



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

*Aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Detlef Zillikens*

Detektierung humaner, monoklonaler anti-Desmoglein 3-Autoantikörper mittels Phagen-Displays und Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie

*Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck*

– Aus der Sektion Naturwissenschaften –

*vorgelegt von
Dr. med. Matthias Christoph Hammers
aus Flensburg*

Lübeck, 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Detlef Zillikens
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Lars Redecke
Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2020
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 25.05.2020

„If you can dream it, you can do it.“

(gemeinhin Walter Elias „Walt“ Disney zugeschrieben,
jedoch ersonnen von Tom Fitzgerald, Senior Creative Executive,
Walt Disney Imagineering)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	6
Zusammenfassung	8
Einleitung	10
<i>Immunität, Autoimmunität, und Autoantikörper</i>	10
<i>Epidermale und subepidermale autoimmun blasenbildende Dermatosen: Einteilung, Epidemiologie, Klinik, Diagnostik, und Therapie in Kürze</i>	13
<i>Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus: Charakterisierung relevanter Autoantigene und Mechanismen des Adhäsionsverlustes</i>	17
<i>Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus: Bisherige Charakterisierung pathophysiologisch relevanter, humaner Autoantikörper</i>	21
Phagen-Display von Antikörperbibliotheken als genetische Methode der Antikörpergenerierung	22
Andere, zellulär-genetische Methoden der Antikörpergenerierung	25
Auflistung aller bisher veröffentlichten, monoklonalen, humanen Pemphigus-Autoantikörper	26
<i>Neue Ansätze zur Identifizierung antigenspezifischer Serumautoantikörper</i>	27
Unterscheidung von Genom/Transkriptom und Proteom	28
Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie zur proteomischen Charakterisierung von Proteinen	28
<i>Strategie und Fragestellungen des hier vorgelegten Projektes</i>	32
Material und Methoden	33
<i>Patienten und verwendete Patientenproben</i>	33
<i>Chemikalien, Reagenzien, Lösungen, sonstige Verbrauchsmaterialien</i>	33
<i>Geräte</i>	34
<i>RNA-Isolation aus peripheren Leukozyten, Transkription zu cDNA</i>	34
<i>Klonierungsexperimente zur Durchführung des Phagen-Displays</i>	34
<i>Selektion antigenspezifischer Phagen mittels Phagen-Displays</i>	36
<i>Vermeidung der Phagenkontamination</i>	36
<i>Isolation, Sequenzierung, und Herstellung antigenspezifischer Antikörper</i>	37
<i>Validierung der antigenspezifischen Antikörper im scFv-Format</i>	38
<i>Hochdurchsatzsequenzierung (NGS) des Antikörperrepertoires</i>	39
<i>Affinitätsaufreinigung antigenspezifischer Antikörper aus Serumproben</i>	40
<i>LC-MS/MS von Antikörperschwerketten</i>	40

<i>Bioinformatische Auswertung und Korrelation der LC-MS/MS-Daten mit genetischen Sequenzdaten</i>	41
Ergebnisse	43
<i>Erfolgreiche Klonierung und Selektion funktioneller, humaner, monoklonaler anti-Desmoglein 3-Autoantikörper mittels Phagen-Displays</i>	43
<i>Erfolgreiche, massenspektrometrische Detektierung H-CDR3-Region-enthaltender Peptide als Surrogat zirkulierender, Phagen-Display-identifizierter anti-Desmoglein 3-Autoantikörper</i>	48
<i>NGS-gestützte, massenspektrometrische Detektierung von H-CDR3-Region-enthaltenden Peptiden zirkulierender anti-Desmoglein 3-Antikörper</i>	54
<i>Validierung massenspektrometrisch identifizierter, anti-Desmoglein 3-Antikörpersurrogate mittels Gensynthese der korrespondierenden variablen Schwereketten und Leichtkettenshufflings</i>	60
Diskussion	63
<i>Stellenwert genetischer Antikörper-Screening-Verfahren wie z. B. Phagen-Display</i>	63
<i>Stellenwert proteomischer Identifizierung monoklonaler Antikörper</i>	66
<i>Mögliche Gründe für die geringe Überlappung genetischer und proteomischer Verfahren zur antigenspezifischen Antikörpercharakterisierung</i>	68
<i>Translationale Bedeutung der hier gewonnenen Erkenntnisse</i>	72
<i>Ausblick</i>	74
Literaturverzeichnis	78
Appendix	92
<i>Appendix I – Publierte, humane, monoklonale Pemphigus-Autoantikörper</i>	93
<i>Appendix II – Chemikalien, Reagenzien, Lösungen, sonstige Verbrauchsmaterialien</i>	100
<i>Appendix III – Geräte</i>	104
<i>Appendix IV – Phagen-Display-Klonierungen und Transformation von E.coli</i>	105
<i>Appendix V – Selektion antigenspezifischer Phagen mittels Phagen-Displays</i>	119
<i>Appendix VI – Isolation monoklonaler Plasmid-DNA, Produktion monoklonaler Antikörperfragmente</i>	123
<i>Appendix VII – Validierung monoklonaler Antikörperfragmente</i>	126
<i>Appendix VIII – Hochdurchsatzsequenzierung des V_H-Antikörperrepertoires</i>	128
<i>Appendix IX – Affinitätsaufreinigung Desmoglein 3-spezifischer Autoantikörper aus Serum</i>	129
<i>Appendix X – LC-MS/MS von Antikörperschwerketten</i>	133
<i>Appendix XI – Bioinformatische Auswertung und Korrelation der LC-MS/MS-Daten mit genetischen Sequenzdaten</i>	134

Danksagung

138

Lebenslauf

139

Abkürzungsverzeichnis

aa, AA	engl. Amino Acid(s) (Aminosäure(n))
A2ML1	engl. Alpha-2-Macroglobulin Like 1 (Antigen des paraneoplastischen Pemphigus, PNP)
APC	engl. Antigen-Presenting Cell (Antigen-präsentierende Zelle)
APD	engl. Antibody Phage Display (Phagen-Display)
AZA	Azathioprin
BCR	engl. B-Cell Receptor (B-Zellrezeptor)
Bp	engl. base pair (Basenpaar)
BP	Bullöses Pemphigoid
BP180	BP-Antigen 180 (180 kDa groß), syn. Kollagen XVII, BP-Antigen (BPAG) 2
BP230	BP-Antigen 230 (230 kDa groß), BP-Antigen (BPAG) 1
C3	Komplementfaktor C3
CAR	engl. Chimeric Antigen Receptor
CAAR	engl. Chimeric Autoantigen Receptor
CCH	Concholepas concholepas (Schneckenart aus der Familie der Stachelschnecken)
CD	engl. Cluster of Differentiation
cDNA	engl. complementary DNA
CDR	engl. Complementarity-Determining Region
CDR3	engl. Complementarity-Determining Region 3 (z. B. der Antikörperschwerkette, dann H-CDR3; die H-CDR3-aa-Sequenz ist klonspezifisch)
CH	engl. Constant Heavy Chain (konstante Region der Antikörperschwerkette)
CH1	Konstante Region 1 der Antikörperschwerkette
CID	engl. Collision-Induced Dissociation
CL	engl. Constant Light Chain (konstante Region der Antikörperleichtkette)
CpG	Immunstimulierende, synthetische Oligonukleotid-DNA, welche unmethylierte CpG-Motive enthält (C: Nukleotid Cytosin; G: Nukleotid Guanin; p: Phosphodiester-Verknüpfung zw. C und G)
CS	engl. Corticosteroid (Kortikosteroid)
CTLA-4	engl. Cytotoxic-T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (syn. CD152)
CYC	Cyclophosphamid
Da	Dalton

DIF	Direkte Immunfluoreszenz
DNA	engl. Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
Dsg1	Desmoglein 1
Dsg3	Desmoglein 3
EBV	Epstein-Barr-Virus (auch Humanes-Herpes-Virus 4)
EC	engl. Extracellular Cadherin Domain (Ektodomänenteil von Dsg-Proteinen)
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrospray-Ionisation
ETA	Exfoliativtoxin A (Exotoxin von Staphylococcus aureus)
Fab' (auch Fab)	engl. Fragment antigen-binding (durch Papain-Verdau aus Immunglobulin zu erhalten)
F(ab')₂	Aus zwei Fab'-Fragmenten aufgebautes Protein (durch Pepsin-/IdeS-Verdau aus Immunglobulin zu erhalten)
FACS	engl. Fluorescence-Activated Cell Sorting
Fc	engl. Fragment crystallizable
FDR	engl. False Discovery Rate (Ratio aus falschen PSMs und aller PSMs in einem LC-MS/MS- Experiment)
g	g-Kraft
GB	gBlocks®, synthetisch generiertes DNA- Fragment (hier: Markenzeichen von IDT)
GluC	Staphylococcus aureus Protease V8; Endoproteinase (Serinproteinase), welche Peptidbindungen von Proteinen C-terminal von Glu (Glutaminsäure; E) spaltet
HA	Hämagglutinin; Glykoprotein des Influenzavirus A (als Tag in rekombinanten Proteinen verwendet)
HC	engl. Heavy Chain (Antikörperschwerkette)
H-CDR3	engl. Heavy-Chain Complementarity- Determining Region 3
IA	Immunadsorption
IdeS	engl. Immunoglobulin degrading enzyme from Streptococcus pyogenes, s. F(ab') ₂
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M

IL	Interleukin
IMGT	engl. ImMunoGeneTics (Informationssystem für Immunglobuline oder Antikörper, T-Zellrezeptoren)
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
LAD-1	120-kDa-Fragment der Ektodomäne des BP180-Antigens
LAG-3	engl. Lymphocyte-Activation Gene 3 (syn. CD223)
LC	engl. Light Chain (Antikörperleichtkette) oder engl. Liquid Chromatography (Kontext)
LC-MS/MS, LC-MS²	engl. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry
LCS	engl. Light-Chain Shuffling (Leichtketten-Shuffling); Variation der APD-Technik
LCS-APD	Light-Chain-Shuffling Antibody Phage Display (s. Abk. LCS, APD)
L-CDR3	Light-Chain Complementarity-Determining Region 3
M	molar
m/z	engl. mass-to-charge Ratio
M13	Virus der Ff-Klasse filamentöser Bakteriophagen (Genus Inovirus), welches <i>E.coli</i> infiziert; für APD genutzt (in genetisch modifizierter Form)
MACS	engl. Magnetic-Activated Cell Sorting
MAG	myelin-assoziiertes Glykoprotein
MHC	engl. Major Histocompatibility Complex
min	Minute
Mio.	Million/Millionen
mL	Milliliter
MMF	Mycophenolat Mofetil
MMLV	engl. Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	engl. Messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTX	Methotrexat
NaCl	Natriumchlorid
NC16A	16. nicht-kollagene Domäne des BP180-Antigens, Teil A (immunodominantes Epitop des BP)
NGS	engl. Next-Generation Sequenzierung (Hochdurchsatzsequenzierung)
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
O.D., OD	Optische Dichte
pIII	Mantelprotein (engl. coat protein) filamentärer Phagen wie M13; in der APD-Technik wird pIII dahingehend modifiziert,

	dass es den monoklonalen Antikörper fusioniert trägt
p200	Antigen des anti-p200-Pemphigoids, von 200 kDa Größe, bislang nicht identifiziert und/oder molekular charakterisiert
p38MAPK	engl. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase
PAGE	engl. Polyacrylamide Gele Electrophoresis (analytische Technik zur Trennung von Proteinen in einem elektrischen Feld)
PBMC	engl. Peripheral Blood Mononuclear Cells (einkernige Zellen des Blutes, z. B. Lymphozyten und Monozyten)
PBS	engl. Phosphate Buffered Saline
PCR	engl. Polymerase Chain Reaction
PD-1	engl. Programmed Cell Death Protein 1 (syn. CD279)
PF	Pemphigus foliaceus
PNP	Paraneoplastischer Pemphigus
PSM	engl. Peptide-Spectrum Match (Übereinstimmung von experimentellem Spektrum und <i>in-silico</i> -Peptidspektrum aus LC-MS/MS-Datenbank)
PV	Pemphigus vulgaris
RNA	engl. Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure), z. B. mRNA
Ro60	RNA-bindendes, 60 kDa großes Autoantigen des systemischen Lupus erythematosus und des Sjögren-Syndroms
RT	Reverse Transkriptase oder engl. Room Temperature (Kontext)
RTX	Rituximab (chimärer anti-CD20-Antikörper)
scFv	engl. Single-Chain Variable Fragment
SDS	engl. Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	engl. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Siglec	engl. Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins
TBS	engl. Tris-Buffered Saline
TIGIT	engl. T-Cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains (Immunrezeptor, welcher auf T-Zellen und NK-Zellen exprimiert wird)
TIM3	engl. T-Cell Immunoglobulin and Mucin-Domain Containing-3 (inhibierender T-Zellrezeptor)
Treg	regulatorische T-Zelle
U.K.	United Kingdom
U.S.A.	United States of America
VDJ, V(D)J	Die V(D)J-Rekombination (auch somatische

	Rekombination) stellt einen genetischen Umlagerungsprozess von DNA dar, welche für die Variabilität der von B-Zellen gebildeten Antikörper und B-Zellrezeptoren verantwortlich ist
VISTA	engl. V-domain Ig suppressor of T-cell activation (Immun-Checkpoint der B7-Familie, auf T-Zellen exprimiert)
V_H	variable Schwereketten eines Antikörpers (umfasst V _H -Gen-Bereich, D-Gen-Bereich, J _H -Gen-Bereich, sowie Framework-4-Region, bis zum Beginn der CH1-Region)
VH	variables Schwereketten (Teil des V _H) eines Antikörpers
V_HH	Single-domain heavy chain antibody (funktioneller Antikörper, welcher nur aus einer Schwereketten besteht, z. B. cameliden Ursprungs)
V_κ	variable Kappa-Leichtkette eines Antikörpers
V_λ	variable Lambda-Leichtkette eines Antikörpers
V_L	variable Leichtkette eines Antikörpers (analog zu V _H VL-Gen-Bereich, J _L -Gen-Bereich, sowie Framework-4-Region umfassend, bis zum Beginn der CL-Region)
VL	variables Leichtketten (Teil des V _L) eines Antikörpers
V_{NAR}	New antigen receptor antibody (kleiner Antikörper, welcher aus Haien isoliert wird)
VP6	engl. Viral Protein 6 (virales Protein 6 des Rotavirus; zu differenzieren von den Nicht-Strukturproteinen, engl. NSPs)
v/v	engl. Percent Volume/Volume (z. B. ergeben 12 mL Ethanol in 100 mL Lösung eine 12 v/v % Ethanol-Lösung)
w/v	engl. Percent Weight/Volume (z. B. ergeben 0,9 g NaCl in 100 mL destilliertem Wasser eine 0,9 w/v % NaCl-Lösung)

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1	Schema zum Desmoglein-Kompensationsmodell	19
Abbildung 2	Schematische Darstellung der Technik des Phagen-Displays	24
Panel 1	Phagen-Display mit RNA aus isolierten, peripheren Leukozyten eines Pemphigus vulgaris-Patientens (PV3a)	45
Panel 2	Erzeugung und Validierung monoklonaler anti-Desmoglein 3-Autoantikörper	47
Panel 3	Erfolgreiche massenspektrometrische Identifizierung von H-CDR3-enthaltenden Peptiden nach Trypsinverdau eines mittels Phagen-Displays rekombinant hergestellten, monoklonalen, humanen Antikörpers	49
Panel 4	LC-MS/MS-Identifizierung von H-CDR3-spezifischen Peptiden zuvor genetisch identifizierter, monoklonaler Antikörper der Phagen-Bibliothek PV3a in affinitätsaufgereinigten anti-Desmoglein 3-Serumantikörpern desselben Patienten	51
Panel 5	Fortsetzung zu Panel 4	52
Panel 6	NGS-Datenbankerstellung und Sequenzierungsergebnisse	55
Panel 7	NGS-gestützte, massenspektrometrische Detektierung antigenspezifischer Serumantikörper unter strikten Kriterien	56
Panel 8	Polyklonale Serumautoantikörperantwort in einem Pemphigus-Patienten (PV3a)	59
Panel 9	Leichtkettenshuffling-Phagen-Display zur rekombinanten Expression und Validierung zuvor rein massenspektrometrisch identifizierter, antigenspezifischer Antikörper	62
Tabelle 1	Charakteristika blasenbildender Autoimmundermatosen	16
Tabelle 2	Problemquellen und Möglichkeiten der Optimierung der genomisch-proteomischen Antikörpercharakterisierung	68
Tabelle S1	Charakteristika humaner, monoklonaler Pemphigus-Autoantikörper	93
Tabelle S2	Chemikalien und Reagenzien	100
Tabelle S3	Antikörper	101
Tabelle S4	Kits	101
Tabelle S5	Lösungen (kommerziell)	101
Tabelle S6	Lösungen (selbst hergestellt)	102
Tabelle S7	Plasmide, Bakterienstämme	103

Tabelle S8	Verbrauchsmaterialien	103
Tabelle S9	Geräte	104
Tabelle S10	Primer für Phagen-Display	105
Tabelle S11	Primer für Hochdurchsatzsequenzierung	128
Tabelle S12	Bioinformatische Parameter der Datenanalyse	134

Zusammenfassung

Autoimmunerkrankungen wie Pemphigus vulgaris (PV), Pemphigus foliaceus (PF) oder das bullöse Pemphigoid (BP) werden durch zirkulierende Autoantikörper verursacht. Diese binden an gut charakterisierte Strukturproteine der Haut, welche desmosomale (PV, PF) und hemidesmosomale (BP) Adhäsion vermitteln, und führen nachfolgend zu einem Adhäsionsverlust und apparenter Klinik.

Zum Studium bzw. zur monoklonalen Charakterisierung dieser antigenspezifischen Autoantikörper wurden bisher genetische und zelluläre Verfahren wie Phagen-Display, EBV-Transformation von Lymphozyten, oder Generierung von Heterohybridomen angewandt, welche alle eine beschränkte, oligoklonale Immunantwort nahelegten. Trotz überaus wichtiger Einblicke in die molekulare Pathophysiologie der Pemphiguserkrankungen, die mit diesen genetisch und zellulär gewonnenen, monoklonalen Antikörpern erst ermöglicht wurden, war bis zum Vorliegen dieser Promotionsschrift sehr wenig zum serologischen Repertoire (d. h., zu den tatsächlich zirkulierenden, antigenspezifischen Autoantikörpern) bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit hatte der Promovend die Gelegenheit, erstmals genetische und proteomische Methoden nebeneinander für die Gruppe der Pemphiguserkrankungen nutzen zu können, mit dem unerwarteten Ergebnis einer deutlich polyklonalen Autoimmunantwort als bisher angenommen, und dem unerwarteten Befund einer geringen Konkordanz genetisch und proteomisch gewonnener, monoklonaler Autoantikörper gegen das PV-Antigen Desmoglein 3 (Dsg3).

Basierend auf Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) affinitätsaufgereinigter Anti-Dsg3-Serumantikörper und einer patientenspezifischen Datenbank des Repertoires der Antikörperschwerketten (welche mittels Hochdurchsatzsequenzierung, NGS, aus RNA peripherer Leukozyten erhalten wurde), konnte der Promovend zuverlässig anti-Dsg3-Antikörperschwerketten (bzw. ihre Peptidfragmente) identifizieren, welche zuvor mittels Phagen-Display (aus dem gleichen Patientenmaterial) nicht erhalten werden konnten. Dass diese proteomisch identifizierten anti-Dsg3-Antikörperschwerketten valide sind, konnte dann in Leichtkettenshuffling-

Experimenten (einer Modifikation des klassischen Phagen-Displays, zur Identifizierung der dazugehörigen, anti-Dsg3-Antikörperleichtkette) und der eingehenden Charakterisierung der resultierenden, monoklonalen anti-Dsg3-Antikörper gezeigt werden.

Diese Arbeit zeigt auf, dass proteomische Methoden, im Zusammenspiel mit NGS, ein effektiver Ansatz nicht nur zur immunologischen Charakterisierung von (Auto-) Immunantworten, sondern auch zur Generierung antigenspezifischer Antikörper sein können. Es werden ferner Optimierungsansätze zur genetischen Methode des Phagen-Displays diskutiert, welche in einer verbesserten Konkordanz genetischer und proteomischer Antikörperrepertoirstudien resultieren sollten. Der genetischen Methode des Phagen-Displays kommt dennoch, wie hier illustriert, weiterhin eine wichtige Rolle bei der Generierung und Validierung monoklonaler Antikörper zu; ihr volles Potential kann sie hier insbesondere im engen Zusammenspiel mit proteomisch gewonnenen Daten entfalten.

Einleitung

Immunität, Autoimmunität, und Autoantikörper

Immunität beschreibt den balancierten Zustand einer ausreichenden Abwehr eines Organismus gegen Infektionen verschiedenster Art, bei gleichzeitig vorhandener Toleranz gegenüber fremden oder körpereigenen Antigenen zur Vermeidung von Allergie und Autoimmunität (1). Angeborene Mechanismen der Immunität stellen dabei sehr alte, hochkonservierte Mechanismen dar, welche als erste Linie der Verteidigung schnell und antigenunabhängig auf unspezifische, konservierte Erkennungsmoleküle von Pathogenen reagieren; hierzu zählen Verteidigungsmechanismen des Komplementsystems und Zytokine (z. B. Interferone) auf der humoralen Seite, oder aber Mastzellen, Phagozyten (z. B. Makrophagen), basophile und eosinophile Granulozyten sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) auf der zellulären Seite. Erworbene Mechanismen der Immunität werden in der Regel durch eine Aktivierung der angeborenen Immunität angestoßen und benötigen aufgrund der involvierten Zellen (B- und T-Lymphozyten) und der Entwicklung einer hochspezifischen Immunantwort (über Antikörperproteine vermittelt) mehr Zeit bis zur vollen Aktivierung. Die Hauptaufgaben der erworbenen Immunität sind i) Diskriminierung fremder (nicht-körpereigener) Antigene von körpereigenen Antigenen, ii) Entwicklung einer spezifischen Immunantwort zur Elimination fremder Antigene (d.h., Pathogenentfernung) ohne Schädigung des eigenen Organismus (d.h., Schonung eigener Antigene/eigener Zellen und Organe), sowie iii) Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses zur schnellen und spezifischen Immunantwort bei erneutem Kontakt mit dem körperfremden Pathogen (1). Auf die Mechanismen der physiologischen Immunantwort auf körperfremde Stimuli soll in dieser Einleitung nicht weiter eingegangen werden; diese sind für den geeigneten Leser andernorts ausführlich beschrieben (1, 2). Stattdessen seien Autoimmunität und Autoantikörper hier näher erläutert: Autoimmunität kann als Reaktion der erworbenen Immunantwort auf körpereigene Antigene beschrieben werden. Dabei ist die Anwesenheit selbstreaktiver Lymphozyten

und autoreaktiver Antikörper Vorbedingung der Ausbildung von Autoimmunität (1-3). „Im Vergleich zu B-Lymphozyten werden T-Lymphozyten als besonders prädestiniert für die Entstehung autoimmuner Erkrankungen angesehen, da sie sowohl die zelluläre wie [die] humorale Immunabwehr aktiv beeinflussen können [und bestimmte MHC-Haplotypen besonders stark mit Autoimmunerkrankungen assoziiert sind]: Im Normalfall werden im Thymus von antigenpräsentierenden Zellen (Antigen Presenting Cells, APCs) zahlreiche körpereigene Antigene („Selbst-Antigene“) präsentiert und T-Zell-Klone mit zu hoher Affinität zum körpereigenen „Selbst“ deletiert (Prozess der negativen Selektion). Ein ähnlicher Prozess zur Toleranzentwicklung findet auch während der B-Zell-Reifung im Knochenmark statt. Diese Mechanismen der zentralen Toleranz sind jedoch regelhaft inkomplett (d.h., es finden sich geringe, physiologische Spiegel an Autoimmunität in einem Großteil der Bevölkerung [(4, 5)]) und werden durch solche der peripheren Toleranz ergänzt: Autoreaktive T-Zellen können so [in der Peripherie] durch Prozesse der Anergie (Ausbleiben der Aktivierung nach peripherer Antigenpräsentation durch fehlendes kostimulatorisches Signal, z. B. CD40 oder CD80), klonale Deletion (CD95-vermittelte Apoptose durch persistierende Aktivierung selbstreaktiver T-Zellen in der Peripherie) oder Suppression durch regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen können Effektor-T-Zellen z. B. durch Sekretion der Zytokine TGF-beta oder IL-10 inhibieren) inaktiviert oder entfernt werden, während autoreaktive B-Zellen keine T-Zell-Hilfe erhalten und in der Regel schnell absterben (dies gilt [jedoch] nicht für B-1-Zellen, die ohne T-Zell-Hilfe niedrigaffine IgM-Autoantikörper bilden können) [(6-10)].“ (3)

Um überschießende Immunreaktionen zu verhindern sind auf der Oberfläche von T- und B-Lymphozyten zahlreiche inhibitorisch wirksame Moleküle (z. B. CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM3, VISTA, TIGIT, FcγRIIb, Siglecs) exprimiert; dies kann nicht nur als starker Hinweis darauf interpretiert werden, dass autoreaktive Lymphozyten in der Peripherie physiologischerweise vorhanden sind und unter Normalbedingungen strikt kontrolliert werden, sondern auch darauf, dass der Stellenwert der peripheren Toleranzmechanismen gegenüber denen der zentralen Toleranz als höher einzuschätzen ist (11). Weitere Evidenz hierfür kommt von klinisch häufig beobachteten Nebenwirkungen der

pharmakologischen Blockade peripherer Checkpoints in der Anti-Tumortherapie, mit autoimmunologischen Symptomen z. B. an Darmschleimhäuten, Leber, Auge, Schilddrüse, oder aber der Haut (11-13).

Der initiale Trigger für die Erkennung von körpereigenen Strukturen kann z. B. eine Infektion mit Entzündung oder eine anderweitige Gewebsschädigung sein, welche zur Stimulierung und Proliferation zuvor ignoranter Zellen aus den peripheren Reservoirs autoreaktiver B- und T-Zellen führen kann (11). Für den Bereich der autoimmun blasenbildenden Hauterkrankungen sind die Trigger größtenteils noch unbekannt; für die Erkrankung Pemphigus foliaceus (PF) existiert eine endemische Form (fogo selvagem) in Brasilien, welche mit dem Stich einer Sandfliege assoziiert ist (14). Für einen (wahrscheinlich jedoch sehr kleinen) Teil der Patienten mit Pemphigus vulgaris (PV) konnte eine Kreuzreaktion des Autoantigens Desmoglein 3 zu dem Rotavirus-Antigen VP6 nachgewiesen werden (15). Publierte genetische Daten des Promovenden legen nahe, dass der Toleranzverlust (d. h., das Vorliegen des Triggers) beim PV ein einmaliges oder zumindest zeitlich beschränktes Ereignis ist, da sich über lange Beobachtungszeiten die gleichen autoantikörperproduzierenden B-Zell-Klone im selben Patienten nachweisen ließen (16). Die selbstlimitierende Autoimmundermatose Pemphigoid gestationis tritt allein schwangerschaftsassoziiert auf und könnte als ein Modellsystem zu Veränderungen der physiologischen Immunantwort und Toleranz im Rahmen einer Schwangerschaft dienen (17). Für die Gruppe der Lupuserkrankungen konnte in einer rezenten Arbeit eine Kreuzreaktion von Ro60-Antikörpern mit bestimmten Spezies von *Propionibacterium* und *Bacteroides* nachgewiesen werden, sodass hier, in genetisch empfänglichen Individuen, eine Dysbiose des physiologisch vorhandenen Mikrobioms als möglicher Trigger des systemischen Lupus erythematoses festgehalten werden kann (18).

Pathogenitätsvermittelnde Autoantikörper in klinisch manifester Autoimmunerkrankung können jeglichen Isotyp annehmen; so existieren für den Menschen Beispiele für Erkrankungen mit autoreaktiven Antikörpern des Isotyps IgM (z. B. Anti-Myelin-assoziierte Glykoprotein-[anti-MAG-]Neuropathie; (19)), IgG (z. B. Pemphiguserkrankungen, Pemphigoiderkrankungen, Lupus, Neuromyelitis optica, Goodpasture-Erkrankung; (20-22)), IgA

(Pemphiguserkrankungen, Pemphigoiderkrankungen, Dermatitis herpetiformis Duhring, IgA-Vaskulitis mit anti-endothelialen Antikörpern; (21, 23-26)) und IgE (Pemphigoiderkrankungen, systemischer Lupus erythematoses; (21, 27)). Autoantikörperproduzierende Zellen können hierbei auch zirkulierende CD20⁺ B-Zellen (z. B. Memory-B-Zellen im Pemphigus) sein; die genaue Rolle von Plasmazellen (CD20⁻) bei den autoimmunbullösen Dermatosen ist noch unklar, diese könnten jedoch therapierefraktäre Fälle des bullösen Pemphigoids oder des Schleimhautpemphigoids nach Rituximabgabe erklären, insbesondere bei Prädominanz der IgE-/IgA-Komponente *in vivo* (28, 29).

Epidermale und subepidermale autoimmun blasenbildende Dermatosen: Einteilung, Epidemiologie, Klinik, Diagnostik, und Therapie in Kürze

Bullöse Autoimmundermatosen stellen eine heterogene Gruppe seltener, jedoch wissenschaftlich prototypischer Erkrankungen dar, die durch zirkulierende wie gewebesgebundene „Autoantikörper gegen verschiedene Adhäsionsproteine der Haut und Schleimhäute“ gekennzeichnet sind (23).

Die pathophysiologischen Mechanismen, insbesondere jene der Endstrecke, unterscheiden sich in der Pemphigusgruppe von jenen der Pemphigoidgruppe. Erkrankungen mit Autoantikörpern gegen desmosomale Adhäsionsproteine epidermaler Keratinozyten (z. B. Desmogleine oder Desmocolline) werden der Pemphigusgruppe zugeschlagen (mit intraepidermale Adhäsionsverlust, auch Akantholyse genannt), solche mit Antikörpern gegen hemidesmosomale Adhäsionsproteine epidermaler Keratinozyten, z. B. BP180 oder Laminin 332, der Gruppe der Pemphigoiderkrankungen (mit subepidermale Adhäsionsverlust) (23). „Bei der Dermatitis herpetiformis Duhring sind die Autoantikörper gegen die Transglutaminasen 2 und 3 gerichtet, welche [jedoch] kein struktureller Bestandteil der dermoepidermalen Junktionszone (DEJ) sind.“ (23) „In Deutschland ist von ca. 2.000 neuen Fällen bullöser Autoimmundermatosen im Jahr [...] [auszugehen] (30).“ (23) Die Prävalenz liegt bei etwa 40.000 Patienten (31).

„In der Gruppe der Pemphiguserkrankungen (Inzidenz 1–2/Mio. Einwohner und Jahr) findet die Blasenbildung intraepidermal statt, sodass das Blasendach sehr dünn ist und klinisch schlaffe, fragile Blasen und/oder rupturierte Blasen (in

Form von Erosionen) entstehen. Diese sind beim PV immer an den Schleimhäuten und fakultativ auch an der Haut zu finden, während beim PF allein die Haut betroffen ist und Schleimhäute ausgespart werden (80% der Pemphigus-Patienten weisen einen Pemphigus vulgaris auf). Das Nikolski-Zeichen ist beim Pemphigus positiv und beschreibt das Phänomen der mechanisch induzierten Erosion nicht-läsionaler Haut. Der paraneoplastischen Pemphigus [PNP] zeichnet sich durch eine ausgeprägte Stomatitis und das obligate Vorliegen einer Neoplasie aus (dies sind vor allem hämatologische Neoplasmen wie Non-Hodgkin-Lymphome, chronisch lymphatische Leukämien und Castleman-Erkrankungen), während Patienten mit dem seltenen IgA-Pemphigus eine charakteristische subkorneale Pustelbildung zeigen (30).

Eine subepidermale Blasenbildung ist bei den Erkrankungen der Pemphigoidgruppe und der Dermatitis herpetiformis Duhring zu beobachten: Hier sind die Blasen aufgrund des dickeren Blasendachs prall gefüllt, und das Nikolski-Zeichen ist negativ. Das bullöse Pemphigoid (BP) ist fast immer mit einem starken Pruritus vergesellschaftet (oft auch noch ohne Blasenbildung im Rahmen eines Prodromalstadiums), tritt meist im 8. und 9. Lebensjahrzehnt auf, und ist mit Abstand die häufigste bullöse Autoimmundermatose (ca. [20] Neuerkrankungen/Mio. Einwohner und Jahr, Tendenz steigend) [(32)]. Während einer Schwangerschaft (oder unmittelbar post partum) kann sich ein Pemphigoid gestationis mit starkem Juckreiz und ekzematösen Hautveränderungen, meist jedoch ohne Blasenbildung, manifestieren. Im Kindesalter ist die lineare IgA-Dermatose die häufigste autoimmune, blasenbildende Hauterkrankung. Sie ähnelt klinisch, ebenso wie das Anti-p200/Laminin- γ 1-Pemphigoid, dem bullösen Pemphigoid. Beim Schleimhautpemphigoid beobachtet man eine überwiegende Beteiligung der hautnahen Schleimhäute, mit der Gefahr der Erblindung bei okulärem Befall. Die Epidermolysis bullosa acquisita kann in eine mechanobullöse und eine entzündliche Form differenziert werden, wobei erstere mit Blasenbildung und Erosionen an mechanisch exponierten Hautregionen einhergeht und unter Narbenbildung abheilt, während letztere [klinisch] dem bullösen Pemphigoid oder dem Schleimhautpemphigoid ähnelt. Blasenbildung sieht man bei der Dermatitis herpetiformis Duhring selten, stattdessen entwickeln sich stark

juckende Papeln, vor allem an den Streckseiten der Extremitäten, am Kopf sowie gluteal (33).“(23)

„Die Diagnose stützt sich nicht allein auf die oft heterogene Klinik, obwohl einige Zeichen [...] charakteristisch für autoimmune blasenbildende Dermatosen sind. Der diagnostische Goldstandard ist der Nachweis [gewebs]gebundener Autoantikörper mittels direkter Immunfluoreszenzmikroskopie (DIF). [...] Während für eine orientierende histologische Untersuchung die Biopsie einer gesamten Blase von Vorteil ist, wird für eine DIF eine unmittelbar periläsional entnommene Biopsie normal erscheinender Haut des Patienten benötigt, die für die weitere Verarbeitung nicht in Formalin fixiert werden darf. [...] Bei den Pemphiguserkrankungen findet sich in der DIF eine interzelluläre Immunglobulin- und/oder Komplementfaktor-C3-Bindung in der Epidermis/Schleimhaut (sogen. retikuläres Fischnetzmuster), während Proben von Pemphigoidpatienten eine lineare Anfärbung von Immunglobulinen und C3 an der DEJ aufweisen (34). Auch der Immunglobulinisotyp ist von diagnostischer Relevanz: Während IgA-Ablagerungen bei der linearen IgA-Dermatose (linear an der DEJ) und Dermatitis herpetiformis Duhring (granulär in den Papillenspitzen [oder an der DEJ]) charakteristisch sind, findet sich bei allen anderen bullösen Autoimmundermatosen überwiegend IgG-Reaktivität (33).

Mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie (IIF) können Patientenserum auf zirkulierende Autoantikörper hin untersucht und durch Titrationsreihen semiquantitative Aussagen getroffen werden, jedoch gilt es bei diesem Screeningverfahren eine geringere Sensitivität als bei der DIF zu beachten. Als IIF-Substrate der Wahl gelten Meerschweinchen- und Affenösophagus für PV und PF und beim paraneoplastischen Pemphigus die plakinreichen Substrate Affen- oder Rattenurothel. Humane Spalthaut (separiert zu Epidermis und Dermis durch Inkubation in 1 M NaCl-Lösung) ist das sensitivste Substrat für die Pemphigoidgruppe: Serumantikörper gegen BP180 und BP230 binden an der epidermalen Seite des artifiziellen Spalts, Autoantikörper gegen Laminin 332, p200-Antigen, Laminin γ 1 und Kollagen Typ VII an der dermalen Seite. Eine IgA-Reaktivität gegen Endomysium glatter Muskelzellen des Affenösophagus dient als IIF-Nachweis von Dermatitis-herpetiformis-Duhring-typischen Autoantikörpern. [...] Für verschiedene Autoantikörper stehen mittlerweile

kommerziell erhältliche ELISA[-Systeme folgender rekombinanter Substrate] zur Verfügung: Desmoglein 3 (PV und paraneoplastischer Pemphigus), Desmoglein 1 (PF und PV), Envoplakin (paraneoplastischer Pemphigus), BP180 und BP230 (bullöses Pemphigoid, Schleimhautpemphigoid, Pemphigoid gestationis), Typ VII-Kollagen (Epidermolysis bullosa acquisita) und Transglutaminase 2 und 3 sowie [...] Gliadin[-Peptid] (Dermatitis herpetiformis). Für Autoantikörper gegen Laminin 332 (beim Schleimhautpemphigoid), das p200-Antigen/Laminin γ 1 [...] [sowie IgE- und] IgA-Antikörper gegen BP180 (bei [BP und linearer] [...] IgA-Dermatose) gibt es bisher noch keine kommerziell verfügbaren Testsysteme, sodass diese Diagnostik nur in wenigen spezialisierten Laboren [...] durchgeführt werden kann.“(23)

„Zur Therapie bullöser Autoimmundermatosen existiert nur eine kleine Zahl von prospektiven Studien, Cochrane-Übersichten fassen den bisherigen Kenntnisstand zusammen (35, 36).“ (23) Leitlinien auf nationaler wie internationaler Ebene versuchen einen therapeutischen Konsens herzustellen. „Grundlegendes Prinzip der [derzeit angewendeten, klinischen] Therapie ist die Immunsuppression und/oder -modulation“, welche andernorts ausführlich diskutiert und beschrieben wird (23, 37, 38). **Tabelle 1** fasst die wesentlichen Punkte dieses Kapitels zusammen (verändert nach (23)).

