreoditis	10
1.4.2 Thyreoperoxidase in der Haut	10
1.5 Phagenbibliothek und Antikörper-Phagen- <i>Display</i>	10
1.5.1 Phagenbibliothek PV3a	11
1.6 Zielsetzung und Fragestellungen	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Polymerase-Kettenreaktion	13
2.1.1 Isolation von Ribonukleinsäure und Synthese von komplementärer Desoxyribonukleinsäure	13
2.1.2 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	15
2.1.3 Agarose-Gel	16
2.2 Antikörperproben	16
2.2.1 Positivkontrollen	16
2.2.2 Nicht-Desmoglein-Antikörper	17
2.3 Antikörperexpression	17
2.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	22
2.5 Enzymgebundener Immunadsorptionsnachweis	22
2.6 Indirekte Immunfluoreszenz	24
2.6.1 Anfertigung von Gefrierschnitten humaner Haut	25
2.6.2 Indirekte Immunfluoreszenz auf kryofixierter humaner Haut	25
2.6.3 Indirekte Immunfluoreszenz auf EUROIMMUN Biochips	26
2.7 Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation	27

2.7.1	Humane adulte niedriges Calcium hohe Temperatur Zellen (HaCaT-Zellen)	28
2.7.2	Ablauf des Nachweisverfahrens zur Keratinozytendissoziation	28
2.8	Humane Vollhautorgankultur	29
2.8.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	30
2.9	Statistik	31
2.10	Verbrauchsmaterialien und Geräte	31
3.	Ergebnisse	36
3.1	Untersuchung von Hautproben auf Thyreoperoxidase-messenger Ribonukleinsäure	36
3.2	Kontrolle der Proteinexpression und der Proteinkonzentrationen	37
3.3	Bestimmung von Bindungseigenschaften der variablen Einzelkettenfragmente	39
3.4	Etablierung der indirekten Immunfluoreszenz auf Affenösophagus und humaner Haut	44
3.4.1	Bindungen der Thyreoperoxidase-variablen Einzelkettenfragmente an unterschiedliche Gewebe	46
3.4.2	Bindung kommerzieller Thyreoperoxidase-Antikörper an humane Haut	49
3.5	Pathogenitätsbestimmung der variablen Einzelkettenfragmente	50
3.6	Etablierung der humanen Vollhautorgankultur	52
4.	Diskussion	54
4.1	Etablierung von Methoden zur Charakterisierung von variablen Einzelkettenfragmenten	54
4.1.1	Enzymgebundene Immunadsorptionsnachweis-Kits eignen sich zum Bindungsnachweis	54
4.1.2	Indirekte Immunfluoreszenz ermöglicht Bindungsnachweis an Gewebe	54
4.1.3	Das Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation eignet sich zum <i>in vitro</i> Pathogenitätsnachweis	55
4.1.4	Humane Vollhautorgankultur ermöglicht <i>in vitro</i> Pathogenitätsnachweis durch Auslösen einer Akantholyse	56
4.1.5	Zusammenfassung der erfolgreich etablierten Methoden	57

4.2	Charakterisierung von Nicht-Desmoglein-Antikörpern	58
4.2.1	Nicht-Desmoglein-variable Einzelkettenfragmente binden an Desmoglein und Thyreoperoxidase	58
4.2.2	Nicht-Desmoglein-variable Einzelkettenfragmente binden unterschiedlich stark an verschiedene Gewebe	59
4.2.3	Fragmentierung der Zellschicht ist vermutlich auf Bindung der variablen Einzelkettenfragmente an Desmoglein zurückzuführen	59
4.2.4	Nicht-Desmoglein-variable Einzelkettenfragmente verursachen keine Akantholyse	60
4.2.5	Zusammenfassende Betrachtung der Nicht-Desmoglein-variablen Einzelkettenfragmente	61
4.2.6	Geringe Thyreoperoxidase-Bindung aufgrund fehlender Ribonukleinsäuren für Thyreoperoxidase-Antikörper in Patientenserum	61
4.2.7	Selektion der variablen Einzelkettenfragmente als Ursache für unterschiedliche Desmogleinbindung von Desmoglein- und Nicht-Desmoglein-variablen Einzelkettenfragmenten	62
4.3	Indirekte Immunfluoreszenz zeigt keine Thyreoperoxidase in humaner Haut trotz Nachweis von Thyreoperoxidase-messenger Ribonukleinsäure	62
4.4	Erkenntnisse bieten viele Möglichkeiten für weitere Projekte	63
5.	Zusammenfassung	65
6.	Literaturverzeichnis	66
7.	Anhang	74
7.1	Poster	74
7.2	Abbildungsverzeichnis	75
7.3	Tabellenverzeichnis	77
7.4	Schreiben der Ethik-Kommission	78
8.	Danksagungen	79

1. Einleitung

1.1 Aufbau der Haut

Die Haut ist mit ungefähr 2,0 m² das größte Organ des Menschen. Ihre Aufgabe besteht nicht nur darin eine Barriere zur Außenwelt zu bilden und somit den Körper vor mechanischen, physikalischen und chemischen Schäden zu schützen (1), sondern sie erfüllt auch verschiedene neuronale und immunologische Funktionen, indem sie eine Vielzahl von Sinneswahrnehmungen verarbeitet und über eigene Immunzellen verfügt, die verschiedene Entzündungsreaktionen vermitteln können (2).

Die Haut wird in mehrere Schichten eingeteilt: die aus Epithelzellen bestehende Epidermis, der bindegewebigen Dermis und der Subcutis, die größtenteils aus Fettgewebe besteht (3). Die äußerste Schicht der Haut ist die Epidermis, die aus Keratinozyten gebildet wird. Der Aufbau unterscheidet sich zwischen der an den Handflächen und Fußsohlen vorkommenden Leistenhaut und der Felderhaut, die am übrigen Integument ausgeprägt wird. Es werden aufgrund der Differenzierung der Keratinozyten innerhalb der Epidermis weitere Schichten abgegrenzt. Diese sind von apikal nach basal: Stratum corneum, das nur in der Felderhaut vorkommende Stratum lucidum, sowie Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum basale (4). Die Epidermis ist in der unter ihr liegenden Basalmembran verankert, welche sich zwischen Epidermis und Dermis befindet. Die Dermis ist aus zwei Schichten aufgebaut. Dem Stratum papillare, welches besonders gefäßreich ist, und dem kollagenreichen Stratum reticulare. In der darunter liegenden Subcutis sind überwiegend Adipozyten zu finden (3, 4).

In der Haut sind außerdem noch multiple weitere Strukturen zu finden. Hierzu gehören Drüsen (Schweiß-, Duft-, und Talgdrüsen), Haarfollikel sowie eine Vielzahl spezialisierter Zellen, die verschiedene Funktionen übernehmen (4). Einen Überblick über diese Zellen gibt die Tabelle (**Tab.**)

1.1.

Tab. 1.1 – Überblick über spezialisierte Zellen der Haut.					
Zellen	<u>Melanozyten</u>	<u>Langerhans-Zellen</u>	<u>Merkel-Zellen</u>	<u>Meissner-Tastkörperchen</u>	<u>Vater-Pacini-Körperchen</u>
Hautschicht	Stratum basale	Stratum spinosum	Stratum basale	Stratum papillare	Subcutis
Funktion	Melaninproduktion	Immunantwort	Mechanorezeption	Druckrezeptor	Vibrationsrezeptor

1.1.1 Antigene der Haut

In der Haut tragen viele unterschiedliche Proteine zur Aufrechterhaltung der Zell-Zellkontakte zwischen den Keratinozyten bei. Weitere Proteine verbinden die Keratinozyten des Stratum basale mit der darunter liegenden Dermis. Dieser Bereich wird als dermoepidermale Junktionszone

bezeichnet. Diese Strukturen können Antigene verschiedener Autoantikörper sein. Eine Bindung der Antikörper an deren Antigene kann somit eine Lockerung der Verbindungen verursachen, wodurch es klinisch zu einer Blasenbildung der Haut kommt. Diese Krankheitsbilder werden deshalb auch als blasenbildende Autoimmundermatosen bezeichnet. Die Erkrankungen unterscheiden sich dabei durch die verschiedenen Antigene, von denen die häufigsten in Abbildung (Abb.) 1.1 schematisch dargestellt werden (5).

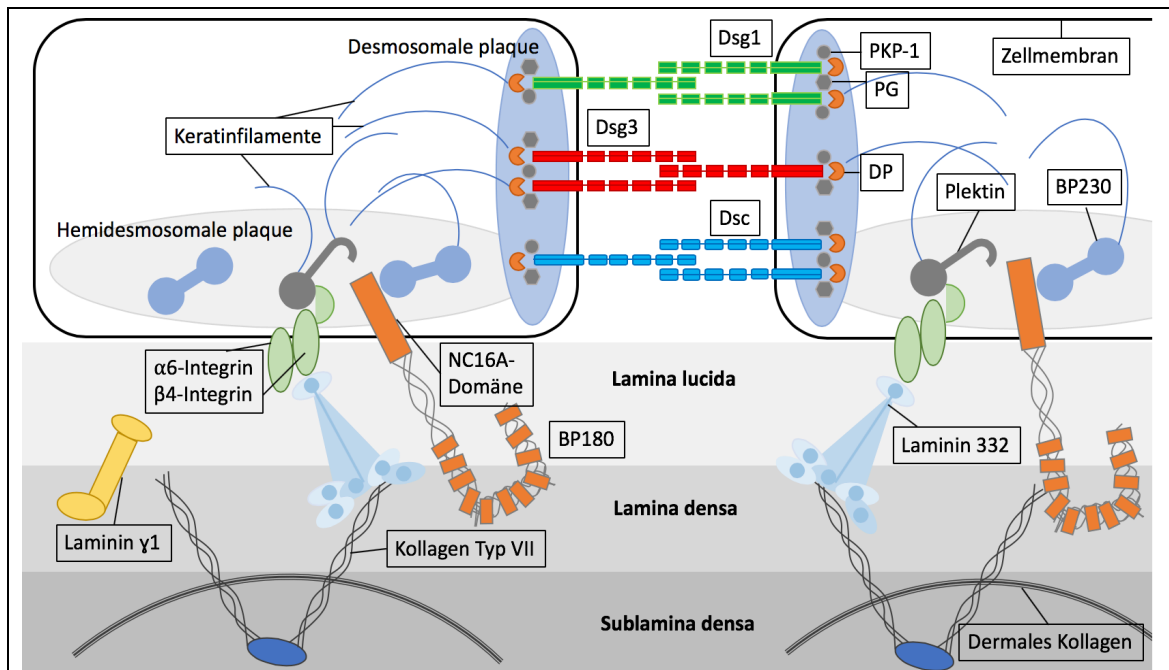


Abb. 1.1 – Darstellung häufiger Autoantigene in der Epidermis und der dermoepidermalen Junktionszone. Die Zell-Zellkontakte werden durch Dsg 1 und 3 sowie durch Dsc erzeugt. Diese Strukturen sind in der desmosomalen Plaque (blau) über PG und PKP-1 an DP und somit an die Keratinfilamente gebunden. Die Verbindung mit der Basalmembran (aus Lamina lucida, Lamina densa und Sublamina densa) geht von der hemidesmosomalen Plaque (grau) aus, in der sich Plektin und BP230 befinden. Die Verankerung in der Basalmembran erfolgt durch BP180, Integrin und Laminin 332. Der Kontakt mit dem dermalen Kollagen erfolgt durch Kollagen Typ VII. Darstellung nach (5).

BP180 = Bullöses Pemphigoid Antigen 1; BP230 Bullöses Pemphigoid Antigen 2; DP = Desmoplakin; Dsc = Desmocollin; Dsg = Desmoglein; PG = Plakoglobin; PKP-1 = Plakophilin-1

1.2 Antikörper

An dieser Stelle sollen kurz die Funktionen und Aufgaben von Antikörpern beschrieben werden. Die Hauptaufgabe des Immunsystems ist es den Körper von fremden und potentiellen Krankheitserregern zu schützen, indem es diese erkennt und bekämpft. Das Immunsystem wird in zwei Klassen unterteilt, das angeborene beziehungsweise (bzw.) unspezifische Immunsystem sowie in das erworbene bzw. spezifische Immunsystem.

Zum unspezifischen Immunsystem gehören, in einer vereinfachten Darstellung, neben mechanischen Barrieren wie der Haut und multiplen Zellen (insbesondere Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen) auch das Komplementsystem. Es kann nur sehr begrenzt zwischen verschiedenen Erregern unterscheiden. Das unspezifische Immunsystem besteht bereits bei der Geburt und bildet einen sofortigen Schutz gegen potentielle Krankheitserreger.

Das erworbene Immunsystem hingegen erkennt hochspezifische Molekularstrukturen (Antigene) und kann diese gezielt eliminieren. Dieser Prozess dauert länger, muss nach der Geburt erst ausgereift werden und wird hauptsächlich durch T- und B-Lymphozyten gesteuert. Dieses System agiert mit Hilfe von Antikörpern (6, 7, 8).

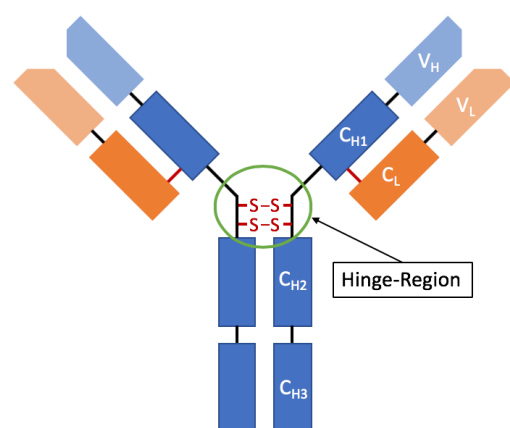
Bei den in dieser Arbeit verwendeten Antikörper handelt es sich um rekombinant produzierte Antikörperstrukturen. Zum besseren Verständnis soll hier die Struktur eines Antikörpers beschrieben und die in dieser Arbeit verwendeten Fragmente erklärt werden. Antikörper bzw. Immunglobuline sind Proteine des erworbenen Immunsystems. Antikörper besitzen eine Ypsilon-ähnliche Form und bestehen aus vier Ketten – zwei langen schweren sogenannten (sog.) H-Ketten (engl.: *heavy chains*) und zwei kurzen leichten sog. L-Ketten (engl.: *light chains*), welche über Disulfidbindungen miteinander verbunden sind. Die schweren Ketten bestehen aus drei konstanten (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) Domänen und einer variablen (V_H) Domäne. Die kürzeren leichten Ketten bestehen aus je einer konstanten (C_L) und variablen (V_L) Domäne. Im Zentrum des Immunglobulins befindet sich die sog. Hinge-Region zwischen C_{H1} und C_{H2} , die entscheidend für die Flexibilität des Moleküls ist (**Abb. 1.2**).

Abb. 1.2 – Darstellung eines IgG-Antikörpers. Zu

erkennen sind die Ypsilon-Form sowie die verschiedenen Domänen. Die schweren (blau) und leichten Ketten (orange) sind durch Disulfidbrücken (rot) miteinander verbunden. Die variablen Regionen sind etwas heller dargestellt. Im Zentrum des Moleküls ist die Hinge-Region dargestellt. Die variablen Domänen sind für die spezifische Bindung an Antigene verantwortlich. Die konstanten Domänen bestimmen die Antikörperklasse und aktivieren die Immunantwort. Darstellung verändert nach (11).

C_H / C_L = Konstante schwere / leichte Domäne;

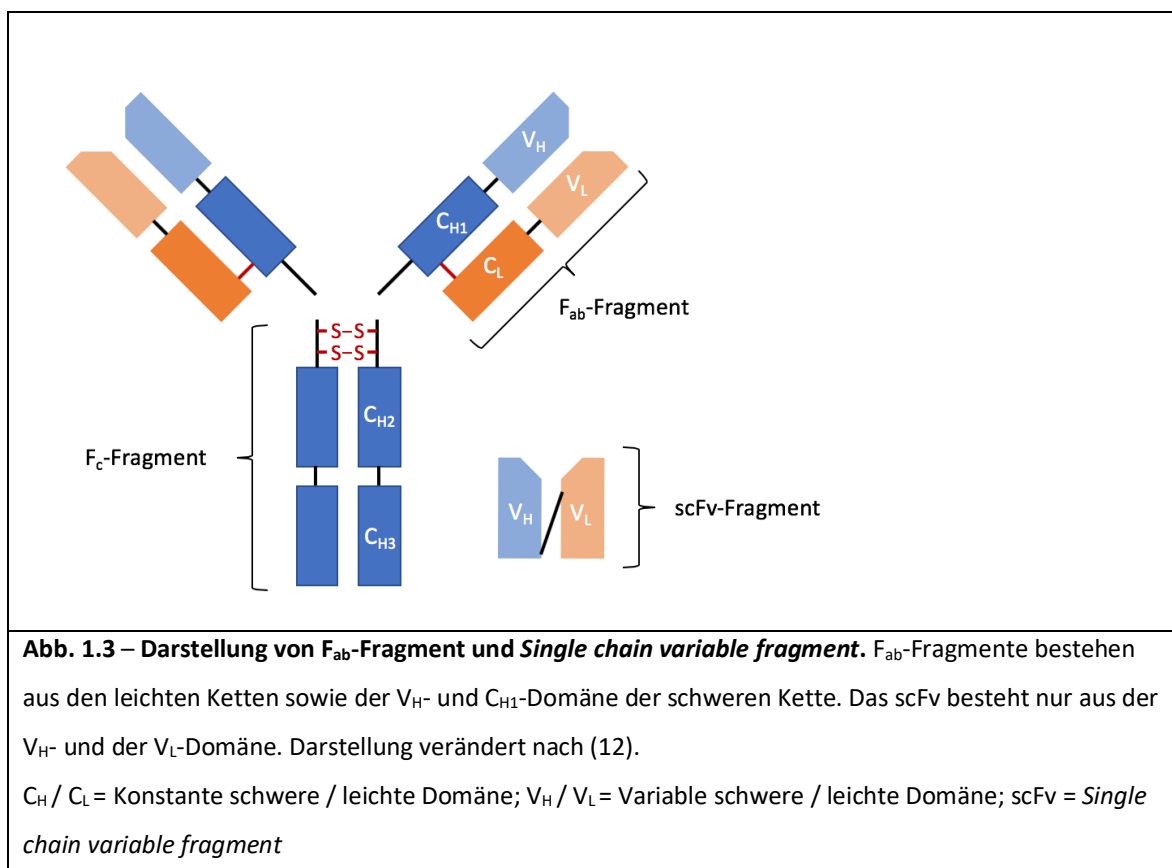
V_H / V_L = Variable schwere / leichte Domäne



Die aus V_H und V_L bestehenden variablen Regionen eines Antikörpers ermöglichen die hochspezifische Bindung der Immunglobuline an Antigene. Hierfür sind jeweils drei hypervariable

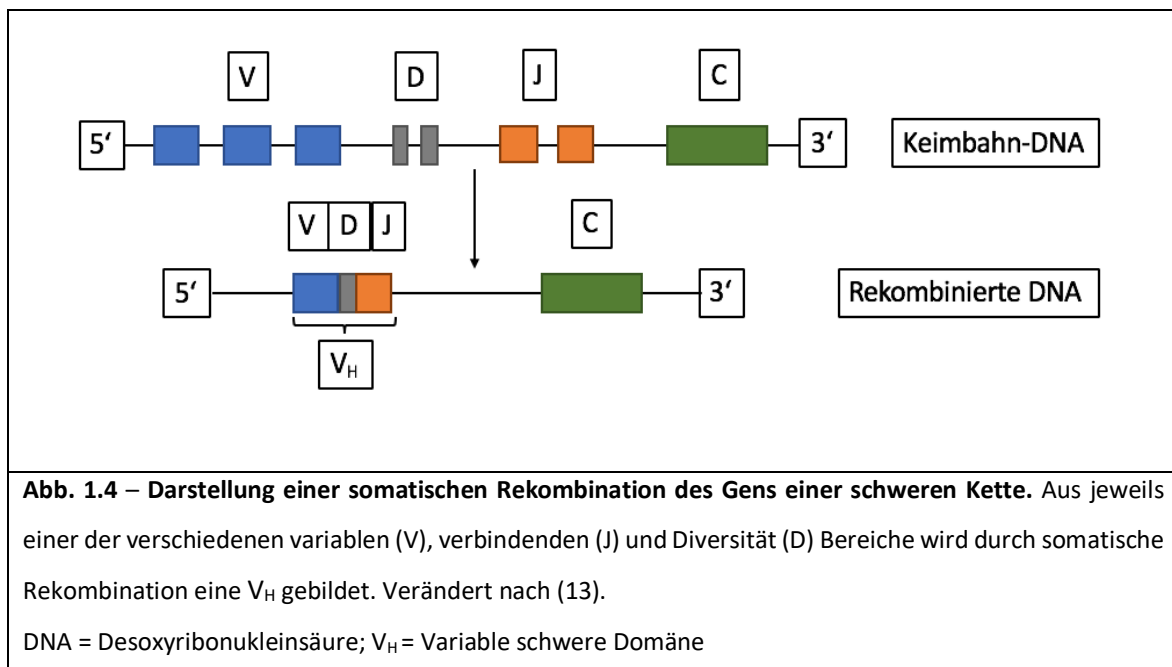
Regionen sog. *Complementarity-determining regions* (CDR) 1-3 verantwortlich, die den direkten Kontakt mit dem Antigen bilden. Konstante Regionen hingegen können von Immunzellen zum Beispiel (z.B.) B-Zellen erkannt werden und eine Immunantwort auslösen. Sie bestimmen auch die Einteilung der Immunglobuline in eine der fünf Klassen: das am häufigsten vorkommende IgG, das ein Pentamer bildende IgM, das als Dimer vorliegende IgA sowie IgE und IgD, welche ebenfalls Monomere sind (9, 10).

Durch die Verwendung der Protease Papain können die H-Ketten im Bereich der Hinge-Region gespalten werden. Auf diese Weise entstehen zwei F_{ab} -Fragmente und ein F_c -Fragment. In dieser Arbeit werden rekombinant produzierte *Single chain variable fragments* (scFv) bzw. variable Einzelkettenfragmente verwendet, welche aus den variablen Regionen der schweren und leichten Ketten bestehen (**Abb. 1.3**) (11).



Die gewaltige Menge an fremden und potentiell gefährlichen Erregern und deren Antigenen zwingt den Körper dazu eine Vielzahl an unterschiedlichen Antikörpern zu bilden. Damit jeder Antikörper nur mit seinem spezifischen Antigen reagiert, ermöglichen Mechanismen die Erzeugung einer erheblichen Diversität zwischen den Immunglobulinen. Entscheidend für die Antikörpersynthese sind B-Zellen und die mit ihnen über den T-Zell-Rezeptor (TCR) interagierenden T-Zellen. Die Herstellung der Immunglobuline findet in B-Zellen statt, in denen die Diversität durch multiple Splicevorgänge und Neuaneordnungen von Genabschnitten erreicht wird. Dieser Prozess wird als

somatische Rekombination bezeichnet. Die für die leichten und schweren Ketten kodierenden Gene bestehen aus verschiedenen variablen (V), verbindenden (J) (engl.: *joint*) und im Fall der schweren Kette auch Diversität (D) Bereichen. Diese können unterschiedlich miteinander kombiniert werden, wodurch eine Vielzahl von variablen Regionen (V_H und V_L) gebildet werden kann (**Abb. 1.4**). Neben der somatischen Rekombination führen weitere Prozesse zur Erhöhung des Immunglobulinrepertoires. Die junctionale Diversität führt durch eine Verbindung von Haarnadelstrukturen in den V, D und J Bereichen zu neuen Genvariationen. Nach der Aktivierung der B-Zelle kann durch einen als somatische Hypermutation bezeichneten Prozess die DNA (Desoxyribonukleinsäure) des Immunglobulins verändert werden. Durch Aktivierung des Enzyms „aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase“ werden Cytosinbasen zu Uracil umgewandelt. Dies kann wiederum auf dem korrespondierenden Strang zu einem Austausch von Guanin zu Adenin führen (13, 14).



1.2.1 Autoimmunität

Die Erstbeschreibung von Autoimmunität erfolgte 1901 durch Paul Ehrlich (15). Dieser bezeichnete die von ihm beobachtete Aktivität des Organismus als *Horror autotoxicus* (lat.: Schrecken der Selbstvergiftung). Heutzutage sind Autoimmunreaktionen als Ursache für Krankheiten verschiedenster Organsysteme identifiziert worden und betreffen etwa fünf bis zehn Prozent der Weltbevölkerung (16). Der Pathomechanismus von Autoimmunerkrankungen beruht auf einer Immunreaktion des Organismus gegen körpereigene sog. Autoantigene (17).

Damit bei der Entstehung von Antikörpern und TCR eine Affinität zu möglichst vielen Antigenen erreicht werden kann (Kapitel 1.2), diese aber nicht gegen den Körper gerichtet sind, führen multiple Mechanismen zur Inaktivierung und Eliminierung autoreaktiver Lymphozyten. Dieser

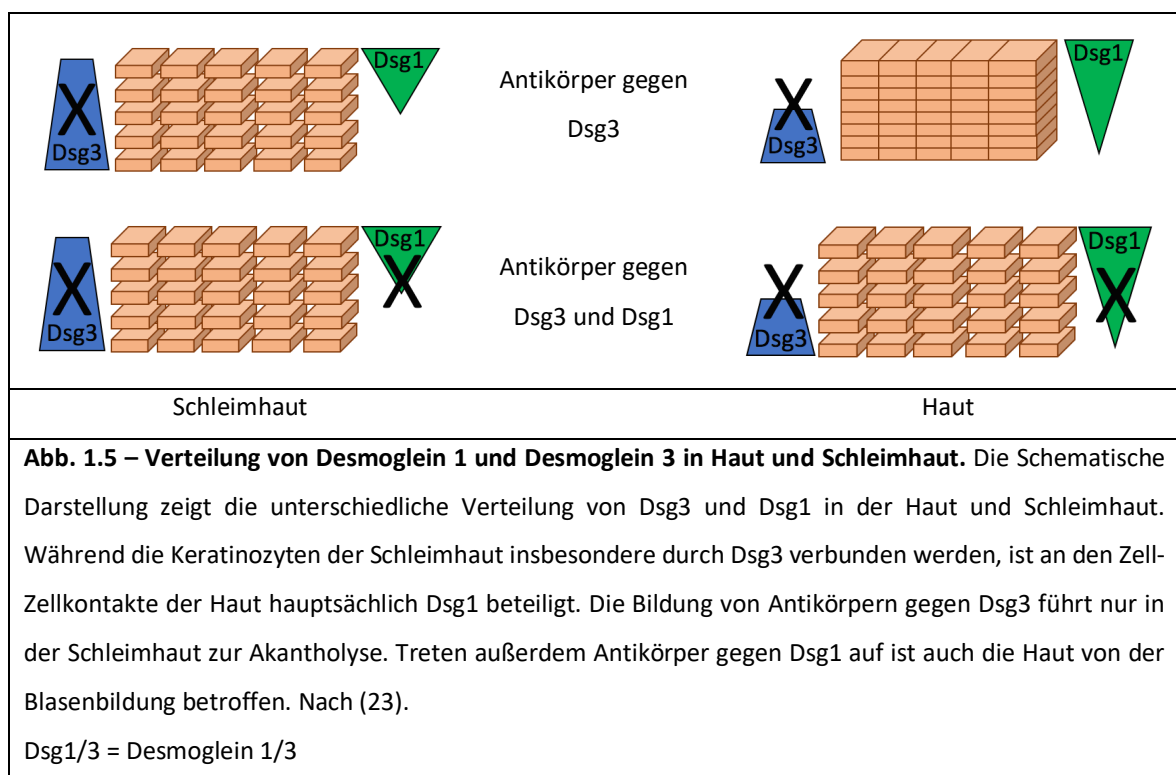
Schutzmechanismus wird als Selbst-Toleranz bezeichnet und beinhaltet mehrere Ebenen. Im Thymus und Knochenmark werden autoreaktive Lymphozyten in einem als negative Selektion bezeichneten Prozess identifiziert und im Rahmen der sog. zentralen Deletion zur Apoptose angeregt (18). Dieser Prozess wird als auch zentrale Toleranz bezeichnet (17). Die verbleibenden, im Körper zirkulierenden Lymphozyten weisen häufig eine geringe Affinität zu eigenen Antigenen auf. Dies ist notwendig, da eine erworbene Immunantwort gegen fremde Antigene nicht gänzlich ohne Autoreaktivität möglich ist (19). Diese Lymphozyten reagieren jedoch nicht mit Autoantigenen, da nötige Kostimulatoren fehlen oder auf den Zellen inhibitorische Rezeptoren aktiviert werden (17) (20). Als weitere Schutzebene können regulatorische T-Zellen (T_{reg} -Zellen), die Autoimmunität durch Cytokine z.B. TGF- β unterdrücken (19).

Beim Versagen der Kontrollmechanismen kann es zum Ausbilden einer Autoimmunerkrankung kommen, welche in organspezifische (z.B. Diabetes mellitus Typ 1) und systemische Erkrankungen (z.B. systemischer Lupus erythematoses) unterteilt werden können. Für die Pathogenese sind alle Teile des Immunsystems verantwortlich, jedoch wird die Pathogenität meist durch T-Zellen oder Antikörper vermittelt. T-Zellen verursachen einerseits sekundäre Entzündungsreaktionen auf abgelagerte Immunkomplexe, andererseits werden einige Autoimmunerkrankungen direkt durch T-Zellen ausgelöst, entweder durch das Auslösen einer Entzündung oder indem Strukturen unmittelbar zerstört werden. Von B-Lymphozyten gebildete Autoantikörper können Entzündungen verursachen, Moleküle durch Bindung inaktivieren oder destabilisieren und an Rezeptoren binden, wodurch diese aktiviert oder gehemmt werden können. Typisch für eine Vielzahl von Autoimmunerkrankungen ist eine Chronifizierung. Durch die Zerstörung einer Struktur werden zunehmend mehr Autoantigene freigesetzt und die Immunantwort somit positiv rückgekoppelt (19). Eine Sonderrolle im Vergleich zu den dargestellten Fällen spielen genetische Erkrankungen. So führt z.B. ein Fehler im AIRE-Gen zu einer autoimmun verursachten Zerstörung multipler endokriner Organe (21).

1.3 Pemphigus vulgaris

Pemphigus ist eine blasenbildende Autoimmundermatose. Zur Gruppe der Pemphiguserkrankungen gehören zwei Haupttypen. Diese sind Pemphigus vulgaris (PV) und Pemphigus foliaceus (PF) (22, 23). Die Inzidenz von PV, mit welchem sich in dieser Arbeit beschäftigt wird, beträgt 0,1 – 0,5 pro 100.000 Einwohner und Jahr und ist damit die häufigste Form der Pemphigustypen. Die Erkrankung tritt überwiegend bei Personen im zweiten Lebensdrittel auf, kann aber prinzipiell in jedem Lebensalter auftreten. Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen (24).

Ursächlich für die Pathogenese von PV sind Autoantikörper, die zu einer intraepidermalen Blasenbildung führen. Dies grenzt die Pemphiguserkrankung vom wesentlich häufiger auftretendem bullösen Pemphigoid ab, wo sich die Blasen subepidermal in der dermoepidermalen Junktionszone befinden (23). Im Fall von PV sind die Antikörper gegen Desmogleinproteine gerichtet (**Abb 1.1**), und verhindern somit die durch Desmoglein (Dsg) ermöglichten Zell-Zellkontakte (25). Aufgrund der unterschiedlichen Arten und der zwischen den Zellschichten variierenden Distribution von Dsg ergeben sich die verschiedenen Pemphigustypen. Im Falle von PV sind die Antikörper gegen Dsg3 oder gegen Dsg3 und Dsg1 gerichtet. Da Dsg3 überwiegend in den Schleimhäuten vertreten ist, führen Antikörper gegen Dsg3 zum klinischen Bild des mukösen PV. Richten sich die Antikörper zusätzlich gegen Dsg1 ist zusätzlich zu den Schleimhäuten auch die Haut betroffen. Beim vom PV abzugrenzenden PF treten nur Antikörper gegen Dsg1 auf. Da Dsg1 in den Schleimhäuten kaum an den Zell-Zellkontakten beteiligt ist, entsteht die Blasenbildung bei PF nur auf der Haut und nicht an den Schleimhäuten (23) (**Abb. 1.5**).



Neben Dsg3- und Dsg1-Antikörpern konnte auch eine mögliche Beteiligung von Antikörpern gegen andere Antigene in der Pathogenese von PV gezeigt werden. Zu diesen gehören insbesondere E-Cadherin, welche wie Dsg zur Aufrechterhaltung von Zell-Zellkontakten beitragen (26, 27) aber auch Thyreoperoxidase-Antikörper (Kapitel 1.4.2). Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Bindung von Antikörpern an Dsg eine p38-vermittelte Aktivierung einer mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) auslöst. Dies wiederum führt zu einer Verlagerung der Antigene von der Oberfläche in das Zytoplasma der Keratinozyten, wodurch die Zellkontakte geschwächt werden (28, 29, 30). Eine

genetische Disposition mit dem Auftreten von PV konnte in Studien gezeigt werden. Schon lange ist eine Rolle bestimmter humaner Leukozytenantigene (HLA), insbesondere von HLA-DRB1*0402 und HLA-DQB1*0503, in der Pathogenese von PV bekannt (31, 32). Vor kurzem konnte außerdem eine Assoziation zwischen einer Variation von Immunglobulin 3 (IgG3) und dem Auftreten von PV beschrieben werden (33).

Das klinische Bild von PV ist durch das Auftreten von Erosionen geprägt. Die durch die Antikörper vermittelten Blasen liegen sehr weit oberflächlich und platzen schon durch geringe mechanische Belastung auf, wodurch tatsächliche Blasen nur selten zu finden sind. Wie beschrieben treten die Erosionen an den Schleimhäuten und gegebenenfalls auch an der Haut auf. Besonders häufig sind Areale betroffen, an denen hohe Scherkräfte wirken. Im Prinzip kann aber das gesamte Integument betroffen sein. In der Klinik kann das Nikolski-Zeichen zur Überprüfung auf ein PV herangezogen werden (23, 24).

