



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Ernährungsmedizin  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Christian Sina

---

**Untersuchungen zur antigenspezifischen,  
anti-inflammatorischen Wirkung des  
murinen IgG1 und der IgG Fc N-Sialylierung**

---

**Inauguraldissertation**

zur

Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

**Gina-Maria Lilienthal  
aus Cottbus**

Lübeck, 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Marc Ehlers

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Hauke Busch

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Lars Redecke

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2019

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 07.05.2019

# INHALT

---

	Zusammenfassung .....	5
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>7</b>
1.1	Immunologische Erkennung und Effektor-Funktionen.....	7
1.1.1	Angeborenes Immunsystem .....	7
1.1.2	Erworbenes Immunsystem .....	8
1.1.3	Komplementsystem .....	10
1.1.4	Antikörper.....	13
1.2	Immunglobulin G .....	17
1.2.1	IgG-Subklassen.....	17
1.2.2	IgG Fc N-Glykosylierung.....	18
1.3	Maladaptive Immunreaktionen und die modulatorische Wirkung der IgG-Subklassen und Fc N-Glykosylierung .....	21
1.4	Zielstellung .....	24
<b>2</b>	<b>Material &amp; Methoden .....</b>	<b>25</b>
2.1	Material.....	25
2.2	Methoden.....	34
2.2.1	Hybridomkultur .....	34
2.2.2	Aufreinigung monoklonaler IgG Antikörper mittels Protein G .....	34
2.2.3	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> - ELISA.....	34
2.2.4	<i>In vitro</i> Hämolysen .....	35
2.2.5	Mausmodell Autoimmunhämolytische Anämie .....	37
2.2.6	Klonierung von murinen anti-MHCI IgG1.....	37
2.2.7	Mausmodell immunisierungsinduzierte EBA .....	41
2.2.8	Aufreinigung von murinen polyklonalen anti-vWFA2 IgG Antikörpern .....	42
2.2.9	<i>In vitro</i> Glykosylierung .....	43
2.2.10	Glykoanalyse .....	44
2.2.11	Mausmodell passive EBA .....	44
2.2.12	Myeloperoxidase Aktivitäts-Nachweis von Ohrbiopsien.....	44
2.2.13	BCA-Test von Ohrbiopsien .....	45
2.2.14	Statistik .....	45
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
3.1	Inhibitorisches Potential von antigenspezifischen murinen IgG1 Antikörpern in der klassischen Komplementaktivierung <i>in vitro</i> .....	46
3.1.1	Murines IgG1 hemmt die Komplexformierung von IgG2a, IgG2b, and IgG3 mit C1q <i>in vitro</i> .....	46
3.1.2	Murines IgG1 hemmt die C1q-medierte, funktionelle Komplementaktivierung durch IgG2a <i>in vitro</i> .....	51
3.3	Inhibitorisches Potential von antigenspezifischen murinen IgG1 Antikörpern in der Komplementaktivierung <i>in vivo</i> .....	55
3.3.1	Translationsstudie zur inhibitorischen Wirkung des murinen IgG1 im Mausmodell der autoimmunhämolytischen Anämie.....	55
3.3.2	Herstellung eines murinen monoklonalen anti-MHCI IgG1 Antikörpers für das Mausmodell der Transfusions-assoziierten akuten Lungeninsuffizienz .....	58

---

3.4	Inhibitorisches Potential von sialylierten antigenspezifischen IgG Antikörpern in EBA .....	61
3.4.1	IgG-Subklassenverteilung und Fc N-Sialylierung nach Toleranzverlust gegenüber Typ VII Kollagen im aktiven EBA Mausmodell.....	61
3.4.2	Untersuchungen mit <i>ex vivo</i> sialylierten, murinen EBA IgG Autoantikörpern in der EBA Effektorphase .....	64
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>68</b>
	Literaturverzeichnis .....	78
	Abkürzungsverzeichnis .....	84
A	Anhang .....	85
	Danksagung .....	92

# ZUSAMMENFASSUNG

---

Die IgG Antikörper-Effektorfunktionen, Aktivierung von Komplement und Fc $\gamma$ -Rezeptoren, werden von der IgG-Subklasse und der Art der Fc N-Glykosylierung reguliert. Humanes IgG4 und murines IgG1 können im Gegensatz zu den anderen Subklassen den klassischen Komplementweg über C1q nicht aktivieren. Stattdessen wird diskutiert, ob humanes IgG4 die Hexamerbildung von humanem IgG1/3 zur Interaktion mit dem sechsköpfigen C1q inhibieren könnte. Des Weiteren besitzen humanes IgG4 und murines IgG1, im Gegensatz zu humanem IgG1/3 und murinem IgG2a/2b, eine verringerte Spezifität und Affinität zu klassischen aktivierenden Fc $\gamma$ -Rezeptoren; murines IgG1 interagiert sogar bevorzugt mit dem inhibitorischen Fc $\gamma$ -Rezeptor IIb. Zusätzlich reguliert die Art der IgG Fc N-Glykosylierung die Affinität zu Fc $\gamma$ -Rezeptoren. Galactosylierte und sialylierte IgG Antikörper weisen eine verringerte Affinität zu diesen auf, jedoch eine erhöhte Interaktion mit Zucker-bindenden C-Typ Lektin-Rezeptoren, was letztendlich zu inhibitorischen Signalen führen kann.

Ziel dieser Arbeit war es, die antigenspezifische, anti-inflammatorische Wirkung des murinen IgG1 und der IgG Fc N-Sialylierung weiter zu untersuchen. Dazu wurde das Potential von murinen monoklonalen anti-TNP IgG1 Antikörpern untersucht die C1q-Bindung, die Komplementaktivierung und -vermittelte Zellyse durch anti-TNP IgG2a, IgG2b und IgG3 Antikörper *in vitro* zu inhibieren. Murines IgG1 inhibierte dosisabhängig, affinitätsabhängig und antigenspezifisch die C1q-Bindung an IgG2a, IgG2b und IgG3 und auch die funktionelle Komplementaktivierung durch IgG2a in einem Hämolyse-Assay mit TNP-gekoppelten Erythrozyten. Die Ergebnisse wurden in einer Peer-Review Fachzeitschrift veröffentlicht (Lilienthal, G-M *et al.* Front. Immunol. 2018 [1]).

Im weiteren Teil der Arbeit sollten Komplement-abhängige Mausmodelle etabliert werden, um die *in vitro* Ergebnisse zu verifizieren. Ein *in vivo*-Hämolysemodell mit murinen monoklonalen anti-Erythrozyten IgG-Subklassen Antikörpern wurde erfolgreich zur Untersuchung der Komplementaktivierung/-inhibierung in Fc  $\gamma$ -Kette-defizienten Mäusen etabliert. Leider zeigte sich, dass durch die Zugabe eines IgG1-Überschusses die applizierte Gesamt-IgG Menge zu hoch wurde, und somit - wahrscheinlich durch IgG-Erythrozyten-Agglutination - keine stabile Messung mehr möglich war.

Für ein Komplement-abhängiges murines Modell zur Transfusions-assoziierten akuten Lungeninsuffizienz wurde eine murine monoklonale anti-MHCI IgG1 Klassen-Switch-Variante des pathogenen IgG2a Klons 34-1-2s kloniert und produziert. Das Potential dieses IgG1 Antikörpers die IgG2a-vermittelte Komplementaktivierung in diesem Modell zu inhibieren wird momentan in einer Kooperation untersucht.

Darüber hinaus wurde ein Komplement- und Fc $\gamma$ -Rezeptor-abhängiges aktives Mausmodell der blasenbildenden Hautautoimmunerkrankung EBA genutzt, um die durch Toleranzverlust

gegenüber Typ VII Kollagen entstehenden IgG-Autoantikörper zu untersuchen. Auch wenn dort keine Unterschiede in der Subklassenverteilung in Bezug zur Krankheitsmanifestierung auffielen, zeigte sich, dass die spezifischen IgG Autoantikörper kranker Mäuse gering sialyliert waren im Vergleich zum Gesamt-IgG gesunder Mäuse.

Hierauf aufbauend, sollte ein passives IgG-Transfer EBA Mausmodell - mit murinen polyklonalen IgG Antikörpern aus dem aktiven EBA Modell - etabliert werden, um das Potential *ex vivo* Glykan-modifizierter autoreaktiver IgG Antikörper in der Effektorphase der EBA zu untersuchen. Ein erster Versuch zum Transfer von *ex vivo*-galactosylierten und sialylierten IgG Autoantikörpern im passiven EBA Modell zeigte im Trend eine geringere Hautentzündung als die nativen IgG Autoantikörper. In Zukunft sollen weitere Versuche folgen, um die Rolle der IgG Autoantikörper-Glykosylierung in EBA genauer zu untersuchen.

Zusammenfassend konnte *in vitro* gezeigt werden, dass murines IgG1 die klassische Komplementaktivierung inhibieren kann. Verschiedene IgG Antikörper-Techniken und Mausmodelle wurden etabliert, um in Zukunft eine antigenspezifische, anti-inflammatorische Rolle des murinen IgG1 und der IgG Fc N-Sialylierung weiter zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Arbeit und weiterer Versuche könnten dazu beitragen auch die Rolle des humanen IgG4 und der humanen IgG Fc N-Sialylierung besser zu verstehen.

# 1 EINLEITUNG

---

Das Immunsystem ist ein komplexes Zusammenspiel zellulärer und humoraler Effektoren, welche den Körper vor Infektionen schützen. So wirkungsvoll wie es viele Pathogene bekämpft, kann ein dysreguliertes Immunsystem körpereigene Strukturen angreifen und chronische Entzündungen induzieren. Im Folgenden soll auf wichtige Komponenten des Immunsystems eingegangen werden, insbesondere auf die unterschiedlichen aktivierenden und inhibierenden Wirkungen von Immunglobulin G-Subklasse Antikörpern und deren Fc-Glykosylierung, die im experimentellen Teil dieser Arbeit untersucht wurden.

## 1.1 Immunologische Erkennung und Effektor-Funktionen

---

### 1.1.1 Angeborenes Immunsystem

Können schädliche Eindringlinge die physikalischen und chemischen Barrieren der Epithelien bzw. antimikrobielle Peptide muköser Oberflächen überwinden, werden sie sofort vom angeborenen Immunsystem erkannt und angegriffen. Die von der myeloiden Linie abstammenden Immunzellen exprimieren verschiedenste *Pattern recognition receptors* (PRRs), um mikrobielle Bestandteile, häufig repetitiv angeordnete Strukturen, zu erkennen. Lektin-Rezeptoren z.B. interagieren mit Kohlenhydratstrukturen und Scavenger-Rezeptoren mit Lipoproteinen. Durch Phagozytose können insbesondere neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen Pathogene schnell eliminieren [2].

Weitere *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) werden von Toll-like Rezeptoren (TLRs), NOD-Proteinen und weiteren Rezeptoren erkannt. Infolgedessen wird in den myeloiden Zellen eine Vielzahl von kostimulatorischen Molekülen sowie Zytokinen und Chemokinen hochreguliert (bspw. NF- $\kappa$ B Weg, TNF- $\alpha$ , CXCL-1/2 und IL-8), welche sekretiert sowohl eine lokale Entzündung bewirken als auch weitreichend andere Effektoren anlocken. Am Infektionsort werden Adhäsionsmoleküle der Selektin- und Integrinfamilie sowie der Immunglobulin-Superfamilie hochreguliert, welche die Migration, Interaktion und das Homing von Leukozyten zum Entzündungsherd im Gewebe ermöglichen [2].

Nach der immunologischen Erkennung und Sofortreaktion ist ein wichtiger Verteidigungsapparat zur Begrenzung und vollständigen Beseitigung einer Infektion das Komplementsystem. Es kann auf drei Wegen, dem klassischen, alternativen und Lektin-Weg schnell aktiviert werden und selbstverstärkend wirken. Lokal agieren die hochreaktiven, Pathogen-oponisierenden (markierenden) Moleküle und lytischen Membranporenkomplexe; weitreichende Wirkung erzielen die von einzelnen Komplementmolekülen abgespaltenen Anaphylatoxine.

## 1.1.2 Erworbenes Immunsystem

Im Vergleich zum angeborenen Immunsystem ermöglicht das erworbene Immunsystem eine noch viel größere Bandbreite fremde Strukturen, die Fremdantigene, zu erkennen. Die von einer lymphoiden Vorläuferzelle stammenden Lymphozyten tragen jeder nur einen Rezeptortypen, jeweils mit einer einzigartigen Spezifität. Durch klonale Deletion werden mit Selbstantigen (Autoantigen) reagierende Zellen eliminiert. Eine unzureichende Effektivität dieses Schrittes, der zentralen Toleranz, soll im Verlauf dieser Arbeit noch weiter aufgezeigt werden. Die verbleibende Population naiver Lymphozyten stellt ein riesiges Repertoire hoch diverser Prototypen von Antigenrezeptoren dar. Erst in Folge einer Infektion und dem spezifischen Antigenkontakt wird ein Klon selektiert zu proliferieren und zum Effektor-Lymphozyten zu reifen. Diese Primärantwort ist zeitlich betrachtet eine späte Abwehr. Durch das immunologische Gedächtnis allerdings wird eine schnelle und verstärkte Sekundärantwort, also ein effektiver Schutz vor Reinfektion, bewirkt [2].

Die meisten Lymphozyten haben ihren Ursprung im Knochenmark. Während B-Lymphozyten (B-Zellen) die antigenunabhängige Entwicklung hier auch abschließen, wandern Vorläufer der T-Lymphozyten (T-Zellen) zumeist in den Thymus aus. Beide weisen in ihrer Entwicklung Parallelen auf: schrittweise Neuordnung der, in V, D und J gegliederten Gene für die variable, antigenbindende Rezeptordomäne (VDJ Rekombination), sequentielle Kontrollschritte und schließlich das Zusammensetzen eines heterodimeren Antigenrezeptors.

Anders als bei B-Zellen differenzieren Thymozyten entweder in die  $\alpha:\beta$  - oder in die  $\gamma:\delta$  (Minderheit) -Linie, welche distinkte Antigenrezeptor-Gene exprimieren. Der aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette zusammengesetzte T-Zell Rezeptor erkennt spezifisch Antigenfragmente (Epitope) von Proteinen, welche über MHC (*Major histocompatibility complex*, auch humanes Leukozytenantigen-System, kurz HLA-System) anderer Körperzellen präsentiert werden. Die  $\alpha:\beta$  T-Zellen werden im Thymus positiv auf Erkennung von Selbst-MHC und negativ auf starke Interaktion mit Autoantigen, d.h. auf Selbst-Toleranz, selektiert und begeben sich dann als reife naive Zellen in die Zirkulation des peripher lymphatischen Gewebes (Milz, Lymphknoten u.a.).

Bei Aufeinandertreffen mit einer Antigen-präsentierenden Zelle (APZ, z.B. Dendritische Zelle), die das passende Antigen über MHC Moleküle präsentiert, liefert diese den Kostimulus zur Proliferation und Differenzierung zu Effektor T-Zellen. Auf MHC Klasse I restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden zu zytotoxischen T-Zellen, die Pathogen-veränderte Körperzellen erkennen und zerstören. Fast jede Körperzelle präsentiert über MHC Klasse I Moleküle auf ihrer Oberfläche Peptide des Zytosols. Ein Virusbefall oder krebsartige Veränderungen spiegeln sich hier ebenfalls wieder [2].

MHC Klasse II wird von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) wie Makrophagen, Dendritische Zellen und B-Zellen exprimiert, welche am Ort einer Infektion Pathogenstrukturen aufnehmen und intrazellulär prozessieren. Die daraus entstehenden Peptidfragmente werden auf

MHC Klasse II geladen und an der Zelloberfläche CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert. Diese sind programmiert bei Aktivierung zu T-Helfer Zellen (T<sub>H</sub>) zu werden und mit der Ausschüttung verschiedener Effektormoleküle (Zytokine) die Zielzelle zu aktivieren. Je nach spezifischer Aktivierung und Differenzierung werden CD4<sup>+</sup> Effektor T-Zellen mindestens unterteilt in T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub> und T<sub>H17</sub> Helferzellen, die spezifische Zytokinmuster exprimieren sowie T-follikuläre Helferzellen (T<sub>FH</sub>), die speziell B-Zellen während der Keimzentrumsreaktion (weiter unten) aktivieren. Eher gegenteilige, immunsuppressive Arbeit leisten regulatorische T-Zellen (T<sub>Reg</sub>); sie unterdrücken T-Zell-Antworten, limitieren somit Immunantworten und beugen Autoimmunität vor [2].

In die Peripherie ausgewanderte naive B-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche den B-Zell-Rezeptor (BZR), der direkt extrazelluläre oder freie Antigene binden kann. Erkannt werden spezifische Teile (Epitope) des antigenen Moleküls, welche fast jede chemische Struktur haben können. Im Fall von Proteinantigenen wird die B-Zell-Aktivierung durch CD4<sup>+</sup> T-Zell-Hilfe unterstützt und führt in der Keimzentrumsreaktion zu Proliferation sowie Ausdifferenzierung zu Gedächtniszellen und Plasmazellen. Plasmazellen produzieren Antikörper, die sezernierte Form des B-Zell-Rezeptors, mit derselben Antigenspezifität. So wird das ursprünglich aktivierende Antigen zum Ziel der aktivierten B-Zell-Klone und deren Antikörper.

Die Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren verschiedene Antikörper-bindende Rezeptoren, sogenannte Fc-Rezeptoren (FcR). Durch die Verlinkung der Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems wirken Antikörper so hauptsächlich auf drei Wegen: Neutralisation, Opsonisierung und Komplementaktivierung. Durch Wegbinden von bakteriellen Toxinen werden diese unschädlich gemacht (neutralisiert). Antikörper-opsonisierte Viren, Bakterien und Zellen werden z.B. von Natürlichen Killerzellen via Fc-Rezeptoren erkannt und zerstört; dieser Mechanismus wird als *Antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) bezeichnet. Wird durch die Antikörper-Opsonisierung auch der klassische Komplementweg aktiviert, und so das Signal „Fremd“ für Phagozyten vielfach verstärkt, spricht man auch von *Complement-dependent cytotoxicity* (CDC) [2].

Das humorale Immunsystem, vor allem mit seinen Zytokinen, Komplementkomponenten und Antikörpern, zeigt deutlich, dass das angeborene Immunsystem nicht vollständig getrennt vom erworbenen Immunsystem betrachtet werden kann. Vielmehr sind beide vor allem über Antikörper und Komplementsystem vielseitig verzahnt und voneinander abhängig. Zusammen bilden sie so eine vielfältig gesteigerte Immunabwehr.

### 1.1.3 Komplementsystem

Das Komplementsystem umfasst sowohl zirkulierende als auch lokal zellulär exprimierte zymogene Proteine (inaktive Enzymvorstufen) [2, 3]. Durch Erkennung von „Fremd“ wird ein initiales Zymogen aktiviert, wodurch eine Kaskade sequentieller Interaktionen und Proteolysen startet. Sie läuft in vier Hauptschritten ab: I) Initiation der Komplementaktivierung, II) C3-Konvertase-Aktivierung und Amplifikation, III) C5-Konvertase-Aktivierung und IV) Terminale *Membrane attack complex* (MAC) -Bildung, die zur Formierung einer Pore in der Zielmembran führt. Es werden drei Hauptaktivierungswege unterschieden: die klassische und alternative Aktivierung sowie der Lektin-Weg. Jeder dieser Wege resultiert in einer C3-Konvertase-Formierung, welche aus dem Molekül C3 das Effektormolekül C3b entstehen lässt (**Abbildung 1.1**).

Jules Bordet entdeckte, dass ein Hitze-instabiler Plasmapbestandteil die Antikörper vermittelte Opsonisierung und Tötung von Bakterien steigern konnte. So kam die Bezeichnung etwas „komplementiere“ die Wirkung von Antikörpern zustande [2]. Bei diesem klassischen Komplementaktivierungsweg bindet die erste Komplementkomponente C1q an Antikörper (IgM und IgG), die an Antigene gebunden haben [2, 4]. C1q ist ein 462 kDa schweres, komplexes Homohexamer. Sechs globuläre Kopfgruppen verfügen über je drei nicht-identische Bindestellen und sind mit der zentralen Domäne über eine Kollagen-Triple-Helix verbunden. Hier assoziieren die Serin-Protease Zymogene C1r und C1s Calcium-abhängig und bilden zusammen den C1-Komplex. Eine erfolgreiche Aktivierung bedingt die multivalente Interaktionen der C1q-Kopfgruppen mit den Antikörpern. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung, die sich auf C1r überträgt und zu dessen Autoaktivierung führt [2].

In Folge dessen aktiviert es C1s, welches C4 spaltet. In dem größeren Spaltprodukt C4b wird eine Thioestergruppe exponiert, die unspezifisch mit Nukleophilen wie Hydroxylgruppen oder Aminogruppen reagiert und so das Fortschreiten der Komplementkaskade direkt auf dem Zielobjekt verankert [5, 6]. Komplement C2 bindet an C4b und wird durch C1s Magnesium-abhängig gespalten. Der entstandene C4b2a-Komplex entspricht der klassischen C3-Konvertase. C3 ist ein C4-Homolog sodass die, im C3b-Spaltprodukt freiwerdende, reaktive Thioestergruppe ebenfalls die Fremdstruktur opsonisiert. Weiterhin bildet sich aus C4b2a3b mit C2a in proteolytischer Funktion die C5-Konvertase. Das Spaltprodukt C5b initiiert die Ausbildung des terminalen Komplementproduktes MAC durch Bindung an C6. Ist die Zielstruktur eine Lipiddoppelschicht, führt der daran assoziierende Komplex aus C5b6789 zur Lyse (**Abbildung 1.1**).

Durch die schnelle Hydrolyse des Thioesters ist die Wirkung von aktiviertem C4b sowie C3b und somit das Fortschreiten der Komplement-Kaskade lokal begrenzt und durch die C1q-Bindung an den Antikörper festgelegt [7].

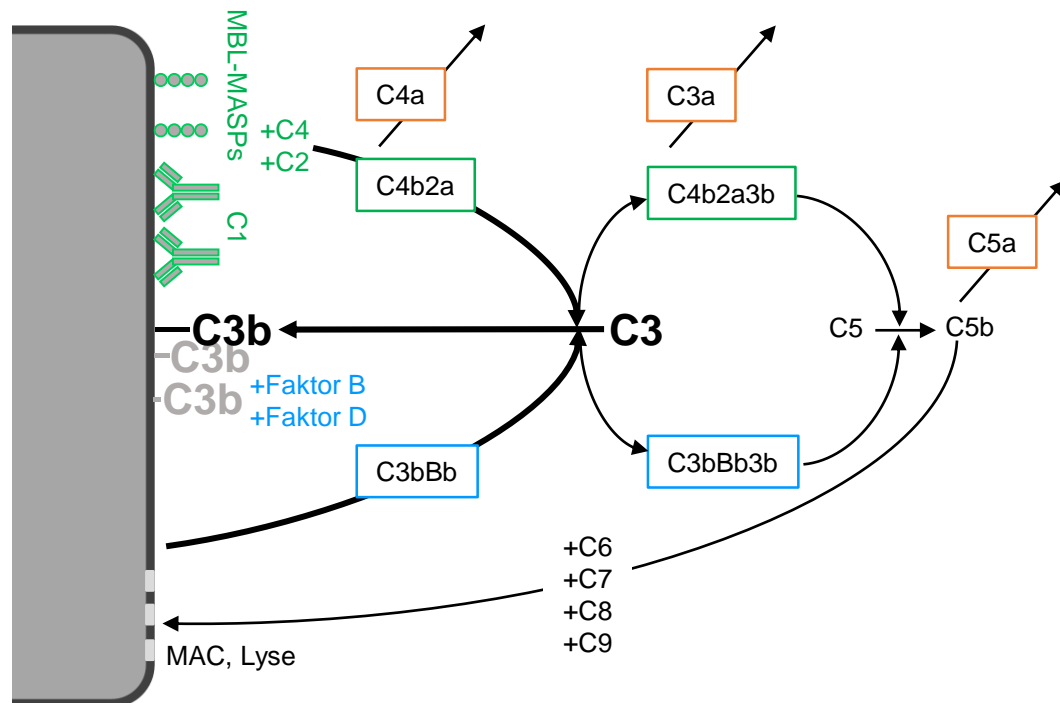
Ähnlich verhält es sich beim weniger häufig stattfindenden Lektin-Weg, der getriggert wird, wenn lösliche PRRs Pathogene erkennen. Dazu gehören das Kohlenhydrat-spezifische, Calcium-abhängige Mannose-bindendes Lektin (MBL) und Ficoline. Das MBL-Molekül gehört mit seiner N-terminalen Kollagen-ähnlichen Struktur und C-terminalen C-Typ Lektin-Domäne zu den Kollektinen. Alle Bindedomänen zusammen ergeben eine hohe Avidität für Mannose, Fucose und N-Acetylglucosamin-Resten. Das für Vertebraten typische terminale Glykan Sialinsäure wird nicht erkannt. Ficolin-Moleküle ähneln mit Stamm und sechs Köpfen der Struktur von MBL und C1q, jedoch weisen sie Fibrinogen-ähnliche Bindedomänen auf, welche auf acetylierte Oligosaccharide spezialisiert sind. MBL und Ficoline sind mit Serin-Proteasen assoziiert (MASPs), welche nach Pathogenbindung die Spaltung von C4 und C2 bewirken. Die weitere Kaskade setzt sich wie der klassische Weg fort (**Abbildung 1.1**).

Der alternative Komplementaktivierungsweg ermöglicht eine Amplifikationsschleife für C3b. Als Substrat dient C3b aus dem klassischen und Lektin-Weg sowie nicht-proteolytisch, sondern spontan hydrolysiertes C3b(H<sub>2</sub>O), welches stetig auf geringem Level aus zirkulierenden C3 entsteht [8]. Das Zymogen Faktor B interagiert mit C3b und wird durch Faktor D Magnesium-abhängig gespalten. Die entstandene alternative C3-Konvertase (C3bBb) ähnelt der klassischen C3-Konvertase sehr, ist jedoch allein zu kurzlebig [9, 10] und benötigt den Stabilisator Properdin (Faktor P) [11–13]. Das nun entstehende C3b kann kovalent an die direkt umgebenden Oberflächen binden und weitere alternative C3-Konvertasen formieren. Weiterhin kann C3b auch an C3bBb binden, wodurch die alternative C5-Konvertase (C3bBb3b) entsteht (**Abbildung 1.1**). Durch diese lokale C3b-Amplifikation werden vermehrt sowohl Phagozyten rekrutiert als auch MAC ausgebildet und damit die Zerstörung des Pathogens beschleunigt.

Die, auf allen drei Aktivierungswegen, von Komplementprodukten markierten Pathogene werden von Komplementrezeptoren exprimierenden Phagozyten erkannt und beseitigt. Der unter den Blutzellen am weitesten verbreitete, C3b/C4b spezifische Komplementrezeptor CR1 fördert die Phagozytose Komplement-opsonisierter Strukturen sowie den Abtransport von Immun-komplexen über Erythrozyten (in der Maus sind es Thrombozyten). Neben CR2 sind auch CR3, CR4 und CR1g spezifisch für C3b sowie dessen inaktivierte oder degradierte Form und stimulieren Phagozytose [2].

Die in der Kaskade anfallenden kleinen Peptide, allen voran C5a sowie mit mittlerer bzw. geringer Aktivität auch C3a bzw. C4a, wirken außerdem als Entzündungsmediatoren, auch Anaphylatoxine genannt. Über ihre entsprechenden C3a- und C5a-Rezeptoren (C3aR und C5aR) auf Endothelzellen von Blutgefäßen stimulieren sie eine Verstärkung des Blutflusses durch Muskelkontraktion, der vaskulären Permeabilität und der Expression von Zelladhäsions-Molekülen. Das erlaubt die Extravasation von Antikörpern und Komplement in umliegendes Gewebe, die Infiltration von Immuneffektorzellen und mikrobizide Aktivität. C5a aktiviert

zudem Mastzellen die Mediatoren Histamin und  $\text{TNF-}\alpha$  auszuschütten. Eine große Menge dieser kleinen Komplementprodukte können einen Kreislaufkollaps, den anaphylaktischen Schock, herbeiführen [2].



**Abbildung 1.1: Komplementaktivierungswege**

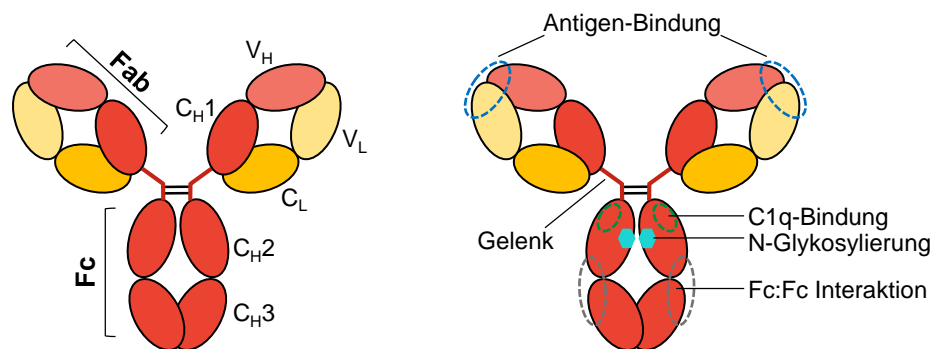
Schematische Darstellung der Initiation der Komplementaktivierung, C3-Konvertase-Aktivierung und C3b-Amplifikation, C5-Konvertase-Aktivierung und terminale Formierung des *Membrane attack complex* (MAC). Grün: klassischer und MBL-Weg: Initiation der Komplementaktivierung durch Bindung von C1q an IgM und IgG Antikörper bzw. Lektin an Mannose. Durch proteolytische Aktivität der zugehörigen Enzyme C1s/C1r bzw. MASPs wird die C3-Konvertase C4b2a generiert, die C3 spaltet. Spaltprodukt C3b bindet kovalent an den Komplementaktivator und hat einen chemotaktischen Effekt auf Phagozyten, oder wird Teil der C5-Konvertase. Durch Spaltung von C5 assemblieren C5b6789 porenförmig an der Zielmembran und führen zur Lyse. Blau: C3b und C3b(H<sub>2</sub>O) (hydrolysiertes C3b aus spontaner Konversion) binden Faktor B. Durch Aktivierung von Faktor D entsteht eine alternative C3-Konvertase (C3bBb) und somit mehr C3b, das opsoniert oder Teil der alternativen C5-Konvertase (C3bBb3b) wird (modifiziert nach Sim und Dodds [7]).

Die bisherigen Abschnitte verdeutlichen, dass das Komplementsystem, einmal getriggert, eine rapide, weitreichende und sehr effektive Abwehr betreibt. Das bedeutet auch, dass der Körper sich vor einem unspezifischen Komplementangriff schützen muss. Etliche positive und negative Regulationsmechanismen haben sich entwickelt, die sowohl in der Flüssig-Phase als auch direkt auf Zelloberflächen in jedes Level der Kaskade eingreifen können. Wirtszellen schützen sich direkt durch Expression extrazellulärer negativ regulatorischer Proteine [2, 7].

### 1.1.4 Antikörper

Die globuläre Form der Antikörper, auch Immunglobuline (Ig), erinnert an einen Stamm mit zwei Armen, gebildet aus zwei identischen schweren (*heavy chain*, HC, je ca. 50 kDa) und zwei identischen leichten Polypeptidketten (*light chain*, LC, je ca. 25kDa). Die N-terminalen variablen Domänen der HC und LC ( $V_H$  und  $V_L$ ) bestehen aus hypervariablen Schleifen, die eine heterogene Protein-bindende Oberfläche bilden, befähigt mit unterschiedlichsten Liganden zu interagieren. In C-terminaler Richtung befindet sich die konstante Region der HC und LC ( $C_H$  und  $C_L$ ). Die drei  $C_H$ -Domänen werden vom N- zum C-Terminus durchnummeriert:  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ , siehe **Abbildung 1.2**.

Üblicherweise wird ein Antikörper der Funktion nach in zwei Fab, die antigenbindenden Fragmente, und einen konstanten Fc- (*Fragment crystallizable*) Teil gegliedert. Hierüber interagieren Antikörper mit den Fc-Rezeptoren auf Immunzellen und Komplement C1q, siehe **Abbildung 1.2** [2].



**Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau eines IgG Antikörpers**

Zwei schwere (H, rot) und zwei leichte (L, gelb) Polypeptidketten assoziieren über Disulfidbrücken zu drei gleichgroßen globulären Domänen. Die variable (V) Region ist die Antigenbindestelle. Die Gelenkregion verleiht den Fab-Armen Flexibilität bei der Antigenbindung. An  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$  der Fc-Domäne binden Komplement C1q und Fc-Rezeptoren. IgG trägt an Asparagin297 ein Glykan (türkis), das in den Freiraum der nicht interagierenden  $C_{H2}$ -Domänen reicht und Einfluss auf die Effektorfunktion hat [14].

Die beiden Fab und der Fc-Teil bilden globuläre Domänen, sodass ein Antikörper in seiner Quartärstruktur aus drei gleich großen globulären Teilen besteht. Diese sind über eine flexible Polypeptidkette, die Gelenk-Region, verknüpft. Die HCs und LCs assoziieren, stabilisiert durch Disulfidbrücken sowie hydrophobe und polare nichtkovalente Interaktionen, wie folgt:  $V_H$  mit  $V_L$  und die  $C_{H1}$  mit  $C_L$  sowie beide  $C_{H3}$  miteinander. Die  $C_{H2}$ -Domänen interagieren nicht direkt, in diese Lücke reichen an Fc-konjugierte Kohlenhydrat-Strukturen [15].

Durch die vertikale Symmetrie können Antikörper simultan an zwei identische Antigene binden. Die Gesamtstärke der Interaktion, Avidität, hängt von der Affinität jedes Fab-Teils und auch von der Flexibilität in der Gelenkregion ab. Diese ist, wie auch die Effektorfunktionen der Antikörper, letztlich von der HC und somit von der Immunglobulinklasse abhängig, die durch den Prozess des Klassenwechsels (siehe weiter unten) entsteht.

Anders als die HC erfüllt die LC keine andere spezifische Funktion als Bauteil der V-Domäne zu sein. Die LC kann entweder als  $\kappa$  oder  $\lambda$  Form ausgeprägt sein, sie durchgehen keinen Klassenwechsel und erscheinen funktionell gleichartig. Das Verhältnis  $\kappa$  zu  $\lambda$  der natürlich vorkommenden LC ist in Menschen 2:1 und in Mäusen 20:1 [2].

### Diversifizierung der variablen Domäne und somit Antigenerkennung

Die riesige Diversität im Repertoire für Antikörperspezifität wird durch mehrere Schritte ermöglicht. Ein Hauptpunkt hier ist die *combinatorial diversity* durch Neuordnung hoch variabler, separater Gensegmente, welche die V-Region kodieren.

Die Immunglobulin-Gensegmente für LC und HC sind in drei Genloci organisiert:  $\kappa$ -LC Locus auf Chromosom 2,  $\lambda$ -LC Locus auf Chromosom 22 und HC Locus auf Chromosom 14. Für die  $V_H$ -Region gibt es drei Gruppen rekombinationsfähiger Gensegmente: V- (Variabel), D- (Diversität) und J- (*Joining*, verbindend) Abschnitte, wohingegen es für  $V_L$  nur V und J sind. Jeder Abschnitt liegt als multiple Kopie mit leicht unterschiedlicher Sequenz vor. Ausschließlich in B-Lymphozyten durchgehen diese Segmente genomischer DNA den Prozess der sogenannten somatischen Rekombination. Konservierte, flankierende Signalsequenzen (*Recombination signal sequence*) und spezifische Abstandshalter (*Spacer*) regulieren die Rekombination. Diese wird katalysiert von einzigartigen Lymphozyten-spezifischen Rekombinasen, den RAG-Proteinen. Nach dem Zufallsprinzip werden für  $V_L$  jeweils eines von vielen V-Segmenten ( $\lambda$  bis zu 33 und  $\kappa$  bis zu 38 funktionelle) mit einem von fünf möglichen J-Segmenten aneinandergeknüpft [2].

Die  $C_L$ -Region ist in einem weiter abwärts liegenden Exon kodiert und wird durch Spleißen der leichten Kette-DNA an die V-Region geknüpft. Für  $V_H$  wird in einer ersten Rekombination eines von 23 D-Segmenten mit einem von sechs J-Segmenten kombiniert; in einer zweiten wird eines von bis zu 46 V-Segmenten mit dem rearrangierten JD verbunden [2].

Die weiter abwärts gelegenen Gensegmente der  $C_H$ -Region bilden ein großes Cluster, in dem jedes  $C_H$ -Gen in mehrere Exons gesplittet ist (**Abbildung 1.3**). In naiven B Zellen wird das  $C_{\mu}$ -Segment mit VDJ verknüpft und schließlich der vollständige BZR präsentiert. Später, nach Aktivierung, wird je nach Stimulus ein definiertes  $C_H$ -Segment mit dem VDJ verknüpft und die dazwischen liegenden Segmente rausgeschnitten [2].