Tabelle 1: Charakteristika blasenbildender Autoimmundermatosen

Erkrankung	Autoantigen	Klinik	Diagnostik	First-line Therapie
<i>Pemphigusgruppe (epidermal blasenbildende Autoimmundermatosen)</i>				
Pemphigus vulgaris	Desmoglein (Dsg) 3 Dsg1	Schmerzhafte Schleimhautläsionen +- schlaflae Blasen der Haut, Erosionen, Krusten; Nikolski-Zeichen positiv	DIF (IgG, C3; interzellulär) IIF auf Affenösophagus (IgG; interzellulär) Dsg 1- und Dsg3-ELISA (IgG)	CS (1-2 mg/kg/d) + AZA oder MMF
Pemphigus foliaceus	Dsg1	Schlaflae Blasen der Haut, Erosionen, Krusten; Aussparung der Schleimhäute, blätterteartige Krusten in seborrhoischen Hautarealen		
Paraneoplast. Pemphigus	Envoplakin Periplakin, Dsg1, Dsg3, BP230, A2ML1, Dsc1-3, Desmoplakin I	Polymorph; hämorrhagische, ausgeprägte Stomatitis, Blasenbildung am Stamm	DIF (IgG, C3; interzellulär) IIF (IgG; interzellulär) ELISA (IgG, IgA)	Behandlung der Neoplasie, CS (0,5-1 mg/kg/d) + CYC/RTX/IA
<i>Pemphigoidgruppe (subepidermal blasenbildende Autoimmundermatosen)</i>				
Bullöses Pemphigoid	BP180-NC16A BP230	Juckreiz, pralle Blasen, Erosionen, urtikarielle/ekzematöse Plaques, geringgradige Schleimhautbeteiligung; Nikolski negativ	DIF (IgG/IgE, C3; linear an DEJ) IIF auf Spalthaut (IgG/IgE) BP180- und BP230-ELISA (IgG/IgE)	Hochpotentes topisches Kortison (Clobetasonpropionat 0,05%-Crema; 10-30 g/d) + Dapson/Doxycyclin/Tetracyclin/AZA/MMF

				/MTX; ggf. + CS (<0.75 mg/kg/d)
Pemphigoid gestationis	BP180-NC16A BP230	V. a. im 2./3. Trimester, in 10% der Fälle innerh. von 4 Wo. post partum; pruritische erythematöse Papeln und Plaques umbilikal (mit Ausbreitung auf Bauch und Oberschenkel); seltener Blasenbildung	DIF (C3, IgG; linear an DEJ) IIF: Komplementbindungstest auf Spalthaut (C3, IgG) BP180-ELISA (IgG)	Hochpotentes topisches Kortison + Cetirizin
Lineare IgA-Dermatose	LAD-1 BP230	V. a. im Kindesalter; Pralle Blasen (halskettenartig gruppiert), anuläre Läsionen, geringgradige Schleimhautbeteiligung	DIF (IgA, C3; linear an DEJ) IIF auf Spalthaut (IgA) Western blot (LAD-1)	Dapson/Sulfapyridin + hochpotentes topisches Kortison; ggf. + CS (0,25-0,5 mg/kg/d)
Anti-p200/Laminin γ 1-Pemphigoid	Laminin γ1 p200-Protein (unbekannt)	Pralle Blasen, erythematöse Plaques am Rumpf	DIF (IgG, C3; linear an DEJ) IIF auf Spalthaut (IgG) Western blot (Laminin γ 1)	Siehe BP, jedoch i. d. R. schnelleres Ansprechen
Schleimhautpemphigoid	BP180-NC16A Laminin 332 BP230 LAD-1 α 6 β 4-Integrin, Laminin 311, Kollagen VII	Erosionen der Schleimhäute, Vernarbungen und Strikturen, Atropie; Augenbeteiligung in ca. 20% der Fälle	DIF (IgG/IgA, C3; linear an DEJ) IIF auf Spalthaut (IgG, IgA) Western blot (v.a. Laminin 332) BP180- und BP230-ELISA	Geringgrad. Risiko: Potentes topisches Kortison + Tetracycline/Dapson; Hochgrad. Risiko: CS (1-1,5 mg/kg/d) + CYC, AZA/MMF Augenbeteiligung: CS (1-1,5 mg/kg/d) + CYC, Dapson, IVIg, MMF Tumorsuche bei Laminin 332-Reaktivität!
Epidermolysis bullosa acquisita	Kollagen VII	Mechanobullös: Blasenbildung an mechan. beanspr. Haut; Inflammator. Form: Entzündliche, atroph. Hautveränderungen	DIF (IgG/IgA, C3 linear an DEJ) IIF auf Spalthaut (IgG, IgA) Kollagen Typ VII-ELISA (IgG)	CS (0,5-2 mg/kg/d) + Colchicin/Dapson
Dermatitis herpetiformis Duhring	Epidermale/gewebsständige Transglutaminase	Brennender Juckreiz, Gruppen von Papulovesikeln v.a. an Extensorseiten und gluteal	DIF (granulär IgA und C3) IIF auf Affenösoophagus (IgA an Endomysium) ELISA (IgA)	Glutenfreie Diät + Dapson

Hauptzielantigene fett; Verwendete Abkürzungen: A2ML1: Alpha-2-Macroglobulin Like 1; AZA: Azathioprin; C3: Komplementfaktor C3; CS, Kortikosteroide; CYC: Cyclophosphamid; DEJ: Dermoepidermale Junctionszone; DIF: Direkte Immunfluoreszenz; Dsc: Desmocollin; Dsg: Desmoglein; IA: Immunadsorption; IIF: Indirekte Immunfluoreszenz; LAD-1: 120-kDa-Fragment der Ektodomäne des BP180-Antigens; MMF: Mycophenolsäure; MTX: Methotrexat; NC16A: 16. Nicht-kollagene Domäne des BP180-Antigens, Teil A; RTX: Rituximab

Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus: Charakterisierung relevanter Autoantigene und Mechanismen des Adhäsionsverlustes

Mittels Immunoblotting und molekularer Klonierungstechniken konnte gezeigt werden, dass die Antigene der Pemphiguserkrankungen Desmoglein (Dsg) 3 und Dsg1 sind, welche als transmembranäre, homodimere (Dsg:Dsg) Glykoproteine innerhalb von Desmosomen Zelladhäsion zwischen epidermalen Keratinozyten (und mukosalen Epithelzellen) vermitteln (21).

In frühen Studien erkannten Autoantikörper sporadischer wie endemischer PF-Patienten ein ~160 kDa-Antigen, welches als Dsg1 identifiziert wurde (39, 40). Durch Demonstration der Ko-Immunopräzipitation eines 85-kDa Polypeptids, Plakoglobin, sowohl durch PF-, als auch durch PV-Seren konnte eine enge Verwandtschaft zwischen PF- und PV-spezifischen, desmosomalen Immunkomplexen gefolgert werden (41). Das PV-Antigen wurde hiernach, durch Screening einer Keratinozyten-cDNA-Phagenbibliothek, als Dsg3 identifiziert (42). Weiterführende Studien konnten dann zeigen, dass von den fünf extrazellulären Domänen des Dsg3 (EC1-5) die aminoterminal Ektodomäne EC1, welche für die homophile Adhäsion zweier Dsg-Moleküle von wesentlicher Bedeutung ist, das immunodominante Epitop darstellt (43). Vergleichbare Beobachtungen wurden für Dsg1 gemacht (44).

Die Schlüsselrolle der Pemphigusantigene für die Adhäsion zwischen Keratinozyten fand eindrücklich Bestätigung durch genetische Deletion von Dsg3 in Mäusen (45) und die enzymatische Spaltung von Dsg1 durch das Staphylococcus-aureus-spezifische Exfoliativtoxin A (ETA) in Mäusen und Menschen (46): Die Deletion oder Inaktivierung dieser Antigene führt zum identischen klinischen und histologischen Befund wie in PV- und PF-Patienten und wie in Mäusen oder Organkulturen normaler humaner Haut, in welche zuvor PV- oder PF-Seren passiv transferiert/injiziert wurden (47-49).

Studien zu den Serumantikörperprofilen von Pemphiguspatienten führten zu der Beobachtung, dass PV-Patienten einen dualen Status von Autoantikörpern zeigen: Die meisten PV-Patienten, die nur eine Schleimhautaffektation aufweisen, haben nur Dsg3-Antikörper in der Zirkulation, während solche mit Schleimhaut- und Hautmanifestationen Antikörper sowohl gegen Dsg3 und Dsg1 aufweisen. Im Gegensatz hierzu weisen PF-Patienten, welche ausschließlich Haut-, jedoch nie Schleimhautmanifestationen aufweisen, allein Dsg1-Antikörper auf (50, 51). Diese Beobachtung führte sodann, unter Beachtung der feingeweblichen Expressionsspiegel von Dsg3 und Dsg1, zur Formulierung der Desmoglein-Kompensationstheorie, welche in **Abbildung 1** zusammengefasst wird. Dieses Modell wurde in der Folge durch zahlreiche mechanistische Studien bestätigt (21).

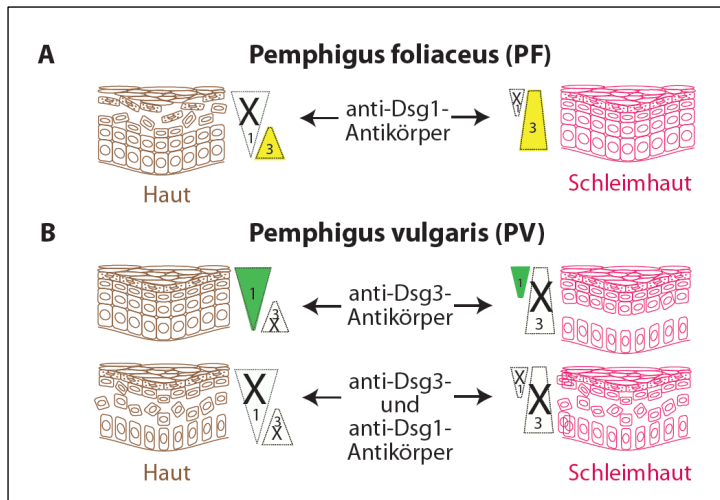


Abbildung 1: Schema zum Desmoglein-Kompensationsmodell.

Die Dreiecke geben die Expressionslevel der Antigene an.

Lesebeispiel: Bei Verlust der Adhäsion durch anti-Desmoglein 1- (Dsg1-) Antikörper kommt es nur in der Haut, nicht aber an den Schleimhäuten zum intraepithelialen Adhäsionsverlust, da in letzteren das Dsg3 für den Verlust des Dsg1 kompensiert (gelb). Modifiziert nach (21).

Mittels monoklonaler, pathogener anti-Dsg3 Autoantikörper, welche von Transkripten peripherer Leukozyten aus PV-Patienten kloniert wurden, konnte gezeigt werden, dass es durch Autoantikörperbindung an das Antigen Dsg3 nicht nur zu einer Aufhebung der trans-Interaktion zwischen Dsg3-Molekülen zweier Keratinozyten kommt (Modell der direkten Interferenz/engl. "Steric Hindrance"), sondern auch die cis-Interaktion zwischen Desmogleinen beeinträchtigt wird (im Sinne einer „Ausdünnung“ elektronenmikroskopisch normalerweise „dichter“ Desmosomenkomplexe auf dem gleichen Keratinozyt) (37, 52-54). Diese direkte pathogene Wirkung von Pemphigus-Autoantikörpern ist auch gegeben, wenn der Fc-Teil fehlt, wie z. B. mit bivalenten F(ab')₂- oder monovalenten Fab'-Fragmenten humaner PF-Seren in Mäusen, oder mit monovalenten Single-Chain Variable Fragments (scFvs), welche aus PF- und PV-Patienten genetisch kloniert wurden, in Hautorgankulturen gezeigt wurde (55-57). Dass Pemphigus-Autoantikörper allein pathogen sind, wurde durch vielfache Experimente validiert: Passive Transferexperimente humaner Autoantikörper in Mäuse resultierten in dosisabhängiger Erkrankung (47, 48), welche zudem auf eine wichtige Rolle von IgG4-Autoantikörpern hinwies (49, 50, 58, 59). Wie bereits oben ausgeführt, ist der Fc-Teil hierbei für die Auslösung des Adhäsionsverlustes nicht relevant, sodass auch Fab'-, F(ab')₂- oder scFv-Fragmente pathogen sind (55, 56). Das „Steric-Hindrance-Modell“ erfuhr weitere Bestätigung durch Epitop-Mapping-Studien, die zeigen konnten, dass die allermeisten der dominanten, durch Pemphigusseren gebundenen Epitope aminoterminal liegen, welche, analog zu den klassischen Cadherinen,

entscheidend für die Zell-Zell-Adhäsion sind (60). Schlussendlich ist die Bindung von Pemphigusautoantikörpern an Desmogleine abhängig von der normalen Konformation dieser Adhäsionsproteine, welche entscheidend auf die Calciumkonzentration reagiert (60-62).

Neben diesem recht simplen, jedoch pathogenetisch überaus effektiven Mechanismus der direkten Interferenz der Zell-Zell-Adhäsion durch Autoantikörper sind andere, zusätzliche Mechanismen involviert, z. B. solche der Internalisierung von Antikörper-Antigen-Komplexen (welche zur Depletion von membranständigen Desmogleinen führt), und solche der zellulären Signaltransduktion in Keratinozyten, welche andernorts ausführlich besprochen werden (v. a. durch p38MAPK, aber auch andere Signaltransduktionsproteine; s. Reviews in Referenzen (21) und (63)). Wichtig ist hierbei zu beachten, dass diese verschiedenen Mechanismen sich nicht gegenseitig ausschließen, sondern vielmehr gemeinsam zu der beobachtbaren Pathologie führen und wahrscheinlich synergistisch wirken (53).

Obwohl in der direkten Immunfluoreszenz von Pemphiguspatienten sehr häufig auch retikuläre Komplementablagerungen nachgewiesen werden können, ist die genaue Rolle des Komplementsystems in der Pemphiguspathophysiologie unklar; bei Erkrankungen der Pemphigoidgruppe ist diese wesentlich besser beschrieben und untersucht (64-66).

Interessanterweise konnte eine rezente Arbeit sehr überzeugend zeigen, dass insbesondere heterodimere Komplexe von Desmogleinen mit Desmocollinen (Dsg:Dsc) Zelladhäsion vermitteln sollen, während homodimere Dsg:Dsg Komplexe geringere Affinitäten zueinander aufwiesen (67). Dies wirft vor dem Hintergrund aller klinischen Erfahrungswerte die interessante Frage auf, warum, bei Ausbildung heterodimerer Bindungseinheiten *in vivo*, die Mehrheit der Pemphiguspatienten dennoch Antikörper gegen Desmogleine, und nicht gegen Desmocolline, aufweist.

Obwohl Desmoglein 3 und 1 die Hauptautoantigene darstellen, welche durch Serumantikörper der Mehrheit aller Pemphiguspatienten gebunden werden, gibt es Ausnahmen: Wenige Patienten zeigen ausschließlich Reaktivität mit anderen desmosomalen Cadherinen, z. B. den Desmocollinen oder dem klassischen E-Cadherin (68-73). Es existieren zudem Patienten, die in

Immunfluoreszenzstudien das klassische Fischnetzmuster zeigen, jedoch gegen keines der bekannten Antigene reagieren. Hier scheinen neue, noch unbekannte Antigene involviert zu sein; die vorliegende Arbeit reißt im abschließenden Diskussionskapitel auch eine neue Identifizierungsstrategie für ebensolche Antigene an (74).

Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus: Bisherige Charakterisierung pathophysiologisch relevanter, humaner Autoantikörper

Autoantikörper können als entscheidendes Bindeglied zwischen der zellulären Initiierung von Autoimmunität und der pathophysiologisch relevanten Endstrecke von Autoimmunität (hier v. a. „Steric Hindrance“, aber auch Aktivierung verschiedener Signalkaskaden) angesehen werden. Sie zirkulieren und sind bei organspezifischer Autoimmunität gewebsgebunden. Der genaue Ort der Synthese von Autoantikörpern ist im Feld der Pemphiguserkrankungen Gegenstand aktueller Forschung und Debatte (29).

Um autoantikörpervermittelte Autoimmunerkrankungen mechanistisch, z. B. in murinen *in vivo*- oder humanen *in vitro*-Modellsystemen, studieren und verstehen zu können ist eine Charakterisierung ebendieser Antikörper (und der sie produzierenden B-Zell-Abkömmlinge) auf molekularem Niveau, d. h., als monoklonale Antikörper, unabdingbar. Zum Klonalitätsbegriff gibt es dabei einen weiten Konsens: Die H-CDR3-Region (heavy chain-complementarity determining region 3), welche durch Rekombination der V(D)J-Gene während der B-Zellentwicklung genetisch in jeder B-Zelle eindeutig festgelegt und über alle klonalen Nachkommen weitergegeben wird, dient hier als wichtige, da eindeutige Signatur* und lässt sich zur Nachverfolgung und zum Nachweis dieser Antikörper (bzw. dieser Klone) in genetischen und proteomischen Studien verwenden. Die variable Schwerekettenkette (V_H) des Antikörpers wird in den meisten Studien als der für die Antigenbindung ausschlaggebende Teil angesehen (v. a. wegen der längeren, komplementären H-CDR1/2/3-Regionen, die mit dem Antigen interagieren; (76-78)), und die Leichtkette im allgemeinen als Teil des

* Es gibt rechnerisch so viele V(D)J-Kombinationsmöglichkeiten, dass ein Auftreten identischer H-CDR3-Sequenzen in zwei humanen Individuen theoretisch als unwahrscheinlich angesehen wird (75). Saada R, Weinberger M, Shahaf G, Mehr R. Models for antigen receptor gene rearrangement: CDR3 length. Immunology and cell biology. 2007 Jun;85(4):323-32. PubMed PMID: 17404591).

Antikörpers mit vornehmlich stabilisierender Wirkung (nur in wenigen Ausnahmen scheint die variable Antikörperleichtkette, V_L , den Hauptanteil an der Antigenbindung zu haben; (79)). Bei den bisher charakterisierten, monoklonalen Pemphigusautoantikörpern zeigt sich, dass der V_H -Teil mit mehreren, verschiedenen V_L -Teilen kombiniert werden kann, und damit der V_H -Anteil des Antikörpers für die Bindung ausschlaggebend zu sein scheint (16). Eine H-CDR3-Konsensussequenz wurde, trotz zahlreicher Studien und identischem Autoantigen, bisher nicht identifiziert, einzelne Antikörper wiesen jedoch ein Konsensusmotiv auf (Aminosäuresequenz D/E-X-X-X-W; (57)).

Die Generierung monoklonaler, humaner Autoantikörper kann auf verschiedene Arten erfolgen; klassischerweise wird dies durch genetische oder zelluläre Verfahren wie Phagen-Display oder In-vitro-Immortalisierung und Stimulation (z. B. durch Hybridom-Techniken oder EBV/CpG) realisiert:

Phagen-Display von Antikörperbibliotheken als genetische Methode der Antikörpergenerierung

Die Methode des Phagen-Displays von Antikörperbibliotheken (engl. APD, Antibody Phage Display) jeglicher Spezies, u. a. Menschen, ist eine bewährte, genetische Hochdurchsatzmethode zur Generierung antigenspezifischer Antikörper, und kann vereinfachend als synthetisches Immunsystem angesehen werden („affinity maturation *in vitro*“). Die Relevanz dieser Methode kann nicht nur an den mittels APD gewonnenen, therapeutisch weltweit in der Klinik genutzten Wirkstoffen Adalimumab (Humira®), Ranibizumab (Lucentis®) und Belimumab (Benlysta®) (umfassend dargestellt in (80)) abgelesen werden, sondern auch an der rezenter Verleihung des Nobelpreises für Chemie an die Arbeitsgruppen von George P. Smith (University of Missouri, Columbia, U.S.A.) und Sir Gregory P. Winter (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, U.K.) im Jahre 2018 (81).

Neben der klinisch-angewandten Nutzung kann APD auch zum Studium grundlegender, immunologischer Charakteristika und Mechanismen antigenspezifischer B-Zellen angewandt werden: Von einer Zellquelle ausgehend (in der Regel periphere Leukozyten, PBMC, eines aktiven,

möglichst unbehandelten Individuums/Patientens) wird mRNA isoliert, revers transkribiert und mittels spezifischer Primerkombinationen, die alle bekannten variablen Schwer- und Leichtkettengene abdecken, das gesamte Immunglobulinrepertoire eines Individuums in Form von cDNA-Amplikaten „immortalisiert“. Dies ist dank sehr spezifischer Primer auch möglich für einzelne Isotypen von Antikörpern (z. B. IgM, IgG, IgA, IgE), und sogar Subklassen wie IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 oder IgA1, IgA2 lassen sich spezifisch amplifizieren (d.h., eine IgA1-spezifische Primerkombination resultiert z. B. nicht in der Amplifizierung eines IgG4-Transkriptes). Es existieren Protokolle zur Klonierung humaner, muriner, aviärer, camelider, und sogar chondrichthyder Bibliotheken von Antikörpern verschiedener Architektur (scFv oder Fab' als gängige Standardformate, und Nanobodies/V_HH/V_{NAR}-Fragmente als neuere, noch kleinere Single-Domain-Antikörperfragmente[†]) (82-85).

Diese Bibliothek wird in einen Phagemid-Vektor (z. B. pComb3X, Scripps Institute) einkloniert und in E.coli (z. B. XL1-Blue oder ER2738) transformiert. Entsprechend transformierte Bakterien exprimieren dann, nach Infektion mit Helferphagen, gentechnologisch modifizierte M13-Phagen (d.h., Inoviren, die Bakterien infizieren), welche außen, am Hüllprotein pIII, das Antikörperfragment (z. B. in Form eines scFv) exprimieren, das innerhalb dieses Phagen genetisch als Phagemid vorliegt (Verknüpfung von Geno- und Phänotyp). Mittels mehrerer Runden der Selektion[‡] auf dem Antigen von Interesse (hier: Desmoglein, z. B. durch Nutzung kommerziell erhältlicher ELISA-Platten) und Amplifizierung eluierter, bindender Phagen werden so nach 2-5 Runden aus Milliarden von verschiedenen Bakteriophagen Pools monoklonaler Phagen hoher Spezifität gewonnen (vgl. **Abbildung 2**). Durch Ausplattierung und Expandieren monoklonaler E.coli-Kolonien können dann die entsprechenden Phagemids sequenziert und Antikörper von Interesse monoklonal in E.coli exprimiert werden (nach Transfer des Vektors in

[†] V_HH: Single-domain heavy chain antibody; V_{NAR}: New antigen receptor antibody

[‡] Im Englischen wird diese Selektion spezifischer Phagen (Bio-)„Panning“ genannt (aus der Umgangssprache von Goldgräbern herrührend) und beschreibt figurativ die Suche nach der „Nadel im Heuhaufen“ bzw. nach den Goldnuggets mittels Waschpfanne.

einen anderen Stamm, TOP10F', welcher das Amberkodon als Stopcodon ausliest und die Fusion des scFvs mit dem pIII-Hüllprotein unterbindet) (86).

Die so gewonnenen, monoklonalen Antikörper können hiernach vielfältigen immunologischen Arbeitstechniken unterworfen werden:

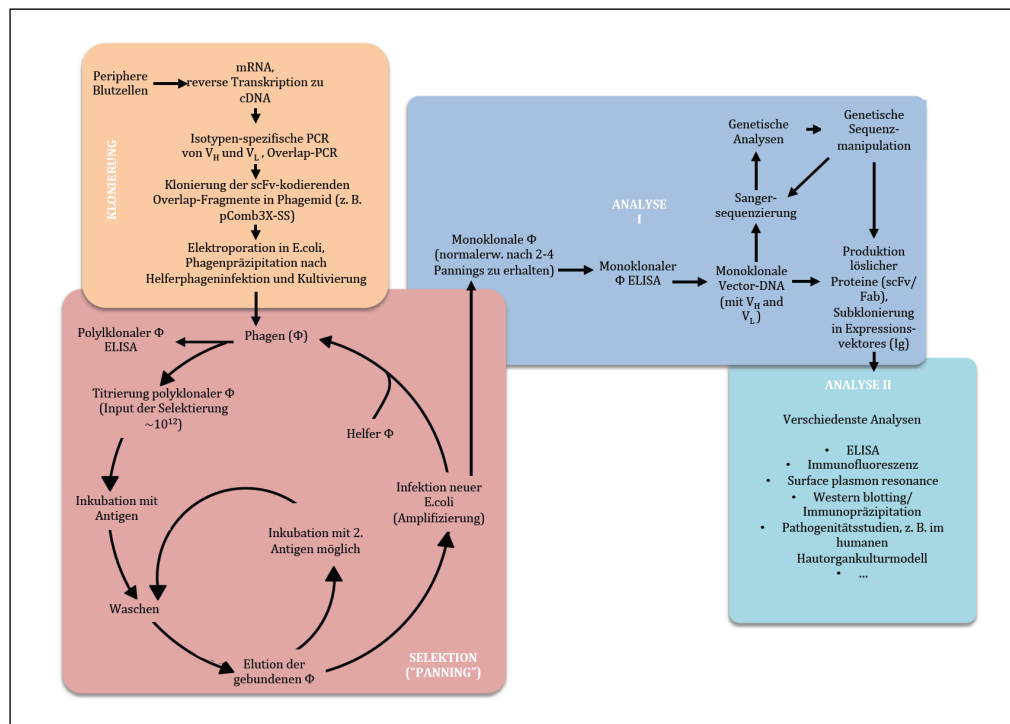


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Technik des Phagen-Displays (Antibody Phage Display, APD). Siehe Text für weiterführende Informationen. Modifiziert nach (86).

Gängig sind genetische Analysen und Gruppierungen (z. B. nach V_H -/ V_L -Gen, Klonalität/ H -CDR3-Aminosäuresequenz; Abgleich mit der Keimbahnsequenz und Charakterisierung der somatischen Mutationen), Subklonierung der V_H -/ V_L -kodierenden DNA-Elemente in andere Vektoren (z. B. zur Generierung vollständiger Antikörpermoleküle in Säugerzellen oder zur gezielten genetischen Veränderung einzelner Abschnitte und Aminosäuren), Expression als scFv (z. B., zur Untersuchung der Bindung in ELISA und Immunfluoreszenz), oder Blotting (z. B. auf rekombinantem Antigenfragmenten, zur Feststellung des genauen linearen/konformationellen Epitops).

Andere, zellulär-genetische Methoden der Antikörpergenerierung

Zelluläre Methoden der Generierung monoklonaler Antikörper basieren auf der Hybridomtechnologie, welche in den 70er Jahren durch César Milstein und Georges J. F. Köhler in Cambridge, U.K., entwickelt wurde. Grundprinzip war hier die Fusionierung sterblicher, antikörperproduzierender Zellen mit unsterblichen Myelomzellen; resultierende hybride Zellen waren ebenfalls unsterblich und erlaubten, nach systematischer Verdünnung der polyklonalen Zellpools, erstmalig monoklonale Antikörper in großen Mengen zu synthetisieren (87, 88). Diese Arbeiten wurden mit murinen Zellen durchgeführt, und die Übertragung auf menschliche, antikörperproduzierende Zellen sollte sich als schwierig erweisen, da eine menschliche Myelomzelllinie zur Fusionierung fehlte: Befriedigende Resultate wurden mit Heteromyelomzellen (d.h., Hybriden aus murinen und menschlichen Myelomzellen) erzielt (89). Modernere Ansätze nutzen inzwischen eine Immortalisierung antikörperproduzierender Zellen durch Epstein-Barr-Viren (EBV), welche jedoch ausgesprochen ineffizient sein können (d.h., eine geringe Ausbeute an Antikörpern liefern) und, bei fehlender, vorgeschalteter Selektion von B-Zellen, vor allem IgM-Antikörper immortalisieren, welche in den meisten Studien eher unerwünscht sind (54, 90, 91). Neuere Ansätze verwenden vorherige Zellselektion (z. B. zur Selektion von IgG⁺-B-Zellen mittels MACS oder FACS) und kombinieren die EBV-Infektion mit CpG-Oligonukleotiden, welche zu einer zusätzlichen, erwünschten B-Zell-Stimulation führen. Dies resultierte in verschiedenen Studien in hoher Effizienz der Immortalisierung und monoklonalen Antikörpern des gewünschten, klassengewechselten Isotyps (54). Ein anderer, rezenter Ansatz verwendete genetische Umprogrammierung von peripheren Gedächtnis-B-Zellen mittels retroviraler Einführung von Genen, die für B cell lymphoma-6 (Bcl-6) und Bcl-xL kodieren, was in stabilen, antikörpersezernierenden Zelllinien resultierte (92).

Auch hier können nach genetischer Identifikation der gewünschten Antikörper die kodierenden DNA-Elemente in spezielle

Expressionsvektoren einkloniert und synthetisch, z. B. mit Hinblick auf den Isotyp, modifiziert werden, zur anschließenden hocheffizienten, jedoch nur transienten Expression in humanen Zellen (z. B. im Expi293-Expressionssystem, ThermoFisher Scientific, mit bis zu mehreren g/L Kulturvolumen) (93). Trotz deutlicher methodischer Verbesserungen bleibt diese Methode auf die Identifizierung weniger B-Zellklone mit der gewünschten Spezifität beschränkt, da die erfolgreiche Identifizierung von antikörpersezernierenden monoklonalen Zellen das arbeitsintensive Screening vieler, einzelner Zellen voraussetzt; so wurde zur Identifizierung des einzelnen Desmoglein 3-spezifischen Pemphigusantikörpers PVMAB786 (syn. F706, s.u.), das Screening vieler hundert Klone notwendig; persönliche Mitteilung, und (94).

Auflistung aller bisher veröffentlichten, monoklonalen, humanen Pemphigus-Autoantikörper

Eine genaue Charakterisierung monoklonaler Antikörper ist entscheidend für die Reproduzierbarkeit biologischer Experimente; diese sollten vor dem experimentellen Einsatz idealerweise vom Protein- bis zum Sequenzlevel bekannt sein (95). Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich über die letzten drei Jahrzehnte mit der Erforschung von Pemphigusantikörpern beschäftigt, und einige dieser Antikörper sind inzwischen als sehr gut charakterisierte Reagenzien in zahlreichen, weiteren Studien verwendet worden, so beispielsweise PX4-3, PX4-4, PF1-2-6, F779, F706 (54-56, 96-102) zur Aufklärung involvierter Signaltransduktionskaskaden und Pathomechanismen in der Gruppe der Pemphiguserkrankungen. Die **Tabelle S1** im **Appendix I** fasst alle bis dato publizierten, humanen Antikörper gegen die Pemphigusantigene Desmoglein 3 und Desmoglein 1 zusammen. Interessanterweise fanden die meisten dieser hier zusammengestellten, genetischen Arbeiten, nach Beurteilung der Aminosäuresequenzen der H-CDR3-Region, eine oligoklonale Autoantikörperantwort in Pemphiguspatienten (d.h., ≤ 10 B-Zell-Klone; (54-56, 94)).

Neue Ansätze zur Identifizierung antigenspezifischer Serumautoantikörper

Wie von Wine et al. (103) pointiert herausgearbeitet ist trotz aller technischen Fortschritte und nach Jahrzehnten antikörperbezogener, experimenteller Forschung (welche v. a. die zuvor vorgestellten genetischen Techniken verwendeten), überaus wenig bekannt zu den tatsächlichen Serumantikörpern, welche im Menschen bzw. im Patienten zirkulieren und Schutz vor Infektionen oder aber autoantikörpervermittelte Erkrankungen hervorrufen[§].

Im medizinisch wichtigen Bereich der Autoimmunität gab es bis zum Abschluss der hier vorliegenden Arbeit nur ein einziges Beispiel für eine umfassende Charakterisierung einer humanen, antigenspezifischen Serumautoantikörperpopulation auf dem Proteinlevel, nämlich im Rahmen des systemischen Lupus erythematodes (mittels Affinitätsaufreinigung von 9G4-Autoantikörpern; (104)). Eine umfassende, möglichst vollständige Beschreibung antigenspezifischer Autoantikörper in organspezifischen, humanen Autoimmunerkrankungen (wie z. B. der Haut) gab es bis zum Abschluss dieser hier vorgelegten Dissertationsschrift nicht. Vorherige, genetische Ansätze sind aufgrund der (zumindest teilweisen) Entkopplung von Transkriptom und Proteom (s. u., „Unterscheidung von Genom/Transkriptom und Proteom“) und anderer, technisch inhärenter Limitationen wenig zielführend, um Fragen nach der tatsächlichen Größe des Serumantikörperrepertoires einer bestimmten Antigenpezifität, nach der relativen Konzentrationsverteilung einzelner, antigenspezifischer Serumantikörper zu einem bestimmten Zeitpunkt und über die Zeit, nach posttranslationalen Modifikationen von Proteinen, oder aber nach

[§] „First and foremost, there is nearly no information on the number of sequences (clonal diversity), functions and relative concentrations of the individual antibodies in serum. Upon reflection it is surely striking that after over a century of immunology research that the clonality of serum antibodies [...] in blood and in secretions has not been established experimentally even to a first approximation. [...] Nor do we know anything about how the clonality of serum antibodies change as a function at extreme ages and disease status [i.e., the dynamics of serum antibodies], or about the concentration distribution of individual [i.e., monoclonal] antibodies in biological fluids. Without a detailed description of the identities and relative amounts of the antibodies that comprise the serological repertoire it is not possible to establish precisely how the B cell developmental program shapes protective immunity. Information on the serological antibody repertoire is particularly pertinent to vaccine design/evaluation and to antibody discovery from patients.“ (103.

Wine Y, Horton AP, Ippolito GC, Georgiou G. Serology in the 21st century: the molecular-level analysis of the serum antibody repertoire. *Current opinion in immunology*. 2015 Aug;35:89-97. PubMed PMID: 26172290. Pubmed Central PMCID: 4553097.)

absoluten Mengen/Konzentrationen von antigenspezifischen Serumantikörpern
suffizient zu beantworten (103, 105).

Unterscheidung von Genom/Transkriptom und Proteom

Das menschliche, nukleäre Genom besteht aus ca. 35.000 Genen, welches für sich genommen keinerlei Informationen an die Zelle übermitteln kann (106). Hierzu bedarf es einer konzertierten Aktion von Enzymen und anderer Proteine, welche biochemisch/zellbiologisch als Expression des Genoms bezeichnet werden kann; Produkt dieser Genomexpression ist das Transkriptom, eine Sammlung von RNA-Molekülen, die Proteine kodiert. Während der Transkription werden einzelne Gene (DNA-Ebene) in Form von RNA-Molekülen kopiert. Hiervon ausgehend werden durch den Prozess der Translation Proteinmoleküle synthetisiert, welche sodann das Proteom der Zelle bilden. Erstaunlicherweise zeigten bereits frühe Arbeiten, die unter Einsatz von Hochdurchsatzmethoden genetischer und proteomischer Natur entstanden sind, eine geringe Korrelation von Transkriptom und Proteom, und dies nicht nur in Pflanzen und Hefen, sondern auch in Säugetieren (105, 107-110). Ob diese Beobachtung der (zumindest teilweisen) Entkopplung von Proteom und Transkriptom auch für antikörpersezernierende Zellen in autoimmunen Erkrankungen zutrifft ist bis zur Publikation der in dieser Promotionsschrift gezeigten Ergebnisse unbekannt gewesen (111).

Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie zur proteomischen Charakterisierung von Proteinen

Basierend auf publizierten Methoden zur proteomischen Charakterisierung von Antikörpern (v. a. aus dem Vakzin-Bereich, siehe Referenzen (112, 113)) wurde mit dieser Dissertation erstmalig ein vollständiges LC-MS/MS-Protokoll zur umfassenden Autoantikörpercharakterisierung in einer Autoimmunerkrankung des Menschen entwickelt: Die Analysetechnik der Massenspektrometrie basiert grundsätzlich auf der Bestimmung des Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) von Ionen in einem Hochvakuum (vgl. Kapitel 16 in Referenz (114)). Die Entwicklung „sanfter“

Ionisierungstechniken (z. B. Elektrospray-Ionisation, ESI) Ende der 1980er Jahre machte hierbei „die intakte Überführung von größeren biologischen Makromolekülen [...] in die Gasphase und damit ihre massenspektrometrische Analyse [erst] möglich.“(114) Die Massenspektrometrie eignet sich aufgrund der genauen Bestimmung der Masse von biologischen Molekülen sehr zur Identifizierung (d.h., auch zur indirekten „Sequenzierung“) von Proteinfragmenten (Peptiden), und damit, über den Nachweis von H-CDR3-spezifischen Fragmenten, auch von antigenspezifischen Serumantikörpern in Patienten. Hierzu wird in den meisten Fällen eine isolierte Proteinbande von Interesse aus einem SDS-PAGE-Gel exzidiert** (es ist auch möglich, Massenspektrometrie mit Proteinlösungen durchzuführen, mit jedoch geringerer Sensitivität) und zur Generierung linearer Peptide von ca. 7-50 Aminosäuren Länge mit einem Enzym, zumeist Trypsin, verdaut††. Dieser Peptidpool wird dann mittels einer flüssigkeitschromatographischen Säule auf Basis der Hydrophobizität der einzelnen Peptide separiert (engl. „reversed-phase liquid chromatography“, LC). Es folgt die Massenspektrometrie, welche zwecks deutlich erhöhter Sensitivität idealerweise als Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS, oder MS²) durchgeführt wird (74). Hier besteht das Instrument nicht nur aus einer Ionenquelle (zur Ionenerzeugung; z. B. mittels ESI), einem Massenanalysator (zur Ionentrennung; z. B. Orbital-Ionenfalle), und einem Detektor (zum Ionennachweis), sondern aus mehreren Massenanalysatoren, was durch optimale Abstimmung der verschiedenen Analysatoren eine äußerst genaue Charakterisierung der erzeugten Ionen ermöglicht (vgl. Kapitel 16.2.6 in Referenz (114)): So können zusätzlich zur Auftrennung der Ionen nach m/z (Vorläuferionen) einzelne Ionen mit definiertem m/z-

** Die den Antikörper eindeutig charakterisierende bzw. identifizierende H-CDR3-Region liegt in dem variablen Anteil der Schwereketten; daher wurde nur diese Schwereketten, nach vorheriger Affinitätsaufreinigung von Desmoglein-spezifischen Autoantikörpern und anschließender elektrophoretischer Auftrennung mittels denaturierender SDS-PAGE, aus dem Gel exzidiert. Die Leichtketten wurden hier verworfen, da für diese Fragestellung nicht informativ.

†† Trypsin spaltet proteolytisch nach den Aminosäuren K (Lysin) und R (Arginin); hieraus folgt auch der Verlust der Identifizierbarkeit solcher H-CDR3-enthaltenden Peptide (und damit Informationen zu diesem Antikörper), welche in diesem Bereich zu viele Lysine und Arginine enthalten; dies kann durch den Abgleich mit den Nukleinsäuredatenbanken vor Durchführung der LC-MS/MS-Experimente vorhergesagt werden.