Zusätzlich zum klinischen Bild erfolgt die Diagnostik der Erkrankungen mit Hilfe verschiedener Methoden. Histologische Schnitte zeigen die intraepidermal ausgeprägte Akantholyse sowie auf der Basalmembran stehende Zellen, welche durch noch intakte Hemidesmosomen (**Abb. 1.1**) mit dieser verbunden sind. Das charakteristische Bild wird als *Tombstone-Pattern* (engl.: Grabstein) bezeichnet. Eine weitere Methode ist die Immunfluoreszenz, welche der Goldstandard in der Diagnostik von PV ist. Es wird zwischen der direkten und der indirekten Immunfluoreszenz unterschieden (DIF bzw. IIF). In der DIF werden breites an Gewebe gebundene Antikörper durch mit einem Fluoreszenzmarker markierte Antikörper sichtbar gemacht. Bei PV-Patienten muss die hierfür nötige Biopsie perilesional entnommen werden. Anschließend zeigt sich in der DIF eine typische netzartige Färbung entlang der Zellmembranen. Diese kommt durch die Bindung der Antikörper an Dsg zustande, welche an der Außenseite der Zellen lokalisiert sind. Die IIF ermöglicht es Antikörper aus Patientenserum auf ein Gewebe aufzutragen und anschließend mit einem Fluoreszenzmarker anzufärben. Im Fall von PV ist das verwendete Gewebe Affenösoophagus und die Dsg-Antikörper des Patienten werden mit einem fluoreszenzmarkierten Anti-IgG-Antikörper markiert (5, 24). Zur Kontrolle der Krankheitsaktivität kann ein mit Dsg1 bzw. Dsg3 beschichteter Enzymgebundener Immunadsorptionsnachweis (ELISA) (Kapitel 2.5) genutzt werden.

Die Therapie der Erkrankung erfolgt durch systemische Glukokortikoide in Kombination verschiedener Immunsuppressiva. Am häufigsten werden hierfür Azathioprin, Mycophenolat-Mofetil (MMF) und Cyclophosphamid verwendet. Gelegentlich kommt es auch zum Einsatz von Rituximab, Methotrexat oder hochdosierter Immunglobuline (IVIG). In schweren Fällen wird auf die Plasmapherese oder die Immunadsorption zurückgegriffen (24). Neuere Studien untersuchen auch den Einfluss von *Epidermal Growth Factor Receptor*-Inhibitoren (34).

1.4. Thyreoperoxidase

In dieser Arbeit soll die Auswirkung von Nicht-Dsg-Antikörpern untersucht werden. Bei den untersuchten Antikörpern handelt es sich um Anti-Thyreoperoxidase-Antikörper. Die Funktionsweise der Thyreoperoxidase (TPO), welche ein Schilddrüsenenzym ist, wird an dieser Stelle beschrieben.

Die Schilddrüse ist eine endokrine Drüse, die eine Reihe von Hormonen synthetisiert, von denen die wichtigsten Thyroxin (T4) und Trijodthyronin (T3) sind. Diese Hormone regulieren über molekulare und zelluläre Mechanismen verschiedene den Grundumsatz beeinflussende Funktionen. Die Synthese von T3 und T4 erfolgt durch eine Reihe von Enzymen und Transportern in den Follikelzellen (**Abb. 1.6**) (35, 36). Die TPO übernimmt bei der Synthese der Schilddrüsenhormone eine Schlüsselrolle, indem sie eine Jodierung von Tyrosinresten und deren Verkettung ermöglicht.

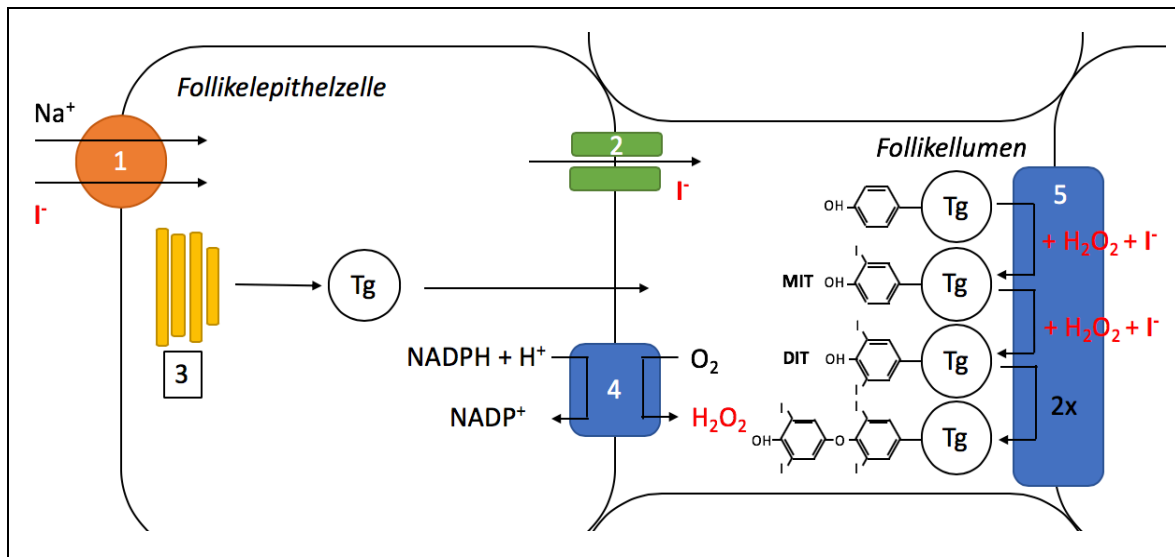


Abb. 1.6 – Synthese von Schilddrüsenhormonen. Für die Synthese der Schilddrüsenhormone werden I⁻ und Tg benötigt. I⁻ werden über einen Natrium-Jodid-Symporter (1) in das Lumen der Follikelzellen aufgenommen und anschließend durch einen Jodidtransporter (2) in das Follikellumen transportiert. Tg wird im Golgi-Apparat synthetisiert und in das Lumen abgegeben. Durch die Thyreoperoxidase (5) werden Tyrosinreste des Tg jodiert, wodurch zunächst MIT und anschließend DIT entstehen. Hierzu werden I⁻ mit Hilfe von H₂O₂ oxidiert, welches durch eine NADPH-Oxidase (4) erzeugt wird. Multiple DIT Moleküle werden durch die TPO miteinander verbunden und als Kolloid im Follikellumen gespeichert. Die jodierten Tyrosinreste können abgespalten werden, wodurch die aktiven Schilddrüsenhormone T3 und T4 entstehen. Nach (35, 36).

DIT = Dijodtyrosin; H⁺ = Wasserstoff; H₂O₂ = Wasserstoffperoxid; I⁻ = Jodidionen; MIT = Monojodtyrosin; Na⁺ = Natrium; NADP(H) = Nicotinamadenindinukleotidphosphat; O₂ = Sauerstoff; Tg = Thyreoglobulin; TPO = Thyreoperoxidase; T3 = Trijodthyronin; T4 = Thyroxin

1.4.1 Hashimoto-Thyreoiditis

Die Hashimoto-Thyreoiditis ist eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen des Menschen. Verursacht wird sie in 90% der Fälle durch Antikörper gegen die TPO und zu Beginn der Erkrankung auch gegen Thyreoglobulin (Tg). Sehr selten können auch Antikörper gegen den Thyreotropin-Rezeptor (TSH-Rezeptor) nachgewiesen werden (37). Durch begleitende T-Zell-Reaktionen kommt es zu einer Entzündung und Zerstörung der Schilddrüse (38). Klinisch manifestiert sich häufig erst nach Jahren das Bild einer Hypothyreose mit typischen Symptomen wie Kälteintoleranz, Gewichtszunahme und Antriebsarmut. Die Erkrankung kann durch den Nachweis der Autoantikörper diagnostiziert und mit einer Hormonsubstitution therapiert werden (37, 39).

1.4.2 Thyreoperoxidase in der Haut

Der Einfluss der Schilddrüse auf die Haut wird durch die klinischen Veränderungen, die durch Schilddrüsenerkrankungen verursacht werden, deutlich. Einige Erkrankungen der Schilddrüse zeigen typische dermatologische Manifestationen. Im Rahmen der Schilddrüsenerkrankung Morbus Basedow kann es zur Ausbildung des für diese Erkrankung charakteristischen prätibialen Myxödems kommen. Auch durch eine Hyper- oder Hypothyreose kommt es zu Hautveränderungen in Form von z.B. Hauttrockenheit, Zunahme der Hautdicke sowie Veränderungen der Haare und Nägel (40). Bei PV-Patienten konnte ein im Vergleich zur Normalbevölkerung häufigeres Vorkommen von TPO-Antikörpern nachgewiesen werden (41, 42). Es zeigte sich auch ein gehäuftes Auftreten von subklinischer Hashimoto-Thyreoiditis bei Patienten mit PV (43). Durch die Untersuchung der HLA von PV-Patienten gelang es außerdem HLA zu identifizieren, bei denen eine vermehrte Bildung von TPO-Antikörpern beobachtet werden konnte (44, 45). Die Durchführung von Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) ermöglichte den Nachweis einer Expression des TPO-Gens in der Haut durch den Nachweis von messenger Ribonukleinsäure (mRNA) (46). Neben PV wird ein verstärktes Auftreten von TPO-Antikörper auch bei anderen Hauterkrankungen z.B. der chronisch spontanen Urtikaria beobachtet (47, 48).

1.5. Phagenbibliothek und Antikörper-Phagen-Display

In einer Phagenbibliothek können multiple Phagen, die auf ihrer Oberfläche verschiedene Strukturen exprimieren, gesammelt und gespeichert werden. Es kann zwischen Antikörper- und Peptid-Phagenbibliotheken unterschieden werden (48). Zur Bearbeitung dieser Arbeit wurde eine Bibliothek aus Antikörpern verwendet. Für die Herstellung einer Antikörper-Bibliothek wird aus einem Medium z.B. Blut oder Milzgewebe Ribonukleinsäure (RNA) extrahiert, welche in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben wird. Diese cDNA kann anschließend im Rahmen einer PCR mit Hilfe spezifischer Primer für die V_H- und V_L-Gene vermehrt

werden. Die dabei entstehende DNA wird in einen Vektor integriert, welcher wiederum in ein *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterium injiziert wird. Der verwendete Vektor codiert für das Oberflächenprotein eines Phagen. Durch die Expression der Vektor-DNA wird zusammen mit dem Strukturprotein ein aus der V_H - und V_L -Domäne bestehendes monoklonales scFv (Kapitel 1.2) auf der Phagenoberfläche exprimiert. Da in der zu Beginn des Verfahrens isolierten RNA die Information für diverse Immunglobuline gespeichert ist, können auf diese Weise multiple Phagen mit verschiedensten scFv erzeugt und gespeichert werden (12).

Durch das Antikörper-Phagen-*Display* (APD) können aus einer Phagenbibliothek diejenigen Phagen, selektiert werden, auf deren Oberfläche ein bestimmtes scFv exprimiert wird. In einem als *Biopanning* bezeichneten Prozess wird zwischen dem Phagen und einem Antigen eine Antigen-Antikörper-Bindung ausgelöst. Nicht fixierte Phagen werden in einem Waschschrift entfernt. Anschließend werden die gebundenen Phagen wieder herausgelöst und zur Vermehrung erneut in *E. coli* transformiert. Um antigenspezifische Phagen zu isolieren, wird der Zyklus drei- bis viermalig wiederholt. Der Erfolg des APD wird mit Hilfe eines Phagen-ELISA kontrolliert. Nachdem ein Phage mit dem gewünschten Antikörper gefunden wurde, können verschiedene weitere Versuche durchgeführt werden. Z.B. kann durch eine DNA-Sequenzierung die für das scFv kodierende Basenabfolge ermittelt werden. In dieser Arbeit wurden die erstellten Vektoren nach Transformation in *E. coli* exprimiert, um sie anschließend weiter zu charakterisieren (Kapitel 2.3) (12).

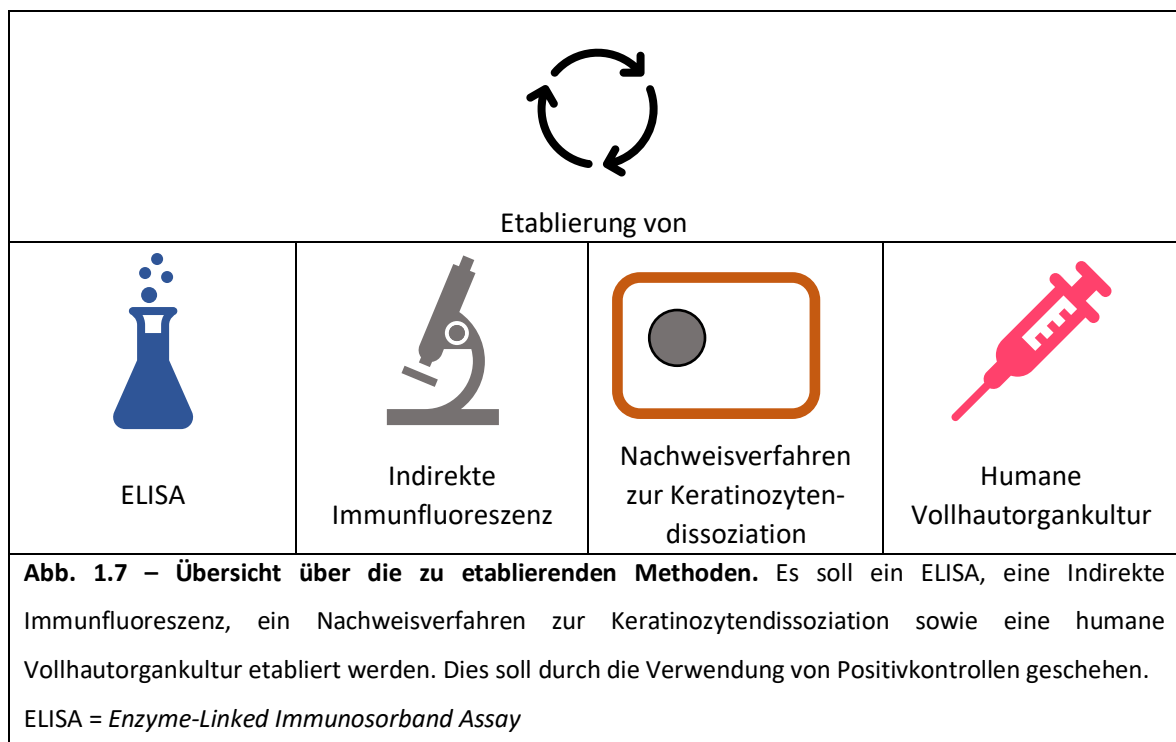
1.5.1 Phagenbibliothek PV3a

In dieser Arbeit wurden Phagen der Phagenbibliothek PV3a verwendet. Die zur Erzeugung der Phagen genutzte DNA entstammt einem PV-Patienten, welcher als PV3 bezeichnet wird. Bei dem männlichen Patienten wurde 2006 erstmals ein mukokutaner PV diagnostiziert. Der Patient war zu dem Zeitpunkt 34 Jahre alt und anamnestisch bestand seit etwa einem Jahr eine Blasenbildung, welche nicht systemisch therapiert wurde. Anfängliche Dsg-Antikörper-Titer betrugen 1:128 und 1:256. Es wurde zunächst eine Therapie mit systemischen Corticosteroiden 10 Milligramm (mg) pro Tag (d) und MMF 1 Gramm (g) pro Tag begonnen, woraufhin nach 3,5 Monaten eine Remission erreicht werden konnte. Im September 2009, September 2011 sowie im Mai 2012 kam es zu Krankheitsrezidiven, nachdem zwischen den Rezidiven die Therapie unterbrochen worden ist. Die Phagenbibliothek PV3a wurde aus am 18. Mai 2012 während des dritten Rezidivs gewonnenen Blutproben erstellt. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Patient PV3 mit Corticosteroiden (20 mg/d) und MMF (1,5 g/d) behandelt (50).

1.6 Zielsetzung und Fragestellungen

In dieser Arbeit soll die Rolle von Nicht-Dsg-Antikörpern in der Pathogenese von PV untersucht werden. Hierzu wurden zuvor aus der Pagenbibliothek PV3a TPO-scFv selektiert, deren Fähigkeiten weiter charakterisiert werden sollen. Die zur Analyse verwendeten Methoden müssen zunächst mit bereits bekannten scFv etabliert werden. Es sollen Protokolle für einen ELISA, eine IIF, ein Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation sowie eine humane Vollhautorgankultur erstellt werden (**Abb. 1.7**). Außerdem sollen Hautproben auf ein mögliches Vorkommen des Schilddrüsenenzym TPO hin untersucht werden. Aus diesen Zielen ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Gelingt der Nachweis von TPO in humaner Haut?
2. Gelingt es Protokolle für die Methoden ELISA, IIF, Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation sowie humane Vollhautorgankultur zu etablieren, mit denen scFv charakterisiert werden können.
3. Welche Eigenschaften besitzen die Nicht-Dsg-scFv? Sind sie in der Lage an TPO zu binden? Reagieren sie auch mit weiteren Antigenen? Lässt sich ein Bindungsnachweis im ELISA auch auf Gewebe übertragen und sind die scFv möglicherweise sogar in der Lage einen pathogenen Effekt auszulösen?



2. Material und Methoden

2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR ist eine Methode, durch die auf schnelle Art und Weise DNA vermehrt werden kann. Eine PCR verläuft in Zyklen, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten besteht (**Abb. 2.1**).

Der erste Schritt wird als Denaturierung bezeichnet. In diesem wird die DNA für etwa 15 Sekunden (s) auf 95 °C erhitzt, wodurch die DNA in ihre Einzelstränge getrennt wird. Im nächsten Abschnitt, der sog. Primerhybridisierung, wird die DNA auf 54 °C abgekühlt, wodurch sich Primer an die Einzelstränge anlagern. Im dritten und letzten Schritt, welcher als DNA-Elongation bezeichnet wird, wird der Ansatz mit der DNA auf 72 °C erwärmt, wodurch mit Hilfe des Enzyms *Thermus aquaticus* (Taq)-Polymerase der komplementäre Strang des DNA-Einzelstrangs gebildet wird (51).

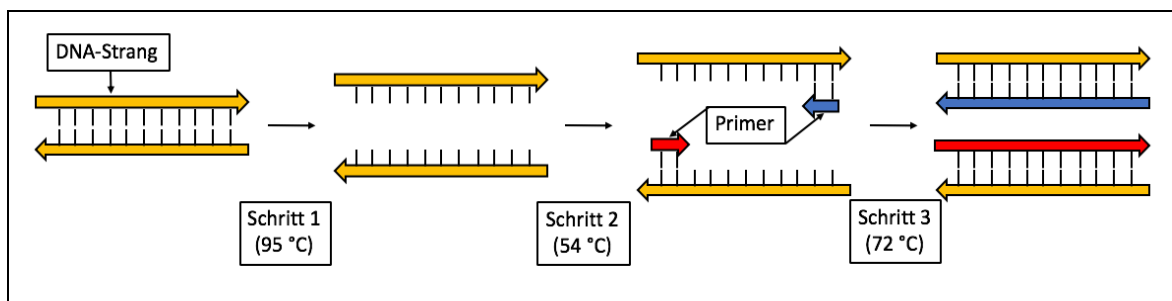


Abb. 2.1 - Ablauf einer Polymerase-Kettenreaktion. Im ersten Schritt wird durch Erhitzen auf 95 °C der DNA-Doppelstrang in Einzelstränge aufgeteilt. Im zweiten Schritt erfolgt durch Abkühlen auf 54 °C die Anlagerung der Primer an die Einzelstränge. Im dritten und letzten Schritt führt ein Erhitzen auf 72 °C zur Aktivierung der Taq-Polymerase, wodurch erneut Doppelstränge gebildet werden. Nach (51).

DNA = Desoxyribonukleinsäure; Taq = *Thermus aquaticus*

In dieser Arbeit musste die DNA zunächst hergestellt werden. Hierzu wurde zuerst RNA aus humaner Haut isoliert und anschließend in DNA umgewandelt. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit eine Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt. Dies ist eine Form einer PCR, mit deren Hilfe sich die Menge an amplifizierter DNA nach einer festgesetzten Wiederholung von PCR-Zyklen quantifizieren lässt.

2.1.1 Isolation von Ribonukleinsäure und Synthese von komplementärer Desoxyribonukleinsäure

Bei -80 °C gelagerte Hautproben wurden in einer mit flüssigem Stickstoff gefüllten Schüssel mit einem Mörser zu Pulver zermahlen und anschließend in ein 1,5 Milliliter (mL) Eppendorfgefäß überführt. Das Eppendorfgefäß wurde erst geschlossen, nachdem der Stickstoff verdampft war. Anschließend wurden 500 Mikroliter (µL) Trizol (Cat# 15596018, Thermo scientific) hinzugefügt und die Probe für 15 s mit dem Vortexer gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten (min) bei Raumtemperatur (RT) wurde der Ansatz bei 4 °C, für 5 min und 1000-facher Erdbeschleunigung (G)

zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und das Pellet verworfen. Zum Überstand wurden 100 µL Chloroform (Cat# 2475-1000, Chemsolute) hinzugefügt, anschließend für 3 min bei RT inkubiert und bei 4 °C, für 15 min und 12000 G zentrifugiert. In dem Eppendorfgefäß bildete sich nun eine obere wässrige und eine untere Phase, die durch eine Interphase getrennt wurden. Die wässrige Phase wurde ohne die Interphase zu berühren abpipettiert und in ein neues Gefäß überführt. Um die RNA zu fällen, wurden 500 µL Isopropanol (Cat# 1136-1000, Chemsolute) hinzugefügt, bei RT für 10 min inkubiert und daraufhin bei 4 °C, für 10 min und 12000 G zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zu der Probe wurden 850 µL 70 % Ethanol (Cat# T913.3, Roth) dazugegeben, danach kurz durchmischt und ein weiteres Mal bei 4 °C, für 10 min und bei 12000 G zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Es wurden ein zweites Mal 850 µL 70 % Ethanol hinzugefügt und ein weiteres Mal zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet an der Luft getrocknet. Abschließend wurde das getrocknete Pellet in 50 µL Nuklease-freiem Wasser resuspendiert (Cat# AM9937, Ambicon). Die Konzentration der RNA wurde mit Hilfe eines Nanodrops der Firma Implen ermittelt.

Die Synthese von cDNA erfolgte mit Hilfe und anhand des Protokolls des *Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit* der Firma Thermo Scientific (52). Die Durchführung der Pipettierschritte erfolgte unter einer UV-Reinigungsbox der Firma Biosan. Es wurden 2 µL RNA, 1 µL Oligo (dT)₁₈ Primer sowie 9 µL Nuklease-freies Wasser vermischt. Anschließend wurden diese 12 µL mit 4 µL 5X Reaktionspuffer, 1 µL RiboLock RNase Inhibitor, 2 µL 1 milimolarem (mM) dNTP Mix und 1 µL *RevertAid* M-MuLV reverser Transkriptase zu insgesamt 20 µL aufgefüllt. In einem Thermozykler der Firma BioRad wurden zur Durchführung der PCR folgende Einstellungen vorgenommen: zuerst Inkubation bei 42 °C für 60 min, gefolgt von 70 °C für 5 min. Das Produkt wurde bei – 20 °C gelagert. Zur Kontrolle der erfolgreichen Synthese von cDNA wurde diese anschließend zu DNA umgeschrieben. Die Synthese von DNA wurde mit dem *Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit* der Firma Thermo Scientific (52) durchgeführt. Die Durchführung der Pipettierschritte erfolgte unter einer UV-Reinigungsbox der Firma Biosan. Es wurde 1 µL 1:1000 in Nuklease-freiem Wasser verdünnte cDNA mit 2,5 µL PCR-Puffer (Cat# M791A, Promega), 0,5 µL 10 mM dNTP Mix, 0,75 µL 25 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂) (Cat# F-510MG, Thermofisher), jeweils 1,5 µL Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Vorwärts- und Rückwärts-Primer (**Tab. 2.1**), 0,5 µL DNA-Polymerase (Cat# M7841, Promega) und 18 µL Nuklease-freies Wasser zu insgesamt 25 µL zusammengeführt. Anschließend wurde eine PCR mit folgenden Einstellungen durchgeführt: zu Beginn ein initialer Denaturierungsschritt mit 94 °C für 3 min, anschließend 35 Zyklen mit jeweils 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Primerhybridisierung bei 58 °C und 45 s DNA-Elongation bei 72 °C. Die erzeugte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.1.2 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die RT-PCR bzw. quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) erfolgte mit Hilfe des *SYBR® Select Master Mix* (Cat# 4472908, Thermofisher) (SYBR). Bei der Durchführung wurde sich am Benutzerhandbuch für SYBR (53) orientiert und erfolgte unter einer UV-Reinigungsbox der Firma Biosan. In eine PCR-Platte wurden in jedes Well, das für die PCR genutzt werden soll, 7 µL Nuklease-freies Wasser pipettiert. Die PCR-Platten und Substanzen wurden während der gesamten Vorbereitung auf Eis gelagert. Anschließend wurden Mikroreaktionsgefäße mit unterschiedlichen Primerpaaren vorbereitet. Es sind jeweils 3 µL vorwärts und 3 µL rückwärts Primer verwendet worden. Die genutzten Primer hatten die folgenden Basensequenzen (**Tab. 2.1**).

Tab. 2.1 – Primerübersicht.

Dsg3 = Desmoglein 3; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase;
TPO = Thyreoperoxidase

Primer	Basenfolge
GAPDH vorwärts	5'-ACA ACT TTG GTA TCG TGG AAG G-3'
GAPDH rückwärts	5'-GCC ATC ACG CCA CAG TTT C-3'
TPO vorwärts	5'-GTC TGT CAC GCT GGT TAT GG-3'
TPO rückwärts	5'-CAA TCA CTC CGC TTG TTG GC-3'
Dsg3 vorwärts	5'-GCA AAA ACG TGA ATG GGT GAA A-3
Dsg3 rückwärts	5'-TCC AGA GAT TCG GTA GGT GAT T-3'

In einigen Versuchen sind die Primer unterschiedlich stark verdünnt worden. Die Verdünnung erfolgte mit Nuklease-freiem Wasser. Zu den Primerpaaren wurden im nächsten Schritt 30 µL SYBR hinzugefügt. Ein Mikroreaktionsgefäß enthielt nun 3 µL Vorwärts-Primer, 3 µL Rückwärts-Primer und 30 µL SYBR als Primer-SYBR-Gemisch. Anschließend wurde 1 µL cDNA (Kapitel 2.1.1) in jedes Well pipettiert. Als Negativkontrolle (NK) wurde jeweils 1 µL Nuklease-freies Wasser verwendet. Danach wurden die Pipettierschritte beendet, indem jeweils 12 µL Primer-SYBR-Gemisch in ein Well pipettiert wurden. Abschließend wurde die PCR-Platte mit einer PCR-Folie abgedeckt. Zusammenfassend enthielt ein Well: 7 µL Nuklease-freies Wasser (bzw. 8 µL im Fall der NK), 1 µL cDNA (bzw. 0 µL im Fall der NK), 1 µL Vorwärts- und 1 µL Rückwärts-Primer sowie 10 µL SYBR. Die RT-PCR wurde mit einem RT-PCR-System anhand des SYBR-Benutzerhandbuches (53) mit folgenden Einstellungen durchgeführt (**Tab. 2.2**):

Tab. 2.2 – Einstellungen der Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion.

DNA = Desoxyribonukleinsäure; UDG = Uracil-Desoxyribonukleinsäure-Glycosylase

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
UDG-Aktivierung	50 °C	2 min	Einmalig
Aktivierung der DNA-Polymerase	50 °C	2 min	Einmalig
Denaturierung	95 °C	15 s	40
Primerhybridisierung	58 °C	15 s	
Elongation	72 °C	1 min	

2.1.3 Agarose-Gel

Zu Beginn des Verfahrens wurde 1X Trishydroxymethylaminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure- (TAE)-Puffer aus 100 mL 10X TAE-Puffer (Cat# 155806, Thermo Scientific) und 900 mL Nuklease-freiem Wasser hergestellt. Nach dem Vermischen von 120 mL 1X TAE und 1,2 g Agarose (Cat# 732-2789P, VWR), wurde das Gemisch für 2 min in der Mikrowelle erwärmt und anschließend zum Abkühlen auf einen Rührer gestellt. Nach dem Abkühlen und Hinzufügen von 2 µL Ethidiumbromid (Cat# 2218.1, Roth) konnte das Gel in eine Gelkammer gegossen werden. Es wurden jeweils 20 µL Proben und 2 µL *Gel Loading Dye* (Cat# B7025S, Biolabs) in ein Gelfach pipettiert. Als Marker dienten 8 µL DNA-Leiter (Cat# SM0313, Thermo scientific). Das Gel wurde bei 100 Volt, 400 Ampere und für mindestens 45 min laufen gelassen. Für die Gelelektrophorese wurde ein weites Gelelektrophorese-System der Firma BioRad verwendet.

2.2 Antikörperproben

In dieser Arbeit wurden insgesamt sechs unterschiedliche scFv auf ihre Bindungseigenschaften und Pathogenität untersucht. Drei von diesen waren bereits veröffentlichte scFv und dienten zur Etablierung der Methoden. Drei weitere wurden mittels APD selektiert und anschließend mit den durch die Positivkontrollen etablierten Methoden charakterisiert. Einen Überblick über die verwendeten scFv gibt **Tab. 2.3**.

2.2.1 Positivkontrollen

Es wurden drei scFv als Positivkontrollen verwendet: scFv 4.2, scFv 3.2 und scFv px4-3. Für diese scFv konnte bereits eine Bindung an Dsg gezeigt werden (54, 55). ScFv 4.2 und scFv 3.2 zeigten eine Aktivität gegen Dsg3, während px4-3 an Dsg1 und Dsg3 bindet. Zur Verfügung gestellt wurden die scFv von Dr. Dr. Christoph Hammers.

2.2.2 Nicht-Desmoglein-Antikörper

Nachdem mithilfe der Positivkontrollen Methoden etabliert worden sind, um scFv zu untersuchen, wurden drei weitere scFv mit diesen Methoden getestet. Bei der Durchführung des APD (12) zur Gewinnung dieser scFv, wurde darauf geachtet, dass nicht gegen Dsg, sondern das Enzym TPO selektiert wird. Es konnten sechs Nicht-Dsg-scFv gewonnen werden, von denen drei in dieser Arbeit weiter charakterisiert wurden. Bei diesen handelt es sich um: scFv TPO 3.1, scFv TPO 3.3 und scFv TPO 3.6. Das APD (12) wurde von Dr. Dr. Christoph Hammers an der *University of Pennsylvania* in Philadelphia durchgeführt. Anschließend wurden die auf pComp3x-Vektoren gespeicherte DNA nach Lübeck geschickt.

Tab. 2.3 – Überblick über verwendete variable Einzelkettenfragmente.

scFv = *Single chain variable fragment*

Gruppe	Name	Bekannte Antigene
Positivkontrollen	scFv 4.2	Desmoglein 3
	scFv 3.2	Desmoglein 3
	scFv px4-3	Desmoglein 1 und 3
Nicht-Desmoglein-Antikörper	scFv TPO 3.1	Thyreoperoxidase
	scFv TPO 3.3	Thyreoperoxidase
	scFv TPO 3.6	Thyreoperoxidase

2.3 Antikörperexpression

Ziel der Antikörperexpression war es die scFv TPO 3.1, TPO 3.3 und TPO 3.6, deren DNA auf Vektoren codiert worden, war (Kapitel 2.2.2), zu exprimieren und aufzureinigen, damit diese anschließend mit weiteren Methoden untersucht werden konnten. Einen Überblick über das Verfahren gibt **Abb. 2.2**.

Vor Beginn der Antikörperexpression mussten einige Puffer und Nährmedien hergestellt werden (**Tab. 2.4**).

Die Antikörperexpression erstreckte sich über einen Zeitraum von vier Tagen. Am ersten Tag wurden Plasmide, welche die Erbinformation für die scFv beinhielten, in *E.coli* integriert und Bakterienkolonien angelegt. Im ersten Schritt wurden hierzu bei -80 °C gelagerte TOP10F' Zellen (Cat# 44-0300, Invitrogen) auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden in die Bakterien Plasmide integriert. Die auf Papier gelagerten Plasmide wurden mit einer 4 Millimeter (mm) Hautprobenstanze ausgestanzt und in ein 1,5 mL *Protein LoBind Tube* gelegt. In die Gefäße wurden 100 µL Nuklease-freies Wasser pipettiert und 10 min auf einen Rührer gestellt, um das Papier aufzulösen. Nach kurzer Zentrifugation des Eppendorfgefäßes wurde anschließend der Überstand

in ein weiteres Eppendorfgefäß überführt. 5 µL des überführten Überstandes wurden in die Gefäße der TOP10F⁺ Zellen pipettiert und auf Eis gelagert.

Tab. 2.4 – Puffer für Antikörperexpression.

dH₂O = Destilliertes Wasser; MOPS = 3-N-Morpholinopropansulfonsäure; NaCl = Natriumchlorid; NaH₂PO₄·2H₂O = Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat; Na₂HPO₄·2H₂O = Dinatriumhydrogenphosphat-Monohydrat; RT= Raumtemperatur

Puffer	Rezept
2 L <i>Super Broth medium</i> (SB-Medium)	60 g Trypton (Cat# BP9726-2, Fisher scientific), 40 g Hefeextrakt (Cat# BP1422-2, Fisher scientific) und 20 g MOPS (Cat# BP308-500, Fisher scientific) in 1930 mL dH ₂ O auflösen, anschließend autoklavieren und luftdicht verschließen. Lagerung bei RT.
1 L <i>Lysogeny Broth Medium</i> (LB-Medium)	25 g <i>Lysogeny Broth Boullion Miller</i> (Cat# BP1426-2, Fisher scientific) in 1 L dH ₂ O auflösen. Lagerung bei 4 °C
1 L <i>Lysogeny Broth</i> /Carbenicillin-Agarplatte (LB/CB- Agarplatte)	40 g <i>Lysogeny Broth Agar</i> (Cat# BP1425-500, Fisher scientific) in 1 L dH ₂ O auflösen, autoklavieren und auf 60 °C abkühlen lassen. Anschließend 1 mL Carbenicillin (Cat# C1389, Sigma) hinzufügen und Agar in Petrischalen ausstreichen. Lagerung bei 4°C.
500 mL 50P/300N-Puffer	3,9 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O (Cat# 1.06342.1000, Emsure), 4,45 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (Cat# 4984.1, Roth) sowie 8,75 g NaCl (Cat# BP358-10, Fisher scientific) in 500 mL <i>Nanopure Water</i> auflösen. PH-Wert von 7,0 einstellen und mit einem Filtropur V50 0.22 µm, 500 mL Filter steril filtrieren. Lagerung bei RT.
500 mL Elutionspuffer (EP)	3,9 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, 4,45 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O sowie 8,75 g NaCl und 10,21 g Imidazol (Cat# 10784564, Fisher scientific) in 500 mL <i>Nanopure Water</i> auflösen. Anschließend mit einem Filtropur V50 0.22 µm, 500 mL Filter steril filtrieren. Lagerung bei RT.

Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien für exakt 30 s auf 42 °C erhitzt und unmittelbar danach wieder in Eis gestellt. Zu den Bakterien wurde nun 250 µL *Super Optimal Broth Medium* (SOC-Medium) (Cat# S1797, Sigma), welches zuvor in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt worden war, pipettiert. Anschließend wurden die Bakterien in dem Medium für 1 h, bei 250 Runden pro Minute (rpm) und 37 °C in einen Schüttelinkubator gestellt. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden 1:10 und 1:1000 Verdünnungen der Bakterienkultur mit 37 °C warmem SOC-Medium hergestellt. Der letzte Schritt des ersten Tages bestand darin, jeweils 50 µL der Verdünnungen auf eine *Lysogeny Broth*/Carbenicillin-Agarplatte (LB/CB-Agarplatte) zu pipettieren und auszustreichen.

Die Platten wurden für 15 min, 250 rpm und 37 °C verkehrtherum in den oben genannten Schüttelinkubator gestellt, danach umgedreht und für weitere etwa 22 h inkubiert.

Ziel des zweiten Produktionstages war es, eine Startkultur anzusetzen und diese für eine weitere Nacht wachsen zu lassen. Hierzu wurde eine einzelne Kultur von den angesetzten LB/CB-Agarplatten entnommen. Diese wurde zusammen mit 25 mL eines SB/CB-Medium (bestehend aus 25 mL SB-Medium und 25 µL des CB-Stocks) sowie 500 µL 1M MgCl₂ in einen 125 mL Erlenmeyerkolben mit einer 0,2 Mikrometer (µm) Ventilationskappe gefüllt. Der Erlenmeyerkolben wurde in den Schüttelinkubator gestellt und über Nacht (ÜN) bei 30 °C und 250 rpm inkubiert (**Abb. 2.2**).

Am dritten Tag wurde eine größere 200 mL Bakterienkultur in einem 500 mL Erlenmeyerkolben angesetzt und ÜN wachsen gelassen. Zusätzlich wurde ein Glycerolstock angelegt und eingefroren, um im Falle eines Fehlschlags bei der weiteren scFv-Produktion und Aufreinigung, den Stock aufzutauen und am dritten Produktionstag neu beginnen zu können. Der Glycerolstock wurde in einem Kryoröhrchen aus 500 µL der Bakterienkultur und 500 µL eines 30 % Glycerol (Cat# G5516, Sigma)/LB-Gemisches hergestellt und bei -80 °C gelagert. Des Weiteren wurde 1,5 mL der Startkultur in ein Eppendorfgesäß pipettiert und anschließend zentrifugiert, sodass ein Pellet entstand. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet bei -20 °C gelagert, um gegebenenfalls die Sequenz des Plasmids nachweisen zu können. Die 200 mL Bakterienkultur wurde angesetzt, indem die Startkultur 1:100 verdünnt wurde. Zu 200 mL SB/CB-Medium (aus 200 mL-SB Medium und 200 µL CB Stock) wurden 2 mL Startkultur und 4 mL 2M MgCl₂ hinzugefügt. Die Kultur wurde bei 37 °C und 300 rpm für ungefähr 3 h im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde mit einem Photometer die optische Dichte (O.D.) ermittelt. War die O.D. < 0,6 wurde weiter inkubiert und erneut gemessen. Bei einer O.D. von 0,6 – 0,8 wurden 200 µL Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) hinzugefügt, wodurch die scFv-Expression gestartet wurde (**Abb 2.2**). Die Kultur mit dem IPTG wurde nun ÜN bei 30 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

Ziel des vierten Tages war es ein Baktierenpellet zu erzeugen, dieses zur Proteinfreisetzung aufzubrechen und die scFv zu extrahieren. Außerdem wurde zur Kontrolle ein Natriumdodecylsulfat-Gel (SDS-Gel) hergestellt. Zu Beginn des Tages wurde die Bakterienkultur aus dem Schüttelinkubator genommen und in 500 mL Zentrifugeflaschen umgefüllt, welche bei 7000 G für 30 min in einer Avanti™ J-25 Zentrifuge zentrifugiert wurden. Anschließend wurden 50 mL des Überstandes in ein Falconröhrchen gefüllt und bei -20 °C gelagert. Der restliche Überstand wurde verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 20 mL eines Lysepuffers (bestehend aus 18 mL *Nanopure Water* und 2 mL *Fast Break Cell Lysis Buffer 10x* (Cat# V587C, Promega) sowie 20 µL DNase1 (*RNase-free*) (Cat# M0303S, Biolabs) aufgelöst. Das resuspendierte Pellet wurde in ein 50 mL Falconröhrchen gefüllt und für 1 h auf einer rotierenden Plattform gelassen.

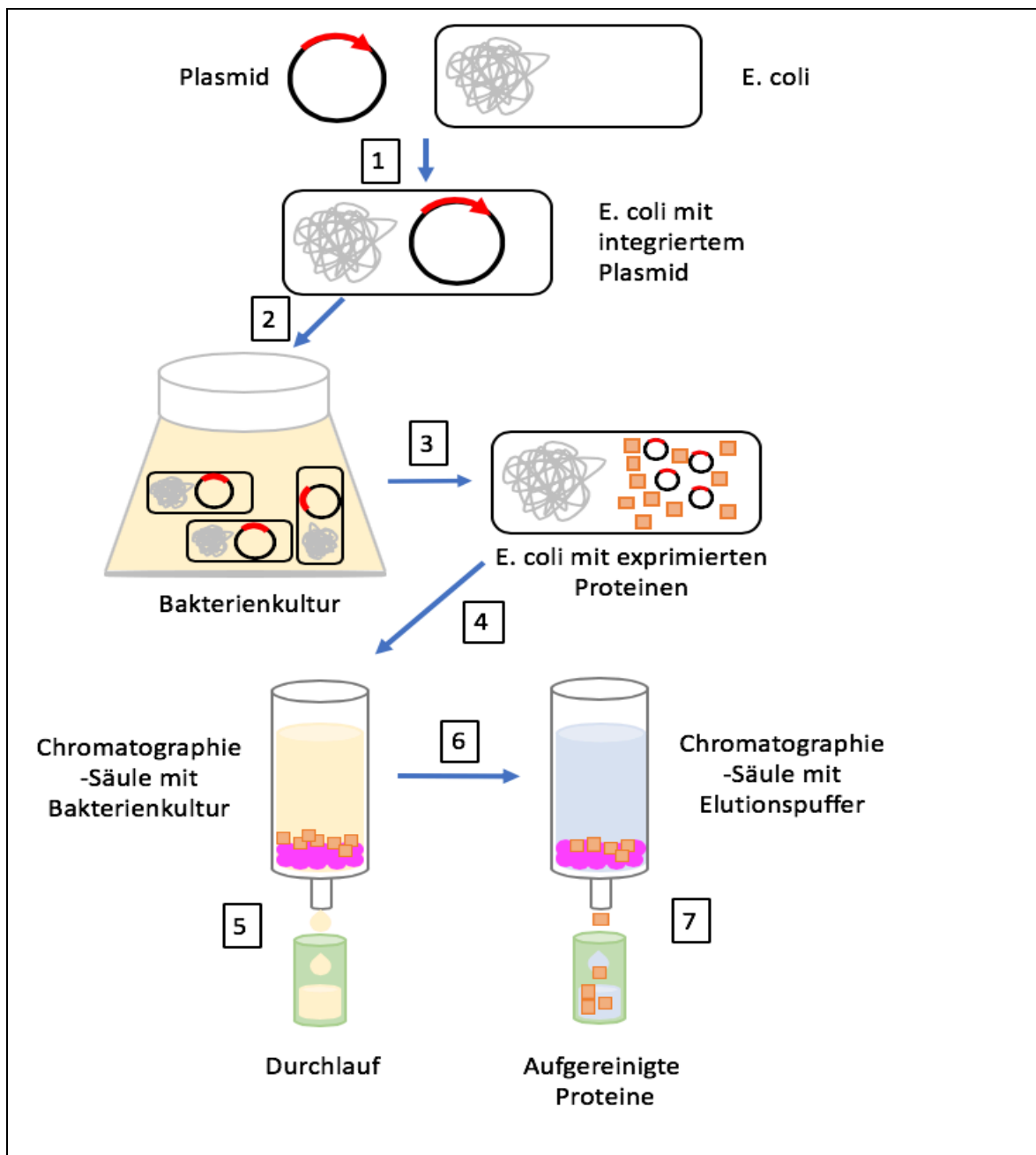


Abb. 2.2 – Darstellung einer Proteinexpression. Ein die DNA des scFv (roter Pfeil) enthaltener Vektor wird in E. coli integriert (1). Das Anlegen und Bebrüten einer Bakterienkultur (gelb) führen zur Vermehrung der Bakterien (2). Nach Zugabe von IPTG (3) beginnt die Expression der Proteine (orange Quadrate). Die Bakterien werden nun lysiert und zusammen mit *Talon Resin Matrix* (rosa) in eine Chromatographie-Säule gefüllt (4). Dort bleiben die Proteine an der *Talon Resin Matrix* hängen, während die übrigen Bestandteile der Kultur durch die Säule laufen (5). Dies führt zur Aufreinigung der Proteine. Nach mehrfachem Waschen wird die Elution durch Zugabe von Elutionspuffer (blau) begonnen (6). Dies führt zum Ausfallen der aufgereinigten Proteine (7). Nach Herstellung eines Natriumdodecylsulfat-Gels zur Überprüfung der Expression erfolgt eine Dialyse, in der Elutionspuffer durch *Dulbecco's-Phosphate buffered saline* ersetzt wird (nicht dargestellt).

DNA = Desoxyribonukleinsäure; E. coli = Escherichia coli Bakterium; IPTG = Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid; scFv = *Single chain variable fragment*

Nach dem Entfernen des Falconröhrchens von der Plattform wurde die Lösung in ein 15 mL Beckmann-Röhrchen gefüllt und für 15 min bei 7000 G zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand aus dem Beckmann-Röhrchen zusammen mit vorbereitetem *Talon Metal Affinity Resin* (Cat# 635502, Clontech) (Talon) und 600 µL Elutionspuffer (EP) in ein Falconröhrchen überführt und für eine weitere h auf die rotierende Plattform gestellt. Zur Vorbereitung des Talons wurden 750 µL Talon in ein Eppendorfgefäß gefüllt und bei 800 G für 2 min zentrifugiert, der entstandene Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Anschließend wurde das Talon dreimal mit 50P/300N-Puffer gewaschen, indem jeweils 600 µL Puffer zu dem Talon pipettiert, für 2 min bei 800 G zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde.

Nun wurde mit der Aufreinigung der scFv begonnen. Diese erfolgte in einer Chromatographie-Säule. Zu Beginn wurde die Säule einmal mit 20 mL 50P/300N Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Gemisch aus vorbereitetem Talon und dem Überstand des Bakterienlysats von der rotierenden Plattform genommen und durch die Säule laufen gelassen (**Abb. 2.2**). Die Menge an durchgelaufenem Gemisch (der sog. Durchlauf) wurde aufgefangen und ein weiteres Mal durch die Säule laufen gelassen. Der zweite Durchlauf wurde ebenfalls aufgefangen und bei 4 °C gelagert. Nach einem weiteren Waschschriff mit 50P/300N-Puffer wurde das Falconröhrchen, das zuvor das Gemisch aus Talon und Bakterienlysat enthielt, mit 10 mL 50P/300N Puffer gespült und ebenfalls durch die Säule laufen gelassen. Danach wurde die Elution durchgeführt, indem dreimal 1400 µL EP durch die Säule laufen gelassen und anschließend in Eppendorfgefäßen, welche auf Eis standen, aufgefangen wurden (**Abb. 2.2**).

Zur Kontrolle einer erfolgreichen Proteinexpression wurde nun eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Kapitel 2.4) durchgeführt. Konnte eine gelungene Expression bestätigt werden, wurden die scFv anschließend dialysiert.

Die Dialyse erfolgte, indem maximal 4 mL der zu diesem Zeitpunkt in EP verdünnten scFv in ein Amicon Ultra-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert wurden. Anschließend wurden 4 mL *Dulbecco's-Phosphate buffered saline* (Cat# 14190, Gibco) (DPBS) in das Zentrifugenröhrchen pipettiert und erneut bei 4000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 3-mal wiederholt. Die nun in DPBS verdünnten Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Im Falle des scFv TPO 3.1 wurde außerdem eine weitere Proteinexpression durchgeführt und das scFv in größeren Mengen produziert. Hierzu wurde an Tag 2 mit dem Herstellen einer Startkultur aus einer Bakterienkolonie begonnen, wie oben beschrieben. Allerdings wurde an Tag 3 eine 1 L anstelle einer 200 mL Bakterienkultur angesetzt, indem zu 1000 mL SB/CB-Medium und 20 mL 1M MgCl₂ 10 mL Startkultur hinzugegeben wurden. Auch die nach 3 h Inkubation zugegebene IPTG-Menge betrug 1 mL anstelle von 200 µL. Ansonsten verliefen Tag 3 und 4 genauso wie oben

beschrieben. Aufgrund der großen Kulturmenge wurden bei der Elution jedoch zehnmal 1400 μ L EP durch die Säule laufen gelassen, anstelle von dreimal.

2.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Kontrolle der Proteinexpression wurde eine SDS-PAGE durchgeführt.

Bei der Vorbereitung des Gels wurde sich aufgrund der verwendeten Substanzen am Protokoll der Firma BioRad (56) orientiert. Zu Beginn wurden die Proben vorbereitet, indem sie 1:4 in Probenpuffer (PP) verdünnt wurden. Für 1 mL PP wurden 900 μ L 4x Laemmli Stock (Cat# 161-0747, BioRad) und 100 μ L 2-Mercaptoethanol (Cat# M3148, Sigma) vermischt. In einigen Fällen wurden die Proben vor der Zugabe von PP in PBS verdünnt, um unterschiedliche Konzentrationen zu erhalten. Die Proben wurden mit einem Wärmeblock für exakt 3 min auf 95 °C erhitzt und unmittelbar danach für 5 min auf Eis gestellt. In dieser Arbeit wurden ausschließlich *Mini-Protean Precast Gels* verwendet. Das Gel wurde vorbereitet, indem der Kamm und das grüne Tape entfernt wurden, sowie das Gel einmal mit dH₂O gespült wurde. Anschließend wurde das Gel in ein kleines Gelelektrophorese-System der Firma BioRad gestellt und die Kammern mit *Running buffer* (Cat# 161-1093, BioRad) gefüllt. Zuerst wurde die innere Kammer bis zur oberen Kante der Gele befüllt, danach die äußere bis zur vorgesehenen Markierung. Nun wurde das Gel mit jeweils maximal 30 μ L der in PP verdünnten Proben beladen. Außerdem wurde in einem Gelfach eine Proteinleiter (Cat# 26634, Thermo Scientific) zur Bestimmung der Proteingrößen verwendet. Das Gel wurde bei 200 Volt, 400 Ampere und für 30 bis 60 min laufen gelassen. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel einmal mit dH₂O gewaschen und geöffnet. Anschließend wurde es zum Waschen dreimal für 5 min mit dH₂O auf eine Schüttelplattform gestellt. Die Färbung erfolgte auf der Schüttelplattform für 1 h mit circa (ca.) 20 mL *Simply blue safe stain* (Cat# LC6060, Invitrogen). Die Entfärbung erfolgte mit dH₂O für dreimal 5 min und anschließendem Belassen des Gels auf der Schüttelplattform in dH₂O ÜN. Am nächsten Tag wurde das Gel von der Schüttelplattform genommen, eingeschweißt und zur Dokumentation eingescannt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.5 Enzymgebundener Immunadsorptionsnachweis

Alle Antikörper wurden nach ihrer Expression durch einen ELISA auf ihre Bindungsaffinität an verschiedene Antigene getestet. Der ELISA ist eine Methode zum Nachweis von verschiedenen Substanzen. Dies können Proteine wie z.B. Antigene oder Antikörper sein. Es ist jedoch auch möglich kleinere Stoffe wie z.B. Hormone zu messen. Der zu untersuchende Stoff wird an einer Oberfläche immobilisiert, was auch als *Coating* bezeichnet wird. Es wird zwischen verschiedenen ELISA-Verfahren, wie dem direkten, dem indirekten (**Abb. 2.3**) oder dem Sandwich-ELISA unterschieden.

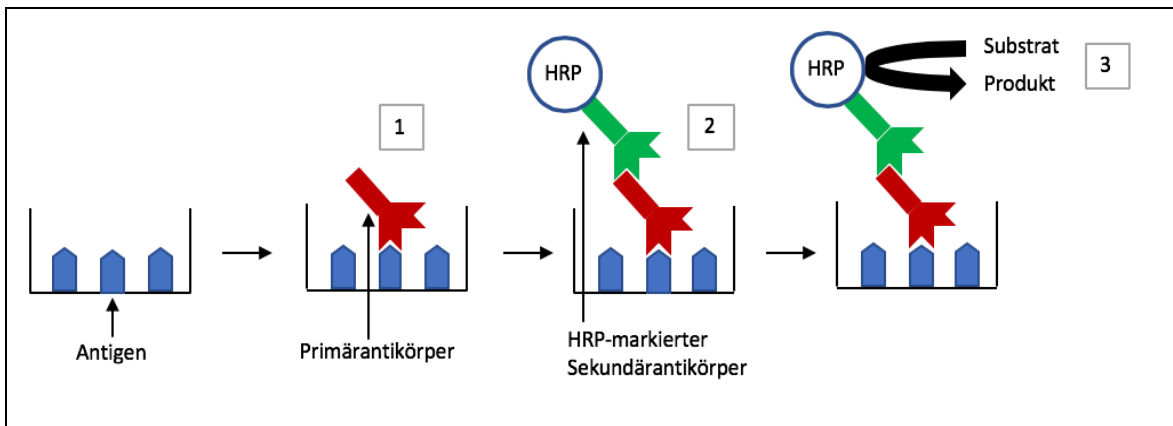


Abb. 2.3 - Ablauf eines indirekten enzymgebundenen Immunadsorptionsnachweises. Zuerst erfolgte die Inkubation mit einem Primärantikörper (1). Anschließend wird mit einem HRP-markiertem Sekundärantikörper inkubiert (2). Im nächsten Schritt wird das Substrat hinzugefügt, welches durch die HRP umgesetzt wird (3). Durch Messen der Farbintensität des Produkts kann der Versuch ausgewertet werden. Nach (57).

HRP = *Horseradish Peroxidase*

Alle Verfahren beruhen darauf, dass ein Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt wurde, direkt oder indirekt an den immobilisierten Stoff bindet. Das Enzym ist häufig, wie auch in dieser Arbeit, eine Meerrettichperoxidase bzw. engl. *Horseradish Peroxidase* (HRP), welche in der Lage ist ein Substrat umzusetzen und dadurch eine Farbreaktion hervorzurufen. Das Ausmaß dieser Reaktion kann abschließend gemessen und ausgewertet werden (58).

Die zur Durchführung der ELISA verwendeten Puffer können **Tab. 2.5** entnommen werden.

Tab. 2.5 – Puffer für Enzymgebundenen Immunadsorptionsnachweis.

BSA = Bovines Serum Albumin; CaCl_2 = Calciumchlorid; RT = Raumtemperatur; TBS = *Tris-buffered saline*

Puffer	Rezept
50 mL Verdünnungspuffer (VP)	5 mL 10X TBS (Cat# 1706435, BioRad), 45 mL <i>Nanopure Water</i> sowie 25 μL 2M CaCl_2 zu 0,5 g BSA (Cat# A-7906, Sigma) hinzufügen und anschließend mit einem Filtropur S 0,2 Filter filtrieren. Lagerung bei 4 °C.
500 mL Waschpuffer (WP)	50 mL 10X TBS, 250 μL 2M CaCl_2 und 450 mL <i>Nanopure Water</i> vermischen, anschließend Hinzufügen von Tween© 20 (Cat# PAH5152, VWR) bis zu einer Endkonzentration von 0,1 %. Dies entspricht 500 μL Tween© 20 bei 500 mL Waschpuffer. Abschließend den Puffer mit einem Filtropur V50 0.2, 500 mL Filter steril filtriert. Lagerung bei RT.

In dieser Arbeit wurden verschiedene ELISA-Kits der Firma EUROIMMUN genutzt, die jeweils mit unterschiedlichen Antigenen beschichtet waren (**Tab. 2.6**).

Tab. 2.6 – Verwendete EUROIMMUN Enzymgebundene Immunadsorptionsnachweis-Kits.	
Antigen	Katalognummer
Desmoglein 1	EA1495-4801G
Desmoglein 3	EA1496-4801G
Thyreoperoxidase (TPO)	EA1012-9601G
Bullöses Pemphigoid Antigen 1 (BP180)	EA1502-4801-2G

Bei der Durchführung wurde sich an den Protokollen der oben genannten ELISA-Kits (**Tab. 2.6**) orientiert. Es wurden jedoch Änderungen der Protokolle vorgenommen. Zu Beginn des Experiments wurden die bei 4 °C aufbewahrten ELISA-Kits für etwa 20 min bei RT gelagert. Währenddessen wurden die zu untersuchenden Antikörperproben in unterschiedlichen Mengen Verdünnungspuffer (VP) verdünnt, um verschiedene Konzentrationen zu erhalten. Anschließend wurden jeweils 100 µL der Proben in ein Antigen-beschichtetes Reagenzgefäß pipettiert und für 60 min inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde jedes Reagenzgefäß dreimal kurz mit 180 µL (Waschpuffer) WP gewaschen. Der Sekundärantikörper *Anti-HA-Peroxidase, High Affinity Rat Monoclonal Antibody, Clone 3F10* (Cat# 12013819001, Roche) wurde 1:1000 in VP verdünnt, es wurden je 100 µL in ein Reagenzgefäß pipettiert und für 60 min inkubiert. Nach Ablauf der zweiten Inkubationszeit wurde erneut dreimal mit je 180 µL WP gewaschen. Hinterher wurde in jedes Gefäß 100 µL Chromogen/Substrat-Lösung aus dem ELISA-Kit hinzugefügt und im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion wurde bei deutlicher Blaufärbung oder nach maximal 30 min mit je 100 µL Stopplösung aus dem ELISA-Kit beendet.

Die Auswertung des ELISA erfolgte innerhalb von maximal 30 min nach Hinzufügen der Stopplösung mit Hilfe eines Infinite 200 Pro der Firma TECAN bei einer Messwellenlänge von 450 Nanometern (nm).

Es wurde außerdem ein ELISA durchgeführt, bei dem das Vorgehen abgewandelt werden musste. In diesem Fall wurde kein scFv, sondern ein Anti-TPO Antikörper getestet. Das Vorgehen war identisch, es wurde jedoch der Sekundärantikörper *Goat Anti-Mouse IgG-HRP* (Cat# sc2302, Santa Cruz Biotechnology) verwendet.

2.6 Indirekte Immunfluoreszenz

Die IIF ist ein Immunfluoreszenztest, der genutzt werden kann, um die Bindungen von Antikörpern an Antigene in verschiedenen Geweben oder Zellen zu untersuchen. Hierzu werden Antikörper verwendet, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Diese Fluoreszenzmarker bilden mit

den nachzuweisenden Stoffen Immunkomplexe und können anschließend mit einem Fluoreszenzphotometer ausgewertet werden. Hierbei kann zwischen einer direkten und einer indirekten Immunfluoreszenz unterschieden werden (58).

In dieser Arbeit wurde die IIF verwendet, um die Bindungseigenschaften der scFv an verschiedene Gewebe zu untersuchen. Es wurde sich dabei auf folgende Gewebe beschränkt (**Tab. 2.7**):

Tab. 2.7 – Für die indirekte Immunfluoreszenz verwendete Gewebe.	
Gewebe	Herstellung/Katalognummer
Kryofixierte Humane Haut	Selbstangefertigte Gefrierschnitte
Ösophagus (Affe)	Cat# 1501-1005, EUROIMMUN
EUROPLUS Schilddrüse (Affe)/Thyreoglobulin	Cat# 1010-1005-3, EUROIMMUN

Die für die IIF verwendeten Puffer können **Tab. 2.8** entnommen werden.

2.6.1 Anfertigung von Gefrierschnitten humaner Haut

Während die Gewebe der Firma EUROIMMUN direkt verwendet werden konnten, musste die humane Haut zuvor aufbereitet werden. Hierzu wurde die humane Haut innerhalb von maximal 48 h nach Operation und Transport in Williams' Medium E (Flüssigmedium) (Cat# F1115, Biochrom) in ungefähr 1 Zentimeter (cm) x 1 cm große Stücke geschnitten in *Tissue-Tek® Cryomold Intermediate* (Cat# 4566, Sakura) gelegt, in *Tissue-Tek® O.C.T. Compound* (Cat# 4583, Sakura) eingebettet und anschließend mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Haut erfolgte bei -80 °C. Schnitte mit einer Schnittdicke von 6 µm wurden mit einem Kryostat der Firma Leica angefertigt. Anschließend wurden jeweils zwei Schnitte auf einen Objektträger aufgetragen. Die Schnitte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.6.2 Indirekte Immunfluoreszenz auf kryofixierter humaner Haut

Kryofixierte Haut (**Tab. 2.7**) wurde zunächst aufgetaut und jeder Schnitt mit einem *Dako Pen* umrandet. Die Schnitte wurden während des gesamten Experiments in einer Dunkelkammer aufbewahrt. Dann wurde für 30 min mit 50 µL Blockpuffer (BP) geblockt. Anschließend erfolgte ein Auftragen von jeweils 50 µL in BP verdünnte Proben und eine Inkubation für 60 min bei RT. Nach Ablauf der 60 min sind die Schnitte dreimal für 3 min mit jeweils 50 µL WP gewaschen worden. Im nächsten Schnitt wurde der Sekundärantikörper *Anti-HA High Affinity Rat Monoclonal Antibody, Clone 3F10* (Cat# 13500600, Roche) 1:100 in BP verdünnt. Auf jeden Schnitt wurden 50 µL verdünnter Sekundärantikörper aufgetragen und für weitere 60 min bei RT inkubiert. Nach Beendigung der zweiten 60 min sind die Schnitte erneut dreimal für 3 min mit 50 µL pro Schnitt gewaschen worden. Als tertiärer Antikörper diente *Alex Fluor 594 Goat Anti-Rat IgG H+L* (Cat# A-11007, Invitrogen). Zunächst erfolgte eine Resuspendierung durch Pipettieren, anschließend wurde

kurz mit einem Vortex geschüttelt, mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert und ein Teil des Überstands 1:200 in BP verdünnt. Auf jeden Schnitt wurde 50 µl verdünnter Tertiärantikörper aufgetragen und für 30 min inkubiert.

Tab. 2.8 – Puffer für indirekte Immunfluoreszenz.

BSA = Bovines Serum Albumin; CaCl₂ = Calciumchlorid; RT = Raumtemperatur; TBS = *Tris-buffered saline*

Puffer	Rezept
500 mL Waschpuffer (WP)	50 mL 10X TBS, 250 µL 2M CaCl ₂ und 450 mL <i>Nanopure Water</i> vermischen, anschließend Hinzufügen von Tween© 20 (Cat# PAH5152, VWR) bis zu einer Endkonzentration von 0,1 %. Dies entspricht 500 µL Tween© 20 bei 500 mL Waschpuffer. Abschließend den Puffer mit einem Filtropur V50 0.22 µm, 500 mL Filter steril filtrieren. Lagerung bei RT.
50 mL Blockpuffer (BP)	Waschpuffer mit BSA bis zu einer Konzentration von 1 % BSA versetzen. Bei 50 mL entspricht dies 0,5 g BSA. Anschließend Puffer mit einem Filtropur S 0,2 Filter steril filtrieren. Lagerung bei 4 °C.

Nach der 30 min Inkubation mit dem Tertiärantikörper wurden die Objektträger erneut dreimal für 3 min mit 50 µL WP pro Schnitt gewaschen und nach Auftragen von einem Tropfen *DAPI Fluoromount-G*© (Cat# 0100-20, SouthernBiotech) pro Schnitt mit einem Deckglas bedeckt. Nach einer mindestens 20 min Trockenphase wurden die Objektträger bis zur weiteren Auswertung bei -20 °C gelagert. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops der Firma KEYENCE.

2.6.3 Indirekte Immunfluoreszenz auf EUROIMMUN Biochips

Auf die bei 4 °C gelagerten EUROIMMUN Biochips - Ösophagus (Affe) oder EUROPLUS Schilddrüse (Affe)/Thyreoglobulin (**Tab. 2.7**) wurde pro Reaktionsfeld 35 µL in BP verdünnte Probe aufgetragen und anschließend mit einem Reagenzträger bedeckt. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei RT. Nach Ablauf der 60 min wurde jedes Reaktionsfeld dreimal für 3 min mit 35 µL WB gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde in BP 1:100 verdünnter *Anti-HA High Affinty Rat Monoclonal Antibody, Clone 3F10* verwendet, von dem 35 µL pro Reagenzfeld benutzt wurden und der nach erneuter Bedeckung mit dem Reagenzträger 60 min bei RT inkubierte. Anschließend wurde erneut dreimal mit 35 µL WP gewaschen. Der Tertiärantikörper *Alex Fluor 594 Goat Anti Rat IgG H+L* wurde genauso wie bei der IIF auf kryofixierter humaner Haut vorbereitet (Kapitel 2.6.2), 1:200 in BP verdünnt, zu jeweils 35 µL pro Reaktionsfeld aufgetragen, mit dem Reagenzträger bedeckt und 30 min bei RT inkubiert. Zum Abschluss des Experiments wurden die Reagenzfelder ein letztes Mal

mit jeweils 35 µL WP dreimal für 3 min gewaschen und nach Auftragen von Tropfen *DAPI Fluoromount-G®* mit einem Deckglas bedeckt. Nach einer mindestens 20 min Trockenphase wurden die Biochips bis zur Auswertung bei -20 °C gelagert. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops der Firma KEYENCE.

In einigen Experimenten wurden Antikörper verwendet, die keine scFv waren. In diesem Fall musste kein Tertiärantikörper verwendet werden. Es wurde lediglich der Sekundärantikörper *Alexa Fluor 488 Goat-Anti Mouse IgG (H+L)* (Cat# A32723, Thermo Scientific) verwendet. Die Vorbereitung, die Verdünnung, die verwendeten Mengen sowie die Inkubationszeit waren identisch wie bei dem verwendeten Tertiärantikörper *Alex Fluor 594 Goat Anti-Rat IgG H+L*.

2.7 Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation

Mit Hilfe des Nachweisverfahrens zur Keratinozytendissoziation sollte untersucht werden, ob die scFv einen pathologischen Effekt auslösen. Es wird eine einschichtige Zelllinie gezüchtet, zu welcher anschließend Antikörper hinzugegeben werden. Mithilfe des Enzyms Dispase werden die Zellen von der Oberfläche des Reaktionsgefäßes gelöst und anschließend mechanischem Stress ausgesetzt. Im Falle einer Fragmentierung der Zellen nach Antikörperzugabe, kann von einem möglichen pathologischen Effekt ausgegangen werden (**Abb. 2.4**) (59).

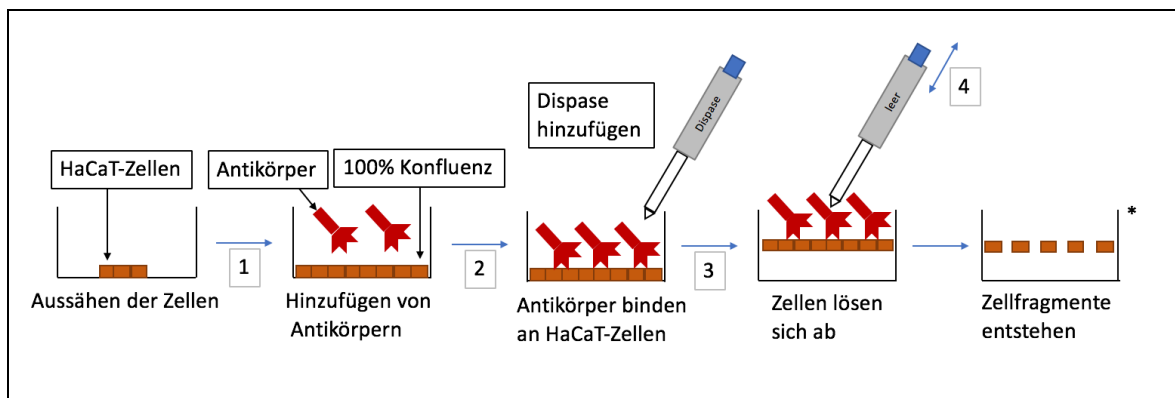


Abb. 2.4 - Ablauf des Nachweisverfahrens zur Keratinozytendissoziation. Nach dem Aussähen von HaCaT-Zellen erfolgt eine Inkubation für 24 h (1). Wenn der Boden des Wells zu 100 % bedeckt ist, werden die zu untersuchenden Antikörper hinzugefügt und erneut für 24 h inkubiert (2). Im nächsten Schritt wird Dispase hinzugefügt und inkubiert (3). Nach dem Ausführen von mechanischem Stress durch Pipettieren (4) entstehen Zellfragmente.

* Antikörper nicht dargestellt

HaCaT-Zellen = Humane adulte niedriges Calcium hohe Temperatur Zellen

2.7.1 Humane adulte niedriges Calcium hohe Temperatur Zellen (HaCaT-Zellen)

Im Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation wurden sog. HaCaT-Zellen (Abkürzung für engl. *Human Adult Low Calcium High Temperature*) verwendet. Bei diesen Zellen handelt es sich um eine aus einem Melanompräparat stammende, immortalisierte Zelllinie. Typisch für diese Zelllinie sind Kulturbedingungen in niedriger Kalziumkonzentration (ca. 0,2 mM) und hoher Temperatur (37 °C), was sich in der Namensgebung widerspiegelt (60).

Die HaCaT-Zellen wurden in 25 mL *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Cat# D5769, Sigma) (DMEM) in T175 TC-Flaschen gezüchtet und aufbewahrt. Die Flaschen wurden ausschließlich unter einem sterilen Abzug geöffnet. Die Lagerung erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂. Das DMEM wurde mit fetalem bovinem Serum (FBS) und Penicillin mit Streptomycin supplementiert. Ein Wechsel des Mediums erfolgte bei einer Farbveränderung des Mediums. Sobald die Zellen eine Konfluenz von annähernd 100 % erreichten, wurden sie auf zwei neue TC-Flaschen aufgeteilt. Hierzu wurde das Medium entfernt und die Zellen zunächst zweimal mit 5 mL DPBS, welches zuvor im Wasserbad erwärmt worden ist, gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch 1:10 in DPBS verdünnter Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-*Solution* (Cat# T4174, Sigma) und ca. 15 min Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ vom Boden der TC-Flasche gelöst. Zum Ende der 15 min wurde die Trypsinreaktion mit 20 mL DMEM gestoppt und der gesamte TC-Flascheninhalt in ein 50 mL Falconröhrchen überführt. Dieses wurde bei RT für 10 min und 100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in DMEM resuspendiert. Abschließend wurden die Zellen auf zwei neue TC-Flaschen aufgeteilt.