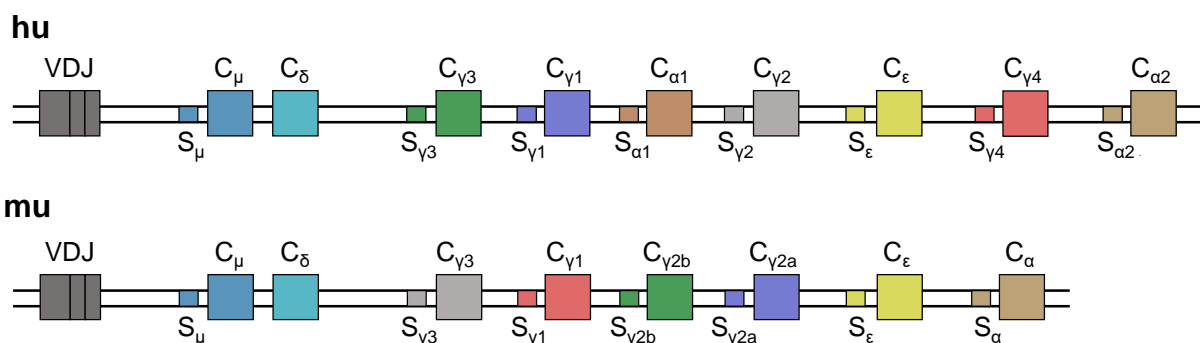
Die höchst variablen Stellen der V-Domäne sind die *Complementarity-determining regions* (CDR1-3); hierüber erfolgt die Kontaktaufnahme mit dem Antigen. Während die hypervariablen Regionen von CDR1 und 2 im V-Gensegment kodiert sind, unterliegt die CDR3 der *junctional diversity*, dem Einfügen und Weglassen von Nukleotiden beim V(D)J-Verknüpfungsprozess. Weitere Variabilität in der Antigenbindestelle wird durch die  $V_L - V_H$ -Paarung generiert. Schließlich erhalten aktivierte B-Zellen eine zusätzliche Variation und somit gereifte Affinität durch somatische Hypermutation, vor allem während der Keimzentrumsreaktion, bei der Punktmutationen in den rearrangierten V-Gensegmenten eingeführt werden [2].

## Generierung verschiedener Immunglobulinklassen und somit variabler Effektorfunktionen

Das Cluster 3' von den J<sub>H</sub> Segmenten enthält verschiedene Immunglobulin C<sub>H</sub>-Gensegmente, welche für die verschiedenen Ig-Isotypen und deren Subklassen kodieren. Es wird zwischen fünf humanen HC-Isotypen  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  und  $\epsilon$  mit entsprechenden Subklassen unterschieden. Die dazugehörigen Immunglobuline beim Menschen sind: IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4, IgA1 und IgA2 sowie IgE. Die Ig-Isotypen und Subklassen in der Maus sind: IgM, IgD, IgG1, IgG2a (Homolog in C57BL/6 IgG2c), IgG2b, IgG3, IgA und IgE [16] (**Abbildung 1.3**).

Auf die J<sub>H</sub>-Gensegmente folgt als erstes das C <sub>$\mu$</sub> -kodierende Gensegment, gefolgt von C <sub>$\delta$</sub>  (**Abbildung 1.3**). Durch alternatives Spleißen werden IgM und IgD BZR auf B-Zellen koexprimiert, wobei je nach Entwicklungsstadium das molekulare Verhältnis variiert. Sie sind die ersten von einer naiven B-Zelle exprimierten BZR [2]. Die Koexpression und einzigartige Funktion von IgD sind bis heute nicht vollständig verstanden. Da das IgD Gelenk deutlich flexibler als das von IgM ist, könnte es als Hilfsrezeptor beim Einfangen von Antigenen dienen. Nach Aktivierung der B-Zelle mit Antigen differenzieren und proliferieren einige der B-Zellen zu Plasmazellen, die die lösliche Form des BZR als IgM Antikörper exprimieren.

Jedes C<sub>H</sub>-Gensegment trägt am Ende zwei alternative Exons, welche einen Carboxyterminus mit hydrophilem, sekretorischem Ende bzw. ein hydrophobes Membranankernde kodieren. Durch alternatives mRNA Spleißen wird erreicht, dass Plasmazellen hauptsächlich die sekretorische Variante (Antikörper) ihres Ig-Isotypen ausbilden. IgM wird vor allem als Pentamer sekretiert und ist auf Grund der Größe auf die Zirkulation im Blut beschränkt. Als Pentamer besitzt diese erste Abwehrform bereits eine hohe Avidität. Zudem formen die fünf Fc-Teile einen starken C1 Komplement-Aktivator [2].



**Abbildung 1.3:** C<sub>H</sub>-kodierendes Gencluster in Mensch (hu) und Maus (mu) mit Switch-Region Elementen S für die nicht-homologe Rekombination zum Ig-Klassenwechsel.

In anderen aktivierten B-Zellen kann, je nach Stimulus, die Klassenwechsel-Rekombination induziert werden. In diesem irreversiblen Prozess wird die C <sub>$\mu$</sub>  der HC durch einen der Isotypen  $\gamma$ ,  $\epsilon$  oder  $\alpha$  bzw. deren entsprechende Subklasse ersetzt, resultierend in einer veränderten Effektoraktivität bei gleichbleibender Antigen-Spezifität [17]. Ein spezifischer Klassenwechsel

wird durch spezifische Zytokinsignale und das für aktivierte B-Zellen spezifische Enzym AID (*Activation-induced cytidine deaminase*) initiiert [2].

In den Introns vor jedem HC Isotyp/Subklassen-Gensegment (außer  $C_\delta$ ) befindet sich ein sogenanntes Switch-Region Element  $S$  mit repetitiver Sequenz, siehe **Abbildung 1.3**. Wenn eine Zelle z.B. Signale für einen spezifischen Klassenwechsel von IgM (IgD) zu IgG1 bekommt, erfolgt eine nicht-homologe Rekombination zwischen  $S_\mu$  und  $S_{\gamma 1}$ , wobei die repetitiven Sequenzen sich zusammenlagern. Die dazwischenliegende chromosomale DNA wird ausgeschnitten und die neuen Enden ligiert. Die nun IgG1 produzierende B-Zelle kann bei einem weiteren Klassenwechsel nicht mehr zurück zu IgM (IgD) oder IgG3 wechseln, siehe **Abbildung 1.3**.

Über einen spezifischen Klassenwechsel entscheiden spezifische Zytokin-sezernierende T-Helferzellen außerhalb und vor allem innerhalb des Keimzentrums. B-Zellen, die über MHCII ein Peptidantigen präsentieren, treffen in sekundär lymphoiden Organen auf die passenden  $T_H$ -Zellen. Die Verbindung über die Korezeptoren CD40/CD40L und das Aussenden von Zytokinen stimuliert die B-Zelle. In der Maus werden typische Subklassenwechsel zu IgG1 und IgE v.a. von IL-4 stimuliert, IgG2a sowie IgG3 sind häufig von IFN- $\gamma$  stimuliert, während TGF- $\beta$  IgG2b und IgA induziert. Letzteres entsteht auch durch IL-5.

Zusätzlich können T-Zell-unabhängige Antigene (Nicht-Proteine), wie etwa bakterielles LPS, zu B-Zellantworten mit Klassenwechsel führen. Dabei führt eine repetitive Antigenstruktur zur Kreuzvernetzung der BZR und weitere Signale zur Aktivierung und eventuell zum Klassenwechsel der B-Zelle [2].

Sequenzunterschiede in den V-Segmenten der konstanten Region der HC entscheiden über die unterschiedlichen Charakteristika jedes Antikörper Isotypen bzw. deren Subklasse. Dazu gehören Anzahl und Ausprägungsstellen von Disulfidbrücken zwischen den Ketten, Anzahl der Glykosylierungsstellen, Anzahl von C-Domänen, Länge und Flexibilität der Gelenkregion, die primäre Aminosäuresequenz und letztlich auch die Halbwertszeit. IgG ist der dominanteste ( $\approx 11$  mg/ml) und langlebigste ( $t_{1/2}$  21Tage) Isotyp im Menschen, gefolgt von IgA (2,6 mg/ml) [18, 19]. IgE trägt einen nur einen geringen, aber biologisch sehr wichtigen Teil bei. Anders als andere Fc-Rezeptoren, kann der von Mastzellen und Basophilen konstitutiv exprimierte, hoch-affine IgE Rezeptor (Fc $\epsilon$ RI) freies monomeres IgE binden. Bei Antigenbindung werden die Ausschüttung von Histamin und anderen Mediatoren unmittelbar getriggert. Verbreitung findet diese Funktion direkt unter der Epithelschicht der Haut sowie unterhalb der Basalmembran des Verdauungs- und Atemwegstrakts. Das System, das sich ursprünglich zu einer effektiven Parasitenabwehr entwickelt hatte, ist heute vor allem Verursacher der Symptome akuter allergischer IgE-vermittelter Reaktionen [2].

IgM und IgA sind die einzigen Ig-Isotypen, die mit der kurzen Polypeptidkette, der *J-Chain*, interagieren. Diese fördert eine Multimerisierung durch das Verlinken von Cysteinen im

sekretorischen HC-Schwanzstück. Die Dimerisierung von IgA ermöglicht den Transport durch Epithelien, so ist es gehäuft in mukösen Sekreten des Darmes, der Atemwege und in Muttermilch vorhanden, während sich monomeres IgA nur im Plasma bewegt [2].

Eine *J-Chain*-unabhängige Multimerisierung konnte man lange Zeit nur von IgM Hexameren im Plasma, welche durch nichtkovalentes Aneinanderlagern der Fc-Teile (**Abbildung 1.2**) von sechs monomeren IgM Antikörpern entstehen kann. Jüngere Forschung hat aufgedeckt, dass auch IgG Moleküle multimerisieren, und mit besonderer Bedeutung für die klassische Komplementaktivierung, auch Hexamere bilden können [20–23].

## 1.2 Immunglobulin G

IgG ist der dominanteste Isotyp nach Klassenwechsel. Die Ig Isotypen sind im Körper selektiv verteilt, wobei IgG großflächige Verbreitung im Blutsystem und der extrazellulären Flüssigkeit findet und mithilfe des neonatalen FcR auch über die Plazenta transportiert werden kann. Außerdem bietet IgG die am breitesten aufgestellten Effektorfunktionen. Das sind Neutralisation, Opsonisierung, Sensibilisierung zur Tötung durch Natürliche Killerzellen oder Komplementaktivierung und nach IgE auch die Sensibilisierung von Mastzellen [2].

### 1.2.1 IgG-Subklassen

Mit vier IgG-Subklassen sind Spezialisten entstanden, die in Verteilung und Effektorfunktion variieren. Die IgG-Subklassen im Menschen sind in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit im Serum von 1 bis 4 durchnummeriert, wobei IgG1 die häufigste ist und zusammen mit IgG3, die wahrscheinlich abwehrstärksten Subklassen stellt. Sie alle entsprechen der schematischen Darstellungsweise in **Abbildung 1.2**. Zu den auffälligsten strukturellen Unterschieden zählt das mit Abstand längste Gelenk im IgG3 und die besondere Eigenschaft von IgG4 einen Fab-Arm-Tausch durchführen zu können und dadurch bispezifische Antikörper zu generieren [19].

Humane (hu) und murine (mu) IgG-Subklassen teilen einige Ähnlichkeiten. Funktionelle Parallelen gelten annähernd nach der Orthologie in Tabelle 1.1 [24–26].

**Tabelle 1.1: Humane IgG-Subklassen und ihre murinen, funktionellen Entsprechungen**

<b>Humanes IgG</b>	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
<b>Murine Entsprechung</b>	IgG2a/2c	IgG3	IgG2b	IgG1

Mu IgG2a (IgG2c in C57BL/6) interagiert wie hu IgG1 am stärksten mit C1q und aktivierenden FcγR, gefolgt von mu IgG2b bzw. hu IgG3. Mu IgG3 interagiert noch vermindert mit C1q, aber nicht mit FcγR. Die Funktion dieser Subklasse ist am wenigsten charakterisiert.

Mu IgG1 und hu IgG4 interagieren nicht mit C1q, wengleich hu IgG4 wie die anderen IgG-Subklassen in der Lage ist ein Hexamer zu bilden [21]. Mu IgG1 sowie hu IgG4 weisen außerdem eine limitierte Spezifität und Affinität zu den aktivierenden Fc $\gamma$ R auf. Stattdessen zeigt mu IgG1 die höchste Affinität zum einzigen inhibitorischen Rezeptor, Fc $\gamma$ RIIb, der klassischen Fc $\gamma$ R [27]. Im humanen wie murinen System translatiert Fc $\gamma$ RIIb, der im Gegensatz zu den anderen klassischen Fc $\gamma$ R nicht über einen ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*), sondern über einen ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*)-Adapter verfügt, inhibitorische Signale. Mechanistisch betrachtet induziert das Quervernetzen von IgG Antikörpern mit klassischen, aktivierenden Fc $\gamma$ R die Phosphorylierung des ITAM in dieser, oder der assoziierten intrazellulären Fc-Rezeptor gamma (FcR $\gamma$ )-Kette. Dies führt zur Zellaktivierung und z.B. Chemokin/Zytokin Produktion sowie Zellmigration. Weiteres Quervernetzen von IgG Immunkomplexen mit Fc $\gamma$ RIIb führt zur ITAM-abhängigen Phosphorylierung des intrazellulären ITIM. Hierdurch wird die SHIP1 Phosphatase rekrutiert, welche die zellaktivierenden Signale unterdrückt [28, 29]. Demnach ist die inhibitorische Wirkung immer auf eine aktivierende ITAM-Phosphorylierung angewiesen.

Tabelle 1.2 fasst die Effektorfunktionen hu und mu IgG-Subklassen im Hinblick auf Fc $\gamma$ R und C1q Aktivierung zusammen.

**Tabelle 1.2: Differenzierte Effektorfunktionen von IgG-Subklasse Antikörpern via Fc $\gamma$ R und C1q**

Affinität zu aktivierenden (blau) oder inhibitorischen (rot) klassischen Fc $\gamma$ R bzw. Komplement C1q mit Affinitätskonstante  $K_a$  ( $M^{-1}$ ); +++:  $K_a > 10^7$ ; ++:  $K_a > 10^6$ ; +:  $K_a > 10^5$ ;  $\pm$ :  $K_a > 10^4$ ; -: keine Bindung; /: variable Datenlage, adaptiert nach [19, 25, 27].

Human	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	Murin	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
<b>Fc<math>\gamma</math>RI</b>	+++	–	+++	+++	<b>Fc<math>\gamma</math>RI</b>	–	+++	–/+	–/+
<b>Fc<math>\gamma</math>RIIa</b>	++	+	+	+					
<b>Fc<math>\gamma</math>RIIb</b>	+;++	$\pm$	+	+	<b>Fc<math>\gamma</math>RIIb</b>	++	+	++	–
<b>Fc<math>\gamma</math>RIIc</b>	+	$\pm$	+	+					–
<b>Fc<math>\gamma</math>RIIIa</b>	+;++	$\pm$	++/+++	+	<b>Fc<math>\gamma</math>RIII</b>	+	+	+	–
<b>Fc<math>\gamma</math>RIIIb</b>	+	–	++	–	<b>Fc<math>\gamma</math>RIV</b>	–	+++	++/+++	–
<b>C1q</b>	++/+++	+	++/+++	–	<b>C1q</b>	–	+++	++	+;++

So relevant wie der IgG-Subklassenwechsel für die IgG-Effektorfunktion ist auch das Vorhandensein und die Ausprägungsform der IgG Fc-Glykosylierung.

## 1.2.2 IgG Fc N-Glykosylierung

Wie die meisten Plasma- und Membranoberflächenproteine sind auch die Ig-Klassen in der konstanten und variablen Region unterschiedlich stark glykosyliert. IgG trägt am Fc nur eine, hoch-konservierte N-Glykosylierung, die von wichtiger funktioneller Bedeutung ist.

Angeknüpft am Asparagin 297 wirkt das, in die C<sub>H</sub>2 Domäne hineinragende Kohlenhydratgerüst, je nach terminaler Ausprägung strukturformend. Das Basisgerüst aus zwei

N-Acetylglucosaminen (GlcNAc) verzweigt sich über drei Mannose-Moleküle und endet mit GlcNAc. An dieser Stelle kann zusätzlich einseitig bzw. beidseitig Galactose über  $\beta$ 1,4 verlinkt sein, bezeichnet als G1 bzw. G2. Weiterhin kann die Galactose terminal einseitig bzw. beidseitig um  $\alpha$ 2,6 verknüpfte Sialinsäure (hu: N-Acetylneuraminsäure, mu: N-Glycolylneuraminsäure) erweitert sein. Man spricht dann von G1S1, G2S1 bzw. G2S2. Fehlen Sialinsäure oder Galactose gänzlich, spricht man von G0 [30].

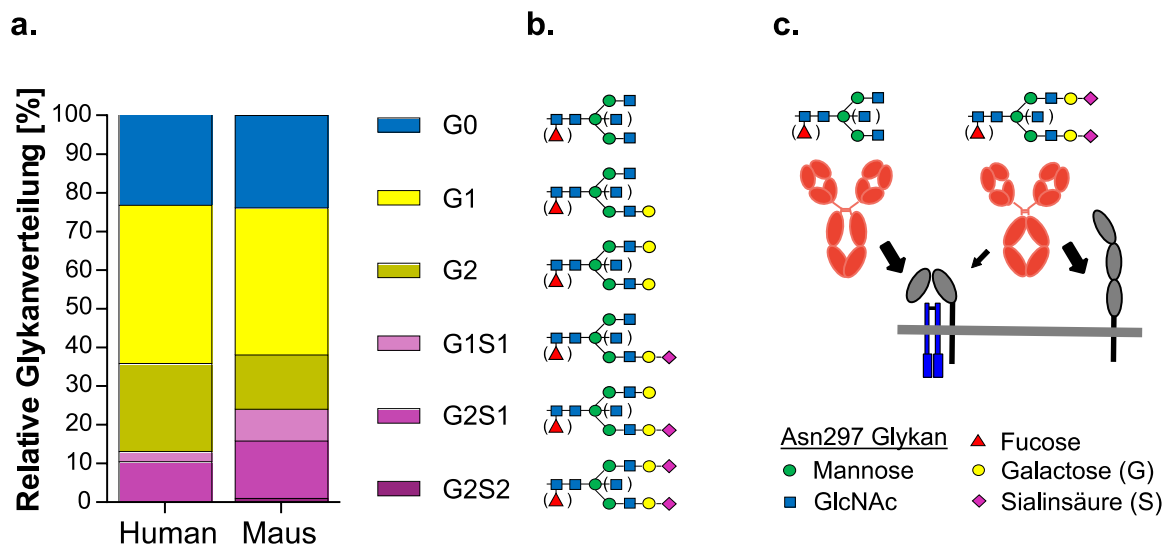
Erweiterungen der Basisstruktur mit Fucose und *bisecting* GlcNAc sind möglich (**Abbildung 1.4 b**). Mu IgG sind nahezu immer fucosyliert, wobei *bisecting* GlcNAc nur selten vorkommt. Für das hu IgG Fc N-Glykan ist mehr Variabilität beschrieben. Das Hinzufügen von *bisecting* GlcNAc unterbindet die Fucosylierung und ist mit einer erhöhten ADCC verbunden. Während einer Schwangerschaft wird IgG stärker fucosyliert (weniger *bisecting* GlcNAc) [31].

Fehlt das Fc N-Kohlehydratgerüst vollständig oder fast vollständig kann IgG gar nicht, bis schlecht mit Fc $\gamma$ R oder C1q interagieren; die Antikörperstruktur ist beeinträchtigt und kann somit in einer verminderten Fc:Fc-Interaktionsmöglichkeit und damit verknüpften Immunkomplexformierung resultieren. Entsprechend konnte eine Entzündung in Autoimmunmodellen, wie Immunthrombozytopenie (ITP) und Arthritis, durch die Hydrolyse des IgG mit dem Enzym EndoS unterdrückt werden. Durch die stattgefundene Hydrolyse bleibt nur das primäre GlcNAc mit oder ohne Fucose erhalten. Allerdings wurde in weiteren Studien deutlich, dass trotz dieser Modifizierung hu IgG1 und IgG3 eine gewisse Fähigkeit behielten FcR-wirksame Immunkomplexe zu formen [32–35]. Dies unterstreicht zum einen die funktionelle Bedeutung des Fc N-Glykans und zum anderen die enorme Stärke von hu IgG1 und IgG3.

Eine durchschnittliche Glykanverteilung von Serum-IgG gesunder Spender ist in **Abbildung 1.4 a** aufgeführt. Dieses Muster tritt altersabhängig auf, mit einem erhöhten G0 Anteil (entspricht geringerer Galactosylierung) in sehr jungen und wieder in späten Jahren. Eine Schwangerschaft dagegen geht mit erhöhter Galactosylierung einher [31]. Eine geringe Galactosylierung wurde auch für Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis (RA), chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (IBD), Myasthenia gravis, systemische Sklerose, systemischer Lupus erythematoses (SLE) und andere gefunden, die mit dem Beginn und Verlauf der Krankheit assoziiert ist. Für wenige Erkrankungen gibt es bislang Daten, aus denen hervorgeht, wie sich die spezifische Autoantikörper Glykosylierung vom Gesamt-IgG abhebt. Für RA ist bekannt, dass eine Linderung in der Erkrankung mit erhöhter IgG Sialylierung durch Schwangerschaft oder anti-TNF Therapie auftritt [36–40]. Dies war umso deutlicher, wenn die autoreaktiven IgG Antikörper betrachtet wurden [41].

Diese Daten deuten bereits darauf hin, dass die Form der terminalen IgG Fc N-Glykosylierung einem Costimulus-kontrollierten, posttranslationalen Mechanismus unterliegt und funktionell bedeutend ist. Arbeiten von Ohmi *et al.* und Oefner *et al.*, Hess *et al.* sowie Bartsch *et al.* aus

unserer Arbeitsgruppe haben hierzu starke Indizien geliefert [42–45]. Vielmehr noch, diese und weitere Forschungsarbeiten der letzten Jahre enthüllten, dass die terminale Sialylierung anti-inflammatorisches Potential aufweist. Dies wurde zunächst für IVIg (gepooltes Serum-IgG von 5000-10.000 gesunden Spendern) beschrieben, das erfolgreich zur Therapie von entzündlichen Erkrankungen eingesetzt wird und auch in autoimmunen Mausmodellen wirksam ist [46]. Die anti-inflammatorische Wirkung resultiert aus der sialylierten IgG Fraktion im IVIg, die mit dem Zucker-bindenden C-Typ Lektin-Rezeptor hu DC-SIGN oder mu SIGN-R1 auf Makrophagen oder DC interagiert [47–49]. Dies führt zur Hochregulation von IL-33, das wiederum Basophile anregt IL-4 auszuschütten, wodurch der inhibitorische Fc $\gamma$ RIIb auf Effektor-Makrophagen hochreguliert wird. Hierdurch wird sehr wahrscheinlich das Verhältnis an sialylierten IgG Antikörpern im Serum und dadurch auch der Schwellenwert zur Aktivierung von Immunzellen angehoben, der notwendig ist, um Entzündung auszulösen.



**Abbildung 1.4: IgG Fc N-Glykosylierung**

**a.** HPLC Analyse ermittelt die relativen Glykananteile vom Gesamt-Glykan am Fc-Asparagin 297 nach EndoS-Verdau des Serum-IgG gesunder Menschen oder naiver Wildtypmäuse; **b.** Mögliche Glykosylierungsmuster G0 bis G2S2 durch terminale Galactosylierung und/oder Sialylierung des Basisgerüsts. **c.** Die terminale Galactosylierung und Sialylierung beeinflusst die Fc-Konformation und verschiebt somit das Interaktionspotential von Typ I Fc $\gamma$ R zu einem zweiten Typ, den C-Typ Lektin-Rezeptoren, welche inhibitorisch wirken.

Ein weiterer C-Typ Lektin-Rezeptor, der mit galactosylierten Immunkomplexen interagiert, wurde von Karsten *et al.* beschrieben. Dectin-1 auf Neutrophilen reagierte auf intraperitoneal applizierte, galactosylierte und sialylierte Immunkomplexe und konnte durch Quervernetzung zusammen mit Fc $\gamma$ RIIb eine Aktivierung der Zelle durch C5a/C5aR unterbinden [50]. Diese und viele andere Studien zeigen somit Möglichkeiten der in erster Linie unspezifischen, aber anti-inflammatorischen Therapie auf [42, 43, 51–54].

Demnach ergibt sich ein Typ II Fc $\gamma$ R, zu denen bislang die C-Typ Lektine DC-SIGN, CD23 und BDCA2 im Menschen sowie SIGN-R1, DCIR, CD23 und Dectin-1 in Mäusen geordnet werden [1, 55, 56]. Die anti-inflammatorische Wirkung erfolgt entweder durch ein eigenes ITIM, durch Assoziation mit Fc $\gamma$ RIIb oder durch einen bisher noch unbekanntem Mechanismus.

Strukturanalysen ergaben, dass Galactosylierung und Sialylierung die Fc-Konformation dahingehend beeinflussen, dass es verstärkt für C-Typ Lektin-Rezeptoren (Typ II), dagegen die G0 Form verstärkt für klassische Fc $\gamma$ R (Typ I) zugänglich ist (**Abbildung 1.4 c**) [57].

In wie weit die terminale Galactosylierung und/oder Sialylierung von IgG auch die C1q-Bindung beeinflusst ist umstritten. Quast *et al.* verweisen auf eine verminderte Komplementaktivierung durch Sialylierung, neuere Arbeiten von Dekkers *et al.* konnten dies jedoch nicht bestätigen [58, 59].

### **1.3 Maladaptive Immunreaktionen und die modulatorische Wirkung der IgG-Subklassen und Fc N-Glykosylierung**

In gesunden Menschen lassen sich autoreaktive B-Zellen finden, die noch nicht aktiviert und daher sehr wahrscheinlich auf eine unzureichende zentrale Toleranzkontrolle zurückzuführen sind. Die aus V(D)J Rekombination entstehenden autoreaktiven B-Zellen werden entweder direkt im Knochenmark eliminiert oder in der Peripherie durch weitere Toleranzmechanismen in Schach gehalten. Entkommen diese auch der peripheren Toleranzkontrolle und expandieren, können Autoimmunerkrankungen entstehen. Interessanterweise könnte nach Suurmond *et al.* ein Großteil autoreaktiver B-Zellen, abhängig von der Autoimmunerkrankung, vor allem von nicht-autoreaktiven B-Vorläuferzellen stammen, die im Keimzentrum gereift sind und deren Autoreaktivität ein Produkt somatischer Hypermutation ist [60].

Autoimmunität tritt meist spontan (idiopathisch) auf, wobei Umwelteinflüsse und eine genetische Prädisposition einwirken können. Verschiedenste Organ-spezifische und systemische Autoimmunerkrankungen sind mit bestimmten HLA Antigenen assoziiert [61]. Mittlerweile sind viele Zielautoantigene beschrieben, allerdings ist nicht allumfassend klar, ob dieselben Autoantigene auch immer die Immunreaktion ausgelöst haben [2]. In einigen experimentellen Mausmodellen macht man sich dies zunutze; durch aktive Immunisierung mit rekombinantem murinem Autoantigen zusammen mit einem stark pro-inflammatorisch kostimulierenden Adjuvans kann eine Autoimmunität erzeugt werden, indem die autoantigenspezifische Toleranz gebrochen wird.

In jedem Fall besteht die Tendenz zur chronischen Entzündung, da, bis auf wenige Ausnahmen, die Autoantigene immer vorhanden sein werden. Vielmehr besteht die Gefahr, dass durch autoimmune Gewebeerstörung intrazelluläre Antigene freigesetzt und von zirkulierenden autoreaktiven B-Zellen erkannt werden. Werden diese aktiviert, differenzieren sie in Plasmazellen, die wiederum Autoantikörper sekretieren. Autoimmunität ist also ein kontinuierlicher und evolvierender Selbstzerstörungsprozess [2].

Die Autoimmunpathogenese erfolgt ähnlich der Bekämpfung pathogener Eindringlinge, wobei einzigartige Autoimmunsyndrome zusätzlich auch an den Funktionsverlust des Zielantigens durch Antikörperbindung gekoppelt sein können. Dazu zählen beispielsweise anti-Acetylcholinrezeptor Antikörper in Myasthenia gravis oder anti-Desmoglein 3 Antikörper in Pemphigus vulgaris, siehe **Abbildung A.1** [2, 62]. Mit Ausnahme von Typ I Diabetes mellitus sind die bedeutendsten Effektoren die Autoantikörper-mediierten Fc-Rezeptor-Systeme und Komplement (für einen beispielhaften Pathomechanismus in der Autoimmundermatose Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) siehe **Abbildung A.2**).

Da die Autoantikörper vor allem der IgG-Klasse angehören, ist es naheliegend, dass die autoantigenspezifische IgG-Subklassenverteilung eine Rolle in der Pathogenese spielt. Basierend auf Tabelle 1.2 sind vor allem hu IgG1 und 3 bzw. mu IgG2a und 2b die Entzündung-treibenden Subklassen [63, 64]. Das kaum reaktive hu IgG4 trägt normalerweise den geringsten Anteil des Serum-IgG, so auch häufig in Autoimmunpatienten ([19, 65] und **Abbildung A.5**). Einige Forschungsarbeiten schreiben der hu IgG4 Subklasse immunregulatorische Funktionen zu. Bereits in den 80er Jahren machten van der Zee *et al.* die Beobachtung, dass sich in Imkern durch die regelmäßige Sensibilisierung mit Bienengift ein Subklassenwechsel von IgG1 zu dominanten IgG4 Leveln vollzog [66]. Es stellt sich die Frage, ob eine generelle oder spezifische Anreicherung an hu IgG4 einem dysregulierten Immunsystem wieder Homöostase verleihen kann. Man nutzt diesen Zusammenhang heute teilweise schon erfolgreich in Form einer Allergen-spezifischen Immuntherapie [54, 67, 68].

Auch autoimmune Mausmodelle deuteten an, dass mu IgG1 ein kontextabhängiges, anti-inflammatorisches Potential besitzt. So konnte z.B. eine genetische mu IgG1 Defizienz eine autoantigenspezifische Subklassenverteilung mit vielfach gesteigerter Pathogenität entstehen lassen [69]. Weiterhin konnte mu IgG1 die Formierung morbider Immunkomplexe in der Niere verhindern. Hierzu wurde vorgeschlagen, dass mu IgG1/hu IgG4 aufgrund der kurzen Gelenkregion und damit verbundenen verringerten segmentalen Flexibilität im Quervernetzen von Antigenen limitiert ist [70]. Die, der Inhibition zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu verstehen, und die Ausschöpfung des subklassenspezifischen anti-inflammatorischen Potentials ist im Hinblick auf maladaptive Immunreaktionen in Autoimmunität oder Transfusion/Transplantation von höchstem Interesse.

Auch die Art der IgG Fc N-Glykosylierung kann die pathogene Effektorstärke von Autoantikörpern beeinflussen. Agalactosylierte, aber nicht sialylierte IgG Autoantikörper induzieren Krankheitssymptome in passiven Arthritis-Mausmodellen, woraus abzuleiten ist, dass G0 IgG Antikörper eine autoimmune Entzündung antigenspezifisch verschlimmern können [44, 45, 71]. Darüber hinaus konnten antigenspezifische - aber nicht unspezifische - sialylierte IgG Antikörper die Entwicklung von Arthritis im immunisierungsinduzierten Mausmodell inhibieren [45]. In einem ähnlichen Modell zeigten Bartsch *et al.*, dass die Injektion geringer,

antigenspezifischer, sialylierter IgG1 Antikörpermengen vor aktiver Immunisierung und Antigen-Boost die Entwicklung von Arthritis schwächte. Dies wurde auf eine verringerte Akkumulation pathogener  $T_H17$ -Zellen und auf eine verringerte autoantigenspezifische IgG Antikörper-Antwort zurückgeführt [44]. Demnach schienen sialylierte IgG Autoantikörper die Entwicklung pathogener Autoimmunzustände zu schwächen, indem entzündliche T- und B-Zell Antworten beeinflusst wurden.

Hiernach stellt sich die Frage, ob das anti-inflammatorische Potential der IgG Fc N-Sialylierung die größte Bedeutung in der Entstehungsphase pathogener Autoimmunzustände hat oder auch noch in der Effektorphase besteht.

## 1.4 Zielstellung

---

Wie bis hier hin dargestellt, wird die Effektorfunktion von IgG Antikörpern von der IgG-Subklasse und der Art der Fc N-Glykosylierung reguliert. Entsprechend unterscheiden sich die humanen sowie murinen IgG-Subklassen in ihrem Potential Komplement und Fc $\gamma$ R zu aktivieren. Hu IgG4 und mu IgG1 können im Gegensatz zu den anderen Subklassen den klassischen Komplementweg über C1q nicht aktivieren. Stattdessen wird diskutiert, ob hu IgG4 eine Hexamerbildung durch hu IgG1 und IgG3 und deren anschließende Interaktion mit dem sechsköpfigen C1q durch sterische Interferenz inhibieren könnte. Des Weiteren zeigen hu IgG4 und mu IgG1 eine verringerte Spezifität und Affinität zu klassischen aktivierenden Fc $\gamma$ R und mu IgG1 sogar eine bevorzugte Interaktion mit dem inhibitorischen Fc $\gamma$ RIIb. Einige Studien zu maladaptiven Immunreaktionen deuten bereits auf eine immunregulatorische, teils sogar anti-inflammatorische Funktion des hu IgG4 und mu IgG1 hin.

Zusätzlich reguliert die Art der IgG Fc N-Glykosylierung die Affinität zu Fc $\gamma$ R. Galactosylierte und sialylierte IgG Antikörper zeigen eine verringerte Affinität zu diesen, jedoch eine erhöhte Interaktion mit Zucker-bindenden C-Typ Lektin-Rezeptoren. Dies kann letztendlich zu inhibitorischen Signalen führen. Obwohl zahlreiche Studien bereits eine anti-inflammatorische Funktion für die IgG Fc N-Sialylierung beschrieben haben, gibt es bisher nur sehr wenige Daten, die dieser Funktion auch ein antigenspezifisches anti-inflammatorisches Potential nachweisen konnten. Sialylierte autoreaktive IgG Antikörper inhibierten die Entwicklung pathogener T- und B-Zellantworten und schwächten somit den entzündlichen Autoimmunitätszustand.

Ziel dieser Arbeit war es, die antigenspezifische anti-inflammatorische Wirkung des mu IgG1 und der IgG Fc N-Sialylierung weiter zu untersuchen. Dazu sollten *in vitro*-Methoden etabliert werden, um die Rolle von IgG1 für die klassische Komplementaktivierung zu untersuchen (3.1). Um dieser Fragestellung auch *in vivo* nachgehen zu können, sollten Komplementabhängige Mausmodelle etabliert werden. Hierzu boten sich autoimmune und transfusionsbedingte Modellerkrankungen an (3.2). Darüber hinaus sollte die Rolle der IgG Fc N-Sialylierung während der Antikörper-Effektorphase in einem Komplement- und Fc $\gamma$ R-abhängigen Mausmodell untersucht werden. Hierfür sollte das aktive, immunisierungsinduzierte Modell der Autoimmundermatose Epidermolysis bullosa acquisita genutzt und dazu eine passive Modellvariante etabliert werden (3.4).

## 2 MATERIAL & METHODEN

---

### 2.1 Material

---

#### 2.1.1 Mäuse

BALB/c Mäuse wurden bei Janvier Labs gekauft. C57BL/6J, C57BL/6S und FcεR1gKO (im Folgenden FcγKO) wurden in der Gemeinsamen Tierhaltung (GTH) der Universität zu Lübeck nach institutionellen Vorschriften gezüchtet und gehalten.

Innerhalb der Vergleichsexperimente autoimmunhämolytische Anämie (3.3.1) und passive Epidermolysis bullosa acquisita (3.4.2) wurden Tiere gleichen Geschlechts und Alters verwendet. Daten der immunisierungsinduzierten Epidermolysis bullosa acquisita (3.4.1) wurden in Kooperation mit Dr. Katja Bieber (LIED, Universität zu Lübeck) gewonnen; das für die Fragestellungen 3.4 verwendete Antiserum war verbliebenes Material anderer bereits abgeschlossener Fragestellungen und Projekte. Entsprechend waren die aktiv immunisierten Kohorten in Geschlecht und Alter gemischt.

Die Tierversuche wurden vom Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung des Landes Schleswig-Holstein genehmigt.

#### 2.1.2 Antikörper

mu anti-TNP IgG3 (Klon 9A6)	Fred Finkelman, Cincinnati Children's Hospital Medical Center (Cincinnati, OH, USA)
anti-mu IgG H+L -HRP	Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, TX, USA)
anti-mu IgG Fc -HRP	Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, TX, USA)
anti-muIgG1-HRP	Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, TX, USA)
anti-mu IgG2c -HRP	Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, TX, USA)
anti-mu IgG2b -HRP	Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, TX, USA)
anti-mu IgG3 -HRP	Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, TX, USA)
anti-hu C1q -HRP	AbD Serotec (Bio-Rad, Kidlington, GBR)
anti-hu IgG Fc -HRP	Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, TX, USA)
anti-hu IgG4 -HRP	Biozol (Eching, Deutschland)
anti-mu IgG1 -BV510	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
anti-mu IgG1 -BV421	Biolegend (San Diego, CA, USA)
anti-mu C3 -Biotin	Biozol (Eching, Deutschland)
anti-mu IgG2a -FITC	Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, TX, USA)

anti-mu IgG2a -AF488	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
anti-mu B220 -BV768	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
anti-mu CD16/32	Biolegend (San Diego, CA, USA)
anti-mu CD8 -AF700	Biolegend (San Diego, CA, USA)
anti-mu CD4 -BV711	Biolegend (San Diego, CA, USA)

### 2.1.3 Zellen und Bakterien

mu anti-TNP IgG1 (Klon B8401H5, hier H5) Hybridom	Birgitta Heyman, Universität Uppsala, (Schweden)
mu anti-TNP IgG1, IgG2a, IgG2b <i>switch-variant</i> (sv) Hybridome	Lucien Aarden, Sanquin Research (Amster- dam, Niederlande)
mu anti-Erythrozyten IgG1, IgG2a, IgG2b <i>switch-variant</i> (sv; Klon 34-3C) Hybridome	Shozo Izui, Universität Genf (Schweiz)
mu anti-MHCI IgG2a (Klon 34-1-2s, HB-79) Hybridom	ATCC Cultures (Manassas, VA, USA)
mu anti-OVA IgG1 (Klon 4C9) Hybridom	Falk Hiepe, Charité (Berlin, Deutschland)
HEK293T/17 Zelllinie ( <i>Human Embryonic Kidney cell</i> )	LGC Standards (Luckenwalde, Deutschland)
Z-kompetente NovaBlue E.coli	LIED, Universität zu Lübeck (Deutschland)

### 2.1.4 Rekombinante Proteinantigene und Enzyme

mu rekombinantes von-Willebrand -factor-A-like domain 2 (vWFA2)	AG Ludwig, Universität zu Lübeck
His-(NC16A) <sub>4</sub>	Euroimmun AG (Lübeck, Deutschland)
hu $\alpha$ 2,6 Sialyltransferase	Roche (Basel, Schweiz)
hu $\beta$ 1,4 Galactosyltransferase	Kelley Moremen, University of Georgia (Ath- ens, GA, USA)
Endoglykosidase S (EndoS)	Mattias Collin, Universität Lund (Schweden)
AgeI	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)
BsiWI	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)
SaII	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Poly- merase	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)
T4 DNA Ligase (+ 10x Ligase Puffer)	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)

### 2.1.5 Vektoren und Primer

Die hier verwendeten Expressionsplasmide für murine Igy1 HC und für murine kappa LC wurden in Tiller *et al.*, 2008, 2009 und 2010 sowie Hess *et al.* 2013 beschrieben [43, 72–74]. Spezifische Primer wie in Tabelle 2.1 und Tabelle 2.3 aufgeführt, wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) produziert.