Verhältnis isoliert, weiter fragmentiert (in Produkt-bzw. Tochterionen der Vorläuferionen), und dann analysiert werden. „Werden viele Ionen des gleichen Peptids [mittels low-energy collision-induced dissociation, CID] fragmentiert, beobachtet man daher in den Spektren [des zweiten Massenanalysators bei Tandem-MS-Experimenten] mehr oder weniger vollständige Fragmentationenserien. Zwei aufeinanderfolgende Fragmentationen einer Serie unterscheiden sich dabei um einen Aminosäurerest. Dieser wird anhand der Massendifferenz identifiziert [und erlaubt somit Rückschlüsse auf die Aminosäuresequenz]. Bei Peptiden gibt es prinzipiell sechs mögliche Serien, die aus Einfachdissoziationen hervorgehen, die N-terminalen a-, b-, und c-Ionen sowie die C-terminalen x-, y-, und z-Ionen. Hiervon werden mit [...] low-energy-CID b- und y-Ionen [...] häufiger gebildet. [...] Mit ESI werden [...] [dabei] Mischungen von einfach, zweifach, dreifach und auch vierfach geladenen Molekülonen detektiert. Je nach Größe und Sequenz des Peptids ist dabei das zweifach oder das dreifach geladenen Molekülon das häufigste.“^{##} (114) Die Detektion „möglichst langer Serien von b- und y-Ionen“ (114) von CID-Spektren tryptischer Peptide erlaubt in der Regel die vollständige Sequenzbestimmung eines Proteins, wie auch in dieser Dissertation gezeigt. Um ggf. „verbliebene Sequenzlücken zu schließen und alle Teilsequenzen richtig anzuordnen, [...] [kann] das [zu untersuchende] Protein alternativ noch mithilfe von mindestens einer zweiten spezifischen Endoprotease [...] in Peptide zerlegt [werden]. Diese werden dann ebenfalls [...] analysiert. Anstelle des Proteins werden also viele verschiedene, überlappende Peptide sequenziert und aus diesen Informationen wird die [theoretisch bekannte] Gesamtsequenz [mit Hilfe bioinformatischer Methoden und MS-spezifischer Programme] rekonstruiert.“ (Kapitel 16.6.3 in Referenz (114))

^{##} Für die Bildung von b- und y-Ionen wird dabei eine aktive Beteiligung mobiler Ladungen (Protonen) angenommen, „in protonierten Peptidionen sind [jedoch] basische Gruppen, also die N-terminale Aminogruppe sowie die Seitenketten der Aminosäuren Lysin und insbesondere Arginin, bevorzugte Aufenthaltsorte für das ladungsgebende Proton.“ (Kapitel 16.6.3 und folgende in (114). Lottspeich F. Bioanalytik. 3., [aktualisierte und erweiterte] Aufl. ed. Heidelberg: Springer; 2012. 1201 S. p.)

Bezüglich „der Quantifizierung wird unterschieden zwischen absoluten Mengen oder Konzentrationen (absolute Quantifizierung) und relativen Unterschieden bzw. Veränderungen in Prozent (relative Quantifizierung). Absolute Quantifizierungen mittels Massenspektrometrie sind möglich, wenn bekannte Mengen der zu bestimmenden Verbindung zur Probe zugegeben werden. Relative Bestimmungen der gleichen Substanzen in verschiedenen Proben können hierauf verzichten, erfordern aber sehr gut reproduzierbare Probenvorbereitungen und MS-Analysen. Mittels der Technik der Isotopenverdünnung [...] sind absolute [...] Quantifizierungen möglich mit einem relativen Fehler von nur wenigen Prozent. Die Technik basiert auf der Erkenntnis, dass stabile isotopische Moleküle chemisch in der Regel nicht unterscheidbar sind, das bedeutet sie werden bei der Probenvorbereitung [d.h., bei der Trypsinisierung der Proteinprobe und während der chromatischen Auftrennung] nicht unterschieden und gleich gut ionisiert und detektiert. Aufgrund ihrer [gering] unterschiedlichen Massen können isotopische Moleküle aber im Massenanalysator getrennt werden [– ansonsten wäre eine absolute Quantifizierung durch den Vergleich mit dem nicht-isotopenmarkierten Peptid nicht möglich]. Dies macht man sich zunutze, indem man in dem zu bestimmenden [synthetisch generierten] Molekül [Peptid] gezielt [...] einige ^{12}C -, ^{14}N oder ^{16}O -Atome gegen ^{13}C , ^{15}N oder ^{18}O austauscht. Entscheidend ist, dass der daraus resultierende Massenzuwachs so groß ist, dass die Isotopenverteilungen der beiden Moleküle (die unmarkierte, ‚leichte‘ Form und die isotopenmarkierte ‚schwere‘ Form) nur geringfügig überlappen, das heißt ihr Mengenverhältnis kann durch Vergleich von Signalhöhen oder Peakflächen bestimmt werden. Für proteolytische Peptide sollte der Massenunterschied mindestens 4 Da betragen.“(Kapitel 16.8 in Referenz (114))

Grundsätzlich kann in der experimentellen Anwendung von MS-Techniken in der Immunologie eine wichtige Komplementierung genetischer Methoden gesehen werden; durch ihre Kombination werden ganz neue Einsichten möglich, wie es auch im Rahmen dieser

Dissertationsschrift anhand der NGS- und APD-gestützten LC-MS/MS zur Antikörpercharakterisierung illustriert werden soll.

Strategie und Fragestellungen des hier vorgelegten Projektes

Im Rahmen dieser Dissertationsschrift sollen folgende Strategien zur Beantwortung der anschließend genannten Fragestellungen verfolgt werden:

1. Identifizierung monoklonaler Anti-Desmoglein 3 (Dsg3)-Antikörper mittels Phagen-Displays, einer rein genetischen Methode zur Gewinnung von Autoantikörpern, basierend auf RNA zirkulierender, peripherer Leukozyten eines klinisch aktiven Pemphigus vulgaris-Patienten.
2. Etablierung einer proteomischen Versuchsroutine zur Identifizierung von anti-Dsg3-Serumautoantikörpern (bzw. ihrer sie kennzeichnenden Peptidfragmente der H-CDR3-Bereiche in den variablen Schwerketten) desselben Patientens, sowie Vergleich dieser Antikörper mit jenen aus Punkt 1.
3. Validierung der proteomisch erhaltenen Serumantikörperfragmente mittels separatem Leichtketten-Shuffling-Phagen-Displays.

Es sollen, spezifisch für die Gruppe der Pemphiguserkrankungen, die Fragen beantwortet werden, ob

1. die mittels genetischer Methoden charakterisierten Antikörper den tatsächlich zirkulierenden Serumantikörpern entsprechen;
2. die Autoimmunantwort, auf Ebene der Autoantikörper, tatsächlich nur oligoklonal (wie aus genetischer Charakterisierung gefolgert) ist;
3. die proteomisch erhaltenen Antikörper valide sind.

Material und Methoden

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit sind genaue Protokolle mit den einzelnen, detaillierten Arbeitsschritten sowie zusätzliche Parameter, Daten und technische Angaben separat im Anhang dieser Dissertationsschrift nachgewiesen (**Appendices II-XI**).

Patienten und verwendete Patientenproben

Bei dem bei Erstdiagnose 34-jährigen, männlichen Patienten PV3 (mit den untersuchten Zeitpunkten PV3 [Erstdiagnose; Dezember 2006] und PV3a [+5,5 Jahre später, in einem Rückfall der Erkrankung; Mai 2012]) wurde mittels Histologie, direkter Immunfluoreszenz sowie mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF-Titer 1:256 für IgG auf Affenösophagus) und positivem Dsg3-/Dsg1-spezifischem ELISA und konkordanter Klinik die Diagnose eines mukokutanen Pemphigus vulgaris gestellt (16). Im Intervall erfolgte eine Therapie mit oralem Prednisolon und Mycophenolatmofetil, mit Zeiten der vollständigen klinischen Remission ohne Therapie. Zu den Zeitpunkten PV3 und PV3a wurden ca. 50 mL EDTA-Blut entnommen und die peripheren Leukozyten mittels Ficoll-Paque PLUS-Dichtegradientenzentrifugation nach Herstellerangaben isoliert. Separiertes EDTA-Plasma wurde bei -80°C gelagert, die Zellpellets in flüssigem Stickstoff bis zur RNA-Isolierung kryokonserviert. Vor Blutentnahme wurde, der Deklaration von Helsinki folgend, das aufgeklärte Einverständnis zur wissenschaftlichen Nutzung und Analyse der Blutprobe eingeholt (Institutional Review Board Protocol 704768 der University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, U.S.A.). Von Patient PV1 (Erstdiagnose September 2002), welcher in Referenz (16) ebenfalls näher beschrieben ist, wurde in gleicher Weise zu verschiedenen Zeitpunkten (PV1, PV1a, PV1b, PV1c) zelluläres Material gewonnen, aus dem der hier verwendete monoklonale Antikörper PV1a 3-15 isoliert werden konnte.

Chemikalien, Reagenzien, Lösungen, sonstige Verbrauchsmaterialien

Eine umfassende Liste findet sich im Anhang, **Appendix II**.

Geräte

Eine umfassende Liste findet sich im Anhang, **Appendix III**.

RNA-Isolation aus peripheren Leukozyten, Transkription zu cDNA

Aus den kryokonservierten peripheren Leukozyten des jeweiligen Blutentnahmezeitpunktes wurde RNA unter Reinraumbedingungen und unter vollständiger, zugfreier Klimatisierung mittels TRIzol™-Reagenz nach Herstellerangaben isoliert, in 50% v/v 2-Propanol bei 12.000 g und 4°C über 10 min gefällt, mit 75% v/v Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert (7.500 g, 4°C, 5 min) und getrocknet (in einer PCR-Hood, 5 min). Hiernach Resuspendierung in DEPC-Wasser, Konzentrationsbestimmung und Abschätzung der A260/A280-Ratio mittels NanoDrop. Schlussendlich Aufreinigung dieser RNA mittels QIAGEN RNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben und Langzeitlagerung in Aliquots zu 5 µg und 10 µg als Ethanolpräzipitate bei -80°C (Endkonzentrationen: 71,4% v/v Ethanol; 2,8% v/v 3 M NaOAc), in Eppendorf-LowBind-Tubes. Vor Transkription zu cDNA ausgiebige Zentrifugation der Ethanolpräzipitate (mind. 20 min bei 13.000 g), Waschen mit 75% v/v Ethanol, Lufttrocknung und Resuspendierung in RNase-freiem Wasser. Im Anschluss sofortige Transkription zu einzelsträngiger cDNA mittels SuperScript™ III (nach Herstellerangaben) oder doppelsträngiger cDNA mittels SMARTer® PCR cDNA Synthesis Kit (nach Herstellerangaben); Lagerung dieser cDNA bei mind. -20°C bis zur nachfolgenden PCR-Reaktion.

Klonierungsexperimente zur Durchführung des Phagen-Displays

Die Klonierung des scFv-kodierenden Antikörperrepertoires zum Zwecke der Expression auf Phagen und nachfolgender Selektion auf Antigen erfolgte nach etablierten Protokollen der Arbeitsgruppe von Carlos F. Barbas, III, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, U.S.A. (s. Protocol 9.2 in Referenz (115)), unter Verwendung des pComb3X-SS-Expressionsvektors. In aller Kürze erfolgten, von cDNA ausgehend, mehrere PCRs zur Generierung von Amplikons der variablen Schwerketten des IgG-Repertoires (panIgG, d. h., die Subklassen IgG1/2/3/4 umfassend), von Amplikons der variablen Leichtketten des Lambda-Repertoires, sowie von Amplikons der variablen Leichtketten des Kappa-Repertoires. Nach separater Aufreinigung mittels Gelelektrophorese und QIAGEN QIAquick Gel

Extraction Kits (nach Maßgabe des Herstellers) und Gelquantifizierung mittels optischem Vergleich mit definierten DNA-Mengen in einem Standard (Low DNA Mass Ladder mit 2000, 1200, 800, 400, 200, 100 bp DNA-Fragmenten, Invitrogen) erfolgte sodann eine Overlap-PCR von variablen Schwerketten mit variablen Leichtketten, getrennt für Lambda-/Kappa-Leichtketten. In diesem Schritt werden Schwer- und Leichtketten zufällig miteinander verbunden und bilden somit scFv-kodierende DNA-Fragmente. Nach erneuter Gelaufreinigung und Gelquantifizierung dieser Overlap-Fragmente erfolgte dann (getrennt für $V_H:V_K$ und $V_H:V_\lambda$) eine Ligation in den linearisierten, zuvor ebenfalls gelaufgereinigten und quantifizierten Phagemid-Vektor pComb3X. Nach Testung der Transformationseffizienzen erfolgte dann die endgültige Transformation in XL-1 Blue-*E.coli*, die Hinzugabe von VCSM13-Helferphagen, sowie die Aufreinigung der resultierenden, polyklonalen Phagenpräparationen, welche an ihren pIII-Kapsidproteinen eine minimale Zahl (idealerweise $n=1$) des Fusionsproteins aus pIII-scFv exprimieren (vgl. Kapitel 1 und Kapitel 2 in (115)). Zur Bestätigung und Validierung rein proteomisch identifizierter monoklonaler Antikörperfragmente mussten die korrespondierenden, vollständigen scFvs (aus variabler Schwer- und Leichtkette) hergestellt werden. Dies gelang durch Vergleich des klonidentifizierenden H-CDR3-Peptids mit den mittels NGS gewonnenen Sequenzen der variablen Schwerketten, sodass die variable Schwerkette *in silico* identifiziert und als DNA-Fragment synthetisiert werden konnte (gBlocks®, von IDT bezogen). Zur Identifizierung der korrekten, dazugehörigen Leichtkette wurde sodann die variable Schwerkette mit dem gesamten Leichtkettenrepertoire des gleichen Patienten (mittels PCR gewonnen, s. o.) vereinigt (modifizierte Overlap-PCR-Reaktion). Dieses Leichtkettenshuffling (engl. „Light-Chain Shuffling“, LCS) erlaubt dann, wie bei dem normalen Phagen-Display, mittels Selektion auf dem Antigen die Isolation der passenden Leichtkette.

Die verwendeten, genauen Protokolle für PCRs, Aufreinigung, Quantifizierung und Ligation sowie die verwendeten Primersets sind in **Appendix IV** gezeigt.

Selektion antigenspezifischer Phagen mittels Phagen-Displays

Die polyklonalen Phagenpräparationen wurden mittels 4% (w/v) Polyethylenglykol (PEG-8000)/3% (w/v) NaCl präzipitiert und in 1% (w/v) BSA/1x TBS/1 mM CaCl₂ resuspendiert. Der Überstand ist potentiell hochkontaminierend und muss nicht nur vorsichtig abgehoben, sondern auch sofort inaktiviert werden (mittels Natriumhypochloritlösung, final 0,5-1% (v/v)). Hiernach sollte idealerweise noch am gleichen Tag die Selektion („Panning“) auf dem Antigen der Wahl stattfinden; hier waren dies kommerziell erhältliche ELISA-Wells mit Desmoglein 3 (MBL), welche, wie die Phagenpools selbst, zur Blockierung unspezifischer Epitope und der Plastikoberflächen zuvor für 1-2 h mit 3% (w/v) Milch in 1x TBS inkubiert wurden. Nach Inkubation der Phagenpools mit dem Antigen erfolgten dann Waschschriffe, um nicht gebundene Phagen zu entfernen (unter zunehmender Zahl an Waschschriffen mit zunehmender Wiederholung der Phagenselektion, zur Erhöhung der Bindungsstärke mit der Zeit). Nach erfolgten Waschschriffen erfolgte dann eine Elution der antigengebundenen Phagen mittels 76 mM Zitronensäure, pH 2.2 (über 10 min) und, nach Transfer in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß, die Neutralisation zu pH 7 mittels 2 M TRIS, pH 11. Diese neutralisierten Phageneluate können dann für die nächste Selektionsrunde auf dem Antigen in E.coli amplifiziert und als Phagenpool isoliert werden. In der Regel sind auf rekombinanten, immobilisierten Antigenen 2-4 Selektionsrunden ausreichend, um hochspezifische Binder zu erhalten, welche dann als monoklonale Phagen isoliert, sequenziert und als lösliche scFv-Proteine weiter charakterisiert werden können. Diese Affinitätssteigerung vieler Millionen Phagen über mehrere Runden der Selektion kann als synthetisches Abbild des adaptiven Immunsystems nach Infektion mit einem neuen, noch unbekanntem Erreger aufgefasst werden.

Die verwendeten, genauen Protokolle für Panning, Phagenpräzipitation und Isolation monoklonaler Phagen sind in **Appendix V** gezeigt.

Vermeidung der Phagenkontamination

Sauberes, aerosolverhinderndes Arbeiten ist sehr wichtig zur essentiellen Vermeidung von Kontamination mit Phagen, welche extremen Bedingungen

widerstehen können. Eine normale Dampfdruckautoklavierung inaktiviert M13-Phagen nicht. Alle mehrfach zu benutzenden Plastikwaren (z. B. Flaschen zur Ultrazentrifugation) müssen nach Phagenkontakt in 0,5-1% (v/v) Natriumhypochloritlösung eingeweicht und anschließend mit destilliertem Wasser gespült und autoklaviert werden. Glaswaren können über Nacht bei 121°C trocken gebacken werden, um jegliche Kreuzkontamination auszuschließen. Pipetten und Laboroberflächen müssen täglich mit 0,5-1% (v/v) Natriumhypochloritlösung abgewischt werden. Einwegplastik muss der Verbrennung zugeführt werden (ohne vorheriges Autoklavieren). Sehr häufiges Wechseln der Handschuhe und der Laborkittel sowie Arbeiten in absolut zugfreien, abgeschlossenen Räumen (S1-Labore) ist unerlässlich.

Isolation, Sequenzierung, und Herstellung antigenspezifischer Antikörper

Nach Anreicherung des polyklonalen Phagenpools (mittels anti-M13-Phage-ELISAs auf rekombinantem Antigen bestimmbar, **Appendix V**) werden monoklonale Kolonien von *E.coli* zufällig von den Luria-Bertani-/Carbenicillin-Ausstrichplatten mittels steriler Pipettenspitzen ausgewählt und einzeln in 10 mL Kulturen (SuperBroth/Tetracyclin/Carbenicillin, in 50 mL Falcon-Röhrchen) genommen. Pro Selektionsrunde empfehlen sich hierbei 16-32 monoklonale Kolonien. Nach Inkubation über Nacht im Schüttler (30-37°C, 225 rpm) sollte eine deutliche Trübung der Kultur sichtbar sein. Von diesen monoklonalen Kulturen wird jeweils ein 500 µL Aliquot für einen Glycerolstock (500 µL Kultur + 500 µL 30% (v/v) Glycerol in LB-Medium; Lagerung bei -80°C) und ein 2 mL Aliquot für die Pelletierung in einem 2 mL Eppendorf-Reagenzgefäß abgenommen; der Rest wird verworfen. Pelletierung in der Zentrifuge bei 4000 g über 15 min, dann Isolation der Plasmid-DNA mittels QIAGEN QIAprep Spin Miniprep-Kits und Lagerung bei -20°C. Sanger-Sequenzierung mittels Vorwärts- und Rückwärtsprimern (ompseq-/dpseq-Primern, jeweils bei 4 pM) in der Nucleic Acid PCR Core (NAPCore) Facility, Children's Hospital of Philadelphia, und Auswertung der resultierenden ab1-Dateien mittels VectorNTI® (Life Technologies) und SnapGene® (GSL Biotech) Software. Manuelle Kontrolle der DNA-Chromatogramme bei Unstimmigkeiten im Alignment der Sequenzierungsergebnisse, ggf. Re-Sequenzierung. Kontrolle der resultierenden

scFv-kodierenden Sequenzen mittels IMGT/V-QUEST (116, 117) und vbase2 (118). Anschließend erfolgten manuelle Zuordnung nach H-CDR3-Aminosäuresequenz zur Gruppierung von B-Zell-Klonen (20% Sequenzabweichung bei gleichem D-Gen und JH-Gen erlaubt) und Speichern der so zusammengetragenen, einzeln kontrollierten Sequenzen im fasta-Format auf mindestens zwei Speichermedien. Die hier gewonnenen, antigenspezifischen V_H-Sequenzen sind in die Erstellung der Datenbank für die nachfolgenden LC-MS/MS-Experimente eingeflossen (s. u.).

Zur Herstellung von löslichen, monoklonalen scFv-Antikörpern wurden die Standardprotokolle (Kapitel 12 in Referenz (115)) befolgt. Es erfolgte zunächst die Transformation von non-suppressor TOP10F'-*E.coli* mit dem sequenzierten, monoklonalen DNA-Vektor mittels Hitzeschock (nach Herstellerangaben). Nach Kultur über Nacht Lyse mittels FastBreak™ Cell Lysis Reagent (Promega) zur Freisetzung des Proteins aus dem periplasmatischen Raum und Affinitätsaufreinigung des His-getaggten scFv aus dem mehrfach abzentrifugierten Lysat mittels Kobalt-Ionen-tragender TALON-Beads (Takara) nach Herstellerangaben. Eine weitere Validierung dieser rekombinanten Proteine z. B. mittels indirekter Immunfluoreszenz auf Affenösophagus oder normaler humaner Haut ist möglich, ebenso die Durchführung eines anti-HA-ELISA auf Desmoglein-Substrat kommerzieller ELISA-Systeme.

Die verwendeten, genauen Protokolle für die Isolation monoklonaler, scFv-kodierender pComb3X-Vektoren sowie zur Herstellung monoklonaler scFv-Proteine sind in **Appendix VI** gezeigt.

Validierung der antigenspezifischen Antikörper im scFv-Format

Aufgrund des Designs der pComb3X-Expressionsvektoren besitzen die rekombinant hergestellten, monoklonalen scFv-Antikörper sowohl ein 6His-Tag als auch ein HA-Tag. Während das 6His-Tag für die Affinitätsaufreinigung genutzt werden sollte, ermöglicht das HA-Tag einen hochspezifischen Nachweis antigengebundener scFv-Fragmente, z. B. mittels indirekter Immunfluoreszenz auf entspr. Substraten (hier: Affenösophagus, normale humane Haut) oder mittels ELISA (hier: Dsg3, Dsg1, BP180, BP230; EUROIMMUN, MBL). Die hierfür benötigten Protokolle sind publiziert in (119) und in **Appendix VII** gegeben.

Hochdurchsatzsequenzierung (NGS) des Antikörperrepertoires

Zur Identifizierung zirkulierender, antigenspezifischer Antikörper mittels LC-MS/MS (s.u.) ist die Erstellung einer eigenen, patientenspezifischen Datenbank zu dem Repertoire variabler Schwerketten (V_H) des jeweiligen, untersuchten Individuums unabdingbar. Das V_H -Repertoire des Isotyps IgG wurde mittels Illumina® MiSeq 2x 300 bp-Technik sequenziert; hierzu erfolgte in einem ersten PCR-Schritt zunächst, vergleichbar zu der Erstellung des Phagen-Display- V_H -Amplikons vom gleichen Patienten, eine V_H -PCR-Reaktion mit Primern, welche zusätzlich NGS-spezifische Overhang-Adapter am Forward- und am Reverse-Primer aufwiesen. Nach PCR-Amplikon-Aufreinigung mittels QIAGEN QIAquick PCR Purification Kits erfolgte in einer weiteren PCR-Reaktion (unter Beachtung der Nextera Low Plex Pooling Guidelines von Illumina®) die Anbringung Illumina®-spezifischer Sequenzierungsadapter, welche neben den Indices zur Multiplex-NGS (PV3a- V_H -Library: Index i5=501; Index i7=706; PV3- V_H -Library: Index i5=501; Index i7=701) auch in den Flow-Cell-Bindungsstellen P5 und P7 am 5'- und am 3'-Ende des finalen Amplikons resultierte (alle PCR-Reaktionen erfolgten mittels Q5 DNA Polymerase von NEB um keine Nukleinsäureartefakte einzubringen). Das resultierende, finale Amplikon wurde, zusammen mit Amplikons anderer, in dieser Dissertationsschrift nicht gezeigter Patienten (mit anderen Indices) äquimolar gemischt und am Institute for Genome Sciences der University of Maryland, Baltimore, MD, U.S.A., sequenziert (PV3a und PV3 wurden hierbei nicht gleichzeitig, sondern zeitlich getrennt sequenziert, wie aus den identischen i5-Indices ersichtlich). Die Anfertigung des Amplikons basiert auf etablierten Protokollen des Labors von Prof. Dr. Aimee S. Payne (Dept. of Dermatology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, U.S.A.) und wurde mit Hilfestellung von Herrn Dr. Christoph T. Ellebrecht aus dem vorgenannten Labor durchgeführt. Die Datenanalyse erfolgte hiernach nach Maßgabe des Promovenden und der Arbeitsgruppenmitglieder von Prof. Dr. John R. Stanley durch den Bioinformatiker Dr. Qi Zheng (Dept. of Dermatology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, U.S.A.). Dazugehörige NGS-Sequenzdaten sind vollständig online im NCBI Sequence Read Archive (SRA), Accession# PRJNA309663 hinterlegt, das detaillierte Protokoll ist in **Appendix VIII** gezeigt.

Affinitätsaufreinigung antigenspezifischer Antikörper aus Serumproben

Desmoglein 3 (Dsg3)-spezifische Autoantikörper wurden aus Serum (welches aus dem vorhandenen Plasma des Patienten nach *in vitro*-Gerinnung und nachfolgender Dialyse gewonnen wurde) des Patienten PV3 (Zeitpunkt PV3a) mittels Dsg3-Säulen (selbst hergestellt, und von EUROIMMUN bezogen) aufgereinigt, nach in **Appendix IX** gezeigten Protokollen (vgl. hierzu auch Referenz (120)). Das Eluat dieser Säulenaufreinigung wurde „Bound“ genannt (anti-Dsg3-Antikörper enthaltend), während der Durchfluss dieser Säulenaufreinigung, nach Aufreinigung mittels Protein G-Beads (nach Herstellerangaben) „Unbound“ genannt wurde (alle Antikörper außer anti-Dsg3-Antikörper enthaltend; non-anti-Dsg3-Antikörper). Teilweise wurden die Dsg3-spezifischen Antikörper nicht mittels niedriger pH-Bedingungen eluiert, sondern direkt im SDS/beta-Mercaptoethanol-Probenpuffer erhitzt und auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Alle Aufreinigungsschritte wurden mittels Dsg3-ELISA (EUROIMMUN) überprüft, jeweils angepasst an die Verdünnung des Ausgangsmaterials (zur Herstellung der Vergleichbarkeit).

LC-MS/MS von Antikörperschwerketten

Die Vorbereitung der LC-MS/MS-Experimente erfolgte durch den Promovenden, die apparativen LC-MS/MS-Untersuchungen selbst durch die Proteomics & Metabolomics Facility am Wistar Institute, Philadelphia, PA, U.S.A. (Dr. Hsin-Yao Tang, Thomas Beer). Initiale LC-MS/MS-Experimente wurden zunächst allein mit affinitätsaufgereinigten und mittels SDS-PAGE (4-12% Criterion™ Tris-HCl Protein Gel, Bio-Rad) separierten Antikörperschwerketten („Bound“-Fraktion; ca. 50 kDa) durchgeführt, ohne parallel die Schwerketten aus dem Durchfluss („Unbound“, s.o.) ebenfalls zu untersuchen (s. **Panel 4**, Ergebnisteil), und ohne Daten aus dazugeh. NGS-Experimenten zu diesem Patienten zu besitzen (d.h., es waren allein die antigenspezifischen Antikörper aus den dazugehörigen Phagen-Display-Experimenten zum gleichen Individuum bekannt)^{§§}. Diese initialen Experimente konnten, wie im Ergebnisteil näher ausgeführt, einige wenige der

^{§§} Verwendete DTASelect v2.0-Parameter: XCorr (+1) >1,8; (+2) >2,0; (+3) >3,0; deltaCN >0,05; ppm <5; H-CDR3-Abdeckung >50%; Erlauben halb-tryptischer Peptide; manuelle Überprüfung aller Fragmentationen der H-CDR3-Region. Verwendete SEQUEST-Parameter: Erlauben einer fehlenden Schnittstelle sowie posttranslationaler Veränderungen (Oxidation, Acetylation), Peptidtoleranz 15 ppm, Fragmentationstoleranz 20 mmu.

genetisch identifizierten monoklonalen Antikörper auch im Serum nachweisen. In diesem Stadium der Versuche testete der Promovend, in enger Zusammenarbeit mit dem Wistar-Institut, auch unterschiedliche Versuchsbedingungen, z. B. hinsichtlich des Verdaus (Trypsin, Endoproteinase GluC), der Probenaufbereitung (exzidierte Gelbande vs. in Lösung), oder der exzidierten Proteinbande selbst (vollständige Antikörperschwerketten von ca. 50 kDa apparenter Größe vs. Fab'-Fragmente, welche vor SDS-PAGE-Auftrennung durch Inkubation des Dsg3-spezifischen Eluats mit IdeS (FabRICATOR®, Genovis) hergestellt wurden, von ca. 31 kDa apparenter Größe). In weiterführenden Experimenten wurde dann die Stringenz der massenspektrometrischen Untersuchungen deutlich erhöht, indem im gleichen Experiment stets „Bound“ und „Unbound“ mitgeführt wurden; unter Abgleich mit den genetischen Sequenzdaten aus den NGS-V_H-Repertoiresequenzierungen (Zeitpunkte PV3 und PV3a [+5,5 Jahre]) konnte so, trotz strikterer Anforderungen, eine größere Zahl an antigenspezifischen Klonen identifiziert werden (s. **Panel 7** und **Panel 8**, Ergebnisteil). Alle unter diesen neuen Bedingungen durchgeführten Experimente wurden in drei bis vier technischen Replikaten für „Bound“ und „Unbound“ durchgeführt. Genauere Informationen zu den stringenteren LC-MS/MS-Bedingungen finden sich in **Appendix X**. Alle hier entstandenen LC-MS/MS-Proteomikdaten sind online unter <https://massive.ucsd.edu>, Accession Number MSV000080368 (zuletzt abgerufen am 13.04.2019, 11:10 Uhr), hinterlegt.

Bioinformatische Auswertung und Korrelation der LC-MS/MS-Daten mit genetischen Sequenzdaten

Zur Interpretation der experimentellen LC-MS/MS-Daten ist ein Abgleich mit *in silico*-generierten, vorhergesagten Spektren notwendig, da eine *de-novo*-Interpretation von Spektren (derzeit noch) zu fehleranfällig und rechenintensiv ist (74). Hierzu muss zunächst eine Datenbank von Proteinen aufgebaut werden, welche zur Analyse von Serumantikörpern für jedes untersuchte Individuum individuell ist. Ergänzt wird diese patientenspezifische Antikörperproteindatenbank durch das gesamte humane Proteom, welches online veröffentlicht ist (<http://www.uniprot.org>; zuletzt abgerufen 12.04.2019,

20:34 Uhr). Für die hier gezeigten, initialen LC-MS/MS-Experimente erfolgte zunächst noch die Datenbankerstellung durch den Promovenden selbst (vgl. **Panel 4**, Ergebnisteil). Hierzu wurden die bekannten, mittels Phagen-Displays erhaltenen Antikörpersequenzen herangezogen, im Bereich der H-CDR3-Aminosäuresequenzregion die eindeutig klonidentifizierenden tryptischen Peptide gebildet (diese enthalten 3' auch noch die Framework-Region 4) und mittels eines selbstprogrammierten Pythonscriptes *in silico* mit allen bekannten 5'-Regionen der konstanten Region 1 (CH1-Region) aller Antikörperisotypen fusioniert (engl. concatenated). Diese so entstandenen Proteinflagen wurden sodann im fasta-Format dem Wistar-Institut überstellt, welches hieraus eine Spektrendatenbank erstellte (unter Zuhilfenahme von SEQUEST, ThermoFisher Scientific), die zum Abgleich mit den experimentellen Spektren genutzt werden konnte (121). Für die deutlich umfangreicheren Spektrenanalysen der nachfolgenden, stringenteren Experimente (und aufgrund der sehr großen Datenmengen) wurde sodann die Expertise des Bioinformatikers Dr. Qi Zheng (Dept. of Dermatology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, U.S.A.) in Anspruch genommen, nach Maßgabe des Promovenden und der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. John R. Stanley und von Dr. Hsin-Yao-Tang. Informationen zu den genauen bioinformatischen Parametern und den verwendeten Programmen finden sich in **Appendix XI**.

Ergebnisse

Erfolgreiche Klonierung und Selektion funktioneller, humaner, monoklonaler anti-Desmoglein 3-Autoantikörper mittels Phagen-Displays

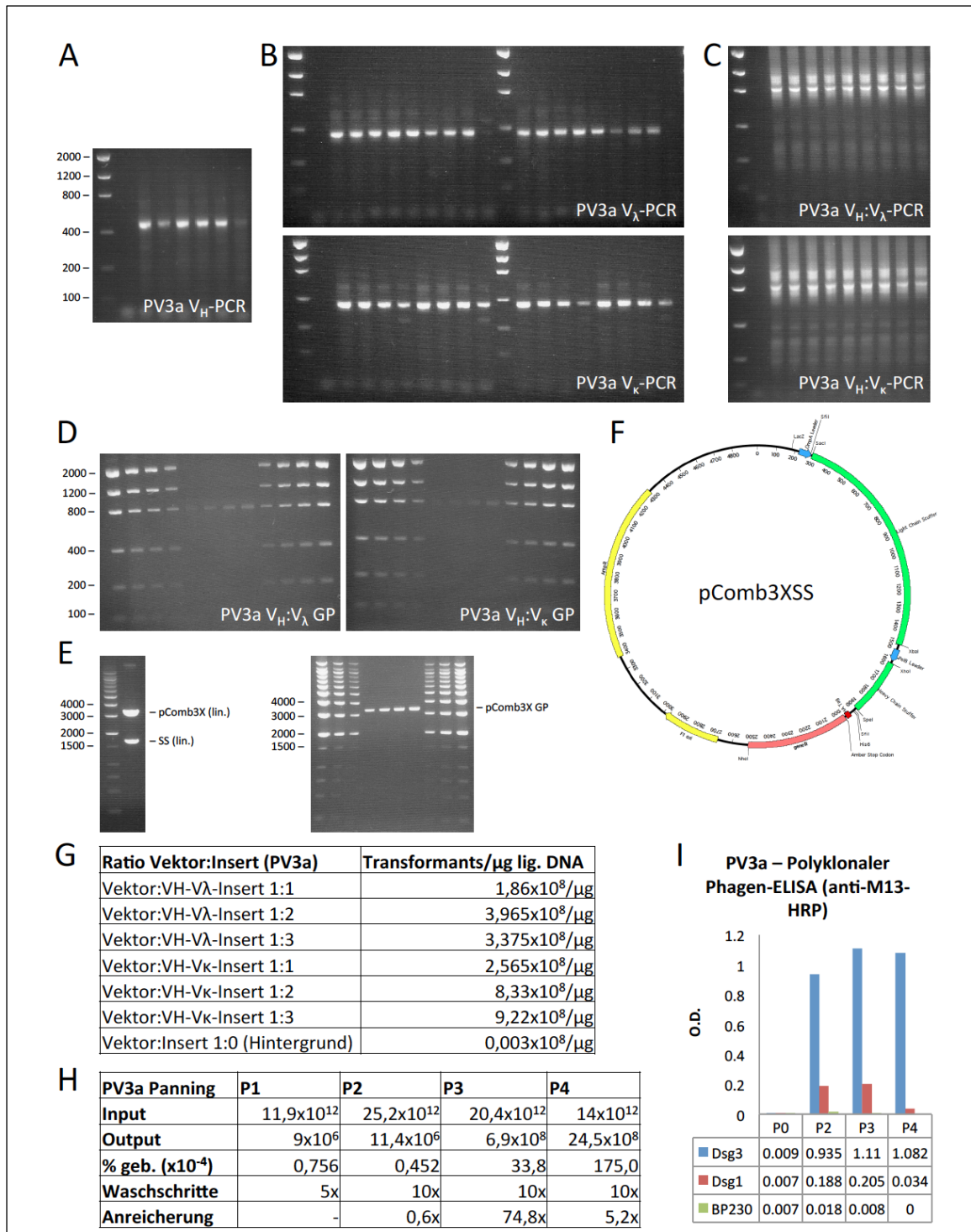
Zur Untersuchung der oben aufgestellten Fragestellungen bedarf es zunächst der Klonierung, Selektion und Sequenzierung funktioneller, humaner, monoklonaler anti-Desmoglein 3-Autoantikörper mittels einer genetischen Methode wie z. B. der des Phagen-Displays (engl. Antibody Phage Display, APD). Hierzu wurden einem aktiven, klinisch wie diagnostisch bestätigten, mukokutanen Pemphigus vulgaris-Patienten mit dem Identifikationscode PV3 zum Zeitpunkt PV3a^{***} ca. 60 mL Vollblut aus einer peripheren Vene abgenommen und, nach Dichtegradientenzentrifugation, die Leukozyten (engl. PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells) isoliert. Nach RNA-Isolation und reverser Transkription zu cDNA erfolgten dann PCRs zur Amplifikation der cDNA-Repertoires variabler Schwerketten vom IgG-Isotyp (sechs Genkombinationen, alle vier IgG-Subklassen erfassend) ^{†††}, variabler Kappa-Leichtketten (16 erfasste Genkombinationen), sowie variabler Lambda-Leichtketten (18 erfasste Genkombinationen). Nach Gelaufreinigung der PCR-Produkte (s. **Panel 1: A, B**) erfolgte eine Overlap-PCR-Reaktion zur Erzeugung von scFv-kodierenden DNA-Fragmenten aus variabler Schwereketten-Linker-variabler Kappa-Leichtkette ($V_H:V_K$) und aus variabler Schwereketten-Linker-variabler Lambda-Leichtkette ($V_H:V_\lambda$). Diese wiederum gelaufgereinigten DNA-Fragmente (s. **Panel 1: C, D**)

^{***} Das Antikörperrepertoire des Patienten PV3 wurde zu den Zeitpunkten PV3 und PV3a (+5,5 Jahre) mittels APD genetisch/funktionell charakterisiert; in der vorliegenden Dissertationsschrift wird vor allem der Zeitpunkt PV3a näher beschrieben. Daten zum Zeitpunkt PV3 finden sich in Ref. (16.Hammers CM, Chen J, Lin C, Kacir S, Siegel DL, Payne AS, et al. Persistence of anti-desmoglein 3 IgG(+) B-cell clones in pemphigus patients over years. The Journal of investigative dermatology. 2015 Mar;135(3):742-9. PubMed PMID: 25142730. Pubmed Central PMCID: 4294994, 111. Chen J, Zheng Q, Hammers CM, Ellebrecht CT, Mukherjee EM, Tang HY, et al. Proteomic Analysis of Pemphigus Autoantibodies Indicates a Larger, More Diverse, and More Dynamic Repertoire than Determined by B Cell Genetics. Cell reports. 2017 Jan 3;18(1):237-47. PubMed PMID: 28052253. Pubmed Central PMCID: 5221611.), zusammen mit weiteren Details zu diesem Patienten und den charakterisierten Zeitpunkten entlang des Krankheitsverlaufs. Die V_H -Repertoires beider Zeitpunkte wurden mittels NGS im Rahmen dieser Dissertationsschrift sequenziert, s.o. und Appendix VIII.