2.7.2 Ablauf des Nachweisverfahrens zur Keratinozytendissoziation

Das Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation erstreckt sich über drei Tage und wurde sofern möglich unter einem sterilen Abzug durchgeführt. Am ersten Tag wurden HaCaT-Zellen auf einer 12-Well Platte ausgesät und für 24 h inkubiert. Hierzu wurden die Zellen aus dem Inkubator genommen. Das in der T175 TC-Flasche enthaltene DMEM wurde mit einer Vakuumpumpe entfernt und die Flasche zweimal mit 10 mL DPBS gewaschen. Um die am Boden der TC-Flasche wachsenden Zelle zu lösen, wurde *Trypsin-EDTA-Solution* 1:10 in DPBS verdünnt und 10 mL in die Flasche pipettiert. Anschließend wurden die Zellen in der Flasche für ca. 15 min, bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde nach Abschluss der Inkubationszeit mit 20 mL DMEM gestoppt. Danach wurden die Zellen und das Medium in ein 50 mL Falconröhrchen überführt und für 10 min, 1000 rpm und bei RT zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 1 mL DMEM aufgelöst. Zum Zählen der Zellen wurde in einem Eppendorfgefäß eine Mischung aus 10 µL DPBS, 80 µL Methylenblau (Cat# 1525-061, Gibco) und 10 µL aufgelöster Zellen vorbereitet und anschließend in einer Neubauerzählkammer gezählt. Die

Zellen wurden in dem Maße in DMEM verdünnt, dass 1 mL Medium $4-6 \times 10^4$ Zellen enthielt. Eine 12-Well Platte wurde vorbereitet und in jede Kammer 1 mL Medium mit $4-6 \times 10^4$ Zellen pipettiert, danach wurde die Platte für 24 h, bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Am zweiten Tag wurden die zu untersuchenden Antikörper hinzugefügt. Zuvor wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops untersucht, ob die Böden der Kammern der 12-Well Platte vollständig mit Zellen bedeckt sind. War dies der Fall, wurde das Medium in den Kammern mit der Vakuumpumpe abgesogen und in 500 mL DMEM verdünnte Antikörper in die Wells pipettiert. Anschließend wurde die Platte für weitere 24 h, bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

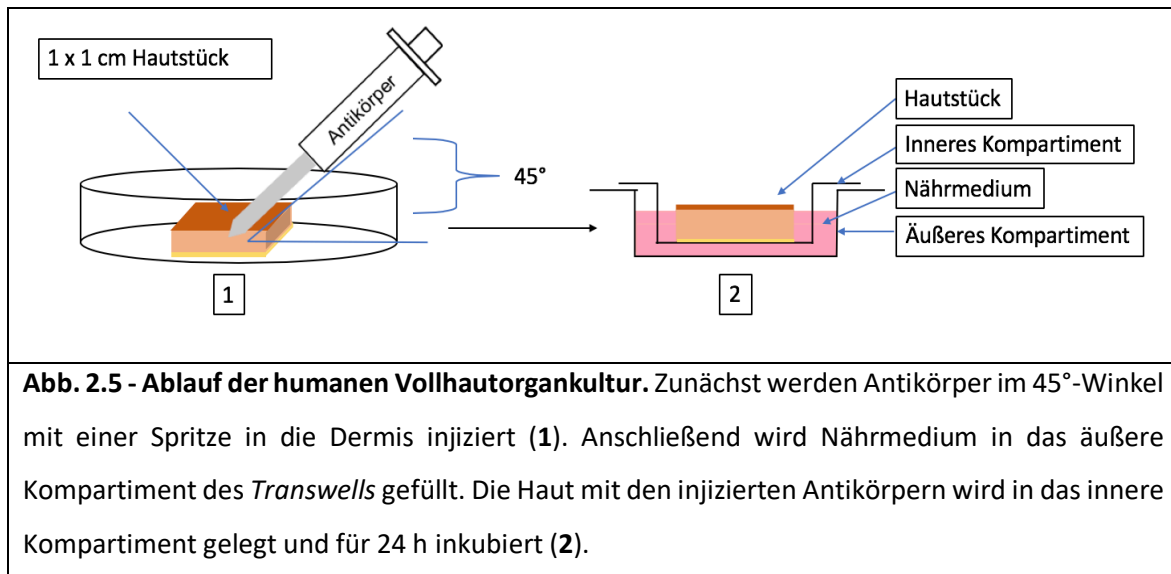
Ziel des dritten Tages war es den Zellen mechanischen Stress auszusetzen, um einen möglichen pathologischen Effekt auszulösen. In einige Kammern wurden am dritten Tag 0,25 µg Exofoliatin A (ETA) (Cat# ST101, Toxintechonology) hinzugefügt. Dies geschah bereits nach 22 h. Nach dem Hinzufügen des ETA wurde die Platte bis zum Vollenden der 24 h Inkubationszeit zurück in den Inkubator gestellt. Nachdem jede Kammer nach Vollendung der Inkubationszeit zweimal mit 1 mL *Hanks' Balances Salt Solution* (HBSS) (Cat# 14025, Gibco) gewaschen wurde, wurden in jede Kammer 500 µL eines 1:1 Gemisches aus HBSS und Dispase (Cat# 07913, Stemcell) pipettiert und die Platte für 30 min, bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Währenddessen wurden in 50 mL Falconröhrchen 0,5 g BSA (Bovines Serum Albumin) in 50 mL HBSS aufgelöst. Danach wurden in das BSA-HBSS-Gemisch 1 mL Pipettenspitzen gestellt und dort für mindestens 30 min belassen, wodurch ein Binden der Zellen an die Spitzen verhindert wird. Nach der Inkubation mit Dispase wurden die Kammern erneut jeweils zweimal mit 1 mL HBSS gewaschen. Nun wurde der mechanische Stress durch fünfmaliges Auf-und Abpipettieren mit einer 1 mL Pipette durchgeführt. Für diesen Pipettierschritt wurden die 1 mL Spitzen, welche für mindestens 30 min in dem BSA-HBSS-Gemisch standen, benutzt. Abschließend wurde in jede Kammer zum Fixieren der Zellfragmente 500 µL Histofix (Cat# P087, Roth), gefolgt von Crystalviolet (Cat# HT90132, Sigma) zum Färben hinzugefügt. Zur Auswertung wurden die Zellfragmente dreimal gezählt und ein Mittelwert gebildet.

2.8 Humane Vollhautorgankultur

Die humane Vollhautorgankultur ist eine weitere Methode zur Untersuchung auf einen möglichen pathologischen Effekt der scFv. Ziel der Methode ist es Antikörper mit einer Spritze in die Dermis zu injizieren und die Haut anschließend für 24 h in einem sog. *Transwell*, das mit einem Nährmedium gefüllt ist, zu inkubieren (**Abb. 2.5**). Anschließend werden Schnitte angefertigt, gefärbt und mithilfe eines Mikroskops auf eine mögliche Blasenbildung untersucht.

Humane Haut wurde mithilfe eines Skalpells in ca. 1 cm x 1 cm große Stücke geschnitten und in das innere Kompartiment eines *Transwells* gelegt. Mit Ausnahme des Schneidens der Haut fand der

gesamte Versuch unter einem sterilen Abzug statt. In den äußeren Teil des *Transwells* wurden 2 mL *Defined Keratinocyte-Serum Free Medium* (Cat# 10744-019, gibco) pipettiert, zu denen 1,2 µL 2M CaCl₂ hinzugefügt wurden. Anschließend wurden mit einer Insulinspritze 50 µL der zu untersuchenden Antikörper oder Kontrollproben im 45°-Winkel in die Dermis der Hautstücke injiziert, welche anschließend in den *Transwells* platziert wurden (**Abb. 2.5**). Die Inkubation der Hautstücke erfolgte für 24 h, bei 37 °C und 5 % CO₂. Am nächsten Tag wurde die Haut in Histofix fixiert.



2.8.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die in Histofix fixierten Hautstücke wurden in Paraffin eingebettet und in 4 µm dicken Schnitten auf Objektträger aufgetragen, welche anschließend mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt wurden. Die Färbung ist nach dem Standard Operationsprotokoll für eine HE-Färbung und mit Hilfe der Materialien des Histologielaors der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein durchgeführt worden. Die HE-Färbung erfolgte in der folgenden Weise: Die Objektträger wurden für 20 min in einen Trockenschrank gestellt und für weitere 20 min in eine Küvette mit Xylol (Cat# 108633, Merck) gestellt. Anschließend wurden die Träger zum Entfernen von Paraffinresten kurz in zwei Küvetten Xylol und danach in zwei Küvetten 100 % Ethanol (Cat# 5054.3, Roth), gefolgt von 96 % Ethanol (Cat# T171.5, Roth), 70 % Ethanol (Cat# T913.1, Roth) und abschließend in dH₂O geschwenkt. Nachdem sie für 5 min in Hämatoxylin (Cat# 105174, Merck) standen, wurden die Schnitte solange unter fließendem Leitungswasser gespült, bis keine Blasen mehr aufgetreten sind. Anschließend erfolgte ein zwei- bis dreimaliges Schwenken in Essigsäure- (Cat# 100063, Merck) Alkohol gefolgt von gründlichem Waschen der Schnitte. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte zwei- bis dreimal in Ammoniakwasser (Cat# 2610.1, Roth) geschwenkt und gewaschen. Die Gegenfärbung mit Eosin (Cat# E4009, Sigma) erfolgte für 30 bis

90 s, abhängig vom Alter des Eosinansatzes. Abschließend wurden die Schnitte durch kurzes Schwenken in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 96 %, Ethanol 100 %, Ethanol 100 %, Xylol 1, Xylol 2 und Xylol 3) dehydriert. Das Eindecken der Schnitte auf den Objektträgern erfolgte mit einem Eindeckautomaten.

2.9 Statistik

Es wurden Daten erhoben und untersucht, die nicht miteinander gepaart sind. Die statistisch ausgewerteten Versuche wurden dreimal wiederholt. Aufgrund einer Stichprobenzahl von drei konnte keine Gaußsche Normalverteilung angenommen werden. Es wurden jeweils verschiedene Substanzen mit derselben NK verglichen. Für die statistische Auswertung der Versuche, wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, da die Gruppengröße größer als zwei war. War dieser statistisch signifikant ($p\text{-Wert} < 0,05$) wurden die Werte mit dem *Dunn's Multiple Comparisson Test* weiter getestet. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *Graphpad Prism 8*.

2.10 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tab. 2.9 – Geräte.

DE = Deutschland; RT-PCR = Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion; UK = Vereinigtes Königreich; USA = Vereinigte Staaten von Amerika

Produkt	Firma	Nummer	Bezeichnung
<i>All-In-One</i> Fluoreszenzmikroskop	Keyence; Osaka, Japan	BZ-9000 (BIOREVO)	Fluoreszenzmikroskop
<i>Applied Biosystems™</i> <i>StepOnePlus™ Real-Time</i> <i>PCR System</i>	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA	4376600	RT-PCR-System
<i>Avanti™ Centrifuge</i>	Beckmann Coulter; Brea, USA	J-25	Avanti™ J-25 Zentrifuge
<i>Biological Safety Cabinet</i> <i>Class II</i>	Nuaire; Caerphilly, UK	NU-440-401E	Steriler Abzug
Bio Photometer Plus	Eppendorf AG; Hamburg, DE	6132 000.008	Photometer
<i>Centrifuge 5810 R</i>	Eppendorf AG; Hamburg, DE	5811000420	Zentrifuge
Eindeckautomat	Leica Biosystems; Wetzlar, DE	CV 5030	Eindeckautomat
Highland Präzisionswaage	AE Adam; Felde, DE	HCB 3001	Waage
Histo-Block, Jung	Leica Biosystems; Wetzlar, DE	Model EG1130	Kälteplatte
<i>Infinite 200 Pro</i> <i>Microplate reader</i>	Tecan Group AG; Männedorf, Schweiz	30052730	<i>Infinite 200 Pro</i>

InoLab® pH 7110	WTW, Xylem Analytics; Rye Brook, USA	1AA112	pH-Meter
Kryostat	Leica Biosystems; Wetzlar, DE	CM3050 S	Kryostat
Leitz BioMED <i>Microscope</i>	Leica Biosystems; Wetzlar, DE	Typ 020- 507.010	Mikroskop
Magnetischer Rührer	Phoenix Instrument; Garbsen, DE	RSM-04H	Rührer
Mikrotom	Reichert-Jung, Leica Biosystems; Wetzlar, DE	Gerätetyp 1140	Mikrotom
<i>Mini-Protean Tetra Cell</i>	BioRad Laboratories; Hercules, USA	16580000	Kleines Gelelektro- phorese-System
Nano Photometer®	Implen GmbH; München, DE	NP 80	Nanodrop
<i>Rotilabo®-Mini- Centrifuge</i>	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE	T464.1	Tischzentrifuge
Schüttelinkubator	Axon Labortechnik; Kaiserlauten, DE	16901	Schüttelinkubator
Sunlab® 3D-Schüttler; Modell SU 1030	Sunlab GmbH; Aschaffenburg, DE	D-8030	Schüttelplattform
<i>Thermomixer Comfort</i>	Eppendorf AG; Hamburg, DE	2050-120-01	Wärmeblock
<i>Tube Rotator EU-Plug</i>	VWR International; Radnor, USA	44-0500	Rotierende Plattform
<i>T100™ Thermal Cycler</i>	BioRad Laboratories; Hercules, USA	1861096	Thermozykler
<i>UVC/T-AR, DNA/RNA UV- Cleaner Box</i>	BioSan; Riga, Lettland	BS-040102- AAA	UV-Reinigungsbox
Vakuumpumpe	KNF Neuberger; Breisgau GmbH, DE		Vakuumpumpe
VORTEX-Genie 2	Scientific Industries; Bohemia, USA	50-728-002	Vortexer
Wasserbad	GFL; Burgwedel, DE	5905904	Wasserbad
<i>Wide Mini-Sub Cell GT System</i>	BioRad Laboratories; Hercules, USA	1704489EDU	Weites Gelelektro- phorese-System

Tab. 2.10 – Verbrauchsmaterialien.

AT = Österreich DE = Deutschland; DNA = Desoxyribonukleinsäure; NL = Niederlande; PCR = Polymerase-Kettenreaktion; RNA = Ribonukleinsäure; RT-PCR = Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion; UK = Vereinigtes Königreich; USA = Vereinigte Staaten von Amerika;

Produkt	Firma	Katalognummer	Bezeichnung
Amicon Ultra-15, PLBC Ultracel-PL Membran, 3 kDa-Zentrifugenrohr	Merck; Darmstadt, DE	UFC900308	Amicon Ultra-Zentrifugenröhrchen
<i>Biosphere® Tip</i> 10 µL farblos	Sarstedt AG; Nümbrecht, DE	70.1130.200	Pipettenspitzen mit Filter
<i>Dako Pen</i>	Dako, Agilent; Santa Clara, USA	S2002	<i>Dako Pen</i>
Econo-Pac Chromatographie-Säule	BioRad Laboratories; Hercules, USA	732-1010	Chromatographie-Säule
<i>Corning® Erlenmeyer cell Culture Flasks</i>	Merck; Darmstadt, DE	CLS431143	Erlenmeyerkolben mit Ventilationskappe
<i>Eppendorf Easypet® 3</i>	Eppendorf AG; Hamburg, DE	4430000018	Pipettierhilfe
<i>Eppendorf® LoBind Microcentrifuge Tubes, 1,5 mL</i>	Sigma-Aldrich Laborchemikalien; Seelze, DE	Z666548-250EA	DNA/RNA-Eppendorfgefäß
<i>Eppendorf® PCR Tubes, 0,2 mL, PCR Clean, farblos</i>	Eppendorf AG; Hamburg, DE	0030124332	PCR-Eppendorfgefäß
<i>Eppendorf Research® Plus, 0,5 – 10 µL</i>	Eppendorf AG; Hamburg, DE	3123000020	0,5 – 10 µL Pipette
<i>Eppendorf Research® Plus, 2 – 20 µL</i>	Eppendorf AG; Hamburg, DE	3123000098	2 – 20 µL Pipette
<i>Eppendorf Research® plus, 10 – 100 µl</i>	Eppendorf AG; Hamburg, DE	3123000047	10 – 100 µL Pipette
<i>Eppendorf Research® plus, 20 – 200 µl</i>	Eppendorf AG; Hamburg, DE	3123000055	20 -200 µL Pipette
<i>Eppendorf Research® plus, 100 – 1000 µl</i>	Eppendorf AG; Hamburg, DE	3123000063	100 -1000 µL Pipette
<i>Eppendorf Research® Plus, 8-Kanal, 30 – 300 µL</i>	Eppendorf AG; Hamburg, DE	3123000101	Multikanalpipette
<i>Eppendorf® Safe-Lock Microcentrifuge Tubes; 1,5 mL; Green</i>	Sigma-Aldrich Laborchemikalien; Seelze, DE	T0162	1,5 mL Eppendorfgefäß
<i>Eppendorf® Safe-Lock Microcentrifuge Tubes; 2,0 mL; Blue</i>	Sigma-Aldrich Laborchemikalien; Seelze, DE	T3045	2,0 mL Eppendorfgefäß

Erlenmeyerkolben 500 mL	Duran, DWK Life Sciences GmbH; Mainz, DE	2122644	500 mL Erlenmeyerkolben
Falconröhrchen 15 mL, 120 x 17 mm, PP	Sarstedt AG; Nümbrecht, DE	62.554.502	15 mL Falconröhrchen
Falconröhrchen 50 mL, 114 x 28 mm, PP	Sarstedt AG; Nümbrecht, DE	62.547.254	50 mL Falconröhrchen
<i>Feather Disposable Scalpel #10</i>	Andwin Scientific; Schaumburg, USA	NC9999403	Skalpell
Filtropur V50 0.22, 500 mL Filter	Sarstedt AG; Nümbrecht, DE	83.1823.001	Filtropur V50 0.22, 500 mL Filter
<i>BD Micro-Fine+ U-100</i> Insulinspritze 12,7 mm	Becton Dickinson GmbH; Heidelberg, DE	324827	Insulinspritze
Kryotube	VWR International; Radnor, USA	479-1261	Kryoröhrchen
Menzel-Gläser, <i>Superfrost® Plus</i>	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA	J1800AMNZ	Objektträger
<i>MicroAmp™ Optical Adhesive Film</i>	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA	4311971	PCR-Folie
<i>Mini-Protean Precast Gels</i>	BioRad Laboratories; Hercules, USA	456-1093	<i>Mini-Protean Precast Gels</i>
Neubauerzählkammer	Laboroptik GmbH; Lancing, UK		Neubauerzählkammer
Pasteurpipetten aus Glas, ISO 7712, 230 mm	Hecht Assistent; Sondheim vor der Rhön, DE	404567002	Pasteurpipetten
<i>PCR Plate Multiply® Fast</i>	Sarstedt AG; Nümbrecht, DE	72.1981.202	PCR-Platte
Petrischalen	Sarstedt AG; Nümbrecht, DE	82.1473	Petrischalen
Pipettenspitzen 10 µL	Sarstedt AG; Nümbrecht, DE	70.1130.100	10 µL Pipettenspitzen
Pipettenspitzen 200 µL	Sarstedt AG; Nümbrecht, DE	70.760.012	200 µL Pipettenspitzen
Pipettenspitzen 1000 µL	Sarstedt AG; Nümbrecht, DE	70.762.100	1000 µL Pipettenspitzen
<i>Polypropylene Bottle with Screw-On Cap</i> , 16 x 80 mm, 10 mL	Beckmann Coulter; Brea, USA	355672	10 mL Beckmann-Röhrchen
<i>Polypropylene Bottle with Screw-On Cap</i> , 69 x 160 mm, 500 mL	Beckmann Coulter; Brea, USA	355665	500 mL Zentrifugenflasche

Reagenzträger	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika; Lübeck, DE	ZZ9999-0110	Reagenzträger
Serologische Pipette 5 mL	Sarstedt AG; Nümbrecht, DE	86.1253.001	5 mL Serologische Pipette
Serologische Pipette 10 mL	Sarstedt AG; Nümbrecht, DE	86.1254.025	10 mL Serologische Pipette
Serologische Pipette 25 mL	Sarstedt AG; Nümbrecht, DE	86.1685.001	25 mL Serologische Pipette
Spritzenvorsatzfilter Filtropur S 0,2	Sarstedt AG; Nümbrecht, DE	83.1826.001	Filtropur S 0,2 Filter
Standard Biopsiestanze 4 mm	Pfmmedical AG; Köln, DE	48401	Biopsiestanze
TC-Flaschen T175	Sarstedt AG; Nümbrecht, DE	83.3912	T175 TC-Flasche
<i>Transwells</i>	Corning Life Sciences B.V.; Amsterdam, NL	3460	<i>Transwell</i>
Zellkultur Multiwellplatte, 12 Well, PS, Transp., Cellstar®	Greiner Bio-One International GmbH; Kremsmünster, AT	665180	12-Well Platte

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung von Hautproben auf Thyreoperoxidase-messenger Ribonukleinsäure

In vorherigen Arbeiten wurden bereits Hinweise auf das Vorliegen von TPO-mRNA in humaner Haut dargestellt (46). Ziel dieser Arbeit war es mit einer PCR ebenfalls für TPO kodierende mRNA in Hautproben zu identifizieren. Hierzu wurde zunächst aus humaner Haut isolierte mRNA in cDNA umgeschrieben. Mit dieser cDNA wurde eine RT-PCR durchgeführt. Das Produkt aus diesen Versuchen wurde anschließend zur besseren Visualisierung auf ein Agarosegel aufgetragen. Die verwendeten Protokolle sind in Kapitel 2.1 aufgeführt. Durch die Verwendung von Primern, die an Bereiche im TPO-Gen binden, sollte TPO-mRNA detektiert werden. Als *Housekeeping Gene* wurde GAPDH genutzt. Außerdem dienten Dsg3-Primer als Positivkontrolle, um cDNA für ein in der Haut vorkommendes Protein nachzuweisen. Alle Primer wurden in derselben PCR außerdem ohne cDNA getestet und somit als NK sowie zum Ausschluss von Verunreinigungen verwendet. **Abb. 3.1** zeigt die auf ein Agarosegel aufgetragenen Produkte der RT-PCR.

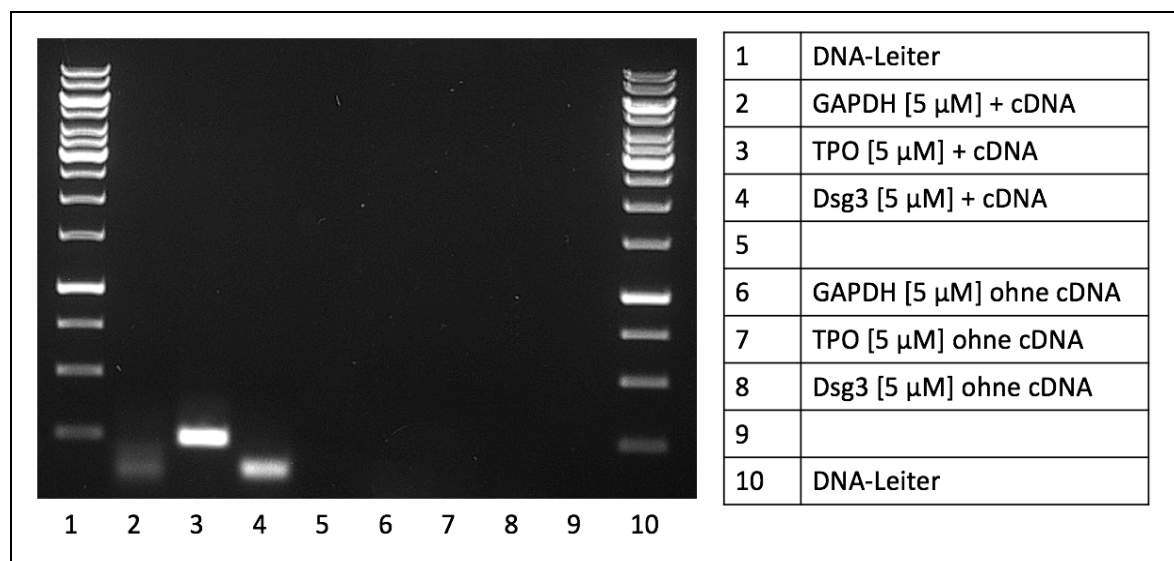


Abb. 3.1 – Agarosegel nach Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion. Es wurde nach dem in Kapitel 2.1 beschriebenen Protokollen vorgegangen. In der PCR wurden verschiedene Primer mit und ohne cDNA aus humaner Haut getestet. GAPDH (Bande 2) diente als *Housekeeping Gene*. Dsg3 (Bande 4) wurde als Positivkontrolle verwendet. Die Banden 6-8 zeigen die Ergebnisse von Negativkontrollen und dienen zum Ausschluss von Verunreinigungen. In Bande 3 konnte nach Verwendung von TPO-Primern und cDNA ein DNA-Fragment nachgewiesen werden. Dies ist ein Indiz für TPO-RNA in humaner Haut.

(c)DNA = (Komplementäre) Desoxyribonukleinsäure; Dsg3 = Desmoglein 3; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; RNA = Ribonukleinsäure; (RT)-PCR = (Echtzeit)-Polymerase-Kettenreaktion; TPO = Thyreoperoxidase

Es wurden jeweils Primer in einer Konzentration von 5 µM mit und ohne cDNA getestet. Alle verwendeten Primer zeigen eine Bande auf dem Agarosegel. Wurde mit den Primern keine cDNA

verwendet, konnte keine Bande dargestellt werden (Bande 6-8). Interessanterweise ist in der dritten Spalte des Gels eine deutliche Bande sichtbar. Dies ist die Bande, in der cDNA zusammen mit TPO-Primern untersucht worden ist. Hiermit kann gezeigt werden, dass mRNA für TPO in aus humaner Haut isolierter mRNA zu finden ist. Diese Ergebnisse bestätigen die oben beschriebenen Daten von Cianfarani *et al.* (46). Der Nachweis von TPO-mRNA in humaner Haut, gab den Anlass in dieser Arbeit scFv zu untersuchen, die an Dsg und TPO binden, um somit die Funktion von Anti-TPO-Antikörpern in der Pathogenese von PV näher zu betrachten.

3.2 Kontrolle der Proteinexpression und der Proteinkonzentrationen

Die Konzentration der Positivkontrollen (scFv 4.2, 3.2 und px4-3) wurde vor der weiteren Untersuchung mit einer SDS-PAGE kontrolliert. Hierzu wurden die Banden von jeweils 2 µL verdünnten scFv-Proben, mit parallel aufgetragenen BSA-Mengen nach Durchführung der SDS-PAGE verglichen. Das Ergebnis wird in **Abb. 3.2** dargestellt.

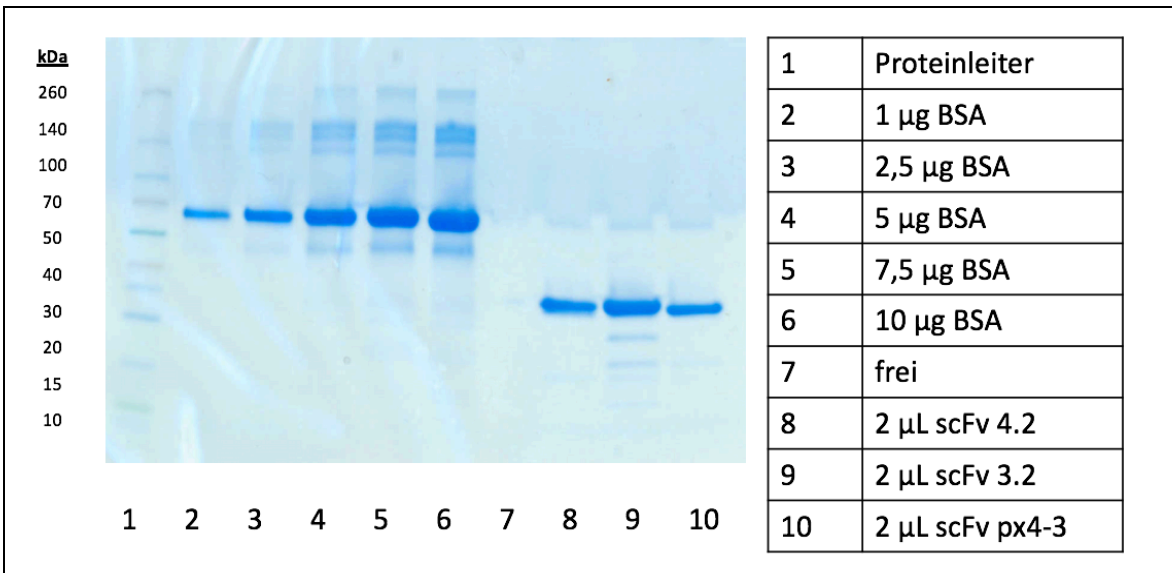
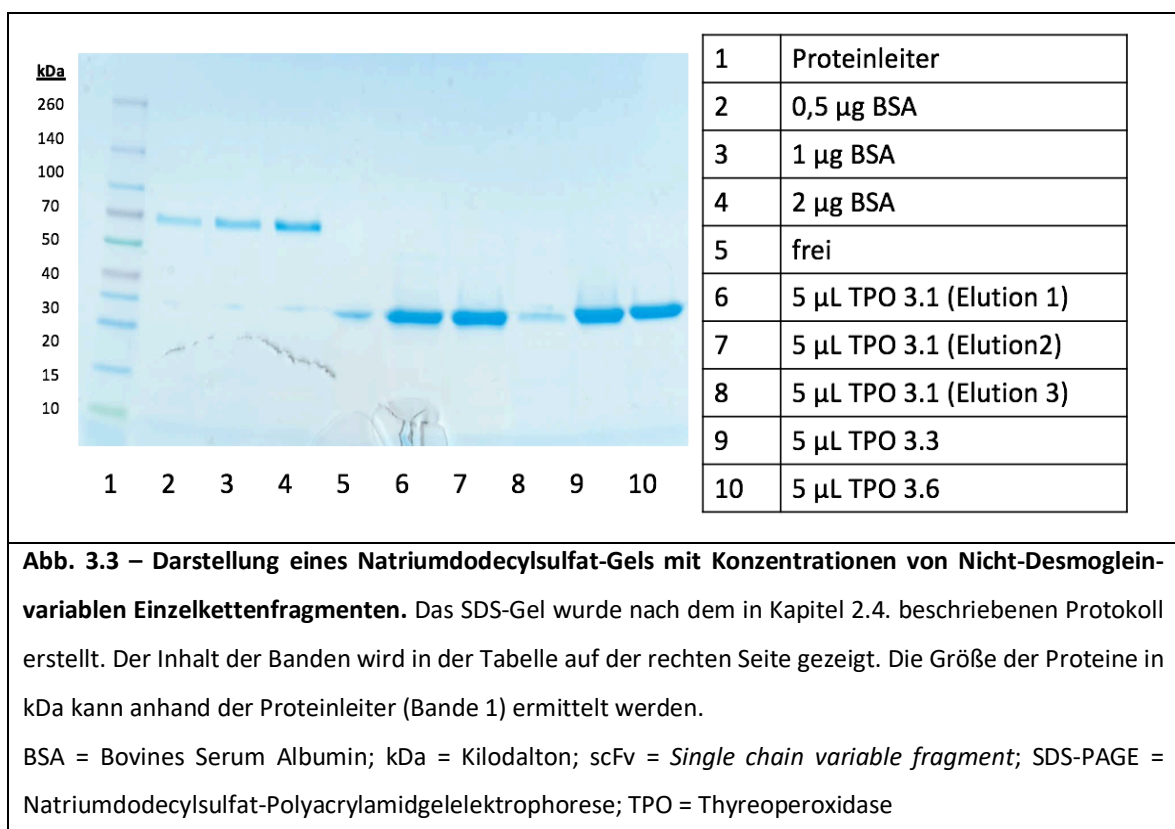


Abb. 3.2 – Darstellung eines Natriumdodecylsulfat-Gels mit Konzentrationen von Positivkontrollen. Das SDS-Gel wurde nach dem in Kapitel 2.4. beschriebenen Protokoll erstellt. Der Inhalt der Banden wird in der Tabelle auf der rechten Seite gezeigt. Die Größe der Proteine in kDa kann anhand der Proteinleiter (Bande 1) ermittelt werden.

BSA = Bovines Serum Albumin; kDa = Kilodalton; scFv = *Single chain variable fragment*; SDS-PAGE = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Banden der scFv 4.2 und px4-3 (Bande 8 und 10) entsprechen einer Bandendicke zwischen 1 µg und 2,5 µg BSA (Bande 2 und 3). 2 µL scFv entsprechen also in etwa 2 µg BSA und somit einer Konzentration von 1 µg/µL. Die Bande von scFv 3.2 (Bande 9) ist etwas dicker und liegt zwischen 2,5 µg und 5 µg (Bande 3 und 4). In 2 µL scFv 3.2 befinden sich demnach ungefähr 4 µL, woraus sich eine Proteinkonzentration von 2 µg/µL ergibt. Zusammenfassend betragen die Konzentrationen der Positivkontrollen demnach für scFv 4.2: 1 µg/µL, für scFv 3.2: 2 µg/µL und für scFv px4-3: 1 µg/µL.

Der Erfolg der Proteinexpression der Nicht-Dsg-scFv bzw. TPO-scFv TPO 3.1, TPO 3.3 und TPO 3.6 wurde ebenfalls mit einer SDS-PAGE kontrolliert. Nachdem das Ergebnis der Expression bestätigt werden konnte, wurde die Konzentration der TPO-scFv nach durchgeführter Dialyse ermittelt, indem jeweils 5 µL verdünnte scFv-Proben mit unterschiedlichen BSA-Mengen verglichen wurden (**Abb 3.2**). Von TPO 3.1 wurden aufgrund der größeren Produktionsmenge je 5 µL der Elutionen 1-3 untersucht, von TPO 3.3 und TPO 3.6 nur die erste. Die Banden von TPO 3.1 Elution 1 und 2 (Bande 6 und 7), sowie die von TPO 3.3 und TPO 3.6 (Bande 9 und 10), entsprechen in etwa derselben Dicke. Sie sind alle mehr als doppelt so stark wie die Bande mit 2 µg BSA (Bande 4). Es wurde davon ausgegangen, dass demnach in etwa 5 µg scFv in den Banden 6,7,9 und 10 vorhanden sind, woraus sich bei jeweils 5 µL verdünnten Proben eine Konzentration von 1 µg/µL ergibt.