### 2.1.6 Chemikalien und Reagenzien

2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES-Puffer)	Merck (Darmstadt, Germany)
6x DNA Ladepuffer	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Agarose peqGOLD	VWR (Radnor, PA, USA)
Alsever's Solution	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	GE-Healthcare (Little Chalfont, UK)
Bromphenolblau	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Citrat-Phosphat-Dextrose-Lösung mit Adenin (CPD-A)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
CMP-Sialinsäure, Dinatriumsalz (CMP-Sial)	Merck (Darmstadt, Germany)
CNBr-aktivierte Sepharose Fast Flow	GE Life Sciences (Little Chalfont, GB)
Coomassie Brilliant Blue R-250	BioRad (Hercules, CA, USA)
DL-Dithiothreitol (DTT) Lösung 1 M in H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM)	LifeTechnologies (Darmstadt, Deutschland)
Dulbecco's buffered saline (DPBS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Essigsäure	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Fetales Kälberserum (FCS)	LifeTechnologies (Darmstadt, Deutschland)
Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (Live/Dead)	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Gelatine	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Glycerol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Glycin	Merck (Darmstadt, Germany)

Glycylglycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Hank's balanced salt solution mit Magnesium und Calcium (HBSS <sup>+/+</sup> )	LifeTechnologies (Darmstadt, Deutschland)
Hank's balanced salt solution ohne Magnesium und Calcium (HBSS <sup>-/-</sup> )	LifeTechnologies (Darmstadt, Deutschland)
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HTAB)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Isopropanol	Otto Fischar (Saarbrücken, Deutschland)
Kanamycin Sulfat	Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland)
Ketanest (Ketamin)	Pfizer (New York City, NY, USA)
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Lymphozyten-Separationsmedium	GE-Healthcare (Little Chalfont, UK)
Methanol	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
MnCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Natriumacetat (NaOAc)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumazid	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumcacodylat-Trihydrat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (Darmstadt, Germany)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10- 250 kDa	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Penicillin-Streptomycin	LifeTechnologies (Darmstadt, Deutschland)
Picrylsulfonsäure (TNBS)-Lösung 5 % w/v in H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Primaton	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Life Sciences (Little Chalfont, GB)
Rompun (Xylazin)	Bayer (Leverkusen, Deutschland)
Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt, Germany)
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Streptavidin BV605	Biologend (San Diego, CA, USA)
Tetramethylbenzidine (TMB)	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
TiterMax® Classic Adjuvant	TiterMax (Norcross, GA, USA)
Trinitrophenol-konjugiertes Ficoll (TNP-Ficoll)	Biosearch Technologies (Petaluma, CA, USA)

TRIS-HCl	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tween20	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
UDP- $\alpha$ -D-Galactose, Dinatriumsalz (UDP-Gal)	Merck (Darmstadt, Germany)
Veronal buffered saline mit Gelatine, Magnesium und Calcium (GVB <sup>+/+</sup> )	Complement Technology (Tyler, TX, USA)
Veronal buffered saline mit Gelatine, ohne Magnesium und Calcium (GVB <sup>-/-</sup> )	Complement Technology (Tyler, TX, USA)

### 2.1.7 Puffer, Medien, Lösungen

Beschichtungspuffer	50 mM Carbonat/Bicarbonat-Puffer
Cacodylatpuffer	0,56 M Natriumcacodylat-Trihydrat, pH 6,9
Coomassie-Entfärbelösung	40 % Methanol (v/v) 10 % Essigsäure (v/v)
ELISA-Puffer	3 % BSA (w/v) 0,1 % Gelatine (w/v) 3 mM EDTA in 1x PBS
Elutionspuffer	0,1 M Glycin, pH 2,9
Erylysepuffer	0,15 M NH <sub>4</sub> Cl 0,1 mM EDTA 1 mM NaHCO <sub>3</sub> pH 7,2
Extraktionspuffer	0,1 M TRIS, pH 7,6 0,154 M NaCl
FACS-Puffer	0,5 % BSA (w/v) 0,05 % Natriumazid (w/v) 10 mM EDTA in 1x PBS
Glycylglycin	1 mg/ml in 1x PBS
HEK-Produktionsmedium	500 ml DMEM 8 ml 2 % Primaton 100 U/ml Penicillin 100 $\mu$ g/ml Streptomycin
HEK-Wachstumsmedium	500 ml DMEM 25 ml hitzeinaktiviertes FCS 100 U/ml Penicillin 100 $\mu$ g/ml Streptomycin
Hybridom-Produktionsmedium	500 ml RPMI 8 ml 2 % Primaton 100 U/ml Penicillin 100 $\mu$ g/ml Streptomycin

Hybridom-Wachstumsmedium	500 ml RPMI 50 ml hitzeinaktiviertes FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Kaliumphosphatpuffer	0,2 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> auf pH 6 einstellen
Kopplungspuffer	0,1 M NaHCO <sub>3</sub> , pH 8,3 0,5 M NaCl
LB-Medium	7,5 g in 300 ml Reinstwasser
MES-Puffer	0,1 M MES, pH 6,5
PBST	0,05 % Tween 20 (v/v) in 1x PBS
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 72 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in Reinstwasser, pH 7,4
Quenching-Puffer	0,1 M TRIS-HCl in Reinstwasser, pH 8
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 190 mM Glycin 0,1 % SDS (w/v) in Reinstwasser, pH 8,3
SDS-Probenpuffer 5x	0,25 M Tris, pH 6,8 0,5 M DTT 25 % Bromphenolblau (w/v) 50 % Glycerol (v/v) 10 % SDS (w/v)
TRIS-Puffer zur Neutralisation	0,1 M TRIS-HCl in Reinstwasser, pH 9
Waschpuffer pH 4	0,1 M NaOAc, pH 4 0,5 M NaCl
Waschpuffer pH 8	0,1 M TRIS-HCl, pH 8 0,5 M NaCl

### 2.1.8 Kits

NucleoBond Xtra Maxi Plus Kit	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Nucleo Spin Gel and PCR Clean UP	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)

### 2.1.9 Patientenmaterial

Normales humanes Serum wurde aus dem Vollblut von gesunden Spendern gewonnen. Serum von Patienten mit bullösem Pemphigoid wurden von Prof. Dr. Dr. Enno Schmidt (Hautklinik, UKSH Lübeck und LIED Universität zu Lübeck) zur Verfügung gestellt. Humane Seren wurden gewonnen und verwendet mit der Genehmigung und nach den Vorschriften und ethischen Standards der Universität zu Lübeck.

### 2.1.10 Verbrauchsmaterial

Cell Strainer 70 µm	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
EDTA-Monovette®/Microvette®	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Falcon, Polypropylen Röhrchen (15ml/50 ml)	Greiner Bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Filter Stericup 0,22 µm	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kanülen	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Lanzetten Solofix®	Braun (Melsungen, Deutschland)
Mikrotiterplatten (hochbindend) 96 Well	Corning Incorporate (Corning, NY, USA)
Mini-PROTEAN® TGX™ Protein Gel, 10% Polyacrylamid	Bio-Rad-Laboratories (Hercules, CA, USA)
PCR Reaktionsgefäße	Bio-Rad-Laboratories (Hercules, CA, USA)
Pipettenspitzen (10/200/1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reagiergefäße (0,5/1,5 ml/2,0 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Säule, 10 ml, Pierce Centrifuge	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Säule, 20 ml	G-Biosciences (St. Louis, MO, USA)
Serologische Pipetten (5/10 ml/25/50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Serumseparator MiniCollect® 0,8 ml	Greiner Bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Skalpell Einweg	Feather (Kita-Ku, Japan)
S-Monovette®	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Spritzen Einweg, Injekt®-F 1 (1ml)	Braun (Melsungen, Deutschland)
Spritzen Einweg, Injekt®-Solo (2 ml)	Braun (Melsungen, Deutschland)
Spritzen Micro-Fine™ (0,3 ml)	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Suspensionskultur-Flasche CELLSTAR® Filter Top	Greiner Bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Zellkultur-Flasche CELLSTAR®	Greiner Bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Zellkultur-Schale CELLSTAR®	Greiner Bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Zentrifugationsfilter 10kDa, Amicon-Ultra 15 und Ultra 0,5	Merck (Darmstadt, Deutschland)

### 2.1.11 Geräte

Analysenwaage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Autoklave VX-75	Systemec (Linden, Deutschland)
Dickenschnellmessgerät 7301	Mitutoyo (Kawasaki, Japan)
Dispergierer Ultra-Turrax T8	IKA Labortechnik (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Durchflusszytometer Attune NxT	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Durchflusszytometer Benchtop analyzer LSRII	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Gelsystem PowerPac Basic	Bio-Rad-Laboratories (Hercules, CA, USA)
Hämatologie-Messgerät XN-9000	Sysmex (Kobe, Japan)
Inkubator AutoFlow NU-5510	NuAir (Plymouth, MN, USA)
Mikroplatten-Photometer Anthos Reader 2001	Anthos Mikrosysteme (Eberstadt, Deutschland)
Mikroplatten-Photometer Spectra Max iD3	Molecular Devices (San José, CA, USA)
Mikroskop Primovert	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mikrozentrifuge Ministar	VWR (Radnor, PA, USA)
NanoDrop-2000C	peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
pH Meter FiveEasy F20	Mettler-Toledo (Columbus, OH, USA)
Pipette Mehrkanal Multistep Eppendorf Xplorer® plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipetten Einkanal	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipetten Mehrkanal	VWR (Radnor, PA, USA)
Pipettierhilfe Pipetboy Accu 2	Integra Bioscience (Zizers, Schweiz)
Protein G HiTrap Säule HP, 5 ml	GE Life Sciences (Little Chalfont, GB)
Protein G Monolith Säule CIM®, 8 ml	BIA Separations (Ljubljana, Slowenien)
Pumpe Dual-Pump KP-22	Fischer Analytics (Weiler, Deutschland)
Schüttelinkubator Ecotron	Infors HT (Bottmingen, Schweiz)
Tube Roller RS-TR5	Phoenix Instrument (Garbsen, Deutschland)
Tube Rotator	VWR (Radnor, PA, USA)
Vakuumpumpe Vacusafe 158310	Integra Bioscience (Zizers, Schweiz)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Wasserbad SW-2C	Julabo (Seelbach, Deutschland)
Wipptisch WT12	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Zentrifuge 5424R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Zentrifuge Avanti J26XP  
Zentrifuge Mega Star 3.0R

Beckmann (Krefeld, Deutschland)  
VWR (Radnor, PA, USA)

### **2.1.12 Software**

Office 365  
GraphPad PRISM 6.0  
FlowJo v10.0.7  
Serial Cloner v2.6.1

Microsoft (Redmond, WA, USA)  
GraphPad Software (San Diego, CA, USA)  
Treestar (Ashland, OR, USA)  
Serial Basics, Freeware

## 2.2 Methoden

---

### 2.2.1 Hybridomkultur

Mycoplasmenfreie Hybridomzellen wurden in FCS-haltigem Hybridom-Wachstumsmedium als Suspensionskultur bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> herangezogen. Bei gewünschter Dichte wurden die Zellen bei 200 xg 7 Minuten abzentrifugiert und in FCS-freiem Hybridom-Produktionsmedium aufgenommen. Nach zwei Wochen wurde die Kultur bei 2000 xg, 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Kulturüberstand gesammelt, steril filtriert und bis zur Antikörperaufreinigung mittels Protein G bei 4°C gelagert.

### 2.2.2 Aufreinigung monoklonaler IgG Antikörper mittels Protein G

Murine monoklonale IgG Antikörper, produziert in Hybridomkultur oder durch Transfektion von HEK-Zellen, wurden unter Zuhilfenahme der Dual Pump KP-22 mit HiTrap Protein G oder Monolith Protein G Säulen nach Herstellerangabe aufgereinigt. Rekombinantes Protein G bindet den Fc-Teil vom IgG mit hoher Affinität pH-abhängig. HiTrap Protein G wurde zunächst mit PBS equilibriert und dann mit Kulturüberstand beladen. Die Sepharose wurde mit dem zehnfachen Bettvolumen PBS gewaschen. Dann wurde IgG mit 0,1 M Glycin pH 2,9 fraktioniert eluiert und sofort mit 0,1 M TRIS pH 9 neutralisiert. Alle verwendeten Lösungen waren eisgekühlt. IgG positive Fraktionen wurden mittels Nanodrop ermittelt, vereint und mit 10 kDa Zentrifugationsfiltern eingeeengt und zu PBS dialysiert.

### 2.2.3 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* - ELISA

Alle ELISA wurden nach dem folgenden Standardprotokoll in hochbindenden 96 Well- Mikrotiterplatten durchgeführt. Das Beschichten von Antigen erfolgte in Beschichtungspuffer; 50 µl pro Well wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder übernacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit ausgeklopft, dreimal mit 150 µl PBST pro Well gewaschen und erneut ausgeklopft. Alle folgenden Inkubationsschritte wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt und danach jeweils gewaschen. Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) -konjugierte Detektionsantikörper wurden entsprechend ihren vorangegangenen Titrationen verdünnt und 50 µl pro Well inkubiert. Hiernach wurde viermal mit je 150 µl PBST gewaschen. Schließlich wurden pro Well 100 µl TMB Substrat aufgetragen und die Reaktion mit 50 µl 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Im Platten-Photometer wurde die Optische Dichte bei 450 nm (OD<sub>450nm</sub>) gemessen.

### **NC16A-spezifischer humaner Subklassen ELISA mit BP-Seren**

Rekombinantes His-(NC16A)<sub>4</sub> wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml an die Platte gekoppelt. Anschließend wurde gewaschen und die Platte für eine Stunde mit 200 µl ELISA-Puffer pro Well inkubiert, um freie Bindestellen mit BSA abzusättigen. Die Proben wurden in ELISA-Puffer verdünnt und 50 µl pro Well in die ausgeklopfte Platte pipettiert. Für die Detektion mit anti-Human IgG-HRP wurden Patientenseren 1:10.000 verdünnt, für anti-Human IgG4-HRP 1:100 und höher verdünnt und in Zweifachbestimmung aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde zum einen normales humanes Serum von gesunden Spendern, zum anderen nur ELISA-Puffer inkubiert. Die aufgetragenen OD-Werte sind die Mittelwerte der Doppelbestimmung abzüglich der Negativkontrollwerte.

### **vWFA2-spezifischer muriner IgG-Subklassen ELISA mit Antiseren**

Rekombinantes murines vWFA2 wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml an die Platte gekoppelt. Anschließend wurde gewaschen und die Platte für eine Stunde mit 200 µl ELISA-Puffer pro Well inkubiert, um freie Bindestellen mit BSA abzusättigen. Jedes vWFA2 Antiserum wurde für die Detektion mit anti-Maus IgG Fc-HRP, IgG1-HRP, IgG2b-HRP, IgG2c-HRP sowie IgG3-HRP 1:10.000 in ELISA-Puffer verdünnt und 50 µl pro Well in Zweifachbestimmung aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde statt Serum nur ELISA-Puffer inkubiert. Die aufgetragenen OD-Werte sind die Mittelwerte der Doppelbestimmung abzüglich der Negativkontrollwerte.

### **C1q ELISA**

TNP-Ficoll wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml an die Platte gekoppelt. Die zu testenden monoklonalen Antikörper wurden in PBS mit 0,1 % Tween20 verdünnt und je 50 µl pro Well inkubiert. Verdünnungsreihen oder Kombinationen von zwei Antikörpern der anti-TNP IgG-Subklassen *switch-variant* (sv) Antikörper IgG2a, IgG2b und IgG1 sowie IgG1 Klon H5 und IgG3 Klon 9A6 wurden, wenn nicht anders indiziert, mindestens in Zweifachbestimmung aufgetragen. Nach einer Stunde wurden ungebundene Antikörper gewaschen und die Platte mit 50 µl pro Well normalem humanem Serum 1:20 in HBSS<sup>+/+</sup> mit 0,1 % Tween20 verdünnt für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde gewaschen und C1q mit HRP-konjugiertem polyklonalem Schaf anti-Human C1q IgG 1:400 in PBS mit 0,1 % Tween20 detektiert.

## **2.2.4 *In vitro* Hämolyse**

### **Erythrozyten Präparation und TNP-Kopplung**

Humanes EDTA-Vollblut wurde in 150 mM NaCl 1:2 verdünnt, 3:1 auf Lymphozyten-Separationsmedium geschichtet und eine Dichtezentrifugation bei 1000 xg für 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Überstand wurde abgenommen, die Erythrozyten mit 40 ml

DPBS bei 800 xg für 7 Minuten gewaschen und schließlich zu gleichen Anteilen in Alsever's Solution bei 4°C gelagert.

Für die Kopplung des Haptens 2,4,6-Trinitrophenol (TNP) an die Erythrozyten-Zelloberflächen wurde die hoch-reaktive Picrylsulfonsäure (2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure, TNBS) verwendet. In ein 50 ml Gefäß wurden 3 ml Reinstwasser, 1,75 ml 0,56 M Cacodylatpuffer und 1 ml Erythrozytenkonzentrat in Alsever's Solution vorgelegt und 0,5 ml 5 % TNBS w/v in H<sub>2</sub>O dazu pipettiert. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur auf einem Wipptisch für eine Stunde. Dann wurden 25 ml DPBS dazugegeben und die Zellen von der übrigen Reaktionslösung abzentrifugiert (500 xg, 5 min, 4°C). Überschüssige TNBS wurde mit 10 ml Glycylglycin in PBS (1 mg/ml) für 5 Minuten abgesättigt. Es folgten Waschschrte bis der Überstand klar war. Schließlich wurden die TNBS-konjugierten Erythrozyten mit Citrat-Phosphat-Dextrose-Lösung mit Adenin (CPD-A) anteilig 9:1 stabilisiert und bei 4°C gelagert.

Die Kopplungseffizienz wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft. Hierfür wurden TNBS-konjugierte Erythrozyten mit mu anti-TNP IgG2a und anschließendem FITC-konjugierten anti-Maus IgG2a in FACS-Puffer gefärbt und mit dem LSRII gemessen.

### Sensibilisierung und Komplement-vermittelte Hämolyse

In jedem Ansatz sollten 5 x 10<sup>8</sup> Zellen mit Antikörpern sensibilisiert werden. Dafür wurde basierend auf Whaley und North [75] eine definierte Zellsuspension von 10<sup>9</sup> Erythrozyten pro ml GVB<sup>-/-</sup> 10 mM EDTA angelegt. Über die OD bei 414 nm und 541 nm einer 100 µl Zellsuspension lysiert in 2,9 ml Wasser, wurde je nach Dichte mittels (2.1) oder (2.2) auf die tatsächliche Konzentration *c* geschlossen.

$$OD_{414nm} = 3 * 10^{-9} * c \quad (2.1)$$

$$OD_{541nm} = 4 * 10^{-10} * c \quad (2.2)$$

50 µl der 10<sup>9</sup>/ml Zellsuspension wurden mit 50 µl anti-TNP IgG verdünnt in GVB<sup>-/-</sup> 10 mM EDTA inkubiert, wobei als Richtwert für die maximale Dosis die höchste subagglutinierende Menge von anti-TNP IgG2a (sv) diene. In Doppelbestimmung wurden Verdünnungsreihen oder Kombinationen von zwei Antikörpern der anti-TNP IgG-Subklassen *switch-variant* (sv) Antikörper IgG2a, IgG2b und IgG1 sowie IgG1 Klon H5, IgG3 Klon 9A6 und anti-OVA IgG1 Klon 4C9 für 30 Minuten bei 37°C unter Schwenken inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden mit GVB<sup>-/-</sup> 10 mM EDTA gewaschen und die Zellen durch zwei weitere Schritte bei 2000 xg für 5 Minuten und 4°C auf GVB<sup>+/+</sup> umgestellt und die Zellen in 50 µl GVB<sup>+/+</sup> resuspendiert. Humanes Serum wurde 1:3 in GVB<sup>+/+</sup> verdünnt und die sensibilisierten Zellen mit je 100 µl für 30 Minuten bei 37°C unter Schwenken inkubiert. Die Komplement-medierte Lyse wurde mit 1 ml eiskalter 0,9 % NaCl abgestoppt. Die Ansätze wurden bei 2000 xg für 5 min und 4°C abzentrifugiert und freies Hämoglobin im Überstand bei 414 nm im Platten-Photometer detektiert. Die effektive Lyse wurde in Relation zur OD von 5 x 10<sup>8</sup> Erythrozyten

lysiert in Wasser (Positivkontrolle, 100 %) ermittelt. Als Negativkontrolle wurden nicht-Antikörper-sensibilisierte TNBS-konjugierte Erythrozyten mit der Serumverdünnung 1:3 in GVB<sup>+/+</sup> inkubiert.

### 2.2.5 Mausmodell Autoimmunhämolytische Anämie

In diesem Mausmodell wird durch Antikörper-Injektion passiv eine autoimmunhämolytische Anämie (AIHA) erzeugt [76, 77]. Die monoklonalen anti-Erythrozyten 34-3C IgG1, IgG2a und IgG2b *switch-variant* (sv) Antikörper wurden durch Hybridomkultur und Protein G-Aufreinigung gewonnen. Wie in **Abbildung 3.5 a** dargestellt, wurde durch intraperitoneale Injektion von IgG2a oder IgG2b eine Anämie erzeugt (Vergleichsgruppe). Die schützende Funktion von IgG1 wurde in C57BL/6J Wildtyp Mäusen mit IgG2a (oder IgG2b) zusammen mit der zweifachen Menge an IgG1 getestet (Testgruppe). Aufgrund der höheren Grunddosierung in FcγKO-Mäusen wurde hier IgG2a (oder IgG2b) zusammen mit IgG1 im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Die alleinige Wirkung der in der Testgruppe gewählten IgG1-Dosis wurde als Negativkontrolle mitgeführt.

Je nach Fragestellung wurden die Versuchstiere bereits einen oder drei Tage nach Antikörperinjektion mit einer Lanzette an der Vena facialis punktiert und das Blut in EDTA-Microvetten aufgefangen. Dieses wurde sofort 1:2 in 100 mM EDTA in PBS verdünnt. Nach der Blutentnahme wurden die Tiere geopfert.

An Tag 3 nach Antikörperinjektion wurde der Hämatokrit als Parameter eines kleinen Blutbildes mit Sysmex XN-9000 bestimmt.

Zum Nachweis der Komplement- und IgG-Opsonisierung an den Erythrozyten wurde in einem separaten Versuch an Tag 1 eine FACS-Analyse durchgeführt. Anhand des Blutbildes wurde das benötigte Blutvolumen für  $10^7$  Erythrozyten kalkuliert und dieses in 25 µl wie folgt gefärbt: Im ersten Schritt wurde mit biotinyliertem anti-Maus C3 für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 250 µl FACS-Puffer bei 300 xg, 5 Minuten, 4°C gewaschen. Als nächstes wurde mit Streptavidin-BV605, anti-Maus IgG2a-AF488 sowie anti-Maus IgG1-BV510 für 15 Minuten, auf Eis, im Dunklen gefärbt. Nach zweimaligen Waschen wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und mit dem LSRII Durchflusssystem analysiert.

### 2.2.6 Klonierung von murinen anti-MHCI IgG1

#### Amplifikation der V(D)J Sequenz

Aus einem mu anti-H-2 Dd/Kd (kurz H-2<sup>d</sup>; MHC Klasse I Antigen) IgG2a Antikörper des Klons 34-1-2s sollte ein mu IgG1 mit derselben variablen Domäne kloniert werden. Hierfür wurde die Firma Absolute Antibody (Oxford, Großbritannien) beauftragt, die variable Domäne der Hybridomzellen 34-1-2s (ATCC® HB-79™) zu sequenzieren und in den TOPO™ Blunt-

End Vektor zu subklonieren. Bei der Sequenzierung wurden die Antikörperspezies und -Subklasse der Hybridome bestätigt (Tabelle A.1).

Die in Tabelle 2.1 gelisteten Primer wurden entworfen, um die HB-79 VDJ ( $V_H$ ) und VJ ( $V_L$ ) entlang des Subklons in einer Hot Start PCR zu amplifizieren, um sie dann in vorhandene Expressionsvektoren einzubringen. Dazu wurde die variable Region, zu dem jeweiligen Expressionsvektor passend, um eine nicht bindende Restriktionsschnittstelle am 5' Ende und gegebenenfalls um einen Abstandshalter erweitert.

**Tabelle 2.1: Primer zur Amplifikation der HB-79 VDJ und VJ Subklone**

Restriktionsschnittstellen gelb: AgeI, grün: Sall, blau: BsiWI; nicht bindende Sequenz: fett; Anfangstriplett (im Vorwärtsprimer, fwd) und Endtriplett (im Rückwärtsprimer, rev) sind unterstrichen.

Name	Sequenz in 5'->3'
<i>HB-79 VDJ fwd</i>	<u>ATTATT</u> <u>ACCGGT</u> GTACATTCCG <u>AGGTTCAGCTGCAG</u> CAGTCTGGGGC
<i>HB-79 VDJ rev</i>	AATAAT <u>GTCGAC</u> GCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTG
<i>HB-79 VJ fwd</i>	<u>ATTATT</u> <u>ACCGGT</u> GTACATT <u>CAGACATCCAGATGACC</u> CAGTCTC
<i>HB-79 VJ rev</i>	AATAAT <u>CGTACG</u> <u>TTTTATTTCAGCTTGGTCCCC</u>

Verwendet wurde die Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) mit 1 ng Template DNA (TOPO-Subklon) in einem 25 µl Reaktionsansatz nach Herstellerangabe. Nach initialer Denaturierung bei 98°C für 30 Sekunden folgten 35 Zyklen des in Tabelle 2.2 dargestellten Protokolls, gefolgt von der finalen Elongation bei 72°C für 10 Minuten.

**Tabelle 2.2: Hot Start PCR Bedingungen**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [Sekunden]
Denaturierung	98	10
Primer-Anlagerung	52	30
Elongation	72	30

Mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese wurde die PCR überprüft und die Produkte extrahiert. Ein einprozentiges Agarosegel mit GelRed (1:10.000) wurde mit den Proben in 6x DNA-Ladepuffer und einem 100 bp Marker beladen und diese für 10 min bei 80 V, dann bei 100 V aufgetrennt. Unter UV-Licht wurden die VDJ und VJ-Banden ausgeschnitten und die DNA mit dem Kit „Nucleo Spin® Gel & PCR clean up“ nach Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert und 30 µl eluiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mit dem Nanodrop bestimmt.

## Restriktionsverdau und Ligation

Zielexpressionsvektor für die HB-79 VDJ war ein C57BL/6 anti-TNP IgG1 schwere Kette kodierender Vektor [43, 72–74]. Dieser trägt zwischen einer Leader-Sequenz und der Sequenz für die konstante Region von murinem C57BL/6 IgG1 je eine AgeI und SalI Restriktionsenzym-Schnittstelle. Zielexpressionsvektor für die HB-79 VJ war ein C57BL/6 anti-TNP kappa-Kette kodierender Vektor [43, 72–74]. Dieser trägt zwischen einer Leader-Sequenz und der Sequenz für die murine C57BL/6 kappa Kette je eine AgeI und BsiWI Restriktionsenzym-Schnittstelle. Beide Vektoren kodieren zudem für Ampicillin Resistenz und werden vom HCMV Promoter kontrolliert.

Der Restriktionsverdau erfolgte mit 1 µg des jeweiligen Expressionsvektors und 4 µg HB-79 VDJ bzw. VJ PCR-Produkt in einem 50 µl Reaktionsansatz. AgeI und SalI reagieren in CutSmart Puffer bei 37°C für 1,5 Stunden, daher wurden beide Verdauschritte gemeinsam in einem Ansatz für den schwere Kette-Expressionsvektor bzw. für die VDJ/V<sub>H</sub> durchgeführt. BsiWI reagiert in 3.1 Puffer bei 55°C für 1,5 Stunden. Das erforderte einen zusätzlichen DNA-Aufreinigungsschritt für den leichte Kette-Expressionsvektor bzw. HB-79 VJ/V<sub>L</sub> zwischen dem ersten Verdau mit BsiWI und dem zweiten mit AgeI. Nach jedem Verdauansatz wurden die Enzyme bei 65°C für 20 Minuten inaktiviert. Alle Pipettierschritte erfolgten auf Eis.

Die DNA Aufreinigung erfolgte wie nach der Amplifikation der V(D)J Sequenzen durch elektrophoretische Auftrennung der Verdauansätze in 6x DNA-Ladepuffer in einem einprozentigen mit GelRed gefärbten Agarosegel. Zur Größenorientierung wurde hier ein 1 kb Marker verwendet und die verdauten Produkte unter UV-Licht ausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem Kit „Nucleo Spin® Gel & PCR clean up“ aus dem Gel extrahiert und mit 30µl eluiert.

Die Ligation des restriktionsverdauten Inserts HB-79 VDJ bzw. HB-79 VJ in 100 ng des restriktionsverdauten schwere Kette-Expressionsvektor bzw. leichte Kette-Expressionsvektor erfolgte im molaren Verhältnis 6:1. Je Ansatz wurden 1 µl T4 DNA-Ligase und der zugehörige 10x Puffer eingesetzt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte eine Stunde lang bei Raumtemperatur.

## Transformation und Maxi-Kultur

Je 5 µl der ligierten Vektoren wurden zu 100 µl Z-Kompetenten Nova Blue E. coli gegeben und diese für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Je 50 µl wurden auf einer LB-Agarplatte (50 µg/ml Ampicillin) gleichmäßig ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Kolonien wurden gepickt und in jeweils 300 ml autoklaviertem LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin) bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach 20 Stunden wurden Glycerolstocks mit einem 3:1 Kultur zu Glycerol-Verhältnis angelegt und bei -80°C eingefroren. Dann wurden die Bakterien abzentrifugiert und die Plasmid-DNA mit dem Kit „NucleoBond Xtra Maxi Plus“ aufgereinigt.

Die finale Sequenzierung der MHCI mu Igy1 und MHCI mu kappa Plasmide erfolgte bei der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) und wurde mit den in Tabelle 2.3 aufgeführten Primern durchgeführt. Die Primer wurden so gewählt, dass sowohl der kodierende Bereich der variablen als auch der konstanten Antikörperregion größtmöglich abgedeckt waren.

**Tabelle 2.3: Primer final**

Vorwärts (fwd) und Rückwärts (rev) -Primer für die finale Sequenzierung der Plasmide MHCI murines Igy1 und MHCI murines kappa

<b>Name</b>	<b>5'- 3' Sequenz</b>
<i>MHCI mu Igy1 fwd</i>	AGTGACAGTGACCTGGA ACTCT
<i>MHCI mu Igy1 rev</i>	CTGAGCTGCTCAGAGTGTAGA
<i>MHCI mu kappa fwd</i>	ACCGGTGTACATTCAGACATCCA
<i>MHCI mu kappa rev</i>	CGTACGTTTTATTCCAGCTTGGT

### **Produktion von murinen anti-MHCI IgG1 Antikörpern mittels Transfektion**

Zur Antikörperproduktion wurde die adhärente, humane, embryonale Nierenzelllinie HEK293T/17 genutzt. Diese wurde in HEK-Wachstumsmedium bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Transfektion wurden Zellen auf 15 cm Zellkultur-Platten ausgesät und diese bei Erreichen von 80 % Konfluenz gründlich mit DPBS gewaschen. Das FCS-haltige HEK-Wachstumsmedium wurde durch 22 ml HEK-Produktionsmedium ersetzt, welches statt FCS 0,03 % Primaton enthielt [43]. Im Anschluss sollten die Zellen mit Polyethylenimin (PEI) chemisch transfiziert werden. PEI ist ein kationisches Polymer und komplexiert mit DNA, und macht diese so membrangängig.

Die Transfektionslösung wurde in DPBS angesetzt und enthielt je zu transfizierende Platte 35 µg Gesamt-DNA (17,5 µg MHCI mu Igy1 + 17,5 µg MHCI mu kappa Plasmid) und 70 µg PEI. Für eine effiziente Komplexierung wurde das Gemisch 10 Sekunden gevortext und anschließend bei Raumtemperatur für 10 Minuten ruhen gelassen. Je 3 ml Transfektionslösung wurden vorsichtig auf die Zellen pipettiert und diese dann für eine Woche inkubiert. Dann wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellen mit frischem HEK-Produktionsmedium eine weitere Woche in Kultur gehalten. Überstände wurden gesammelt sterilfiltriert und bis zur Aufreinigung mit Protein G bei 4°C gelagert.

### **Verifizierung der murinen anti-MHCI IgG1 Antikörper-Zusammensetzung mittels SDS-PAGE**

5 µg des in dieser Arbeit durch Umklonierung und Transfektion erzeugten mu anti-MHCI IgG1 sowie 5 µg mu anti-TNP IgG1 Klon H5 wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und reduziert. Die Proben wurden dann in einem Sammel- und Trenngel mit 10 % Polycarylamid in SDS Laufpuffer zunächst bei 80 V, dann bei 120 V elektrophoretisch getrennt. Als Größenmarker diente PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder,

10- 250 kDa. Die Proteine wurden mittels Coomassie Blau angefärbt und das Gel mit Coomassie-Entfärbelösung behandelt und schließlich fotografisch dokumentiert.

### **Verifizierung der murinen anti-MHCI IgG1 Antikörper Funktionalität mittels FACS**

Um zu überprüfen, ob der rekombinante mu anti-MHCI IgG1 an sein bestimmtes Antigen bindet, wurden Milzzellen von BALB/c und C57BL/6J Wildtyp Mäusen mit dem Antikörper inkubiert und diese mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen.

Hierfür wurde je Wildtypstamm ein Tier durch zervikale Dislokation getötet und die Milz entnommen. Das Organ wurde mit eiskaltem PBS gewaschen und mithilfe eines 70 µm Cell Strainer in Einzelzellsuspension gebracht. Die Zellen wurden bei 300 xg, 4°C für 5 Minuten pelletiert, im Folgenden: gewaschen, und anschließend in 5 ml Erylysepuffer resuspendiert. Nach 5 Minuten wurde mit 30 ml PBS aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und mit Hilfe einer Neubauer-Kammer gezählt.

Im Folgenden wurden von beiden Wildtypstämmen je  $10^7$  Zellen eingesetzt. Die Antikörperinkubationsschritte erfolgten in 50 µl FACS-Puffer auf Eis. Nach jeweils 20 Minuten Antikörperinkubation wurde mit 250 µl FACS-Puffer gewaschen. Im ersten Schritt wurde ein Fc-Rezeptor Block mit anti-CD16/CD32 durchgeführt, um unspezifische Signale zu reduzieren oder zur Kontrolle nur mit FACS-Puffer inkubiert. Als zweites wurden die Zellen mit 0,5 µg mu anti-MHCI IgG1 oder 0,5 µg mu anti-TNP IgG1 (Isotypkontrolle) inkubiert. Als drittes wurden alle Test- und Kontrollansätze mit einem Mastermix aus Fixable Viability Dye eFluor 780 (Live/Dead, 1:1000), anti-mu IgG1-BV421, anti-mu B220-BV768, anti-mu CD8-AF700 sowie anti-mu CD4 -BV711 im Dunklen gefärbt. Hiernach wurde zweimal gewaschen und die Zellen mit dem Attune NxT Durchflusszytometer aufgenommen.

## **2.2.7 Mausmodell immunisierungsinduzierte EBA**

Das Mausmodell beruht auf der Etablierung von Iwata *et al* [78]. C57BL/6S Tiere wurden geschlechts- und altersunabhängig mit rekombinantem murinem vWFA2 (von-Willebrand-factor-A-like domain 2) immunisiert. Hierzu wurde eine 1:1 Wasser-in-Öl Emulsion mit dem Adjuvans TiterMax Classic vorbereitet. Im Detail heißt das, TiterMax wurde für 1 Minute gevortext und die benötigte Menge mit einem Volumensicherheits-Faktor 1,7 entnommen und dann mit einer 20G Kanüle in eine 2 ml Spritze aufgezogen. Die gleiche Menge vWFA2 aus einer 2 mg/ml Stocklösung in PBS wurde bereitgestellt und in zwei Teilen mit einer 23G Kanüle in eine weitere 2 ml Spritze aufgenommen. Die Kanülen wurden fest ineinandergesteckt und zunächst die eine Hälfte der wässrigen Proteinlösung in das Adjuvans gespritzt, dann fünfmal von einer in die andere Spritze gedrückt. Der zweite Teil wurde hinzugefügt und mindestens dreißigmal durch Drücken gemischt bis eine homogene, weiße, sehr visköse Emulsion vorlag. Diese wurde möglichst luftblasenfrei in 1 ml Spritzen überführt und auf Eis kurz zwischengelagert.