^{†††} Der verwendete V_H -Reverse-Primer lagert sich am Beginn der für die konstanten Region 1 (CH1) des Immunglobulin kodierenden Transkripte an und ist spezifisch für den Isotyp IgG. Da er alle vier Subklassen (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) erfasst wird er hier als panIgG-Reverse-Primer geführt.

wurden nun, separat für Kappa/Lambda, in den linearisierten und ebenfalls gelaufgereinigten Vektor pComb3X^{###} einkloniert, für die Elektroporation in XL1-*E.coli*-Zellen vorbereitet und auf Transformationseffizienzen hin getestet (s. **Panel 1**: G). Diese Vektorpräparationen stellen *de facto* immortalisierte cDNA-Bibliotheken des gesamten, auf RNA-Ebene exprimierten (IgG-) Antikörperrepertoires des Patienten PV3a dar. Nach erfolgter Elektroporation, *E.coli*-Kultur und Phagenpräparation können dann, in wiederholten Selektionsrunden auf dem entsprechenden Antigen (hier: Desmoglein 3, immobilisiert auf kommerziellen ELISA-Platten von EUROIMMUN/MBL) sowie jeweils nachfolgender Amplifizierung (nach Infektion von *E.coli* mit vom Antigen eluierten, polyklonalen Phagen), spezifisch bindende, polyklonale Phagenpools isoliert werden (s. **Panel 1**: H, I). Diese resultierenden polyklonalen, antigenspezifischen Phagenpools sind dann der Ausgangspunkt für die Auswahl monoklonaler, phageninfizierter Kolonien von *E.coli* sowie für die Isolation monoklonaler Vektoren (zur Sanger-Sequenzierung des scFv-kodierenden Inserts, s. **Panel 2**: A) und Phagenpräparationen (zur Testung im monoklonalen anti-M13-Phagen-ELISA; s. **Panel 2**: B). Ist ein monoklonaler Klon genetisch identifiziert, so kann, nach Überführung des entsprechenden Vektors in den non-suppressor TOP10F'-*E.coli*-Stamm, das jeweilige scFv-Protein in löslicher Form rekombinant hergestellt und aufgereinigt werden. Diese Proteine können dann weiter validiert werden, z. B. mittels indirekter Immunfluoreszenz auf Affenösophagus oder normaler humaner Haut (s. **Panel 2**: C) und mittels anti-HA-ELISA auf Desmoglein-Substrat kommerzieller ELISA-Systeme (s. **Panel 2**: D).

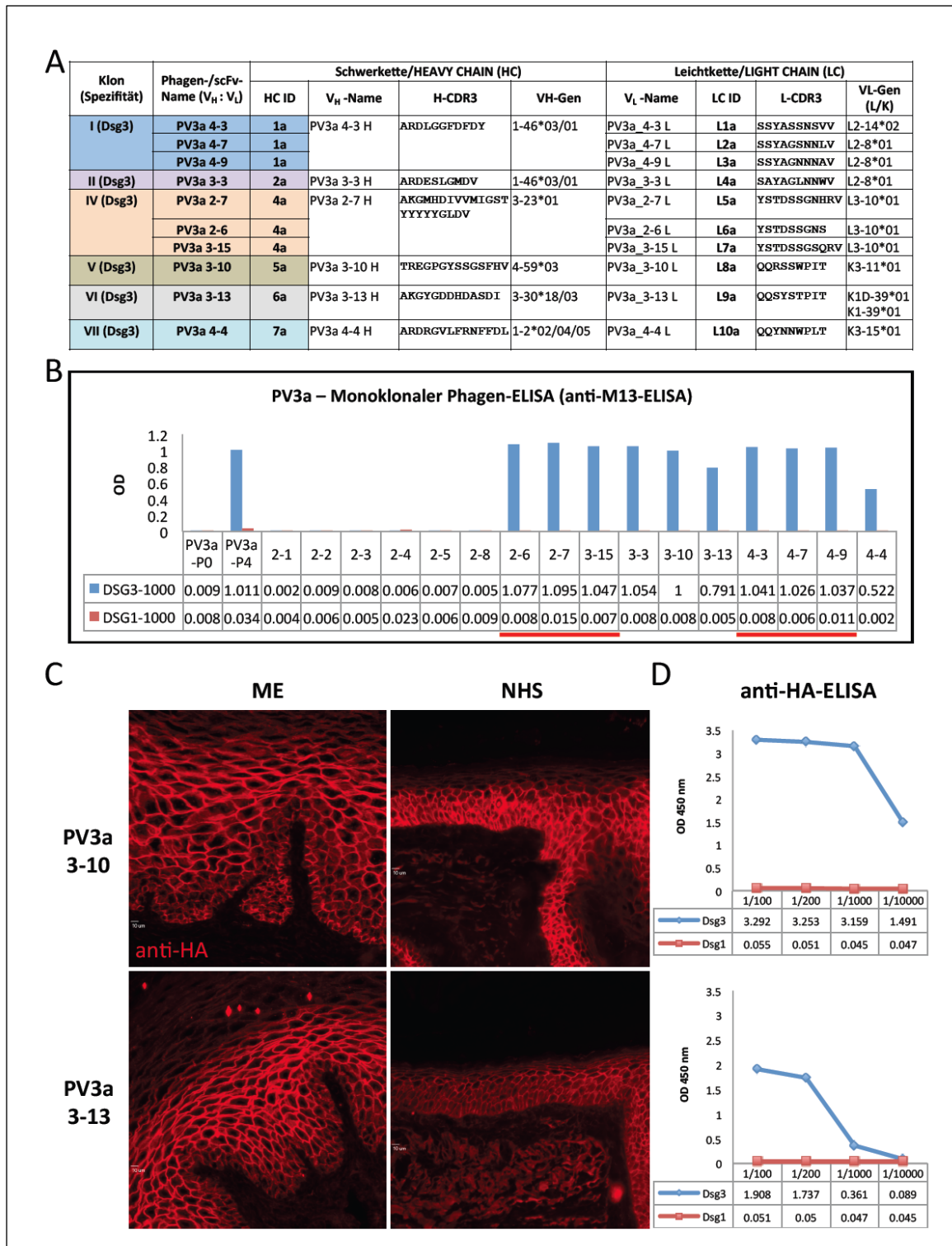
Dieser Expressionsvektor der pComb-Reihe (Barbas-Lab, Scripps-Institute, La Jolla, CA, U.S.A.) besitzt C-terminal im Backbone ein 6His-Tag (zur Aufreinigung des rekombinant in TOP10F'-*E.coli* exprimierten scFv-Proteins) und ein HA-Tag (zur schnellen und einfachen Detektion des scFv-Proteins in ELISA-, FACS-, Western Blot-, oder Immunfluoreszenzstudien). Das Insert wird, aufgrund der Verwendung des Sfi-I-Restriktionsenzym, direktional (mittels T4-Ligasen) einkloniert. Ein Amber Stop-Kodon (TAG) 3' des 6His-Tags und des HA-Tags erlaubt die Expression des in den Vektor einklonierten scFv-kodierenden Inserts als lösliches scFv-Protein (in das Amber Stop-Kodon nicht supprimierenden *E.coli*-Stämmen, wie z. B. TOP10F'). Wird das Amber Stop-Kodon supprimiert (wie z. B. in den für die Phagenproduktion genutzten *E.coli*-Stämmen XL1-Blue oder ER2738), so wird das weiter downstream (3') gelegene Gen III ebenfalls translatiert, welches, als resultierendes pIII-Coatprotein des Bakteriophagen, den scFv-Antikörper fusioniert auf der Außenseite trägt.



Panel 1: Phagen-Display mit RNA aus isolierten, peripheren Leukozyten eines Pemphigus vulgaris-Patientens (PV3a).

(A) Gelelektrophorese der V_H -Amplikons des pan-IgG-(IgG1234)-Repertoires (sechs Primerkombinationen, eine Negativkontrolle, Standard; Amplikon-Größe ca. 450 bp). (B) Gelelektrophorese der Leichtketten-Amplikons für V_λ und V_κ ; 18 Kombinationen für V_λ , 16 für V_κ ; jeweils eine Negativkontrolle. Größe der Amplikons ca. 380 bp (C) Gelelektrophorese der $V_H:V_{\lambda/\kappa}$ -Overlap-PCR-Amplikons; erwartetes Produkt bei ca. 800 bp (vor Gelaufreinigung). (D) Overlap-Amplikons nach Gelaufreinigung; gezeigt ist exemplarisch die Gelquantifizierung anhand bekannter Mengen von Standard-DNA in jeder der flankierenden vier Banden links und rechts. Durch Vergleich der Standardbanden (bei verschiedenen Konzentrationen) mit den Gelaufreinigungsprodukten (ebenfalls bei verschiedenen Konzentrationen) ist eine sehr zuverlässige Mengen-/Konzentrationsbestimmung aufgereinigter DNA-Amplifikate möglich, welche kritisch für alle weiteren Klonierungsschritte ist. (F) Zeigt den hier verwendeten Vektor pComb3XSS des Scripps-Instituts. Nach Sfi-I-Verdau ist das Stufferfragment (SS) leicht von dem linearisierten Vektor pComb3X zu unterscheiden, wie in (E) links gezeigt. Auch hier erfolgt eine Quantifizierung ((E) rechts). Verschiedene Ratios von Vektor:Insert während des Ligationsschritts resultieren in unterschiedlich hohen Transformationseffizienzen in konstanten Zahlen von XL-1 Blue-*E.coli*; meistens erbringt eine molare Ratio von 1:3 (Vektor:Insert) das beste Ergebnis. In (H) sind die Titrationsergebnisse des Pannings auf dem immobilisierten Antigen Desmoglein 3 (MBL) gezeigt; mit dem dritten Panning-/Selektionsschritt zeigte sich hier eine Anreicherung antigenspezifischer Phagen. Im polyklonalen Phagen-ELISA (I) ist die Anreicherung bereits im zweiten Panningschritt zu erkennen, jedoch zeigt die Erfahrung, dass monoklonale Binder hier innerhalb des polyklonalen Phagenpools noch die Minderheit darstellen (vgl. (H) und (I)).

In den hier durchgeführten Experimenten stellte sich für den Ligationsschritt des scFv-kodierenden Inserts in den Expressionsvektor die molare Ratio von Vektor zu Insert von 1:2 bis 1:3 als am günstigsten dar, mit vergleichbaren Transformationseffizienzen zwischen 1:2 und 1:3. Die Unterschiede zwischen der Kappa- und der Lambda-Bibliothek ($8,78 \times 10^8/\mu\text{g}$ vs. $3,67 \times 10^8/\mu\text{g}$ DNA) können a. e. auf unterschiedliche Toxizitäten der Phagenexpression in *E.coli* oder auf Variation in der Gelquantifikation der eingesetzten DNA-Pools zurückgeführt werden (**Panel 1**: D, E, G). Mit dem dritten Panning auf Desmoglein 3-Substrat ist mittels Koloniezählung auf LB/Carbenicillin-Titrationsplatten eine 74,8-fache Anreicherung zu verzeichnen, was ein guter, indirekter Hinweis auf eine erfolgreiche Selektion antigenspezifischer Phagenklone ist, wie dann auch durch den polyklonalen Phagen-ELISA direkt veranschaulicht (**Panel 1**: H, I). Nach Sanger-Sequenzierung von insges. ca. 64 monoklonalen Kolonien des zweiten und dritten Pannings erfolgte eine Auswertung der erhaltenen, scFv-kodierenden DNA-Sequenzen dergestalt, dass Sequenzduplikate entfernt und Klone händisch nach Aminosäure-Sequenz des H-CDR3-Bereichs der variablen Schwereketten gruppiert wurden (bis ca. 1-3 Aminosäuren bzw. max. 20% Unterschied zwischen zwei H-CDR3-Aminosäure-Sequenzen wurden diese als gleicher Klon zusammengefasst). Hieraus ergaben sich sechs verschiedene, Dsg3-spezifische Klone für die Phagenbibliothek PV3a, mit 10 verschiedenen, monoklonalen anti-Dsg3-Antikörpern (**Panel 2**: A). Wie für Antikörper anderer Spezifität bekannt (122, 123) kann auch hier beobachtet werden, dass identische variable Schwereketten, z. B. V_H 1a aus **Panel 1**, Teil A, mit drei verschiedenen variablen Leichtketten V_L funktionelle Antikörper bilden kann (PV3a 4-3, 4-7, 4-9). Dies deutet auf die Dominanz der in der Schwereketten enthaltenen H-CDR-Bereiche 1/2/3 für die Antigenbindung hin, gegenüber den in der Leichtkette enthaltenen L-CDR-Bereichen 1-3 (76, 77). Immunfluoreszenzoptisch zeigt sich auf Affenösophagusschnitten und Kryoschnitten normaler, humaner Haut das pemphigustypische, fischnetzartige Muster, dass durch Anfärbung membranständiger Desmoglein 3-Ektodomänen auf Keratinozyten entsteht. Ein HA-Tag-spezifischer scFv-ELISA auf Dsg3-/Dsg1-Substrat wird realisiert durch Detektion mittels eines anti-HA-HRP-Antikörpers und zeigt die Spezifität der hier exemplarisch gezeigten zwei Antikörper für Dsg3 (**Panel 2**: C, D).



Panel 2: Erzeugung und Validierung monoklonaler anti-Desmoglein 3-Autoantikörper. In (A) gezeigt sind genetische Informationen zu monoklonalen Antikörpern, die nach Sequenzierung und Analyse von ca. 64 monoklonalen *E.coli*-Kolonien erhalten werden konnten. Es zeigt sich, dass sich die variable Schwerkette V_H in einigen funktionellen Antikörpern mit mehreren, verschiedenen, variablen Leichtketten V_L kombinieren kann (z. B. in Klon I oder IV), was auf einen wesentlichen Einfluss des V_H auf die Antigenbindung nahelegt (der umgekehrte Fall ist denkbar, jedoch nur in sehr wenigen Beispielen beobachtet worden). Klon III (H-CDR3-aa-Sequenz ARINYYDGSGHHSDADYM) ist hier nicht gezeigt, da dieser zuvor zu einem anderen Zeitpunkt in dem selben Patienten (PV3) mittels Antibody Phage Displays, APD, identifiziert wurde, nicht jedoch mittels APD zum Zeitpunkt PV3a (s. Material und Methoden). Mittels LC-MS/MS konnte dieser genetisch zu einem früheren Zeitpunkt (PV3) bereits nachgewiesene Klon dann in PV3a-Serum nachgewiesen werden (s. Panel 8). (B) Nach Bestätigung der erfolgreichen Selektion durch den polyklonalen anti-M13-Phagen-ELISA (s. Panel 1), erfolgt nun die Produktion monoklonaler Phagen zur weiteren Validierung mittels monoklonaler anti-M13-Phagen-ELISAs. Alle isolierten Phagen weisen allein Desmoglein (Dsg) 3-, nicht jedoch Dsg1-Reaktivität auf. Rote Linien weisen auf genetisch zusammengehörige monoklonale Antikörper hin, welche eine gemeinsame H-CDR3-aa-Sequenz aufweisen. (C) Validierung zweier, bisher unveröffentlichter PV3a-Antikörper gegen Dsg3 auf Affenösophagus (ME), normaler menschlicher Haut (NHS) und mittels anti-HA-ELISAs auf Dsg3/1. Beide Antikörper binden spezifisch das Zielantigen Dsg3.

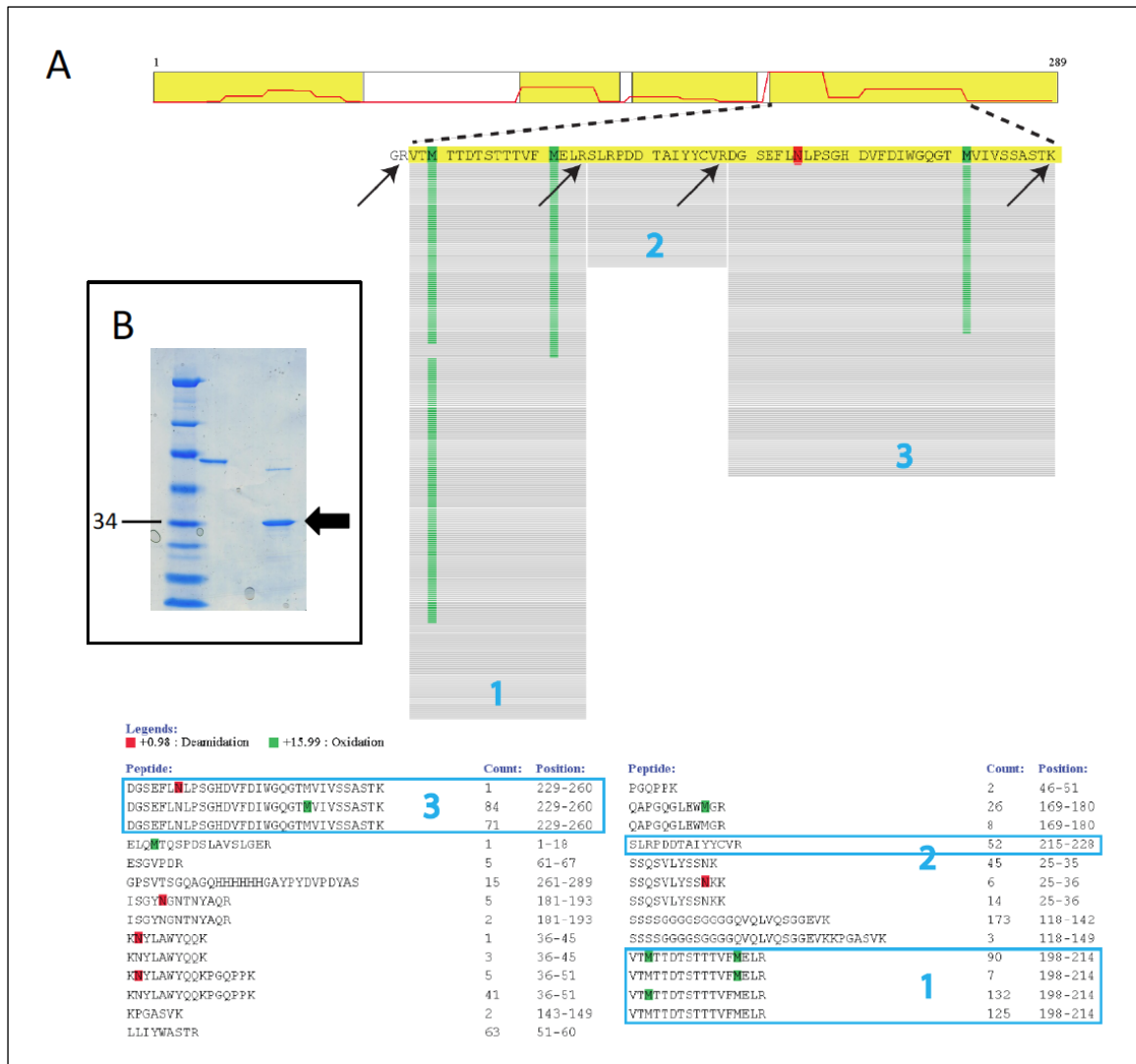
Die hier gewonnenen Daten legen eine oligoklonale Autoimmunantwort (d. h., ≤ 10 B-Zellklone/Patient) in Patienten mit Pemphigus vulgaris (PV) nahe; dies ist konkordant zu zuvor publizierten, genetischen Daten zum Dsg-spezifischen B-Zellrepertoire in weiteren PV-Patienten und Patienten mit Pemphigus foliaceus (PF) (16, 54-56, 124).

Zur Bestätigung dieses Befundes kann, wie in dieser Arbeit nachfolgend dargelegt, eine massenspektrometrische Untersuchung des Repertoires Desmoglein-spezifischer, zirkulierender Serumantikörper durchgeführt werden.

Erfolgreiche, massenspektrometrische Detektierung H-CDR3-Region-enthaltender Peptide als Surrogat zirkulierender, Phagen-Display-identifizierter anti-Desmoglein 3-Autoantikörper

Zur Bestätigung des hier beschriebenen, durch genetische Experimente erhaltenen Befundes eines oligoklonalen Sets autoreaktiver B-Zellen im Pemphiguspatienten kann eine massenspektrometrische Untersuchung des Repertoires Desmoglein-spezifischer, zirkulierender Serumautoantikörper durchgeführt werden. Hierzu muss zunächst sichergestellt sein, dass überhaupt spezifische Serumantikörper (bzw. solche Peptide spezifisch für eben jene Serumantikörper) mittels Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) detektiert werden können.

Ein Antikörper (bzw. eine B-Zelle mit seinem B-Zellrezeptor, engl. BCR) wird über die H-CDR3-Sequenz eindeutig charakterisiert. Der Promovend verwendete für ein erstes massenspektrometrisches Experiment einen in *E.coli* rekombinant hergestellten und gut charakterisierten monoklonalen scFv-Antikörper gegen Desmoglein 3 (PV1a 3-15) und konnte, nach SDS-PAGE, Trypsinisierung, LC-MS/MS und Datenanalyse ein tryptisches Peptid, welches einen Großteil der H-CDR3-Region dieses Antikörpers abdeckt, identifizieren (**Panel 3**). Dieses experimentelle Beispiel zeigt exemplarisch, dass es möglich ist, monoklonale Antikörper massenspektrometrisch über H-CDR3-spezifische, tryptische Peptide zu identifizieren, vorausgesetzt die kodierende Sequenz ist bekannt. Limitiert wird diese Detektion prinzipiell allein durch das Vorhandensein zu vieler bzw. zu dicht gereihter Lysine und Arginine im Bereich von H-CDR3-Sequenz und



Panel 3: Erfolgreiche massenspektrometrische Identifizierung von H-CDR3-enthaltenden Peptiden nach Trypsinverdau eines mittels Phagen-Displays rekombinant hergestellten, monoklonalen, humanen Antikörpers. (A) Oben ist der gesamte Sequenzbereich des Antikörpers PV1a 3-15 stilisiert dargestellt (in der Reihenfolge V_L-Linker-V_H); Peptide der gelben Bereiche wurden mittels LC-MS/MS identifiziert (Lage der roten Linie korreliert mit der Anzahl der identifizierten Peptide). Es gibt Bereiche, welche mittels LC-MS/MS nicht abgedeckt sind (weiß), was z. B. durch die Anwesenheit zu vieler Aminosäuren, nach welchen Trypsin C-terminal schneidet, bedingt sein kann (K, Lysin; R, Arginin; Schnittstellen mit Pfeilen markiert). Das tryptische Peptid Nr. 3 beinhaltet einen großen Abschnitt der diesen Antikörper identifizierenden H-CDR3-Region (VRDGSEFLNLPSPGHDFDI). Modifikationen des Proteins sind in rot (Deamidierung) und grün (Oxidation) dargestellt. (B) SDS-PAGE des hier benutzten monoklonalen Antikörpers (im scFv-Format; molekulare Masse ca. 27 kDa; apparente Masse höher, s. Pfeil/ganz rechte Bande).

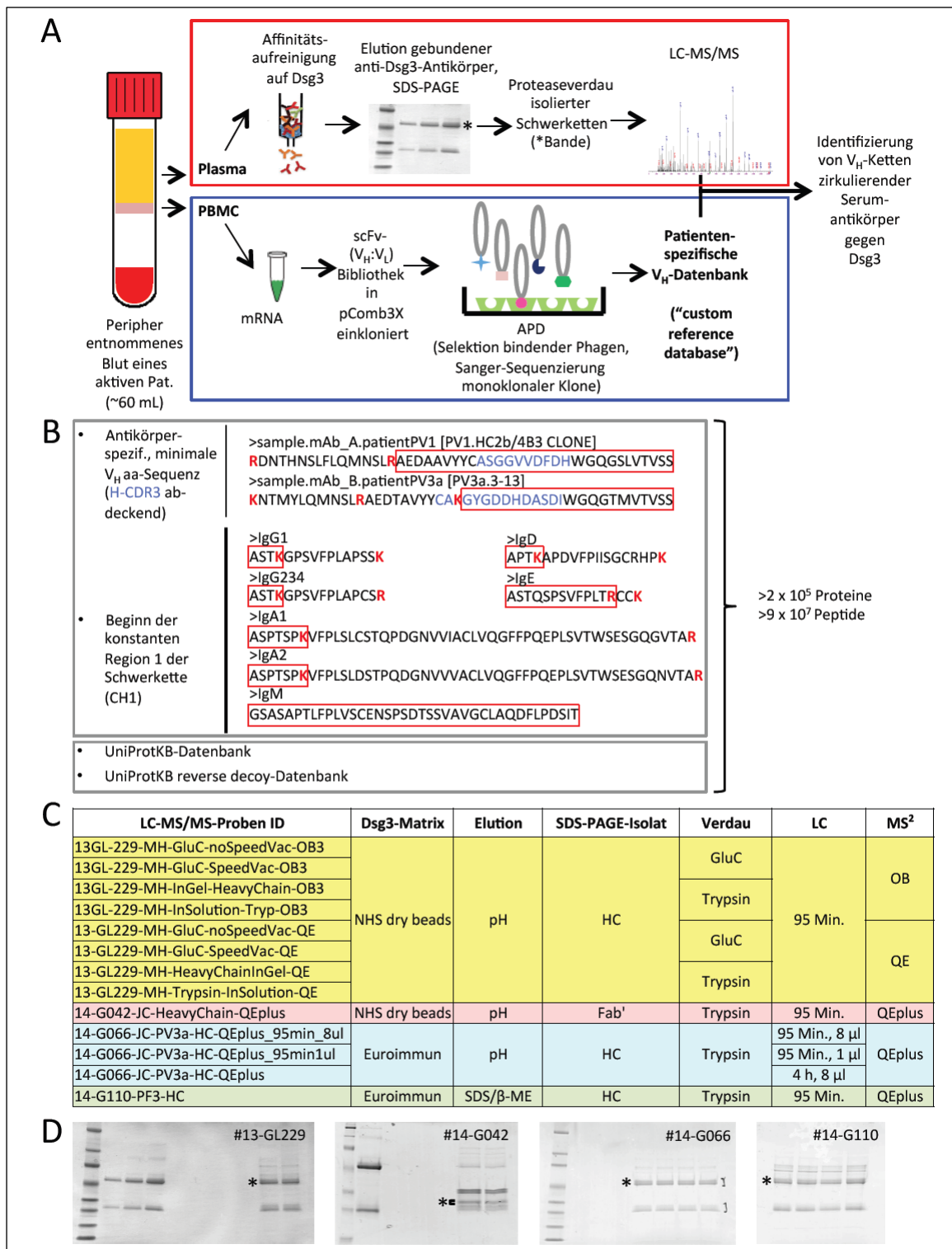
nachfolgender Framework 4- und Constant Heavy Chain Region (CH) 1-Sequenz, was, bei Verwendung von Trypsin, in zu kleinen, massenspektrometrisch nicht mehr detektierbaren und/oder redundanten Peptidfragmenten resultieren würde (vgl. hierzu H-CDR3-Sequenz von Klon VII, **Panel 2**, Teil A: ARDRGVLFRNFFDL). In diesem Falle wäre die parallele Verwendung anderer

Enzyme zur Erzeugung von besser LC-MS/MS-geeigneten Peptiden denkbar, z. B. von GluC, LysC, ArgC, AspN, Chymotrypsin oder Pepsin.^{§§§}

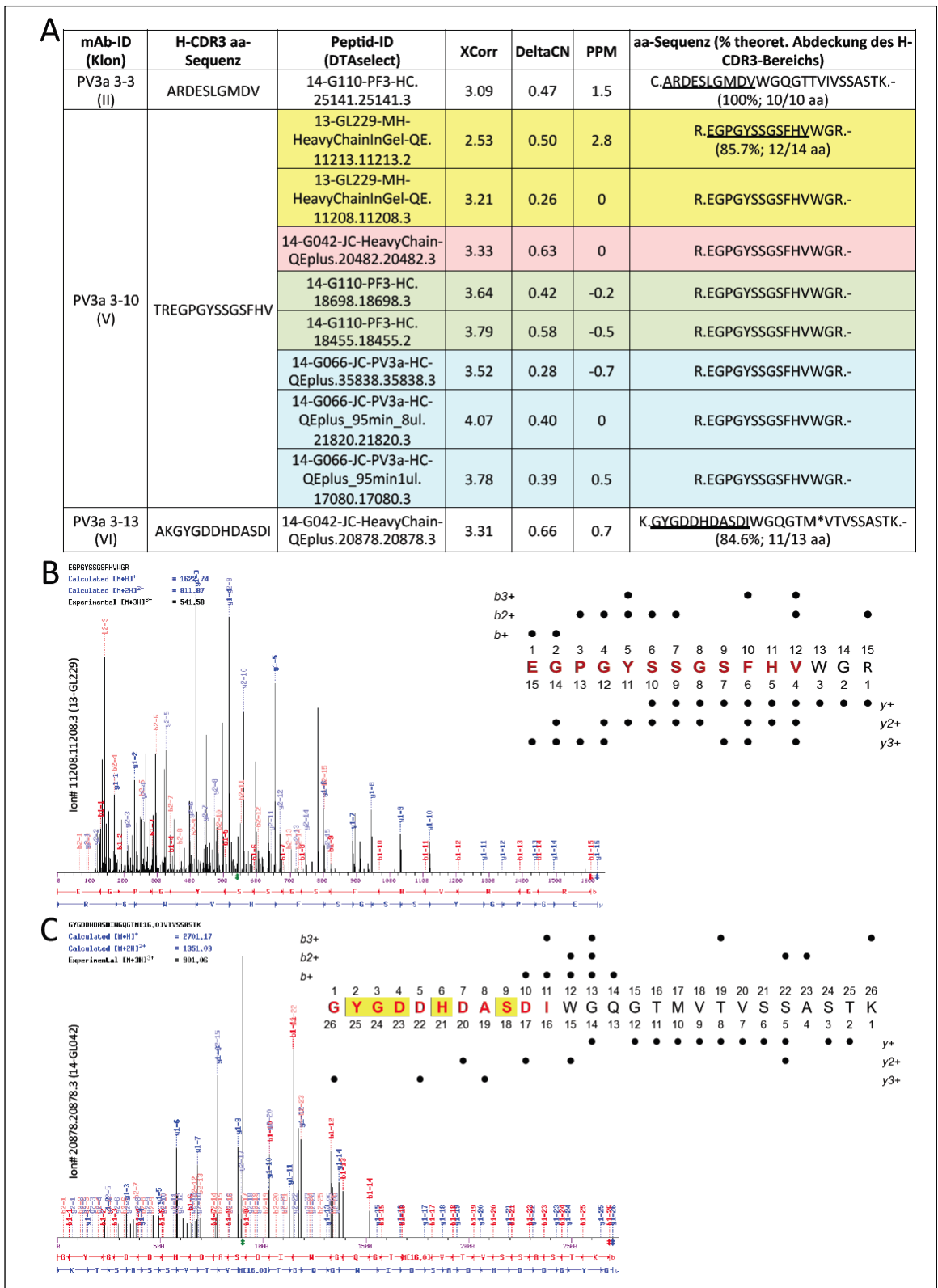
Nach erfolgreicher Detektion eines H-CDR3-spezifischen Peptids für einen einzelnen monoklonalen Antikörper versuchte der Promovend im nächsten Schritt, die mittels Phagen-Displays erhaltenen Dsg3-spezifischen Antikörper des Patienten PV3a im Serum desselben Patienten zu identifizieren: Hierzu verwendete er, in mehrfach unter verschiedenen Versuchsbedingungen durchgeführten Experimenten, SDS-PAGE-separierte, denaturierte Schwereketten affinitätsaufgereinigter anti-Dsg3-Antikörper aus PV3a-Serum für die Massenspektrometrie (**Panel 4**: A, C, D). Zur nachfolgenden Datenanalyse mittels DTASelect v2.0 und SEQUEST (Parameter in Material und Methoden gegeben) kamen hier allein die APD-Antikörper-V_H-Sequenzen der PV3-/PV3a-Klone (sieben Klone, mit acht verschiedenen V_H-Sequenzen; vgl. **Panel 2** und Referenz (16)) in Kombination mit den in **Panel 4** unter B gezeigten sieben Fragmenten des Beginns der konstanten Schwerekette zum Einsatz (insges. 56 Kombinationen), ergänzt zu insges. ca. 2×10^5 Proteinen durch die Proteine der UniProtKB-Datenbank des humanen Proteoms und der dazugehörigen Reverse-Decoy-Datenbank (**Panel 4**: B).

In **Panel 5** sind die wesentlichen Ergebnisse dieser APD-Sequenz-spezifischen LC-MS/MS-Datenanalyse illustriert: Für drei der insges. sieben PV3-/PV3a-APD-Klone können, durch Abgleich der experimentellen LC-MS/MS-Spektren mit den *in-silico*-Spektren, in Serumantikörperpräparationen klonspezifische Peptide nachgewiesen werden, jedoch in unterschiedlicher Qualität: Obwohl alle gezeigten Peptide die vorher festgelegten SEQUEST-Parameter erfüllen, zeigt sich bei händischer Analyse der Fragmentationen jedes der in der letzten Spalte von **Panel 5** (A) gezeigten, experimentellen Peptide, dass beispielsweise Klon V mit viel höherer Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden kann als Klon VI. Dies ist in **Panel 5** (B) und (C) illustriert: Das entsprechende H-CDR3-Peptid EGPYSSGSFHVWGR für Klon V ist vollständig durch b-/y-Fragmentationen abgedeckt, während das Peptid für Klon VI keine vollständige Fragmentationen-

^{§§§} Es empfiehlt sich, nach Möglichkeit, ein *in-silico*-Verdau von H-CDR3-enthaltenden Sequenzen, um den Erfolg einer Detektion bestimmter (Serum-)Antikörper mittels Massenspektrometrie abschätzen zu können. Hierzu gibt es verschiedene Tools online, z. B. unter http://web.expasy.org/peptide_cutter/ (zuletzt abgerufen am 04.01.2018, 15:30 Uhr).



Panel 4: LC-MS/MS-Identifizierung von H-CDR3-spezifischen Peptiden zuvor genetisch identifizierter, monoklonaler Antikörper der Phagen-Bibliothek PV3a in affinitätsaufgereinigten anti-Desmoglein 3-Serumantikörpern desselben Patienten. (A) Experimentelle Routine; proteomischer Schenkel in rot, genetischer Schenkel in blau. Die hier verwendete Antikörper- V_H -Datenbank enthält nur Sequenzen Phagen-Display-identifizierter, monoklonaler, antigenspezifischer Antikörper. (B) Schema zur Erstellung der für die proteomische Analysen benötigten Datenbank: Ausgehend von genetisch bekannten Antikörpern werden *in silico* tryptische Peptide, welche die H-CDR3-Region (blau) enthalten, gebildet. Diese minimalen, antikörperspezifischen Peptide, welche neben (Anteilen) der H-CDR3-Region weiter downstream auch die Framework-Region 4 (FRW4; bis VSS) enthalten, werden mit Peptiden des Beginns der konstanten Region 1 (CH1) von Antikörpern aller Isotypen kombiniert. Enthalten die H-CDR3- oder die FRW4-Region eines Antikörpers, oder aber der Beginn der CH1-Region zuviele oder gar keine Aminosäuren nach denen Trypsin C-terminal schneiden kann, so ist die Bildung dieser Datenbank erschwert/unmöglich, und dieser ggf. genetisch identifizierte Antikörper kann mit proteomischen Methoden (unter Verwendung von Trypsin) nicht identifiziert werden. Diese antikörperspezifische Sequenzdatenbank wird ergänzt durch das gesamte humane Proteom (z. B. UniProtKB) und eine Reverse Decoy-Datenbank. (C) Übersicht über die Versuchsbedingungen der hier durchgeführten massenspektrometrischen Experimente: Eine Farbe fasst ein Experiment zusammen. „NHS dry beads“ zeigt die Verwendung selbsthergestellter Dsg3-Matrix an, während „Euroimmun“ eine von Euroimmun bezogene Dsg3-Matrix angibt (s. Material u. Methoden). Die Elution erfolgte entweder unter niedrigem pH-Wert ($\sim 2,3$) oder mittels Erhitzen der gewaschenen Beads in SDS/2-Mercaptoethanol. (D) SDS-PAGE-Gele der in (C) gezeigten Experimente; mit * ist der massenspektrometrisch untersuchte Bereich der Antikörperschwerketten oder des Fab'-Fragments (Experiment #14-G042) angezeigt, welcher vor Trypsinisierung aus dem Gel herausexzidiert wurde. Abkürzungen: Fab': Fragment antigen binding; GluC: Endoproteinase GluC; HC: Antikörperschwerkette; LC: Liquid Chromatography-Bedingungen; OB: Orbitrap; QE: Q Exactive.