3.3 Bestimmung von Bindungseigenschaften der variablen Einzelkettenfragmente

Mithilfe der ELISA wurde untersucht, ob die scFv in der Lage sind, an Antigene, gegen die sie in der APD selektiert wurden, zu binden. Als Positivkontrollen dienten der Dsg1- und Dsg3-ELISA. Die TPO-scFv sollten auch auf Reaktionen mit TPO untersucht werden. Zunächst musste durch Versuche ein Protokoll erstellt werden, mit dem die scFv im ELISA untersucht werden können. Das erstellte Protokoll ist in Kapitel 2.5 aufgeführt. Nachdem das Protokoll erstellt worden war, wurden alle scFv durch dreimalige Wiederholung des ELISA auf ihre Bindungseigenschaften an die Zielantigene untersucht. Zunächst wurden die Positivkontrollen untersucht, um eine Positivkontrolle für die ELISA mit den TPO-scFv zu haben.

Die scFv wurden unterschiedlich stark in VP verdünnt (1:1.000, 1:10.000, 1:100.000 und 1:1.000.000) und auf ihre Bindungsaffinität an Dsg3 im Falle von scFv 4.2 und scFv 3.2, sowie gegen Dsg1 und Dsg3 bei scFv px4-3 getestet. Als NK dienten 100 μ L VP. Bei der Auswertung der ELISA-Untersuchungen mit den Positivkontroll-scFv zeigte sich, dass diese im ELISA einen messbaren Farbumschlag bewirken (**Abb. 3.4**). Beim Verwenden von geringeren Verdünnungen waren die gemessenen Werte der O.D. bei 450 nm im Vergleich zu stärkeren Verdünnungen höher. Eine Ausnahme bildete dabei scFv 3.2, welches bei einer Verdünnung von 1:10.000 im Mittel einen etwas höheren Farbumschlag bewirkte als bei 1:1.000. Es ließ sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Farbindensität zwischen NK und zugegebenen scFv messen. Hierbei bestand sowohl eine allgemeine Signifikanz zwischen NK und Verwendung der scFv, als auch ein signifikanter Unterschied einzelner Verdünnungsstufen mit der NK. Bei der statistischen Auswertung der einzelnen Verdünnungen mit dem Dunn's-Test waren in allen Fällen die höchsten scFv-Konzentrationen ($1:10^3$) und mit Ausnahme von scFv px4-3 im Dsg3-ELISA auch die Verdünnungen von $1:10^4$ signifikant. Da diese Daten mit bereits veröffentlichten Ergebnissen (54, 55) vereinbar sind, konnte davon ausgegangen werden, dass der ELISA mit dem in Kapitel 2.5 beschriebenen Vorgehen auch für die Charakterisierung der scFv TPO 3.1, TPO 3.3 und TPO 3.6 geeignet ist.

Die TPO-scFv wurden im ELISA auf ihre Fähigkeit an verschiedene Antigene zu binden untersucht. Dies waren Dsg1, Dsg3, TPO und das Bullöses Pemphigoid Antigen 1 (BP180). Die scFv wurden unterschiedlich stark in VP verdünnt (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000). Als NK dienten 100 μ L VP. Ziel der Versuche war es herauszufinden, an welche Antigene die scFv im ELISA binden. Bei der Durchführung der ELISA mit TPO 3.1 zeigte sich in allen Versuchen ein allgemeiner signifikanter Unterschied zwischen scFv-Zugabe und der NK (**Abb. 3.5**). Dieser ist geringer als der Verwendung der Positivkontrolle (**Abb. 3.4**). Beim Vergleichen der einzelnen verdünnten Proben mit der NK, konnte bei der für die Positivkontrollen verwendeten niedrigsten Verdünnung (1:1.000)

keine Signifikanz ermittelt werden. Es zeigen nur höhere Konzentrationen (1:10 und 1:100) ein signifikantes Ergebnis mit dem Dunn's-Test.

Durch höhere Konzentrationen von scFv TPO 3.1 konnten in den meisten Fällen höhere O.D. bei 450 nm gemessen werden als durch das Verwenden geringerer Mengen. Eine Ausnahme ließ sich dabei bei der Durchführung der Dsg1-ELISA beobachten. Dort trat durch eine Verdünnung von 1:100 eine stärkere Färbung auf als durch 1:10 verdünnte scFv. Die ELISA Ergebnisse von scFv TPO 3.1 zeigten zusammenfassend, dass dieses scFv in der Lage ist, an verschiedene Antigene zu binden. Die Bindung an Dsg1, Dsg3 und BP180 ist dabei stärker als die an TPO (**Abb. 3.5**).

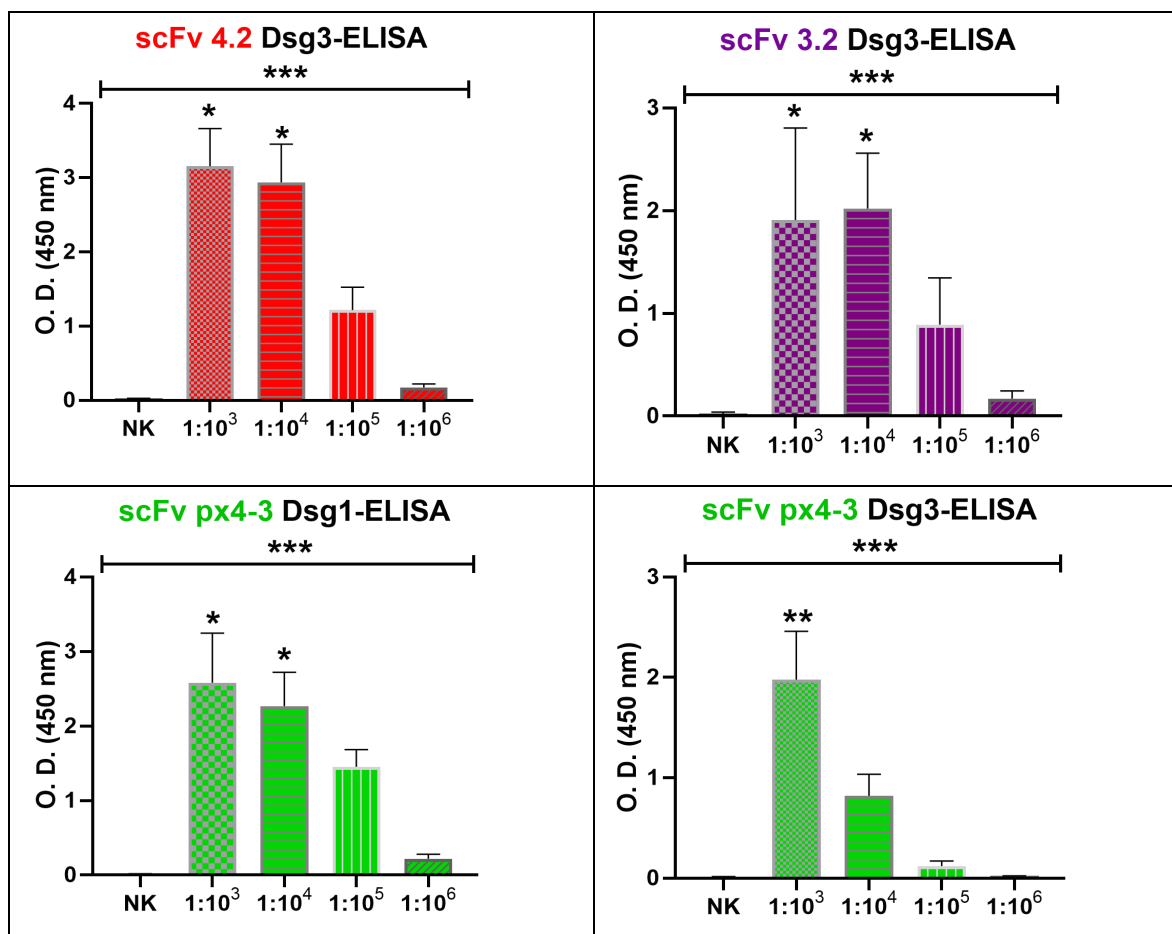


Abb. 3.4 Enzymgebundener Immunsorptionsnachweis mit Positivkontrollen. Es wurden drei Wiederholungen durchgeführt (n=3). Die Versuche wurden wie in Kapitel 2.5 beschrieben durchgeführt. Als NK wurde VP verwendet. Die X-Achse zeigt die scFv-Verdünnung in VP. Die Y-Achse zeigt die O.D. bei 450 nm. Skalierung der Y-Achse variiert. Es werden Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Es zeigten sich signifikante Unterschiede der O.D. im Vergleich zwischen NK und scFv-Zugabe. Die statistische Auswertung erfolgte aufgrund nicht normalverteilter Daten mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Dunn's-Test (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Dsg1/3 = Desmoglein 1/3; ELISA = *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; NK = Negativkontrolle; O.D. = Optische Dichte; scFv = *Single chain variable fragment*; VP = Verdünnungspuffer

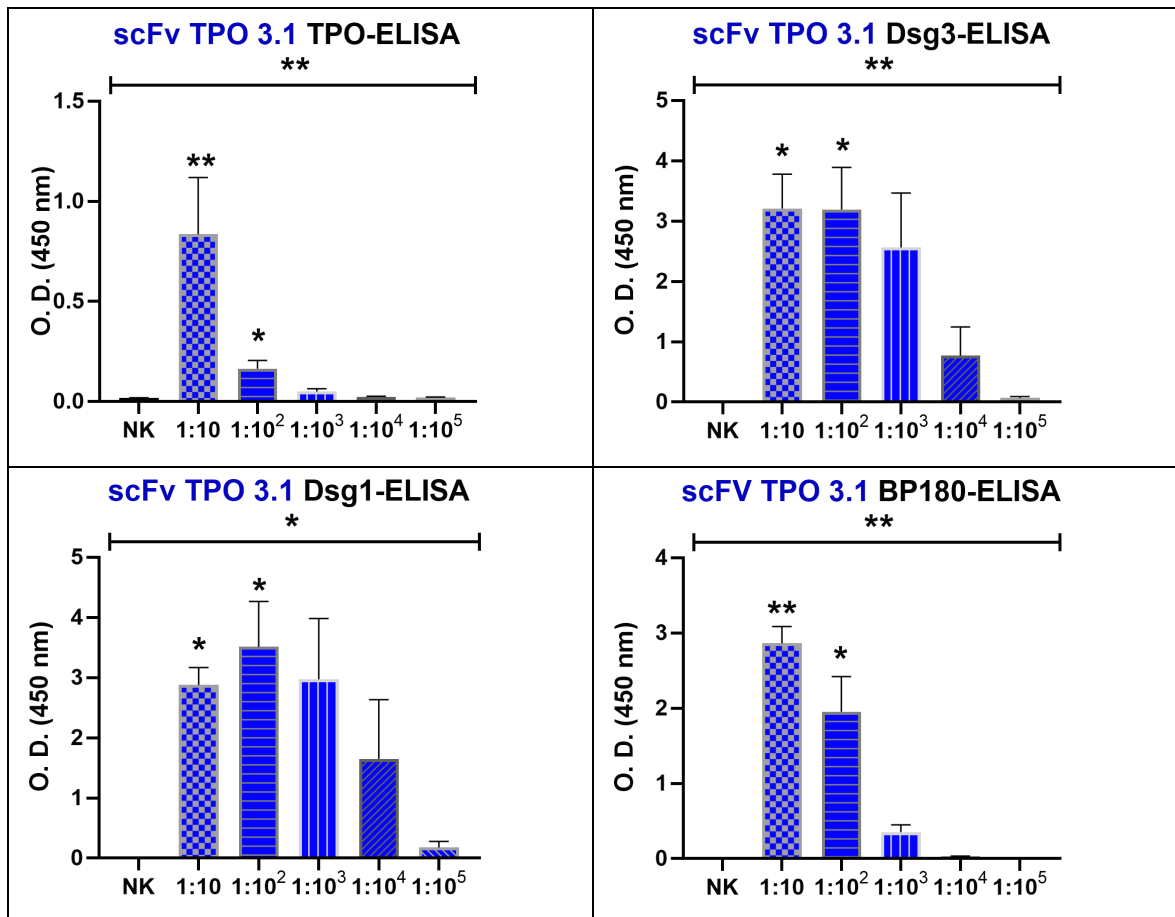


Abb. 3.5 – Enzymgebundener Immunsorptionsnachweises mit variablem Einzelkettenfragment

TPO 3.1. Es wurden drei Wiederholungen durchgeführt (n=3). Die Versuche wurden wie in Kapitel 2.5 beschrieben durchgeführt. Als NK wurde VP verwendet. Die X-Achse zeigt die scFv-Verdünnung in VP. Die Y-Achse zeigt die O.D. bei 450 nm. Skalierung der Y-Achse variiert. Es werden Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Es zeigen sich signifikante Unterschiede der O.D. zwischen NK und scFv-Zugabe. Die statistische Auswertung erfolgte aufgrund nicht normalverteilter Daten mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Dunn's-Test (* = p < 0,05; ** = p < 0,01).

BP180 = Bullöses Pemphigoid Antigen 1; Dsg1/3 = Desmoglein 1/3; ELISA = *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; NK = Negativkontrolle; O.D. = Optische Dichte; scFv = *Single chain variable fragment*; VP = Verdünnungspuffer

Bei der Auswertung der ELISA mit scFv TPO 3.3 durch den Kruskal-Wallis-Test konnte mit allen verwendeten ELISA-Kits ein allgemeiner signifikanter Unterschied zwischen NK und scFv-Zugabe detektiert werden (**Abb. 3.6**). Die Signifikanz ist im Vergleich zu den Positivkontrollen geringer (**Abb. 3.4**). Es wurden um den Faktor 100 höhere Konzentrationen verwendet als bei Versuchen mit den Positivkontroll-scFv. Beim Vergleichen der einzelnen Verdünnungsstufen mit der NK konnte für alle Proben in der geringsten Verdünnung (1:10) ein signifikanter Unterschied gemessen werden. Dieser konnte im Dsg1- und Dsg3-ELISA ebenfalls in einer Verdünnung von 1:100 festgestellt werden. Zusammenfassend zeigt sich im ELISA mit scFv TPO 3.3, dass dieses scFv überwiegend an Dsg1 und Dsg3 bindet.

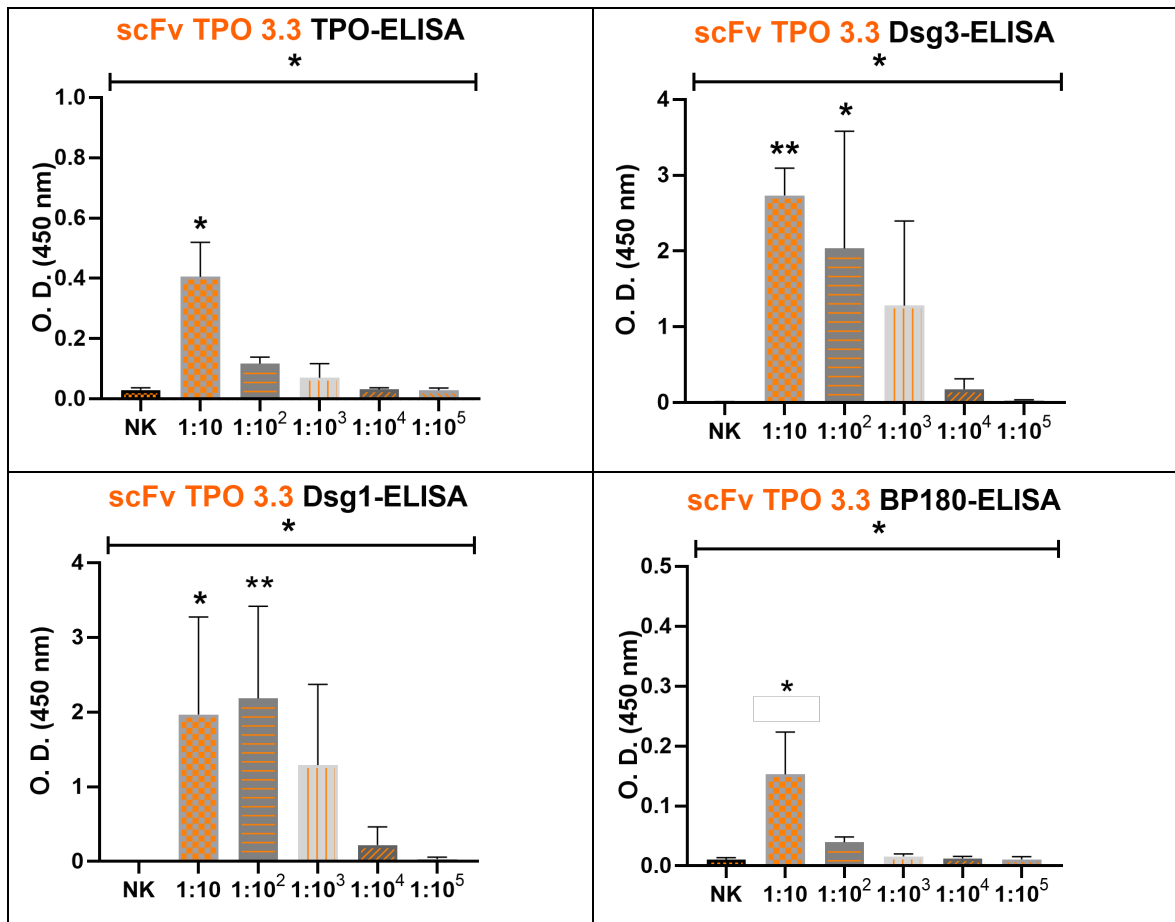


Abb. 3.6 – Enzymgebundener Immunsorptionsnachweises mit variablem Einzelkettenfragment TPO 3.3. Es wurden drei Wiederholungen durchgeführt (n=3). Die Versuche wurden wie in Kapitel 2.5 beschrieben durchgeführt. Als NK wurde VP verwendet. Die X-Achse zeigt die scFv-Verdünnung in VP. Die Y-Achse zeigt die O.D. bei 450 nm. Skalierung der Y-Achse variiert. Es werden Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Es zeigen sich signifikante Unterschiede der O.D. zwischen NK und scFv-Zugabe. Die statistische Auswertung erfolgte aufgrund nicht normalverteilter Daten mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Dunn's-Test (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

BP180 = Bullöses Pemphigoid Antigen 1; Dsg1/3 = Desmoglein 1/3; ELISA = *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; NK = Negativkontrolle; O.D. = Optische Dichte; scFv = *Single chain variable fragment*; VP = Verdünnungspuffer

Bei der Betrachtung der ELISA Ergebnisse von scFv TPO 3.6 zeigt sich mit dem in Kapitel 2.5 beschriebenen Vorgehen und statistischen Auswertung anhand des Kruskal-Wallis-Test nicht in allen Fällen ein signifikanter Unterschied der O.D zwischen NK und scFv Zugabe. Im ELISA mit Dsg1 konnte keine Signifikanz berechnet werden.

Die gemessenen O.D.-Werte zwischen 2 und 3 lassen jedoch eine Bindung von scFv TPO 3.6 an Dsg1 vermuten. Das scFv zeigt die höchsten Werte im Dsg1- und Dsg3-ELISA und scheint insbesondere an diese Antigene zu binden. Auffallend ist, dass im Fall der ELISA mit Dsg1 und Dsg3 erst ab einer Verdünnung von 1:10.000 eine stärkere Abnahme der O.D. zu erkennen ist. Bei der Durchführung des Dunn's-Tests zeigen sich signifikante Unterschied zwischen NK und 1:10 Verdünnung im TPO-

und BP180-ELISA, während im Dsg3-ELISA nur die 1:1.000 Verdünnung signifikant ist und der Dsg1-ELISA keine Signifikanz aufweist (**Abb. 3.7**).

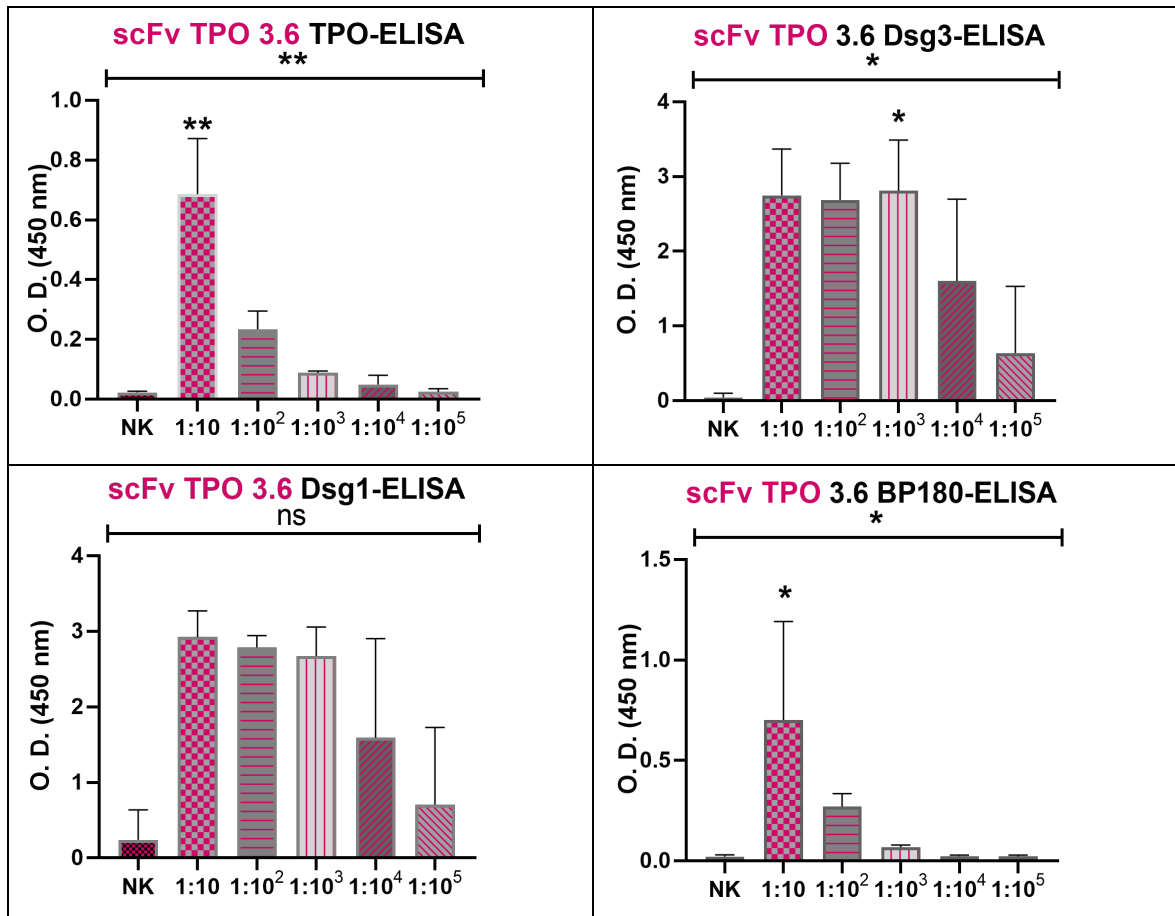


Abb. 3.7 – Enzymgebundener Immunadsorptionsnachweises mit variablem Einzelkettenfragment TPO 3.6. Es wurden drei Wiederholungen durchgeführt (n=3). Die Versuche wurden wie in Kapitel 2.5 beschrieben durchgeführt. Als NK wurde VP verwendet. Die X-Achse zeigt die scFv-Verdünnung in VP. Die Y-Achse zeigt die O.D. bei 450 nm. Skalierung der Y-Achse variiert. Es werden Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Es zeigen sich signifikante Unterschiede der O.D. zwischen NK und scFv-Zugabe. Der Dsg1-ELISA war nicht signifikant. Die statistische Auswertung erfolgte aufgrund nicht normalverteilter Daten mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Dunn's-Test (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

BP180 = Bullöses Pemphigoid Antigen 1; Dsg1/3 = Desmoglein 1/3; ELISA = *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; NK = Negativkontrolle; O.D. = Optische Dichte; scFv = *Single chain variable fragment*; VP = Verdünnungspuffer

3.4 Etablierung der indirekten Immunfluoreszenz auf Affenösophagus und humaner Haut

Ziel der IIF mit den Positivkontrollen war es ein Protokoll für eine IIF zu etablieren, mit welchem auch weitere scFv auf ihre Fähigkeit, an Zielantigene in Geweben zu binden, untersucht werden können. Die IIF erfolgte nach den in Kapitel 2.6.2 und 2.6.3 beschriebenen Protokollen und wurde auf Affenösophagus und humaner Haut durchgeführt. Zunächst zeigte sich in der IIF auf mit Affenösophagus beschichteten Biochips, dass alle Positivkontrollen in der Lage sind an Affenösophagus zu binden. Dies gelang auch bei starker Verdünnung, bei denen lediglich 35 Nanogramm (ng) der scFv für jedem Schnitt genutzt wurden (**Abb. 3.8**). Als NK wurden 35 μ L BP verwendet. Die IIF wurde mit jedem scFv dreimal wiederholt. Für alle scFv wurden in drei unterschiedlichen IIF vergleichbare Färbemuster nachgewiesen.

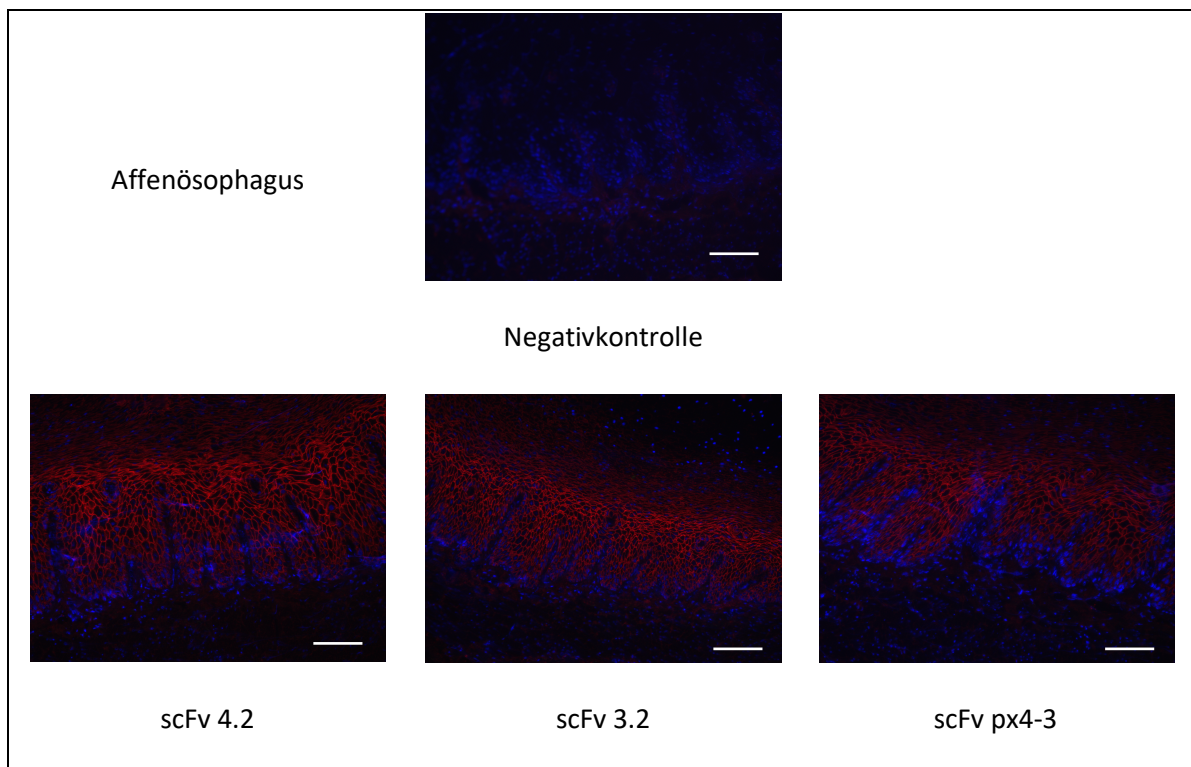


Abb. 3.8 – Darstellung einer indirekten Immunfluoreszenz auf Affenösophagus mit Positivkontrollvariablen Einzelkettenfragmenten. Die IIF wurde wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben durchgeführt. In den hier gezeigten Bildern wurden jeweils 35 ng scFv pro Schnitt verwendet. Als Negativkontrolle dienten 35 μ L BP. Alle scFv zeigen in der IIF das für Dsg-Antikörper typische netzartige Expressionsmuster, das den Zellgrenzen der Keratinozyten entspricht, an der Oberfläche des Affenösophagus. Dies ist ein Indiz dafür, dass die scFv im Gewebe an die gewünschten Zielantigene binden. Skalierungslinie entspricht 100 μ m.

BP = Blockpuffer; Dsg = Desmoglein; IIF = Indirekte Immunfluoreszenz; scFv = *Single chain variable fragment*

Nachdem es gelang Affenösophagus mit den scFv 4.2, 3.2 und px4-3 anzufärben, wurde das Protokoll der IIF auf Affenösophagus auch auf Gefrierschnitten mit humaner Haut durchgeführt. Auch hier konnte eine Affinität der scFv auf das Gewebe nachgewiesen werden. Die mit dem

Fluoreszenzmikroskop ermittelte Intensität der Signale zwischen den verschiedenen scFv unterschied sich. Bei einer Verwendung von 500 ng pro Schnitt zeigte sich bei scFv px4-3 ein stärkeres Signal als bei scFv 4.2 und scFv 3.2. Für scFv 4.2 wurde außerdem eine IIF mit doppelter Menge scFv (1.000 ng) durchgeführt, da die Intensität der Färbung bei 500 ng scFv nicht sehr deutlich war. Als NK wurden 50 µL BP genutzt. Außerdem zeigte sich bei letzteren scFv, dass die Fluoreszenz in den basalen Schichten der Haut stärker war als in den oberflächlichen. Des Weiteren scheint scFv px4-3 deutlich stärker an die Haut zu binden als die anderen scFv, was durch die stärkere Färbung zu erkennen ist (**Abb. 3.9**).

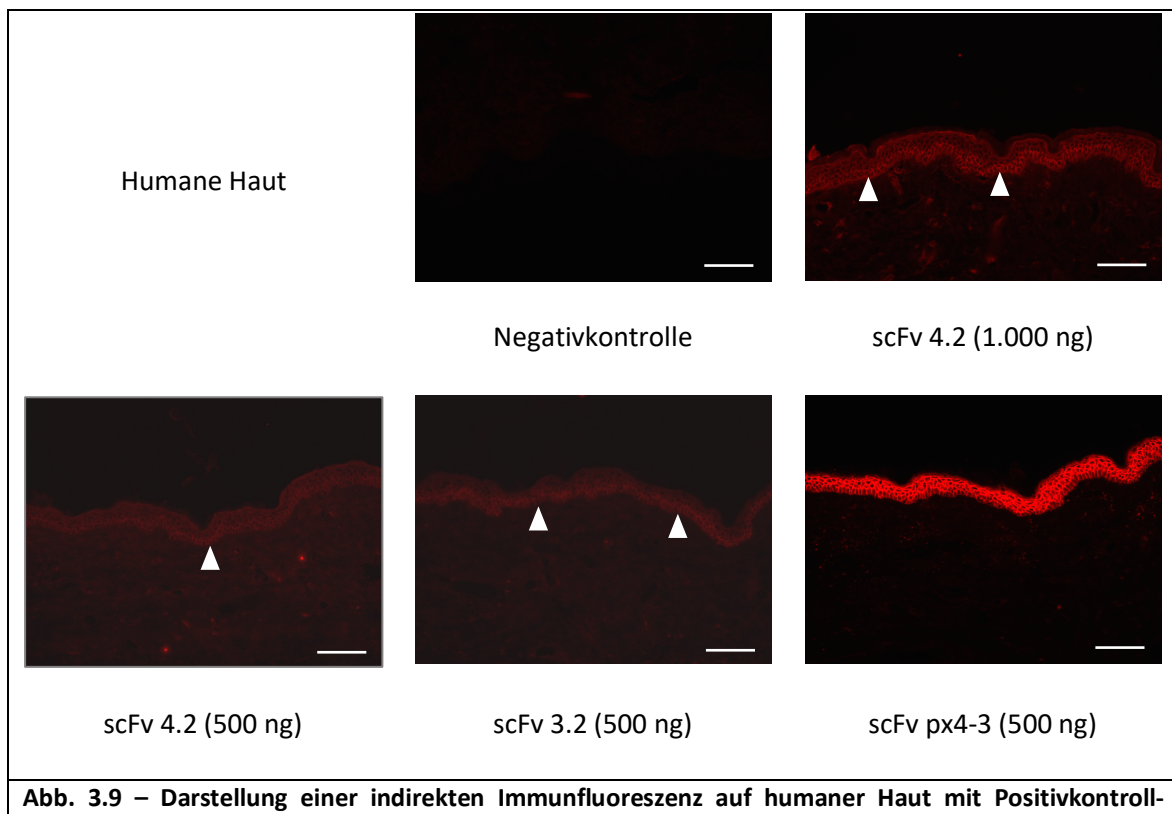


Abb. 3.9 – Darstellung einer indirekten Immunfluoreszenz auf humaner Haut mit Positivkontrollvariablen Einzelkettenfragmenten. Die IIF wurde wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben durchgeführt. In den hier gezeigten Bildern wurden jeweils 500 ng scFv pro Schnitt verwendet. Als Negativkontrolle dienten 50 µL BP. Für scFv 4.2 wurde außerdem eine Färbung mit 1.000 ng scFv durchgeführt. Alle scFv zeigten im Vergleich zur Negativkontrolle ein stärkeres Signal. Dies ist ein Indiz auf eine Bindung der scFv an Zielantigene in der Haut. Das Signal von scFv px4-3 ist in der gesamten Epidermis homogen nachzuweisen und ist intensiver als das von scFv 4.2 und 3.2, welche am deutlichsten in den basalen Epidermisschichten (weiße Pfeile) binden. Das Färbemuster entspricht dem für Dsg-Antikörper typischen netzartigem Muster, das den Zellgrenzen der Keratinozyten entspricht. Skalierungslinie entspricht 100 µm.

BP = Blockpuffer; IIF = Indirekte Immunfluoreszenz; scFv = *Single chain variable fragment*

3.4.1 Bindungen der Thyreoperoxidase-variablen Einzelkettenfragmente an unterschiedliche Gewebe

Nachdem das Protokoll für eine IIF mit scFv durch Versuche mit den Positivkontrollen etabliert werden konnte, wurden auch die TPO-scFv auf ihre Fähigkeit an verschiedene Gewebe zu binden getestet. Da die Positivkontrollen die stärksten Signale auf mit Affenösophagus beschichteten Biochips zeigten, wurden auch die TPO-scFv zuerst auf Affenösophagus mit einer IIF getestet. Es konnte bei einer Verwendung von 3.500 ng in BP verdünnten scFv pro Schnitt bei allen scFv ein Signal nachgewiesen werden, das dem der Positivkontroll-scFv entspricht. Als NK dienten 35 µL BP (Abb. 3.10).