Zunächst wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion von Xylazin, 15 µg/g Körpergewicht, und Ketamin, 100 µg/g Körpergewicht narkotisiert. Dann wurden in beide Hinterläufe jeweils 50-60 µl Emulsion (entspricht max. 120 µg vWFA2 pro Tier) mit einer 30G Kanüle subkutan gespritzt. Die Emulsion wirkt als Depot, das mit einer Schwellung der Füße einhergeht. Mobilität und Fressverhalten der Tiere waren davon uneingeschränkt.

Nach Immunisierung wurden die Tiere wöchentlich auf die Krankheitsmanifestation hin beobachtet. Beim Erreichen eindeutiger EBA-Symptome, i.d.R. ab Woche 6, spätestens aber nach Woche 12 wurde die betroffene Maus narkotisiert und der finale Schweregrad in Anlehnung an Bieber *et al.* als Prozent der von Läsionen, Erosionen, Verkrustung und Erythema betroffenen Haut eingestuft [79]. Schließlich wurde final Blut gewonnen und die Maus geopfert. Das Blut wurde nach Gerinnung abzentrifugiert und das Serum bei -20°C aufbewahrt. Die Durchführung erfolgte in Kooperation mit Dr. Katja Bieber (LIED, Universität zu Lübeck).

## 2.2.8 Aufreinigung von murinen polyklonalen anti-vWFA2 IgG Antikörpern

### Aufreinigung des murinen vWFA2-Antiserums mittels Protein G

Antiserum von EBA erkrankten Mäusen mit einem Schweregrad über 1,1 % wurde aufgetaut und für 5 Minuten bei 10.000 xg, 4°C abzentrifugiert. Gesammelte Proben wurden vereint und 1:10 mit PBS verdünnt. Eine 20 ml Säule wurde mit 4 ml Protein G 4 Fast Flow befüllt und mit 50 ml PBS equilibriert. Das Antiserum wurde zweimal auf die Säule gegeben und diese dann mit 100 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde mit 0,1 M Glycin pH 2,9 fraktioniert eluiert und sofort mit 0,1 M TRIS pH 9 neutralisiert. Alle verwendeten Lösungen waren eisgekühlt. IgG positive Fraktionen wurden mittels Nanodrop ermittelt, gepoolt und mit 10 kDa Zentrifugationsfiltern eingeeengt und zu PBS dialysiert. Die Aufreinigung ergab 30 mg Gesamt-IgG. Parallel wurde IgG aus dem Serum unbehandelter Wildtypmäuse nach dem gleichen Protokoll mit Protein G aufgereinigt. Dieses diente in Versuchen der passiven EBA als Negativkontrolle.

### Kopplung von vWFA2 an CNBr-aktivierte Sepharose

Für die antigenspezifische Aufreinigung des Gesamt-IgG vWFA2-immunisierter Mäuse wurde rekombinantes murines vWFA2 an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. Die Herstellung der Säule erfolgte in Anlehnung an Herstellerinstruktionen sowie Kavran und Leahy [80]. Zunächst wurden 5 mg Ligand zu Kopplungspuffer pH 8,3 mit einem 10 kDa Zentrifugationsfilter umgepuffert und die Konzentration des 2 ml Dialysats im Nanodrop (OD<sub>260/280</sub>) bestimmt. Weiterhin wurden 0,7 g Sepharose mit 1 mM HCl aufgequollen und in eine 10 ml Säule überführt. Überschüssige Flüssigkeit wurde aus der geöffneten Säule in ein 50 ml Gefäß abzentrifugiert (3 Minuten, 300 xg). Ein ca. 2,5 ml großes Bettvolumen war entstanden. Die Kopplungslösung wurde auf die nun verschlossene Säule gegeben, für 12 Stunden bei 4°C inkubiert und dabei mehrfach vorsichtig durchmischt. Hiernach wurde die Kopplungslösung in ein 50 ml Gefäß

zentrifugiert und die Kopplungseffizienz mit Nanodrop ( $OD_{260/280}$ ) unter Bezug zur Ausgangslösung ermittelt. Die Säule wurde mit 15 ml Kopplungspuffer gewaschen, abzentrifugiert und der Schritt mit 15 ml Quenching Puffer wiederholt. Dann wurde die Säule mit 15 ml Quenching-Puffer beladen und für 2,5 Stunden auf einem Rotator bei Raumtemperatur inkubiert, um verbliebene reaktive Gruppen abzusättigen. Nach dem Abzentrifugieren der Lösung folgten vier Zyklen der folgenden Waschschriffe: Resuspendieren der Sepharose mit 15 ml Waschpuffer pH 8, abzentrifugieren (3 Minuten, 300 xg), dann resuspendieren mit 15 ml Waschpuffer pH 4 und abzentrifugieren. Hiernach wurde die Säule mit 15 ml 20 % Ethanol in PBS gewaschen, abzentrifugiert und zur Lagerung bei 4°C erneut befüllt. Alle verwendeten Lösungen waren eisgekühlt.

### **vWFA2-spezifische IgG Aufreinigung**

Die vWFA2-spezifische Säule wurde mit PBS equilibriert. 13,2 mg Protein G aufgereinigtes Gesamt-IgG vWFA2 immunisierter Mäuse wurden in 100 ml PBS verdünnt und auf die Säule gegeben. Der Durchfluss wurde aufgefangen und weitere zweimal auf die Säule geladen und im Anschluss mit 50 ml PBS gewaschen. Dann wurde mit 0,1 M Glycin pH 2,9 fraktioniert eluiert und sofort mit 0,1 M TRIS pH 9 neutralisiert. Alle verwendeten Lösungen waren eisgekühlt. IgG positive Fraktionen wurden mittels Nanodrop ermittelt, vereint und mit einem 10 kDa Zentrifugationsfilter eingeeengt und zu PBS dialysiert. Die Aufreinigung ergab 1,4 mg polyklonales vWFA2-spezifisches IgG. Spezifität und Effizienz der Säule wurden mit ELISA geprüft.

### **2.2.9 *In vitro* Glykosylierung**

IgG Antikörper wurden mit 10 kDa Zentrifugationsfiltern zu 100 mM MES-Puffer dialysiert und aufkonzentriert. Dann wurde in zwei Enzymreaktionen zuerst galactosyliert, dann sialyliert. Im Detail heißt das, in die vorbereitete Antikörper-Lösung wurde im Massenverhältnis zu IgG das Substrat UDP-Gal 1:1,2 sowie humane  $\beta$ 1,4-Galactosyltransferase 100:1 pipettiert. Nach Hinzufügen von  $MnCl_2$  zu einer 20 mM Endverdünnung wurde die Reaktion bei 37°C und 300 rpm gestartet. Nach 24 Stunden wurde im Massenverhältnis zu IgG das Substrat CMP-Sial 1:2 sowie humane  $\alpha$ 2,6-Sialyltransferase 1:20 zum Reaktionsansatz pipettiert und weitere 8 Stunden bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Die finale IgG Konzentration im Reaktionsansatz betrug mindestens 5 mg/ml.

Zum Beenden der Reaktion wurde der Reaktionsansatz zunächst zu reinem 100 mM MES und schließlich zu PBS dialysiert.

## 2.2.10 Glykoanalyse

Aufgereinigte IgG Antikörper wurden über Nacht bei 37°C mit EndoS verdaut, um spezifisch die N-Glykane durch Hydrolyse freizusetzen. Die Glykane wurden von Yannic Bartsch mit Aminobenzamid markiert und mittels (HILIC-) HPLC auf einer Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fischer, Waltham, MA, USA) analysiert.

## 2.2.11 Mausmodell passive EBA

In den Ohransatz von C57BL/6J Wildtyp Mäusen wurden polyklonale EBA Maus IgG Antikörper injiziert, welche entweder nativ glykosyliert oder *in vitro* (*ex vivo*) sialyliert waren. Zuvor wurden die Tiere narkotisiert (i.p. Xylazin 15 µg/g Körpergewicht und Ketamin 100 µg/g Körpergewicht) und die Ohrdicke an drei Stellen mit einem Dickenschnellmessgerät (Genauigkeit 10 µm) vermessen. Dann wurden je Ohr 50 µl Antikörper in PBS subkutan mittig in die Ohraußenseite injiziert.

Der Versuch wurde sowohl mit EBA Gesamt-IgG als auch mit vWFA2-spezifischem IgG durchgeführt. Als Negativkontrolle diente dieselbe Menge von Protein G-aufgereinigtem Serum-IgG unbehandelter C57BL/6J Wildtypmäuse.

Nach einer Beobachtungszeit von 48 Stunden wurden die Tiere erneut narkotisiert und die Ohrdicke an drei Stellen gemessen. Jedes Ohr wurde fotografiert und ein Schweregrad kalkuliert, der sich aus der Summe der jeweils prozentual betroffenen Hautfläche  $A$  im äußeren und sichtbaren Bereich des inneren Ohrs ergibt (Formel (2.3); **Abbildung 3.11 c**).

$$\text{Schweregrad} = (0,4 * A_{\text{innen tief}}) + (0,2 * A_{\text{innen}}) + (0,4 * A_{\text{außen}}) \quad (2.3)$$

Nachdem die Tiere durch zervikale Dislokation getötet waren, wurden die Ohren abgeschnitten, Haare weggeschnitten und jeweils in 1,5 ml Gefäßen in Stickstoff schockgefroren. Biopsien wurden bei -80°C zwischengelagert.

## 2.2.12 Myeloperoxidase Aktivitäts-Nachweis von Ohrbiopsien

Mit dem Test werden reaktive Sauerstoffspezies nachgewiesen, welche von dem Neutrophilen-Enzym Myeloperoxidase produziert werden. Es wird als Entzündungsmarker für die Ohrbiopsie des passiv lokalen EBA Modells herangezogen. Hierfür wurden schockgefrorene Ohrbiopsien mit einem Skalpell zerkleinert. Die Gewebestücke wurden zuerst in Extraktionspuffer, dann durch Zugabe von 0,5 % HTAB dispergiert (Endvolumen 1 ml). Anschließend wurde mit drei Einfrier-/Auftau-Zyklen bei -80°C für 5 Minuten ein Zellaufschluss bewirkt. Zuletzt wurden verbliebene feste Bestandteile durch Zentrifugation bei 18.000 xg für 15 Minuten, 4°C vom Lysat abgetrennt. Der Überstand wurde bei -80°C eingefroren oder auf Eis direkt weiterverwendet. Eine Verdünnungsreihe wurde in Kaliumphosphatpuffer angefertigt und in einer

Mikrotiterplatte 50  $\mu$ l Probe mit 50  $\mu$ l TMB bis zu 30 Minuten dunkel inkubiert. Schließlich wurde die Reaktion mit 50  $\mu$ l 0,5 M Schwefelsäure gestoppt und bei 450 nm im Platten-Photometer gemessen.

Die resultierenden OD-Werte wurden auf den Gesamtproteingehalt (BCA-Test) normalisiert.

### **2.2.13 BCA-Test von Ohrbiopsien**

Der Test dient zur Bestimmung des Proteingehalts jeder Ohrenbiopsie des passiv lokalen EBA Modells und wird mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit durchgeführt. Ausgangsmaterial waren die für den MPO-Test präparierten Zelllysate. Diese wurden in Kaliumphosphatpuffer 1:5 verdünnt und im selben Puffer wurde eine BSA-Standard Verdünnungsreihe nach Kit-Instruktion angefertigt. Je 25  $\mu$ l Probe wurde in eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit 200  $\mu$ l BCA-Reaktionslösung versetzt, gemixt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Proteinachweis beruht auf der Biuret-Reaktion und wird durch Bicinchoninsäure (BCA) verstärkt. Die entstandene farbige Lösung wurde bei 562 nm im Platten-Photometer gemessen und die Proteinmenge der Proben über die geplottete Standardkurve errechnet.

### **2.2.14 Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von GraphPad PRISM. Kleine Gruppengrößen wurden als normalverteilt angenommen. Der Vergleich von zwei Gruppen erfolgte mittels t-Test oder, bei signifikant verschiedener Varianz mittels Welch-Test und 95 % Konfidenzintervall. Für 3.4.1 wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt.

$P < 0,05$  wurde als Signifikanzanzeige erachtet (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  und \*\*\* $P < 0,001$ ).

## 3 ERGEBNISSE

---

Die mu IgG1 Subklasse, ähnlich dem hu IgG4, und die terminale IgG Fc-N Sialylierung werden unabhängig voneinander mit verringerter Entzündung und Pathologie assoziiert [25, 31]. In dieser Arbeit sollte das inhibitorische Potential von mu IgG1 Subklasse Antikörpern und sialylierten IgG Autoantikörpern in Komplement- und Fc $\gamma$ R-vermittelter Autoimmunität untersucht werden. Dabei sollte zunächst modellhaft die blockierende Wirkung von nicht-C1q-bindendem mu IgG1 auf die klassische Komplementaktivierung durch andere murine Subklassen *in vitro* analysiert werden (3.1). Weiter sollte untersucht werden, ob mu IgG1 komplementabhängige Krankheitsmodelle in der Maus inhibieren kann (3.2). Zusätzlich zur IgG1 Subklasse sollte auch die schützende Wirkung von sialylierten mu IgG Autoantikörpern in der Effektorphase bullöser Autoimmundermatosen getestet werden (3.4).

### 3.1 Inhibitorisches Potential von antigenspezifischen murinen IgG1 Antikörpern in der klassischen Komplementaktivierung *in vitro*

---

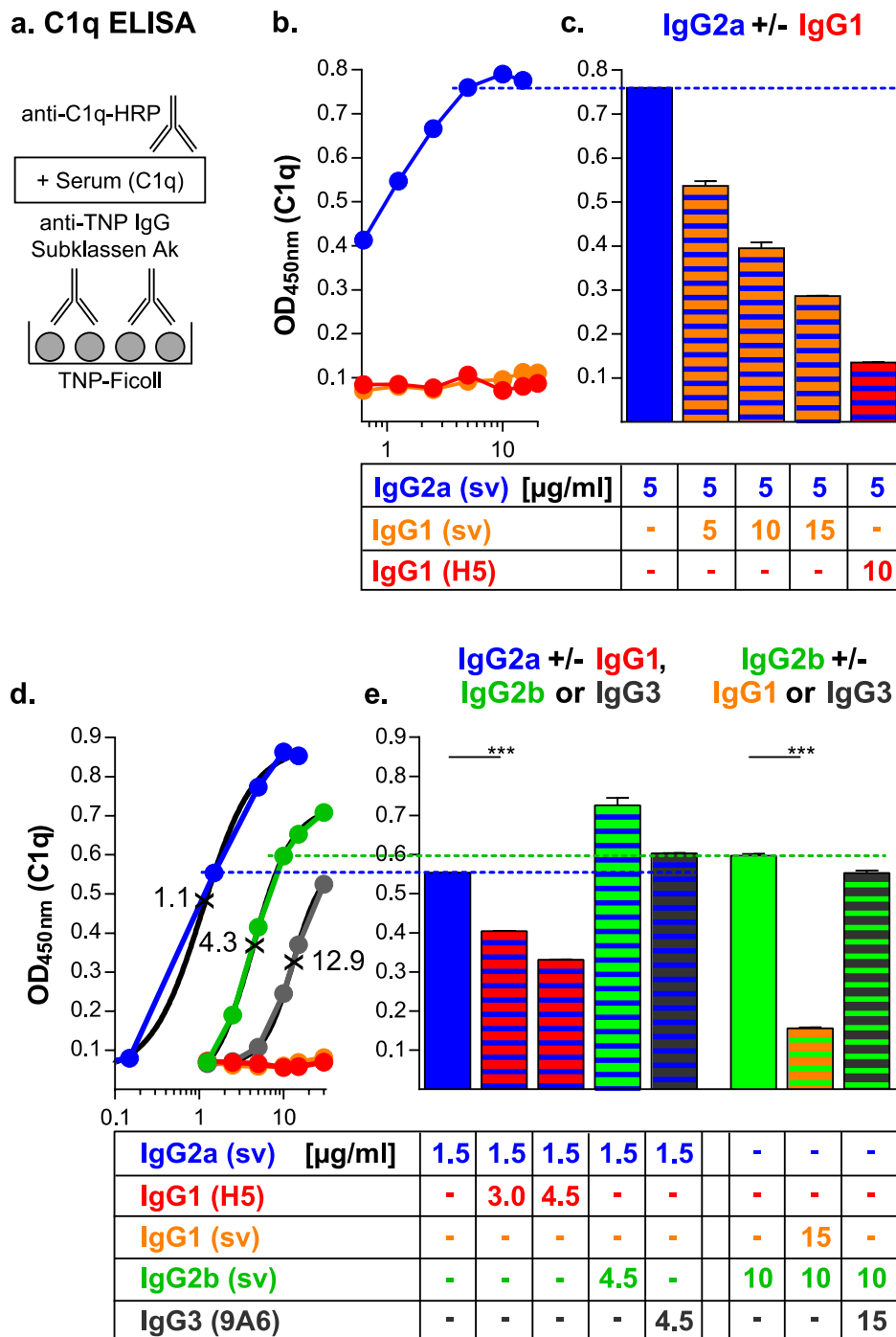
#### 3.1.1 Murines IgG1 hemmt die Komplexbildung von IgG2a, IgG2b, and IgG3 mit C1q *in vitro*

Unter den mu IgG-Subklassen sind IgG2a und IgG2b, gefolgt von IgG3 starke C1q-Binder und somit Aktivator des klassischen Komplementweges. Stattdessen findet zwischen IgG1 und C1q keine ausreichende Interaktion statt, um die klassische Komplement-Kaskade zu aktivieren. Basierend auf den jüngsten Publikationen, dass eine Hexamerbildung C1q-bindender IgG-Subklassen die C1q-Bindung fördert, war die Hypothese, dass hu IgG4 oder mu IgG1 eine solche Hexamerbildung und die folgende C1q-Bindung durch eine Antigen-abhängige sterische Interferenz inhibieren könnte. Entsprechend sollte *in vitro* untersucht werden, ob mu IgG1 die C1q-Bindung und somit Komplementaktivierung durch IgG2a, IgG2b und IgG3 Subklassen Antikörpern inhibieren kann.

Vielfältige Möglichkeiten bot hier das 2,4,6-Trinitrophenyl (TNP) -System, ein Hapten, welches über eine reaktive Gruppe an variable Trägermoleküle wie Polymere oder Proteine gekoppelt werden kann, so dass diese dann von TNP-spezifischen Antikörpern erkannt werden. Zur Verfügung standen die murinen monoklonalen anti-TNP IgG1 (Klon H5) [43, 54, 81] sowie IgG1, IgG2a und IgG2b *switch-variant* (sv, Klassenwechsel-Varianten) [54, 70, 82] Antikörper-produzierenden Hybridom-Zelllinien. Durch Kultivierung der Hybridomzellen und Aufreinigung des Kulturüberstandes mittels Protein G wurden die entsprechenden Antikörper teils eigenständig im Labor Ehlers, teils von der Firma InVivo (Henningsdorf, Deutschland)

produziert und zur Verfügung gestellt. Für die Versuchszwecke wurde weiterhin ein aufgereinigter muriner monoklonaler anti-TNP IgG3 Subklasse Antikörper (Klon 9A6) von Prof. Dr. F. Finkelman (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, OH, USA) bereitgestellt [70, 83]. Die verfügbaren monoklonalen anti-TNP IgG-Subklassen Antikörper zeichnen sich durch eine hohe Affinität zu TNP aus, wobei die anti-TNP IgG sv aufgrund ihrer identischen VDJ Sequenz dieselbe Affinität besitzen. Allerdings weist der IgG1 (Klon H5) eine etwas höhere Affinität auf als die anti-TNP IgG sv; dies wurde in Epp *et al.* gezeigt [54].

Um zu untersuchen, ob mu IgG1 die antigenabhängige C1q-Bindung durch IgG2a, IgG2b und IgG3 blockieren kann, wurde mit einem ELISA System gearbeitet. 96 Wellplatten wurden mit einer gesättigten TNP-Ficoll Menge beschichtet und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen einzelner anti-TNP IgG-Subklasse Antikörpern inkubiert. Hiernach wurden die immobilisierten Antikörper mit humanem Serum als C1q-Quelle inkubiert, welches in einem Calcium-haltigen Puffer (HBSS<sup>+/+</sup>) mit 0,1 % Tween20 verdünnt war. Calcium ist relevant für die vollständige Ausbildung des C1-Komplexes (siehe 1.1.3). Antikörpergebundenes C1q wurde mit HRP-konjugierten, polyklonalen Schaf anti-human C1q IgG Antikörpern und TMB Substrat als OD<sub>450nm</sub> detektiert (**Abbildung 3.1 a**). Die C1q ELISA-Werte wurden gegen die anti-TNP IgG-Subklassen Dosis aufgetragen. Hieraus resultierten Subklassen-spezifische C1q-Bindungskurven (**Abbildung 3.1 b, d**), die zeigten, dass C1q bevorzugt an anti-TNP IgG2a (sv), aber auch IgG2b (sv) und IgG3 (9A6) band.



**Abbildung 3.1: Murines IgG1 inhibiert die C1q-Bindung an IgG2a, IgG2b und IgG3 *in vitro***

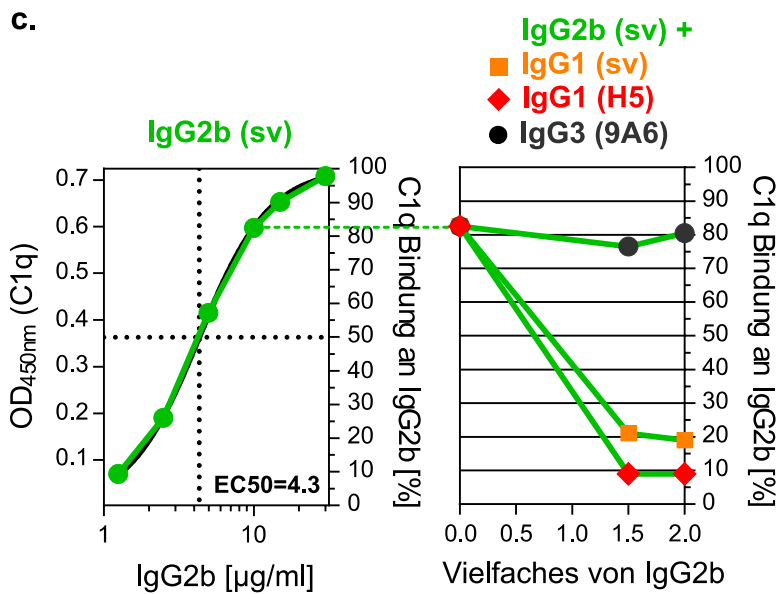
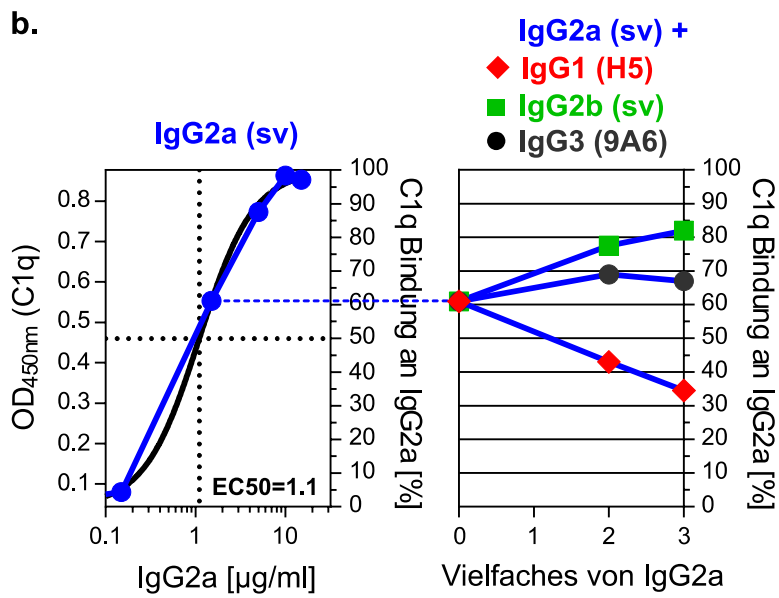
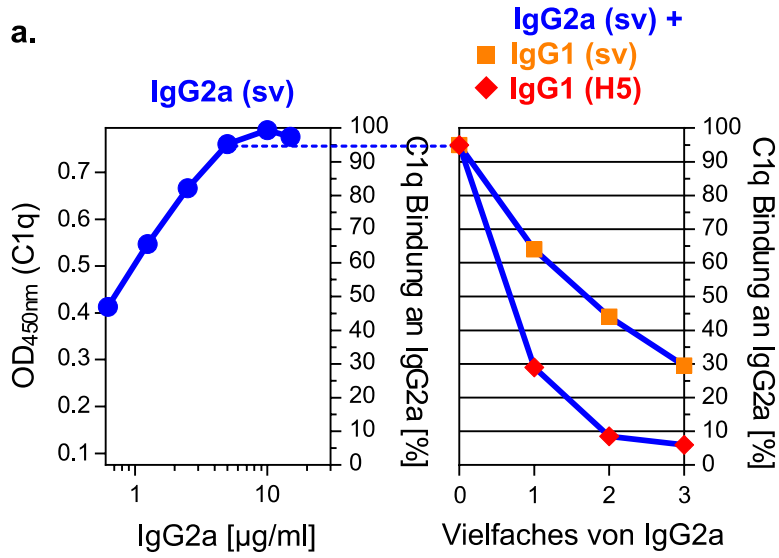
**a.** Schematische Beschreibung des in **(b-e)** sowie Abbildung 3.2 angewendeten C1q ELISA. TNP-Ficoll beschichtete 96 Well Mikrotiterplatten wurden mit verschiedenen Konzentrationen eines oder zwei anti-TNP monoklonalen Maus Subklassen Antikörpern inkubiert; IgG1 (Klon H5; rot), IgG3 (Klon 9A6; grau) sowie die IgG1 (orange), IgG2a (blau) und IgG2b (grün) *switch-variant* (sv; mit identischen VDJ Sequenzen) Antikörper. Auf die immobilisierten Antikörper wurde C1q-enthaltendes, humanes Serum pipettiert, welches mit HRP-konjugiertem anti-C1q Antikörper und TMB-Substrat detektiert wurde. **b.,d.** Mittelwerte der als OD gemessenen C1q-Bindekurven einzelner anti-TNP IgG-Subklassen Antikörper bei entsprechender Dosis (µg/ml). Die IgG-subklassenspezifische mittlere Effektivdosis (EC50; x) wurde durch Interpolation der C1q-Bindekurve kalkuliert ( $R^2 > 0,99$ ). **c., e.** Mittelwerte  $\pm$  SEM der resultierenden C1q ELISA-Werte der entsprechenden anti-TNP IgG-Subklassen Antikörper (-kombinationen) (**c.** 5 µg/ml IgG2a: n=1, Kombinationen: n=2; **e.** n $\geq$ 2); einer von mindestens zwei unabhängigen Versuchen; Abbildung teilweise modifiziert aus Lilienthal, G-M *et al.*, Front. Immunol. 2018 [1].

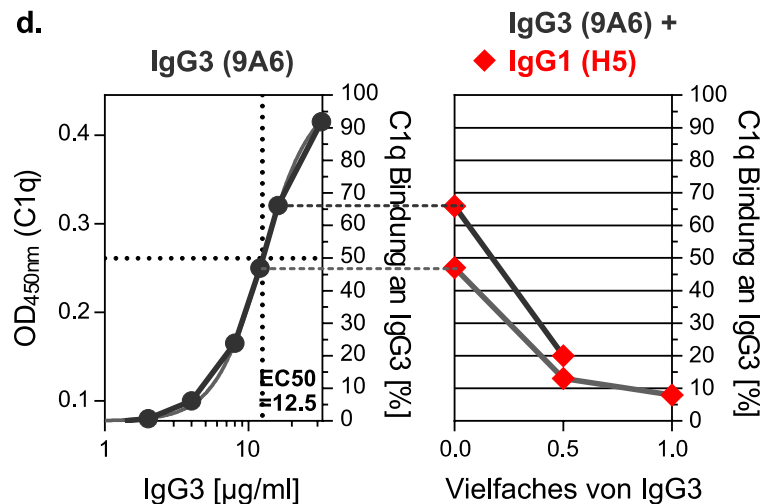
Um die IgG-subklassenspezifische C1q-Bindungskapazität zu quantifizieren wurden die C1q-Bindekurven interpoliert und die mittlere Effektivdosis (EC50) kalkuliert. Sie ergaben 1,1 µg/ml für IgG2a (sv), 4,3 µg/ml für IgG2b (sv) und 12,5-12,9 µg/ml für IgG3 (9A6), wobei der EC50 Wert für IgG3 aufgrund der VDJ Differenzen nicht direkt mit den Werten der IgG2a und IgG2b sv Antikörper vergleichbar war. Wie erwartet, fand keine nachweisbare Interaktion von C1q mit den monoklonalen IgG1 Antikörpern (H5 und sv) statt (**Abbildung 3.1 b, d**). Im Folgenden wurde die inhibierende Wirkung des mu IgG1, bzw. anderen Subklassen zur Kontrolle, auf die C1q-Bindung durch IgG2a, IgG2b und IgG3 untersucht.

In der Anwendung einer Kombination von zwei anti-TNP IgG-Subklassen Antikörpern, inhibierten beide IgG1 Klone (H5 und sv) konzentrationsabhängig die C1q-Bindung an IgG2a, IgG2b und IgG3 (**Abbildung 3.1 c, e; Abbildung 3.2**). IgG1 Klon H5 erwies sich als stärkerer Inhibitor, was sehr wahrscheinlich auf die höhere TNP-Affinität zurückzuführen war. Aufgrund der begrenzten Immobilisierungsfläche in einem Reaktionswell und der damit verbundenen Konkurrenz um TNP-Bindungsstellen wurde die Inhibition sowohl bei hohen als auch mittleren Konzentrationen C1q-bindender IgG-Subklassen Antikörper getestet. Bei einer fast gesättigten C1q-Bindungsdosis von IgG2a (5 µg/ml) wurde eine 2- oder 10-fache Inhibition bei zweifacher Menge IgG1 sv bzw. IgG1 Klon H5 beobachtet (**Abbildung 3.1 b, c; Abbildung 3.2 a**). Bei einer IgG2a Konzentration (1,5 µg/ml) nahe dessen EC50 war die Inhibition durch eine zweifache IgG1 Klon H5 Menge 1,4-fach (**Abbildung 3.1 d, f; Abbildung 3.2 b**). Bei einer fast gesättigten C1q-Bindungsdosis von IgG2b (10 µg/ml) genügte die eineinhalbfache Menge an IgG1 sv oder Klon H5, um die C1q-Bindung um das 4- bzw. 9-fache zu hemmen (**Abbildung 3.1 d; Abbildung 3.2 c**). Die C1q-Bindung an IgG3 Dosierungen (12 oder 16 µg/ml) nahe dessen EC50 wurde allein durch Zugabe der halben Mengen IgG1 Klon H5 um das 3- bis 4-fache inhibiert (**Abbildung 3.2 d**).

Zusammengefasst galt, je schwächer das C1q-Bindungspotential einer IgG-Subklasse, desto effizienter war die Inhibition durch die IgG1-Subklassen Antikörper, und je höher die Konzentration an IgG2a, IgG2b, oder IgG3, umso stärker war die dosisabhängige C1q-Bindungsinhibition. Hierin zeigte IgG1 Klon H5 eine stärkere Inhibition als IgG1 sv, was sehr wahrscheinlich an dessen höherer TNP-Affinität lag.

Im Gegensatz dazu steigerte IgG2b in Kombination mit IgG2a die C1q-Bindung im Vergleich zu IgG2a allein. Eine Kombination aus IgG2a oder IgG2b mit IgG3 bewirkte keine Inhibition der C1q-Bindung gegenüber IgG2a oder IgG2b allein (**Abbildung 3.1 e; Abbildung 3.2 b, c**). Somit inhibierte ausschließlich mu IgG1 die Bindung von C1q an mu IgG2a, IgG2b und IgG3.





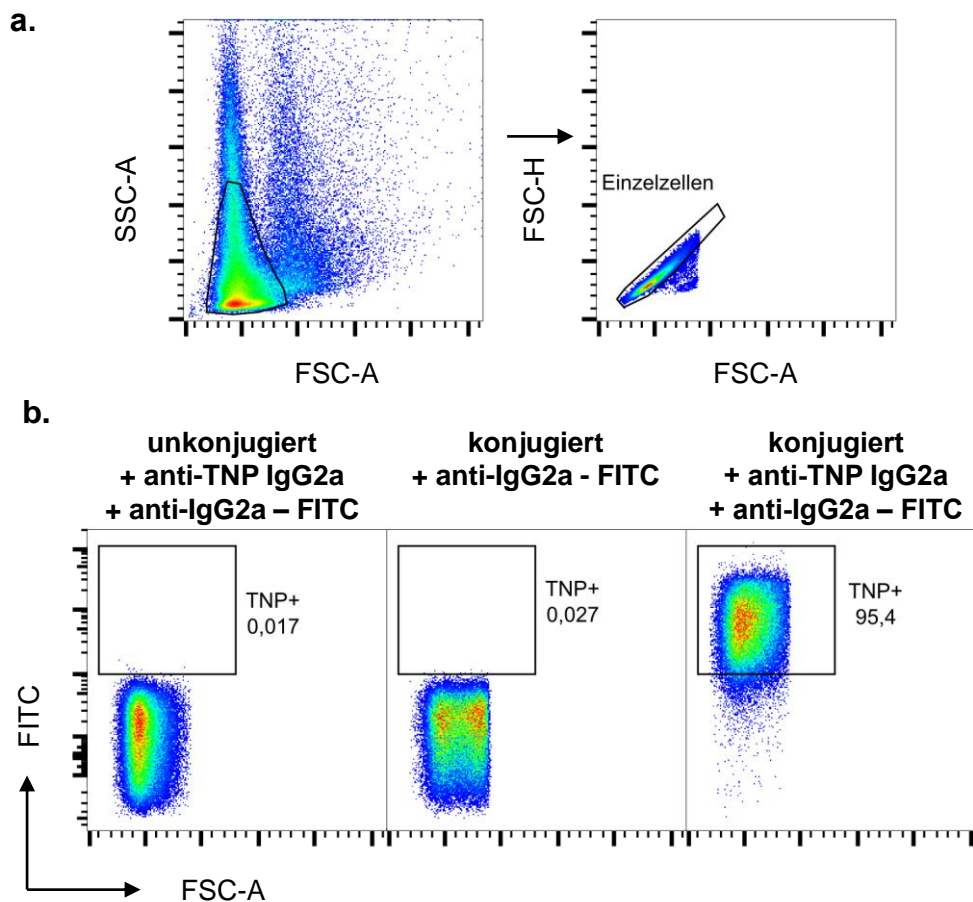
**Abbildung 3.2: Inhibition der C1q-Bindung an IgG2a, IgG2b und IgG3 durch IgG1.**

(a-d) C1q ELISA Experimente wie beschrieben und partiell in Abbildung 3.1 (c, e) gezeigt mit TNP-Ficoll beschichteten 96 Well Platten, die mit verschiedenen Konzentrationen von ein oder zwei monoklonalen anti-TNP IgG-Subklassen IgG1 (Klon H5; rot), IgG3 (Klon 9A6; grau) sowie IgG1 (orange), IgG2a (blau), und IgG2b (grün) *switch-variant* (sv; mit identischen VDJ Sequenzen) Antikörpern inkubiert wurden. Nach Zugabe von C1q enthaltendem humanem Serum und anschließendem HRP-konjugiertem anti-C1q und TMB-Substrat wurde die OD bei 450nm bestimmt. Die jeweils linke Abbildung zeigt die OD der C1q-Bindekurven von IgG2a (blau), IgG2b (grün), oder IgG3 (grau) allein (linke y-Achse, Mittelwert von  $n=2$ ) und deren interpolierte Kurven mit Prozentanteil (rechte y-Achse) ihrer maximalen C1q-Bindung (schwarz;  $R^2$  der Interpolation war  $> 0,99$ ; Maximum bzw. Minimum der Kurven wurden auf 100 % bzw. 0 % gesetzt). Die IgG-Subklassen spezifische mittlere Effektivdosis (EC50 in  $\mu\text{g/ml}$ ) wurde mittels interpolierter C1q-Bindekurve kalkuliert. Zu den indizierten Mengen (gestrichelte Linie) einzelner IgG-Subklassen (a.  $5\mu\text{g/ml}$  IgG2a; b.  $1,5\mu\text{g/ml}$  IgG2a; c.  $10\mu\text{g/ml}$  IgG2b; d. 12 oder  $16\mu\text{g/ml}$  IgG3) wurde die indizierte x-fache Menge einer zweiten indizierten anti-TNP IgG-Subklasse hinzugefügt. Die resultierenden OD Mittelwerte und errechnete Prozentanteile sind in der jeweils rechten Abbildung dargestellt; Abbildung teilweise modifiziert aus Lilienthal, G-M *et al.*, Front. Immunol. 2018 [1].

### 3.1.2 Murines IgG1 hemmt die C1q-medierte, funktionelle Komplektaktivierung durch IgG2a *in vitro*

Als nächstes wurde *in vitro* untersucht, ob mu IgG1 auch die C1q-medierte, funktionelle Komplektaktivierung inhibieren kann. Übliche Komplektaktivitätsnachweise beruhen auf der CDC, bei der durch funktionelle Aktivierung der Komplektkaskade final der MAC ausgebildet und die Zielzelle lysiert wird. Das in dieser Arbeit genutzte CDC-Verfahren war ein Hämolyse Assay und beruhte auf der durch Antikörper- und Komplekt- vermittelten Lyse von Erythrozyten und der dadurch induzierten Freisetzung von photometrisch detektierbarem Hämoglobin.