Panel 5: Fortsetzung zu Panel 4. (A) In den in Panel 4 gezeigten Experimenten konnten Peptide charakteristisch für drei der genetisch identifizierten, monoklonalen Antikörperklone der Phagen-Bibliothek PV3a gefunden werden, nämlich für Klone II, V, VI. Die Parameter XCorr, DeltaCN, und PPM geben Auskunft über die Qualität der peptidspezifischen Spektren, die Ladung z des jeweiligen Peptids ist der Peptid-ID-Spalte zu entnehmen (letzte Ziffer der die Peptide eindeutig identifizierenden Peptid-ID). In der letzten Spalte sind die massenspektrometrisch identifizierten Peptide gezeigt und der antikörperidentifizierende H-CDR3-Anteil des jeweiligen Peptids mittels Unterstreichung visualisiert. (B, C) Es sind exemplarisch die detektierten b-/y-Ionenfragmente für zwei antikörperspezifische Peptide (Klon V und Klon VI) gegeben. Oben (B): Dieses Peptid deckt den H-CDR3-Bereich des Klons V zu 85.7% ab (rot). Für dieses Peptid ist eine gute Abdeckung durch b-/y-Ionen einfacher bis dreifacher Ladung festzustellen (schwarze Punkte über und unterhalb der Peptid-aa-Sequenz). Unten (C): Für dieses Peptid, welches theoretisch 84.6% des H-CDR3-Bereichs des Klons VI abdeckt, ist keine gute Abdeckung durch b-/y-Ionen festzustellen (gelb: H-CDR3-Bereiche ohne Abdeckung durch b-/y-Ion). Dieser Klon kann daher nicht mit der selben Sicherheit als zirkulierender, Dsg3-spezifischer Serumklon geführt werden wie Klon V aus (B).

abdeckung in weiten Bereichen des H-CDR3-Peptids zeigt (gelb markiert; **Panel 5**, Teil C). Für Klon II ergibt sich ein ähnlicher Befund wie für Klon VI (nicht gezeigt). Zusammengefasst kann daher, mit den bis hierhin gezeigten Daten nur für Klon V (mit dem monoklonalen Antikörper PV3a 3-10) sicher von einem Vorhandensein im Serum dieses Patienten ausgegangen werden, während die Anwesenheit von Antikörpern der Klone II und VI im Serum unsicher, jedoch nicht ausgeschlossen ist.****

Limitierender Faktor dieser hier vorliegenden massenspektrometrischen Untersuchungen zum Vorhandensein monoklonaler Antikörper bestimmter Spezifität im Serum war das sehr begrenzte, jedoch antigenspezifische V_H-Repertoire, welches hier allein von Phagen-Bibliotheken dieses Patienten stammten. Da eine monoklonale Serumantwort aufgrund massenspektrometrischer Vordaten zu immunisierten Individuen und Tieren sehr unwahrscheinlich erscheint (103, 113), wurde im nächsten Schritt der vorliegenden Arbeit versucht, zunächst das cDNA-V_H-Repertoire dieses Patienten mittels NGS vollständig genetisch zu charakterisieren (zum Erhalt von Sequenzen welche für Antikörper sämtlicher Spezifitäten kodieren, nicht allein für anti-Dsg3-Antikörper), um dann mit dieser deutlich erweiterten Datenbank potenziell mehr Serumantikörper, die mittels Phagen-Displays aus verschiedensten Gründen nicht erhalten werden konnten, identifizieren zu können. Hierbei richtete sich der Promovend nach publizierten Arbeiten und wandte diese erstmalig auf eine dermatologische Autoimmunerkrankung an; diese Experimente beinhalteten, neben des Einsatzes von NGS zur V_H-Repertoiresequenzierung, auch den Nachweis ungebundener, d. h., antigenunspezifischer Antikörper (als interne Qualitätskontrolle) sowie deutlich striktere Kriterien der Spektrenanalyse (s. Material und Methoden, sowie **Appendices X und XI**).

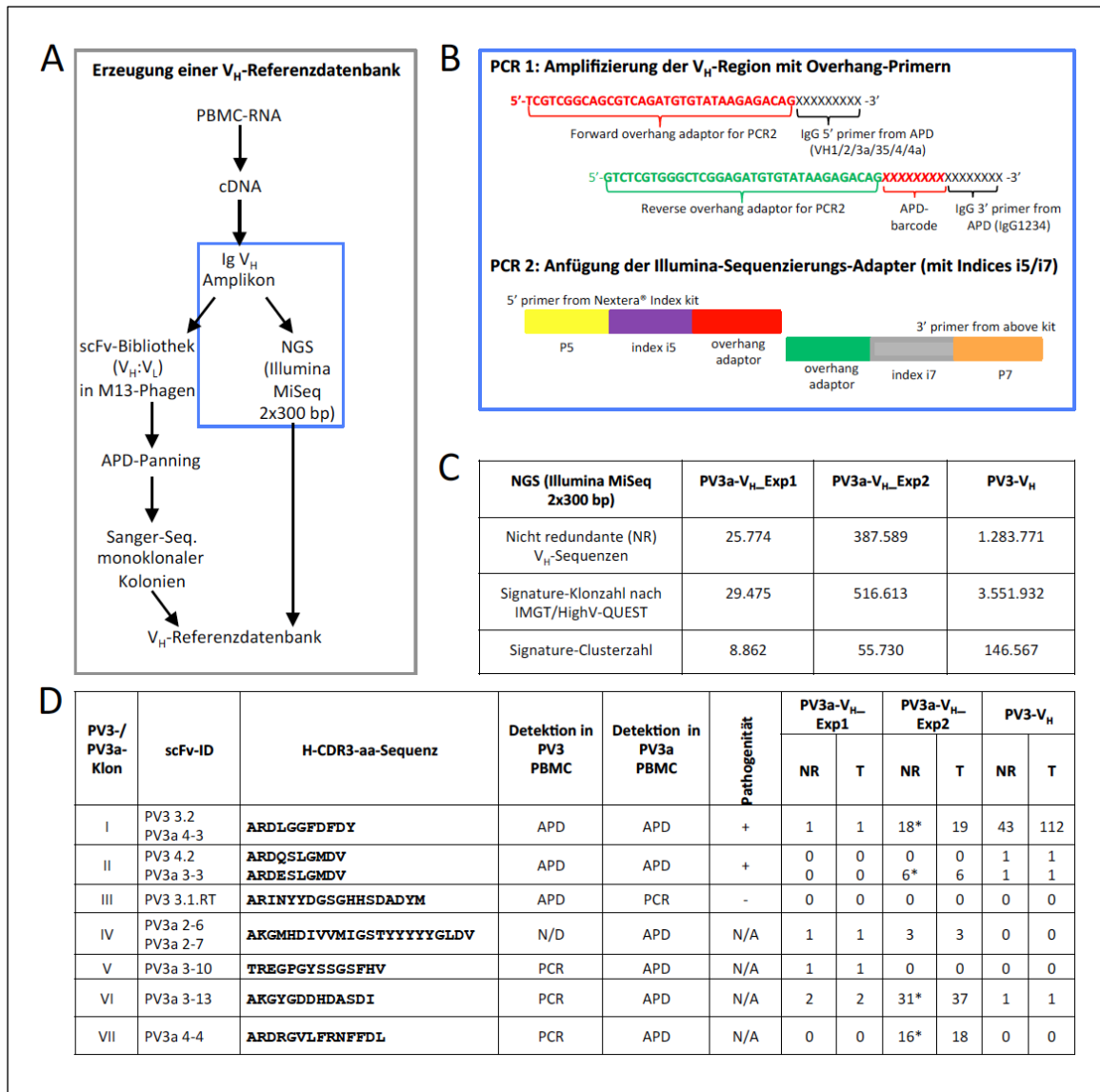
**** Es besteht die Möglichkeit, dass diese genetisch mittels Phagen-Displays identifizierten Klone nicht als zirkulierende Serumantikörper vorliegen, sondern allein als B-Zellrezeptor (Phagen-Display erfasst, in der hier vorgestellten Form, sowohl Antikörpertransskripte als auch B-Zellrezeptor-Transskripte; s. Material und Methoden, und Einleitung).

NGS-gestützte, massenspektrometrische Detektierung von H-CDR3-Region-enthaltenden Peptiden zirkulierender anti-Desmoglein 3-Antikörper

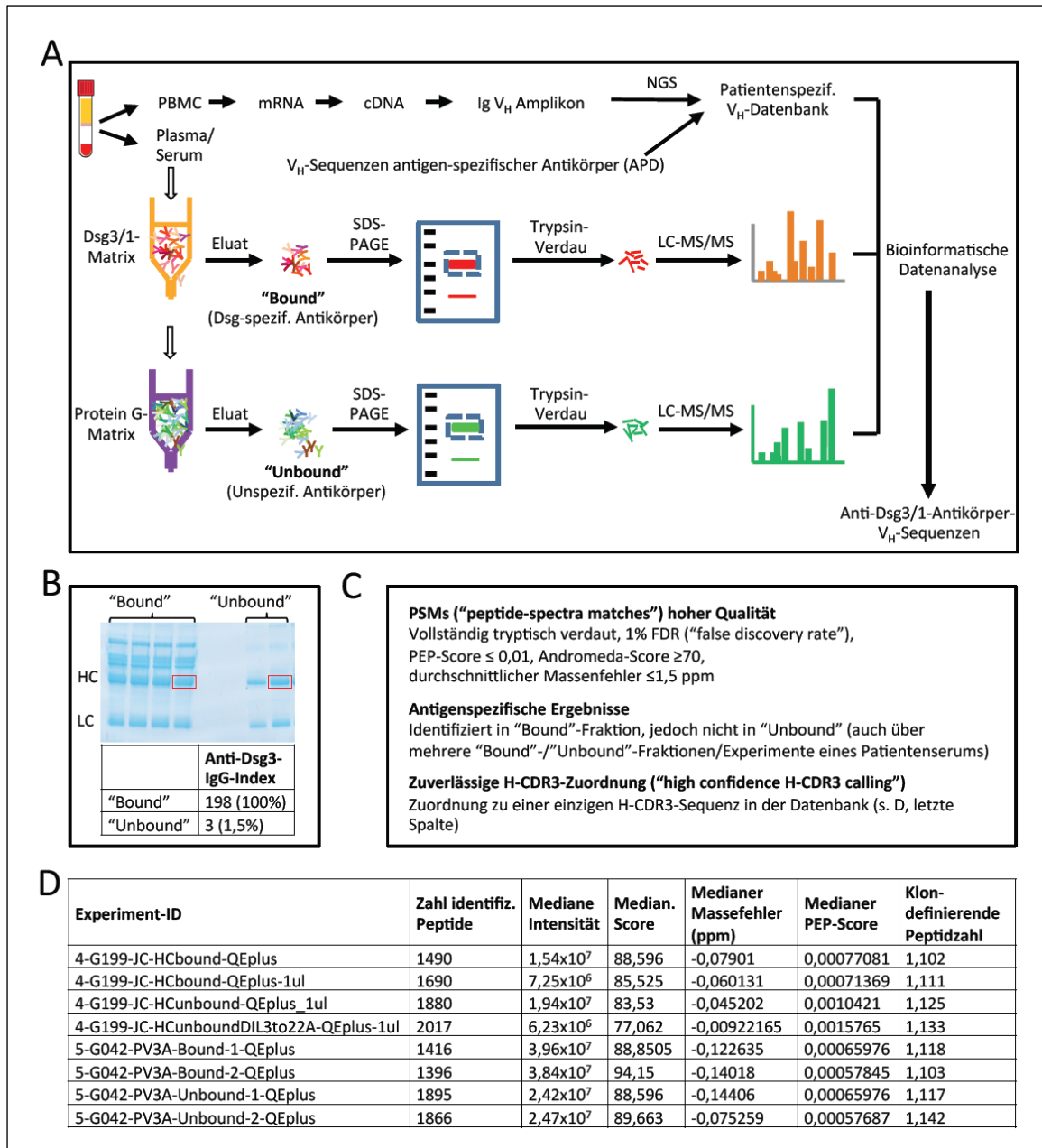
Die NGS-gestützte, massenspektrometrische Detektierung von H-CDR3-Region-enthaltenden Peptiden erbringt potenziell eine deutlich umfassendere Detektion monoklonaler Serumantikörper, wie in mehreren publizierten Beispielen gezeigt (103, 112, 113). Der Promovend verwendete zur Konstruktion einer diversen V_H -Sequenzdatenbank die Illumina® MiSeq-Plattform (Format 2x300 bp). Hierzu wurde, von PBMC-RNA/-cDNA der Zeitpunkte PV3 und PV3a ausgehend, mittels PCR zunächst ein V_H -Amplikon mit Illumina®-spezifischen Overhang-Sequenzen 5' und 3' hergestellt (**Panel 6: A, B**). Nach PCR-Aufreinigung des Produktes erfolgte, in einer zweiten PCR (mit nur wenigen PCR-Zyklen, zur Vermeidung PCR-induzierter Biases/Verzerrungen), die Anfügung der Illumina-Sequenzierungsadapter, welche neben der Indices i5 und i7 auch die Flow-Cell-Bindungsstellen P5 und P7 enthalten (**Panel 6: B**). Im einem repräsentativen NGS-Lauf erhielt der Promovend so, für PV3a, ca. 390.000 nicht redundante V_H -Sequenzen, welche sich zu etwa 56.000 B-Zellklonen clustern ließen (**Panel 6: C**). Bei Abgleich mit den durch APD erhaltenen Sequenzen der Zeitpunkte PV3 und PV3a (+5,5 Jahre) desselben Patienten ließen sich mindestens 5 von 7 Klonen wiederauffinden, mit unterschiedlichen Readzahlen. Zwei Klone (III, V) ließen sich nicht, oder nur in sehr geringer Zahl, mittels NGS identifizieren, trotz sehr hoher Readzahlen bei NGS-Sequenzierung des Zeitpunktes PV3 (**Panel 6: D**).^{†††}

Publizierten Beispielen folgend veränderte der Promovend die Aufreinigung antigenspezifischer Antikörper in diesen neuen LC-MS/MS-Experimenten dahingehend, dass nun nicht nur Dsg3-spezifische Antikörperschwerketten, nach Separierung durch SDS-PAGE, tryptisch verdaut und massenspektrometrisch untersucht wurden („Bound“), sondern auch jene Antikörperschwerketten nicht-

^{†††} Interessanterweise ist Klon V mit den zuvor gezeigten LC-MS/MS-Daten (s. **Panel 5**) sicher im Serum identifiziert worden, was i) auf Sampling-bezogene Effekte, ii) auf eine Entkopplung von RNA- und Proteinebene (z. B. hohe Proteinmengen bei sehr geringer Transkriptzahl), oder/und iii) auf eine äußerst geringe Zahl zirkulierender, Antikörper-produzierender B-Zellen hinweisen könnte (z. B. aufgrund gewebsständiger B-Zellen). Im Umkehrschluss kann dies auch als ein Indiz für die sehr hohe Sensitivität der genetischen Methode des Phagen-Displays interpretiert werden.



Panel 6: NGS-Datenbankerstellung und Sequenzierungsergebnisse. (A) Schematische Darstellung der V_H-Referenzdatenbankerstellung mittels NGS (rechts) und Phagen-Displays (APD; links). Der blau gerahmte Teil wird in (B) näher beschrieben. Die resultierende V_H-Datenbank beinhaltet im Falle von NGS sämtliche V_H-DNA-Sequenzen (also auch solche von Antikörpern/B-Zellrezeptoren anderer Spezifitäten, idealerweise des gesamten Antikörperrepertoires dieses Individuums), im Falle von APD allein antigenspezifische anti-Dsg3-Antikörper-V_H-DNA-Sequenzen. (B) Erzeugung des Illumina®-MiSeq-Amplikons mittels zweier, aufeinanderfolgender PCRs. In PCR1 wird dem V_H-Amplikon (von RNA/cDNA aus amplifiziert) ein „Forward overhang“-Adapter und ein „Reverse Overhang“-Adapter angefügt. In PCR2 werden die Indices i5 und i7 angefügt, welche die sichere Unterscheidung verschiedener V_H-Repertoires im gleichen MiSeq-Sequenzierlauf ermöglichen. (C) Zahlen zweier NGS-Läufe des V_H-Repertoires von Patient PV3, Zeitpunkt PV3a, und eines NGS-Laufes des gleichen Patienten zum Zeitpunkt PV3 (Erstdiagnose). Aufgrund zu geringer Outputzahlen im ersten Experiment (das PV3a-NGS-Amplikon stellte 1% der Gesamtmenge der zu sequenzierenden V_H-Repertoires verschiedener Patienten dar) wurde der NGS-Lauf für dieses Repertoire wiederholt (nun mit ca. 10% der Gesamtmenge geladener DNA). Nach Erzeugung nicht redundanter V_H-Sequenzen erfolgte eine IMGT/HighV-QUEST-Analyse; aufgrund der Zuordnung mehrerer VH-/JH-Gene zu einigen Sequenzen durch den IMGT-Algorithmus ist die Zahl der „Signature-Klone“ daher höher als die Zahl nicht redundanter V_H-Sequenzen. Die „Signature-Clusterzahl“ gibt die Zahl der B-Zell-Cluster an, nach den in **Appendix XI** gezeigten, bioinformatischen Parametern. Zeitpunkt PV3 wurde zu einem späteren Zeitpunkt und mit noch höherem Anteil an der Gesamtmenge geladener DNA sequenziert, mit noch höheren Readzahlen verglichen zu PV3a. (D) Sechs der sieben PV3-/PV3a-APD-B-Zellklone können in den beiden NGS-Läufen zu PV3a identifiziert werden. Klon III ist trotz gesteigerter NGS-Sequenzierentiefe des PV3-Amplikons nicht detektierbar, und dies trotz Nachweises mittels H-CDR1/2/3-spezifischer PCR in publizierten Vorarbeiten („Detektion in PV3a PBMC“, genauer beschrieben in Referenz (16)). N/D, not detected; nicht detektierbar. „Pathogenität“ gibt die Testung der monoklonalen Antikörper im humanen Vollhaut-Organkulturmodell an (N/A, not available; nicht durchgeführt). „NR“ gibt die Zahl nicht redundanter Hits zu diesem Klon/Antikörper an (ein Stern signalisiert das Vorhandensein identischer H-CDR3-Sequenzen bei unterschiedlichem VH-Gen), „T“ die gesamte Zahl an Hits (inklusive Wiederholungen in dem entspr. Cluster).



Panel 7: NGS-gestützte, massenspektrometrische Detektion antigenspezifischer Serumantikörper unter strikten Kriterien. (A) Neue Versuchsroutine (vgl. zu **Panel 4**, Teil A), welche, zur Steigerung der Spezifität und Validität, neben spezifischen Antikörpern („Bound“) auch unspezifische Antikörper (d.h., den depletierten Überstand/Durchfluss der Affinitätsaufreinigung der Dsg3-spezifischen Antikörper) aufweist, i. S. e. somit differentiellen Massenspektrometrie. Vom o. g. Durchfluss der Affinitätsaufreinigung auf Dsg3-Matrix wird mittels Protein G-Beads „unspezifisches“ (nicht-anti-Dsg3-) IgG isoliert („Unbound“). (B) Exemplarisches SDS-PAGE-Gel für die unter (A) schematisch dargestellte Versuchsroutine, an PV3a-Serum. (C) Strikte Kriterien zur Identifizierung klonspezifischer Peptidspektren als Surrogat der Anwesenheit dieses Klons im Serum. (D) Übersicht über alle mit PV3a-Serum durchgeführten, massenspektrometrischen Experimente. Von allen LC-MS/MS-Läufen wurden ungefähr gleiche Peptidzahlen für „Bound“ zu „Unbound“ erhalten. Die letzte Spalte gibt die Peptidzahl pro Klon an, die Spalten dazwischen zeigen Andromeda-/MaxQuant-spezifische Kennzahlen zur Qualität der erhaltenen Spektren (vgl. Material und Methoden).

Dsg3-spezifischer IgG-Antikörper (isoliert mittels Protein G aus dem Durchfluss der Dsg3-IgG-Aufreinigung; „Unbound“; **Panel 7**: A, B). Diese differentielle Massenspektrometrie („Bound“ vs. „Unbound“) erlaubt, nach bioinformatischer Aufbereitung, eine deutlich verbesserte, d. h., zuverlässigere Aussage dazu, ob bestimmte, genetisch (durch NGS bekannte) Antikörperklone tatsächlich als zirkulierende Serumantikörper vorliegen oder nicht. Die, vgl. zu den vorherigen Experimenten aus **Panel 4** und **Panel 5**, nun deutlich strikteren Kriterien der Datenauswertung mittels MaxQuant (mit Andromeda-Suchmaschine) und selbstentwickelter Skripte des Bioinformatikers sind in **Panel 7** unter C (sowie in Material und Methoden) zusammengefasst. Angaben zur hohen Qualität der unter diesen Bedingungen erhaltenen LC-MS/MS-Daten sind in **Panel 7** unter D gegeben.###

Die nach oben ausgeführten Details durchgeführte, NGS-gestützte LC-MS/MS-Analyse affinitätsaufgereinigter anti-Dsg3-Serumantikörper erbrachte, für Zeitpunkt PV3a, eine Zahl von nun 56 antigenspezifischen B-Zellklonen (**Panel 8**: A). Diese Zahl zeugt von einer deutlich diverseren Autoimmunantwort in Pemphigus vulgaris-Patienten als zuvor angenommen und mittels Phagen-Displays (und anderer genetischer Verfahren) nachgewiesen. Aufgrund der strikten Kriterien sowie technischer Limitationen ist es wahrscheinlich, dass die tatsächliche Zahl Autoantikörper produzierender Klone noch höher ist und die hier gegebene Zahl von 56 Klonen tatsächlich nur ein unteres Limit darstellt.#### Mit Sternsymbolen (*) sind in **Panel 8** unter A solche Klone angegeben, die

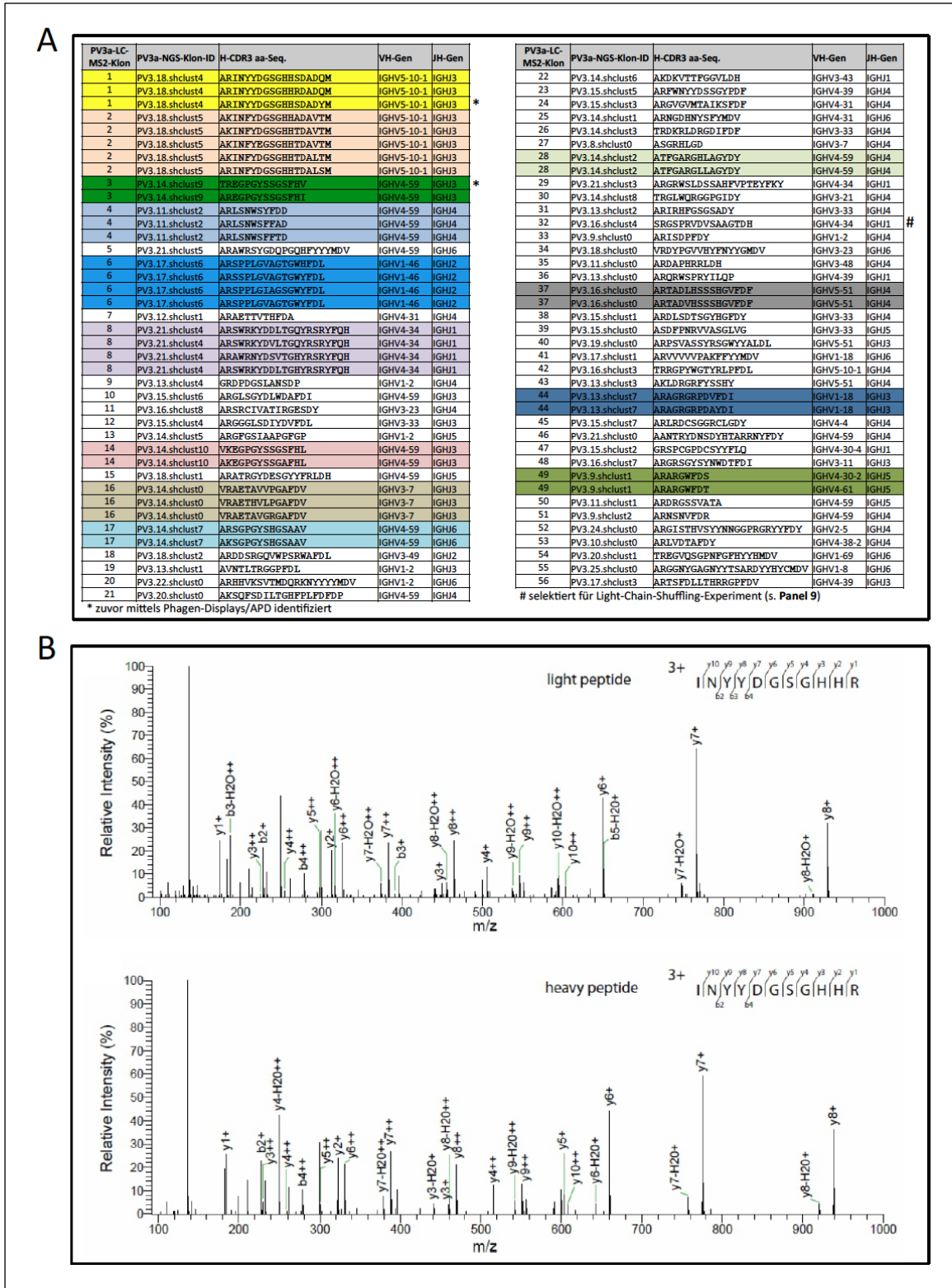
Man beachte die vergleichbaren Peptidzahlen zu „Bound“ und „Unbound“ in einem zusammengehörigen LC-MS/MS-Experiment (4-G199 oder 5-G042), welche als indirekter Hinweis auf ungefähr identische Mengen massenspektrometrisch analysierter Antikörperschwerketten dienen können; hierzu wurden diese, vor Durchführung des LC-MS/MS-Laufs, mittels SDS-PAGE auf gleiche Mengen hin austitriert. Die Massenfehler [ppm] sind aufgrund des verwendeten Hybrid Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometers sehr gering (Thermo Fisher Q Exactive Plus). In der letzten Spalte wird gezeigt, dass pro B-Zellklon ca. ein spezifisches Peptid zur eindeutigen Identifizierung mittels LC-MS/MS-generierter Spektren existiert (den tryptischen Verdau der H-CDR3-Region berücksichtigend).

So kann ein Antikörper durchaus auch vereinzelt in der „Unbound“-Fraktion aufzufinden sein, z. B. wenn die Affinitätsaufreinigung nicht vollständig erfolgte oder sich die On-/Off-Kinetik des betreffenden, tatsächlich Dsg3-spezifischen Antikörpers zu sehr von jenen unterscheidet, die sich in der „Bound“-Fraktion finden. In dieser Arbeit ist im **Panel 9** ein Beispiel für einen monoklonalen Antikörper gegeben, welcher nicht unter den strikten Kriterien massenspektrometrisch identifiziert wird, jedoch eindeutig Dsg3-spezifisch reagiert (GB8P3-8). Dies ist ein sehr starker Hinweis darauf, dass, wie im Text ausgeführt, die tatsächliche Anzahl antigenspezifischer Klone noch höher ist als hier angegeben. Ein weiterer technischer Grund für eine zu geringe Klonzahl kann die Aminosäuresequenz im H-CDR3-Bereich und die hier feststellbare Zahl tryptischer Schnittstellen darstellen.

bereits zuvor mittels der genetischen Technik des Phagen-Displays in diesem Patienten identifiziert werden konnten (und mit diesen proteomischen Experimenten nun als bestätigte Serumantikörper bestätigt gelten dürfen). Es fällt auf, dass sich, im gleichen Individuum, nur wenige zuvor genetisch identifizierte, antigenspezifische B-Zellklone serologisch identifizieren lassen, und umgekehrt, auch nur wenige serologisch identifizierte B-Zellklone in den genetischen Experimenten identifiziert wurden. Die vielfältigen Gründe für diese im Rahmen dieser Arbeit unerwartet gemachten Feststellung (sowie Optimierungsvorschläge für zukünftige Experimente zur proteomischen Serumantikörpercharakterisierung und -klonierung/-validierung) sollen in der Diskussion besprochen werden.

Als weitere Qualitätskontrolle der LC-MS/MS-Experimente wurde im Rahmen dieser Arbeit für das den PV3a-LC-MS2-Klon Nr. 1 (entspr. APD-Klon Nr. III aus **Panel 6** in D) identifizierende, tryptische Peptid (als „leichtes“ Peptid bezeichnet, da unmarkiert) ein korrespondierendes, „schweres“ Peptid mit stabiler Isotopenmarkierung der Aminosäure Arginin synthetisiert und der entsprechende Serumantikörperpräparation zugegeben („spike-in“-Experiment; **Panel 8**: B). Sowohl das Spektrum sowie die LC-Elutionszeit des schweren Peptids entsprachen denen des leichten Peptids, sodass unsere H-CDR3-Peptididentifikation (und damit die Identifikation von variablen Schwerketten und Serumklonen) mittels LC-MS/MS und anschließender bioinformatischer Datenanalyse generell als valide angesehen werden darf (und dies, obwohl die genetische Information zu diesem Klon allein aus den APD-Experimenten stammt und in keinem der NGS-Läufe identifiziert wurde).

Ultimative Bestätigung erfährt letztere Schlussfolgerung zur peptidbasierten proteomischen Identifizierung antigenspezifischer Serumantikörper durch die durch den Promovenden durchgeführten Leichtkettenshuffling-Experimente: Zu dem im **Panel 8** (A) mit einer Raute (#) versehenen PV3a-Serumklon Nr. 32 sollte mit dieser Variation der APD-Technik der dazugehörige, vollständige Autoantikörper monoklonal hergestellt werden, damit dieser, durch genetische Verfahren wie APD zuvor nicht identifizierte Klon, mittels ELISA und Immunfluoreszenz als tatsächlich Pemphigus-typisch validiert werden konnte.



Panel 8: Polyklonale Serumautoantikörperantwort in einem Pemphiguspatienten (Zeitpunkt PV3a). (A) Die unter strikten Kriterien erfolgte massenspektrometrische Analyse des Dsg3-Serumantikörperrepertoires (vgl. Panel 7) zeigt eine deutlich diversere (und ausgeprägt polyklonale) Serumantwort als zuvor mittels genetischer Verfahren (z. B. Phagen-Display/APD, Heterohybridom-Technologie) in der Literatur beschrieben (56 Serumantikörper für PV3a vs. 6 APD-Antikörper von PV3a). Farblich wurden zusammengehörige H-CDR3-Aminosäure-Sequenzen zusammengefasst (als ein Klon). Mit einem * sind antikörperspezifische H-CDR3-Sequenzen markiert, welche zuvor bereits in dazugehörigen APD-Experimenten als scFv isoliert und validiert werden konnten. Der mit dem #-Symbol markierte Klon wurde ausgewählt für die Validierung eines hier nun rein massenspektrometrisch identifizierten, antigenspezifischen Klons mittels Light-Chain-Shufflings (vgl. Panel 9; GB4-Antikörper). (B) Um die korrekte bioinformatische Zuordnung und die hohe Qualität der Detektion der PSM (Peptide-Spectra Matches) zu demonstrieren synthetisierte der Promovend exemplarisch für den PV3a-LC-MS2-Klon 1 (H-CDR3-Sequenz ARINYYDGGSHH[R/S]DAD[Q/Y]M; dazugehöriges, massenspektrometrisch identifiziertes „leichtes Peptid“ INYYDGGSHH) ein Isotopen-markiertes „schweres Peptid“ („heavy peptide“) und gab dieses der aufbereiteten Serumprobe vor LC-MS/MS bei. Die Isotopen-Markierung des Arginins [¹³C₆, ¹⁵N₄] erhöhte die Masse des einfach geladenen (z=1) y-Ions um 10.01 Dalton (vgl. m/z-Zahlen für Peaks einfach geladener y-Ionen), zeigte jedoch ansonsten ein identisches massenspektrometrisches Spektrum verglichen zum leichten Peptid aus dem gleichen LC-MS/MS-Lauf (auch die Elutionszeit im LC-Schritt war mit 18,8 min identisch). Dies validiert die bioinformatische Zuordnung von PSM zu Peptidsequenz.

Validierung massenspektrometrisch identifizierter, anti-Desmoglein 3-Antikörpersurrogate mittels Gensynthese der korrespondierenden variablen Schwerketten und Leichtkettenshufflings

Zur rekombinanten Herstellung der Minimalform eines Antikörpers, dem monovalenten scFv-Fragment, werden zumindest die kodierenden Sequenzen der variablen Schwerkette (V_H) und Leichtkette (V_L) benötigt. Werden V_H und V_L mit einem flexiblen Linker verbunden, so erhält man ein antigenbindendes, monovalentes scFv-Molekül, welches einem der beiden antigenbindenden Bereiche eines vollständigen, bivalenten Antikörpers gleicher Spezifität entspricht. Mittels LC-MS/MS wurde beispielsweise das klonidentifizierende H-CDR3-Peptid zu Klon-Nr. 32 identifiziert (**Panel 8**: A). Durch vorherige genetische V_H -Repertoirestudien mittels NGS ist daher auch die vollständige V_H -Sequenz dieses spezifischen Klons bekannt und bioinformatisch zuordenbar, sodass zur rekombinanten Herstellung des vollständigen Serumantikörpers allein die variable Leichtkette V_L fehlt. Diese ließ sich, wie in dieser Arbeit nachfolgend gezeigt, durch die genetische Technik des Leichtkettenshufflings (bzw. des Leichtkettenshuffling-Phagen-Displays, LCS-APD) identifizieren: Hierzu bezog der Promovend die variable Schwerkette als synthetisches ds-DNA-Fragment und verband dieses mittels Overlap-PCR separat mit dem gesamten Kappa- und Lambda- V_L -Repertoire dieses Patienten zu Bibliotheken von scFv-kodierenden DNA-Fragmenten (d.h., die V_H -DNAs sind, für einen Klon, alle identisch, während die $V_{\lambda/\kappa}$ -kodierenden DNA-Bereiche äußerst divers sind). Diese scFv-kodierenden Bibliotheken ließen sich, nach Einklonierung in pComb3X und separater Transformation in *E.coli*, als Phagenbibliotheken isolieren und, wie im normalen Phagen-Display-Prozess, gegen das Antigen Dsg3 selektieren und monoklonal sequenzieren.

In Teil A von **Panel 9** sind Details zu acht synthetischen ds-DNA- V_H -Fragmenten gegeben, welche für diese LCS-APD-Experimente (auf den hier generierten Vordaten beruhend) ausgewählt und als gBlocks® von IDT bezogen wurden (hier abgekürzt zu „GB“).**** Anzumerken ist, dass auch solche ds-DNA- V_H -Fragmente für Klone ausgesucht wurden, die die strikten Kriterien aus **Panel 7** und **Panel 8**

**** Der zuvor genannte PV3a-LC-MS2-Klon Nr. 32 findet sich hier als GB4 wieder.

nicht erfüllten (d.h., die nicht in jeder der vier „Bound“-Fraktionen der Exp. 4-G199 und 5-G042 massenspektrometrisch aufzufinden waren; z. B. GB6, GB7, GB8). Von diesen 16 vollständig durch den Promovenden klonierten GB-LCS-APD-Vektorbibliotheken (8x $V_H:V_K$; 8x $V_H:V_\lambda$) wurden sechs für die nachfolgende Isolation als Phagenbibliotheken und das nachfolgende Panning auf Dsg3 ausgewählt: GB3, GB4, GB8 (jeweils mit V_K - und V_λ -Leichtketten). Die GB3-Bibliothek ließ sich hierbei in mehreren Wiederholungen der Versuche nicht auf Dsg3 selektieren (keine Phagenpräzipitation/-isolation mit dem 2./3. Panning mehr möglich), während für die GB4- und die GB8-Bibliothek mit dem 2.-4. Panning eine deutliche Anreicherung antigenspezifischer Phagen nachzuweisen war (**Panel 9: B**). Von den Bibliotheken GB4 und GB 8 isolierte und sequenzierte der Promovend im Folgenden monoklonale Kolonien von *E.coli*, was in der Identifizierung der repräsentativen monoklonalen Antikörper GB4P4-7 und GB8P3-8 mündete: Beide Antikörper binden spezifisch an das Substrat Dsg3, werden durch Serum desselben Patienten an der Bindung an das Substrat gehindert, und weisen immunfluoreszenzoptisch ein Pemphigus-typisches Bindungsmuster auf Affenösophagussubstrat auf (**Panel 9: C-E**).

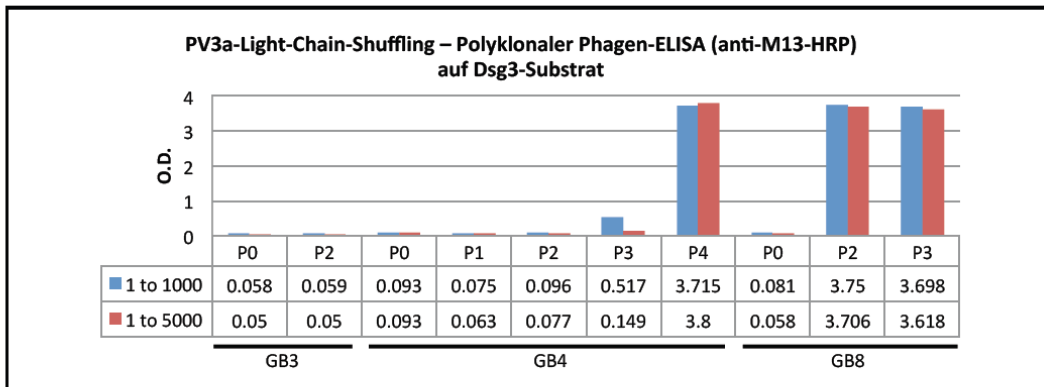
Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass nicht nur jeder der in **Panel 8** in A gezeigten, massenspektrometrisch über kleine Anteile der variablen Schwereketten (d.h., über die H-CDR3-identifizierenden Peptide) identifizierten Klone tatsächlich ein Dsg3-spezifischer Klon ist, sondern auch solche Klone valide Autoantikörperproduzenten sein können, die sich nicht mit den strikten Kriterien aus **Panel 7** (Teil C) identifizieren ließen. Die Zahl von 56 Klonen ist daher, wie bereits ausgeführt, als eine überaus konservative Einschätzung zu bezeichnen, und die tatsächliche Zahl autoreaktiver Klone dürfte für die Gruppe der Pemphiguspatienten noch höher sein (i. S. e. polyklonalen Autoimmunantwort). Nebenbefundlich lässt sich festhalten, dass die hier angewandte LCS-APD-Technik, welche eine Variation der normalen Phagen-Display-Technik darstellt, in den meisten Fällen zum monoklonalen Antikörper führen kann (hier für 2/3 Klone gezeigt). In der Diskussion soll eine verbesserte Technik zur noch einfacheren und schnelleren Identifizierung des zusammengehörigen $V_H:V_{\lambda/K}$ -Paares antigenspezifischer Antikörperklone beschrieben werden (125).