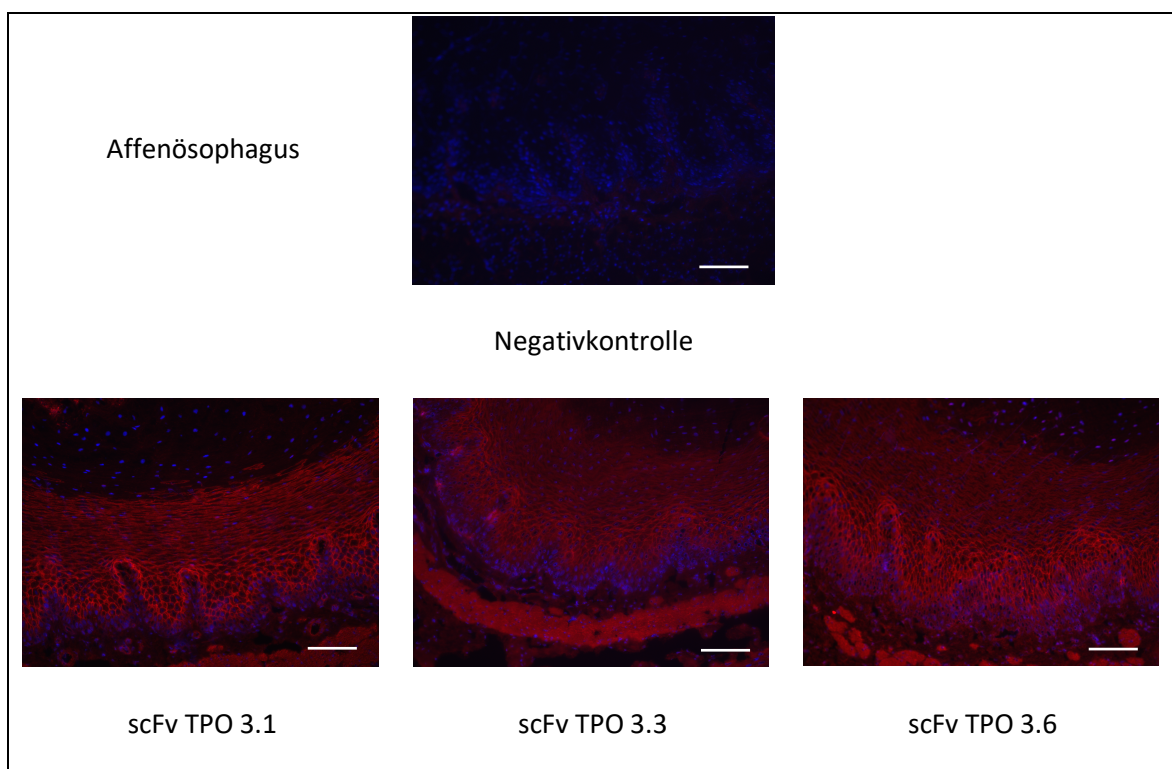


Abbildung 3.10 – Darstellung einer indirekten Immunfluoreszenz auf Affenösophagus mit Thyreoperoxidase-variablen Einzelkettenfragmenten. Die IIF wurde wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben durchgeführt. In den hier gezeigten Bildern wurden jeweils 3.500 ng scFv pro Schnitt verwendet. Als Negativkontrolle dienten 35 µL BP. Alle scFv zeigen in der IIF das für Dsg-Antikörper typische, den Zellgrenzen der Keratinozyten folgende Expressionsmuster an der Oberfläche des Affenösophagus. Dies ist ein Indiz dafür, dass die scFv im Gewebe an die gewünschten Zielantigene binden. Skalierungslinie entspricht 100 µm.

BP = Blockpuffer; IIF = Indirekte Immunfluoreszenz; scFv = *Single chain variable fragment*; TPO = Thyreoperoxidase

Im nächsten Schritt wurden die TPO-scFv auch auf ihre Fähigkeit, an humane Haut zu binden, untersucht. Es wurden jeweils 5.000 ng in BP verdünnte TPO-scFv verwendet. Als NK dienten 50 µL BP. Für scFv TPO 3.1 lässt sich eine Färbung der basalen Epidermisschichten sehen, welches dem

Färbemuster von scFv 3.2 ähnelt. In der IIF von scFv TPO 3.3 und TPO 3.6 lassen sich überwiegend Artefakte nachweisen. ScFv TPO 3.3 färbt die Epidermis gering und unspezifisch. Für scFv TPO 3.6 lässt sich keine Bindung feststellen (**Abb. 3.11**).

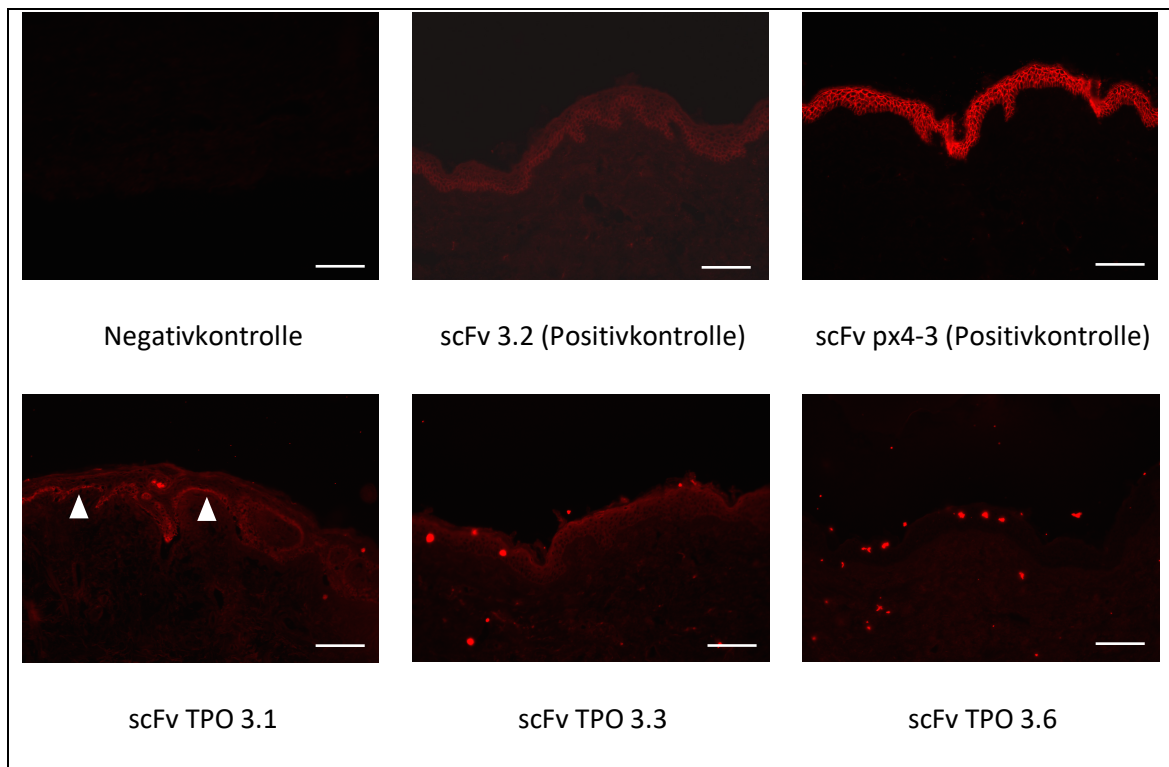


Abbildung 3.11 – Darstellung einer indirekten Immunfluoreszenz auf humaner Haut mit Thyreoperoxidase-variablen Einzelkettenfragmenten. Die IIF wurde wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben durchgeführt. In den hier gezeigten Bildern wurden jeweils 5.000 ng scFv pro Schnitt verwendet. Als Negativkontrolle dienten 50 µL BP. Als Positivkontrolle dienten 500 ng scFv 3.2 und px4-3. ScFv TPO 3.1 zeigt einige Signale in den basalen Epidermisschichten (weiße Pfeile), welche dem Färbemuster von der Positivkontrolle scFv 3.2 ähneln. Bei den scFv TPO 3.3 und TPO 3.6 sind überwiegend Artefakte zu erkennen. Das Färbemuster der Positivkontrolle scFv px4-3 ist intensiver als das aller getesteten TPO-scFv und ist homogen in der gesamten Epidermis zu sehen. Es entspricht dem für den für Dsg-Antikörper typischen, den Zellgrenzen der Keratinozyten folgenden Expressionsmuster. Skalierungslinie entspricht 100 µm.

BP = Blockpuffer; IIF = Indirekte Immunfluoreszenz; scFv = *Single chain variable fragment*; TPO = Thyreoperoxidase

Da es das Ziel dieser Arbeit ist Nicht-Dsg-Antigene im Zusammenhang mit PV zu untersuchen und für die TPO-scFv im ELISA eine gewisse Bindung an TPO nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.3), wurden mit scFv TPO 3.1, 3.3 und 3.6 auch IIF auf mit Schilddrüsengewebe beschichteten Biochips durchgeführt. Bei der IIF wurde nach dem in Kapitel 2.6.3 aufgeführten Protokoll vorgegangen. Es wurden jeweils 3.500 ng in BP verdünnte scFv verwendet. Als Positivkontrolle wurde MoAb 47 (Cat# sc-58432, Santa Cruz), ein kommerzieller Anti-TPO-Antikörper, verwendet. Bei MoAb 47

handelt es sich nicht um ein scFv. Aus diesem Grund musste das Protokoll für die IIF, wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben, abgeändert werden. Es wurden 3.500 ng MoAb 47 verwendet, die in BP verdünnt wurden. Als NK wurden 35 µL BP verwendet. Bei Betrachtung der Positivkontrolle zeigt sich um die Zellen entlang der Follikel (weißer Stern) eine vermehrte Zunahme der Fluoreszenz. Ein vergleichbares Muster lässt sich auch bei Betrachtung von scFv TPO 3.3 erkennen. ScFv TPO 3.3 scheint an Antigene in Schilddrüsengewebe zu binden. Das Färbemuster von scFv TPO 3.1 und scFv TPO 3.6 sind am ehesten auf unspezifische Bindungen zurückzuführen (**Abb. 3.12**).

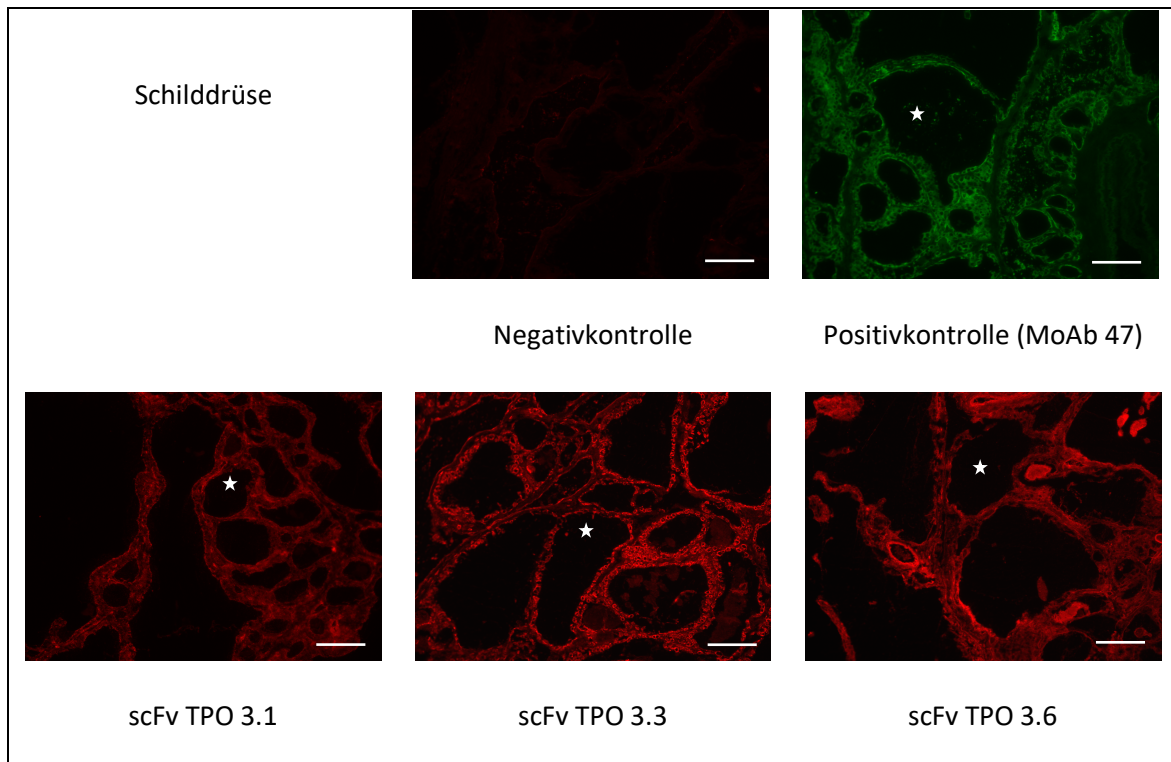
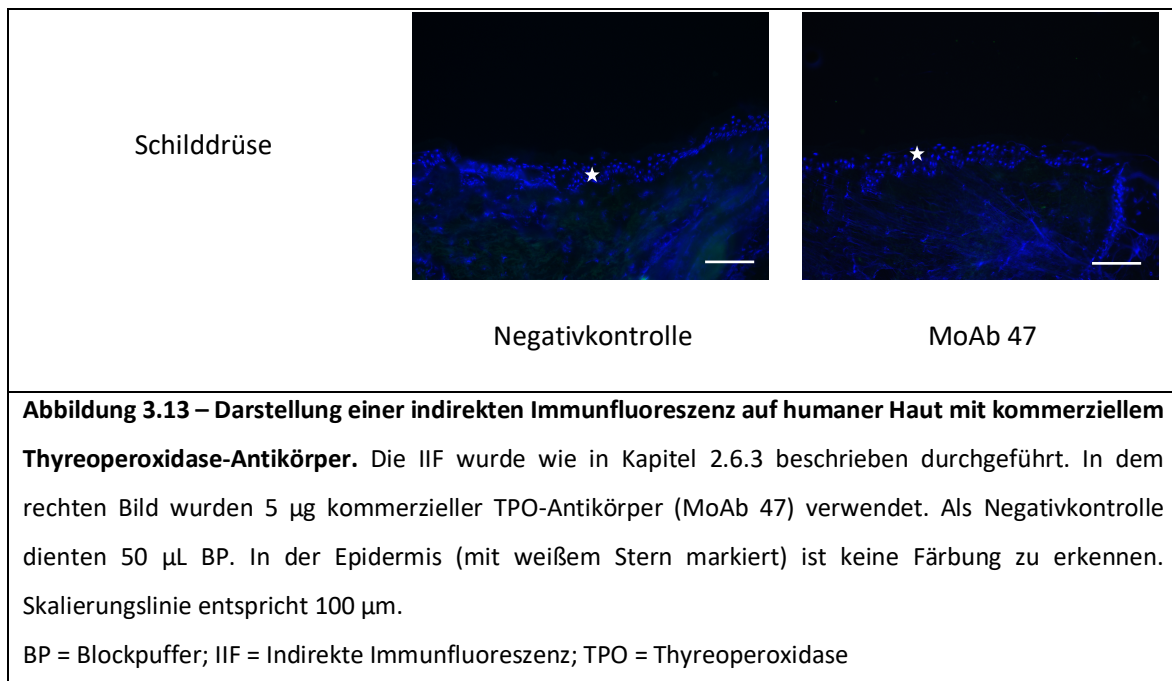


Abb. 3.12 – Darstellung einer indirekten Immunfluoreszenz auf Schilddrüsengewebe mit Thyreoperoxidase-variablen Einzelkettenfragmenten. Die IIF wurde wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben durchgeführt. In den hier gezeigten Bildern wurden jeweils 3.500 ng scFv pro Schnitt verwendet. Als Negativkontrolle dienten 35 µL BP. Als Positivkontrolle dienten 3.500 ng MoAb 47. In der Positivkontrolle zeigt sich eine Färbung an den Zellen entlang der Follikel (beispielhaft mit weißem Stern markiert). Ein ähnliches Färbemuster ist bei scFv TPO 3.3 zu erkennen. Bei scFv TPO 3.1 und scFv TPO 3.6 zeigt sich ein unspezifisches Färbemuster. Skalierungslinie entspricht 100 µm.

BP = Blockpuffer; IIF = Indirekte Immunfluoreszenz; scFv = *Single chain variable fragment*; TPO = Thyreoperoxidase

3.4.2 Bindung kommerzieller Thyreoperoxidase-Antikörper an humane Haut

Es wurde außerdem eine IIF auf humaner Haut mit einem kommerziellen TPO-Antikörper durchgeführt, welcher als MoAb 47 bezeichnet wird. Ziel dieses Experiments war es das Enzym TPO in der Haut nachzuweisen, nachdem mit der RT-PCR der Nachweis von mRNA in Hautproben gelang (**Abb 3.1**). Der Versuch erfolgte anhand des in Kapitel 2.6.3 aufgeführten Protokolls. Im Fall dieser IIF konnte der Antikörper *Alexa Fluor 488 Goat-Anti Mouse IgG (H+L)* als Sekundärantikörper verwendet werden, welcher fluoreszenzmarkiert ist. Aus diesem Grund konnte auf einen Tertiärantikörper verzichtet werden.



Es wurden 5 µg des in BP verdünnten Antikörpers verwendet. Als NK dienten 50 µL BP. Bei der Auswertung ließ sich in der Epidermis keine Färbung erkennen. MoAb 47 scheint nicht an humane Haut zu binden (**Abb. 3.13**).

3.5 Pathogenitätsbestimmung der variablen Einzelkettenfragmente

Die scFv wurden mit einem Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation untersucht. Das Ziel dieser Experimente war es zu untersuchen, ob die Verwendung der scFv zu einer Bildung von Keratinozytenfragmenten führt. Auf diese Weise kann getestet werden, ob die scFv durch die Bindung an ihre Zielantigene in einem *in vitro* Modell einen pathogenen Effekt auslösen. Es wurde nach dem in Kapitel 2.7 beschriebenen Protokoll vorgegangen. Mit jedem scFv wurde dreimal ein Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation durchgeführt. PBS wurde als NK verwendet. Als eine weitere Kontrolle diente ETA. ETA ist ein Toxin, welches in der Lage ist Dsg1 zu spalten (61). Durch dessen Verwendung sollte gezeigt werden, dass eine Spaltung von Dsg1 allein nicht zu einer Fragmentbildung führt. Der Grund hierfür ist die sog. Kompensationstheorie, nach der für die Dissoziation von Keratinozyten Dsg1 und Dsg3 inaktiviert werden müssen (62). Die scFv wurden in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (5 µg und 10 µg) getestet. 10 µg scFv wurden jeweils mit und ohne ETA getestet, 5 µg scFv wurden nur mit ETA untersucht. Auf diese Weise konnte die Wirkung der scFv mit und ohne ETA untersucht werden. Das scFv px4-3 wurde nur ohne ETA getestet, da dieses scFv an Dsg1 und Dsg3 bindet (Kapitel 2.2.1). Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich, dass sowohl PBS als auch 2,5 µg ETA ohne scFv nicht zu einer Bildung von Keratinozytenfragmenten führen. Das scFv 4.2 und scFv 3.2 führen zu einer Fragmentbildung, wenn zusätzlich zu den scFv 2,5 µg ETA verwendet wird. Dabei führt die Verwendung von 10 µg im Vergleich zu 5 µg scFv zu mehr Fragmenten. 10 µg scFv ohne ETA bilden keine Fragmente. Das scFv px4-3 führte auch ohne ETA zu einer Fragmentierung der Keratinozytenschicht. Zusammenfassend wird gezeigt, dass die Inaktivierung von entweder Dsg1 durch ETA oder von Dsg3 durch scFv 4.2 bzw. scFv 3.2 nicht zum Auflösen der Keratinozytenschicht führt. Werden durch Verwendung von scFv px4-3 oder scFv 4.2 bzw. 3.2 mit ETA sowohl Dsg1 als auch Dsg3 inaktiviert, wird die Keratinozytenschicht zerstört (**Abb. 3.14**).

Bei der Untersuchung der Nicht-Dsg-scFv (TPO 3.1, TPO 3.3 und TPO 3.6) ließ sich erkennen, dass diese zu einer Fragmentierung der Keratinozytenschicht führen. Dieser Effekt zeigt sich, wenn zu den scFv außerdem 2,5 µg ETA hinzugefügt werden. Bei scFv TPO 3.1 und scFv TPO 3.6 führte die Verwendung von 10 µg scFv im Vergleich zu 5 µg zu mehr Keratinozytenfragmenten. Im Falle von scFv TPO 3.3 führten 5 µg zu mehr Fragmenten als 10 µg scFv. Im Vergleich zu scFv 4.2, scFv 3.2 und scFv px4-3 entstanden bei den TPO-scFv weniger Fragmente. Zusammenfassend führen scFv TPO 3.1, scFv TPO 3.3 und scFv TPO 3.6 ähnlich wie scFv 4.2 und 3.2 zusammen mit ETA zu einer Dissoziation der Keratinozyten (**Abb. 3.14**).

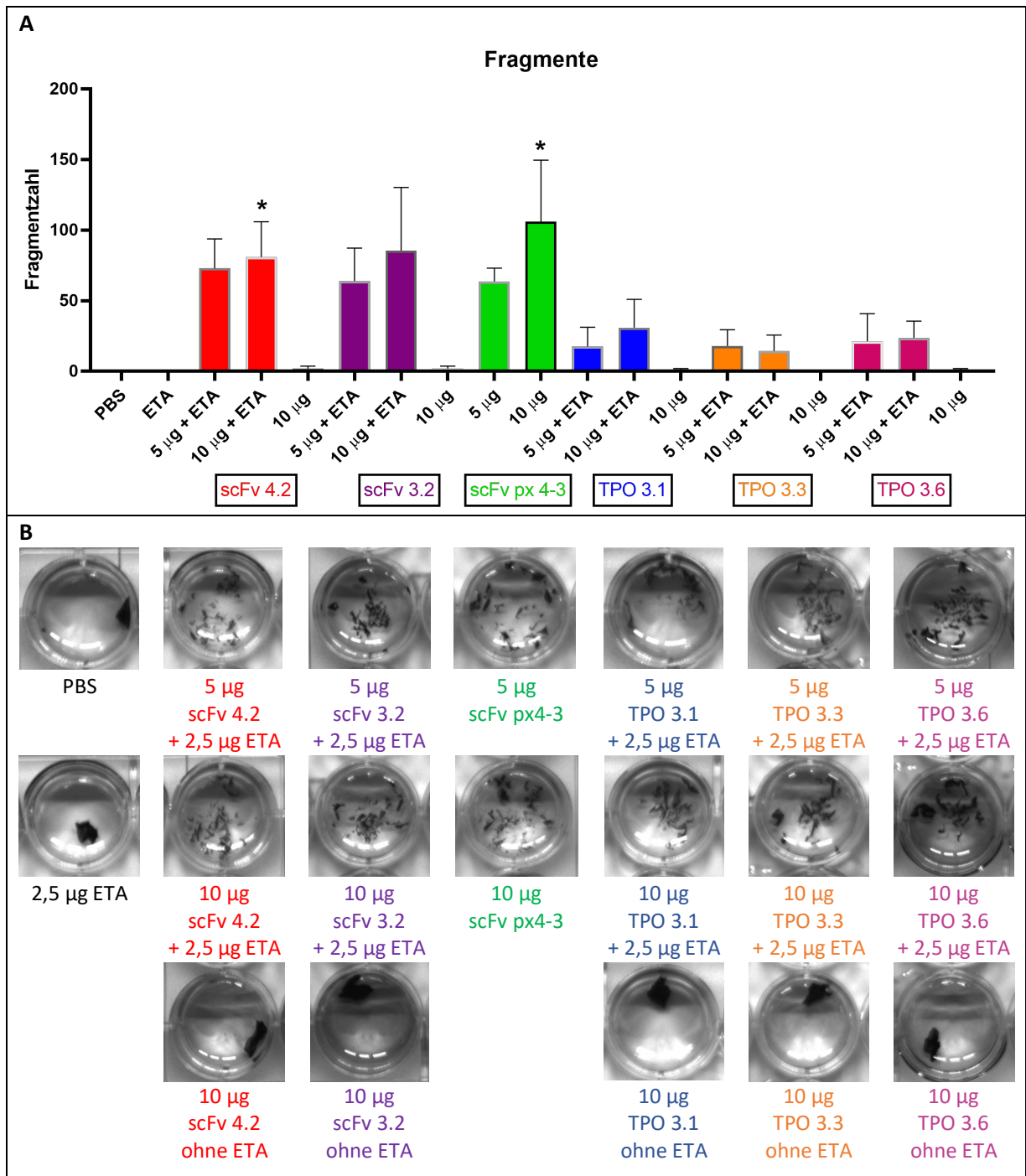
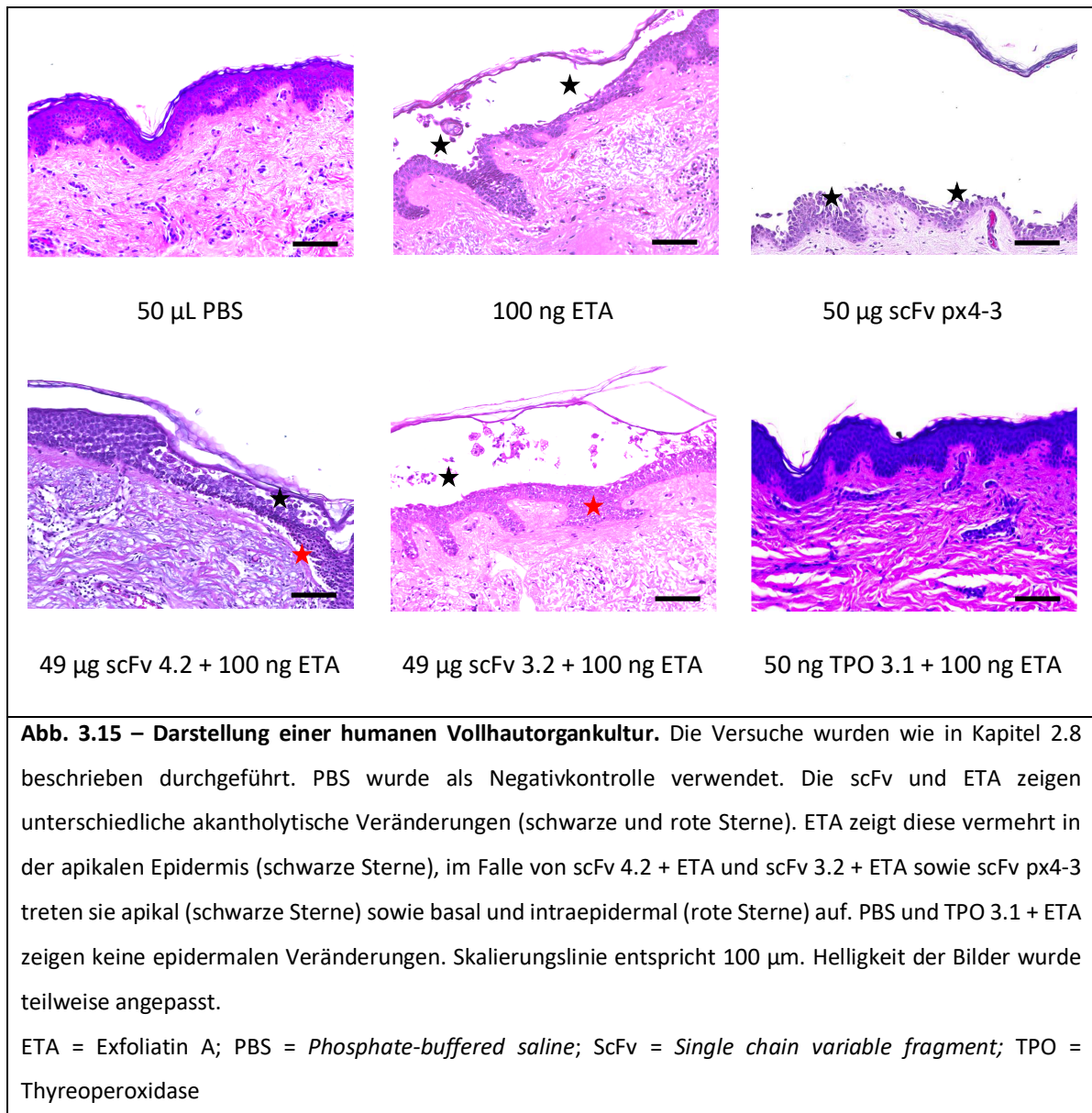


Abb. 3.14 – Darstellung der Ergebnisse des Nachweisverfahrens zur Keratinozytendissoziation. Die Versuche wurden wie in Kapitel 2.7 beschrieben durchgeführt. Oben (**A**) zeigt die Anzahl der Keratinozytenfragmente (Y-Achse) durch Zugabe der scFv nach dreifacher Wiederholung (n=3). Unterschiedliche scFv sind durch Farben gekennzeichnet. Bei ETA-Zugabe wurden jeweils 2,5 µg ETA verwendet. PBS diente als Negativkontrolle. Die Zugabe von scFv und ETA führte zu Fragmentbildung. ETA allein ermöglichte keine Bildung von Fragmenten. ScFv px4-3 bildete auch ohne ETA Fragmente. Die statistische Auswertung erfolgte, da keine Normalverteilung vorlag, mit dem Kruskal-Wallis-Test (jeweils $p < 0,001$, Signifikanzniveau nicht dargestellt) und dem Dunn's-Test (* = $p < 0,05$). Unten (**B**) zeigt beispielhaft Bilder der jeweiligen Wells nach Durchführung des Experiments. ETA = Exfoliatin A; PBS = *Phosphate-buffered saline*; ScFv = *Single chain variable fragment*; TPO = Thyreoperoxidase

3.6 Etablierung der humanen Vollhautorgankultur

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst die Methode der humanen Vollhautorgankultur im Labor für experimentelle Dermatologie Lübeck etabliert und mit Hilfe der Positivkontroll-scFv getestet werden. Anschließend sollten die TPO-scFv auf ihre Fähigkeit eine Blasenbildung auszulösen untersucht werden. Die Etablierung dieser Methode erfolgte zusammen mit Shirin Emtenani, einer Mitdotorandin aus der gleichen Abteilung. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse von humanen Vollhautorgankulturen mit den scFv 4.2, 3.2, px4-3, sowie TPO 3.1 dargestellt (**Abb. 3.15**).



Die **Abb. 3.15** zeigt HE gefärbte humane Hautschnitte 24 h nach Injektion der zu untersuchenden Moleküle. Es wurden jeweils 50 μ L der Proben in ein 1 cm x 1 cm großes Hautstück injiziert. 50 μ L der NK zeigten keinen Effekt. Auf der Abbildung ist eine intakte Epidermis zu erkennen. Die Verwendung von 50 μ g scFv px4-3 führte zu einer Acantholyse. Die Abstände zwischen den einzelnen Keratinozyten sind verbreitert und die oberen Epidermisschichten sind von den basalen

Schichten getrennt. Das Injizieren von 100 ng ETA, welches in 49 µL PBS gelöst ist, führt zu einer Akantholyse in den apikalen Anteilen der Epidermis. Es gelang nicht durch alleiniges Verwenden von 50 µg scFv 4.2 oder 50 µg scFv 3.2 eine Lösung der Zell-Zellkontakte zu erreichen. Die Mischung von 49 µg scFv 4.2 und 100 ng ETA, bzw. 49 µg scFv 3.2 und 100 ng ETA führte zu akantholytischen Veränderungen der Haut. In diesem Fall sind Lockerungen der Keratinozyten in den basalen und apikalen Epidermisschichten zu erkennen. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit der humanen Vollhautorgankultur zeigen, dass scFv px4-3 in der Lage ist, ohne das Hinzufügen von weiteren Substanzen wie ETA eine Akantholyse der Epidermis auszulösen. Für einige scFv scheint die humane Vollhautorgankultur ein *in vitro* Verfahren zur Testung auf Pathogenität zu sein.

Nach den durch die Untersuchung von Positivkontrollen erlangten Erkenntnissen, wurde außerdem das scFv TPO 3.1 mit Hilfe der humanen Vollhautorgankultur untersucht. Auf die Untersuchung der scFv TPO 3.3 und TPO 3.6 wurde verzichtet, da für diese scFv in der IIF kein Bindungsnachweis an humane Haut gezeigt werden konnte und Hautproben für die Durchführung des Experiments nur begrenzt zur Verfügung stehen. Die Injektion von 50 µg scFv TPO 3.1 zeigte keine Akantholyse. Auch das Hinzufügen von 100 ng ETA konnte nicht zu einer Lockerung der Keratinozyten beitragen (**Abb. 3.15**).

4. Diskussion

4.1 Etablierung von Methoden zur Charakterisierung von variablen Einzelkettenfragmenten

Durch Verwendung der in dieser Arbeit verwendeten Positivkontrollen (scFv 4.2, scFv 3.2 und scFv px4-3) sollten Methoden im Labor des Lübecker Instituts für experimentelle Dermatologie etabliert werden, mit denen weitere scFv untersucht werden können. In dieser Arbeit wurden nach der Etablierung die scFv TPO 3.1, TPO 3.3 und TPO 3.6 getestet. Das Ziel dieser Versuche war es, Methoden zur Verfügung zu haben, um in dieser wie auch in weiteren Arbeiten andere scFv zu charakterisieren.

4.1.1 Enzymgebundene Immunadsorptionsnachweis-Kits eignen sich zum Bindungsnachweis

Die mit den Positivkontroll-scFv durchgeführten ELISA sollten eine Bindung der scFv an die erwarteten Antigene zeigen. ELISA dienen regelmäßig als Methode zum Nachweis von Antikörpern (63). Die verwendeten scFv wurden bereits in vorherigen Arbeiten beschrieben (54, 55). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das in Kapitel 2.5 beschriebene Protokoll zur Durchführung von ELISA mit scFv erstellt. Dies erfolgte durch mehrfache Wiederholung und Anpassung der einzelnen Versuchsschritte. Nachdem das beschriebene Protokoll erstellt worden war, zeigten sich nach dessen Durchführung für scFv 4.2, scFv 3.2 und scFv px4-3 Bindungen an die erwarteten Antigene (**Abb. 3.4**). Im Falle von scFv 4.2 und scFv 3.2 war dieses Antigen Dsg3, für scFv px4-3 Dsg1 und Dsg3. Da ELISA bereits routinemäßig zur Detektion von Antikörpern verwendet werden und in dieser Arbeit mit dem erstellten Protokoll eine Bindung der scFv an die zuvor beschriebenen Antigene gezeigt werden konnte, ist davon auszugehen, dass auch weitere scFv nach der hier durchgeführten Vorgehensweise untersucht werden können. Aus diesem Grund wurden die scFv TPO 3.1, TPO 3.3. und TPO 3.6 ebenfalls, wie in Kapitel 2.5 beschrieben, getestet. Prinzipiell kann das etablierte Vorgehen auch für viele weitere scFv und verschiedene Antigene genutzt werden.