Aufgereinigte humane Erythrozyten wurden mit 2,4,6-Trinitrobenzoesäure (TNBS) -Lösung inkubiert und so für monoklonale anti-TNP Antikörper spezifisch gemacht. Molekular unterscheidet sich TNBS von TNP lediglich durch eine Sulfonsäure-Gruppe am Phenolring, über die es mit primären Aminen reagieren und so an Oberflächenmembranproteine konjugieren kann. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Kopplungseffizienz und die erfolgreiche Erkennung durch anti-TNP IgG Antikörper bestätigt (Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3: Nachweis der TNP-Kopplung an Erythrozyten für den Hämolyse Assay**

Dichtegradienten isolierte Erythrozyten wurden zur TNP-Kopplung mit 2,4,6-Trinitrobenzoesäure (TNBS) behandelt, welche an Membranoberflächenproteine konjugiert. Die Kopplung wurde anschließend mit anti-TNP IgG2a und FITC-markierten anti-Maus IgG2a Antikörpern im Durchflusszytometer verifiziert. FITC Signale ausgewählter Einzelzell-Erythrozyten (**a**) wurden durchflusszytometrisch aufgenommen und als Prozent TNP-positiver Erythrozyten dargestellt (**b**) (v.l.n.r. nicht TNBS-behandelte, mit Primär- und Sekundärantikörper gefärbte Zellen; TNBS-behandelte Zellen mit Sekundärantikörper; TNBS-behandelte Zellen mit Primär- und Sekundärantikörper gefärbte Zellen); Abbildung teilweise modifiziert aus Lilienthal, G-M *et al.*, Front. Immunol. 2018 [1].

Der Hämolyse Assay wurde in Anlehnung an Whaley und North [75] etabliert. Als Komplementquelle diente normales humanes Serum, welches neben C1q alle weiteren Komplementkomponenten enthielt, um eine Lyse der Erythrozyten und Hämoglobinfreisetzung herbeizuführen. Darüber hinaus lief der Hämolyse Assay in einem Calcium- und Magnesium-haltigem Natrium-Veronal Puffer, kurz GVB<sup>+/+</sup> ab. Calcium wird für die funktionelle C1-Aktivierung benötigt und Magnesium für die Ausbildung der C3 Konvertasen (1.1.3). Nicht vorhandenes oder durch EGTA cheliertes Calcium erlaubte in diesem Assay keine messbare durch anti-TNP Antikörper- und Serum-Komplement-vermittelte Hämolyse (Daten nicht gezeigt). Demnach basierte der Assay auf der klassischen Komplementaktivierung und eignete sich, um eine nach 3.1.1 gefundene Inhibition mit mu IgG1 zu untersuchen.

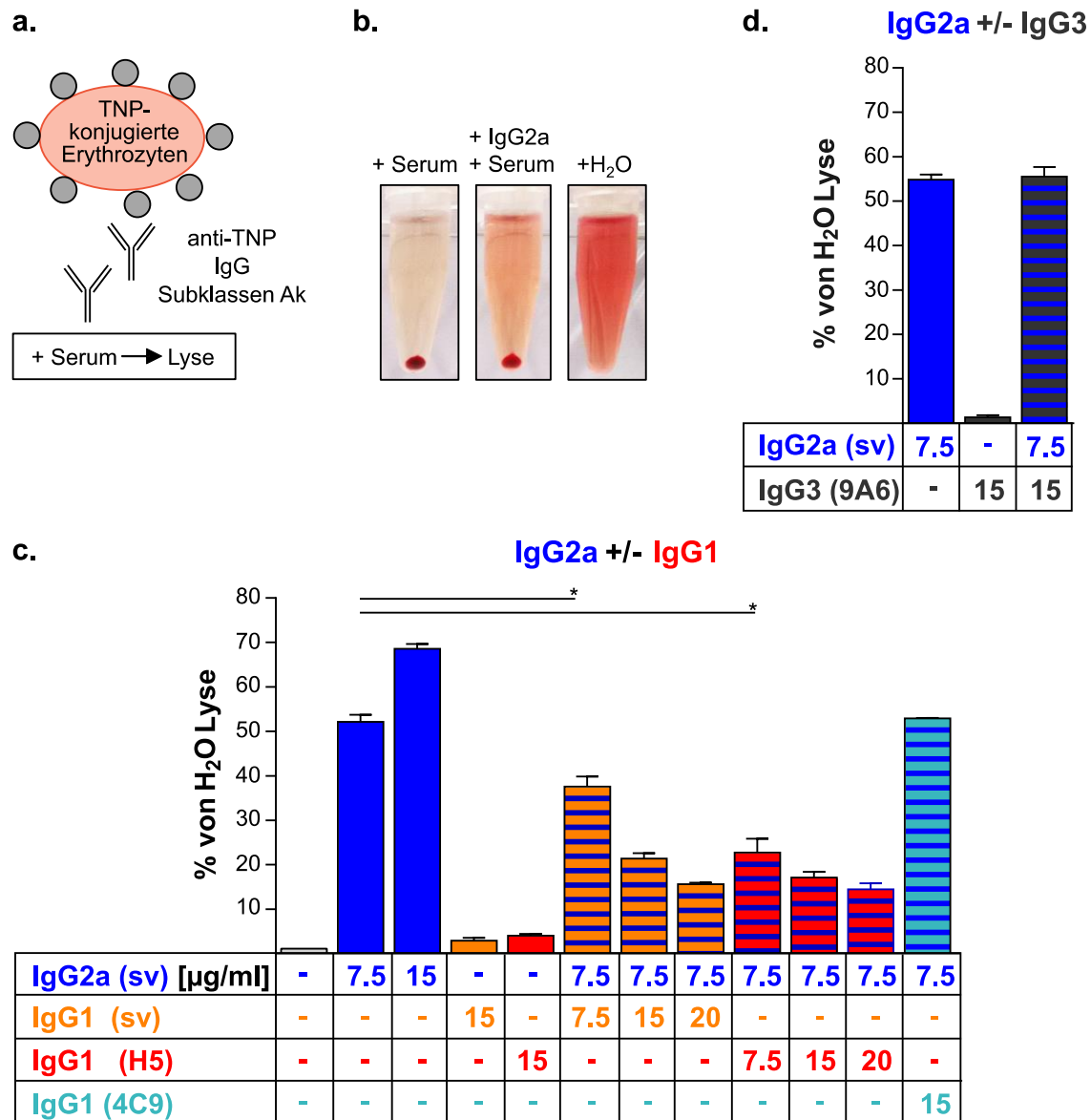
Hierzu wurde eine definierte Zellsuspension in GVB<sup>-/-</sup> angelegt und mit einem mu anti-TNP IgG-Subklassen Antikörper oder einer Kombination aus zwei anti-TNP IgG-Subklassen inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden entfernt und die nun sensibilisierten Zellen mit humanem Serum in GVB<sup>+/+</sup> inkubiert (**Abbildung 3.4 a**). Zur Quantifizierung der Erythrozytenlyse wurden die Reaktionsansätze abzentrifugiert und die Absorption von Hämoglobin im Überstand bei 414 nm photometrisch detektiert. Die Komplement-medierte Erythrozytenlyse wurde als Prozent einer Volllyse mit H<sub>2</sub>O (100 %; Positivkontrolle) kalkuliert (**Abbildung 3.4 b-d**).

In dieser Anwendung induzierte IgG2a allein eine dosisabhängige C1q-medierte Erythrozytenlyse im Bereich zwischen 2,5 und 22,5 µg/ml; die Lyse erreichte bis zu 70 % der H<sub>2</sub>O-Positivkontrolllyse (**Abbildung 3.4 c, d** und Daten nicht gezeigt). IgG2b induzierte nur eine schwache Lyse im Bereich zwischen 7,5 – 22,5 µg/ml und erreichte nicht mehr als 8 % der H<sub>2</sub>O-Positivkontrolllyse (Daten nicht gezeigt). Mu IgG1 und auch IgG3 bewirkten keine eindeutige Lyse (1–4 % der H<sub>2</sub>O-Positivkontrolllyse), die sich von der Negativkontrolle (kein IgG) abgrenzen ließ (**Abbildung 3.4 c, d**). Weil eine signifikante Erythrozytenlyse mit IgG2b und IgG3 ausblieb, wurde im Folgenden ausschließlich der Einfluss von IgG1 auf die IgG2a-medierte Erythrozytenlyse getestet.

Beide anti-TNP IgG1 Klone inhibierten die IgG2a-induzierte Erythrozytenlyse. Ein IgG1:IgG2a Verhältnis von 2:1 ermöglichte eine 2,4- oder 3-fache Inhibition der IgG2a-medierten Lyse mit IgG1 sv bzw. IgG1 Klon H5. Im Gegensatz hierzu steigerte die Zugabe von IgG2b die IgG2a-medierte Lyse, während IgG3 keinen Effekt zeigte (**Abbildung 3.4 d** und Daten nicht gezeigt). Ein anti-Ovalbumin mu IgG1 (Klon 4C9), unspezifisch für das TNP-Antigen, zeigte selbst bei doppelter anti-Ovalbumin IgG1 Menge keine Inhibition der anti-TNP IgG2a-medierten Erythrozyten-Lyse (**Abbildung 3.4 c**).

Zusammenfassend konnte ausschließlich antigenspezifisches mu IgG1 eine IgG2a- und C1q-induzierte, funktionelle Komplementaktivierung im Hämolyse Assay inhibieren.

Die Daten in 3.1.1 und 3.1.2 wurden in der Peer-Review Fachzeitschrift *Frontiers Immunology* publiziert [1].



**Abbildung 3.4: IgG1 inhibiert die IgG2a vermittelte funktionelle Komplementaktivierung *in vitro* antigenspezifisch**

**a.** Schematische Beschreibung des in **(b-d)** angewendeten *in vitro* Hämolyse Assays. Eine definierte Zahl TNP-gekoppelter Erythrozyten (Abbildung 3.2) wurde mit einem oder einer Kombination aus zwei verschiedenen murinen monoklonalen anti-TNP IgG-Subklassen IgG1 (Klon H5 rot) oder IgG3 (Klon 9A6 grau) sowie IgG1 (orange) und IgG2a (blau) *switch-variant* (sv; mit identischen VDJ Sequenzen) oder anti-Ovalbumin IgG1 (Klon 4C9 türkis) Antikörper inkubiert. Um die Lyse herbeizuführen wurden sensibilisierte Zellen mit Serum als Komplementquelle inkubiert. **b.** Beispielhafte Anwendung zentrifugierter TNP-gekoppelter Erythrozyten nach Reaktion mit Serum allein, anti-TNP IgG2a plus Serum oder H<sub>2</sub>O als Positivkontrolle (100 % Lyse). **c., d.** Mittelwerte ± SEM der resultierenden Erythrozytenlyse, gemessen als OD von Hämoglobin bei 414 nm im Überstand zentrifugierter Zellen, kalkuliert als Prozent der maximal möglichen Lyse induziert durch H<sub>2</sub>O (100 %) bei angezeigter µg/ml einzeln oder paarweise angewendeter IgG-Subklassen Antikörper (n=2). Die Ergebnisse eines von mindestens zwei unabhängigen Versuchen sind aufgeführt; Abbildung teilweise modifiziert aus Lilienthal, G-M *et al.*, Front. Immunol. 2018 [1].

### 3.3 Inhibitorisches Potential von antigenspezifischen murinen IgG1 Antikörpern in der Komplementaktivierung *in vivo*

---

#### 3.3.1 Translationsstudie zur inhibitorischen Wirkung des murinen IgG1 im Mausmodell der autoimmunhämolytischen Anämie

Um das inhibitorische Potential des mu IgG1 auf Komplement-mediierte Immunantworten *in vivo* zu untersuchen, wurde ein beschriebenes Mausmodell zur hämolytischen Anämie gewählt. Patienten mit autoimmunhämolytischer Anämie exprimieren anti-Erythrozyten Antikörper, die zur Eliminierung von Erythrozyten führen. Diese beruht auf Komplement-mediiertes Lyse und weiteren CR- und FcγR- abhängigen Mechanismen [61, 76, 84].

In dem Mausmodell wird die Erythrozytendepletion durch hochaffine murine monoklonale anti-Maus Erythrozyten IgG2a Antikörper (Klon 34-3C bzw. deren Subklassen *switch variant* (sv) Antikörper mit identischen V(D)J Ketten) induziert [76, 85]. Eine einmalige intraperitoneale Injektion von z.B. IgG2a führt zur Depletion von Erythrozyten, welche sich im Abfall des Hämatokrits (Ht), dem relativen Anteil der Blutzellen zum Blutvolumen (Erythrozyten 99 % und andere 1 %), widerspiegelt und nach drei bis vier Tagen seine stärkste Ausprägungsform hat. Für das Modell beschrieben sind IgG2a mit der größten Pathogenität, gefolgt von IgG2b. Beide Subklassen induzieren eine sowohl Komplement- als auch FcγR-abhängige Lyse [76].

Basierend auf diesem Modell sollte getestet werden, ob und wie die IgG1-Subklasse eine IgG2a und IgG2b-mediierte Anämie inhibieren kann (**Abbildung 3.5 a-c**). Dazu wurden die IgG2a, IgG2b und IgG1 sv Antikörper produzierenden 34-3C Hybridomzellen von Prof. Dr. S. Izui (Universität Genf, Schweiz) zur Verfügung gestellt und wie beschrieben kultiviert, und die Antikörper via Protein G aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt.

Anschließend wurden C57BL/6J Wildtypmäuse intraperitoneal mit IgG2a oder IgG2b allein (Vergleichsgruppe) oder jeweils kombiniert mit der doppelten Menge IgG1 injiziert (Testgruppe) und der Ht bestimmt. Dabei diente die gewählte therapeutische Dosis von IgG1 allein injiziert als Negativkontrollgruppe gegenüber dem normalen Ht, der ähnlich wie im Mensch auch in Mäusen zwischen 40 und 50 % liegt (**Abbildung 3.5 a**; Daten nicht gezeigt und [76]). 70 µg IgG2a induzierten eine schwere Anämie (Ht 21,5 %) und 70 µg IgG2b eine milde Anämie (Ht 34,9 %). In beiden Fällen hatte die Zugabe von 140 µg IgG1 keine inhibierende Wirkung auf die Depletion IgG2a- oder IgG2b-opsonisierter Erythrozyten (Ht 22,5 % bzw. 32,4 %).

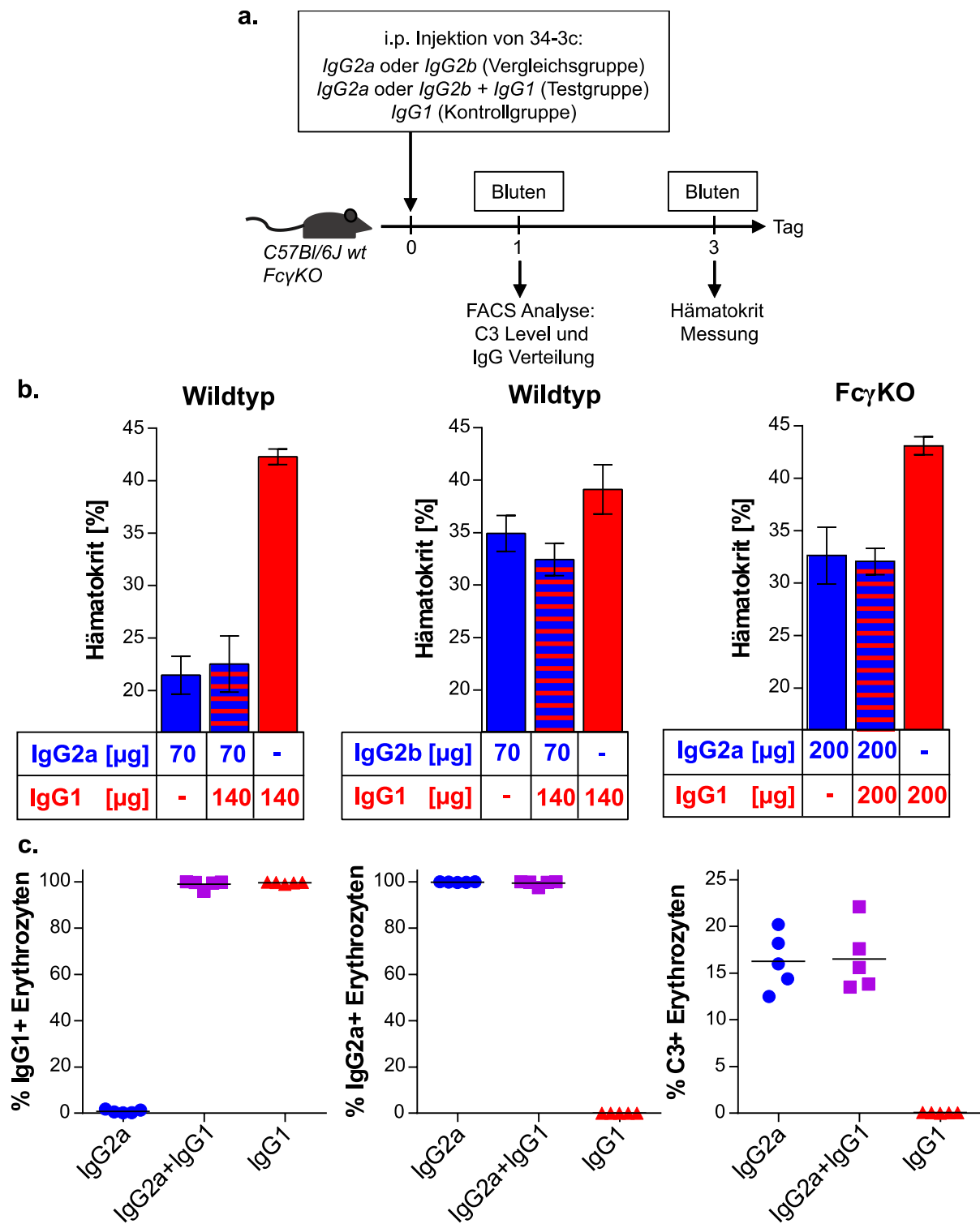
Um die FcγR-vermittelte Erythrophagozytose als Depletionsmechanismus auszugrenzen und die Involvierung vom Komplement zu untersuchen, sollte die Wirkung von IgG1 letztendlich

in FcR $\gamma$ -Kette defizienten Mäusen (Fc $\gamma$ KO) durchgeführt werden. Diese Mäuse exprimieren keine klassischen aktivierenden Fc $\gamma$ R.

Hierin war eine Dosissteigerung auf 200  $\mu$ g IgG2a allein nötig, um nach drei Tagen mindestens eine milde Anämie (Ht auf 32,6 %) zu induzieren. Diese Fc $\gamma$ R-unabhängige Lyse wurde in Azeredo da Silveira *et al.*, als Komplement-abhängige Lyse nachgewiesen [76]. Entsprechend war dies auch die IgG2a Ausgangsmenge für einen kombinierten IgG1/IgG2a Versuch. In einem ersten Versuch in Fc $\gamma$ KO-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Kombination von 200  $\mu$ g IgG2a mit der gleichen Menge IgG1 (200  $\mu$ g) keine Auswirkung auf den Ht (32,0 %) im Vergleich zu IgG2a allein hatte (**Abbildung 3.5 b**). Höhere (Kombinations-)Dosierungen hatten negative Auswirkung auf die Messgenauigkeit, was auf CR-abhängige Erythrophagozytose durch Kupffer Zellen zurückzuführen sein könnte. Ein anderer Interpretationsansatz dieser Schwankungen bei noch höheren IgG Mengen war der mögliche Beginn einer Erythrozytenagglutination, welche jedoch nicht nachgewiesen werden konnte.

Um dennoch eine mögliche IgG1-abhängige Inhibition der IgG2a-vermittelten Komplementaktivierung auf den Zielzellen zu einem frühen Zeitpunkt zu untersuchen, wurden Fc $\gamma$ KO-Mäuse an Tag 1 geblutet und extrazellulär auf opsonisierendes Komplement C3 sowie mu IgG1 und IgG2a mittels Durchflusszytometrie hin untersucht. Auf diese Weise konnte eine mögliche verringerte C3 Aktivierung und/oder subklassenspezifische Verdrängung zu erkennen sein. In der durchflusszytometrischen Analyse wiesen alle Erythrozyten der Vergleichsgruppe eine vollständige einzel- bzw. der Testgruppe doppelt-positive IgG1- und IgG2a-Opsonisierung auf. Die Zugabe von 200  $\mu$ g IgG1 zu 200  $\mu$ g IgG2a konnte auch die C3 Opsonisierung der Erythrozyten durch IgG2a nicht reduzieren, wobei nur 15-16,5 % aller Erythrozyten als C3 positiv gefärbt waren (**Abbildung 3.5 c**).

Zusammenfassend konnte die, im Rahmen der aufgeführten *in vivo* Versuche, bei den gewählten Dosierungen von mu anti-Erythrozyten IgG2a oder IgG2b sv (Klon 34-3C) Antikörpern erzeugte hämolytische Anämie nicht durch die Zugabe der IgG1 sv inhibiert werden (doppelte IgG1 Menge in WT Mäusen und einfache IgG1 Menge in Fc $\gamma$ KO-Mäusen). Eine Erhöhung der IgG1 Menge und damit das IgG1/IgG2a Verhältnis konnte leider nicht konsequent durchgeführt werden, da es dann zu starken Messschwankungen, wahrscheinlich ausgelöst durch IgG2a+IgG1-vermittelte Agglutinationen, kam. Demnach war dieses Modell zur Untersuchung der IgG1 vermittelten Inhibition der IgG2a- oder IgG2b-induzierten Komplementaktivierung ungeeignet.



**Abbildung 3.5: Untersuchungen der autoimmunhämolytischen Anämie im Mausmodell**

**a.** Schematische Beschreibung des in **(b, c)** angewendeten in vivo Modells. C57BL/6J Wildtyp und Fc-Rezeptor gamma-Kette defizienten (Fc $\gamma$ KO) -Mäusen wurde i.p. ein einzelner oder eine Kombination aus zwei 34-3C monoklonalen anti-Maus Erythrozyten *IgG2a*, *IgG2b* und *IgG1* *switch-variant* (mit identischen VDJ-Sequenzen) Antikörper injiziert. Je nach Mauslinie wurde eine Anämie induzierende *IgG2a* und *IgG2b* Dosis gewählt, deren Schweregrad drei Tage nach Injektion als Verlust im Ht bestimmt wurde **(b)** als Parameter eines kleinen Blutbildes; Wildtyp: n=5; Fc $\gamma$ KO: n=3-5; Mittelwert  $\pm$  SEM, nicht signifikant; **c.** Nach Injektion von 200  $\mu$ g *IgG2a* oder 200  $\mu$ g *IgG2a* + 200  $\mu$ g *IgG1* oder 200  $\mu$ g *IgG1* allein (Negativkontrolle) in Fc $\gamma$ KO-Mäuse wurde an Tag 1 durchflusszytometrisch die Opsonisierung von Komplement C3 und die Verteilung der Erythrozyten gebundenen IgG-Subklassen Antikörper bei Kombinationsdosis mit *IgG1* überprüft. Proben wurden mit anti-Maus *IgG1*-BV510, *IgG2a*-AF488 sowie C3-Biotin + Streptavidin-BV605 gefärbt. Abgebildet sind die relativen Signale nach

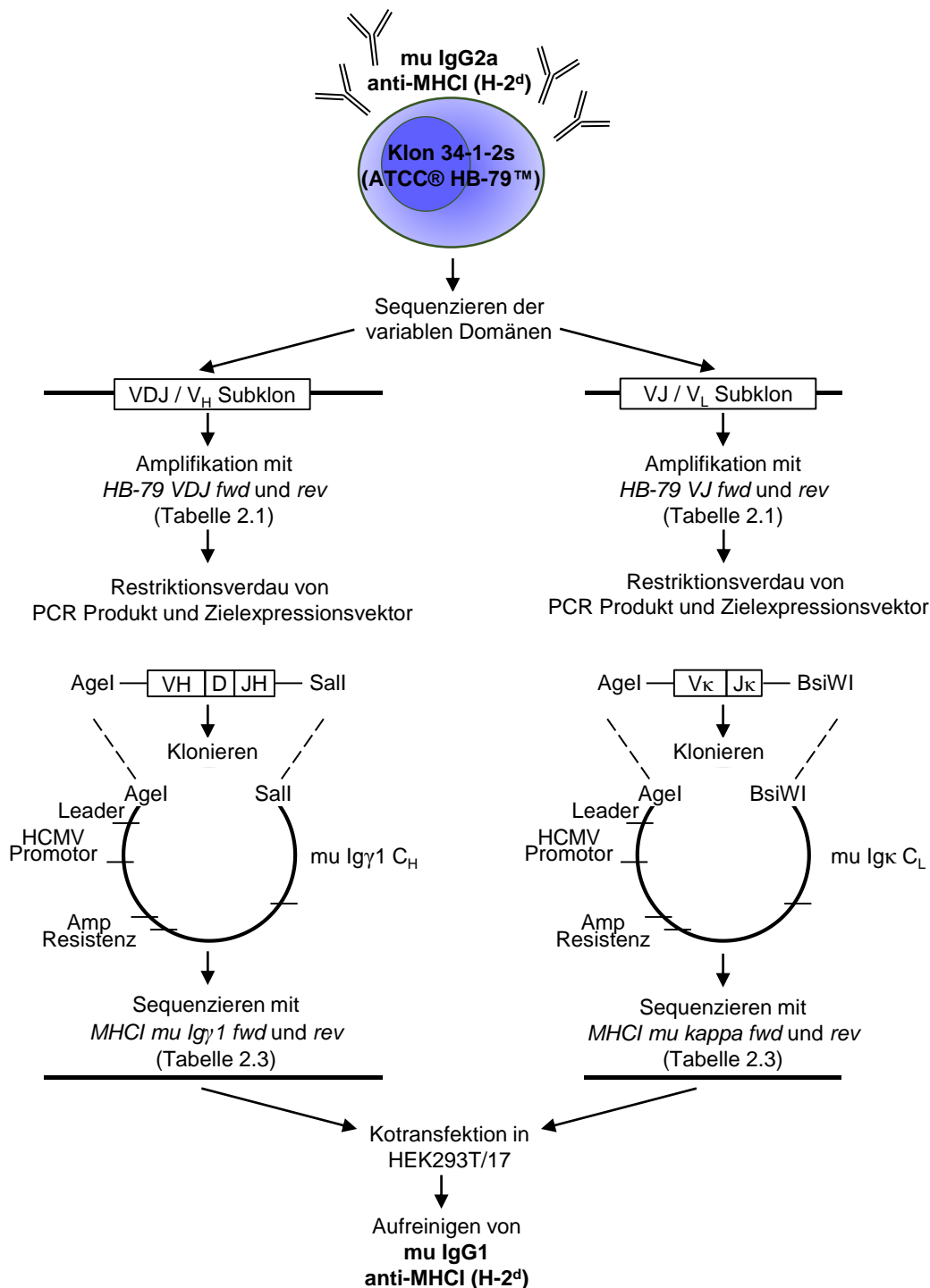
Vorauswahl der Erythrozyten Population mittels 405 nm Side Scatter (Abbildung A.3). Einer von mindestens zwei unabhängigen Versuchen dargestellt, n=5, nicht signifikant.

### 3.3.2 Herstellung eines murinen monoklonalen anti-MHCI IgG1 Antikörpers für das Mausmodell der Transfusions-assoziierten akuten Lungeninsuffizienz

Um die inhibierende Rolle von IgG1 bei der IgG2a-induzierten Komplementaktivierung zu untersuchen, sollten IgG Antikörper für ein zweites Mausmodell in Kooperation mit Prof. Dr. Fred Finkelman (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA) produziert werden. Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI) ist eine Todesursache von Blutprodukt-Transfusionen, induziert durch Spender anti-Empfänger HLA Antikörper [86]. Eine Antikörper-induzierte TRALI kann in Mäusen des H-2<sup>d</sup> Haplotyps mit dem 34-1-2s monoklonalen mu IgG2a Antikörper gegen H-2D<sup>d</sup> und H-2K<sup>d</sup> (kurz H-2<sup>d</sup>; MHC Klasse I Antigen) induziert werden [87, 88]. Wie Strait *et al.* zeigten, ist der pathogene Mechanismus in diesem System primär Komplement- statt FcγR-getrieben und involviert v.a. periphere Blut-Monozyten [89]. Hierin binden die pathogenen Antikörper an H-2<sup>d</sup> MHC I auf vaskulären Endothelzellen, die in Folge der Komplementaktivierung und dem Einströmen reaktiver Monozyten beschädigt werden. Sind die Blutgefäße der Lunge betroffen, kann ein nichtkardiogenes Lungenödem entstehen.

Nachdem das Modell der hämolytischen Anämie (oben) für die Beantwortung der zentralen Fragestellung dieser Arbeit als ungeeignet bewertet werden musste, erschien das TRALI-Modell optimal, um *in vivo* einer möglichen antigenspezifischen, IgG1-vermittelten Inhibition einer IgG2a-medierten Komplementaktivierung nachzugehen. Hierfür sollte aus dem mu anti-MHCI IgG2a (Klon 34-1-2s; [89]) die IgG1 *switch-variant* mit derselben V(D)J kloniert und produziert werden, siehe **Abbildung 3.6**.

Dazu wurden die variablen Domänen der Hybridomzellen 34-1-2s (ATCC® HB-79™) extern sequenziert und subkloniert (Tabelle A.1). Basierend hierauf wurden die in Tabelle 2.1 (siehe 2.2.6) aufgeführten Primer inklusive Restriktionsschnittstellen entworfen und die Subklone der HB-79 VDJ schweren und VJ leichten Kette mittels PCR amplifiziert. Nach Gelelektrophorese und DNA-Extraktion wurden die Produkte und Zielexpressionsvektoren enzymatisch verdaut. Die VDJ schwere Kette wurde dann in einen murinen anti-TNP IgG1 schwere Kette Expressionsvektor [43, 72, 73] zwischen eine Leader-Sequenz und der Sequenz für die konstante murine C57BL/6 IgG1 Region ligiert. Die VJ leichte Kette wurde in einen murinen anti-TNP kappa-Kette Vektor [43, 72, 73] zwischen eine Leader-Sequenz und der Sequenz für die murine C57BL/6 kappa Kette ligiert. Beide Vektoren kodieren für eine Ampicillin-Resistenz und sind unter der Kontrolle des HCMV Promotors. Dies ist notwendig für die Selektion erfolgreich ligierter und transformierter Expressionsvektoren in Z-kompetenten *E. coli* Bakterien sowie die Gewährleistung einer konstitutiven Transkription des Genproduktes.

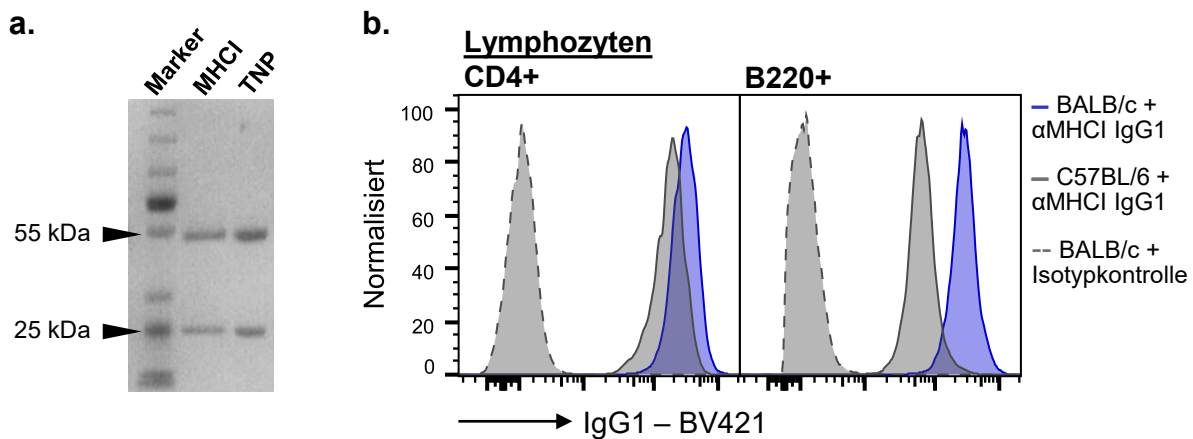


**Abbildung 3.6: Klonierung der murinen IgG1 Klassen-Switch-Variante von anti-MHCI (H-2<sup>d</sup>) IgG2a**  
In Anlehnung an Tiller *et al.* [74].

Die *MHC1 mu Igγ1* und *MHC1 mu kappa* Plasmid-DNA wurde aufgereinigt und unter Verwendung der in Tabelle 2.3 (siehe 2.2.6) aufgeführten Primer extern sequenziert (Tabelle A.2). Die erfolgreiche Umklonierung von HB-79 VDJ und VJ in Vektoren mit mu IgG1 schweren Kette Sequenz bzw. mu kappa leichten Kette Sequenz wurde bestätigt. Zur Antikörperproduktion wurden adhärenente HEK293T/17 Zellen in FCS-freiem HEK-Produktionsmedium chemisch transfiziert. Hierfür wurde Polyethylenimin (PEI) mit einem Plasmid-DNA zu PEI

Massenverhältnis von 1:2 verwendet, wobei das Massenverhältnis von *MHCI mu Igy1* zu *MHCI mu kappa* 1:1 betrug. Der Kulturüberstand wurde via Protein G aufgereinigt.

Die Zusammensetzung des neuen IgG1 Antikörpers wurde mittels SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen überprüft. Hierin wies die ansonsten saubere Bahn eine jeweils scharfe Bande der schweren bzw. der leichten Ig-Ketten bei erwarteter Höhe auf (**Abbildung 3.7 a**). Darüber hinaus wurde getestet, ob der umklonierte Antikörper in seiner spezifischen Antigenbindung funktionell ist. Leukozyten haben die höchste Expression von MHC I, daher der Terminus Humanes Leukozytenantigen (HLA), und sind leicht zu isolierende kernhaltige Körperzellen. Dementsprechend wurden Splenozyten der Wildtypstämme BALB/c und C57BL/6J isoliert und mit anti-MHCI IgG1 Antikörpern inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse ergab starke IgG1-Signale auf unterschiedlichen Lymphozytenpopulationen, wobei aufgrund des Ursprungs der V(D)J aus BALB/c, erwartungsgemäß höhere IgG1 Signale auf BALB/c ( $H-2^d$ ) im Vergleich zu C57BL/6J ( $H-2^b$ ) Zellen gefunden wurden (**Abbildung 3.7 b**).



**Abbildung 3.7: Verifizierung der murinen anti-MHCI IgG1 Produktion**

Verifizierung von Zusammensetzung (**a**) und Funktionalität (**b**) des in dieser Arbeit produzierten monoklonalen mu anti-MHCI IgG1, der auf der V(D)J-Sequenz von 34-1-2s IgG2a (HB-79) aus BALB/c beruht. Nach Umklonierung wurden HEK293T/17 Zellen mit den Plasmiden *MHCI mu Igy1* und *MHCI mu kappa* chemisch transfiziert und der Antikörper aus dem Kulturüberstand mittels Protein G aufgereinigt. **a.** SDS-PAGE von DTT- und hitzedenaturierten Proben des mu anti-MHCI IgG1 und des monoklonalen mu anti-TNP IgG1 Antikörpers, mit Größenstandard-Marker 10-250 kDa für schwere (~55 kDa) und leichte Ketten (~25 kDa); Coomassie Blau Färbung. **b.** Splenozyten unbehandelter Mäuse der Wildtypstämme BALB/c (blau) und C57BL/6J (grau, durchgezogene Linie) wurden zunächst mit einem Fc-Rezeptor-Block (anti-CD16/CD32) und anschließend mit anti-MHCI IgG1 behandelt. Als Isotypkontrolle wurden separat Splenozyten mit mu anti-TNP IgG1 inkubiert (grau, gestrichelte Linie). Dann wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkiertem anti-mu IgG1, B220, CD4 und CD8 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Abgebildet sind Histogramme der IgG1 Signalstärke modal normalisierter Zellzahlen von Einzelzellen unterteilt nach  $CD8^{neg}CD4^{pos}$  und  $CD8^{neg}B220^{pos}$  Oberflächenantigenen; einer von mindestens zwei unabhängigen Versuchen.

Hiernach ist zu schlussfolgern, dass die anti-MHCI IgG1 sv von 34-1-2s IgG2a erfolgreich generiert wurde und im TRALI Mausmodell auf inhibitorische Wirkung getestet werden kann. Die Tests werden momentan im Labor von Prof. Dr. F. Finkelman durchgeführt, wo das Modell bereits etabliert ist [89], und sind deshalb noch nicht Bestandteil dieser Arbeit.

### 3.4 Inhibitorisches Potential von sialylierten antigenspezifischen IgG Antikörpern in EBA

In einem weiteren aktiven Maus-Autoimmunmodell zur Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) sollte zum einen die IgG-Subklassenverteilung, zum anderen die IgG Fc N-Glykosylierung, insbesondere die Fc N-Sialylierung, mit dem Schweregrad der induzierten Krankheit korreliert werden. Die IgG Fc-N Sialylierung reguliert vor allem die Interaktion mit Fc $\gamma$ -/C-Typ Lektin-Rezeptoren.