A

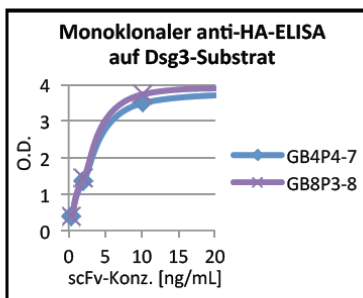
GB-ID	PV3a-LC-MS2-Klon	H-CDR3-Aminosäure-Sequenz	LC-MS2-Experiment und Peptid-Intensität			
			4-G199-JC-HCbound-QEplus	4-G199-JC-HCbound-QEplus-lul	5-G042-PV3A-Bound-1-QEplus	5-G042-PV3A-Bound-2-QEplus
GB1	10	ARGLSCGYDLWDAFDI	3.7E+08	2.8E+08	2.6E+08	4.2E+08
GB2	12	ARGGGLSDIYDVFDL	2.9E+08	1.7E+08	2.9E+08	2.4E+08
GB3	6	ARSPPLGVAGTGWHFDL	1.5E+08	2.6E+08	1.1E+09	1.1E+09
GB4	32	SRGSPRVVSAAGTDFH	3.2E+07	8.1E+07	9.2E+07	8.5E+07
GB5	16	VRAETHVLPAGAFDV	1.1E+08	9.4E+07	1.5E+08	1.8E+08
GB6	.*	ARGPRGVQHQLFYFYYLDV	0	7.6E+06	2.2E+08	2.0E+08
GB7	.*	ARHTAYGAMADY	0	0	3.8E+08	6.7E+08
GB8	.*	ARGGHGDYWAWFDP	0	0	1.0E+08	9.7E+07

*Nicht als "PV3a-LC-MS2-Klon" geführt, da die strikten Kriterien (s. Panel 7) nicht voll erfüllt werden (hier: Nicht in allen "bound"-Fraktionen identifiziert).

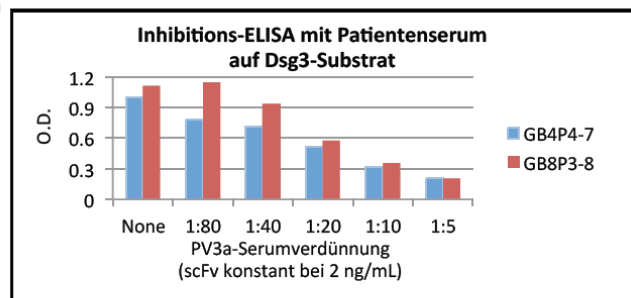
B



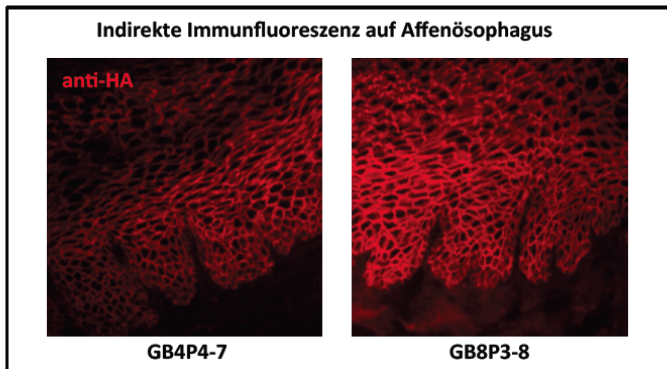
C



D



E



Panel 9: Leichtkettenschuffling-Phagen-Display zur rekombinanten Expression und Validierung zuvor rein massenspektrometrisch identifizierter, antigenspezifischer monoklonaler Antikörper. (A) Zur Klonierung von schwerkettenrestringierten Leichtkettenschuffling-Phagen-Display-Bibliotheken wurden acht variable Schwerketten (IDs GB1-GB8) ausgewählt. Hierzu wurden von acht mittels LC-MS/MS identifizierten Klonen die dazugehörigen, vollständigen V_H -DNA-Sequenzen in der patientenspezifischen NGS- V_H -Datenbank gesucht und als synthetische ds-DNA bezogen (hier als gBlocks® [GB] von IDT bezogen). Diese DNA-Bausteine wurde dann, mittels der Standard-Overlap-PCR, mit dem gesamten Leichtkettenrepertoire ($V_{\lambda/\kappa}$) dieses Patienten zu einer kombinatorischen $V_H:V_L$ -Bibliothek (scFv-kodierend) zusammengefügt (separat für jeden GB, getrennt für Kappa- und Lambda- V_L s). Als Phagenbibliothek in E.coli wurden GB3-, GB4-, und GB8- V_H -enthaltende DNA-Bibliotheken exprimiert und auf dem Antigen (Dsg3) selektiert. GB6-GB8 sind in Panel 8 nicht als PV3a-LC-MS2-Klon geführt, da diese nicht in allen LC-MS2-Experimenten in der „Bound“-Fraktion zu identifizieren waren. Diese Klone können jedoch, obwohl die zuvor festgelegten strikten Kriterien nicht vollständig erfüllt werden, trotzdem valide sein (was mit diesem Experiment getestet werden sollte). (B) Bibliotheken GB4 und GB8 zeigen nach drei bzw. zwei „Pannings“ auf Dsg3-Substrat ein Signal im polyklonalen anti-M13-Phagen-ELISA, was auf eine erfolgreiche Selektion monoklonaler Phagen hinweist. Von diesen polyklonalen Pools ausgehend wurden monoklonale Kolonien ausgewählt, sequenziert und exprimiert. Die Phagenbibliothek GB3 konnte, trotz mehrfacher Versuche, nicht für Dsg3-spezifische Klone angereichert werden. (C) Die rekombinanten Antikörper GB4P4-7 (Antikörper Nr. 7 aus dem vierten Panning der GB4-Phagenbibliothek) und GB8P3-8 (8. Antikörper des dritten Pannings der GB8-Phagenbibliothek) binden spezifisch an Dsg3 im anti-HA-ELISA. (D) PV3a-Patientenserum interferiert mit der Bindung der monoklonalen scFv-Antikörper GB4P4-7 und GB8P3-8 an das Antigen Dsg3 und validiert hiermit diese Antikörper (durch Bindung an ähnliche/gleiche, relevante Epitope auf Dsg3). (E) Beide Antikörper zeigen auch in der indirekten Immunfluoreszenz das typische Muster von Pemphigus-Antikörpern („Fischnetzmuster“), welches durch Anfärbung membranständiger, keratinozytärer Dsg3-Moleküle entsteht (200x Vergrößerung).

Diskussion

Stellenwert genetischer Antikörper-Screening-Verfahren wie z. B. Phagen-Display

Genetische Verfahren zur Identifizierung und Erzeugung monoklonaler Antikörper als eindeutig definierte und in unbegrenzten Mengen rekombinant herstellbare Reagenzien und Therapeutika sind unverzichtbar für die moderne, lebenswissenschaftliche Forschung und für die Medizin (86, 126-129). Im Bereich der Pemphiguserkrankungen wurden bisher Phagen-Display (engl. APD, Antibody Phage Display), die Heterohybridom-Technologie, und EBV-Lymphozytentransformation zur Erzeugung und zum Studium humaner monoklonaler, antigenspezifischer Antikörper gegen die Cadherine Desmoglein (Dsg) 3 und Dsg1 angewandt (16, 54-57, 91, 94, 124, 130, 131). Die mittels dieser Techniken erzeugten monoklonalen Antikörper wurden u. a. erfolgreich eingesetzt zur Aufklärung von Pathomechanismen der Blasenbildung (z. B. dem Prinzip der direkten Interferenz von anti-Desmoglein-Antikörpern mit den adhäsionsvermittelnden Dsg:Dsg-Komplexen intraepidermal; engl. als „Steric Hindrance“ bezeichnet), involvierten Signaltransduktionswegen, oder Kreuzreaktivitäten der Zielantigene (z. B. zwischen Desmoglein 3 und Rota-Viruskapsid VP6, aber auch zwischen Desmoglein 3 und Desmoglein 1, durch den zufälligen Nachweis bispezifischer, monoklonaler anti-Desmoglein 3/1-Antikörper) (15, 53, 54, 56, 97, 102, 124). Eine erfolgreiche, translationale Nutzung nichtpathogener anti-Desmoglein-Antikörper zur zielgerichteten Lokalisation von Wirkstoffen an der Epidermis wurde ebenfalls beschrieben (101).

Alle vorgenannten, genetischen Techniken besitzen Vor- und Nachteile (86): Phagen-Display besitzt hierbei, im Vergleich zur Heterohybridom-Technologie und zur EBV-Lymphozytentransformation, den entscheidenden Vorteil, eine „High-Throughput“-Technologie zu sein, die das gleichzeitige Screening bzw. die gleichzeitige Selektion von $>10^{12}$ Phagen auf einem Antigensubstrat erlaubt; solche Zahlen lassen sich mit den anderen beiden Techniken nicht erreichen, welche, verglichen zum APD-Screening, äußerst aufwändig, personalintensiv und teuer sind (oft müssen für einen einzelnen Antikörper hunderte, einzeln

ausplattierte Zellen inkubiert und deren Zellüberstände mittels ELISA, Immunfluoreszenz o. ä. untersucht werden; vgl. (94)). Ein möglicher Nachteil der Technologie des Phagen-Displays könnte eine unphysiologische Paarung von variabler Schwer- und Leichtkette sein, da diese im Overlap-PCR-Schritt zufällig miteinander verbunden werden; eigene Vordaten aus mehreren, unabhängigen Experimenten zeigten jedoch, dass durch diese zufällige genetische Verknüpfung sehr wahrscheinlich keine Reaktivitäten entstehen bzw. erzeugt werden, die im tatsächlichen (Serum-)Antikörperrepertoire des jeweiligen Patienten nicht auch vorhanden wären.††††

Aufgrund der auch in dieser Arbeit gezeigten, sehr hohen Sensitivität des genetischen Screening-Verfahrens APD (vgl. Klon III in **Panel 6**, Teil D; bestätigt in **Panel 8**) ist dieses auch prädestiniert zur longitudinalen Verfolgung antigenspezifischer Klone über die Zeit bzw. über verschiedene Krankheitsstadien im gleichen Patienten (z. B. bei Erstdiagnose, Remission, Rückfall) (16). Hierbei ist anzumerken, dass die APD-Technik in der hier dargelegten und genutzten Form sowohl Transkripte von sezernierten Antikörpern, als auch von B-Zellrezeptoren (BCRs) erfasst, was bei den erwähnten Longitudinalstudien einen großen und erwünschten Vorteil darstellte, da so auch B-Zellen und/oder Plasmazellvorläufer erfasst werden konnten, die noch (bzw. zum untersuchten Zeitpunkt) keine Antikörper in das Interstitium/Plasma sezernierten.

Dass genetisch identifizierte Antikörper-/BCR-Sequenzen valide sind, obwohl diese ggf. nicht im Serum als monoklonaler Serumantikörper nachgewiesen werden können, zeigt sich nicht nur an ELISA-, Immunfluoreszenz-, oder

†††† So konnte der Promovend für einen Pemphiguspatienten nach vollständiger Remissionsinduktion durch den CD-20-Antikörper Rituximab exemplarisch zeigen, dass in der Phagenbibliothek PV1c-IgG (publiziert in Ref. (16)) keine anti-Desmoglein-IgG-Klone mehr aufzufinden sind, und dies obwohl diese Bibliothek valide und divers ist (sichergestellt durch gleichzeitige Selektion auf Tetanus-Toxoid und Expression von monoklonalen Antikörpern des IgG-Repertoires gegen Tetanus-Toxoid; unveröffentlichte Daten). Würde die zufällige Verknüpfung von variabler Schwer- und Leichtkette zu unphysiologischen Reaktivitäten führen, so wäre der Erhalt von Dsg-Antikörpern auch aus der Phagenbibliothek PV1c-IgG zu erwarten gewesen. In gleicher Arbeit konnte der Promovend zu anderen Phagenbibliotheken zeigen, dass einige scFv-Antikörper die gleichen Kombinationen von VH- und VL-Genen aufweisen wie zuvor publizierte monoklonale Antikörper aus Heterohybridom-/EBV-Transformations-Experimenten, welche das gleiche Antigen banden. Es wird daher davon ausgegangen, dass die Selektion von Bindern auf dem Antigen zu der korrekten, physiologischen Paarung von V_H:V_L führt (bzw. die korrekte Paarung selektiert wird).

Pathogenitätsstudien, sondern auch an Epitopstudien: So konnte bereits in mehreren Publikationen (und auch in dieser Dissertationsschrift) mittels Inhibitions-ELISA gezeigt werden, dass genetisch identifizierte, monoklonale Antikörper an die gleichen Epitope binden, wie Serumantikörper desselben und auch anderer Patienten mit der gleichen Erkrankung (56, 131).

In einer kürzlich publizierten Studie wird, in Zusammenschau mit den dazugehörigen, isotypenspezifischen NGS-Daten, eine isotypenspezifische Variante der APD-Technik erstmalig auch zu extensiven Repertoire- und Klassenwechselstudien von Autoantikörpern in Pemphiguspatienten verwendet (24). Zu ähnlichen Zwecken verwendet der Promovend, in laufenden Experimenten, die APD-Technologie zur erstmaligen und umfassenden Charakterisierung des IgG1-/IgG4-/IgE-Antikörperrepertoires in Patienten mit bullösem Pemphigoid (BP), ergänzt durch proteomische Daten zu BP-spezifischen Serumantikörpern derselben Patienten (in Teilen bereits publiziert in (119)).

Die in dieser Arbeit beschriebene Klonierung des IgG-Antikörperrepertoires des Patienten PV3a mittels APD erbrachte, bei sehr guten Transformationseffizienzen von $>10^8/\mu\text{g}$ Vektor-DNA, sechs Klone^{****} mit 10 verschiedenen monoklonalen anti-Desmoglein 3-scFv-Antikörpern. Alle jene Antikörper zeigten sich, wie erwartet, als Pemphigus vulgaris-typisch und antigenspezifisch (d.h., im ELISA nur an Desmoglein (Dsg) 3, nicht jedoch an Dsg1 bindend, sowie mit typischem Muster in der indirekten Immunfluoreszenz auf Affenösophagus und normaler, humaner Haut). Bispezifische anti-Dsg3/1-Antikörper wurden hier nicht identifiziert, was ein Vorhandensein solcher, aus Vorexperimenten bereits bekannter Antikörper jedoch nicht ausschließt (vgl. hierzu intermediäre Dsg1-O.D.-Werte im polyklonalen Phagen-ELISA, **Panel 1**, Teil I).

Die oligoklonale Zahl^{§§§§} hier genetisch identifizierter B-Zellklone fügt sich ein in publizierte Vordaten zu weiteren Patienten mit Pemphigus vulgaris oder Pemphigus foliaceus (54-56, 91, 94, 130, 132). Es ist denkbar, dass diese Zahl an

**** Unter Einbezug der zuvor klonierten Phagenbibliothek PV3 (-5,5 Jahre; bei Erstdiagnose) ergeben sich insgesamt sieben Klone.

§§§§ Als oligoklonal wird hier definiert die Zahl von ≤ 10 B-Zellklonen (nach H-CDR3-Aminosäuresequenz, mit 80% Sequenzähnlichkeit).

B-Zellklonen jedoch zu niedrig gegriffen ist: So basiert die technisch anspruchsvolle Phagen-Display-Technologie auf wiederholten Gelaufreinigungen von PCR-Amplifikaten (mit jeweils signifikanten, technisch bedingten Verlusten an DNA-Material), einer effizienten Overlap-PCR-Reaktion, der effizienten Einklonierung diverser scFv-kodierender DNA-Bibliotheken in den Expressionsvektor (z. B. pComb3X), einer effizienten Elektroporation in elektrokompetente *E.coli*-Präparationen hoher Qualität, der erfolgreichen und vollständigen Aufreinigung der resultierenden Phagenbibliotheken mittels Ultrazentrifugation und PEG-Präzipitation, sowie der zufälligen und begrenzten, händischen Auswahl monoklonaler Kolonien für die nachfolgende Sanger-Sequenzierung.

Auch scheint das genetische Ausgangsmaterial und der für die Elektroporation/Re-Infektion verwendete *E.coli*-Stamm Einfluss auf die Klonzahl zu haben; in o. g. BP-Phagenbibliotheken verwendete der Promovend nicht nur PBMC-cDNA, welche mittels eines neuen, proprietären MMLV-RT-Enzyms (133, 134) transkribiert wurde, sondern auch ER2738 *E.coli* ([F'proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15 zcf::Tn10 (tetr)] fhuA2 glnVΔ(lac-proAB) thi-1Δ(hsdS-mcrB)5; Lucigen) anstelle von XL-1 Blue *E.coli* (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]; Agilent), unter nun anfänglicher Beigabe von Glucose zur temporären Repression der lacZ-Promotor-abhängigen pIII-Kapsid-scFv-Fusionsproteinexpression; bei ansonsten identischen Protokollen konnten von einem Patienten so deutlich mehr als zehn Klone isoliert werden (unpublizierte Daten).

Diese, sowie weitere, mögliche Gründe für geringe Klonzahlen bei Verwendung der APD-Technologie und Vorschläge zur Optimierung dieser dennoch sehr potenten und für die Forschung und Entwicklung wichtigen Methode werden im Folgenden weiter diskutiert.

Stellenwert proteomischer Identifizierung monoklonaler Antikörper

Mittels NGS-gestützter, proteomischer Identifizierung monoklonaler Serumantikörper wurden für unseren PV-Patienten PV3a 56 Antikörperklone identifiziert (**Panel 8**, Ergebnisteil). Diese Zahl klonal unterschiedlicher

Antikörperklone ist deutlich höher und diverser als zuvor mittels genetischer Methoden für die Gruppe der Pemphiguserkrankungen nachgewiesen. Wie bereits erwähnt, stellt die Zahl von 56 proteomisch identifizierten Klonen ein unteres Minimum dar, mit sehr strikten Kriterien in der Datenauswertung.

Dieser doch unerwartete und pathophysiologisch neue Befund einer polyklonalen Autoimmunantwort bedeutet möglicherweise, dass die beobachtete Klinik in Pemphigus vulgaris-Patienten nicht, wie zuvor angenommen, Resultat der Evasion einiger, weniger autoimmuner B-Zellen bzw. B-Zellklone vor den körpereigenen, immunologischen Mechanismen der Toleranz ist, sondern eher das Ergebnis einer breiteren und generalisierteren Autoimmunantwort vieler B-Zelllinien, welche den immunologischen Toleranzmechanismen entgehen. Wie in vorherigen Arbeiten des Promovenden sowie in weiterführenden Arbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte lassen sich diese autoreaktiven B-Zellklone über lange Zeit im Blut der Patienten nachweisen (abhängig vom gewählten Modus der Therapie). Diese zeigen jedoch, wie experimentell am Beispiel von Pemphigus foliaceus demonstriert, unterschiedliche Aktivitäten in der Sekretionsleistung monoklonaler Antikörper produzierender Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (111). Diese Beobachtung könnte hohe Titer im spezifischen Desmoglein-ELISA in Pemphiguspatienten in Remission erklären helfen (135-137).*****

Generell hat die proteomische Identifizierung monoklonaler Antikörper im Serum in der medizinischen Forschung eine herausragende Position, da so, im Zusammenspiel mit der Methode des NGS, sehr schnell und effizient Serumantikörper gegen bekannte Antigene identifiziert, validiert, und rekombinant synthetisiert werden können (103, 138, 139). Das Beispiel der HIV-Erkrankung und der dort stattfindenden, kontinuierlichen Suche nach therapeutisch einsetzbaren, möglichst breit neutralisierenden monoklonalen Antikörpern zeigt den Erfolg dieser innovativen Methodik auf (140, 141), welche

***** Diese mittels Proteomik detektierbaren Dynamik in der Expression monoklonaler Autoantikörper über die Zeit kann nicht nur unmittelbar in der Krankheitsaktivität des Patienten seine Entsprechung finden, sondern potenziell auch erklären, warum einige Patienten mit Pemphigus selbst in Remission hohe Antikörpertiter aufweisen. In Remission könnten so vermehrt nicht-pathogene monoklonale Antikörper exprimiert werden, während pathogene monoklonale Antikörper hier entweder in der Minderheit sind oder nicht exprimiert werden. Diese naheliegende Möglichkeit gilt es jedoch noch im Rahmen von weiteren Studien genauer zu untersuchen.

sich durchaus auch auf andere, hochprävalente und/oder potenziell letale Infektionskrankheiten (z. B. Hepatitis B/C oder Ebola) und zur (grundlagenwissenschaftlichen) Entschlüsselung der Immunantwort nach Impfung übertragen lässt (112, 142, 143).

Andere wichtige, hier jedoch nicht weiter diskutierte Einsatzbereiche der Tandem-Massenspektrometrie stellen insbesondere die Identifizierung unbekannter Zielantigene von Autoimmunerkrankungen (z. B. mittels Histoimmunopräzipitation und nachfolgender LC-MS/MS-Analyse) oder globale Untersuchungen des gesamten Proteoms (bzw. des Phosphoproteoms bei Signalkaskaden) unter verschiedenen Versuchsbedingungen dar (74, 144-147).

Mögliche Gründe für die geringe Überlappung genetischer und proteomischer Verfahren zur antigenspezifischen Antikörpercharakterisierung

Mittels NGS-gestützter, proteomischer Identifizierung monoklonaler Serumantikörper wurden für den PV-Patienten PV3a 56 Antikörperklone identifiziert. Von diesen 56 Klonen finden sich mittels der genetischen, APD-basierten Methode der Antikörpergenerierung nur zwei (**Panel 8**, Ergebnisteil). Mögliche Problemquellen dieses geringen Overlaps zwischen genetischen und proteomischen Methoden sind in **Tabelle 2** zusammenfassend aufgelistet und sollen nachfolgend, für ausgewählte Beispiele, weiter diskutiert werden:

Tabelle 2: Problemquellen und Möglichkeiten der Optimierung der genomisch-proteomischen Antikörpercharakterisierung

Technik	Mögliche Problemquelle	Optimierungsmöglichkeit
APD/NGS	Nur einmalige Blutentnahme aus einer peripheren Vene, zur Zellaufreinigung (RNA-Quelle) und zur gleichzeitigen Gewinnung von Serum/Plasma	Mehrmalige Blutentnahmen peripher und/oder Durchführung einer Knochenmarksstanze; Einsatz gesorteter Zellpopulationen (z. B. nur CD138 ⁺ Plasmazellen); Zellisolation aus läsionaler/periläsionaler Haut; Immunapherese/-adsorption (für die Isolation großer Antikörpermengen, nicht jedoch für Zellen geeignet)
APD/NGS	RNA/cDNA geringer Qualität und/oder geringer Menge	Verwendung genetisch optimierter reverser Transkriptasen (z. B. SuperScript IV, Thermo Fisher Scientific); Amplifizierung von mRNA/ss-cDNA mittels spezieller Kits (z. B. Takara/Clontech); Optimierung der mRNA-Isolation
APD/NGS	Klonierung und Selektion des pan-IgG-V _H -/Phagen-Repertoires	Getrennte Klonierung und Selektion der IgG-Subtypen-V _H -/Phagen-Repertoires (IgG1/2/3/4); zusätzliche Klonierung und Selektion anderer, zusätzlicher Isotypen und ggf. Subklassen (z. B. IgA mit IgA1/2, IgE)
APD/NGS	Geringe PCR-Effizienz/-Ausbeute während der APD-Klonierungs- und/oder der	Verwendung anderer Cycler-Kinetiken und/oder Primerschmelztemperaturen, Optimierung der PCR-Konditionen; Gradienten-PCR; Verwendung eines anderen PCR-Cyclers; Verwendung

	NGS-Klonierungsschritte	unterschiedlicher Mengen/Ratios von Forward-/Reverse-Primern (z. B. 80:20 statt 50:50)
APD/NGS	Verlust von DNA während repetitiver Gelaufreinigungen	Sicherstellung der Nukleasenfreiheit von Arbeitsumgebung und sämtlichen Reagenzien; Verwendung alternativer Gelaufreinigungsverfahren, z. B. „Freeze-and-Squeeze“, E-Gel (ThermoScientific), oder von Magnetic Beads
APD	Auf pIII-Capsid des Phagen exprimiertes Antikörperfragment ist toxisch für <i>E.coli</i> ; geringe Expressionsraten von Phagen/monoklonaler scFv-Proteine	Wechsel von XL1-Blue zu anderen, für Phagen-Display geeigneten <i>E.coli</i> -Stämmen, z. B. ER2738 oder TG1; anfängliche Beigabe von Glucose zu den Phagen-infizierten <i>E.coli</i> -Zellen (zur temporären Repression der lacZ-Promotor-abhängigen pIII-Capsid-scFv-Fusionsproteinexpression); Für bekannte (sequenzierte) monoklonale Klone kann eine Kodonoptimierung der scFv-kodierenden Sequenzabschnitte erfolgen (nicht möglich für diverse, polyklonale Vektor-/Phagenpräparationen). Benutzung eines anderen Expressionsvektors (anstelle des Phagemids pComb3X kann z. B. pADL-10b oder pCANTAB 5e zum Einsatz kommen)
APD	Überwucherung seltener Phagenklone durch in <i>E.coli</i> besser replizierende Phagenklone (während der repetitiven Amplifizierungsschritte)	Getrennte Selektion und Expression von Kappa-/Lambda-scFv-Phagenbibliotheken; kürzere/optimierte Inkubationszeiten während der Phagenreplikation in <i>E.coli</i> ; Reduktion der Inkubationstemperatur von 37 auf 30 Grad Celsius; mehrfache Wiederholung der Phagen Selektion auf dem jeweiligen Antigen von Interesse, unter ggf. verschiedenen Bedingungen (Waschpuffer, Anzahl Waschschrte, Elutionsbedingungen, etc.) und verschiedentlich gebundenem Antigen (z. B. ELISA-Well, Beads, Säulen, Agarose, etc.)
APD	Geringe/oligoklonale Zahl antigenspezifischer B-Zellklone während der Sanger-Sequenzierung monoklonaler Kolonien der APD-Selektionsschritte P2/P3/P4. Mangelhafte Phagenelution.	Sanger-Sequenzierung von mehr monoklonalen <i>E.coli</i> -Kolonien aus APD-Selektionsschritt P2/P3/P4; Hochdurchsatz-NGS-Sequenzierung antigenspezifischer, scFv-kodierender pComb3X-Inserts aus Selektionsschritt P2/P3/P4 (möglich z. B. mittels PacBio RSII CCS; Insertlänge ~850 bp); Verwendung anderer/alternativer Antigen-/Substratquellen oder Elutionsverfahren während der Phagen Selektionsschritte P1/P2/P3/P4 (z. B. ELISA-Platten eines anderen Herstellers [hier, für Desmogleine: MBL und EUROIMMUN verfügbar]; Herstellung eigener antigenbeschichteter/-konjugierter Beads/Säulen/ELISA-Platten mit unterschiedlicher Antigendichte; Phagen Selektion mittels magnetischer Beads; Phagenelution mittels Citratpuffer [pH<3, oder, harscher], Glycinpuffer [pH<3, oder, harscher], EDTA-Puffer [zur Calciumchelation und Konformationsänderung des Ca ²⁺ -abhängigen Antigens], oder enzymatisch; Infektion von <i>E.coli</i> „in-well“, mit weiterhin an das Antigen gebundenen Phagen), da einige scFv-tragende Phagen ggf. gar nicht eluiert werden können.
LC-MS/MS	Geringe Überlappung LC-MS/MS-identifizierter Antikörperklone mit genetisch identifizierten, antigenspezifischen Klonen (z. B. aus APD)	S. APD-bezogene Optimierungsvorschläge oben; Relaxierung der strikten LC-MS/MS-Selektionskriterien (via Bioinformatik); NGS-V _H -Datenbankerstellung von zellulärer cDNA mehrerer Blutentnahmen und/oder Knochenmarksbiopsien (zu unterschiedlichen Zeitpunkten); Einschluss von Gewebeprobe(n) (RNA gewebständiger B-/Plasmazellen); tiefere Hochdurchsatzsequenzierung des V _H -cDNA-Pools; mehrfache Durchführung von Serumabnahme, Affinitätsaufreinigung und LC-MS/MS; Benutzung zusätzlicher Enzyme zum Proteinverdau (neben Trypsin); Benutzung sensitiverer MS/MS-Geräte, Optimierung des LC-Gradienten zur Injektion der tryptischen Peptide; harsche Elution von antigengebundenen Antikörpern u. Phagen

Verwendete Abkürzungen: APD, Antibody Phage Display (Phagen-Display); NGS, Next-Generation Sequencing

Es ist hinlänglich bekannt, dass APD ein verzerrtes Abbild des humanen Antikörperrepertoires geben kann, da die Wachstumsgeschwindigkeit phageninfizierter *E.coli* (bzw. die Phagenassemblierung in *E.coli*) innerhalb eines polyklonalen Pools sehr unterschiedlich sein kann und einige (humane) Antikörpersequenzen toxisch auf *E.coli* wirken können (148, 149). Eine technisch sehr anspruchsvolle Methode zur Verhinderung der Konkurrenz zwischen unterschiedlichen Phagen in gleicher Kultur könnte die

Kompartimentalisierung mittels Mikrofluidik sein (150), was jedoch ein hohes Maß an Erfahrung und individueller Infrastruktur erfordert. Nach Erfahrung des Promovenden kann hier bereits eine Optimierung der Inkubationsdauer und -temperatur der *E.coli*-Kultur nach Phageninfektion (z. B. für nur 10-14 h nach den einzelnen Panningschritten, bei 30 statt 37 Grad Celsius) zu verbesserten Ergebnissen führen. Auch ist denkbar, dass einige, potentiell pathophysiologisch wichtige, antigenspezifische Phagen nicht durch schonende Verfahren vom Antigen eluiert werden können und deutlich harschere Methoden zum Einsatz kommen sollten (vgl. hierzu **Tabelle 2** sowie den technischen Ansatz, dass für einige LC-MS/MS-Experimente dieser Arbeit die antigenspezifischen Serumantikörper unter reduzierenden Bedingungen von den antigenbeladenen Beads „heruntergekocht“ wurden). Bislang ebenfalls nicht umfassend über mehrere Studien gezeigt ist der mögliche, positive Effekt einer mehrfachen und/oder isotypen-/subklassenspezifischen Klonierung von APD-Bibliotheken des gleichen Individuums (24); diese Techniken würden sehr wahrscheinlich die Diversität der in der jeweiligen Bibliothek kodierten Antikörper deutlich erhöhen und, bei getrennter Expression und Selektion als Pools von Phagen (durch eine „Entzerrung“ einer sehr phagendichten Situation während der Selektion), in einer größeren Klonalität und einem größeren Overlap zu den proteomischen Verfahren resultieren.

Obwohl die hier etablierte LC-MS/MS-Routine auf NGS-Datenbanken rein peripherer PBMC basierte (und im Vergleich mit APD deutlich bessere Ergebnisse erbrachte, was auf APD-inhärente Probleme hinweisen kann), scheint die gleichzeitige Isolation antikörperkodierenden Zellmaterials aus Zirkulation (peripheres Blut, mit zirkulierenden B-Zellen) und Knochenmark (Plasmazellen) des gleichen Individuums ein sehr vielversprechender Ansatz zur Verbesserung der Konkordanz Genetik-Proteomik zu sein, und dies zu möglichst mehreren Zeitpunkten: So konnte Wine et al. in einem mit Hämocyanin aus *Concholepas concholepas* (CCH) immunisierten Kaninchen zeigen, dass 18/34 der mittels LC-MS/MS identifizierten, CCH-spezifischen IgG-Serumantikörper auf Knochenmarkstranskripte variabler Schwerketten zurückgehen, während die restlichen 16/34 CCH-IgG-Antikörper Transkripten peripherer Leukozyten entstammen (113). Eine Kombination dieser beiden RNA-Quellen zur

Konstruktion von APD-cDNA-Bibliotheken sollte daher die Zahl erfasster Serumantikörper und den Overlap von genetischen und proteomischen Methoden weiter erhöhen können, unter weiterer Optimierung der APD-Technologie, wie oben und in **Tabelle 2** ausgeführt. Analog hierzu könnte ein Einbezug von Hautproben von Pemphiguspatienten die Zahl genetisch identifizierter Serumklone verbessern helfen, da kürzlich gezeigt werden konnte, dass zumindest ein Teil der antikörperproduzierenden Zellen periläsional/läsional in der Haut angesiedelt ist (29); diese gewebsspezifischen, antikörperkodierenden Transkripte könnten so durch etablierte und hochsensitive Verfahren aus den Gewebeproben extrahiert und in die Klonierung der Phagen-Bibliotheken eingeschlossen werden. Denkbar, jedoch bislang nicht durch entsprechende Literatur für den Menschen gezeigt, wäre der Einschluss weiterer, immunologisch relevanter Gewebe, wie z. B. der Milz oder der die Haut drainierenden Lymphknoten, sowie die Wiederholung o. g. Zell- und Serumgewinnung aus verschiedenen Quellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Während eine wiederholte Zell- und Serumgewinnung zu mehreren Zeitpunkten realisierbar ist, erscheint eine umfangreiche Probennahme über Blut und Knochenmark hinaus aus ethisch-medizinischen Gründen bei Patienten als eher schwierig möglich (ggf. ist in zukünftigen Experimenten eine Entnahme mehrerer Organbiopsien *post mortem* zu erwägen, nach vorheriger Aufklärung und Einwilligung des Patienten zu Lebzeiten).

Auf proteomischer Seite könnte das mehrfache Gewinnen von Serum über einen bestimmten Zeitraum bzw. die extensive Gewinnung von Serumantikörpern (z. B. mittels Protein A-Immunsorption, als Ausgangsmaterial für folgende, antigenspezifische Antikörperaufreinigungen) die Problematik einer geringen Konkordanz zu den genetischen Daten durch eine repräsentativere Abdeckung des Serumantikörperpools abschwächen. Denkbar wäre auch eine zusätzliche Gewebsextraktion gebundener, antigenspezifischer Autoantikörper aus Hautproben der Patienten, basierend auf publizierten Protokollen und einem Patent (147, 151-153).

Translationale Bedeutung der hier gewonnenen Erkenntnisse

Der eindeutige Nachweis einer deutlich polyklonalen Autoimmunantwort als zuvor für die Gruppe der Pemphiguserkrankungen angenommen birgt mehrere, auch translational nutzbare Implikationen: Zunächst scheint der immunologische Toleranzverlust nicht auf einzelne, wenige Klone bzw. Sets von Klonen beschränkt, wie noch durch rein genetische Vordaten suggeriert. Hierbei ist jedoch weiterhin unklar, ob der Toleranzverlust über einen längeren Zeitraum hinweg bestehen bleibt, oder nur einmalig auftritt, z. B. während einer Infektion oder einer anderweitigen, transienten Immunkompromittierung (genetische Vordaten einer einzelnen publizierten Studie suggerieren einen einmaligen Toleranzverlust; (16)). Es muss daher unbedingt durch zukünftige Studien umfassender untersucht werden, auf welcher Ebene der Toleranzverlust bei Pemphiguspatienten stattfindet, d. h., entweder zentral im Knochenmark, oder peripher (11, 154), und wie lange dieser Verlust der Regulation andauert. Zentrale Toleranzdefekte (z. B. aufgrund fehlerhafter B-Zell-Rezeptor-Editierung, engl. receptor editing, oder kompromittierter Deletion autoreaktiver B-Zellklone) würden deutlich schwieriger zu korrigieren bzw. zu behandeln sein als periphere Toleranzdefekte, welche z. B. aufgrund mangelnder Suppression autoreaktiver B-Zellen durch regulatorische T-Zellen, Tregs, auftreten können. Beispiele für effektive Möglichkeiten der Therapie peripherer Defekte der B-Zell-Toleranz sind so (für andere Erkrankungen aus dem autoimmunen Formenkreis bereits gezeigt) z. B. die Gabe von IL-2 (155-157) und/oder die Infusion gentechnisch modifizierter, antigenspezifischer Tregs (CAR-Treg-Zellen), die in ähnlicher Weise in Zukunft selektiv Desmoglein-reaktive B-Zellen targetieren und supprimieren könnten (158-161).++++

Bis diese vielversprechende CAR-Treg-Technologie ausgereift und auch für die Gruppe der Pemphiguserkrankungen verfügbar ist, haben klinisch tätige Dermatologen mit B-Zell-depletierenden Wirkstoffen wie Rituximab, einem chimären, murin/humanen monoklonalen anti-CD20-IgG1 κ -Antikörper, eine sehr wirksame Therapie an der Hand, unter der, abhängig vom Zeitpunkt der

++++ Diese innovative Technologie wird momentan z. B. von TxCell für das bullöse Pemphigoid weiterentwickelt (s. Link unter <https://www.txcell.com/pipeline/#!/entxbp>; letzter Zugriff: 19.09.2018, 23:53 Uhr).

ersten Gabe im Krankheitsverlauf und vom exakten Protokoll, mehr als 50 % der Pemphiguspatienten in eine Langzeitremission ohne weitere, adjuvante Immunsuppression gebracht werden können (37, 162-165).#####

Ein anderer, jedoch ebenfalls noch experimenteller Ansatz, welcher, im Gegensatz zur ungerichteten Depletion aller CD20⁺ B-Zellen durch Rituximab, spezifisch alle Dsg3-autoreaktiven B-Zellen (einschließlich CD20⁻ Plasmazellen) entfernen kann, ist die CAAR-T-Zell-Therapie, welche sich in einem Pemphigus-Mausmodell als sehr effektiv und nebenwirkungsarm/-frei zeigte (98). Da die meisten Pemphigus vulgaris-Patienten Dsg3- und Dsg1-Autoantikörper aufweisen fehlt zur effektiven Therapie hier jedoch noch eine gegen das Dsg1 gerichtete CAAR-T-Zell-Therapie, welche sich jedoch in Entwicklung befindet (persönliche Kommunikation); sodann könnten, entweder sequenziell, oder aber zeitgleich Dsg3- und Dsg1-B-Zellen dauerhaft eradiziert werden.

Weiterhin stellt sich die Frage, warum die Autoimmunantwort so ausgeprägt polyklonal ist; so ist für den Pemphigus gänzlich unbekannt, ob eine kontinuierliche Stimulierung autoreaktiver B-Zelllinien durch Freisetzung der Antigene Dsg3 und Dsg1 (z. B. durch Autoantikörper oder eine anderweitig induzierte Zellschädigung) induziert werden könnte. Es wurde bereits nachgewiesen, dass sich ein N-terminales 30 kDa-Fragment des Dsg3-Proteins im Serum nachweisen lässt (166); dieses könnte bei Störungen der Toleranzmechanismen auf B-Zellebene (und APC-Ebene) zahlreiche Epitope für eine rasche Selektion und Expansion vieler verschiedener, autoreaktiver anti-Dsg3-B-Zellklone bieten.