4.1.2 Indirekte Immunfluoreszenz ermöglicht Bindungsnachweis an Gewebe

Durch IIF können Antigene oder Antikörper in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen werden (58). In der klinischen Diagnostik werden Blutseren von PV-Patienten routinemäßig auf Bindungen von Dsg1- und Dsg3-Antikörpern an Affenösophagus untersucht (5, 24, Kapitel 1.3). In dieser Arbeit sollte ein Protokoll erstellt werden, mit dem sich unterschiedliche scFv hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften an verschiedene Gewebe untersuchen lassen. Da die Phagenbibliothek PV3a aus dem Serum eines PV-Patienten erstellt wurde (50, Kapitel 1.5), wurde in dieser Arbeit ebenfalls eine IIF auf Affenösophagus durchgeführt. Als weiteres Gewebe wurde humane Haut verwendet. Es wurde nach dem in Kapitel 2.6 beschriebenen Protokoll vorgegangen. Zunächst wurden die scFv 4.2, 3.2 und px4-3 untersucht, da für diese scFv bereits erfolgreiche Bindungen in

der IIF beschrieben worden sind (5, 24). Die Auswertung der mit den Positivkontroll-scFv durchgeführten IIF zeigte das für Dsg-Antikörper typische netzartige Färbemuster, das den Zellgrenzen zwischen den Keratinozyten entspricht, unter dem Fluoreszenzmikroskop. Im Vergleich zwischen Affenösophagus und humaner Haut, musste auf Affenösophagus eine niedrigere scFv-Konzentration verwendet werden, um eine Antikörperbindung nachzuweisen (**Abb. 3.8, Abb. 3.9**). Des Weiteren zeigte sich bei scFv px4-3 eine deutlichere Färbung als bei scFv 4.2 und 3.2. Dies wurde insbesondere bei der IIF auf humaner Haut (**Abb. 3.9**) deutlich. Bei diesen Versuchen konnte auch ein unterschiedliches Verteilungsmuster der einzelnen scFv beobachtet werden. Eine Erklärung hierfür könnte die unterschiedliche Anordnung der Dsg in den verschiedenen Hautschichten sein (Kapitel 1.3, **Abb. 1.5**). ScFv 4.2 und 3.2 binden als Dsg3-Antikörperfragment an die Dsg in den basalen Epidermisschichten, während scFv px4-3 zusätzlich an Dsg 1 bindet. Somit lässt sich durch die Verwendung von scFv px 4-3 in allen Schichten der Epidermis eine Färbung entlang der Keratinozyten detektieren. Zusammenfassend lässt sich für alle Positivkontrollen mit Hilfe der IIF eine Bindung an Affenösophagus und humane Haut nachweisen. Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass mit dem in Kapitel 2.6 beschriebenen Protokoll die Bindung von scFv an verschiedene Gewebe untersucht werden kann. Da verschiedene scFv ein positives Bindungsverhalten zeigten, ist davon auszugehen, dass das Verfahren auch für weitere scFv geeignet ist. Außerdem scheint auch eine Durchführung des Versuchsablaufs auf unterschiedlichen Geweben möglich zu sein, da eine Bindung der scFv sowohl an Affenösophagus als auch an humane Haut gezeigt werden konnte. Die durch die Untersuchung der Positivkontrollen erstellten Versuchsprotokolle ermöglichten anschließend Versuche mit den scFv TPO 3.1, TPO 3.3 und TPO 3.6. Bei diesen scFv wurde zusätzlich eine IIF auf Schilddrüsengewebe durchgeführt (Kapitel 3.4.1).

4.1.3 Das Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation eignet sich zum *in vitro* Pathogenitätsnachweis

Nachdem eine Bindung der Positivkontroll-scFv an ein bestimmtes Antigen und anschließend an ein Gewebe nachgewiesen werden konnte, sollten Verfahren etabliert werden, mit denen die scFv auf die Möglichkeit einen pathogenen Effekt auszulösen untersucht werden können. Zu diesen Modellen gehört das Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation, welches mit Hilfe der Positivkontroll-scFv (scFv 4.2, 3.2 und px4-3) etabliert werden sollte. Im Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation wird eine einlagige Zellschicht HaCaT-Zellen mit scFv inkubiert und anschließend mechanischem Stress ausgesetzt. Zerfällt die Zellschicht in einzelne Fragmente, kann von einem möglichen pathogenen Effekt eines Antikörpers ausgegangen werden (59, Kapitel 2.7). Das Verfahren wurde bereits zur Untersuchung von Antikörpern verwendet (64). In dieser Arbeit sollte getestet werden, ob mit Hilfe des Nachweisverfahrens zur Keratinozytendissoziation auch für

die scFv der Phagenbibliothek PV3a eine mögliche Pathogenität nachgewiesen werden kann. Die Auswertung der Versuche zeigte, dass die Zugabe der scFv eine Fragmentierung der HaCaT-Zellen ermöglicht (**Abb. 3.14**). Interessanterweise führten scFv 4.2 und scFv 3.2 nur dann zu einer Fragmentierung der Zellschicht, wenn gleichzeitig ETA hinzugegeben wurde. Dies war im Falle des scFv px4-3 nicht nötig. Eine mögliche Erklärung hierfür bietet die sog. Kompensationstheorie. Nach dieser Theorie müssen für eine vollständige Aufhebung der Zellkontakte sowohl Dsg1 als auch Dsg3 inaktiviert werden (62, 65). Die scFv 4.2 und 3.2 inhibieren nur Dsg3, weshalb bei diesen scFv zusätzlich das Dsg1 inhibierende ETA hinzugegeben werden muss (61). Das scFv px4-3 hingegen führt zur Deaktivierung von Dsg1 und Dsg3, weshalb hier kein ETA nötig ist. Zusammenfassend scheint das Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation eine geeignete Methode zu sein, um scFv auf einen möglichen pathogenen Effekt zu untersuchen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass auf diese Weise nur scFv gegen Dsg getestet werden können, da das Modell auf der Fragmentierung von HaCaT-Zellen beruht, welche insbesondere durch die Inhibierung von Dsg ermöglicht wird (5), (Kapitel 1.1.1, **Abb. 1.1**).

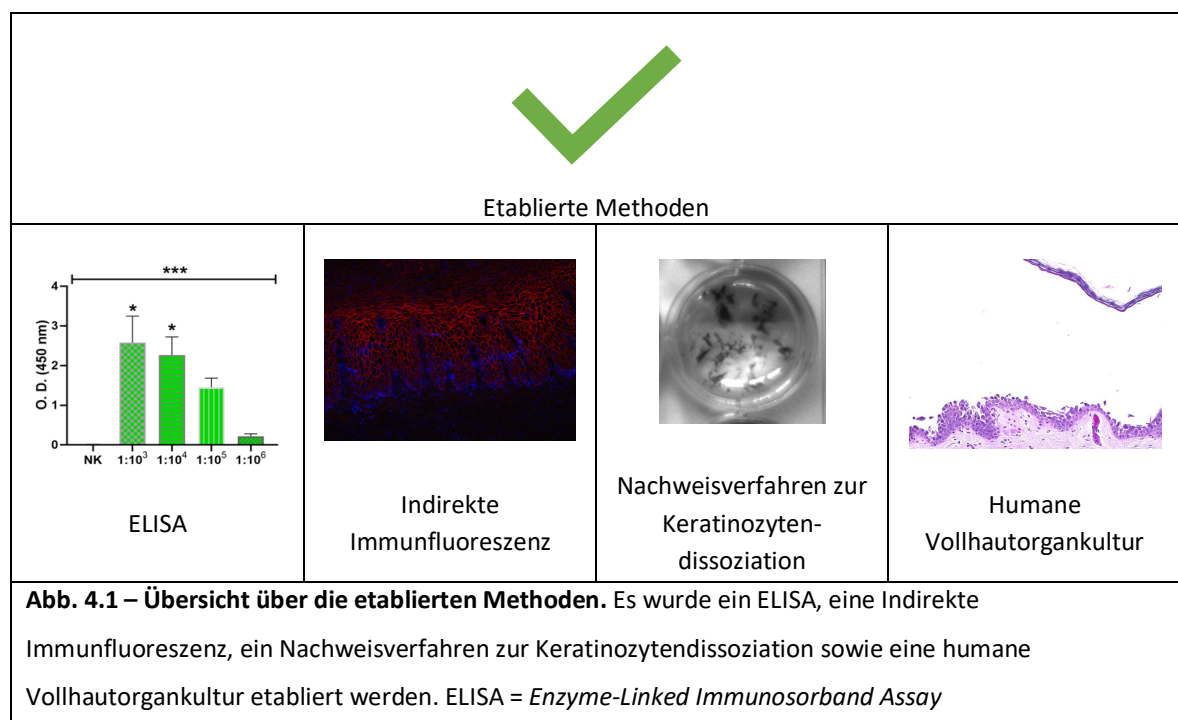
4.1.4 Humane Vollhautorgankultur ermöglicht *in vitro* Pathogenitätsnachweis durch Auslösen einer Akantholyse

Die humane Vollhautorgankultur ist eine weitere Methode zur Untersuchung, ob ein Antikörper in der Lage ist einen pathogenen Effekt auszulösen. Das Verfahren wird in Kapitel 2.8 beschrieben. Kommt es nach Injektion von Antikörpern zur Akantholyse, kann von Pathogenität ausgegangen werden (66). Die Auswertung der Ergebnisse der humanen Vollhautorgankultur zeigte, dass eine Injektion von 50 µL scFv px4-3 nach 24 h zu einer Akantholyse führt (**Abb. 3.15**). Bei der Untersuchung der Auswertung von scFv 4.2 und scFv 3.2 konnte nur dann eine Lockerung der Zell-Zellkontakte betrachtet werden, wenn zusätzlich zu 49 µg scFv weitere 100 ng ETA hinzugefügt wurden. Beim Vergleichen der Ergebnisse von scFv und ETA und der alleinigen Injektion von ETA, lässt sich ein Unterschied über die Verteilung der Akantholyse in den einzelnen Epidermisschichten erkennen (**Abb. 3.15**). Die Injektion von ETA führte zu einer Ablösung der apikalen von den basalen Epidermisanteilen. Die Akantholyse trat überwiegend in den oberen Anteilen der Epidermis auf. Durch das Hinzufügen von scFv 4.2 und scFv 3.2 zu ETA konnte auch in den basalen Bereichen der Epidermis eine Auflösung der Zellkontakte beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung wäre die Wirkung der scFv und ETA auf Dsg1 und 3, sowie die Verteilung der Dsg in der Epidermis. Dsg1 ist in der gesamten Epidermis verteilt. Dsg3 ist hingegen nur in den basalen Schichten vertreten (23, 24, **Abb. 1.5**). Aus diesem Grund führt die Inhibierung von Dsg1 durch ETA in der Haut zu einer Akantholyse. Die alleinige Hemmung von Dsg3 durch die scFv kann jedoch keine ausreichende Auflösung der Zellkontakte erreichen, da das verbliebende Dsg1 ausreicht, um eine Akantholyse zu verhindern. In diesem Fall kann nur das zusätzliche Ausschalten von Dsg1 eine Trennung der

Epidermisschichten ermöglichen. Diese Erkenntnis erklärt auch die Pathogenese unterschiedlicher Pemphigus-Erkrankungen. Im Fall von PF führen Dsg1-Antikörper zur Blasenbildung der Haut. Das durch Dsg3-Antikörper ausgelöste PV hingegen hat zwei Formen. Beim mukösen PV tritt eine durch Dsg3-Antikörper vermittelte Blasenbildung nur an den Schleimhäuten auf, an der Haut sind keine Blasen zu erkennen. Nur wenn zusätzlich zu den Dsg3-Antikörpern auch Dsg1-Antikörper auftreten, entsteht die Form des mukokutanen PV, bei dem es auch an der Haut zur Blasenbildung kommt (Kapitel 1.3). Im Modell der humanen Vollhautorgankultur führt diese Erkenntnis zu einer Schwierigkeit. Es lässt sich beim Untersuchen von scFv, die nur Dsg3 inaktivieren, nicht klar abgrenzen, ob die beobachtete Akantholyse durch ETA allein oder durch die scFv und ETA ausgelöst wird. In diesem Fall kann eine unterschiedliche Verteilung der Akantholyse in den einzelnen Schichten der Epidermis einen möglichen Hinweis auf einen pathogenen Effekt der scFv geben. Zur Untersuchung von Dsg1 und Dsg3 inhibierenden scFv, wie es bei scFv px4-3 der Fall ist, ist die humane Vollhautorgankultur hingegen eine anschauliche Methode. Die Beobachtungen der Akantholyse durch Dsg1 zerstörendes ETA legt die Vermutung nahe, dass Dsg1 inhibierende scFv ebenfalls mit dieser Methode untersucht werden können.

4.1.5 Zusammenfassung der erfolgreich etablierten Methoden

Durch die Verwendung der Positivkontrollen scFv 4.2, scFv 3.2 und scFv px4-3 gelang es durch mehrfaches Wiederholen Protokolle für die zuvor geplanten Methoden (ELISA, IIF, Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation und Humane Vollhautorgankultur) zu erstellen (Abb. 4.1).



4.2 Charakterisierung von Nicht-Desmoglein-Antikörpern

Nach der Etablierung der in Kapitel 4.1 beschriebenen Methoden zur Untersuchung und Charakterisierung von scFv (ELISA, IIF, Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation und humane Vollhautorgankultur) wurden auch Nicht-Dsg-scFv (scFv TPO 3.1, scFv TPO 3.3 und scFv TPO 3.6) untersucht. Die Besonderheit dieser scFv besteht darin, dass im Rahmen des APD (Kapitel 1.5) die Selektion gegen TPO stattfand. Das Ziel des APD war es scFv zu selektieren, die sowohl gegen TPO als auch gegen Dsg gerichtet sind.

4.2.1 Nicht-Desmoglein-variable Einzelkettenfragmente binden an Desmoglein und Thyreoperoxidase

Mit den Nicht-Dsg-scFv TPO 3.1, TPO 3.3 und TPO 3.6 wurden ELISA und IIF durchgeführt, um die Bindungsfähigkeiten der scFv an verschiedene Antigene zu untersuchen. Die scFv wurden im ELISA in mehreren Verdünnungsstufen nach dem in Kapitel 2.5 beschriebenen Protokoll getestet. Sie zeigten dabei eine signifikante Bindung an die getesteten Antigene (TPO, Dsg1, Dsg3 und BP180) (**Abb. 3.5, 3.6, 3.7**). Bei der Betrachtung der O.D. ließen sich bei den verschiedenen Antigenen deutliche Abweichungen erkennen. Im Falle von Dsg1 und Dsg3 bewirkten alle scFv auch bei höheren Verdünnungen (1:1.000) eine gut zu erkennende Verfärbung der Testsubstanzen mit durchschnittlichen O.D. Werten > 2 für TPO 3.1 und TPO 3.6, bzw. > 1 für TPO 3.3. Im TPO-ELISA betrug die gemessene O.D. der Testsubstanzen bei geringerer Verdünnung (1:10) für TPO 3.1 $\approx 0,8$, für TPO 3.3 $\approx 0,4$ und für TPO 3.6 $\approx 0,7$ (jeweils auf eine Nachkommastelle gerundet). Es wurde außerdem mit allen Nicht-Dsg-scFv ein ELISA mit BP180 durchgeführt. Die durchschnittlich ermittelte O.D. bei der geringsten Verdünnung (1:10) betrug bei den scFv in diesem Fall für TPO 3.1 $\approx 2,7$, TPO 3.3 $\approx 0,2$ und für TPO 3.6 $\approx 0,7$. Es besteht demnach zwischen den Nicht-Dsg-scFv eine starke Abweichung der O.D. im BP180 ELISA. Bei TPO 3.3 und TPO 3.6 befinden sich die Werte des TPO und des BP180 im selben Bereich, während sie für TPO 3.1 deutlich darüber liegen. Die ELISA Ergebnisse der Nicht-Dsg-scFv zeigen zusammenfassend, dass die TPO-scFv an Dsg1 und Dsg3 binden. Eine signifikante Bindung an TPO tritt erst bei höheren Konzentrationen auf und ist bezogen auf die gemessenen O.D.-Werte schwächer. Bei geringer Verdünnung von 1:10 konnte bei allen scFv auch im BP180 ELISA ein signifikant messbares Signal gemessen werden, obwohl im APD nicht gegen dieses Antigen selektiert wurde. Aufgrund dieser Beobachtung besteht die Möglichkeit, dass es bei diesen geringen Verdünnungen zu einer unspezifischen Bindung der scFv kommt (67). Die gemessenen O.D.-Werte von TPO und BP180 wären demnach möglicherweise auf eine unspezifische Bindung der scFv zurückzuführen.

4.2.2 Nicht-Desmoglein-variable Einzelkettenfragmente binden unterschiedlich stark an verschiedene Gewebe

Die Auswertung der IIF mit den Nicht-Dsg-scFv zeigte eine Bindung der scFv TPO 3.1, TPO 3.3 und TPO 3.6 an Affenösophagus (**Abb. 3.10**). Das Färbemuster ähnelt dabei dem netzartigen, den Zellgrenzen der Keratinozyten folgendem Färbemuster der scFv 4.2, 3.2 und px4-3. Da für die Nicht-Dsg-scFv bereits im ELISA eine Bindung an Dsg1 und Dsg3 nachgewiesen werden konnte, wird das für Dsg-Antikörper typische Färbemuster (24) am ehesten auf eine Bindung der scFv an Dsg zurückzuführen sein. Auf humaner Haut konnte für scFv TPO 3.3 und scFv TPO 3.6 keine spezifische Bindung nachgewiesen werden (**Abb. 3.11**). Für das scFv TPO 3.1 konnte bei einer hohen Konzentration eine Bindung an die basalen Hautschichten erreicht werden. Da die Bindung an humane Haut erst bei einer großen Menge scFv TPO 3.1 zu erkennen ist, könnte es möglich sein, dass die Färbung durch unspezifische Bindung zustande kommt (68). Eine für hohe Antikörperkonzentrationen übliche Färbung des Hintergrunds (69) findet hingegen nicht statt. Auch die Dermis wird durch scFv TPO 3.1 nicht angefärbt. Insgesamt lässt sich humane Haut durch die Nicht-Dsg-scFv schlechter anfärben als Affenösophagus, welcher beim Nachweis von Dsg-Antikörpern in der IIF eine höhere Sensitivität aufweist (5, 70) und deshalb routinemäßig in der PV-Diagnostik verwendet wird (71). Diese Besonderheit lässt sich auch durch die mit den Nicht-Dsg-scFv durchgeführten IIF bestätigen.

Die Auswertung der IIF mit den Nicht-Dsg-scFv auf Schilddrüsengewebe zeigte für das scFv TPO 3.3 eine mit der Positivkontrolle, einem kommerziellen Anti-TPO Antikörper, vergleichbare Färbung der Schilddrüsenfollikel (**Abb. 3.12**). Da das Enzym TPO in den die Follikel umgebenden Epithelzellen exprimiert wird (35), ist durch TPO-Antikörper bzw. TPO-scFv eine Färbung dieser Zellen zu erwarten. ScFv TPO 3.3 scheint den Ergebnissen der IIF nach an TPO in Schilddrüsengewebe zu binden. Im Falle der scFv TPO 3.1 und TPO 3.6 konnte hingegen kein vergleichbares Färbemuster nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigt mit TPO 3.3 das scFv mit den geringsten Werten im TPO ELISA (Kapitel 3.3) als einziges ein Färbemuster, dass auf eine mögliche Bindung an TPO hindeutet. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse des ELISA und der IIF, dass eine Bindung der Nicht-Dsg-scFv an Dsg1 und Dsg3 besteht. Die Bindung an TPO scheint schwach, aber zumindest für scFv TPO 3.3 ausreichend zu sein, um an Gewebe zu binden.

4.2.3 Fragmentierung der Zellschicht ist vermutlich auf Bindung der variablen Einzelkettenfragmente an Desmoglein zurückzuführen

Bei der Durchführung des Nachweisverfahrens zur Keratinozytendissoziation konnte bei allen Nicht-Dsg-scFv eine Fragmentierung der HaCaT-Zellen beobachtet werden (**Abb. 3.14**). Die Anzahl der Hautfragmente der einzelnen scFv war im Falle der Nicht-Dsg-scFv nicht signifikant, es konnte

aber ein Unterschied im Vergleich zur NK erkannt werden. Die NK zeigte 1 Fragment, während die TPO-scFv zu einer Bildung von 14 bis 31 Fragmenten führten, abhängig von dem verwendeten scFv und dessen Konzentration. Bei der durch die Ergebnisse gezeigten Tendenz würde eine Erhöhung der Versuchswiederholungen vermutlich zu einer Verbesserung der Signifikanz führen (72, 73). Das Ziel dieser Versuche war es zu untersuchen, ob die scFv in der Lage sind *in vitro* einen pathogenen Effekt auszulösen. Bei einer im ELISA gezeigten Bindung der scFv an Dsg1 und Dsg3 (**Abb. 3.5, 3.6, 3.7**), wäre eine Auflösung der Zellschicht ohne die Zugabe von ETA zu erwarten. Diese Vermutung ergibt sich durch die Beobachtung des Dsg1 und Dsg3 inaktivierendem scFv px4-3, welches in der Lage ist ohne Zugabe von ETA eine Fragmentierung der Zellschicht zu verursachen (Kapitel 4.1.3, **Abb. 3.14**).

Diese Erwartung konnte im Nachweisverfahrens zur Keratinozytendissoziation bei den TPO-scFv nicht bestätigt werden. Eine Fragmentierung der Zellschicht konnte in diesem Fall nur bei einer Zugabe von dem Dsg1 deaktivierendem ETA erreicht werden. Es ist nicht davon auszugehen, dass die Bildung der Hautfragmente einzig durch das zu den scFv hinzugegebene ETA verursacht wird, da ETA allein nicht zu einer Fragmentierung der Zellen führt (**Abb. 3.14**). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte durch die Epitope, an die die scFv binden, erklärt werden. Studien haben gezeigt, dass Dsg-Antikörper im Rahmen der Pathogenese von PV insbesondere an Bereiche im amino-terminalen Ende von Dsg3 und Dsg1 binden (74, 75). Möglicherweise interagieren die TPO-scFv mit Dsg1 und Dsg3, aber die Epitope, an die sie binden, ermöglichen keine Auflösung der Zell-Zellkontakte, da sie in nicht für die Interaktion relevanten Bereichen stattfindet. Eine Blockierung dieser Epitope ermöglicht eventuell erst durch die Inaktivierung weiterer Bereiche einen pathogenen Effekt auszulösen. Eine weitere Erklärung wäre auch, dass erst eine größere Menge scFv in der Lage ist, ohne ETA eine Auflösung der Zellschicht zu bewirken. Obwohl die scFv TPO 3.1, TPO 3.3 und TPO 3.6 im Rahmen des APD gegen TPO selektiert wurden und im ELISA, sowie im Fall von TPO 3.3 auch in der IIF an TPO bzw. Schilddrüsengewebe binden, sind die im Rahmen des Nachweisverfahrens zur Keratinozytendissoziation beobachteten Ergebnisse mit großer Wahrscheinlichkeit auf die im ELISA gezeigte Dsg-Bindung der scFv zurückzuführen.

4.2.4 Nicht-Desmoglein-variable Einzelkettenfragmente verursachen keine Akantholyse

Bei der Untersuchung der Nicht-Dsg-scFv mit der humanen Vollhautorgankultur wurde nur das scFv TPO 3.1 verwendet. Die Entscheidung beruht darauf, dass nur für dieses scFv in der IIF ein Bindungsnachweis an humane Haut gezeigt werden konnte (**Abb 3.11**). Da dies mit scFv TPO 3.3 und TPO 3.6 nicht gelang, wurde aufgrund des hohen Materialaufwandes der Methode auf eine Untersuchung dieser scFv verzichtet. Bei der Durchführung der humanen Vollhautorgankultur mit scFv TPO 3.1 konnte keine Akantholyse nachgewiesen werden. Dies könnte zum einen an einer zu geringen Menge an verwendetem scFv liegen. Alternativ würde die in Kapitel 4.2.3 beschriebene

Bindung der scFv an für die Zellkontakte weniger relevante Bereiche von Dsg diese Beobachtung erklären. Interessanterweise konnte auch unter der Verwendung von ETA keine Auflösung der Zellkontakte beobachtet werden. Dies ist am ehesten auf fehlerhaftes ETA zurückzuführen, da in den durchgeführten Versuchen mit scFv TPO 3.1 auch durch die Injektion von ETA ohne scFv keine Akantholyse beobachtet werden konnte.

4.2.5 Zusammenfassende Betrachtung der Nicht-Desmoglein-variablen Einzelkettenfragmente

Von den drei untersuchten TPO-scFv ist TPO 3.3 am interessantesten. Der Grund hierfür liegt in den Ergebnissen der IIF auf Schilddrüsengewebe, da es in der Lage war an Schilddrüsengewebe zu binden (**Abb. 3.12**). Die im TPO-ELISA gemessenen Ergebnisse (**Abb. 3.6**) scheinen somit auf eine tatsächliche Reaktion mit TPO zurückzuführen zu sein. TPO 3.3 besitzt demnach eine Kreuzreaktivität mit Dsg und TPO. Die im Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation beobachtete Fragmentbildung (**Abb. 3.14**) lässt außerdem eine mögliche Pathogenität vermuten. Die anderen TPO-scFv (TPO 3.1 und TPO 3.6) binden an Dsg1 und Dsg3 und scheinen einen ähnlichen pathogenen Effekt wie TPO 3.3 zu besitzen. Schilddrüsengewebe ließ sich mit diesen scFv in der IIF jedoch nicht anfärben. Mögliche Ursachen für die geringe TPO-Bindung und die im Vergleich zu den Positivkontrollen schwächere Dsg-Aktivität, die sich z.B. bei der IIF auf humaner Haut zeigt (**Abb. 3.11**), werden in den nächsten Kapiteln diskutiert.

4.2.6 Geringe Thyreoperoxidase-Bindung aufgrund fehlender Ribonukleinsäuren für Anti-Thyreoperoxidase-Antikörper in Patientenserum

Interessanterweise fallen die Bindungseigenschaften der TPO-scFv an Dsg stärker aus als an TPO. Eine mögliche Erklärung für diese Eigenschaft könnte die Herkunft der scFv sein. Die Phagenbibliothek PV3a wurde mit RNA erstellt, die aus dem Blut eines mukokutanen PV-Patienten isoliert wurde (50). Da der mukokutane PV durch Dsg1- und Dsg3-Antikörper verursacht wird, ist das Auftreten von für diese Antikörper kodierender RNA in B-Zellen dieses Patienten zu erwarten. Von RNA für gegen TPO gerichtete Antikörper im Serum des Patienten ist jedoch primär nicht auszugehen. Durch APD konnten aus der Phagenbibliothek PV3a bereits gegen Dsg gerichtete Antikörper selektiert werden, nicht jedoch TPO-scFv. Möglicherweise besitzen TPO und Dsg ähnliche Epitope, an die die scFv binden. Ein TPO-scFv könnte dann an Dsg und ein Dsg-scFv an TPO binden. Bei einem mukokutanen PV-Patienten, dessen Plasmazellen Antikörper gegen Dsg produzieren, könnten dann auch einige Dsg-Antikörper an TPO binden. Im Rahmen des APD aus der Phagenbibliothek PV3a könnten bei der Selektion gegen TPO Phagen kloniert worden sein, deren Plasmide die DNA für Anti-Dsg-scFv mit einer Kreuzreaktivität gegen TPO besitzen, anstelle von Anti-TPO-scFv mit einer Kreuzreaktivität gegen Dsg. Dies könnte die schwache Reaktion mit TPO der Nicht-Dsg-scFv erklären.

4.2.7 Selektion der variablen Einzelkettenfragmente als Ursache für unterschiedliche Desmogleinbindung von Desmoglein- und Nicht-Desmoglein-variablen Einzelkettenfragmenten

Die ELISA und IIF Ergebnisse der Nicht-Dsg-scFv fielen im Vergleich zu den Positivkontrollen schwächer aus. Dies kann mit der Selektion der scFv im Rahmen des APD zusammenhängen. Das Ziel dieser Arbeit ist es scFv zu charakterisieren, die sowohl an TPO als auch an Dsg binden. Hierzu wurde während des APD gegen TPO selektiert. Bei der Detektion und Herstellung der Positivkontroll-scFv hingegen sollten scFv, die an Dsg binden, gefunden werden (54, 55). Die Nicht-Dsg-scFv scheinen Antikörper mit einer Bindung an verschiedene Antigene zu sein, während die Positivkontrollen primär mit Dsg reagieren. Wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben ist die Dsg-Bindung der gegen TPO selektierten scFv stärker als die TPO-Bindung. Es wurde die Möglichkeit benannt, dass es sich bei den TPO-scFv eigentlich um Dsg-scFv mit einer Kreuzreaktivität handeln könnte. Interessanterweise sind diese Dsg-scFv jedoch nicht durch ein *Panning* an Dsg1 oder Dsg3 selektiert worden. Erst das *Panning* mit TPO führte zur Entdeckung der scFv TPO 3.1, TPO 3.3 und TPO 3.6. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass zuvor aus der Phagenbibliothek PV3a klonierte scFv nicht zusätzlich auf eine mögliche TPO-Bindung getestet worden sind. Möglicherweise handelt es sich bei den scFv TPO 3.1, TPO 3.3 und TPO 3.6 um bereits durch *Panning* an Dsg selektierte und als Anti-Dsg-scFv beschriebene scFv mit einer schwächeren Affinität zu Dsg als die Positivkontroll-scFv. Diese Frage könnte durch Untersuchung von aus der Phagenbibliothek PV3a selektierten Anti-Dsg-scFv auf eine mögliche TPO-Bindung beantwortet werden.

4.3 Indirekte Immunfluoreszenz zeigt keine Thyreoperoxidase in humaner Haut trotz Nachweis von Thyreoperoxidase-messenger Ribonukleinsäure

In Studien konnte bereits eine Zunahme von TPO-Antikörpern bei PV-Patienten gezeigt werden. (41, 43, 44). Der Zusammenhang von Anti-TPO- und Anti-Dsg-Antikörpern sollte in dieser Arbeit näher betrachtet werden. Hierzu sollte das Vorhandensein des Enzyms TPO in humaner Haut untersucht werden. Zur Bildung von TPO in der Haut ist mRNA notwendig, die für dieses Enzym kodiert (76). Im Prozess der Proteinbiosynthese ist die durch die RNA-Polymerase transkribierte mRNA das erste Zwischenprodukt. Aus diesem Grund sollte TPO-mRNA nachgewiesen werden, um die Möglichkeit des Vorkommens von TPO in der Haut zu überprüfen. Hierzu wurde mRNA in cDNA umgeschrieben und anschließend eine RT-PCR mit für das TPO-Gen spezifischen Primern durchgeführt (Kapitel 2.1). Im Rahmen der im Anschluss an die RT-PCR durchgeführten Gelelektrophorese, konnte TPO-DNA sichtbar gemacht werden (**Abb. 3.1**). Vergleichbare Ergebnisse wurden bereits an anderer Stelle publiziert (46). Diese Erkenntnisse konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. In der Haut ist TPO-mRNA nachzuweisen. Diese Erkenntnis führte im

Rahmen dieser Arbeit zu der These, dass TPO-Antikörper nicht nur bei PV-Patienten vermehrt nachzuweisen sind, sondern möglicherweise auch eine Rolle in der Pathogenese der Erkrankung übernehmen.

Nachdem mit Hilfe der RT-PCR der Nachweis von TPO-mRNA gezeigt werden konnte, wurde der Versuch unternommen auch das Enzym in der Haut nachzuweisen. Da die IIF auf humaner Haut für diese Arbeit bereits etabliert worden war, wurde versucht humane Haut mit einem kommerziellen Anti-TPO-Antikörper anzufärben. Wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben war jedoch kein Unterschied zwischen der Färbung mit MoAb 47 und der NK zu erkennen (**Abb. 3.13**). Dieses Ergebnis kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen ist in humaner Haut möglicherweise keine TPO, sondern lediglich die mRNA vorhanden. Ein Unterschied zwischen mRNA und Proteinexpression wird wiederholt beobachtet (77). Diese Beobachtung kann z.B. durch posttranskriptionelle Modifikation (78) oder die Degradierung von Proteinen (79) erklärt werden. Im Falle der posttranskriptionellen Modifikation wird die mRNA nach der Transkription verändert. Dabei können durch alternatives Spleißen aus derselben mRNA unterschiedliche Proteine entstehen (80) Proteindegradierung beschreibt den z.B. durch Ubiquitin und Proteasomen vermittelten Abbau von Proteinen.

Eine weitere Möglichkeit, weshalb kein Proteinnachweis gelungen ist, könnte in der verwendeten Methode liegen. Die IIF wurde hier genutzt, da sie im Rahmen dieser Arbeit schon zur Charakterisierung der scFv etabliert wurde. Mit dieser Methode ist teilweise auch der Nachweis von Proteinen, die in der Haut bekannt sind, wie z.B. Dsg1 und Dsg3 schwierig. Es müssen z.B. hohe Antikörperkonzentrationen verwendet werden (Kapitel 3.4, **Abb. 3.9**). Für ein Protein, das bisher noch nicht in der Haut nachgewiesen wurde, sollten zunächst sensitivere Methoden verwendet werden. Z.B. wäre ein Western Blot mit anschließender Immunmarkierung von TPO geeignet, um das Vorkommen von TPO in der Haut genau zu untersuchen.