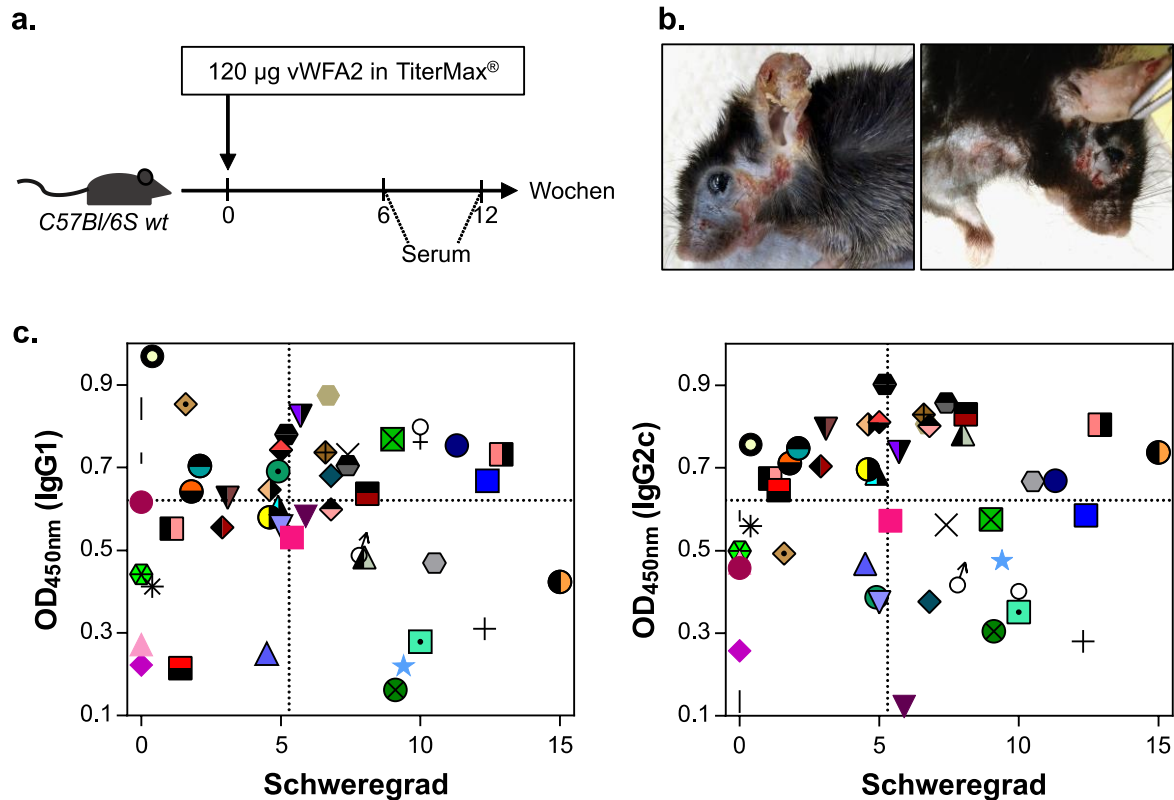
Die EBA ist eine IgG-mediierte, Komplement- und Fc $\gamma$ R- abhängige blasenbildende (bullöse) Autoimmundermatose. Die Entstehung der Krankheit ist abhängig von APC-induzierten CD4+ T-Zellen, die wiederum die Entwicklung autoantigenspezifischer Plasmazellen bewirken [78]. Sezernierte Typ VII Kollagen-spezifische Antikörper binden an die dermo-epidermale Junctionszone, in der vor allem die Subklassen IgG2a/2b pathogen wirken [64]. Dabei wird Komplement aktiviert und über die C5a/C5aR-Achse infiltrierte Neutrophile werden von den Immunkomplexen über Fc $\gamma$ RIV aktiviert [90–92]. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Proteasen werden freigesetzt. Die Folge sind eine Hautentzündung und die dermo-epidermale Separation (Blasenbildung), siehe **Abbildung A.1** und **Abbildung A.2**. Die Induktion des aktiven Maus EBA-Modells ist an den H-2<sup>S</sup> Haplotyp geknüpft, weshalb die aktive, immunisierungsinduzierte EBA mit SJL oder C57BL/6S Mäusen durchgeführt wird. Die Neutrophilen-dominierte Effektorphase in der experimentellen, passiven EBA kann auch in Mäusen mit anderem Haplotyp erfolgen [79].

Zunächst sollte die Auto-IgG-Subklassenverteilung und Fc N-Sialylierung von C57BL/6S Mäusen untersucht werden, die durch Immunisierung Toleranz gegenüber dem endogenen Typ VII Kollagen verlieren, entsprechend eine T- und B-Zell- und Antikörperantwort gegen Typ VII Kollagen und schließlich eine EBA-Symptomatik entwickeln (3.4.1). Anschließend sollten auf diesem Weg polyklonale IgG Autoantikörper gewonnen werden, um diese unmodifiziert (nativ) oder *in vitro* galactosyliert und sialyliert im passiven Mausmodell auf Induktion einer Hautentzündung hin zu untersuchen (3.4.2).

#### 3.4.1 IgG-Subklassenverteilung und Fc N-Sialylierung nach Toleranzverlust gegenüber Typ VII Kollagen im aktiven EBA Mausmodell

Um in Mäusen eine aktive EBA auszulösen, wurden C57BL/6S Tiere mit rekombinanter mu von-Willebrand-factor-A-like domain 2 (vWFA2), der immundominanten Domäne im NC1 von Typ VII Kollagen [93–95], injiziert [78, 96] (**Abbildung 3.8 a**). Das Adjuvans TiterMax diente dabei als starker Costimulus, um den Toleranzverlust auszulösen. Als Folge entwickeln die Tiere zirkulierende und gewebsständige IgG Antikörper, die etwa ab der sechsten Woche nach Immunisierung zu deutlich sichtbaren Hautläsionen und Blasenbildungen führten

(Abbildung 3.8 b und Daten nicht gezeigt). Die prozentual akut betroffene Hautfläche jeder Maus wurde basierend auf Bieber *et al.* wöchentlich als klinischer Schweregrad eingestuft [79]. Serum wurde einmalig, spätestens zwölf Wochen nach Immunisierung gewonnen und dabei der entsprechende finale Schweregrad dokumentiert.



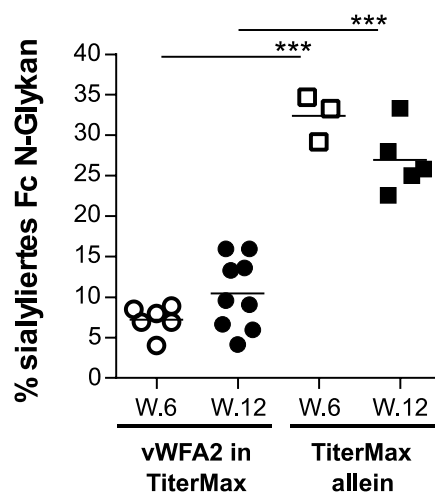
### Abbildung 3.8: Immunisierungs-induzierte EBA

**a.** Schematische Beschreibung des Mausmodells der aktiven EBA; naiven C57BL/6S Wildtypmäusen wurden je Hinterlauf subkutan 60 µg einer Emulsion aus rekombinanter muriner von-Willebrand-factor-A-like domain 2 (vWFA2) in dem Adjuvans TiterMax injiziert. Hiernach wurden die Tiere auf Auftreten EBA-typischer Symptome wie juckende, nässende Wunden, Erythema, Erosionen, Blasen und Krusten beobachtet (**b**), die i.d.R. ab der sechsten Woche auftraten. Das Antiserum wurde einmalig zwischen der sechsten und zwölften Wochen nach Immunisierung gewonnen und dazu der klinische Schweregrad (prozentual betroffene Körperfläche) eingestuft. **c.** Nachweis vWFA2 spezifischer IgG-Subklassen mittels ELISA; vWFA2 beschichtete Platten wurden mit dem verdünnten Serum jeder Maus (**a**) inkubiert und schließlich jede Platte mit einem HRP-konjugierten anti-mu IgG-Subklassen spezifischen Antikörper und TMB Substrat entwickelt. Exemplarisch gezeigt sind die individuellen ELISA-Werte für IgG1 sowie IgG2c (IgG2a in C57BL/6) als OD bei 450nm gegen den klinischen Schweregrad. Gepunktete Linien: Median von OD und Schweregrad; Maus-identische Symbolik zwischen den Subklassen sind Mittelwerte abzüglich Negativkontrolle (kein Serum); n=46, Regressionsanalyse war nicht signifikant. Die Durchführung erfolgte in Kooperation mit Dr. Katja Bieber.

Um einen Zusammenhang zwischen klinischem Schweregrad und Subklassenverteilung antigenspezifischer, zirkulierender IgG Antikörper zu untersuchen, wurde das Serum jeder Maus in einem vWFA2 spezifischen ELISA mit entsprechenden HRP-konjugierten anti-mu IgG Fc und anti-mu IgG-Subklassen Sekundärantikörpern inkubiert. Da keine Standards zur Verfügung standen, wurden die IgG-Subklassen Expressionslevel als relative Messwerte zueinander (OD bei 450 nm) verglichen. Generell wies die Mehrheit der Tiere einen relativ hohen vWFA2 spezifischen IgG Titer auf, wobei die wenigen niedrig-titrigen nicht durch den Mangel einer bestimmten Subklasse herausstachen. So waren auch die Messwerte für die einzelnen

Subklassen breit gestreut mit einem relativ hohen Median für die Expressionslevel von IgG2b und IgG2c sowie IgG1, und einem dagegen niedrigen Level für IgG3. Individuen entwickelten parallel IgG2b:IgG2c ( $R^2=0,48$ ; \*\*\*), IgG2b:IgG1 ( $R^2=0,40$ ; \*\*\*) und schwach auch IgG2c:IgG1 ( $R^2=0,14$ ; \*). Es lag keine signifikant negative Korrelation des klinischen Schweregrads zu IgG1-Leveln vor, so auch keine signifikant positive zu den anderen Subklassen IgG2c/2b/3 (**Abbildung 3.8 c**; **Abbildung A.4**).

Während die hier analysierte IgG-Subklassenverteilung nicht als Krankheitsmarker herangezogen werden konnte, enthüllten Glykoanalysen stark signifikante Unterschiede in der autoantigenspezifischen IgG Fc N-Sialylierung gegenüber dem Gesamt-IgG von nur mit Adjuvans immunisierten Mäusen (**Abbildung 3.9**). Serumproben sechs oder zwölf Wochen nach Immunisierung wurden vWFA2-spezifisch aufgereinigt und anschließend mit EndoS verdaut, welches spezifisch zwischen dem ersten und zweiten GlcNAc schneidet [97]. Die Analyse der Glykane erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) (Durchführung Yannic Bartsch, Labor Ehlers).



**Abbildung 3.9: Autoantikörper in der immunisierungsinduzierten EBA sind gering sialyliert**

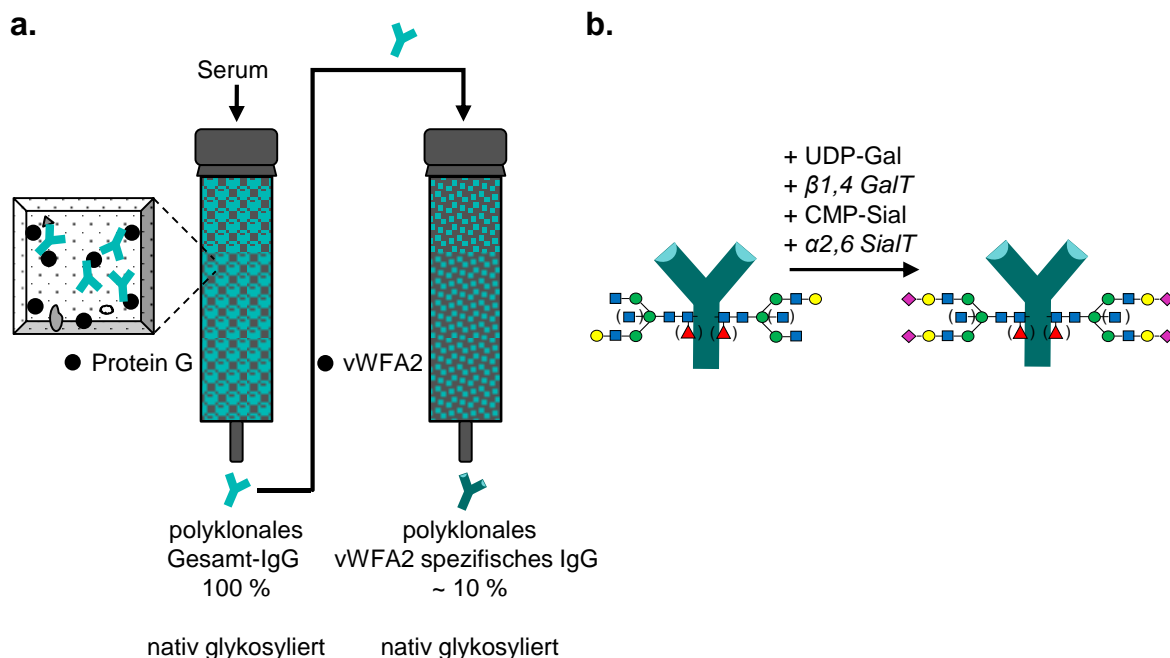
HPLC Analyse des EndoS verdauten Gesamt-Glykans am IgG Fc Asparagin297. Sechs oder zwölf Wochen nach Immunisierung von C57BL/6S Mäusen mit vWFA2 in TiterMax wurde Serum-IgG vWFA2-spezifisch bzw. Serum-IgG der Adjuvans Kontrolle Protein G-aufgereinigt und analysiert.

IgG Autoantikörper von Autoantigenen in TiterMax immunisierten Mäusen waren deutlich weniger sialyliert als Gesamt-IgG von Mäusen, die nur mit TiterMax immunisiert wurden. Zwischen dem Beginn der EBA-Symptomatik in der sechsten Woche bis zur zwölften Woche waren keine Sialylierungs-Unterschiede zu beobachten, was darauf hindeutete, dass die Entstehung von gering-sialylierten IgG Autoantikörpern bereits vor der sechsten Woche determiniert wurde. Zusammenfassend war keine unterschiedliche IgG-Subklassenverteilung zwischen Mäusen mit unterschiedlichem Schweregrad, wohl aber in der IgG Fc N-Sialylierung zu erkennen. Aufgrund dieser Datenlage war die Testung verschieden sialylierter Autoantikörper in der Induktion einer EBA von besonderem Interesse.

### 3.4.2 Untersuchungen mit *ex vivo* sialylierten, murinen EBA IgG Autoantikörpern in der EBA Effektorphase

Im nächsten Versuch sollte das Potential von *ex vivo* sialylierten autoantigenspezifischen IgG Antikörpern im passiven EBA-Mausmodell untersucht werden.

Antiserum von EBA-erkrankten Mäusen mit einem Schweregrad über 1,1 %, gewonnen durch Immunisierung mit rekombinantem murinem vWFA2 in TiterMax (**Abbildung 3.8 a, b**), wurde vereint aufgereinigt. In einem ersten Schritt wurde über Protein G Sepharose das Gesamt-IgG aufgereinigt (30 mg) und in einem zweiten Schritt wurde die Hälfte des gewonnenen IgG über eine mit vWFA2-gekoppelte Säule antigenspezifisch aufgereinigt. Unspezifische Bindungen wurden mit großzügigen Waschvolumina reduziert und mittels ELISA überprüft (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.10: Präparation von polyklonalen EBA IgG Autoantikörpern und anschließender Glykomodifizierung für *in vivo* Versuche**

**a.** Antiserum von vWFA2 immunisierten C57BL/6S Wildtypmäusen, deren klinische EBA-Symptome einen Schweregrad über 1,1 erreicht hatten (Abbildung 3.8), wurden vereint und das Gesamt-IgG mittels Protein G-Sepharose aufgereinigt. Von der Hälfte hiervon wurde in einem weiteren Schritt über Sepharose mit Cyanobromid immobilisiertem vWFA2 das antigenspezifische IgG gewonnen. **b.** Schematische Darstellung der anschließenden *in vitro* Glykomodifizierung; Das nativ gering sialylierte polyklonale EBA IgG (Gesamt-IgG oder vWFA2-spezifisches IgG) wurde zur Testung im passiven EBA-Modell *in vitro* zunächst vollständig galactosyliert und dann weiter sialyliert. Bei 37°C verknüpfen die rekombinanten, humanen Enzyme  $\beta 1,4$  GalT (Galactosyltransferase) bzw.  $\alpha 2,6$  SialT (Sialyltransferase) die Nukleotid-aktivierten Saccharide UDP-Galactose bzw. CMP-Sialinsäure; für Glykoanalysen der nativen und *in vitro* sialylierten Variante siehe Abbildung 3.11 b.

Maximal 10 % des Gesamt-IgG wurden von der antigenspezifischen Säule eluiert, ein relativ hoher Anteil, der jedoch Werte aus vorangegangenen Testaufreinigungen bestätigte (**Abbildung 3.10 a** und Daten nicht gezeigt). Um zu prüfen, ob eine hohe Sialylierung die Pathogenität der Antikörper hemmt, wurde das native EBA IgG (Gesamt-IgG und antigenspezifisch) nach dem

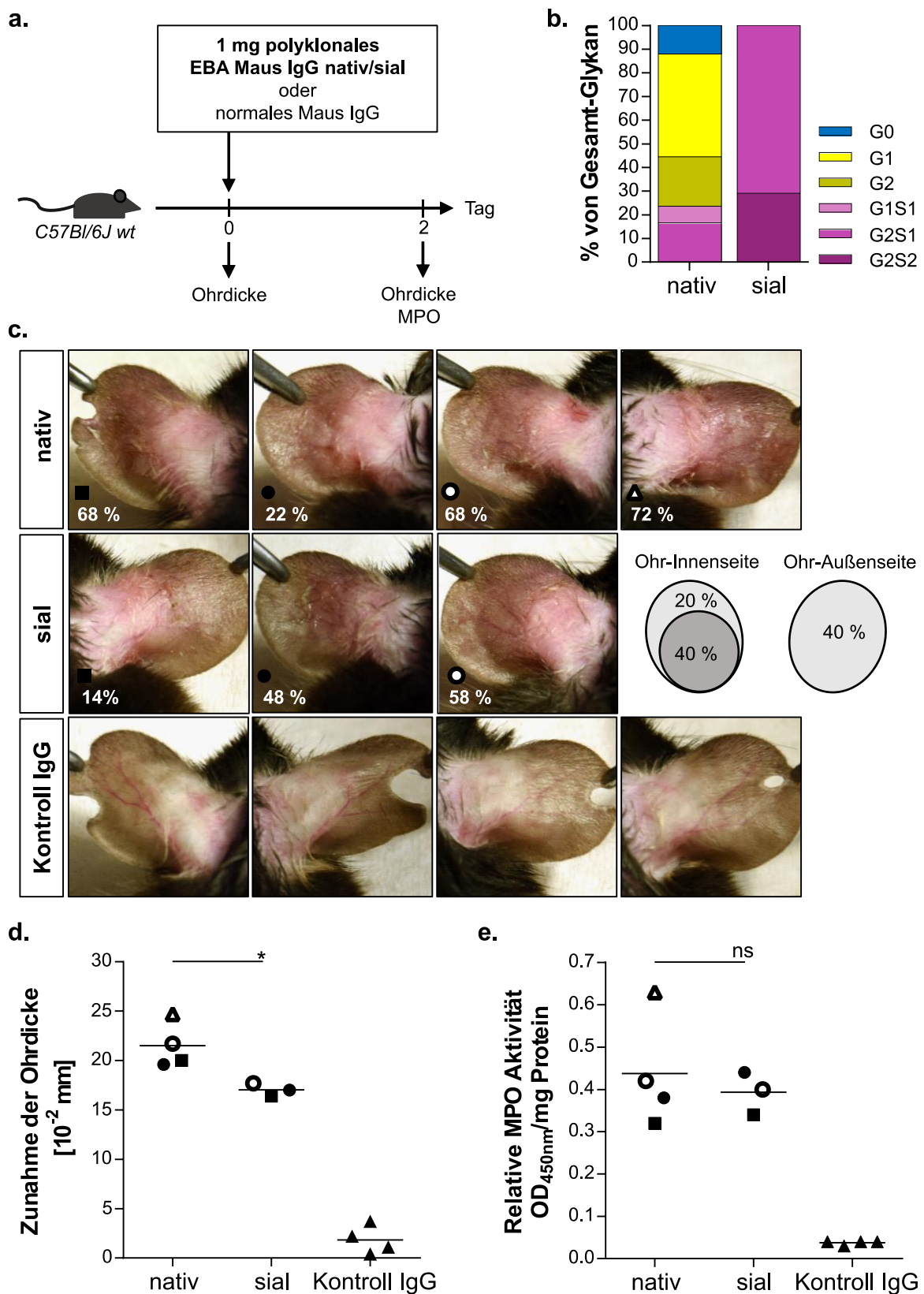
in **Abbildung 3.10 b** dargestellten *in vitro*-Verfahren glykosyliert. Dies führte zu einer vollständigen Galactosylierung und Sialylierung mit 30 % G2S2 Anteil, siehe **Abbildung 3.11 b**.

Schließlich sollte getestet werden, welche Wirkung die polyklonalen EBA IgG Autoantikörper bei Transfer in naive C57BL/6J Wildtyp Mäuse haben und ob die *ex vivo* hoch-sialylierte Variante im Vergleich zur nativen Glykosylierung weniger pathogen ist. Hierzu wurde das passive lokale EBA-Modell am Ohr genutzt, welches bislang systemisch oder lokal vor allem mit polyklonalen Kaninchen anti-murinen Typ VII Kollagen Antikörpern durchgeführt wurde [79, 91]. Die Antikörper werden hierbei einmalig subkutan in das Ohr injiziert, was ausreichend ist, um nach 48 Stunden die klinische Phänotypisierung vorzunehmen (**Abbildung 3.11 a**).

Zur Quantifizierung einer Entzündung wurden am Versuchsende auch die Parameter „Zunahme der Ohrdicke“, als Zeichen einer gesteigerten vaskulären Permeabilität und außerdem die Myeloperoxidase (MPO) Aktivität erfasst. Letztere ist eine indirekte Nachweismethode von, in das biopsierte Ohrgewebe eingewanderten Neutrophilen Granulozyten, deren intrazelluläre MPO nach Zellaufschluss freigesetzt werden und zugeführtes Substrat messbar umwandeln. Zur Normalisierung des jeweils verwendeten Gewebestücks wurde vom Zelllysate parallel die Proteinmenge mittels BCA-Assay bestimmt.

Zunächst wurde das polyklonale Gesamt-IgG EBA-erkrankter Tiere in einer relativen Dosissteigerung getestet. Unter der Voraussetzung, dass 10 % des Gesamt-IgG antigenspezifisch waren, wurde 1 mg natives Gesamt-IgG oder *ex vivo* sialyliertes Gesamt-IgG gespritzt. Zusätzlich wurde eine Gruppe, mit 1 mg Maus IgG von unbehandelten Mäusen als Negativkontrolle appliziert (**Abbildung 3.11 a, b**).

Nach zwei Tagen Beobachtung hatte sich die gewählte Dosis als pathogen erwiesen; der optische Eindruck der Ohren hob sich deutlich von der Negativkontrolle ab. Sowohl native als auch *ex vivo* sialylierte EBA Gesamt-IgG Antikörper induzierten nässende Wunden mit großflächigem Erythema v.a. auf der Ohräußenseite, welche auch die Applikationsseite war. Nativ glykosyliertes EBA Gesamt-IgG induzierte im Mittel einen klinischen Schweregrad von 57,5 % und das sialylierte EBA Gesamt-IgG 40 % (**Abbildung 3.11 c**; nicht signifikant). Die Ohrdicke betrug im Mittel 215  $\mu\text{m}$  für natives IgG (entspricht einer Zunahme von 71 %) und 170  $\mu\text{m}$  für sialyliertes IgG (entspricht einer Zunahme von 56 %) (**Abbildung 3.11 d**, signifikant). Die Einwanderung von Neutrophilen war indirekt ebenfalls nachweisbar; Ohrbiopsien der Gruppen nativ glykosyliert im Vergleich zu sialyliert wiesen jedoch keine Unterschiede in der Myeloperoxidase Aktivität auf (**Abbildung 3.11 e**).



**Abbildung 3.11: Wirkung verschieden glykosylierter, muriner polyklonaler EBA IgG Antikörper in der Induktion einer lokalen EBA**

**a.** Schematische Beschreibung des in (c-e) angewendeten *in vivo* Modells der lokalen, passiven EBA. 1 mg natives oder *ex vivo* sialyliertes (Abbildung 3.10) polyklonales Gesamt-IgG von mit vWFA2 immunisierten C57BL/6S Wildtypmäusen (Abbildung 3.8) oder Gesamt-IgG von unbehandelten Mäusen (Kontroll IgG) wurden passiv auf C57BL/6J Wildtypmäuse durch einmalige, subkutane Injektion in den Ohransatz übertragen. Nach der klinischen

Phänotypisierung an Tag 2 wurden die Tiere geopfert und die Ohren biopsiert **b.** HPLC Analyse der, in **(c-e)** eingesetzten, EndoS verdauten Glykane, nativ und *ex vivo* sialylierter EBA Gesamt-IgG Antikörper. Abgebildet ist die relative Verteilung der Fraktionen agalactosyliert (G0), einseitig galactosyliert (G1) + einseitig sialyliert (G1S1), beidseitig galactosyliert (G2) + einseitig sialyliert (G2S1) oder + beidseitig sialyliert (G2S2) (Abbildung 1.4) des IgG Asparagin 297- Gesamt-Glykans. **c.** Fotografische Dokumentation der klinischen Symptome (v.a. Erythema, nässend) der Ohr-Außenseiten am Versuchsende; indiziert ist der klinische Schweregrad, welcher sich aus der Summe der prozentual betroffenen Fläche auf der Ohr-Innen- und Außenseite nach abgebildeter Wichtung ergibt (siehe Formel (2.2) in 2.2.11); nicht signifikant. **d.** Zunahme der Ohrdicke von Tag 0 zu 2 (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung). **e.** Myeloperoxidase (MPO)-Aktivitätsnachweis der Ohrbiopsien am Versuchsende; Gewebeprobe wurden dispergiert, der Zellaufschluss via Gefrier-Auftauzyklen herbeigeführt und das Lysat (1:5 verdünnt) mit TMB Substrat im 96 Well-Format inkubiert. Dargestellt ist die OD bei 450 nm der abgestoppten MPO-Reaktion normalisiert auf die Proteinmenge der Biopsie, bestimmt mittels BCA-Assay. Mausindividuelle Symbole in **(c-e)** identisch; n=3-4, methodische Ausreißer wurden ausgeschlossen; einmaliger Versuch.

Zusammenfassend induzierten *ex vivo* sialylierte Gesamt-IgG EBA Antikörper vom Trend eine geringere Hautentzündung am Ohr als nativ gering-sialylierte Gesamt-IgG Antikörper.

Aufgrund der aufwendigen Generierung dieser EBA IgG Antikörper bzw. der limitierten Menge an Gesamt-IgG wurde der Versuch mit dem bestehenden IgG-Material nicht wiederholt, sondern entschieden, den Rest nach **Abbildung 3.10 a** antigenspezifisch aufzureinigen.

Hieraus resultierten am Ende gerade so viel natives vWFA2 IgG und *ex vivo* sialyliertes vWFA2 IgG, dass ein Versuch mit jeweils 5 Mäusen pro Gruppe à 80 µg Injektion durchgeführt werden konnte. Leider induzierten die 80 µg nur eine kaum von der Negativkontrolle zu differenzierende Hautentzündung am Ohr, so dass auch die Messungen der Ohrdicke und MPO keine hinreichend auswertbaren Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ergaben.

In Zukunft sollen weitere und diesmal deutlich mehr C57BL/6S Mäuse aktiv mit vWFA2 in TiterMax immunisiert werden, um mehr Gesamt-IgG und letztendlich mehr vWFA2-spezifisches IgG für Wiederholungsversuche mit einer höheren vWFA2-spezifischen IgG-Dosis durchführen zu können. Um die Rolle der Glykosylierung weiter zu untersuchen, sollen dann auch *ex vivo* de-sialylierte und de-galactosylierte IgG Antikörper hergestellt werden.

Dazu muss ein weiterer Tierversuchsantrag geschrieben und genehmigt werden sowie weiteres EBA Gesamt-IgG von kranken Tieren produziert und gesammelt werden.

## 4 DISKUSSION

---

In Forschungsarbeiten der letzten Jahrzehnte wurden mu IgG1 und hu IgG4 sowie die IgG Fc N-Sialylierung häufig mit einer immunregulatorischen Funktion assoziiert. Insbesondere in Komplement-, Fc $\gamma$ -Rezeptor- und T-Zell vermittelten Autoimmun – und Allergiemodellen wurde für mu IgG1 und die IgG-Sialylierung sogar eine anti-inflammatorische Wirkung aufgedeckt [65, 66, 69, 70, 83] und [42–44, 46, 50, 51, 53, 54, 77, 98].

Dass eine inhibitorische Wirkung von mu IgG1 oder hu IgG4 antigenspezifisch ablaufen müsste, ist naheliegend. Die anti-inflammatorische Wirkung von sialylierten IgG Antikörpern beruhte bisher vor allem auf der inhibitorischen Wirkung von unspezifischem IVIg [46, 47, 51, 98]. Obwohl naheliegend, diese natürlichen Eigenschaften des IgG auch in Form eines antigenspezifischen Ansatzes zu erforschen, gibt es hierzu bisher nur wenige publizierte *in vivo*-Daten [44, 45, 65].

In dieser Arbeit wurde modellhaft *in vitro* untersucht, wie sich die Zugabe der mu IgG1-Subklasse auf die klassische Komplementaktivierung mediiert durch C1q-bindende IgG-Subklassen Antikörper auswirkt. Anhand der aufbauend durchgeführten beispielhaften murinen Autoimmunmodelle sollte die Rolle von mu IgG1 *in vivo* untersucht werden. Neben der Subklasse wurde weiter auch das inhibitorische Potential antigenspezifischer, hoch-sialylierter Autoantikörper in dem hierfür erstmalig etablierten Modell der lokalen passiven EBA mit polyklonalem mu IgG untersucht.

### **Murines IgG1 inhibiert die C1q-Bindung an andere IgG-Subklassen *in vitro* abhängig von der Spezifität und der Affinität**

---

Für hu IgG1 und hu IgG3 wurde eine antigenabhängige Hexamerformierung durch nichtkovalente Fc:Fc-Interaktion beschrieben, welche die maximale, hexavalente Interaktion mit C1q erlaubt und damit die Komplementaktivierung steigert [14, 22, 23, 99, 100]. Im Hexamer interagiert nur ein Fab-Arm mit dem Antigen, während der andere Arm mit dem Fc-Teil in einer Ebene positioniert ist [22, 23]. Wenngleich für hu IgG4 eine Hexamerformierung beschrieben wurde [21], kann diese Subklasse nicht C1q binden und Komplement aktivieren [19, 66]. Als entscheidende Ursachen werden Subklassen-spezifische Aminosäuresequenzunterschiede diskutiert, die eine verringerte Flexibilität bedingen [19, 101] und so auch eine Schleifenkonformation in der C<sub>H</sub>2-Domäne verändern, wodurch die C1q- (wie auch Fc $\gamma$ R-) Bindestelle zerstört wird [102, 103].

Auf der anderen Seite wurde für hu IgG4 wie auch IgA eine mögliche Inhibierung der hu IgG1 und hu IgG3 Hexamerformierung mit effizienter C1q-Bindung vorgeschlagen [14, 21, 66, 104–106]. Aufgrund der funktionellen Gemeinsamkeiten, wie fehlender C1q-Interaktion, von hu IgG4 und mu IgG1, wurde im ersten Teil dieser Arbeit die vorgeschlagene Inhibition mit

mu IgG1 und C1q-bindenden mu IgG2a, IgG2b und IgG3 untersucht. Auch wenn hier nur angenommen werden kann, dass eine Hexamerformierung mit verbundener C1q-Bindung auf diese mu IgG-Subklassen zutrifft, konnte gezeigt werden, dass mu IgG1 die Interaktion der anderen mu IgG-Subklassen mit C1q verhindert (**Abbildung 3.1; Abbildung 3.2**). Durch die gestörte C1q-Bindung wurde auch die funktionelle Komplementaktivierung unterbunden, so dass weder pro-inflammatorische Komplementmediatoren noch terminaler MAC entstehen konnten (**Abbildung 3.4**).

Die Inhibition korrelierte positiv mit der IgG1-Dosis und -Affinität und war stärker bei hohen C1q-bindenden IgG2a, IgG2b und IgG3 Mengen im Vergleich zu geringeren Ausgangsdosierungen nahe ihres EC50. Daher war zunächst anzunehmen, dass die C1q-Inhibition auf affinitätsabhängiger Kompetition zwischen mu IgG1 und den anderen Subklassen um freies Antigen beruhte (**Abbildung 3.2 c**). Andererseits konnte IgG3 die C1q-Bindung an IgG2a oder IgG2b nicht verhindern, wenn es in der gleichen Dosis wie IgG1 verwendet wurde, obwohl IgG3 hierin selbst noch nicht C1q binden konnte (**Abbildung 3.2 e**); die Inhibition war also auf IgG1 allein beschränkt. Vermutlich bewirkt mu IgG1 eine sterische Interferenz zu den antigengebundenen mu IgG2a, IgG2b oder IgG3, so dass folglich eine Hexamerformierung verhindert wird. Die Bindung von mu IgG1 an Antigen in unmittelbarer Umgebung C1q-bindender Subklassen könnte deren Fc:Fc-Kontaktaufbau stören und somit potentiell deren Hexamerisierung, C1q-Bindung, und Komplementaktivierung reduzieren. Auch denkbar ist die sterische Interferenz von antigengebundenem mu IgG1/hu Ig4 mit anderen Komplement Faktoren [14, 23].

Die IgG-Hexamerformierung beruht nach Diebolder *et al.* vor allem auf der monovalenten, anstatt der hoch-affinen bivalenten Antigenbindung und ist demnach stark vom Antikörper-Antigen Paar abhängig [22]. Unter der Voraussetzung, dass eine effiziente Inhibition der C1q-Bindung durch mu IgG1 auf der sterischen Interferenz mit der IgG2a/2b/3-Hexamerausbildung basiert, ist auch diese von der Antigenbeschaffenheit und -dichte abhängig. Das im C1q ELISA verwendete, polymere Ficoll mit dichter TNP-Haptenisierung schien hierfür ideal zu sein. Auch die diffuse TNP-Haptenisierung der Membranoberfläche von Erythrozyten und einer Epitopräsentation, nun im Kontext von Protein, schien für die anti-TNP IgG2a und Komplement-medierte Lyse sowie Inhibition durch mu IgG1 geeignet zu sein. Eine Immunreaktion in diesem Kontext kommt der potentiellen *in vivo* Situation näher.

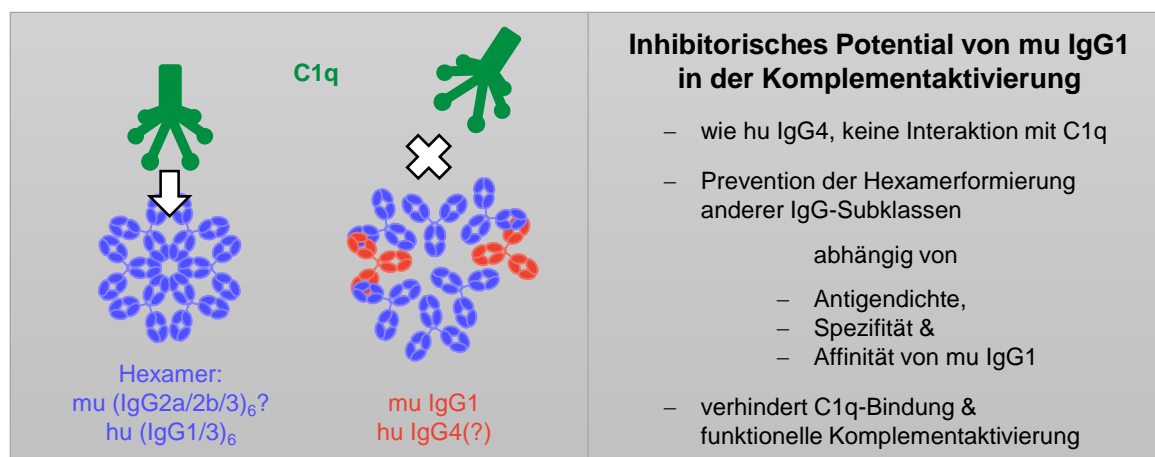
Der Hämolyse-Assay zeigte, dass ein unspezifischer monoklonaler mu IgG1 Antikörper keine Auswirkung auf die IgG2a-medierte klassische Komplementaktivierung hatte (**Abbildung 3.4 c**). Der beschriebene Inhibitionsmechanismus mit mu gG1 erfolgt also nur unter Fab-Antigenkontakt und war somit antigenspezifisch bzw. antigenabhängig.

Die sehr effiziente IgG1-Inhibition der C1q-Bindung an den schwächeren Komplementaktivator IgG3 gegenüber IgG2a unterstützt die Hypothese der verbesserten sterischen Interferenz bei

verringertes Subklassen-spezifischer Flexibilität (**Abbildung 3.2 d**). Für mu IgG2a wie IgG2b ist in der Literatur eine besondere konformationelle Flexibilität beschrieben. Diese sollte zum einen eine bessere Antigenbindung und Hexamerformierung erlauben und zum anderen einen denkbar besseren Widerstand gegenüber mu IgG1, um weiterhin mit einem Fab antigegebunden, doch gleichzeitig Fc:Fc-verknüpft zu bleiben [25]. So besäße eine auf mu IgG3 abzielte Inhibition mit mu IgG1 eine hohe Effizienz, insbesondere auch, weil die Pathogenizität von IgG3 nahezu vollständig auf Komplementaktivierung beruht [76].

Strait *et al.* fanden heraus, dass in IgG1-defizienten Mäusen mu IgG3 Immunkomplexe durch Autoaggregation und Präzipitation in Gefäßen (Kryoglobulinämie) eine letale Nierenschädigung auslösten, was durch spezifisches IgG1 verhindert werden konnte. Zwar wurde diese Beobachtung unabhängig von Komplement- oder FcR-Mechanismen betrachtet, zeigt aber umso mehr, dass die bloße Subklassenverteilung die Zusammensetzung und Größe von Immunkomplexen effektiv moduliert. Die Autoren diskutieren auch, dass hu IgG4 eine ähnliche inhibitorische Rolle einnehmen könnte [70].

Die in dieser Arbeit beobachtete IgG1-vermittelte Inhibition der Komplementaktivierung durch C1q-bindende IgG-Subklassen beruhte sehr wahrscheinlich auf effizienter sterischer Interferenz in Abhängigkeit von der Epitopspezifität und Affinität des mu IgG1 sowie der Antigendichte, zusammengefasst in **Abbildung 4.1**. Nach Zuo *et al.* ist offensichtlich, dass hu IgG4 ähnlich funktionieren kann [65], wenn nicht sogar wirksamer ist. Ein einzigartiges Serin an Position 228 zusätzlich zu R409 erlauben die Interaktion mit dem Fc anderer IgG-Subklassen und unter bestimmten Umständen auch einen Fab-Arm-Austausch, resultierend in bispezifischen Antikörpermolekülen [107–114].