In weiterführenden Arbeiten dieser Arbeitsgruppe konnten Chen et al. für den hier untersuchten Patienten PV3 zeigen, dass von den zahlreichen, proteomisch nachgewiesenen, autoreaktiven Klonen nur ein kleiner Teil für den Großteil der zirkulierenden Serumautoantikörper verantwortlich ist (111). Dieser Befund ist konkordant zu Vorbefunden nach Tetanusimpfung (103, 112) und könnte für die

Aufgrund des ausgelaufenen Patentschutzes für Rituximab wird eine Therapie mit diesem monoklonalen Antikörper deutlich kostengünstiger und wahrscheinlich, ob der guten Wirksamkeit, auch die neue Erstlinientherapie im Pemphigus werden. Erstes, 2017 in Europa zugelassenes Biosimilar von Rituximab (MabThera®, Roche) ist Truxima® (Entwicklungsname CT-P10) der südkoreanischen Firma Celltrion, und weitere sind in Entwicklung; vgl. hierzu (165).
Greenwald M, Tesser J, Sewell KL. Biosimilars Have Arrived: Rituximab. *Arthritis*. 2018;2018:3762864. PubMed PMID: 29765782. Pubmed Central PMCID: 5885398.)

Pemphiguserkrankung darauf hinweisen, dass eine vollständige Depletion aller Dsg-reaktiven B- und Plasmazellen (wie z. B. mittels CAAR-T-Zell-Therapie nun technisch möglich) nicht zwingend notwendig ist, sondern eine Entfernung der Hauptantikörperbildner (z. B. mittels Rituximab, sofern CD20-exprimierend) ausreichend sein könnte. §§§§§ Die verbliebenen Antikörperbildner könnten möglicherweise durch adjuvante Immunsuppression, IL-2-Gabe und/oder eine Wiederherstellung der körpereigenen Toleranzmechanismen kontrolliert werden (z. B. durch die beobachtete Reduktion der Zahlen Dsg3-spezifischer T-Zellen und die Zunahme regulatorischer B-Zellen nach Rituximabgabe) (167-169). Diese Überlegungen zur notwendigen und optimalen Therapietiefe und zur Identifizierung eines weiter optimierten Behandlungsprotokolls (z. B. IL-2 plus Rituximab) könnten durch proteomische Studien (mit begleitenden NGS-Analysen des genetischen Antikörperrepertoires, wie hier dargestellt und etabliert) vor und nach Rituximab-Gabe in Pemphiguspatienten systematisch untersucht werden.

Ausblick

Die genetische Technik des Phagen-Displays (APD) ist in keiner Weise veraltet und weiterhin unerlässlich zur effizienten Generierung monoklonaler Antikörper, sowohl für grundlagenwissenschaftliche Fragestellungen, als auch für eine translational-therapeutische Verwendung (81, 101). In dieser Dissertationsschrift hat die LC-MS/MS-gestützte Methodik bzgl. der möglichst breiten Identifizierung antigenspezifischer Klone bessere Resultate als die (hier nicht systematisch optimierte) APD-Technologie erbracht; die hier vorgestellten LCS-APD-Ergebnisse (**Panel 9**) illustrieren jedoch die hohe Relevanz dieser effektiven, genetischen Methode, welche im Zusammenspiel mit proteomischen Methoden zur vollen Ausprägung kommt. Hinsichtlich des in dieser Dissertation angewendeten APD-Protokolls dürfte gelten, dass bei methodisch optimierter

§§§§§ Bei zunehmender Vorerkrankungsdauer ist von einer zunehmenden Therapieresistenz auszugehen, da die autoreaktiven CD20+ B-Zellen im Verlauf wahrscheinlich zu Plasmazellen reifen, welche das CD20-Oberflächenmolekül nicht mehr exprimieren. Für diese Fälle ist eine CAAR-T-Zell-Therapie wahrscheinlich die optimale Therapieform (164. Lunardon L, Tsai KJ, Propert KJ, Fett N, Stanley JR, Werth VP, et al. Adjuvant rituximab therapy of pemphigus: a single-center experience with 31 patients. Archives of dermatology. 2012 Sep;148(9):1031-6. PubMed PMID: 22710375. Pubmed Central PMCID: 3658473.).

Durchführung an den zuvor diskutierten und oben in **Tabelle 2** dargestellten Stellen sehr wahrscheinlich eine signifikant bessere Übereinstimmung der Daten zu zirkulierenden Serumantikörpern und rein genetisch klonierten Antikörper erzielt werden kann. Auf älteren Protokollen basierend machen sich neueste Protokolle zur genetischen Klonierung von Antikörpern eine technisch anspruchsvolle Einzelzellkompartimentalisierung isolierter Lymphozyten mittels Mikrofluidik und nachfolgender Einzelzell-PCR (innerhalb sogenannter Microdroplets) zunutze, um physiologisch gepaarte $V_H:V_L$ -cDNAs zu erhalten, welche in den weiteren Standardschritten des APD-Protokolls *en masse* in den entsprechenden Expressionsvektor inkloniert werden können (125). In Kombination mit verfeinerten Protokollen der Hochdurchsatzsequenzierung (Next-Generation Sequencing, NGS), welche ebenfalls die physiologische $V_H:V_L$ -cDNA-Paarung von Antikörpern erhalten können, und proteomischer Analyse der korrespondierenden, affinitätsaufgereinigten Serumantikörper lassen sich so, in Theorie, antigenspezifische, monoklonale Antikörper in physiologischer Paarung zu jeder Erkrankung bzw. jeder humoral vermittelten Immunantwort herstellen (142, 170), und dies in kürzester Zeit. Die Etablierung einer solchen Pipeline ist technisch anspruchsvoll und bedarf signifikanter Investitionen in Infrastruktur und die entsprechende personelle Ausstattung; vor dem Hintergrund des großen medizinisch-therapeutischen Potentials spezifischer, monoklonaler Antikörper (z. B. zur Therapie pandemischer Infektionserkrankungen wie Ebola) sind diese Kosten jedoch relativ.

Die Massenspektrometrie hat im letzten Jahrzehnt eine sehr beeindruckende Entwicklung vollzogen, die auch einer deutlichen (und weiter anhaltenden, kontinuierlichen) Verbesserung der Sensitivität der verwendeten Geräte und der bioinformatischen Datenanalyse geschuldet ist (144); die so möglich gewordene, zuverlässige Identifizierung und Quantifizierung jeglichen Bestandteils eines Proteoms ist von herausragender Bedeutung sowohl für eine mechanistische, hypothesenbasierte Forschung als auch für globale „Omics“-Studien (144). Massenspektrometrie erlaubt die Untersuchung posttranslatiöner Modifikationen und Signaltransduktionswege (Phosphoproteomics), von Interaktionen zwischen Proteinen, und sogar struktureller Aspekte von Proteinen (z. B. Epitopstudien über Hydrogen-Deuterium Exchange (HX)-

Massenspektrometrie; (171)). Für den Bereich der dermatologischen Autoimmunerkrankungen besonders interessant dürfte die Identifizierung neuer Autoantigene mittels Massenspektrometrie sein, z. B. nach Histoimmunpräzipitation des putativen, neuen Autoantigens mittels der Patientenautoantikörper aus Gewebsschnitten (147). So ist das Zielantigen im klinisch recht häufig anzutreffenden anti-p200-Pemphigoid weiterhin nicht identifiziert worden (172, 173), und es finden sich im klinischen Alltag immer wieder hautoerkrankte Patienten mit nachweisbar gewebsgebundenen Autoantikörpern, die sich jedoch in keinem der bislang etablierten serologischen Test fassen lassen (74).

Der Promovend hatte im Rahmen dieser Dissertationsschrift die Gelegenheit, erstmals genetische und proteomische Methoden nebeneinander für die Gruppe der Pemphiguserkrankungen nutzen zu können, mit dem unerwarteten Ergebnis einer deutlich polyklonalen Autoimmunantwort als bisher angenommen. Die hier vorgestellten Arbeiten sollen und können nur einen Beginn weiterer Arbeiten in diesem Bereich darstellen, und es ist zu vermuten, dass im Gebiet der Pemphigoiderkrankungen ähnliche, pathophysiologisch relevante Befunde zu stellen sind. Diesen Fragen widmet sich der Promovend nach Abschluss der vorliegenden Promotion, erste (unveröffentlichte) Daten zum Antikörperrepertoire mehrerer Patienten mit bullösem Pemphigoid liegen bereits vor. Ebenso soll in zukünftigen Arbeiten des Promovenden versucht werden, eine absolute Quantifizierung monoklonaler, Anti-Dsg3-Autoantikörper im Patientenserum zu erreichen, da es hierzu bislang keinerlei publizierte Daten gibt und solche Daten durchaus von Bedeutung für dieses Patientenkollektiv sind, z. B. zur optimalen Konzipierung der Bindungskapazität Dsg3-spezifischer Absorber (174). Als letztes Beispiel zum Potential massenspektrometrischer Untersuchungen in der Autoimmundermatologie soll die Verwendung von phosphoproteomischen Methoden zur Entschlüsselung bislang nicht im Detail verstandener Signaltransduktionswege im bullösen Pemphigoid Erwähnung finden; Ergebnisse aus diesen grundlagenwissenschaftlichen Studien könnten nach dem Prinzip „from bench to bedside“ in gänzlich neuen Therapieprinzipien münden, welche potenziell deutlich besser verträglich sind und weniger

Nebenwirkungen für die zumeist alten und oft multimorbiden Patienten erwarten lassen.

Literaturverzeichnis

1. Murphy KM, Weaver C, Mowat A, Janeway C. Janeway's immunobiology. 9th edition ed2017. 904 pp p.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL, Baker A. Cellular and molecular immunology. Ninth edition ed2018. 565 pp p.
3. Hammers CM. Im aktiven Mausmodell der Epidermolysis bullosa acquisita sind lymphonodale IFN-gamma-Genexpression und der MHC-Haplotyp H2s assoziiert mit der Ausbildung pathogener, komplementfixierender Autoantikörper: Universität zu Lübeck; 2011.
4. Prussmann W, Prussmann J, Koga H, Recke A, Iwata H, Juhl D, et al. Prevalence of pemphigus and pemphigoid autoantibodies in the general population. Orphanet journal of rare diseases. 2015 May 15;10:63. PubMed PMID: 25971981. Pubmed Central PMCID: 4436865.
5. Prussmann J, Prussmann W, Recke A, Rentzsch K, Juhl D, Henschler R, et al. Co-occurrence of autoantibodies in healthy blood donors. Experimental dermatology. 2014 Jul;23(7):519-21. PubMed PMID: 24816528.
6. Peters AL, Stunz LL, Bishop GA. CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator. Seminars in immunology. 2009 Oct;21(5):293-300. PubMed PMID: 19595612. Pubmed Central PMCID: 2753170.
7. Adams AB, Ford ML, Larsen CP. Costimulation Blockade in Autoimmunity and Transplantation: The CD28 Pathway. Journal of immunology. 2016 Sep 15;197(6):2045-50. PubMed PMID: 27591335. Pubmed Central PMCID: 5370073.
8. Manjarrez-Orduno N, Quach TD, Sanz I. B cells and immunological tolerance. The Journal of investigative dermatology. 2009 Feb;129(2):278-88. PubMed PMID: 19148217. Pubmed Central PMCID: 2728045.
9. Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. Immunity. 2000 Dec;13(6):829-40. PubMed PMID: 11163198.
10. Quach TD, Rodriguez-Zhurbenko N, Hopkins TJ, Guo X, Hernandez AM, Li W, et al. Distinctions among Circulating Antibody-Secreting Cell Populations, Including B-1 Cells, in Human Adult Peripheral Blood. Journal of immunology. 2016 Feb 1;196(3):1060-9. PubMed PMID: 26740107. Pubmed Central PMCID: 5351554.
11. Theofilopoulos AN, Kono DH, Baccala R. The multiple pathways to autoimmunity. Nature immunology. 2017 Jun 20;18(7):716-24. PubMed PMID: 28632714. Pubmed Central PMCID: 5791156.
12. Jour G, Glitza IC, Ellis RM, Torres-Cabala CA, Tetzlaff MT, Li JY, et al. Autoimmune dermatologic toxicities from immune checkpoint blockade with anti-PD-1 antibody therapy: a report on bullous skin eruptions. Journal of cutaneous pathology. 2016 Aug;43(8):688-96. PubMed PMID: 27086658.
13. Kahler KC, Hassel JC, Heinzerling L, Loquai C, Mossner R, Ugurel S, et al. Management of side effects of immune checkpoint blockade by anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies in metastatic melanoma. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG. 2016 Jul;14(7):662-81. PubMed PMID: 27373241.

14. Qian Y, Jeong JS, Abdeladhim M, Valenzuela JG, Aoki V, Hans-Filho G, et al. IgE anti-LJM11 sand fly salivary antigen may herald the onset of fogo selvagem in endemic Brazilian regions. *The Journal of investigative dermatology*. 2015 Mar;135(3):913-5. PubMed PMID: 25285921. Pubmed Central PMCID: 4323842.
15. Cho MJ, Ellebrecht CT, Hammers CM, Mukherjee EM, Sapparapu G, Boudreaux CE, et al. Determinants of VH1-46 Cross-Reactivity to Pemphigus Vulgaris Autoantigen Desmoglein 3 and Rotavirus Antigen VP6. *Journal of immunology*. 2016 Aug 15;197(4):1065-73. PubMed PMID: 27402694. Pubmed Central PMCID: 4976025.
16. Hammers CM, Chen J, Lin C, Kacir S, Siegel DL, Payne AS, et al. Persistence of anti-desmoglein 3 IgG(+) B-cell clones in pemphigus patients over years. *The Journal of investigative dermatology*. 2015 Mar;135(3):742-9. PubMed PMID: 25142730. Pubmed Central PMCID: 4294994.
17. Semkova K, Black M. Pemphigoid gestationis: current insights into pathogenesis and treatment. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2009 Aug;145(2):138-44. PubMed PMID: 19520487.
18. Greiling TM, Dehner C, Chen X, Hughes K, Iniguez AJ, Boccitto M, et al. Commensal orthologs of the human autoantigen Ro60 as triggers of autoimmunity in lupus. *Science translational medicine*. 2018 Mar 28;10(434). PubMed PMID: 29593104. Pubmed Central PMCID: 5918293.
19. Maurer MA, Rakocevic G, Leung CS, Quast I, Lukacisin M, Goebels N, et al. Rituximab induces sustained reduction of pathogenic B cells in patients with peripheral nervous system autoimmunity. *The Journal of clinical investigation*. 2012 Apr;122(4):1393-402. PubMed PMID: 22426210. Pubmed Central PMCID: 3314454.
20. Soltys J, Liu Y, Ritchie A, Wemlinger S, Schaller K, Schumann H, et al. Membrane assembly of aquaporin-4 autoantibodies regulates classical complement activation in neuromyelitis optica. *The Journal of clinical investigation*. 2019 Apr 8;130. PubMed PMID: 30958797.
21. Hammers CM, Stanley JR. Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. *Annual review of pathology*. 2016 May 23;11:175-97. PubMed PMID: 26907530. Pubmed Central PMCID: 5560122.
22. Mastroianni-Kirsztajn G, Hornig N, Schlumberger W. Autoantibodies in renal diseases - clinical significance and recent developments in serological detection. *Frontiers in immunology*. 2015;6:221. PubMed PMID: 26029207. Pubmed Central PMCID: 4426760.
23. Hammers CM, Schmidt E, Zillikens D. [Autoimmune blistering skin diseases: diagnostic and therapeutic approach]. *Deutsche medizinische Wochenschrift*. 2014 Jul;139(28-29):1473-7. PubMed PMID: 24983196. Blasenbildende Autoimmunerkrankungen der Haut--diagnostische und therapeutische Aspekte.
24. Ellebrecht CT, Mukherjee EM, Zheng Q, Choi EJ, Reddy SG, Mao X, et al. Autoreactive IgG and IgA B Cells Evolve through Distinct Subclass Switch Pathways in the Autoimmune Disease Pemphigus Vulgaris. *Cell reports*. 2018 Aug 28;24(9):2370-80. PubMed PMID: 30157430. Pubmed Central PMCID: 6156788.
25. Frampton G, Jayne DR, Perry GJ, Lockwood CM, Cameron JS. Autoantibodies to endothelial cells and neutrophil cytoplasmic antigens in

- systemic vasculitis. *Clinical and experimental immunology*. 1990 Nov;82(2):227-32. PubMed PMID: 2242605. Pubmed Central PMCID: 1535114.
26. Yang YH, Chang CJ, Chuang YH, Hsu HY, Yu HH, Lee JH, et al. Identification and characterization of IgA antibodies against beta2-glycoprotein I in childhood Henoch-Schonlein purpura. *The British journal of dermatology*. 2012 Oct;167(4):874-81. PubMed PMID: 22632612.
27. Sanjuan MA, Sagar D, Kolbeck R. Role of IgE in autoimmunity. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2016 Jun;137(6):1651-61. PubMed PMID: 27264000.
28. He Y, Shimoda M, Ono Y, Villalobos IB, Mitra A, Konia T, et al. Persistence of Autoreactive IgA-Secreting B Cells Despite Multiple Immunosuppressive Medications Including Rituximab. *JAMA dermatology*. 2015 Jun;151(6):646-50. PubMed PMID: 25901938.
29. Yuan H, Zhou S, Liu Z, Cong W, Fei X, Zeng W, et al. Pivotal Role of Lesional and Perilesional T/B Lymphocytes in Pemphigus Pathogenesis. *The Journal of investigative dermatology*. 2017 Nov;137(11):2362-70. PubMed PMID: 28647348.
30. Schmidt E, Zillikens D. The diagnosis and treatment of autoimmune blistering skin diseases. *Deutsches Arzteblatt international*. 2011 Jun;108(23):399-405, I-III. PubMed PMID: 21712975. Pubmed Central PMCID: 3123771.
31. Hubner F, Recke A, Zillikens D, Linder R, Schmidt E. Prevalence and Age Distribution of Pemphigus and Pemphigoid Diseases in Germany. *The Journal of investigative dermatology*. 2016 Dec;136(12):2495-8. PubMed PMID: 27456755.
32. Plaquevent M, Tetart F, Fardet L, Ingen-Housz-Oro S, Valeyrie-Allanore L, Bernard P, et al. Higher Frequency of Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Intake in Bullous Pemphigoid Patients than in the French General Population. *The Journal of investigative dermatology*. 2019 Apr;139(4):835-41. PubMed PMID: 30543900.
33. Schmidt E, Zillikens D. Pemphigoid diseases. *Lancet*. 2013 Jan 26;381(9863):320-32. PubMed PMID: 23237497.
34. Schulze F, Kasperkiewicz M, Zillikens D, Schmidt E. [Bullous pemphigoid]. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*. 2013 Dec;64(12):931-43; quiz 44-5. PubMed PMID: 24337308. Bulloses Pemphigoid.
35. Kirtschig G, Middleton P, Bennett C, Murrell DF, Wojnarowska F, Khumalo NP. Interventions for bullous pemphigoid. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2010 Oct 6(10):CD002292. PubMed PMID: 20927731.
36. Martin LK, Werth V, Villanueva E, Segall J, Murrell DF. Interventions for pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2009 Jan 21(1):CD006263. PubMed PMID: 19160272.
37. Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, Takahashi H, Yamagami J, Zillikens D, Payne AS, et al. Pemphigus. *Nature reviews Disease primers*. 2017 May 11;3:17026. PubMed PMID: 28492232. Pubmed Central PMCID: 5901732.
38. van Beek N, Zillikens D, Schmidt E. [Therapy of pemphigus]. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*. 2019 Apr;70(4):243-53. PubMed PMID: 30887081. Aktuelle Therapie des Pemphigus.
39. Koulu L, Kusumi A, Steinberg MS, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Human autoantibodies against a desmosomal core protein in pemphigus foliaceus. *The*

Journal of experimental medicine. 1984 Nov 1;160(5):1509-18. PubMed PMID: 6491602. Pubmed Central PMCID: 2187488.

40. Stanley JR, Koulu L, Klaus-Kovtun V, Steinberg MS. A monoclonal antibody to the desmosomal glycoprotein desmoglein I binds the same polypeptide as human autoantibodies in pemphigus foliaceus. *Journal of immunology*. 1986 Feb 15;136(4):1227-30. PubMed PMID: 3511144.

41. Korman NJ, Eyre RW, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Demonstration of an adhering-junction molecule (plakoglobin) in the autoantigens of pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris. *The New England journal of medicine*. 1989 Sep 7;321(10):631-5. PubMed PMID: 2770792.

42. Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell*. 1991 Nov 29;67(5):869-77. PubMed PMID: 1720352.

43. Amagai M, Karpati S, Prussick R, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *The Journal of clinical investigation*. 1992 Sep;90(3):919-26. PubMed PMID: 1522242. Pubmed Central PMCID: 329947.

44. Kowalczyk AP, Anderson JE, Borgwardt JE, Hashimoto T, Stanley JR, Green KJ. Pemphigus sera recognize conformationally sensitive epitopes in the amino-terminal region of desmoglein-1. *The Journal of investigative dermatology*. 1995 Aug;105(2):147-52. PubMed PMID: 7543545.

45. Koch PJ, Mahoney MG, Ishikawa H, Pulkkinen L, Uitto J, Shultz L, et al. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *The Journal of cell biology*. 1997 Jun 2;137(5):1091-102. PubMed PMID: 9166409. Pubmed Central PMCID: 2136216.

46. Amagai M, Matsuyoshi N, Wang ZH, Andl C, Stanley JR. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nature medicine*. 2000 Nov;6(11):1275-7. PubMed PMID: 11062541.

47. Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Diaz LA. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *The New England journal of medicine*. 1982 May 20;306(20):1189-96. PubMed PMID: 7040962.

48. Roscoe JT, Diaz L, Sampaio SA, Castro RM, Labib RS, Takahashi Y, et al. Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pathogenic to BALB/c mice by passive transfer. *The Journal of investigative dermatology*. 1985 Dec;85(6):538-41. PubMed PMID: 3905977.

49. Rock B, Martins CR, Theofilopoulos AN, Balderas RS, Anhalt GJ, Labib RS, et al. The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *The New England journal of medicine*. 1989 Jun 1;320(22):1463-9. PubMed PMID: 2654636.

50. Ding X, Aoki V, Mascaro JM, Jr., Lopez-Swidorski A, Diaz LA, Fairley JA. Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles. *The Journal of investigative dermatology*. 1997 Oct;109(4):592-6. PubMed PMID: 9326396.

51. Amagai M, Tsunoda K, Zillikens D, Nagai T, Nishikawa T. The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile.

- Journal of the American Academy of Dermatology. 1999 Feb;40(2 Pt 1):167-70. PubMed PMID: 10025740.
52. Heupel WM, Zillikens D, Drenckhahn D, Waschke J. Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *Journal of immunology*. 2008 Aug 1;181(3):1825-34. PubMed PMID: 18641320.
53. Saito M, Stahley SN, Caughman CY, Mao X, Tucker DK, Payne AS, et al. Signaling dependent and independent mechanisms in pemphigus vulgaris blister formation. *PloS one*. 2012;7(12):e50696. PubMed PMID: 23226536. Pubmed Central PMCID: 3513318.
54. Di Zenzo G, Di Lullo G, Corti D, Calabresi V, Sinistro A, Vanzetta F, et al. Pemphigus autoantibodies generated through somatic mutations target the desmoglein-3 cis-interface. *The Journal of clinical investigation*. 2012 Oct;122(10):3781-90. PubMed PMID: 22996451. Pubmed Central PMCID: 3461925.
55. Ishii K, Lin C, Siegel DL, Stanley JR. Isolation of pathogenic monoclonal anti-desmoglein 1 human antibodies by phage display of pemphigus foliaceus autoantibodies. *The Journal of investigative dermatology*. 2008 Apr;128(4):939-48. PubMed PMID: 18007588. Pubmed Central PMCID: 2597791.
56. Payne AS, Ishii K, Kacir S, Lin C, Li H, Hanakawa Y, et al. Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display. *The Journal of clinical investigation*. 2005 Apr;115(4):888-99. PubMed PMID: 15841178. Pubmed Central PMCID: 1070425.
57. Yamagami J, Payne AS, Kacir S, Ishii K, Siegel DL, Stanley JR. Homologous regions of autoantibody heavy chain complementarity-determining region 3 (H-CDR3) in patients with pemphigus cause pathogenicity. *The Journal of clinical investigation*. 2010 Nov;120(11):4111-7. PubMed PMID: 20978359. Pubmed Central PMCID: 2964997.
58. Funakoshi T, Lunardon L, Ellebrecht CT, Nagler AR, O'Leary CE, Payne AS. Enrichment of total serum IgG4 in patients with pemphigus. *The British journal of dermatology*. 2012 Dec;167(6):1245-53. PubMed PMID: 22803659. Pubmed Central PMCID: 3601918.
59. Koneczny I. A New Classification System for IgG4 Autoantibodies. *Frontiers in immunology*. 2018;9:97. PubMed PMID: 29483905. Pubmed Central PMCID: 5816565.
60. Sekiguchi M, Futei Y, Fujii Y, Iwasaki T, Nishikawa T, Amagai M. Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. *Journal of immunology*. 2001 Nov 1;167(9):5439-48. PubMed PMID: 11673563.
61. Eyre RW, Stanley JR. Human autoantibodies against a desmosomal protein complex with a calcium-sensitive epitope are characteristic of pemphigus foliaceus patients. *The Journal of experimental medicine*. 1987 Jun 1;165(6):1719-24. PubMed PMID: 2438368. Pubmed Central PMCID: 2188354.
62. Kamiya K, Aoyama Y, Shirafuji Y, Hamada T, Morizane S, Fujii K, et al. A higher correlation of the antibody activities against the calcium-dependent epitopes of desmoglein 3 quantified by ethylenediaminetetraacetic acid-treated enzyme-linked immunosorbent assay with clinical disease activities of pemphigus vulgaris. *Journal of dermatological science*. 2013 Jun;70(3):190-5. PubMed PMID: 23602628.

63. Ludwig RJ, Vanhoorelbeke K, Leypoldt F, Kaya Z, Bieber K, McLachlan SM, et al. Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology. *Frontiers in immunology*. 2017;8:603. PubMed PMID: 28620373. Pubmed Central PMCID: 5449453.
64. Dainichi T, Chow Z, Kabashima K. IgG4, complement, and the mechanisms of blister formation in pemphigus and bullous pemphigoid. *Journal of dermatological science*. 2017 Dec;88(3):265-70. PubMed PMID: 28747266.
65. Lessey E, Li N, Diaz L, Liu Z. Complement and cutaneous autoimmune blistering diseases. *Immunologic research*. 2008;41(3):223-32. PubMed PMID: 18641925.
66. Lapiere JC, Guitart J, Ettl DA, Chen DM, Amagai M, Chan LS. Preferential activation of the complement system in the lower epidermis of patients with pemphigus vulgaris. *The British journal of dermatology*. 1998 Nov;139(5):851-4. PubMed PMID: 9892953.
67. Harrison OJ, Brasch J, Lasso G, Katsamba PS, Ahlsen G, Honig B, et al. Structural basis of adhesive binding by desmocollins and desmogleins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016 Jun 28;113(26):7160-5. PubMed PMID: 27298358. Pubmed Central PMCID: 4932976.
68. Mao X, Nagler AR, Farber SA, Choi EJ, Jackson LH, Leiferman KM, et al. Autoimmunity to desmocollin 3 in pemphigus vulgaris. *The American journal of pathology*. 2010 Dec;177(6):2724-30. PubMed PMID: 20952584. Pubmed Central PMCID: 2993297.
69. Kozłowska A, Hashimoto T, Jarzabek-Chorzelska M, Amagai A, Nagata Y, Strasz Z, et al. Pemphigus herpetiformis with IgA and IgG antibodies to desmoglein 1 and IgG antibodies to desmocollin 3. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2003 Jan;48(1):117-22. PubMed PMID: 12522381.
70. Rafei D, Muller R, Ishii N, Llamazares M, Hashimoto T, Hertl M, et al. IgG autoantibodies against desmocollin 3 in pemphigus sera induce loss of keratinocyte adhesion. *The American journal of pathology*. 2011 Feb;178(2):718-23. PubMed PMID: 21281804. Pubmed Central PMCID: 3069870.
71. Flores G, Culton DA, Prisayanh P, Qaqish BF, James K, Maldonado M, et al. IgG autoantibody response against keratinocyte cadherins in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *The Journal of investigative dermatology*. 2012 Nov;132(11):2573-80. PubMed PMID: 22810308. Pubmed Central PMCID: 3710730.
72. Hisamatsu Y, Amagai M, Garrod DR, Kanzaki T, Hashimoto T. The detection of IgG and IgA autoantibodies to desmocollins 1-3 by enzyme-linked immunosorbent assays using baculovirus-expressed proteins, in atypical pemphigus but not in typical pemphigus. *The British journal of dermatology*. 2004 Jul;151(1):73-83. PubMed PMID: 15270874.
73. Evangelista F, Dasher DA, Diaz LA, Prisayanh PS, Li N. E-cadherin is an additional immunological target for pemphigus autoantibodies. *The Journal of investigative dermatology*. 2008 Jul;128(7):1710-8. PubMed PMID: 18219275.
74. Hammers CM, Tang HY, Chen J, Emtenani S, Zheng Q, Stanley JR. Research Techniques Made Simple: Mass Spectrometry for Analysis of Proteins in Dermatological Research. *The Journal of investigative dermatology*. 2018 Jun;138(6):1236-42. PubMed PMID: 29793618.

75. Saada R, Weinberger M, Shahaf G, Mehr R. Models for antigen receptor gene rearrangement: CDR3 length. *Immunology and cell biology*. 2007 Jun;85(4):323-32. PubMed PMID: 17404591.
76. Barrios Y, Jirholt P, Ohlin M. Length of the antibody heavy chain complementarity determining region 3 as a specificity-determining factor. *Journal of molecular recognition : JMR*. 2004 Jul-Aug;17(4):332-8. PubMed PMID: 15227640.
77. Crouzier R, Martin T, Pasquali JL. Heavy chain variable region, light chain variable region, and heavy chain CDR3 influences on the mono- and polyreactivity and on the affinity of human monoclonal rheumatoid factors. *Journal of immunology*. 1995 May 1;154(9):4526-35. PubMed PMID: 7722307.
78. Sidhu SS, Li B, Chen Y, Fellouse FA, Eigenbrot C, Fuh G. Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions. *Journal of molecular biology*. 2004 Apr 23;338(2):299-310. PubMed PMID: 15066433.
79. Su CT, Ling WL, Lua WH, Poh JJ, Gan SK. The role of Antibody V kappa Framework 3 region towards Antigen binding: Effects on recombinant production and Protein L binding. *Scientific reports*. 2017 Jun 19;7(1):3766. PubMed PMID: 28630463. Pubmed Central PMCID: 5476676.
80. Nixon AE, Sexton DJ, Ladner RC. Drugs derived from phage display: from candidate identification to clinical practice. *mAbs*. 2014 Jan-Feb;6(1):73-85. PubMed PMID: 24262785. Pubmed Central PMCID: 3929457.
81. Press release: The Nobel Prize in Chemistry 2018 2018. Available from: <http://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/press-release/> ; last accessed April 11, 2019, 11:42 AM.
82. Feng M, Bian H, Wu X, Fu T, Fu Y, Hong J, et al. Construction and next-generation sequencing analysis of a large phage-displayed VNAR single-domain antibody library from six naive nurse sharks. *Antibody therapeutics*. 2019 Jan;2(1):1-11. PubMed PMID: 30627698. Pubmed Central PMCID: 6312525.
83. Shriver-Lake LC, Liu JL, Zabetakis D, Sugiharto VA, Lee CR, Defang GN, et al. Selection and Characterization of Anti-Dengue NS1 Single Domain Antibodies. *Scientific reports*. 2018 Dec 27;8(1):18086. PubMed PMID: 30591706. Pubmed Central PMCID: 6308234.
84. Liu JL, Shriver-Lake LC, Zabetakis D, Anderson GP, Goldman ER. Selection and characterization of protective anti-chikungunya virus single domain antibodies. *Molecular immunology*. 2019 Jan;105:190-7. PubMed PMID: 30550981.
85. Bever CS, Dong JX, Vasylieva N, Barnych B, Cui Y, Xu ZL, et al. VHH antibodies: emerging reagents for the analysis of environmental chemicals. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2016 Sep;408(22):5985-6002. PubMed PMID: 27209591. Pubmed Central PMCID: 4983233.
86. Hammers CM, Stanley JR. Antibody phage display: technique and applications. *The Journal of investigative dermatology*. 2014 Feb;134(2):1-5. PubMed PMID: 24424458. Pubmed Central PMCID: 3951127.
87. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975 Aug 7;256(5517):495-7. PubMed PMID: 1172191.
88. Leavy O. Milestone 9 - The birth of monoclonal antibodies [[Accessed 2019-04-11]. Available from:

89. Little M, Kipriyanov SM, Le Gall F, Moldenhauer G. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunology today*. 2000 Aug;21(8):364-70. PubMed PMID: 10916138.
90. Fraussen J, Vrolix K, Martinez-Martinez P, Losen M, Meulemans E, De Baets MH, et al. A novel method for making human monoclonal antibodies. *Journal of autoimmunity*. 2010 Sep;35(2):130-4. PubMed PMID: 20732843.
91. Qian Y, Clarke SH, Aoki V, Hans-Filho G, Rivitti EA, Diaz LA. Antigen selection of anti-DSG1 autoantibodies during and before the onset of endemic pemphigus foliaceus. *The Journal of investigative dermatology*. 2009 Dec;129(12):2823-34. PubMed PMID: 19571823. Pubmed Central PMCID: 2847628.
92. Kwakkenbos MJ, Diehl SA, Yasuda E, Bakker AQ, van Geelen CM, Lukens MV, et al. Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. *Nature medicine*. 2010 Jan;16(1):123-8. PubMed PMID: 20023635. Pubmed Central PMCID: 2861345.
93. Zhang G, Liu J, Fan W, Chen Q, Shi B. An Efficient Transient Expression System for Enhancing the Generation of Monoclonal Antibodies in 293 Suspension Cells. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2017;18(4):351-7. PubMed PMID: 28322160.
94. Yeh SW, Cavacini LA, Bhol KC, Lin MS, Kumar M, Duval M, et al. Pathogenic human monoclonal antibody against desmoglein 3. *Clinical immunology*. 2006 Jul;120(1):68-75. PubMed PMID: 16635589.
95. Baker M. Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. *Nature*. 2015 May 21;521(7552):274-6. PubMed PMID: 25993940.
96. Lo AS, Mao X, Mukherjee EM, Ellebrecht CT, Yu X, Posner MR, et al. Pathogenicity and Epitope Characteristics Do Not Differ in IgG Subclass-Switched Anti-Desmoglein 3 IgG1 and IgG4 Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. *PLoS one*. 2016;11(6):e0156800. PubMed PMID: 27304671. Pubmed Central PMCID: 4909199.
97. Cho MJ, Lo AS, Mao X, Nagler AR, Ellebrecht CT, Mukherjee EM, et al. Shared VH1-46 gene usage by pemphigus vulgaris autoantibodies indicates common humoral immune responses among patients. *Nature communications*. 2014 Jun 19;5:4167. PubMed PMID: 24942562. Pubmed Central PMCID: 4120239.
98. Ellebrecht CT, Bhoj VG, Nace A, Choi EJ, Mao X, Cho MJ, et al. Reengineering chimeric antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease. *Science*. 2016 Jul 8;353(6295):179-84. PubMed PMID: 27365313. Pubmed Central PMCID: 5343513.
99. Mao X, Li H, Sano Y, Gaestel M, Mo Park J, Payne AS. MAPKAP kinase 2 (MK2)-dependent and -independent models of blister formation in pemphigus vulgaris. *The Journal of investigative dermatology*. 2014 Jan;134(1):68-76. PubMed PMID: 23657501. Pubmed Central PMCID: 3786199.
100. Yoshida K, Ishii K, Shimizu A, Yokouchi M, Amagai M, Shiraishi K, et al. Non-pathogenic pemphigus foliaceus (PF) IgG acts synergistically with a directly pathogenic PF IgG to increase blistering by p38MAPK-dependent desmoglein 1 clustering. *Journal of dermatological science*. 2017 Mar;85(3):197-207. PubMed PMID: 28024684. Pubmed Central PMCID: 5510496.