4.4 Erkenntnisse bieten viele Möglichkeiten für weitere Projekte

Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse ermöglichen neue Denkansätze und Methoden für weitere Arbeiten und Experimente. Die verwendeten TPO-scFv scheinen trotz ihrer Selektion gegen TPO insbesondere an Dsg zu binden. Einige mögliche Ursachen für diese Erkenntnisse wurden bereits in Kapitel 4.2.6 und 4.2.7 diskutiert. In zukünftigen Arbeiten könnten diese Vermutungen überprüft werden. Interessanter wäre es TPO-scFv aus Phagenbibliotheken Anti-TPO positiver PV-Patienten zu selektieren und anschließend mit den bereits etablierten Methoden zu charakterisieren. Es könnten auch weitere Nicht-Dsg-Antikörper untersucht werden, die nicht gegen TPO, sondern an andere Antigene binden. Besonders vielversprechend sind hierbei Antikörper gegen E-Cadherin, welches bereits als mögliches Nicht-Dsg-Antigen im Zusammenhang mit Pemphigus beschrieben worden ist (81, 82, 83). Des Weiteren können auch die etablierten Methoden in anderen Arbeiten verwendet werden. Sei es zur Charakterisierung von scFv oder für andere Verfahren. Die humane

Vollhautorgankultur bietet dabei ein besonders anschauliches Verfahren. Aufgrund der Erfolge, die in unserer Arbeitsgruppe mit dieser Methode bereits erzielt werden konnten, veröffentlichten wir ein standardisiertes Verfahren zur Durchführung dieses Modells (84). Außerdem gelang die weitere Untersuchung von neuen potentiellen Therapiemöglichkeiten zur Behandlung von PV (85).

5. Zusammenfassung

Pemphigus vulgaris (PV) ist eine Autoimmundermatose, bei der es zur Ausbildung intraepidermaler Blasen kommt. Verursacht wird diese Erkrankung durch Antikörper gegen Desmoglein (Dsg) 3 oder Dsg 3 und 1. Einige Studien zeigen außerdem eine mögliche Beteiligung weiterer Nicht-Dsg-Antikörper in der Pathogenese der Erkrankung, weshalb diese Antikörper weiter auf ihren Zusammenhang mit PV hin untersucht werden sollten. Aus der Gruppe der Nicht-Dsg-Antikörper wurde sich in diesem Fall für die nähere Betrachtung von Thyreoperoxidase- (TPO)-Antikörpern entschieden, da der Nachweis von TPO-messenger Ribonukleinsäure in humanen Hautproben sowohl in dieser, wie auch in zuvor publizierten Arbeiten gelang. Bei den getesteten Antikörpern handelt es sich um an TPO bindende *Single chained variable fragments* (scFv), die zuvor mittels Antikörper Phagen *Displays* aus einer von einem PV-Patienten stammenden Phagenbibliothek selektiert wurden. Anschließend wurden die scFv mit verschiedenen Methoden charakterisiert. Diese Methoden mussten zunächst mit Hilfe von Dsg-scFv etabliert werden. Insbesondere die humane Vollhautorgankultur ist hierbei ein Verfahren, mit dem anschaulich die durch scFv vermittelte Akantholyse verdeutlicht werden kann. Zusätzlich wurden Protokolle für einen Enzymgebundenen Immunadsorptionsnachweis (ELISA), eine indirekte Immunfluoreszenz (IIF) sowie ein Nachweißverfahren zur Keratinozytendissoziation erstellt.

Die Untersuchung der TPO-scFv durch IIF ergab eine Färbung von Affenösophagus, die wahrscheinlich auf die im ELISA gezeigte Bindung an Dsg 1 und 3 zurückzuführen ist. Die gemessenen Signale im TPO-ELISA aller TPO-scFv waren im Vergleich zu Dsg deutlich schwächer. Das scFv TPO 3.3 lagerte sich außerdem an Schilddrüsengewebe an und ist deshalb am interessantesten. Im Nachweißverfahren zur Keratinozytendissoziation gelang nach Zugabe von TPO-scFv die Fragmentierung von Keratinozyten, was auf einen pathogenen Effekt der scFv hindeutet. Diese Ergebnisse konnten durch die humane Hautorgankultur nicht bestätigt werden. Zusammenfassend scheinen die TPO-scFv, trotz ihrer Selektion gegen TPO, insbesondere mit Dsg zu interagieren. Diese Bindungseigenschaften mit Dsg erklären am ehesten die Ergebnisse in der IIF sowie im Nachweißverfahren zur Keratinozytendissoziation. Es scheint auch eine gewisse Affinität mit TPO zu bestehen. Durch die Verwendung einer Phagenbibliothek eines Patienten mit TPO-Antikörpern im Serum, könnten zukünftig effektivere TPO-scFv selektiert werden. Die für eine solche Arbeit nötigen Versuchstechniken wurden in dieser Arbeit bereits etabliert und können auch für die Untersuchung weiterer Antikörper verwendet werden. Hierbei sind insbesondere E-Cadherin-Antikörper interessant. Die Leistung dieser Arbeit besteht einerseits in der Charakterisierung von Nicht-Dsg-Antikörper. Vielmehr ermöglichen jedoch die erstellten Versuchsprotokolle viele Möglichkeiten für weitere Arbeiten. So konnte unsere Arbeitsgruppe durch Verwendung der humanen Vollhautorgankultur bereits einige Erfolge vorweisen.

6. Literaturverzeichnis

1. Reißig D, Salvetter J (2017) Haut (Integument commune). In: Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D, Salveter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wennemuth G, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch HG: *Duale Reihe Anatomie*, 4. Aufl., 1265-1272, Thieme, Stuttgart
2. Hertl M (2018) Dermatologische Unterlagen – Struktur und Aufbau der Haut. In: Plewig G, Ruzicka T, Kaufmann R, Hertl M (Hrsg.): *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*, 7. Aufl, S. 3-5, Springer, Heidelberg
3. Hegyi I, Zelger B (2012) Haut – Aufbau der Haut. In: Böcker W, Denk H, Heit PU, Höfler G, Kreipe H, Moch H (Hrsg.): *Pathologie*, 5. Aufl., S. 827-829, Urban & Fischer Elsevier, München
4. Welsch U (2018) Haut. In: Welsch U (Hrsg.), Kummer W (Hrsg.), Deller T: *Histologie Das Lehrbuch*, 5. Aufl., S. 564-582, Urban & Fischer Elsevier, München
5. van Beek N, Zillikens D, Schmidt E (2018) Diagnosis of Autoimmune Bullous Diseases. *JDDG – Journal of the German Society of Dermatology*, 16(9): 1077–1092
6. Silverthorn DU (2016) The Immune System - The Immune Response. In: Silverthorn DU: *Human Physiology: An Integrated Approach*, 7. Aufl., S. 780/781, Pearson, Hallbergmoos
7. Walzog B, Fandrey J (2018) Blut: Ein flüssiges Organsystem - Abwehrmechanismen des Körpers. In: Pape HC (Hrsg.), Kurtz A (Hrsg.), Sibernagl S (Hrsg.): *Physiologie*, 8. Aufl., S. 278-291, Thieme, Stuttgart
8. Gulbins E, Lang KS (2019) Immunsystem. In: Brandes R, Lang F, Schmidt RF (Hrsg.): *Physiologie des Menschen*, 32. Aufl., S. 312, Springer, Heidelberg
9. Ansorge S, Träger M (2014) Immunologie - Antikörper. In: Heinrich PC (Hrsg.), Müller M (Hrsg.), Grave L (Hrsg.): *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Aufl., S. 914-922, Springer, Heidelberg
10. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto Jr. GJ, Stryer Lubert (2018) Das Immunsystem. In: Berg JM, Tymoczko JL, Gatto Jr. GJ, Stryer Lubert: *Stryer Biochemie*, 8. Aufl., S. 1165-1199 Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
11. Hammers CM (2011) Im aktiven Mausmodell der Epidermolysis bullosa acquisita sind lymphonodale IFN- γ -Genexpression und der MHC-Haplotyp H2s assoziiert mit der Ausbildung pathogener, komplementfixierender Autoantikörper. Dissertation der Universität zu Lübeck
12. Hammers CM, Stanley JR (2014) Antibody Phage Display: Technique and Applications Christoph. *Journal of Invesigative Dermatology*, 134(2): 1–13
13. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, Amon A, Martin KC (2018) Immunology - Immunoglobulins: Structure and Function. In: Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, Amon A, Martin KC: *Molecular Cell Biology*, 8. Aufl., S. 1095-

- 1103, WH Freemann and Company, New York
14. Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP (2013) Immunmechanismen - Die Bildung von Antikörpern. In: Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP: *Brock Mikrobiologie*, 13. Aufl., S. 1252-1254, Pearson, Hallbergmoos
 15. Ehrlich P, Morgenroth J (1901) Ueber Hämolysine, Fünfte Mittheilung. *Berliner Klinische Wochenschrift*, 38: 251-257
 16. Shapira Y, Agmon-Levin N, Shoenfeld Y (2010) Defining and Analyzing Geoepidemiology and Human Autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 34(3): 168–177
 17. Kumar V, Abbas A, Aster JC (2017) Disease of the immune System - Autoimmune Diseases. In: Kumar V (Hrsg.), Abbas A (Hrsg.), Aster JC (Hrsg.), Perkins JA: *Robbins Basic Pathology*, 10. Aufl., S. 145-162, Elsevier, Amsterdam
 18. Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC (2005) Central Tolerance: Learning Self-Control in the Thymus. *Nature Reviews Immunology*, 5(10): 772–782
 19. Murphy KM, Weaver C (2018) Autoimmunität und Transplantation. In: Murphy KM, Weaver C: *Janeway Immunologie*, 9. Aufl., S. 836-900, Springer Spektrum, Berlin
 20. Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, Vinuesa CG (2005) Cellular and Genetic Mechanisms of Self Tolerance and Autoimmunity. *Nature*, 435(7042): 590–597
 21. Bratanic N, Kisand K, Avbelj Stefanija M, Battelino T, Trebusak Podkrajsek K (2015) Clinical, Genetic and Immunological Characteristics of Paediatric Autoimmune Polyglandular Syndrome Type 1 Patients in Slovenia. *Zdravstveno Varstvo*, 54(2): 112–118
 22. Zillikens D, Schmidt E, Reimer S, Chimanovitch I, Hardt-Weinelt K, Rose C, Bröcker EB, Kock M, Boehncke WH (2001) Antibodies to Desmogleins 1 and 3, but not to BP180, Induce Blisters in Human Skin Grafted onto SCID Mice. *Journal of Pathology*, 193(1): 117–24
 23. Hammers CM, Stanley JR (2016) Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 11(1): 175–197
 24. Sadik C, Zillikens D, Hertl M (2018) Bullöse Autoimmundermatosen. In: Plewig G, Ruzicka T, Kaufmann R, Hertl M (Hrsg.): *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*, 7. Aufl., S. 840ff, Springer, Heidelberg
 25. Evangelista F, Culton DA, Diaz LA (2015) Desmosomal Proteins as Autoantigens in Pemphigus. In: Murrell DF: *Blistering Diseases: Clinical Features, Pathogenesis, Treatment*, 1. Aufl., S. 55-56, Springer, Heidelberg
 26. Evangelista F, Dasher DA, Diaz LA, Prisayanh PS, Li N (2008) E-Cadherin Is an Additional Immunological Target for Pemphigus Autoantibodies. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(7): 1710–1718

27. Oliveira MEF, Culton DA, Prisayanh P, Qaqish BF, Diaz LA (2013) E-Cadherin Autoantibody Profile in Patients with Pemphigus Vulgaris. *British Journal of Dermatology*, 169(4): 812–818
28. Waschke J, Spindler V (2014) Desmosomes and Extradесmosomal Adhesive Signaling Contacts in Pemphigus. *Medicinal Research Reviews*, 34(6): 1127–1145
29. Galichet A, Borradori L, Müller EJ (2014) A New Light on an Old Disease: Adhesion Signaling in Pemphigus Vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(1): 8–10
30. Mao X, Li H, Sano Y, Gaestel M, Park JM, Payne AS (2014) MAPKAP Kinase 2 (MK2)-Dependent and -Independent Models of Blister Formation in Pemphigus Vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(1): 68–76
31. Ahmed AR, Yunis EJ, Khatri K, Wagner R, Notani G, Awdeh Z, Alper CA (1990) Major Histocompatibility Complex Haplotype Studies in Ashkenazi Jewish Patients with Pemphigus Vulgaris. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(19), 7658–7662
32. Yan L, Wang JM, Zeng K (2012) Association between HLA-DQB1 Polymorphisms and Pemphigus Vulgaris: A Meta-Analysis. *British Journal of Dermatology*, 167(4): 768–777
33. Recke A, Konitzer S, Lemcke S, Freitag M, Sommer NM, Abdelhady M, Amoli MM, Benoit S, El-Chennawy F, Eldarouti M, Eming R, Gläser R, Günther C, Hadaschik E, Homey B, Lieb W, Peitsch WK, Pföhler C, Robati RM, Saeedi M, Sardy M, Sticherling M, Uzun S, Worm M, Zilikens D, Ibrahim S, Vidarsson G, Schmidt E, the German AIBD Genetic Study Group (2018) The p.Arg435His Variation of IgG3 with High Affinity to FcRn Is Associated with Susceptibility for Pemphigus Vulgaris-Analysis of Four Different Ethnic Cohorts. *Frontiers in Immunology*, 9: 1-8
34. Sayar BS, Rüegg S, Schmidt E, Sibilía M, Siffert M, Suter MM, Galichet A, Müller EJ (2014) EGFR Inhibitors Erlotinib and Lapatinib Ameliorate Epidermal Blistering in Pemphigus Vulgaris in a Non-Linear, V-Shaped Relationship. *Experimental*, 23: 33–38
35. Deutzmann R (2016) Hormonelle Regulation - Schilddrüsenhormone (Thyroxin und Triiodthyronin). In: Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Frings S, Grissmer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger J, Müller F, Pedain C, Rettig J, Wagner C, Wischmeyer: *Duale Reihe Physiologie*, 3. Aufl., 365-374, Thieme, Stuttgart
36. Lang F, Föller M(2019) Schilddrüsenhormone. In: Brandes R, Lang F, Schmidt RF (Hrsg.): *Physiologie des Menschen*, 32. Aufl., S. 932-936, Springer, Heidelberg
37. Bätge B, Dodt C, Müller-Wieland D, Renz-Polster H (2017) Endokrines System - Thyreoditis. In: Braun J (Hrsg.), Müller-Wieland D (Hrsg.), Renz-Polster H, Krautzig S: *Basislehrbuch Innere Medizin*, 6. Aufl., S. 693/694, Urban & Fischer Elsevier, München
38. Voll RE, Lamprecht P, Warnatz K, Schulze-Koops H, Peter HH, Pichler WJ (2018) Immunsystem - Autoimmunreaktion und Autoimmunkrankheit. In: Siegenthaler W (Hrsg.), Blum HU (Hrsg.),

- Müller-Wieland D (Hrsg.): *Klinische Pathophysiologie*, 10. Aufl., S. 635-636, Thieme, Stuttgart
39. Reinke M, Beuschlein F, Gain T, Bottermann P (2009) Schilddrüsenerkrankungen - Schilddrüsenentzündungen. In: Classen M, Diehl V, Kochsiek K, Böhm M (Hrsg.), Hallek M (Hrsg.), Schmiegell W (Hrsg.): *Innere Medizin*, 6. Aufl., S.1114/1115, Urban & Fischer Elsevier, München
 40. Mitchell AL, Simon HS Simon (2013) Autoimmune thyroid diseases. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder H, Frew AJ, Weyand CM: *Clinical Immunology: Principles and Practice*, 4. Aufl., Elsevier, Amsterdam
 41. Pitoia F, Moncet D, Glorio R, Diaz AG, Costa GR, Carbia S, Cabrera H, Niepomniszcze H (2005) Prevalence Of Thyroid Autoimmunity In Patients With Pemphigus Vulgaris. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 65: 307–310
 42. Ansar A, Farshchian M, Farahnaki S, Farshchian M (2009) Thyroid Autoimmunity in Iranian Patients with Pemphigus Vulgaris Editor. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 23(6): 719–720
 43. Kavala M, Kural E, Kocaturk E, Zindanci I, Turkoglu Z, Can B (2012) The Evaluation of Thyroid Diseases in Patients with Pemphigus Vulgaris. *The Scientific World Journal*, 2012: 1–4
 44. Sajda T, Hazelton J, Patel M, Seiffert-Sinha K, Steinman L, Robinson W, Haab BB, Sinha AA (2016) Multiplexed Autoantigen Microarrays Identify HLA as a Key Driver of Anti-Desmoglein and -Non-Desmoglein Reactivities in Pemphigus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(7): 1859–1864
 45. Seiffert-Sinha K, Khan S, Attwood K, Gerlach JA, Sinha AA (2018) Anti-Thyroid Peroxidase Reactivity Is Heightened in Pemphigus Vulgaris and Is Driven by Human Leukocyte Antigen Status and the Absence of Desmoglein Reactivity. *Frontiers in Immunology*, 9: 1–12
 46. Cianfarani F, Baldini E, Cavalli A, Marchioni E, Lembo L, Teson M, Persechino S, Zambruno G, Ulisse S, Odorisio T, D'Armiento M (2010) TSH Receptor and Thyroid-Specific Gene Expression in Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(1): 93–101
 47. Chanprapaph K, Iamsung W, Wattanakrai P, Vachiramon V (2018) Thyroid Autoimmunity and Autoimmunity in Chronic Spontaneous Urticaria Linked to Disease Severity, Therapeutic Response, and Time to Remission in Patients with Chronic Spontaneous Urticaria. *BioMed Research International*, 2018: 1-13
 48. Sánchez J, Sánchez A, Cardona R (2019) Causal Relationship Between Anti-TPO IgE and Chronic Urticaria by In Vitro and In Vivo Tests. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 11(1): 29–42
 49. Rami A, Behdani M, Yardehnavi N, Habibi-Anbouhi M, Kazemi-Lomedasht F (2017) An Overview on Application of Phage Display Technique in Immunological Studies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(7): 599–602

50. Hammers CM, Chen J, Lin Chenyan, Kacir S, Siegel DL, Payne AS, Stanley JR (2015) Persistence of Anti-Desmoglein 3 IgG + B-Cell Clones in Pemphigus Patients over Years. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(3): 742-749
51. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto Jr. GJ, Stryer Lubert (2018) Erforschung der Gene und Genome - Die Gentechnik hat Biologie auf allen Ebenen revolutioniert. In: Berg JM, Tymoczko JL, Gatto Jr. GJ, Stryer Lubert: *Stryer Biochemie*, 8. Aufl., S. 173-184, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
52. Thermo Fisher Scientific Inc. (2013) Product Information: RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit. S. 1-2, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012715_RevertAid_FirstStrand_cDNA_Syn_K1621_UG.pdf (Letzter Aufruf am 11.12.2019)
53. Life Technologies Corporation (2013) SYBR[®] Select Master Mix MANUAL. S. 4-38, Life Technologies Corporation, Carlsbad. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4472919_4473367_SYBR_Select_MasterMix_UG.pdf (Letzter Aufruf am 11.12.2019)
54. Cho MJ, Lo ASY, Mao X, Nagler AR, Ellebrecht CT, Mukherjee EM, Hammers CM, Choi, EU, Sharma PM, Uduman M, Li H, Rux AH, Farber SA, Rubin CB, Kleinstein SH, Sachais BS, Posner MR, Cavacini LA, Payne AS (2014) Shared VH1-46 Gene Usage by Pemphigus Vulgaris Autoantibodies Indicates Common Humoral Immune Responses among Patients. *Nature Communications*, 5(4167): 1–11
55. Yamagami J, Payne AS, Kacir S, Ishii K, Siegel DL, Stanley JR (2010) Homologous Regions of Autoantibody Heavy Chain Complementarity-Determining Region 3 (H-CDR3) in Patients with Pemphigus Cause Pathogenicity. *Journal of Clinical Investigation*, 120(11): 4111–4117
56. Bio-Rad Laboratories Inc. (2011) Setup and Basic Operation. In: Bio-Rad Laboratories Inc.: Mini-PROTEAN[®] Precast Gels Instruction Manual and Application Guide, S. 4-7, Bio-Rad, Hercules http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_1658100.pdf (Letzter Aufruf am 06.02.2020)
57. Deutzmann R (2016) Nachweismethoden - Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA). In: Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: *Duale Reihe Biochemie*, 4. Aufl., S. 606-612, Thieme, Stuttgart
58. Pschyrembel W (2013) In: Pschyrembel W: *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, 264. Aufl., S.984, De Gruyter, Berlin
59. Ishii K, Harada R, Matsuo I, Shirakata Y, Hashimoto K, Amagai M (2005) In Vitro Keratinocyte Dissociation Assay for Evaluation of the Pathogenicity of Anti-Desmoglein 3 IgG

- Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(5): 939–946
60. Schmitz S (2009) Zellbiologische Grundlagen - Zelluläre Seneszenz in vitro. In: Schmitz S: *Der Experimentator: Zellkultur*, 2. Aufl., S. 12-14, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
 61. Amagai M, Matsuyoshi N, Wang Z, Andl C, Stanley J (2000) Toxin in Bullous Impetigo and Staphylococcal Scalded-Skin Syndrome Targets desmoglein 1. *Nature Medicine*, 6(11), 1275–1277
 62. Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR (1999) Explanations for the Clinical and Microscopic Localization of Lesions in Pemphigus Foliaceus and Vulgaris. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(4): 461–468
 63. Lequin RM (2005) Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 51(12): 2415–2418
 64. Hofrichter Maxi, Dworschak J, Emtenani S, Langenhan J, Weiß F, Komorowski L, Zilikens D, Stöcker W, Probst C, Schmidt E, Goletz S (2018) Immunoabsorption of Desmoglein-3-Specific IgG Abolishes the Blister-Inducing Capacity of Pemphigus Vulgaris IgG in Neonatal Mice. *Frontiers in Immunology*, 9: 1-10
 65. Wu Hong, Wang ZH, Yan A, Lyle S, Fakharzadeh S, Wahl JK, Wheelock MJ, Ishikawa H, Uitto J, Amagai M, Stanley JR (2000) Protection against Pemphigus Foliaceus by Desmoglein 3 in Neonates. *New England Journal of Medicine*, 343(1): 31–35
 66. an der Wier G, Pas HH, Jonkman MF (2010) Experimental Human Cell and Tissue Models of Pemphigus. *Dermatology Research and Practice*, 2010: 1–8
 67. Rauch P, Zellmer A, Dankbar N, Specht C, Sperling D (2005) Assayoptimierung: Störeffekte Bei Immunoassays Erkennen Und Vermeiden. *Laborwelt - Das Biotechnologie Themenheft*, 6: 1-8.
 68. Hycult Biotech (2010) Troubleshooting Immunofluorescence. S. 1–2, Hycult Biotech, Uden. https://www.hycultbiotech.com/media/wysiwyg/Troubleshooting_Immunofluorescence_1.pdf (Letzter Aufruf am 11.12.2019)
 69. Cell Signaling Technology (2007) A Guide to Successful Immunofluorescence. S. 1-15, Cell Signaling Technology, Danvers. <http://media.cellsignal.com/www/pdfs/resources/product-literature/application-if-brochure.pdf> (Letzter Aufruf am 11.12.2019)
 70. Shetty VM, Subramaniam K, Rao R (2017) Utility of immunofluorescence in dermatology. *Indian Dermatol Online Journal*, 8(1): 1–8
 71. Schmidt E, Zilikens D (2011) The Diagnosis and Treatment of Autoimmune Blistering Skin Diseases. *Deutsches Ärzteblatt International*, 108(23): 399–405
 72. Faller H (2010) - Statistische Hypothesenprüfung. In: Faller H und Lang H: *Medizinische Psychologie und Soziologie*, 3. Aufl., S. 55, Springer, Heidelberg

73. Bujang MA, Adnan TH (2016) Requirements for Minimum Sample Size for Sensitivity and Specificity Analysis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(10): 1–6
74. Amagai M, Karpati S, Prussick R, Klaus-Kovtun V, Stanley JR (1992) Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *The Journal of Clinical Investigation*, 90(3): 919-926
75. Tsunoda K, Ota T, Aoki M, Yamada T, Nagai T, Nakagawa T, Koyasu S, Nishikawa T, Amagai M (2003) Induction of Pemphigus Phenotype by a Mouse Monoclonal Antibody Against the Amino-Terminal Adhesive Interface of Desmoglein 3. *The Journal of Immunology*, 170(4): 2170-2178
76. Meister G (2019) RNA als Überträger und Regulator - RNA-Klassen. In: Dröge P, Meister G, Schiebel E, Vingron M, Walter J, Nordheim A (Hrsg.), Knippers R (Hrsg.): *Molekulare Genetik*, 11. Aufl., S. 52-54, Thieme, Stuttgart
77. Kendrick N (2004) A Gene's mRNA level does not usually predict its protein level. S. 1-8, Kendrick Laboratories Inc., Madison.
http://www.kendricklabs.com/WP1_mRNAsVsProtein_KendrickLabs.pdf (Letzter Aufruf am 11.12.2019)
78. Greenbaum Dov, Colangelo C, Williams K, Gerstein M (2003) Comparing Protein Abundance and mRNA Expression Levels on a Genomic Scale. *Genome Biology*, 4(9): 117.1-117.7
79. Glickman MH, Ciechanover A (2002) The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiological Reviews*, 82(2): 373–428
80. Voet D, Voet JG, Pratt CW (2019) Transkription und RNA-Prozessierung - Posttranskriptionelle Prozessierung. In: Voet D, Voet JG, Pratt CW: *Lehrbuch der Biochemie*, 3. Aufl., S. 1167-1191, Wiley-VCH, Weinheim
81. Evangelista F, Dasher DA, Diaz LA, Prisayanh PS, Li N (2008) E-Cadherin is an additional immunological target for pemphigus autoantibodies. *Journal of Investigative Dermatology*, 128: 1710-1718
82. Oliveira MEF, Culton DA, Prisayanh P, Qaqish BF, Diaz LA (2013) E-cadherin autoantibody profile in patients with pemphigus vulgaris. *British Journal of Dermatology*, 169: 812-818
83. Rötzer V, Hartlieb E, Vielmuth F, Gliem M, Spindler V, Waschke J (2015) E-cadherin and Src associate with extradesmosomal Dsg3 and modulate desmosome assembly and adhesion. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(24): 4885-4897
84. Burmester IAK, Emtenani S, Johns JG, Ludwig RJ, Hammers CM, Hundt JE (2019) Translational Use of a Standardized Full Human Skin Organ Culture Model in Autoimmune Blistering Diseases. *Current Protocols in Pharmacology*, 85: 1-9

85. Burmester IAK, Flaswinkel S, Thies CS, Kasprick A, Kamaguchi M, Bumiller-Bini V, Emtenani S, Feldmann N, Kridin K, Schmidt E, van Beek N, Zillikens D, Hammers CM, Hundt JE, Ludwig RJ (2020) Identification of novel therapeutic targets for blocking acantholysis in pemphigus. *British Journal of Pharmacology*, 177(22): 5114-5130

7. Anhang

7.1 Poster

Selection, expression and characterisation of human monoclonal autoantibodies against non-desmoglein antigens by using the pemphigus vulgaris phage library PV3a

MD TP31
Since 10/16

Jan-Gerrit Johns, Institute of Experimental Dermatology (Hammers, Hundt, Schmidt, Kasprick)

Introduction and hypothesis

1. Pemphigus autoantibodies against desmoglein 3 (Dsg 3) and/or Dsg 1 cause intraepidermal blisters (acantholysis).
2. Recently other non-desmoglein antibodies have been found in sera of pemphigus patients.
3. Some of these antibodies are against thyroperoxidase (TPO)
4. We want to find antibodies against TPO and Dsg 3/1

Methods

1. Proteinexpression
2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
3. Indirect immunofluorescence (IIF) on different tissues
4. Dispase assay
5. Human skin organ culture

Results

The following antibodies were tested:

<u>Positive control antibodies:</u> scFv 4.2. (anti-Dsg 3) scFv 3.2. (anti-Dsg 3) scFv px4-3 (anti-Dsg 3 and 1)	<u>Non-desmoglein antibodies:</u> scFv TPO 3.1. scFv TPO 3.3. scFv TPO 3.6.
---	---

Concentration of all antibodies is 1 µg/µl

Dsg antibodies bind to Dsg in Dsg ELISA

Non-Dsg antibodies bind to multiple targets

Dsg antibodies and scFv TPO 3.1. bind to monkey esophagus

Dsg antibodies and scFv TPO 3.1. bind to human skin

Dsg antibodies induce pathogenicity in dispase assay and human skin organ culture

Dispase assay

Human skin organ culture

Conclusions

1. Antibodies with reactivity against Dsg 3, Dsg 1, BP180 and TPO could be detected by using antibody phage display.
2. One of these antibodies (scFv TPO 3.1.) binds to the skin.
3. Pathogenicity of TPO antibodies remains to be tested

Outlook

- Testing for pathogenicity of TPO antibodies (dispase assay)
- Stain thyroid tissue with TPO antibodies
- Repeat ELISA with TPO antibodies

Cooperation partners

Shirin Emtenani (TP27) – method teaching

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Seite
1.1 Darstellung häufiger Autoantigene in der Epidermis und der dermoepidermalen Junktionszone.	2
1.2 Darstellung eines IgG-Antikörpers.	3
1.3 Darstellung von F _{ab} -Fragement und <i>Single chain variable fragment</i> .	4
1.4 Darstellung einer somatischen Rekombination des Gens einer schweren Kette.	5
1.5 Verteilung von Desmoglein 1 und Desmoglein 3 in Haut und Schleimhaut.	7
1.6 Synthese von Schilddrüsenhormonen.	9
1.7 Übersicht über die zu etablierenden Methoden.	12
2.1 Ablauf einer Polymerase-Kettenreaktion.	13
2.2 Darstellung einer Proteinexpression.	20
2.3 Ablauf eines indirekten Enzymgebundener Immunadsorptionsnachweises.	23
2.4 Ablauf des Nachweisverfahrens zur Keratinozytendissoziation.	27
2.5 Ablauf der humanen Vollhautorgankultur.	30
3.1 Agarosegel nach Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion.	36
3.2 Darstellung eines Natriumdodecylsulfat-Gels mit Konzentrationen von Positivkontrollen.	37
3.3 Darstellung eines Natriumdodecylsulfat-Gels mit Konzentrationen von Nicht-Desmoglein-variablen Einzelkettenfragmenten.	38
3.4 Enzymgebundener Immunadsorptionsnachweises mit Positivkontrollen.	40
3.5 Enzymgebundener Immunadsorptionsnachweises mit variablem Einzelkettenfragment TPO 3.1.	41
3.6 Enzymgebundener Immunadsorptionsnachweises mit variable, Einzelkettenfragment TPO 3.3.	42

3.7	Enzymgebundener Immunadsorptionsnachweises mit variablem Einzelkettenfragment TPO 3.6.	43
3.8	Darstellung einer indirekten Immunfluoreszenz auf Affenösophagus mit Positivkontroll-variablen Einzelkettenfragmenten.	44
3.9	Darstellung einer indirekten Immunfluoreszenz auf humaner Haut mit Positivkontroll-variablen Einzelkettenfragmenten.	45
3.10	Darstellung einer indirekten Immunfluoreszenz auf Affenösophagus mit Thyreoperoxidase-variablen Einzelkettenfragmenten.	46
3.11	Darstellung einer indirekten Immunfluoreszenz auf humaner Haut mit Thyreoperoxidase-variablen Einzelkettenfragmenten.	47
3.12	Darstellung einer indirekten Immunfluoreszenz auf Schilddrüsengewebe mit Thyreoperoxidase-variablen Einzelkettenfragmenten.	48
3.13	Darstellung einer indirekten Immunfluoreszenz auf humaner Haut mit kommerziellem Thyreoperoxidase-Antikörper.	49
3.14	Darstellung der Ergebnisse des Nachweisverfahrens zur Keratinozytendissoziation.	51
3.15	Darstellung einer humanen Vollhautorgankultur.	52
4.1	Übersicht über die etablierten Methoden.	57

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle	Seite
1.1 Überblick über spezialisierte Zellen der Haut.	1
2.1 Primerübersicht.	15
2.2 Einstellungen der Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion.	16
2.3 Überblick über verwendete variable Einzelkettenfragmente.	17
2.4 Puffer für Antikörperexpression.	18
2.5 Puffer für Enzymgebundenen Immunadsorptionsnachweis.	23
2.6 Verwendete EUROIMMUN Enzymgebundene Immunadsorptionsnachweis-Kits.	24
2.7 Für die indirekte Immunfluoreszenz verwendete Gewebe.	25
2.8 Puffer für indirekte Immunfluoreszenz.	26
2.9 Geräte.	31
2.10 Verbrauchsmaterialien.	33

7.4 Schreiben der Ethik-Kommission



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
PD Dr. med. Tobias Fischer
Klinik für Dermatologie und Venerologie

im Hause

Ethik-Kommission

Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. F. Gieseler
Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 500 4639
Fax: +49 451 500 3026
janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 06-109

Datum: 15. März 2012

In-vitro-Untersuchung der Biologie des humanen Haarfollikels in bezug auf Wachstumseigenschaften, Apoptose, Wachstumsregulation, Pigmentierung und Immunprivileg im Haarorgankulturmodell

Hier: Amendment 2 –Ihr Schreiben vom 13. März 2012

Sehr geehrter Herr Dr. Fischer,

das Amendment bezüglich der Nutzung von Haut aus anderen behaarten Arealen mit den folgenden Unterlagen habe ich zustimmend zur Kenntnis genommen:

- Aufklärung und Einwilligung sowie
- Studienprotokoll.

Es bedarf keiner weiteren Begutachtung durch die Kommission.

Bitte beachten Sie folgenden Hinweis: Die Haarproben können nur vernichtet werden, wenn diese in pseudonymisierter Form vorliegen.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und besten Wünschen
für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich

Ihr

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Raspe'.

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

8. Danksagungen

Ich möchte mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. med. vet. Jennifer Hundt für das von ihr zur Verfügung gestellte Thema sowie für die gute Betreuung, die Anregungen und die Aufnahme in ihre freundliche und unterstützende Arbeitsgruppe bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Dr. Christoph Hammers nicht nur für die Cobetreuung, die Ausarbeitung des Themas und die zur Verfügung gestellten Antikörper und Labormaterialien, sondern auch für das von ihm durchgeführte Antikörper-Phagen-*Display*.

Dem Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie (LIED) unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Hauke Busch sowie der von Prof. Zillikens geleiteten Klinik für der Dermatologie, Allergologie und Venerologie des UKSH Campus Lübeck danke ich für die Nutzung der Laborgeräte und Materialien.

Dem Graduiertenkolleg 1727 möchte ich für die Unterstützung meiner Arbeit, den stetigen Austausch, die Einladungen zu wissenschaftlichen Vorträgen und Kongressen sowie für das großzügige Stipendium danken.

Den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe Nadine Merg, Ayleen Fokuhl, Rebecca Pfündl und insbesondere Shirin Emtenani danke ich für die schöne Zeit und die vielseitige Unterstützung bei der Bearbeitung dieser Arbeit.

Außerdem danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die immer an mich glauben und mir auf meinem Weg zur Seite stehen.