**Abbildung 4.1: Perspektive auf das Potential von mu IgG1 und hu IgG4 die klassische Komplementaktivierung zu inhibieren.** Abbildung teilweise modifiziert aus Lilienthal, G-M *et al.*, Front. Immunol. 2018 [1].

Die Möglichkeit, dass mu IgG1 oder hu IgG4 durch eine antigenabhängige sterische Interferenz die Hexamerformierung anderer IgG-Subklassen verhindern könnte, könnte bedeuten, dass ein einzelnes mu IgG1 oder hu IgG4 Molekül schon ausreicht, um die Hexamerformierung durch

sechs C1q-bindende IgG-Subklassen Moleküle zu stören. Dies Möglichkeit würde dem mu IgG1 oder hu IgG4 eine starke anti-inflammatorische Eigenschaft durch Blockierung der klassischen Komplementaktivierung verleihen.

### **Inhibitorisches Potential von antigenspezifischem murinem IgG1 in maladaptiver Immunreaktion *in vivo***

---

Nach der erfolgreichen Inhibition der IgG2a- und Komplement-medierten Hämolyse mit mu IgG1 *in vitro* war es naheliegend die Rolle des mu IgG1 in einem ähnlichen Modell *in vivo* zu untersuchen. Patienten mit autoimmunhämolytischer Anämie exprimieren anti-Erythrozyten Antikörper, die zur Eliminierung von Erythrozyten führen. Diese beruht auf Komplement-mediierter Lyse, CR- und FcγR-abhängiger Erythrophagozytose durch Kupffer-Zellen und Makrophagen sowie FcγR-abhängiger ADCC [61, 76, 84].

Um eine mögliche IgG1-vermittelte Limitierung der Pathogenese im Mausmodell zu testen, bot sich das Komplement- und FcγR-abhängige Modell der experimentellen autoimmunhämolytischen Anämie an, wofür hoch affine Erythrozytenantigen-spezifische IgG-Subklasse sv Antikörper des Klons 34-3C mit gleicher V(D)J Sequenz im Labor produziert wurden [76].

Entgegen der Erwartung konnte die Zugabe der doppelten Menge von mu IgG1 zu IgG2a oder IgG2b sv (2:1) die Reduktion von Erythrozyten in der Zirkulation von Wildtypmäusen an Tag 3 nicht messbar verhindern. Es konnte sein, dass eine mögliche Inhibition von Komplement durch die Interaktion von IgG2a oder IgG2b mit FcγRIII bzw. auch FcγRI und IV überlagert wurde [115]. In FcγKO-Mäusen konnte eine 1:1 Zugabe von IgG1 zu einer pathogenen Dosis von IgG2a (je 200 µg) die Anämie nicht schwächen (**Abbildung 3.5**).

Durchflusszytometrische Analysen von Erythrozyten 24 Stunden nach Antikörperinjektion in FcγKO-Mäuse im oben erwähnten 1:1 Ansatz mit je 200 µg Antikörper, zeigten, dass IgG1 und IgG2a doppelt positiv an alle Erythrozyten gebunden hatten. Auffällig war, dass trotzdem nur etwa 1/6 der Zellen C3-positiv waren.

Offensichtlich hatte ein 1:1 Verhältnis von IgG1 zu IgG2a nicht ausgereicht, um eine Komplementaktivierung eventuell zu inhibieren. Es könnte sein, dass die anti-Erythrozyten IgG2a-Dosis noch nicht im Überschuss vorlag, also auch keine starke Konkurrenz um Antigenbindstellen mit IgG1 bestehen konnte. Möglicherweise basiert die in diesem Modell beobachtete suboptimale, aber immerhin funktionelle Komplementaktivierung nicht auf der Ausbildung von IgG2a-Hexameren, so dass diese auch schwieriger durch IgG1 zu hemmen wäre. In der Literatur wird diskutiert, dass die Komplementaktivierung neben der Antigenlast auch von der „Natur des Antigens, Effektor- und/oder Zielzellen“ abhängig ist [59]. Entsprechend vorstellbar ist, dass nicht nur die Hexamerformierung für C1q-Bindung, sondern auch die Inhibition dessen

durch sterische Interferenz mit den verschiedenen molekularen Konfigurationen der Antikörper und Antigene variiert [22, 59, 116–119].

Der Einsatz einer höheren IgG1-Ratio ( $> 1:1$ ) war in dem Modell leider nicht möglich, da dies zu starken Messschwankungen führte. Also konnte eine potentielle, inhibitorische Wirkung des IgG1 bei der Komplementaktivierung durch IgG2a in diesem *in vivo* Modell nicht beantwortet werden. Die höheren IgG-Gesamtdosierungen ( $> 400 \mu\text{g}$ ) deuteten auf eine weitere, subklassenunabhängige Erythrozytendepletion hin. Diese funktionierte möglicherweise ähnlich wie die von Baudino *et al.* beschriebene Hämagglutination, in der polymeres IgM und IgA Erythrozyten kreuzvernetzen, und von der Milz aufgenommen werden [117]. Die Daten unterstreichen, dass neben Komplement- und FcR-vermittelten Effekten, jede Krankheit ein höchst individuelles Zusammenspiel von Pathomechanismen birgt.

Zirkulierende Zielzellen könnten deshalb für die hier aufgestellte therapeutische Fragestellung von Nachteil sein. Vor diesem Hintergrund sollte dann auf alternative Krankheitsmodelle mit fester Phase Antigenen zur Untersuchung einer inhibitorischen Wirkung des *mu* IgG1 fokussiert werden.

Immunisierungsinduzierter Toleranzbruch gegenüber murinem Typ VII Kollagen ging unabhängig vom EBA-Schweregrad mit hohen autoantigenspezifischen IgG1-Titern einher (**Abbildung 3.8**). Obwohl nicht klar ist, ob das IgG1 pathogen war, schien es im organspezifischen, stark pro-inflammatorischen Immunstatus der Mäuse keine alles überlagernde Schutzwirkung zu haben. Dies steht zunächst im Kontrast zu Huda *et al.*, die durch Immunisierung von IgG1-defizienten Mäusen Toleranzverlust gegenüber Acetylcholin-Rezeptor mit stärkeren Symptomen einer Myasthenia gravis beobachtet haben. Allerdings beruhte die Verschlimmerung hier auf höherer IgG2a/IgG3-Deposition und somit stärkerer Komplementaktivierung an der neuromuskulären Verbindungsstelle im Vergleich zu entsprechenden IgG1/IgG2b-dominierenden Subklassen in Wildtypmäusen [69]. Man kann spekulieren, dass gänzlich fehlendes IgG1 in EBA-Mäusen deutlich stärkere Symptome ausgelöst hätte.

Im humanen System scheint dies offensichtlicher zu sein, da IgG4 i.d.R. nur einen geringen Anteil vom Gesamt-IgG sowie autoreaktivem IgG ausmacht. Beispielsweise weisen an BP erkrankte Patienten selten hohe Titer an spezifischem IgG4 auf (**Abbildung A.5** und [65]). Dass eine spezifische Anreicherung von IgG4 mit verbesserten Symptomen einhergeht, ist bisher für allergische Zustände, nicht jedoch für entzündliche Antikörper-mediierte Autoimmunerkrankungen beschrieben [66]. Tatsächlich zeigten Zuo *et al.* kürzlich erfolgreich, dass spezifisches BP Patienten IgG4 in humanisierten Mäusen die Bindung von IgG1 und IgG3 mitsamt Komplement-Opsonisierung, Neutrophilen-Infiltration und Blasenbildung blockiert [65].

Nach den in dieser Arbeit durchgeführten Mausmodellen ist anzunehmen, dass die *mu* IgG1-Subklasse antigen- und organabhängig eine mehr oder weniger starke Schutzfunktion ausüben

könnte. Weitere Studien sind notwendig, um zu verstehen, wo mu IgG1/hu IgG4 schützen kann, was zum Beispiel durch genetische Modifizierung wie  $Ig\gamma 1^{-/-}$  oder Depletion von IgG1 in Antiserum und Übertragung auf naive Mäuse erreicht werden kann. Für eine Substitutionstherapie sollte außerdem ermittelt werden, welches Niveau mu IgG1/hu IgG4 gegenüber den anderen Subklassen haben muss, um zu schützen, und ab wann eine potentielle, ungewollte Wirkung wie in der autoimmunhämolytischen Anämie auftritt.

Bei der Auswahl an Modellen ist nicht zu vergessen, dass auch eine Nische hu IgG4-vermittelter Krankheiten existiert, die einen fibro-entzündlichen, potentiell jedes Organ treffbaren Zustand darstellen und auch Fab-medierte Pathomechanismen bestehen [62, 120]. Obwohl IgG4 nur limitiert mit aktivierenden, klassischen Fc-Rezeptoren interagiert, stellt sich die Frage, ob diese Autoantikörper eine agalactosylierte Fc N-Glykosylierung aufweisen und ob eine Sialylierung ihre Pathogenität reduzieren, wenn nicht sogar anti-inflammatorisch wirken könnte.

Hiernach sollte die Relevanz einer antigenspezifischen IgG4-Therapie für Transfusions-assoziierte Krankheiten klarer sein, da hier nur eine limitierte pathogene Antikörpermenge vom Spender auf den Akzeptor übertragen wird. Im Empfänger könnte hochaffines, therapeutisches IgG4, i.v. appliziert, in der Konkurrenz um Antigenbindung gut gegen die Spenderantikörper ankommen. In dem von Strait *et al.* identifizierten primär Komplement-abhängigen Pathomechanismus im Mausmodell TRALI binden anti-H-2<sup>d</sup> monoklonale IgG2a an H-2<sup>d</sup> MHCI auf vaskulären Endothelzellen. Nach Komplementaktivierung wirkt die C5a/C5aR-Achse chemotaktisch und aktivierend auf Monozyten/Makrophagen in Blutgefäßen der Lunge. Dort sekretieren sie reaktive Sauerstoff-Intermediate, wodurch das Endothel beschädigt wird, Flüssigkeit und Proteine in das Lungenparenchym einströmen können und so ein nichtkardiogenes Lungenödem verursachen [89]. Dieses und weitere Folgesymptome wie akute Hypoxämie treten im Menschen innerhalb oder nach 6 Stunden auf, wobei viele Patienten eine schwere Morbidität durchleben, die in 5-10 % tödlich ist [86].

Von höchstem Interesse ist demnach die Testung des in dieser Arbeit erfolgreich hergestellten, murinen anti-MHCI (H-2<sup>d</sup>) IgG1, *switch-variant* des IgG2a Klon 34-1-2s, der für das TRALI-Modell bereits dem Labor von Prof. Dr. Fred Finkelman, Cincinnati Children's Hospital Medical Center (Cincinnati, OH, USA) zur Verfügung gestellt wurde (**Abbildung 3.7**). Dort wird basierend auf dem BALB/c-Modell in Strait *et al.* die inhibitorische Wirkung von IgG1 gegenüber IgG2a-mediierter Komplementaktivierung auf vaskulären Endothelzellen und Folgeerscheinungen getestet [89].

## Inhibitorisches Potential von sialylierten IgG Autoantikörpern

---

Als nächste vielversprechende anti-inflammatorische Eigenschaft von IgG Antikörpern wurde die Fc-N297-Sialylierung in dem Modell der passiven lokalen EBA betrachtet. Hierin verursacht die Bindung von IgG Antikörpern an Kollagen Typ VII eine Komplement- und Fc $\gamma$ R-medierte Entzündung mit subepidermaler Blasenbildung durch die Zerstörung der Verankerung zwischen Dermis und Basalmembran (**Abbildung A.1**; **Abbildung A.2**) [64]. Die lineare Deposition von IgG an eine feste Phase, aber auch die kurze Beobachtungszeit von nur 48 Stunden sowie die Möglichkeit verschiedenster Analysemethoden sprachen für die Nutzung dieses Modells. Murine Studien der passiven EBA werden der Literatur nach mit polyklonalem Kollagen Typ VII-spezifischem Kaninchen IgG durchgeführt, pathogene monoklonale Antikörper sind nicht beschrieben [79, 91, 121]. Die Kaninchenspezies besitzt allerdings nur ein C $\gamma$ -Gen [122]. Da jedoch die Fc N-Glykosylierung die IgG-Subklassen Funktion unterschiedlich stark zu modulieren scheint, sollte das Antiserum von vWFA2-immunisierten Mäusen für die passive EBA verwendet werden (**Abbildung 3.8**) [42, 43, 50, 54, 77].

vWFA2 in TiterMax immunisierte Tiere entwickelten unabhängig vom klinischen Schweregrad neben IgG2b und IgG2c auch hohe IgG1-Titer (**Abbildung 3.8**). Glykoanalysen zu einem Zeitpunkt erster eindeutiger EBA-Symptome sowie einem späten Zeitpunkt wiesen auf eine reduzierte Sialylierung der antigenspezifischen IgG Antikörper im Vergleich zum Gesamt-IgG von nicht erkrankten, mit Adjuvans allein immunisierten Tieren hin (**Abbildung 3.9**). Diese Beobachtung geht mit der Assoziation einer geringen Sialylierung und Galactosylierung in anderen Autoimmunerkrankungen einher [31] und deutet auf eine in der Induktionsphase stattfindende Regulation der Autoantikörper-Glykosylierung hin [30, 42, 43, 54].

Die Arbeiten von Ohmi *et al.* sowie Bartsch *et al.* zeigten, dass die Entwicklung von autoimmuner Entzündung in RA durch Eingreifen in die Entstehungsphase moduliert werden kann. Die anti-inflammatorische Wirkung resultierte aus passiv transferiertem sialyliertem, autoreaktivem IgG, welche das Priming der spezifischen T- und B-Zellen und somit die Entstehung pathogener Antikörper beeinflusste [44, 45].

Hiernach stellte sich die Frage, wie verschieden glykosylierte, autoreaktive IgG Antikörper in der Effektorphase wirken. Es sollte getestet werden, ob eine *ex vivo* durchgeführte Galactosylierung und Sialylierung von EBA IgG Autoantikörpern die Pathogenität verringern würde.

48 Stunden nach subkutanem Transfer von nativem und *ex vivo* sialyliertem EBA Gesamt-IgG in die Ohren von Wildtypmäusen zeigte sich eine tendenziell verringerte Pathogenität des sialylierten IgG im Vergleich zur nativen, gering sialylierten Variante (**Abbildung 3.11**). Um die Tendenz zu interpretieren, soll hier der Pathomechanismus passiver EBA beleuchtet werden.

Der erste Schritt zur Entzündung nach Bindung von IgG an Typ VII Kollagen ist die klassische und alternative Komplementaktivierung [64, 123]. Das entstandene C5a löste die gesteigerte

vaskuläre Permeabilität aus, was aufgrund der gefundenen Ohrschwellung auf beide Gruppen zutraf, wobei signifikant reduziert mit sialyliertem IgG (**Abbildung 3.11**). Es ist fraglich, ob der Unterschied auf eine verringerte Interaktion von sialylierten mu IgG mit C1q zurückzuführen ist, welche nach Quast *et al.* zumindestens für hu IgG1 zutrifft [58]. Neuere Arbeiten mit 20 verschiedenen Glykoformen von hu IgG1 widerlegen diese Aussage jedoch und eigene Arbeiten mit verschiedenen glykosylierten murinen anti-TNP IgG2a wiesen keine differenzierte C1q-Bindung im ELISA auf ([59] und Daten nicht gezeigt). Um dies zu überprüfen, sind Wiederholungsversuche notwendig, in denen dann an der dermo-epidermalen Junktionszone deponiertes Komplement C3 immunhistochemisch nachzuweisen wären.

Nichtsdestotrotz, führten sowohl nativ glykosyliertes als auch *ex vivo* sialyliertes EBA Gesamt-IgG zu einer ausreichend starken C5a/C5aR-Achse mit Hochregulierung des Adhäsionsmoleküls CD18 und Extravasation von neutrophilen Granulozyten in die Haut, was anhand der vergleichbaren MPO Werte gezeigt wurde [92, 124]. Allerdings reflektiert dieses Maß auch nur den Zustand noch nicht aktivierter Neutrophile zum Versuchsende, jedoch keine vorangegangene Neutrophilen Aktivierung, die bereits kleinere Unterschiede ausmachen könnten (**Abbildung 3.11; Abbildung A.2**).

Infiltrierte Neutrophile interagieren via Fc-Rezeptoren mit IgG und werden je nach intrazellulärer Signaldomäne aktiviert. Aufgrund der Pathologie beider Gruppen ist anzunehmen, dass antigengebundenes, sialyliertes wie auch nativ glykosyliertes IgG2b und IgG2c v.a. mit FcγRIV und der hohe IgG1 Anteil auch mit dem geringer affinen FcγRIII interagiert und so zur ITAM-Phosphorylierung und Aktivierung der Neutrophilen führten [29, 125]. Die folgende ROS-Ausschüttung zerstört umliegendes Gewebe, und die Entzündung wird durch Neutrophile Proteasen und Mediatoren noch gesteigert wird (**Abbildung A.2**) [126, 127].

Angesichts dieser komplexen, sich selbst verstärkenden Mechanismen ist leicht vorzustellen, dass ein starkes Verhältnis von inhibitorischen gegenüber aktivierenden FcγR auf den infiltrierten Effektorzellen präsent sein muss, um die Pathogenität zu begrenzen. Zwar ist beschrieben, dass das EBA Autoantikörpertransfer-Modell in Mäusen defizient in der Expression von inhibitorischen FcγRIIb mit stärkeren Symptomen einhergeht [125], wohl aber reicht die basale Expression von FcγRIIb und C-Typ Lektin-Rezeptoren in naiven Wildtypmäusen nicht für die effiziente Suppression aus. Es ist bekannt, dass die i.p.- oder i.v.-Verabreichung sialylierter Antikörper in Form von IVIg, löslichen Immunkomplexen oder spezifischen IgG-Monomeren via Interaktion mit C-Typ Lektin-Rezeptoren einen immunregulatorischen Impuls setzen können. Dieser wirkt sich zeitabhängig und unspezifisch anti-inflammatorisch auf Effektorzellen aus [46, 50, 54]. Darüber hinaus konnte der Transfer von IVIg oder sialylierten IgG Fc-Fragment-geprägten DC oder Makrophagen eine Autoimmunpathologie in anderen Mäusen unterdrücken [56].

Eine antigenspezifische, immunregulatorische Bedeutung scheint die Autoantikörper Fc N-Glykosylierung durch die enge Verknüpfung mit der folgenden Rezeptorexpression jedoch nur

in ihrer Entstehungsphase zu haben, was mit den EBA-Glykoanalysen in **Abbildung 3.9** einhergeht. Entsprechend scheint die *ex vivo* herbeigeführte Autoantikörper-Sialylierung bei der hier durchgeführten, einmaligen Anwendung in der Effektorphase zwar ein etwas geringeres inflammatorisches Potential zu haben, stellt in dieser Form jedoch keine therapeutische Option dar. In Zukunft sollten die bisher durchgeführten Versuche mit spezifischem IgG in einer höheren Dosierung wiederholt werden. Dabei sollte *ex vivo* sialyliertes IgG mit *ex vivo* de-sialylierten und de-galactosylierten IgG Antikörpern verglichen werden. Auf diese Weise könnte der inhibitorische Effekt der Sialylierung deutlicher werden. Dies würde zunächst die Immunisierung weiterer Mäuse mit vWFA2 in TiterMax erfordern.

Weiterhin vielversprechend wäre die Etablierung eines kombinierten aktiven und passiven EBA-Modells, in das man zu einem frühen Zeitpunkt mit sialylierten Typ VII Kollagen IgG Antikörpern eingreifen würde und dabei, wie für Arthritismodelle gezeigt, eventuell die T- und B-Zellantworten supprimieren könnte [44, 45]. Hierzu könnte man auch auf das passiv systemische EBA-Modell zurückgreifen, worin Typ VII Kollagen IgG Antikörper wiederholt, systemisch injiziert werden [79]. Möglicherweise könnten die durch wiederholte Verabreichung gebildeten, sialylierten autoreaktiven Immunkomplexe Effektorzellen zur verstärkten Expression inhibitorischer Rezeptoren beeinflussen und auf diesem Weg das Immunsystem langfristig antigenspezifisch modulieren.

### **Schlussfolgerung und Ausblick**

---

Die *in vitro*-Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass mu IgG1 die klassische Komplementaktivierung durch mu IgG2a, IgG2b und IgG3 inhibieren kann. Um diese inhibitorische Rolle des mu IgG1 *in vivo* zu untersuchen, müssen Mausmodelle etabliert werden, in denen die Immunantwort vorrangig über den klassischen Komplementsignalweg aktiviert wird und weniger über Fc $\gamma$ -Rezeptoren. Alternativ müssen entsprechende Modelle in FcR $\gamma$ -Kette-defizienten Mäusen durchgeführt werden.

Das hier etablierte Hämolyse-Mausmodell in FcR $\gamma$ -Kette-defizienten Mäusen erwies sich als ungeeignet, da hier die nötigen hohen IgG-Subklassenmengen, um den klassischen Komplementweg zu untersuchen, sehr wahrscheinlich zu Agglutinationen führten. Die Anwendung der murinen anti-MHCI IgG1 Antikörper im stark Komplement-abhängigen Transfusionsmodell und auch die Untersuchung zur Rolle von murinen anti-Typ VII Kollagen IgG1 Autoantikörpern im aktiven und passiven EBA Modell sind vielversprechend und sollen im Anschluss dieser Arbeit weiter analysiert werden.

Die ersten Untersuchungen mit sialylierten autoantigenspezifischen IgG Antikörpern im passiven EBA Modell zeigen tendenziell, dass sialylierte IgG Autoantikörper in der Effektorphase etwas weniger inflammatorisch wirken könnten als nicht-sialylierte IgG Autoantikörper. In der

Literatur wurden inhibitorische Wirkungen mit sialylierten antigenspezifischen IgG Antikörpern insbesondere in aktiven Modellen gezeigt, und dabei suppressive Wirkungen auf nachfolgende T- und B-Zellantworten nachgewiesen. Im Anschluss dieser Arbeit sollen deshalb inhibitorische Wirkungen von sialylierten Antikörpern in frühen Stadien des aktiven EBA Mausmodells analysiert werden.

Zusammenfassend könnten die in dieser Arbeit gezeigten und zukünftige Arbeiten dazu beitragen, in Zukunft die Entstehung und Wirkung der IgG-Subklassenverteilung und Art der IgG Fc N-Glykosylierung während einer Immunreaktion besser zu verstehen und, um ein mögliches inhibitorisches Potential von sialylierten mu IgG1 und hu IgG4 Antikörpern weiter zu untersuchen.

# LITERATURVERZEICHNIS

---

- [1] Lilienthal G-M, Rahmüller J, ... Ehlers M (2018) Potential of Murine IgG1 and Human IgG4 to Inhibit the Classical Complement and Fc $\gamma$  Receptor Activation Pathways. *Front Immunol* 9(May):958.
- [2] Murphy K, Travers P, ... Janeway C (2012) *Immunobiology* eds Schanck D, Scobie J (Garland Science, New York). 8. Auflage.
- [3] Liszewski MK, Kolev M, ... Kemper C (2013) Intracellular Complement Activation Sustains T Cell Homeostasis and Mediates Effector Differentiation. *Immunity* 39(6):1143–1157.
- [4] Müller-Eberhard, HJ; Calcott M (1966) Interaction between C'1q and  $\gamma$ G-globulin. *Immunochemistry* 3(6):500.
- [5] Müller-Eberhard HJ (1979) The Molecular Dynamics and Biochemistry of Complement. *Modulation of Protein Function* (Elsevier), pp 219–232.
- [6] Reid KBM, Porter RR (1981) The proteolytic activation systems of complement. *Annu Rev Biochem* 50:433.
- [7] Sim RB, Dodds AW (1997) The complement system: an introduction. *Complement: A Practical Approach*, eds Dodds AW, Sim RB (Higher Education Press and Springer-Verlag, Oxford), pp 1–18.
- [8] Fearon DT, Austen KF (1975) Initiation of C3 cleavage in the alternative complement pathway. *J Immunol* 115(5):1357–61.
- [9] Medicus RG, Götze O, Müller-Eberhard HJ (1976) Alternative pathway of complement: recruitment of precursor properdin by the labile C3/C5 convertase and the potentiation of the pathway. *J Exp Med* 144(4):1076–93.
- [10] Pangburn MK, Müller-Eberhard HJ (1986) The C3 convertase of the alternative pathway of human complement. Enzymic properties of the bimolecular proteinase. *Biochem J* 235(3):723–730.
- [11] Fearon DT, Austen KF (1975) Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med* 142(4):856–863.
- [12] DiScipio RG (1981) The binding of human complement proteins C5, factor B, beta 1H and properdin to complement fragment C3b on zymosan. *Biochem J* 199(3):485–96.
- [13] Hourcade DE (2006) The role of properdin in the assembly of the alternative pathway C3 convertases of complement. *J Biol Chem* 281(4):2128–32.
- [14] Melis JPM, Strumane K, ... Parren PWHI (2015) Complement in therapy and disease. *Mol Immunol* 67(2):1–14.
- [15] Jefferis R (2012) Isotype and glycoform selection for antibody therapeutics. *Arch Biochem Biophys* 526(2):159–66.
- [16] Mestas J, Hughes CCW (2004) Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J Immunol* 172(5):2731–2738.
- [17] Longerich S, Basu U, ... Storb U (2006) AID in somatic hypermutation and class switch recombination. *Curr Opin Immunol* 18(2):164–174.
- [18] Gonzalez-Quintela A, Alende R, ... Vidal C (2008) Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clin Exp Immunol* 151(1):42–50.
- [19] Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T (2014) IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Front Immunol* 5(OCT):1–17.
- [20] Wu Y, West A, ... Bjorkman P (2013) Structural basis for enhanced HIV-1 neutralization by a dimeric immunoglobulin g form of the glycan-recognizing antibody 2G12. *Cell Rep* 5(5):1443–1455.
- [21] Davies AM, Jefferis R, Sutton BJ (2014) Crystal structure of deglycosylated human IgG4-Fc. *Mol Immunol* 62(1):46–53.
- [22] Diebolder C a, Beurskens FJ, ... Parren PWHI (2014) Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science* (80- ) 343(6176):1260–3.
- [23] Wang G, de Jong RN, ... Heck AJR (2016) Molecular Basis of Assembly and Activation of Complement Component C1 in Complex with Immunoglobulin G1 and Antigen. *Mol*

- Cell* 63(1):135–145.
- [24] Hussain R, Dawood G, ... Ellner JJ (1995) Selective increases in antibody isotypes and immunoglobulin G subclass responses to secreted antigens in tuberculosis patients and healthy household contacts of the patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2(6):726–32.
- [25] Chemouny JM, Hurtado-Nedelec M, ... Monteiro RC (2016) Protective role of mouse IgG1 in cryoglobulinaemia; Insights from an animal model and relevance to human pathology. *Nephrol Dial Transplant* 31(8):1235–1242.
- [26] Unkeless JC, Scigliano E, Freedman VH (1988) Structure and Function of Human and Murine Receptors for IgG. *Annu Rev Immunol* 6:1:251–281.
- [27] Bruhns P, Jönsson F (2015) Mouse and human FcR effector functions. *Immunol Rev* 268(1):25–51.
- [28] Nimmerjahn F, Ravetch J V (2008) Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8(1):34–47.
- [29] Nimmerjahn F, Ravetch J V (2008) Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annu Rev Immunol* 26(6157):513–33.
- [30] Collin M, Ehlers M (2013) The carbohydrate switch between pathogenic and immunosuppressive antigen-specific antibodies. *Exp Dermatol* 22(8):511–4.
- [31] Alter G, Ottenhoff THM, Joosten SA (2018) Antibody glycosylation in inflammation, disease and vaccination. *Semin Immunol* 39(May):102–110.
- [32] Albert H, Collin M, ... Nimmerjahn F (2008) In vivo enzymatic modulation of IgG glycosylation inhibits autoimmune disease in an IgG subclass-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci* 105(39):15005–15009.
- [33] Nandakumar KS, Collin M, ... Holmdahl R (2013) Dominant suppression of inflammation by glycan-hydrolyzed IgG. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(25):10252–7.
- [34] Kao D, Danzer H, ... Nimmerjahn F (2015) A Monosaccharide Residue Is Sufficient to Maintain Mouse and Human IgG Subclass Activity and Directs IgG Effector Functions to Cellular Fc Receptors. *Cell Rep* 13(11):2376–2385.
- [35] Mimura Y, Katoh T, ... Rudd PM (2018) Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: challenges for the safety, functionality and efficacy. *Protein Cell* 9(1):47–62.
- [36] Rook GAW, Steele J, ... Rademacher TW (1991) Changes in IgG glycoform levels are associated with remission of arthritis during pregnancy. *J Autoimmun* 4(5):779–794.
- [37] Pasek M, Duk M, ... Krotkiewski H (2006) Galactosylation of IgG from rheumatoid arthritis (RA) patients - Changes during therapy. *Glycoconj J* 23(7–8):463–471.
- [38] Van Beneden K, Coppieters K, ... Elewaut D (2009) Reversible changes in serum immunoglobulin galactosylation during the immune response and treatment of inflammatory autoimmune arthritis. *Ann Rheum Dis* 68(8):1360–1365.
- [39] Förger F, Østensen M (2010) Is IgG galactosylation the relevant factor for pregnancy-induced remission of rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther* 12(1):108.
- [40] van de Geijn FE, Wuhler M, ... Dolhain RJ (2009) Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study. *Arthritis Res Ther* 11(6):R193.
- [41] Scherer HU, van der Woude D, ... Toes REM (2010) Glycan profiling of anti-citrullinated protein antibodies isolated from human serum and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 62(6):1620–9.
- [42] Oefner CM, Winkler A, ... Ehlers M (2012) Tolerance induction with T cell-dependent protein antigens induces regulatory sialylated IgGs. *J Allergy Clin Immunol* 129(6):1647–55.
- [43] Hess C, Winkler A, ... Ehlers M (2013) T cell-independent B cell activation induces immunosuppressive sialylated IgG antibodies. *J Clin Invest* 123(9):3788–96.
- [44] Bartsch YC, Rahmöller J, ... Ehlers M (2018) Sialylated Autoantigen-Reactive IgG Antibodies Attenuate Disease Development in Autoimmune Mouse Models of Lupus Nephritis and Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* 9(June):1183.
- [45] Ohmi Y, Ise W, ... Furukawa K (2016) Sialylation converts arthritogenic IgG into inhibitors of collagen-induced arthritis. *Nat Commun* 7:1–12.
- [46] Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch J V (2006) Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science (80- )* 313(5787):670–3.
- [47] Anthony RM, Wermeling F, ... Ravetch J V (2008) Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(50):19571–8.

- [48] Anthony RM, Ravetch J V (2010) A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs. *J Clin Immunol* 30 Suppl 1(6157):9–14.
- [49] Anthony RM, Wermeling F, Ravetch J V (2012) Novel roles for the IgG Fc glycan. *Ann N Y Acad Sci* 1253(6157):170–80.
- [50] Karsten CM, Pandey MK, ... Köhl J (2012) Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nat Med* 18(9):1401–6.
- [51] Schwab I, Biburger M, ... Nimmerjahn F (2012) IVIg-mediated amelioration of ITP in mice is dependent on sialic acid and SIGNR1. *Eur J Immunol* 42(4):826–30.
- [52] Yamada K, Ito K, ... Izui S (2013) Galactosylation of IgG1 modulates FcγRIIB-mediated inhibition of murine autoimmune hemolytic anemia. *J Autoimmun* 47:104–10.
- [53] Fiebiger BM, Maamary J, ... Ravetch J V. (2015) Protection in antibody- and T cell-mediated autoimmune diseases by antiinflammatory IgG Fcs requires type II FcRs. *Proc Natl Acad Sci* 112(18):E2385–E2394.
- [54] Epp A, Hobusch J, ... Ehlers M (2018) Sialylation of IgG antibodies inhibits IgG-mediated allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol* 141(1):399–402.e8.
- [55] Pincetic A, Bournazos S, ... Ravetch J V (2014) Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 15(8):707–716.
- [56] Brückner C, Lehmann C, ... Nimmerjahn F (2017) Sweet SIGNs: IgG glycosylation leads the way in IVIG-mediated resolution of inflammation. *Int Immunol* 29(11):499–509.
- [57] Sondermann P, Pincetic A, ... Ravetch J V (2013) General mechanism for modulating immunoglobulin effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(24):9868–72.
- [58] Quast I, Keller CW, ... Lünemann JD (2015) Sialylation of IgG Fc domain impairs complement-dependent cytotoxicity. *J Clin Invest* 125(11):4160–4170.
- [59] Dekkers G, Rispens T, Vidarsson G (2018) Novel Concepts of Altered Immunoglobulin G Galactosylation in Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 9(MAR):553.
- [60] Suurmond J, Diamond B (2015) Autoantibodies in systemic autoimmune diseases: specificity and pathogenicity. *J Clin Invest* 125(6):2194–2202.
- [61] Barcellini W (2015) New insights in the pathogenesis of autoimmune hemolytic anemia. *Transfus Med Hemotherapy* 42(5):287–293.
- [62] Huijbers MG, Plomp JJ, ... Verschuuren JJ (2018) IgG4-mediated autoimmune diseases: a niche of antibody-mediated disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1413(1):92–103.
- [63] Ehlers M, Fukuyama H, ... Ravetch J V (2006) TLR9/MyD88 signaling is required for class switching to pathogenic IgG2a and 2b autoantibodies in SLE. *J Exp Med* 203(3):553–61.
- [64] Sitaru C, Chiriac MT, ... Zillikens D (2006) Induction of Complement-Fixing Autoantibodies against Type VII Collagen Results in Subepidermal Blistering in Mice. *J Immunol* 177(5):3461–3468.
- [65] Zuo Y, Evangelista F, ... Liu Z (2016) IgG4 autoantibodies are inhibitory in the autoimmune disease bullous pemphigoid. *J Autoimmun* 73:1–9.
- [66] van der Zee JS, van Swieten P, Aalberse RC (1986) Inhibition of complement activation by IgG4 antibodies. *Clin Exp Immunol* 64(2):415–422.
- [67] Akdis CA, Akdis M (2015) Advances in allergen immunotherapy : Aiming for complete tolerance to allergens. *Sci Tranl Med* 7(280):1–6.
- [68] Larché M, Akdis C a, Valenta R (2006) Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6(10):761–71.
- [69] Huda R, Strait RT, ... Christadoss P (2015) IgG1 deficiency exacerbates experimental autoimmune myasthenia gravis in BALB/c mice. *J Neuroimmunol* 281:68–72.
- [70] Strait RT, Posgai MT, ... Finkelman FD (2015) IgG1 protects against renal disease in a mouse model of cryoglobulinaemia. *Nature* 517(7535):501–504.
- [71] Rademacher TW, Williams P, Dwek R a (1994) Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(13):6123–7.
- [72] Tiller T, Busse CE, Wardemann H (2009) Cloning and expression of murine Ig genes from single B cells. *J Immunol Methods* 350(1–2):183–93.
- [73] Tiller T, Kofer J, ... Wardemann H (2010) Development of self-reactive germinal center B cells and plasma cells in autoimmune Fc gammaRIIB-deficient mice. *J Exp Med* 207(12):2767–78.
- [74] Tiller T, Meffre E, ... Wardemann H (2008) Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector

- cloning. *J Immunol* 329(D):112–124.
- [75] Whaley K, North J (1997) Haemolytic assays for whole complement activity and individual components. *Complement: A Practical Approach*, eds Dodds AW, Sim RB (Higher Education Press and Springer-Verlag, Oxford), p 19–48.
- [76] Azeredo da Silveira S, Kikuchi S, ... Izui S (2002) Complement activation selectively potentiates the pathogenicity of the IgG2b and IgG3 isotypes of a high affinity anti-erythrocyte autoantibody. *J Exp Med* 195(6):665–672.
- [77] Ito K, Furukawa J, ... Izui S (2014) Lack of galactosylation enhances the pathogenic activity of IgG1 but Not IgG2a anti-erythrocyte autoantibodies. *J Immunol* 192(2):581–8.
- [78] Iwata H, Bieber K, ... Ludwig RJ (2013) B Cells, Dendritic Cells, and Macrophages Are Required To Induce an Autoreactive CD4 Helper T Cell Response in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. *J Immunol* 191(6):2978–2988.
- [79] Bieber K, Koga H, Nishie W (2017) In vitro and in vivo models to investigate the pathomechanisms and novel treatments for pemphigoid diseases. *Exp Dermatol* 26(12):1163–1170.
- [80] Kavran JM, Leahy DJ (2014) Coupling Antibody to Cyanogen Bromide-Activated Sepharose. *Methods Enzymol* 541:27–34.
- [81] Karlsson MC, Wernersson S, ... Heyman B (1999) Efficient IgG-mediated suppression of primary antibody responses in Fcγ receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5):2244–9.
- [82] Giorgini A, Brown HJ, ... Robson MG (2008) Fc RIII and Fc RIV Are Indispensable for Acute Glomerular Inflammation Induced by Switch Variant Monoclonal Antibodies. *J Immunol* 181(12):8745–8752.
- [83] Strait RT, Thornton S, Finkelman FD (2016) Cγ1 Deficiency Exacerbates Collagen-Induced Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 68(7):1780–1787.
- [84] Molina H, Miwa T, ... Song WC (2002) Complement-mediated clearance of erythrocytes: Mechanism and delineation of the regulatory roles of Crry and DAF. *Blood* 100(13):4544–4549.
- [85] Shibata T, Berney T, ... Izui S (1990) Monoclonal anti-erythrocyte autoantibodies derived from NZB mice cause autoimmune hemolytic anemia by two distinct pathogenic mechanisms. *Int Immunol* 2(12):1133–41.
- [86] Looney MR (2016) Current concepts in TRALI pathogenesis. *ISBT Sci Ser* 11:206–210.
- [87] Looney MR (2006) Neutrophils and their Fc receptors are essential in a mouse model of transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 116(6):1615–1623.
- [88] Looney MR, Nguyen JX, ... Matthay MA (2009) Platelet depletion and aspirin treatment protect mice in a two-event model of transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 119(11):0–12.
- [89] Strait RTT, Hicks W, ... Finkelman FDD (2011) MHC class I-specific antibody binding to nonhematopoietic cells drives complement activation to induce transfusion-related acute lung injury in mice. *J Exp Med* 208(12):2525–2544.
- [90] Hammers CM, Bieber K, ... Westermann J (2011) Complement-Fixing Anti-Type VII Collagen Antibodies Are Induced in Th1-Polarized Lymph Nodes of Epidermolysis Bullosa Acquisita-Susceptible Mice. *J Immunol* 187(10):5043–5050.
- [91] Kasperkiewicz M, Sadik CD, ... Ludwig RJ (2016) Epidermolysis Bullosa Acquisita: From Pathophysiology to Novel Therapeutic Options. *J Invest Dermatol* 136(1):24–33.
- [92] Mihai S, Hirose M, ... Nimmerjahn F (2018) Specific inhibition of complement activation significantly ameliorates autoimmune blistering disease in mice. *Front Immunol* 9(MAR). doi:10.3389/fimmu.2018.00535.
- [93] Chen M, Doostan A, ... Woodley DT (2007) The cartilage matrix protein subdomain of type VII collagen is pathogenic for epidermolysis bullosa acquisita. *Am J Pathol* 170(6):2009–2018.
- [94] Leineweber S, Schönig S, Seeger K (2011) Insight into interactions of the von-Willebrand-factor-A-like domain 2 with the FNIII-like domain 9 of collagen VII by NMR and SPR. *FEBS Lett* 585(12):1748–1752.
- [95] Wegener H, Leineweber S, Seeger K (2013) The vWFA2 domain of type VII collagen is responsible for collagen binding. *Biochem Biophys Res Commun* 430(2):449–453.
- [96] Samavedam UKSRL, Iwata H, ... Ludwig RJ (2014) GM-CSF modulates autoantibody production and skin blistering in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J*

- Immunol* 192(2):559–71.
- [97] Collin M, Olsén a. (2001) EndoS, a novel secreted protein from *Streptococcus pyogenes* with endoglycosidase activity on human IgG. *EMBO J* 20(12):3046–3055.
- [98] Anthony RM, Nimmerjahn F, ... Ravetch J V (2008) Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science* (80- ) 320(5874):373–6.
- [99] Cook EM, Lindorfer MA, ... Taylor RP (2016) Antibodies That Efficiently Form Hexamers upon Antigen Binding Can Induce Complement-Dependent Cytotoxicity under Complement-Limiting Conditions. *J Immunol* 197(5):1762–1775.
- [100] de Jong RN, Beurskens FJ, ... Parren PWHI (2016) A Novel Platform for the Potentiation of Therapeutic Antibodies Based on Antigen-Dependent Formation of IgG Hexamers at the Cell Surface. *PLOS Biol* 14(1):e1002344.
- [101] Tian X, Vestergaard B, ... Langkilde AE (2015) In-depth analysis of subclass-specific conformational preferences of IgG antibodies. *IUCrJ* 2:9–18.
- [102] Davies AM, Sutton BJ (2015) Human IgG4 : a structural perspective. 139–159.
- [103] Davies AM, Rispens T, ... Sutton BJ (2017) Room temperature structure of human IgG4-Fc from crystals analysed in situ. *Mol Immunol* 81:85–91.
- [104] Kerr M a (1990) The structure and function of human IgA. *Biochem J* 271(2):285–96.
- [105] Lohse S, Peipp M, ... Dechant M (2010) Impact of Human IgA Antibodies on Complement-Dependent Cytotoxicity Mediated by Combinations of EGF-R-Directed Antibodies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 58(4):303–312.
- [106] Woof JM, Ken MA (2006) The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol* 208(2):270–282.
- [107] Cohen PL, Cheek RL, ... Eisenberg RA (1987) The subclass distribution of human IgG rheumatoid factor. *J Immunol* 139(5):1466–71.
- [108] Zack DJ, Stempniak M, ... Weisbart RH (1995) Localization of an Fc-binding reactivity to the constant region of human IgG4. Implications for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 155(10):5057–63.
- [109] Kawa S, Kitahara K, ... Bahram S (2008) A novel immunoglobulin-immunoglobulin interaction in autoimmunity. *PLoS One* 3(2):1–8.
- [110] Rispens T, Ooievaar-De Heer P, ... Aalberse RC (2009) Human IgG4 Binds to IgG4 and Conformationally Altered IgG1 via Fc-Fc Interactions. *J Immunol* 182(7):4275–4281.
- [111] Ito T, Kitahara K, ... Bahram S (2010) A Novel Heterophilic Antibody Interaction Involves IgG4. *Scand J Immunol* 71(2):109–114.
- [112] Rispens T, Meesters J, ... Aalberse RC (2013) Fc-Fc interactions of human IgG4 require dissociation of heavy chains and are formed predominantly by the intra-chain hinge isomer. *Mol Immunol* 53(1–2):35–42.
- [113] van der Neut Kofschoten M, Schuurman J, ... Parren PWHI (2007) Anti-Inflammatory Activity of Human IgG4 Antibodies by Dynamic Fab Arm Exchange. *Science* (80- ) 317(5844):1554–1557.
- [114] Labrijn AF, Buijsse AO, ... Parren PWHI (2009) Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo. *Nat Biotechnol* 27(8):767–771.
- [115] Baudino L, Nimmerjahn F, ... Izui S (2008) Differential contribution of three activating IgG Fc receptors (FcγRI, FcγRIII, and FcγRIV) to IgG2a- and IgG2b-induced autoimmune hemolytic anemia in mice. *J Immunol* 180(3):1948–1953.
- [116] Xia M-Q, Hale G, Waldmann H (1993) Efficient complement-mediated lysis of cells containing the CAMPATH-1 (CDw52) antigen. *Mol Immunol* 30(12):1089–1096.
- [117] Baudino L, Fossati-Jimack L, ... Izui S (2007) IgM and IgA anti-erythrocyte autoantibodies induce anemia in a mouse model through multivalency-dependent hemagglutination but not through complement activation. *Blood* 109(12):5355–5362.
- [118] Teeling JL, Mackus WJM, ... van de Winkel JGJ (2006) The Biological Activity of Human CD20 Monoclonal Antibodies Is Linked to Unique Epitopes on CD20. *J Immunol* 177(1):362–371.
- [119] Bindon CI, And GH, Waldmann H (1988) Importance of Antigen Specificity for Complement-Mediated Lysis by Monoclonal Antibodies. *Eur J Immunol* 18(10):1507–1514.
- [120] Oprea R, Oprea B, ... Diaconescu IB (2017) Overview of IgG4 - Related Disease. *J Med Life* 10(4):203–207.
- [121] Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, ... Amagai M (2017) Pemphigus. *Nat Rev Dis Prim*

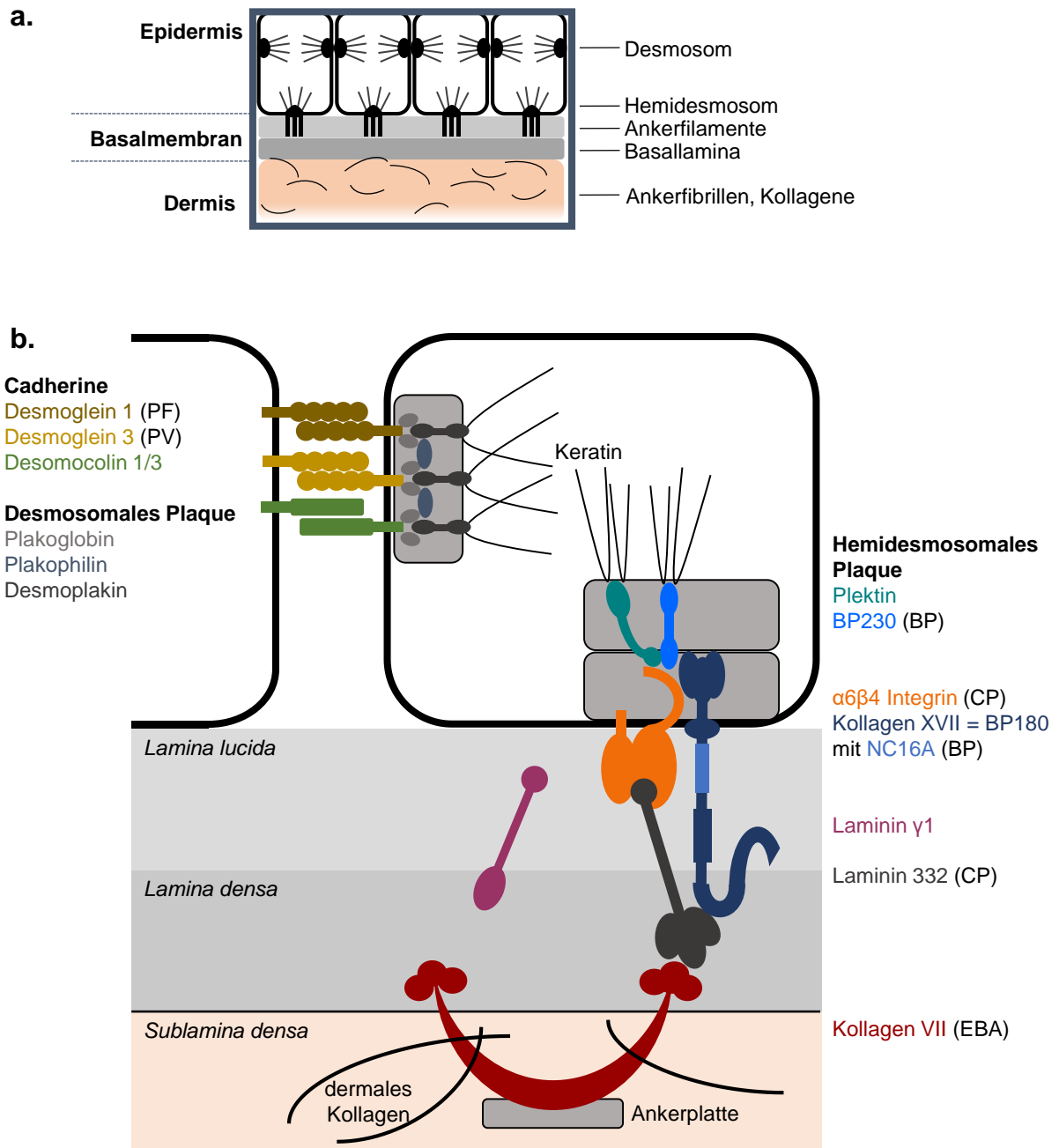
- 3(1 SPEC.ISS.):17026.
- [122] Knight KL, Burnett RC, McNicholas JM (1985) Organization and polymorphism of rabbit immunoglobulin heavy chain genes. *J Immunol* 134(2):1245 LP-1250.
- [123] Mihai S, Chiriac MT, ... Sitaru C (2007) The alternative pathway of complement activation is critical for blister induction in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Immunol* 178(10):6514–6521.
- [124] Yu X, Akbarzadeh R, ... Petersen F (2018) Neutrophil Adhesion Is a Prerequisite for Antibody-Mediated Proteolytic Tissue Damage in Experimental Models of Epidermolysis Bullosa Acquisita. *J Invest Dermatol* 138(9):1990–1998.
- [125] Kasperkiewicz M, Nimmerjahn F, ... Ludwig RJ (2012) Genetic identification and functional validation of FcγR4 as key molecule in autoantibody-induced tissue injury. *J Pathol* 228(May):8–19.
- [126] Chiriac MT, Roesler J, ... Sitaru C (2007) NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage. *J Pathol* 212(1):56–65.
- [127] Sadeghi H, Lockmann A, ... Ludwig RJ (2015) Caspase-1–Independent IL-1 Release Mediates Blister Formation in Autoantibody-Induced Tissue Injury through Modulation of Endothelial Adhesion Molecules. *J Immunol* 194(8):3656–3663.
- [128] Schmidt E, Zillikens D (2010) Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases. *Autoimmun Rev* 10(2):84–89.
- [129] Ludwig RJ (2013) Clinical Presentation, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Epidermolysis Bullosa Acquisita. *ISRN Dermatol* 2013:1–25.
- [130] Culton DA, Liu Z, Diaz LA (2013) *Autoimmune Bullous Skin Diseases-Pemphigus and Pemphigoid* (Elsevier Inc.) doi:10.1016/B978-0-12-384929-8.00065-4.
- [131] Baum S, Sakka N, ... Barzilai A (2014) Diagnosis and classification of autoimmune blistering diseases. *Autoimmun Rev* 13(4–5):482–489.

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

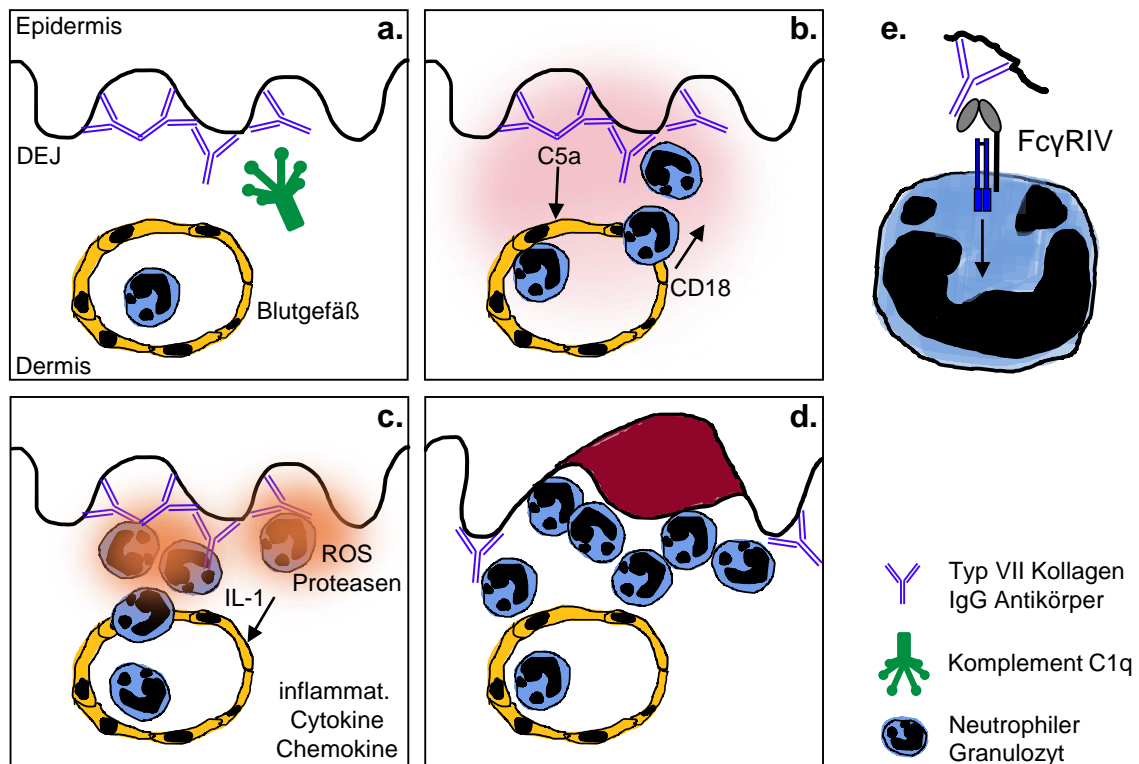
ADCC	<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
AIHA	Autoimmunhämolytische Anämie
amp	Ampicillin
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BP	bullöses Pemphigoid
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDC	<i>Complement-dependent cytotoxicity</i>
CR	<i>Complement receptor</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EBA	Epidermolysis bullosa acquisita
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EndoS	Endoglykosidase S
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
Fc	<i>Fragment crystallizable</i> , kristallisierbare Region des Immunglobulins
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
HC	<i>Heavy chain</i> , schwere Kette des Immunglobulins
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
Ht	Hämatokrit
hu	human
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KO	Knock-out
LC	<i>Light chain</i> , leichte Kette des Immunglobulins
MAC	<i>Membrane attack complex</i> , Membranangriffskomplex
MASP	<i>Mannose-binding protein-associated serine protease</i>
MBL	<i>Mannose-binding lectin</i> , Mannose-bindendes Lektin
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MPO	Myeloperoxidase
mu	murin
OD	Optische Dichte
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
R	Rezeptor
RA	Rheumatoide Arthritis
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sv	<i>switch-variant</i> , IgG-Subklassenwechsel-Variante
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNBS	2,4,6 Trinitrobenzoesäure
TNP	2,4,6 Trinitrophenyl
TRALI	Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz
vWFA2	<i>von-Willebrand-factor-A-like domain 2</i>

# A ANHANG



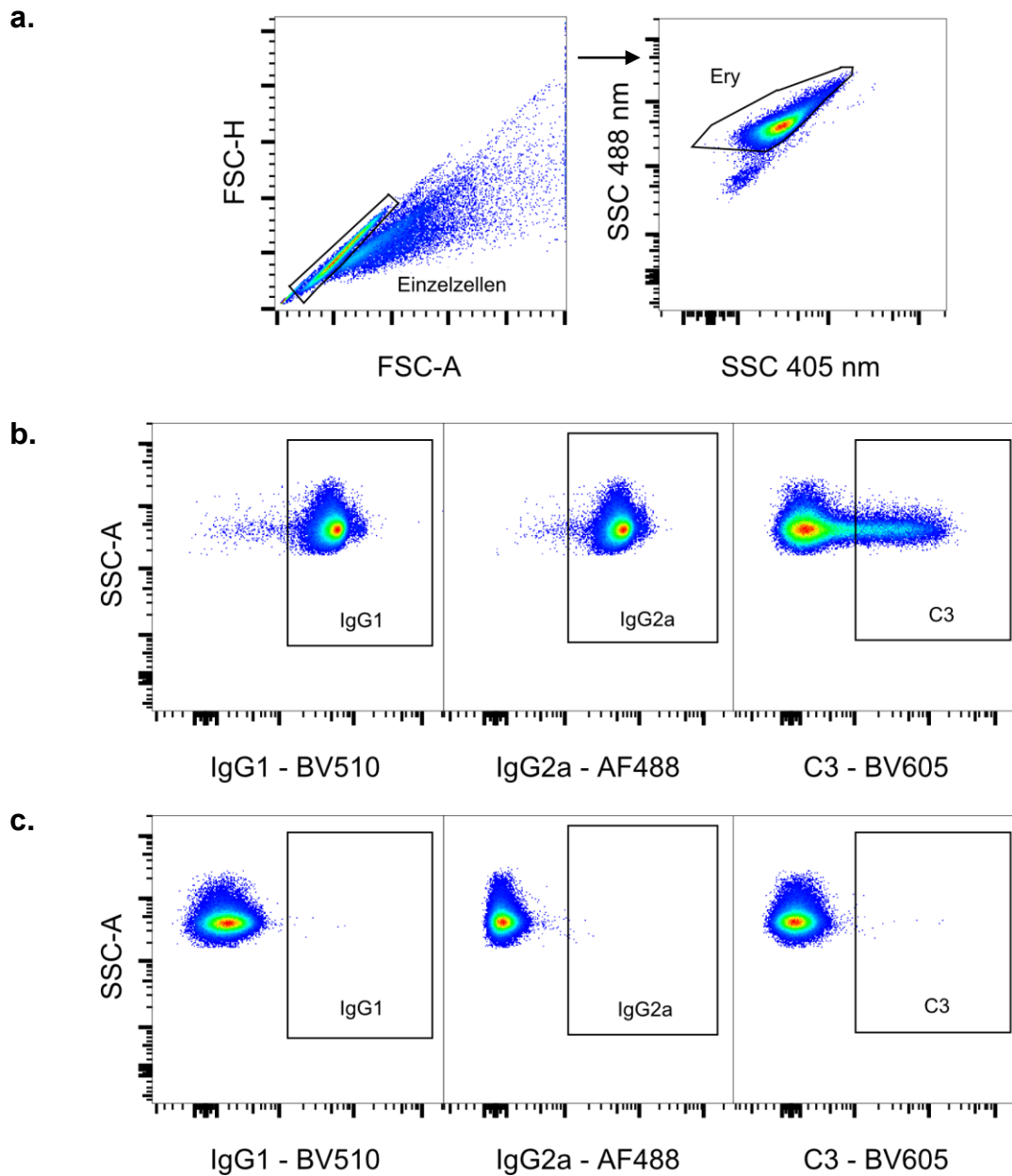
**Abbildung A.1: Autoantikörper bullöser Autoimmundermatosen richten sich gegen Ankerstrukturen in der Haut**

**a.** Übersicht der *Dermoepidermalen Junctionszone*; Hemidesmosomen verknüpfen die untere Epidermis-Zellschicht mit der Basalmembran und werden von weiteren Kollagenen/Ankerfibrillen mit der Dermis zusammengehalten. Desmosomen bilden die interzelluläre Verbindung der Epidermis. Gestörte Protein-Protein Interaktionen durch Autoantikörper-Bindung resultieren in inflammatorischer Gewebeerzörung und subepidermaler oder intraepidermaler Blasenbildung. **b.** beispielhafte Erkrankungstypen mit Autoantigenen; Pemphigus Typ: Pemphigus foliaceus (PF) / vulgaris (PV); Pemphigoider Typ: bullöses Pemphigoid (BP), *Cicatricial Pemphigoid* (CP), *Epi-dermolysis bullosa acquisita* (EBA); in Anlehnung an: [128–131].



### Abbildung A.2: Autoantikörper initiiertes Pathomechanismus der Autoimmundermatose Epidermolysis bullosa acquisita

Autoantigene bullöser Autoimmundermatosen sind Ankerstrukturen, siehe auch Abbildung A.1, **a**. IgG Autoantikörper beispielsweise hier in EBA binden an die vWFA2 Domäne in Kollagen Typ VII in der Dermoepidermalen Junctionszone, gefolgt von klassischer und alternativer Komplementaktivierung **b**. Durch die C5a/C5aR Achse wird die vaskuläre Permeabilität erhöht, Integrine wie CD18 und ICAM-1 werden hochreguliert, gefolgt von der Neutrophilen-Extravasation in die Haut **c**. Die IgG - FcγR Interaktion aktiviert Effektorzellen, Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Proteasen werden ausgeschüttet, pro-inflammatorische Mediatoren wie IL-1, GM-CSF und CXCL-1/2 rekrutieren weitere myeloide Zellen, **d**. Gewebeschäden und Blasenbildung sind die Folge. **e**. Die Effektorzellaktivierung erfolgt via intrazellulärem aktivierendem Adaptermolekül ITAM; in Anlehnung an: [79, 91, 92, 129].



### Abbildung A.3: FACS Strategie AIHA Tag 1

EDTA-Vollblutproben von Tag 1 des Mausmodells autoimmunhämolytische Anämie (AIHA) (Abbildung 3.6 a, c) wurden mit anti-Maus IgG1-BV510, IgG2a-AF488 sowie C3 Biotin mit anschließendem Streptavidin-BV605 gefärbt. **a.** Vorgaten; in der Population von Einzelzellen wurde basierend auf der Absorptionsfähigkeit von Hämoglobin über den 405 nm Side Scatter die Erythrozyten Population identifiziert und für **(b)** und **(c)** ausgewählt. **b.** Exemplarische, vollgefärbte Probe der Gruppe  $200\ \mu\text{g}\ \text{IgG2a} + 200\ \mu\text{g}\ \text{IgG1}$ . **c.** Exemplarische Einzelfärbung; v.l.n.r. Probe der Gruppe  $200\ \mu\text{g}\ \text{IgG2a}$  mit anti-IgG1-BV510, Probe der Gruppe  $200\ \mu\text{g}\ \text{IgG1}$  mit anti-IgG2a-AF488, Probe der Gruppe  $200\ \mu\text{g}\ \text{IgG2a} + 200\ \mu\text{g}\ \text{IgG1}$  mit Streptavidin-BV605.

**Tabelle A.1: Sequenzanalyse Hybridom 34-1-2s (HB-79)**

Durchgeführt von Absolute Antibody (Oxford, Großbritannien); V-Regionen: 5' Race; C-Regionen: Sanger Sequencing; C<sub>L</sub> Signalsequenz mit muriner kappa leichten Kette übereinstimmend, C<sub>H</sub> Signalsequenz aus dem Start der C<sub>H1</sub> Region vereinbar mit mu IgG2a.

<b>HB-79</b>	<b>5' – 3' Sequenz</b>
<i>VJ</i>	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCCTCTCTGG GAGAAAGAGTCACTTGTCTCGGGCAAGTCAGGACATTGGT AGTAACTTAAACTGGCTTCAGCAGGAACCAGATGGAACATTTAA ACGCCTGATCTACGCCACATACAGTTTAGATTCTGGTGTCCCCAA AAGGTTTCAGTGGCAGTAGGTCTGGGTCCGATTATTCTCTCACCAT CAGCAGCCTTGAGTCTGAAGATTTTGTAGACTATTACTGTCTACA ATATGCTAGTTCTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGG AAATAAAA
<i>C<sub>L</sub> Signalpeptidsequenz</i>	ATGAGGGCTCCTGCACAGATTTTTGGCTTCTTGTTGCTCTTGTTTC CAGGTACCAGATGT
<i>VDJ</i>	GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGTTTGTGAGGCCAGG GGCCTCAGTCAAGTTGTCTGCACAGCTTCTGGCTTTAACATTTAA AGACGACTATATGTTTTGGGTGAAACAGAGGCCTGAGCAGGGCC TGGAGTGGATTGGATGGATTGCTCCTGACAATGGTGATACTGAAT ATGCCTCGAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACA TCTCCAACACAGCCTACGTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAG GACACTGCCGTCTATTACTGTACTACATGGGGTTACTATAGTTAC GTAAACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
<i>C<sub>H</sub> Signalpeptidsequenz</i>	ATGAAATGCAGCTGGGTCACTTCTTCCTGATGGCAGTGGTTATA GGGTCAATTCA

**Tabelle A.2: Sequenzanalyse finaler Vektoren nach Umklonierung**

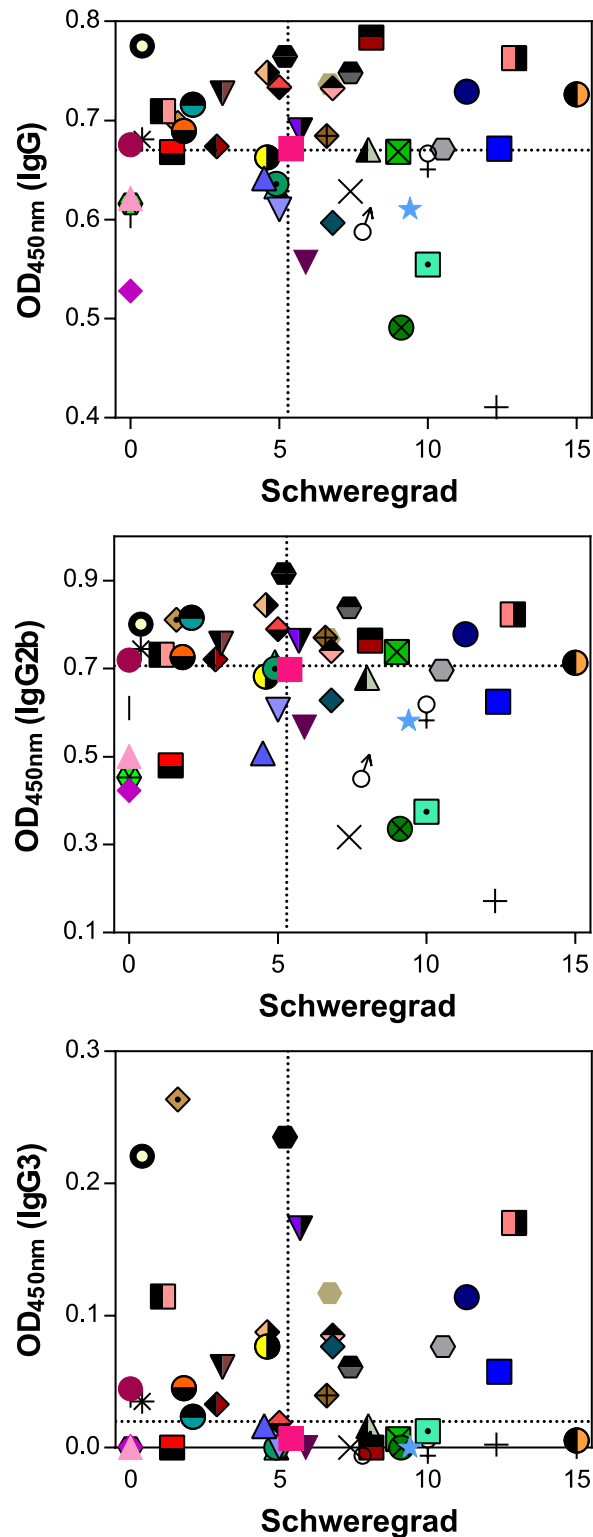
Die VDJ von anti-H-2<sup>d</sup> (MHCI Antigen) IgG2a Klon 34-1-2s (HB-79) wurde in einen murinen Igy1 HC (C57BL/6J) Expressionsvektor eingebracht zwischen die AgeI (gelb) und SalI (grün) Schnittstellen und die VJ in einen murinen (C57BL/6) kappa LC Expressionsvektor zwischen AgeI (gelb) und BsiWI (blau). Cycle Sequencing der finalen Plasmide wurde durchgeführt von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) mit den in Tabelle 2.3 aufgeführten Primern (hier unterstrichen). Ergebnisse sind vereinbar mit theoretischen Sequenzen.

**HB-79 Umkloniert 5' – 3' Sequenz***MHCI mu kappa*

ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGT  
GTACATTCAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCC  
TCTCTGGGAGAAAGAGTCAGTCTCACTTGTCTGGGCAAGTCAGGACAT  
TGGTAGTAACCTAAACTGGCTTCAGCAGGAACCAGATGGAACCTATTA  
AACGCCTGATCTACGCCACATACAGTTTAGATTCTGGTGTCCCCAAAA  
GGTTCAGTGGCAGTAGGTCTGGGTCCGATTATTCTCTCACCATCAGCA  
GCCTTGAGTCTGAAGATTTGTAGACTATTACTGTCTACAATATGCTA  
GTTCTCCGTACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAACGT  
ACCGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCA  
GTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTA  
CCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAAGATTGATGGCAGTGAACGAC  
AAAATGGCGTCTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAG  
CACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATG  
AACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACT  
TCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTGAAAGCTT

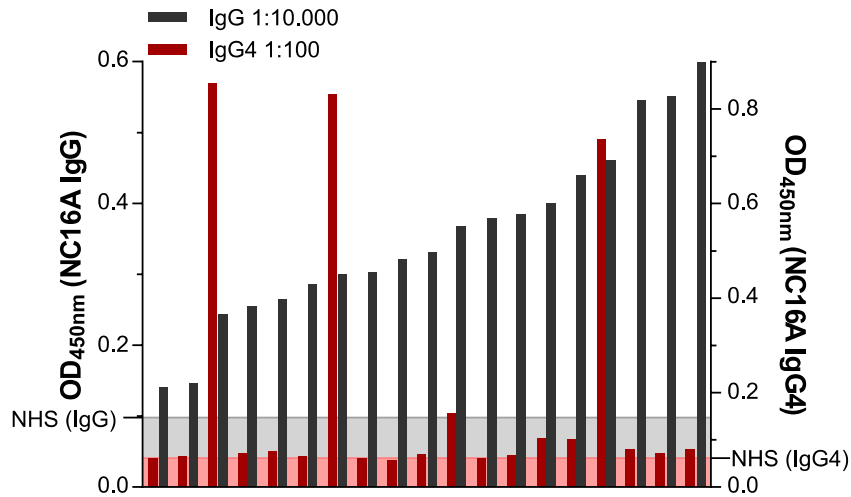
*MHCI mu Igy1*

ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGT  
GTACATTCCGAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGTTTGTGAG  
GCCAGGGCCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTTAACAT  
TAAAGACGACTATATGTTTTGGGTGAAACAGAGGCCCTGAGCAGGGCC  
TGGAGTGGATTGGATGGATTGCTCCTGACAATGGTGATACTGAATAT  
GCCTCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCCTC  
CAACACAGCCTACGTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTG  
CCGTCTATTACTGTACTACATGGGGTTACTATAGTTACGTAAACTACT  
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCGTCGACGACACCC  
CCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAACTCC  
ATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGT  
GACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCT  
TCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTGCACTGA  
CTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCCAGACCGTCACTGCAACGTTG  
CCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAG  
GGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCAATATGTACAGTCCAGAAGTATCATC  
TGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCT  
GACTCCTAAGGTACAGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATC  
CCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACA  
GCTCAGACGAAACCCCGGGAGGAGCAGATCAACAGCACTTTCCGTTC  
AGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGG  
AGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCCCATCGAG  
AAAACCATCTCCAAAACCAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGT  
ACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGT  
CTGACCTGCATGATAACAACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAG  
TGGCAGTGGAAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACTCAGC  
CCATCATGGACACAGATGGCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATG  
TGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTACCTGCTCTGTG  
TTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCA  
CTCTCCTGGTAAATGACGCGTACG



#### Abbildung A.4: vWFA2-spezifischer IgG-Subklassen ELISA

Ergänzende IgG-Subklassendaten zu Abbildung 3.8; vWFA2 beschichtete 96 Well Platten wurden mit dem Maus-individuellem, 1:10.000 verdünntem Serum vWFA2 in TiterMax immunisierter C57BL/6S Mäuse inkubiert und schließlich jede Platte mit einem HRP-konjugierten anti-Maus IgG-Subklassen spezifischen Antikörper und TMB Substrat entwickelt. Exemplarisch gezeigt sind die individuellen ELISA-Werte für IgG, IgG2b und IgG3 als OD bei 450 nm gegen den klinischen Schweregrad. Gepunktete Linien: Median von OD und Schweregrad; Maus-identische Symbolik zwischen den Subklassen sind Mittelwerte abzüglich Negativkontrolle (kein Serum); n=46, Regressionsanalysen waren nicht signifikant.



#### Abbildung A.5: Seltenes Aufkommen von humanem IgG4 im Serum von BP Patienten

NC16A spezifischer ELISA zur Detektion von Typ XVII Kollagen Autoantikörpern im Serum von Patienten mit diagnostizierter Autoimmundermatose bullöses Pemphigoid. In 16 von 19 Patienten war der spezifische IgG4-Titer kaum verschieden vom normalen humanen Serum in diesem ELISA (NHS IgG4; rosa) bei deutlich positiven spezifischen IgG-Werten (Negativkontrolle: NHS IgG; grau); Serumverdünnung für IgG 1:10.000, für IgG4 1:100; Mittelwerte aus Doppelbestimmung, einmaliger Versuch.

# DANKSAGUNG

---

Die Doktorarbeit ist eine Reise durch Neuland: Jeden Tag probiert man etwas Neues und führt eisern Tagebuch. Auf dieser Reise konnte ich sehr viel lernen und entdecken. Ich bin stolz, die Dinge, wie ich sie gefunden habe, veröffentlichen zu können. Doch bei den Neuland-Herausforderungen hätte ich mich ohne die Unterstützung anderer kaum fortbewegen können...

An dieser Stelle möchte ich ein sehr großes Danke aussprechen!

Zunächst einmal möchte ich mich bei Prof. Dr. Marc Ehlers bedanken: Danke für deine stets offene Tür, zahlreiche ermutigende Ratschläge, deine Beharrlichkeit, aber auch dein Verständnis an so mancher Stelle. Danke, dass du mich bis hierhin gefördert hast!

Keine Woche ist vergangen, in der es unserer AG Ehlers an Teamgeist mangelte!

Insbesondere danken möchte ich Yannic Bartsch für die gesamte Verantwortung der HPLC Glykoanalysen, die praktische Unterstützung und viele wissenschaftliche Diskussionen. Ich danke Janina Petry für ihre gut organisierte Laborpraxis, der Unterstützung beim Klonieren, Mäusen und so vielem anderen. Ich hätte in keinem Büro ohne euch zwei sitzen wollen! Ich danke Dr. Alexei Leliavski für „erfahrene“ Ratschläge, ich vermisse unsere Gespräche, sie hatten immer etwas Erleichterndes! Weiterer Dank geht an Dres. Johann Rahmüller, Alexandra Epp und Juliane Hobusch!

Bei meinen offiziell über das GRK in den Stand der Mentoren gehobenen Ansprechpartnern zu Fachlichem und Persönlichem: Prof. Dr. Rudolf Manz und Prof. Dr. Admar Verschoor. Mit eurer Hilfe habe ich auch mal den Blickwinkel geändert und Neues gewagt. Danke für euer stets wertvolles Feedback! Weiterhin danke ich Dr. Katja Bieber für die Bereitstellung von Mäusen und vWFA2 sowie die experimentelle Unterstützung! Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Misa Hirose für die stets verfügbare Unterstützung und geteilten Erfahrungen mit dem EBA Modell.

Ich bin dankbar, Teil des DFG geförderten Graduiertenkollegs 1727 „Modulation von Autoimmunität“ gewesen zu sein. Danke an alle, die mich in den vergangenen Jahren zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit unterstützt haben, von denen ich lernen und mich inspirieren lassen konnte. Vielen, vielen Dank natürlich auch an die fleißigen Korrekturleser!

Ein großes Dankeschön geht an meine Familie und wunderbaren Freunde, die stets die richtigen Worte finden oder mich in die Frischluft begleiten, um einen klaren Kopf zu bekommen. Noch viel mehr möchte ich meinen Eltern danken: Ihr habt mich auf einen großen Weg geleitet und mich individuell unterstützt, wo ihr nur konntet. In meinem Fach strebt man zunächst an erster, und schließlich letzter Autor zu sein. Für mich, habt ihr Lieben das längst geschafft!

**Danke!**