101. Kouno M, Lin C, Schechter NM, Siegel D, Yang X, Seykora JT, et al. Targeted delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand to keratinocytes with a pemphigus mAb. *The Journal of investigative dermatology*. 2013 Sep;133(9):2212-20. PubMed PMID: 23439393. Pubmed Central PMCID: 3681880.
102. Mao X, Sano Y, Park JM, Payne AS. p38 MAPK activation is downstream of the loss of intercellular adhesion in pemphigus vulgaris. *The Journal of biological chemistry*. 2011 Jan 14;286(2):1283-91. PubMed PMID: 21078676. Pubmed Central PMCID: 3020736.
103. Wine Y, Horton AP, Ippolito GC, Georgiou G. Serology in the 21st century: the molecular-level analysis of the serum antibody repertoire. *Current opinion in immunology*. 2015 Aug;35:89-97. PubMed PMID: 26172290. Pubmed Central PMCID: 4553097.
104. Tipton CM, Fucile CF, Darce J, Chida A, Ichikawa T, Gregoretto I, et al. Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus. *Nature immunology*. 2015 Jul;16(7):755-65. PubMed PMID: 26006014. Pubmed Central PMCID: 4512288.
105. Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, Gholami AM, Lieberenz M, Savitski MM, et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature*. 2014 May 29;509(7502):582-7. PubMed PMID: 24870543.
106. Brown TA. *Genomes 3*. [3rd ed. Oxford: Bios Scientific Publishers; 2006. 713 S. p.
107. Ghazalpour A, Bennett B, Petyuk VA, Orozco L, Hagopian R, Mungrue IN, et al. Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. *PLoS genetics*. 2011 Jun;7(6):e1001393. PubMed PMID: 21695224. Pubmed Central PMCID: 3111477.
108. Schwanhausser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, et al. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. 2011 May 19;473(7347):337-42. PubMed PMID: 21593866.
109. Wang D, Eraslan B, Wieland T, Hallstrom B, Hopf T, Zolg DP, et al. A deep proteome and transcriptome abundance atlas of 29 healthy human tissues. *Molecular systems biology*. 2019 Feb 18;15(2):e8503. PubMed PMID: 30777892. Pubmed Central PMCID: 6379049.
110. Edfors F, Danielsson F, Hallstrom BM, Kall L, Lundberg E, Ponten F, et al. Gene-specific correlation of RNA and protein levels in human cells and tissues. *Molecular systems biology*. 2016 Oct 20;12(10):883. PubMed PMID: 27951527. Pubmed Central PMCID: 5081484.
111. Chen J, Zheng Q, Hammers CM, Ellebrecht CT, Mukherjee EM, Tang HY, et al. Proteomic Analysis of Pemphigus Autoantibodies Indicates a Larger, More Diverse, and More Dynamic Repertoire than Determined by B Cell Genetics. *Cell reports*. 2017 Jan 3;18(1):237-47. PubMed PMID: 28052253. Pubmed Central PMCID: 5221611.
112. Lavinder JJ, Wine Y, Giesecke C, Ippolito GC, Horton AP, Lungu OI, et al. Identification and characterization of the constituent human serum antibodies elicited by vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014 Feb 11;111(6):2259-64. PubMed PMID: 24469811. Pubmed Central PMCID: 3926051.
113. Wine Y, Boutz DR, Lavinder JJ, Miklos AE, Hughes RA, Hoi KH, et al. Molecular deconvolution of the monoclonal antibodies that comprise the

- polyclonal serum response. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013 Feb 19;110(8):2993-8. PubMed PMID: 23382245. Pubmed Central PMCID: 3581903.
114. Lottspeich F. Bioanalytik. 3., [aktualisierte und erweiterte] Aufl. ed. Heidelberg: Springer; 2012. 1201 S. p.
115. Barbas CF. Phage display a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 1 Vol. in various pagings p.
116. Alamyar E, Duroux P, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT((R)) tools for the nucleotide analysis of immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) V-(D)-J repertoires, polymorphisms, and IG mutations: IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST for NGS. Methods in molecular biology. 2012;882:569-604. PubMed PMID: 22665256.
117. IMGT/V-QUEST [[last accessed 2019-04-12]. Available from: http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest.
118. vbase2 [[last accessed 2019-04-12]. Available from: <http://www.vbase2.org/>.
119. Emtenani S, Yuan H, Lin C, Pan M, Hundt JE, Schmidt E, et al. Normal human skin is superior to monkey oesophagus substrate for detection of circulating BP180-NC16A-specific IgG antibodies in bullous pemphigoid. The British journal of dermatology. 2018 Oct 13. PubMed PMID: 30315657. Pubmed Central PMCID: 6462259.
120. Langenhan J. Development of Specific Immunoabsorbers for the Treatment of Human Pemphigus Diseases: Universität zu Lübeck; 2012.
121. Sadygov RG, Cociorva D, Yates JR, 3rd. Large-scale database searching using tandem mass spectra: looking up the answer in the back of the book. Nature methods. 2004 Dec;1(3):195-202. PubMed PMID: 15789030.
122. Czerwinski M, Siemaszko D, Siegel DL, Spitalnik SL. Only selected light chains combine with a given heavy chain to confer specificity for a model glycopeptide antigen. Journal of immunology. 1998 May 1;160(9):4406-17. PubMed PMID: 9574545.
123. DeKosky BJ, Kojima T, Rodin A, Charab W, Ippolito GC, Ellington AD, et al. In-depth determination and analysis of the human paired heavy- and light-chain antibody repertoire. Nature medicine. 2015 Jan;21(1):86-91. PubMed PMID: 25501908.
124. Yamagami J, Kacir S, Ishii K, Payne AS, Siegel DL, Stanley JR. Antibodies to the desmoglein 1 precursor proprotein but not to the mature cell surface protein cloned from individuals without pemphigus. Journal of immunology. 2009 Nov 1;183(9):5615-21. PubMed PMID: 19843946. Pubmed Central PMCID: 2766247.
125. Wang B, DeKosky BJ, Timm MR, Lee J, Normandin E, Misasi J, et al. Functional interrogation and mining of natively paired human VH:VL antibody repertoires. Nature biotechnology. 2018 Feb;36(2):152-5. PubMed PMID: 29309060. Pubmed Central PMCID: 5801115.
126. Lee CM, Iorno N, Sierro F, Christ D. Selection of human antibody fragments by phage display. Nature protocols. 2007;2(11):3001-8. PubMed PMID: 18007636.
127. Robinson WH. Sequencing the functional antibody repertoire--diagnostic and therapeutic discovery. Nature reviews Rheumatology. 2015 Mar;11(3):171-82. PubMed PMID: 25536486. Pubmed Central PMCID: 4382308.

128. Conroy PJ, Law RH, Caradoc-Davies TT, Whisstock JC. Antibodies: From novel repertoires to defining and refining the structure of biologically important targets. *Methods*. 2017 Mar 1;116:12-22. PubMed PMID: 28088364.
129. Hafeez U, Gan HK, Scott AM. Monoclonal antibodies as immunomodulatory therapy against cancer and autoimmune diseases. *Current opinion in pharmacology*. 2018 Aug;41:114-21. PubMed PMID: 29883853.
130. Qian Y, Jeong JS, Ye J, Dang B, Abdeladhim M, Aoki V, et al. Overlapping IgG4 Responses to Self- and Environmental Antigens in Endemic Pemphigus Foliaceus. *Journal of immunology*. 2016 Mar 1;196(5):2041-50. PubMed PMID: 26826247. Pubmed Central PMCID: 4761459.
131. Saleh MA, Ishii K, Yamagami J, Shirakata Y, Hashimoto K, Amagai M. Pathogenic anti-desmoglein 3 mAbs cloned from a paraneoplastic pemphigus patient by phage display. *The Journal of investigative dermatology*. 2012 Apr;132(4):1141-8. PubMed PMID: 22277944.
132. Qian Y, Diaz LA, Ye J, Clarke SH. Dissecting the anti-desmoglein autoreactive B cell repertoire in pemphigus vulgaris patients. *Journal of immunology*. 2007 May 1;178(9):5982-90. PubMed PMID: 17442983.
133. Baranauskas A, Paliksa S, Alzbutas G, Vaitkevicius M, Lubiene J, Letukiene V, et al. Generation and characterization of new highly thermostable and processive M-MuLV reverse transcriptase variants. *Protein engineering, design & selection : PEDS*. 2012 Oct;25(10):657-68. PubMed PMID: 22691702.
134. Zhao C, Liu F, Pyle AM. An ultraprocessive, accurate reverse transcriptase encoded by a metazoan group II intron. *Rna*. 2018 Feb;24(2):183-95. PubMed PMID: 29109157. Pubmed Central PMCID: 5769746.
135. Hammers CM, Stanley JR. Patients with pemphigus foliaceus may retain antibody reactivity against calcium-stabilized, distal desmoglein 1 domains in remission. *The British journal of dermatology*. 2016 Jan;174(1):17-8. PubMed PMID: 26790650.
136. Kamiya K, Aoyama Y, Yamasaki O, Kamata A, Yamagami J, Iwatsuki K, et al. Epitope analysis of antidesmoglein 1 autoantibodies from patients with pemphigus foliaceus across different activity stages. *The British journal of dermatology*. 2016 Jan;174(1):113-9. PubMed PMID: 26294113.
137. Nakahara T, Takagi A, Yamagami J, Kamiya K, Aoyama Y, Iwatsuki K, et al. High anti-desmoglein 3 antibody ELISA index and negative indirect immunofluorescence result in a patient with pemphigus vulgaris in remission: evaluation of the antibody profile by newly developed methods. *JAMA dermatology*. 2014 Dec;150(12):1327-30. PubMed PMID: 25075929.
138. Salazar G, Zhang N, Fu TM, An Z. Antibody therapies for the prevention and treatment of viral infections. *NPJ vaccines*. 2017;2:19. PubMed PMID: 29263875. Pubmed Central PMCID: 5627241.
139. Cheung WC, Beausoleil SA, Zhang X, Sato S, Schieferl SM, Wieler JS, et al. A proteomics approach for the identification and cloning of monoclonal antibodies from serum. *Nature biotechnology*. 2012 Mar 25;30(5):447-52. PubMed PMID: 22446692.
140. Sajadi MM, Dashti A, Rikhtegaran Tehrani Z, Tolbert WD, Seaman MS, Ouyang X, et al. Identification of Near-Pan-neutralizing Antibodies against HIV-1 by Deconvolution of Plasma Humoral Responses. *Cell*. 2018 Jun 14;173(7):1783-95 e14. PubMed PMID: 29731169. Pubmed Central PMCID: 6003858.

141. Williams LD, Ofek G, Schatzle S, McDaniel JR, Lu X, Nicely NI, et al. Potent and broad HIV-neutralizing antibodies in memory B cells and plasma. *Science immunology*. 2017 Jan 27;2(7). PubMed PMID: 28783671. Pubmed Central PMCID: 5905719.
142. Sato S, Beausoleil SA, Popova L, Beaudet JG, Ramenani RK, Zhang X, et al. Proteomics-directed cloning of circulating antiviral human monoclonal antibodies. *Nature biotechnology*. 2012 Nov;30(11):1039-43. PubMed PMID: 23138294.
143. Wang B, Kluwe CA, Lungu OI, DeKosky BJ, Kerr SA, Johnson EL, et al. Facile Discovery of a Diverse Panel of Anti-Ebola Virus Antibodies by Immune Repertoire Mining. *Scientific reports*. 2015 Sep 10;5:13926. PubMed PMID: 26355042. Pubmed Central PMCID: 4564727.
144. Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature*. 2016 Sep 15;537(7620):347-55. PubMed PMID: 27629641.
145. Humphrey SJ, Karayel O, James DE, Mann M. High-throughput and high-sensitivity phosphoproteomics with the EasyPhos platform. *Nature protocols*. 2018 Sep;13(9):1897-916. PubMed PMID: 30190555.
146. Elias MS, Long HA, Newman CF, Wilson PA, West A, McGill PJ, et al. Proteomic analysis of filaggrin deficiency identifies molecular signatures characteristic of atopic eczema. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2017 Nov;140(5):1299-309. PubMed PMID: 28479159. Pubmed Central PMCID: 5667587.
147. Scharf M, Miske R, Kade S, Hahn S, Denno Y, Begemann N, et al. A Spectrum of Neural Autoantigens, Newly Identified by Histo-Immunoprecipitation, Mass Spectrometry, and Recombinant Cell-Based Indirect Immunofluorescence. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1447. PubMed PMID: 30038610. Pubmed Central PMCID: 6046535.
148. Derda R, Tang SK, Li SC, Ng S, Matochko W, Jafari MR. Diversity of phage-displayed libraries of peptides during panning and amplification. *Molecules*. 2011 Feb 21;16(2):1776-803. PubMed PMID: 21339712. Pubmed Central PMCID: 6259649.
149. Carmen S, Jermutus L. Concepts in antibody phage display. *Briefings in functional genomics & proteomics*. 2002 Jul;1(2):189-203. PubMed PMID: 15239904.
150. Derda R, Tang SK, Whitesides GM. Uniform amplification of phage with different growth characteristics in individual compartments consisting of monodisperse droplets. *Angewandte Chemie*. 2010 Jul 19;49(31):5301-4. PubMed PMID: 20583018. Pubmed Central PMCID: 2963104.
151. Korman NJ. In situ-bound antibodies eluted from the skin of patients with bullous pemphigoid are preferentially directed against the 230-kD bullous pemphigoid antigen. *The Journal of investigative dermatology*. 1995 Dec;105(6):824-30. PubMed PMID: 7490478.
152. Miske R, Hahn S, Rosenkranz T, Muller M, Dettmann IM, Mindorf S, et al. Autoantibodies against glutamate receptor delta2 after allogeneic stem cell transplantation. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*. 2016 Aug;3(4):e255. PubMed PMID: 27458598. Pubmed Central PMCID: 4946772.
153. Stoecker W, Teegen B, Jahnke A, inventorsDIAGNOSTIC COINCUBATION ASSAY patent US2017/0370911A1. 2017 Dec 28, 2017.

154. Samuels J, Ng YS, Coupillaud C, Paget D, Meffre E. Human B cell tolerance and its failure in rheumatoid arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005 Dec;1062:116-26. PubMed PMID: 16461794.
155. Chamberlain N, Massad C, Oe T, Cantaert T, Herold KC, Meffre E. Rituximab does not reset defective early B cell tolerance checkpoints. *The Journal of clinical investigation*. 2016 Jan;126(1):282-7. PubMed PMID: 26642366. Pubmed Central PMCID: 4701568.
156. Humrich JY, Riemekasten G. Restoring regulation - IL-2 therapy in systemic lupus erythematosus. *Expert review of clinical immunology*. 2016 Nov;12(11):1153-60. PubMed PMID: 27283871.
157. von Spee-Mayer C, Siegert E, Abdirama D, Rose A, Klaus A, Alexander T, et al. Low-dose interleukin-2 selectively corrects regulatory T cell defects in patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases*. 2016 Jul;75(7):1407-15. PubMed PMID: 26324847.
158. Yu H, Paiva R, Flavell RA. Harnessing the power of regulatory T-cells to control autoimmune diabetes: overview and perspective. *Immunology*. 2018 Feb;153(2):161-70. PubMed PMID: 29155454. Pubmed Central PMCID: 5765377.
159. Koristka S, Kegler A, Bergmann R, Arndt C, Feldmann A, Albert S, et al. Engrafting human regulatory T cells with a flexible modular chimeric antigen receptor technology. *Journal of autoimmunity*. 2018 Jun;90:116-31. PubMed PMID: 29503042.
160. Skuljec J, Chmielewski M, Happle C, Habener A, Busse M, Abken H, et al. Chimeric Antigen Receptor-Redirected Regulatory T Cells Suppress Experimental Allergic Airway Inflammation, a Model of Asthma. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1125. PubMed PMID: 28955341. Pubmed Central PMCID: 5600908.
161. Yoon J, Schmidt A, Zhang AH, Konigs C, Kim YC, Scott DW. FVIII-specific human chimeric antigen receptor T-regulatory cells suppress T- and B-cell responses to FVIII. *Blood*. 2017 Jan 12;129(2):238-45. PubMed PMID: 28064157. Pubmed Central PMCID: 5234219.
162. Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, Hebert V, Houivet E, Calbo S, et al. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. *Lancet*. 2017 May 20;389(10083):2031-40. PubMed PMID: 28342637.
163. Ran NA, Payne AS. Rituximab therapy in pemphigus and other autoantibody-mediated diseases. *F1000Research*. 2017;6:83. PubMed PMID: 28184292. Pubmed Central PMCID: 5288686.
164. Lunardon L, Tsai KJ, Propert KJ, Fett N, Stanley JR, Werth VP, et al. Adjuvant rituximab therapy of pemphigus: a single-center experience with 31 patients. *Archives of dermatology*. 2012 Sep;148(9):1031-6. PubMed PMID: 22710375. Pubmed Central PMCID: 3658473.
165. Greenwald M, Tesser J, Sewell KL. Biosimilars Have Arrived: Rituximab. *Arthritis*. 2018;2018:3762864. PubMed PMID: 29765782. Pubmed Central PMCID: 5885398.
166. Lanza A, Femiano F, De Rosa A, Cammarota M, Lanza M, Cirillo N. The N-terminal fraction of desmoglein 3 encompassing its immunodominant domain is present in human serum: implications for pemphigus vulgaris autoimmunity.

- International journal of immunopathology and pharmacology. 2006 Apr-Jun;19(2):399-407. PubMed PMID: 16831306.
167. Eming R, Nagel A, Wolff-Franke S, Podstawa E, Debus D, Hertl M. Rituximab exerts a dual effect in pemphigus vulgaris. *The Journal of investigative dermatology*. 2008 Dec;128(12):2850-8. PubMed PMID: 18563178.
168. Mouquet H, Musette P, Gougeon ML, Jacquot S, Lemercier B, Lim A, et al. B-cell depletion immunotherapy in pemphigus: effects on cellular and humoral immune responses. *The Journal of investigative dermatology*. 2008 Dec;128(12):2859-69. PubMed PMID: 18563177.
169. Colliou N, Picard D, Caillot F, Calbo S, Le Corre S, Lim A, et al. Long-term remissions of severe pemphigus after rituximab therapy are associated with prolonged failure of desmoglein B cell response. *Science translational medicine*. 2013 Mar 6;5(175):175ra30. PubMed PMID: 23467561.
170. DeKosky BJ, Ippolito GC, Deschner RP, Lavinder JJ, Wine Y, Rawlings BM, et al. High-throughput sequencing of the paired human immunoglobulin heavy and light chain repertoire. *Nature biotechnology*. 2013 Feb;31(2):166-9. PubMed PMID: 23334449. Pubmed Central PMCID: 3910347.
171. Casina VC, Hu W, Mao JH, Lu RN, Hanby HA, Pickens B, et al. High-resolution epitope mapping by HX MS reveals the pathogenic mechanism and a possible therapy for autoimmune TTP syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015 Aug 4;112(31):9620-5. PubMed PMID: 26203127. Pubmed Central PMCID: 4534270.
172. Goletz S, Hashimoto T, Zillikens D, Schmidt E. Anti-p200 pemphigoid. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2014 Jul;71(1):185-91. PubMed PMID: 24767733.
173. Lau I, Goletz S, Holtsche MM, Zillikens D, Fechner K, Schmidt E. Anti-p200 pemphigoid is the most common pemphigoid disease with serum antibodies against the dermal side by indirect immunofluorescence microscopy on human salt-split skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2019 Apr 3. PubMed PMID: 30953703.
174. Langenhan J, Dworschak J, Saschenbrecker S, Komorowski L, Schlumberger W, Stocker W, et al. Specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus requires the entire ectodomains of desmogleins. *Experimental dermatology*. 2014 Apr;23(4):253-9. PubMed PMID: 24533885.
175. Speicher KD, Kolbas O, Harper S, Speicher DW. Systematic analysis of peptide recoveries from in-gel digestions for protein identifications in proteome studies. *Journal of biomolecular techniques : JBT*. 2000 Jun;11(2):74-86. PubMed PMID: 19499040. Pubmed Central PMCID: 2291619.
176. Zhang J, Kobert K, Flouri T, Stamatakis A. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*. 2014 Mar 1;30(5):614-20. PubMed PMID: 24142950. Pubmed Central PMCID: 3933873.
177. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology*. 2008 Dec;26(12):1367-72. PubMed PMID: 19029910.

Appendix

Appendix I – Publizierte, humane, monoklonale Pemphigus-Autoantikörper

Tabelle S1: Charakteristika humaner, monoklonaler Pemphigus-Autoantikörper

Publikation	ID mAb	ID Patient	Alternative Bezeichnung mAb	H-CDR3-Sequenz (aa)	VH-Gen-/VH-Gen-Familie	Reaktivität	IF-Daten	ELISA-Daten	Pathogenität	Technik der Isolation	Weitere Kommentare	
(56)	(D3)1b/3a	PV1	PV4B6	ARDKAAYESGYYIGDF	1-69	D3	+	+	n/a	1		
	(D3)1d/2c	PV1	PV4B7; D(3)4-7	ARDKAAYESGYYIGDF	1-69	D3	n/a	+	n/a	1		
	(D3)1g/2e	PV1	PV3B9; D(3)3-9	ARDKAAYESGYYIGDF	1-69	D3	n/a	+	n/a	1		
	(D3)1i/4d	PV1	PV2B4; D(3)2-4	ARDKAAYESGYYIGDF	1-69	D3	n/a	+	n/a	1		
	(D3)3c/9	PV1	PV4B3	ASGGVDFDH	3-7	D3	+	+	+	1	(mit ETA)	
	(D3)3a/9	PV1	PV3B1; D(3)3-1	ASGGVDFDH	3-7	D3	n/a	+	n/a	1		
	(D3)3b/8	PV1	PV3B5; D(3)3-5	ASGGVDFDH	3-7	D3	n/a	+	n/a	1		
	(D3)4/30	PV1	PV3B12; D(3)3-12	AREALVYDSSGYKGGFDY	3-30	D3	n/a	+	n/a	1		
	(D1)11/10	PV1	PF3-8	ARTTAYWYFDLMGR	4	D1	n/a	+	n/a	1		
	(D1)7a/13a	PV1	PF4-5; D(1)4-5	ARELSPLTAGAAHTLDYWGQ	3-8	D1	-	+	n/a	1		
	(D1)5b/16a	PV1	PF4-3; D(1)4-3	AREMSPITAGAAHTYECWGQ	3-8	D1	n/a	+	n/a	1		
	(D1)6b/14	PV1	PF3-2; D(1)3-2	ARELSPPTAAFAHSYDLWGQ	3-8	D1	-	+	n/a	1		
	(D1)8/12a	PV1	PF3-5; D(1)3-5	ARELSPITAGDAHTFDSWGQ	3-8	D1	-	+	n/a	1		
	(D3)112b/6	PV1	PX4-4	ARGWHTGFRGYP SHWYFDL	4-4	D31	+	+	-	1		
	(D3)112a/5	PV1	PX4-2; D(3)14-2	ARGWHTGFRGYP SHWYFDL	4-4	D31	+	+	-	1		
	(D3)12/29	PV1	PX4-3; D(3)14-3	ARGGYSGWYFDY	1-69	D31	+	+	+	1		
	(D3)12/28	PV1	PX4-1	ARGGYSGWYFDY	1-69	D31	+	+	+	1		
	(57)	3.2	PV3	D3.B.4C.3.2	ARDLGGFFDDYWGQ	1-46	D3	+	+	+	1	(mit ETA)
		4.2	PV3	D3.B.4C.4.2	ARDQSLGMDVWGQ	1-46	D3	+	+	+	1	(mit ETA)
		F24-9	PF2	n/a	VRGPAYDIDYWGQ	3-53	D1	+	+	+	1	

(16)	PV4B6 etc.	PV1	(7/9 abs; clone I)	ARDKAAYEESGYYIIGDF	1-69	D3	+	+	n/a	1		
	PV3B8 etc.	PV1	(1/9 abs; clone I)	ARDKEAYEESGYYIIGDF	1-69	D3	n/a	+	n/a	1		
	PV1a 4-1 etc.	PV1a	(1/9 abs; clone I)	ARDKAAYEAGYYIIGDF	1-69	D3	n/a	+	n/a	1		
	PV4B3 etc.	PV1	clone II	ASGGVYDFDH	3-7	D3	+	+	+	(mit ETA)	1	
	PV1a 3-15 etc.	PV1a/ 1b	(8/9 abs; clone III)	VRDGEFLNLP SGHDVFDI	1-18	D3	+	+	+	+	(mit ETA)	1
	PV1b 2-8	PV1a/ 1b	(1/9 abs; clone III)	VRDGEFLNLP SGHDAFDI	1-18	D3	+	+	+	+	(mit ETA)	1
	PV3B12 etc.	PV1	clone IV	AREALVYDSSGYYKGGFDY	3-30	D3	n/a	+	+	n/a	1	
	PX4-4 etc.	PV1	clone V	ARGWHRTGFRGYP SHWYFDL	4-4	D31	+	+	+	-	1	
	PX4-1 etc.	PV1	clone VI	ARGGYSGWYNFYD	1-69	D31	+	+	+	+	1	
	3.2	PV3	clone I; D3.B.4C.3.2	ARDLGGDFDY	1-46	D3	+	+	+	+	(4°C)	1
	4.2	PV3	clone II; D3.B.4C.4.2	ARDQSLGMDV	1-46	D3	+	+	+	+	(4°C)	1
	PV3a 3-3	PV3a	clone II	ARDESLGMDV	1-46	D3	+	+	+	+	(4°C)	1
	3.1	PV3	clone III; D3.RT.3.1	ARINYDGSCHHSADADYM	5-a	D3	+-	+	+	-	(mit ETA)	1
	PV3a 3-15 etc.	PV3a	clone IV; PV3a 2-6; PV3a 2-7	AKGMHDIVMIGSTYYIYGLDV	3-23	D3	n/a	+	+	n/a	1	
	PV3a 3-10	PV3a	clone V	TREGPGYSSGSFHV	4-59	D3	+	+	+	n/a	1	
	PV3a 3-13	PV3a	clone VI	AKYGDHDSADI	3-30	D3	+	+	+	n/a	1	
	PV3a 4-4	PV3a	clone VII	ARDRGVLFRRNFFDL	1-2	D3	n/a	+	+	n/a	1	
	F706	I	PVMAB786	ARGVGTLDHWGQ	1-46	D3	+	+	+	+	(mit ETA)	4
	F779	II	n/a	ARSIESISGRTLGYWGO	1-46	D3	+	+	+	+	(mit ETA)	4
	PVA3	A	n/a	TLPAGTYLMS (WGQ)	3-15	D31	+	+	+	n/a	5	IgG1
	PVA4	A	n/a	AHRGGRQLVGAWFDP (WGQ)	2-5	D3/D3 1	+	+	+	n/a	5	IgG3
	PVA172	A	n/a	VRDYRIEGVPAAGTFEY (WGQ)	3-7	D3	+	+	+	n/a	5	IgG1
	PVA218	A	n/a	ARHGGSAYSSSSDAFDF (WGQ)	5a	D3	+	+	+	n/a	5	IgG4
PVA224	A	n/a	ARESRSYYIFGMDV (WGQ)	3-48	D3/D3 1	+	+	+	+	(mit ETA)	5	
PVA232	A	n/a	AKTIFGVVNSCMDV (WGQ)	3-23	D3	+	+	+	n/a	5	IgG1	

(94, 96, 97)

(54)

(Fortsetzung) (55)	3-09(5)/L11	PF1	PF1-3-K6	n/a	3-9	D1	n/a	+	n/a	1			
	3-09(6)/L12	PF1	PF1-26	AKDGMRVFVGGGDFWQ	3-9	D1	-	+	-	1	IP: preDsg1		
	3-09(6)/O1808	PF1	PF1-22	AKDGMRVFVGGGDFWQ	3-9	D1	+-	+	n/a	1			
	3-09(6)/1c	PF1	PF1-2-102	AKDGMRVFVGGGDFWQ	3-9	D1	n/a	+	n/a	1			
	3-09(7)/O1202	PF1	PF1-1-1	n/a	3-9	D1	-	+	n/a	1	preDsg1		
	3-09(7)/1c	PF1	PF1-2-3	AKDGIIVFVGDGLDWQ	3-9	D1	+-	+	-	1	preDsg1		
	3-09(8)/L11	PF1	PF1-2-18	AKAGTDYDSSASELPDYWQ	3-9	D1	+-	+	-	1	IP: preDsg1		
	3-09(9)/L8	PF1	PF1-1-7	AKVGGTYDITSGADYFDLWGR	3-9	D1	n/a	+	-	1	IP: preDsg1		
	3-09(9)/L2	PF1	PF1-19	AKVGGTYDITSGADYFDLWGR	3-9	D1	n/a	+	n/a	1			
	3-09(10)/O1808	PF1	PF1-27	AREDNWQLLHFYYAMDVWQ	3-9	D1	n/a	+	+	n/a	1		
	3-07/1e	PF1	PF1-8-2; PF1-8-5	ARESFYVGGTYVDFWQ	3-7	D1	+	+	+	++ (PF1-8-2)	1	IP: matDsg1; PF1-8-5 ist nicht pathogen!	
	3-30/3h	PF1	PF1-8-15	ARDRVEGVWGGTFDHWQ	3-30	D1	+	+	+	+	1	Bindet Epitope 89-101 auf matDsg1 (EC1)	
	(124)	F24-9	PF2	n/a	VRGPAYDIDY (WGQ)	3-53	D1	+	+	+	1	matDsg1	
		F23-5	PF2	n/a	ARGRTVRFGEIVSEGGMDVWQ	1-8	D1	+	+	-	1	matDsg1	
		F24-15	PF2	n/a	ASEGGELTIDYWQ	3-66	D1	+	+	-	1	matDsg1	
F24-2		PF2	n/a	ARQWVIETSGIRASGFDVWQ	3-30	D1	+	+	+	-	1	matDsg1 und preDsg1	
F23-6		PF2	n/a	ARSSGYDLPYAFDIWQ	3-9	D1	+	+	(zytopl.)	-	1	preDsg1	
F24-1		PF2	n/a	ARSFGRYEFADDAFDIWR	4-30	D1	+	+	(zytopl.)	-	1	preDsg1	
PNP-A1		PNP1	n/a	VREGIAADGMWQ	1-46	D3	+	+	+	+(mit ETA)	1		
PNP-A2		PNP1	n/a	VREGIAADGMWQ	1-46	D3	+	+	+	n/a	1		
PNP-B1		PNP1	n/a	ARDSIPMMGHDIWQ	1-46	D3	+	+	+	+(mit ETA)	1		
PNP-B2		PNP1	n/a	ARDSIPMMGHDIWQ	1-46	D3	+	+	+	n/a	1		
(131)	PNP-C1	PNP1	n/a	ARGSLIVPAAYFDWQ	1-46	D3	+	+	+	+(mit ETA)	1		
	PNP-D1	PNP1	n/a	ASGVVPAALDLDRDYWQ	1-2	D3	-	+	-	-	1		
	ARDWDD(N/T)GVLFY	P20 (PF)	n/a	ARDWDD(N/T)GVLFY	3b	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	6	Keine vollst. mAb-Seq.; klonspezif. IgG-Signatur; wahrsch. Dsg1-spezif.	

(Fortsetzung) (168)	A(T/S)CMVQGDIV WFDP	P20 (PF)	n/a		A(T/S)CMVQGDIVWFDP	4	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	6	Keine vollst. mAb-Seq.; klonspezif. IgG-Signatur; wahrsch. Dsg1-spezif.	
	ASCII(A/G)VAGTFF FDY	P20 (PF)	n/a		ASCII(A/G)VAGTFFDY	4	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	6	Keine vollst. mAb-Seq.; klonspezif. IgG-Signatur; wahrsch. Dsg1-spezif.	
(132)	EF2B8	PV-1	n/a		QGIAVAFDS	3-30	D31	n/a	+	n/a	n/a	4	IgG1	
	EF2E9	PV-1	n/a		DGRGVTMVGVISRQWFD	3-30	D31	n/a	+	n/a	n/a	4	IgG1	
	EF4A6	PV-1	n/a		GGTIFGVVVVEKNQFDY	3-33	D31	n/a	+	n/a	n/a	4	IgG1	
	WE1C6 etc.	PV-2	n/a		DLSGAATRYLES	3-30	D31	n/a	+	n/a	n/a	4	IgG1	
	WE5D10	PV-2	n/a		PRWELIARPYFDY	3-23	D3	n/a	+	n/a	n/a	4	IgG1	
	WE5G4	PV-2	n/a		DGWYCSSSTRCLNWFDP	3-30	D31	n/a	+	n/a	n/a	4	IgG1	
	JB1D10	PV-3	n/a		DPLDITMVRGIIRROGSA	3-23	D31	n/a	+	n/a	n/a	4	IgG1	
	JB1F7	PV-3	n/a		VKYCRGGSCPGGMDV	3-30	D31	n/a	+	n/a	n/a	4	IgG2	
	JB2E1	PV-3	n/a		AWQLPYTFDF	4-61	D31	n/a	+	n/a	n/a	4	IgG1	
	JB3F10	PV-3	n/a		DGARSKPMVVATIRGYFDY	3-30	D31	n/a	+	n/a	n/a	4	IgG1	
	J4F12	PV-4	n/a		n/a	n/a	D31	n/a	+	n/a	n/a	4	IgG1	
	JM1B11(8) etc.	PV-5	n/a		FWAPYCGSTSCYTPFDY	3-23	D31	n/a	+	n/a	n/a	4	IgG1	
	(91)	FS6-2C12	FS6	n/a		QNCSPNSCFNYFAP	4-59	D1	n/s	+	n/a	n/a	4	IgG1
		FS6-2G3	FS6	n/a		EMSLQPVAGMDV	3-23	D1	n/s	+	n/a	n/a	4	IgG1
		FS6-3A4(2)	FS6	n/a		GRFYHMDV	1-69	D1	n/s	+	n/a	n/a	4	IgG1
		FS7-1C11	FS7	n/a		HRIGYCSGNSCYDFDY	5-51	D1	n/s	+	n/a	n/a	4	IgG1
		FS7-1H10	FS7	n/a		HFIPAPPDY	1-18	D1	n/s	+	n/a	n/a	4	IgG2
FS7-2A9		FS7	n/a		RDIYDVGVGGLVDY	3-23	D1	n/s	+	n/a	n/a	4	IgG1	
FS7-2F8(4)		FS7	n/a		TESATTFGVAYYYFDY	3-7	D1	n/s	+	n/a	n/a	4	IgG1	
FS7-4C1		FS7	n/a		DSDSHYMDV	3-23	D1	n/s	+	n/a	n/a	4	IgG1	
FS12-1D2(2)		FS12	n/a		DSLTYCGGDCPTVIFGY	3-7	D1	n/s	+	n/a	n/a	4	IgG1	
FS12-1F10(2) etc.		FS12	n/a		AYYDFWSGHDDAFDI	3-74	D1	n/s	+	n/a	n/a	4	IgG1	
FS3-2B12		FS33	n/a		GLPYSGSDRGLDP	3-48	D1	n/s	+	n/a	n/a	4	IgG1	

(Fortsetzung) (130)	n/a	JLDO	n/a		1-69	D1	n/a	+	n/a	2	
	n/a	JLDO	n/a	ASPYSGYDFLWAY	3-23	D1	n/a	+	n/a	2	
	n/a	JLDO	n/a	AKWDHYPTRAFPI	4-34	D1	n/a	+	n/a	2	
Hammers et al., unpublished	IgA1-PV.D3.3-6	IgA1- PV1	n/a	ASRPLYCSGGNCYSYYQYGMNV	3-23	D3	+	+	+	3	

Abkürzungen: aa: Aminosäure; D1=Desmoglein 1; D3=Desmoglein 3; D31=Desmoglein 3+1; ETA: Exfoliativtoxin A; H-CDR3: Heavy chain complementarity-determining region 3; n/a: Keine Angaben; ID mAb: Identifikationsnummer monoklonaler Antikörper; IF: Immunfluoreszenzmikroskopie; IP: Immunpräzipitation; preDsg1: Prä-Desmoglein 1 (unreifes Dsg1, mit Prä-Pro-Peptid); matDsg1: Reifes Dsg1 (nach Abspaltung des Prä-Pro-Peptids); zytopl.: Zytoplasmatisches IF-Muster

Schlüssel zur Isolationstechnik: 1=APD (Phagen-Display); 2=APD (IgG4-spezifisch), von Heterohybridom/EBV-mRNA ausgehend; 3=APD (IgA1-spezifisch); 4=EBV/Heterohybridom; 5=EBV/CpG; 6=Immunoscope (keine vollen Antikörpersequenzen)

In Referenz (24) finden sich im Supplement Table S4 weitere 80, mittels Phagen-Displays erhaltene, monoklonale Antikörper (Isotypen IgG1/4, IgA1/2) von vier Patienten, mit ELISA- und IIF-bestätigter Reaktivität gegen Desmoglein 3 und/oder Desmoglein 1. Diese wurden aus Platzgründen hier nicht ausgewiesen.

Appendix II – Chemikalien, Reagenzien, Lösungen, sonstige

Verbrauchsmaterialien

Primer-Sequenzen sind in **Appendix IV** und **Appendix VIII** ausgewiesen und wurden von sämtlich von Sigma-Aldrich bezogen.

Tabelle S2: Chemikalien und Reagenzien

Item	Cat#	Manufacturer/Vendor
1% TAE Wide Mini ReadyAgarose™ Precast Gel, 20 well, with EtBr	1613044	Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany
2-Mercaptoethanol	M6250	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
3% TAE Wide Mini ReadyAgarose™ Precast Gel, 20 well, with EtBr	1613046	Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany
4-20% Criterion™ Tris-HCl Protein Gel, 12+2 wells, 45 µL	3450032	Bio-Rad, Laboratories GmbH, Munich, Germany
4-20% Criterion™ Tris-HCl Protein Gel, 18 wells, 30 µL	3450033	Bio-Rad, Laboratories GmbH, Munich, Germany
ABTS tablets 5 mg and Buffer for ABTS	11204521001 11204530001	Roche, Mannheim, Germany
Advantage® 2 PCR Kit - 30 Rxns	639207	Takara Bio Europe/SAS, Saint-Germain-en-Laye, France
Agencourt AMPure XP Beads	A63881	Beckman Coulter, Krefeld, Germany
Albumin, from bovine serum (BSA)	A7906	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
AmpliTag™ DNA Polymerase	N8080171	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
Blotting-Grade Blocker	170-6404	Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany
Calcium chloride	C1016	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
Carbenicillin	C1389	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
Citric acid	251275	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
Deoxynucleotide (dNTP) Mix	11969064001	Roche, Mannheim, Germany
DEPC-Treated Water	AM9906	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
DNA Gel Loading Dye, purple (6X)	B7025S	New England Biolabs, Frankfurt, Germany
DNA Ladder (1 kb)	201115	Agilent, Frankfurt, Germany
DNA low mass ladder	10068013	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
DNase I	D5025	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
UltraPure™ 0.5 M EDTA, pH 8.0	15575020	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
Ethanol, Absolute (200 Proof), Molecular Biology Grade	BP2818-100	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
Ethidium bromide solution, 10 mg/mL	E1510	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
FastBreak cell lysis reagent, 10X	V857C	Promega GmbH, Mannheim, Germany
Ficoll® Paque Plus	17-1440-02	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany
Glycerol for molecular biology	G5516	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
Glycine-HCl	G7403-250G	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
Glycogen, from mussels	10901393001	Roche, Mannheim, Germany
IgG from human serum	I4506	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
Imidazole	I202	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
IPTG	BP1620-10	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
Kanamycin Sulfate	11815032	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
LB agar	BP1425-500	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
LB agar carbenicillin – 100, Plates	L0418	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
BD Difco™ LB Broth, Miller	DF0446-17-3	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
Magnesium chloride	BP214-500	Thermo Fisher scientific, Dreieich, Germany
MOPS	M92020-1000.0	RPI, Mt. Prospect, IL, U.S.A.
Pierce™ NHS-Activated Agarose, Dry	26197	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
PEG 8000	BP233-1	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
UltraPure™ Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol (25:24:1, v/v)	15593031	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
Polyoxyethylene glycol sorbitan monolaurate (Tween® 20)	P1379	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
Pierce™ Protein G Agarose	20398	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
Q5® High-Fidelity DNA polymerase	M0491	New England Biolabs, Frankfurt, Germany
SeaKem® LE Agarose	50004	Lonza; via Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Germany
SeaKem® Gold Agarose	50150	Lonza; via Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Germany

SeaKem® GTG™ Agarose	50070	Lonza; via Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Germany
SeaPlaque™ Agarose	50101	Lonza; via Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Germany
SfiI	11288059001	Roche, Mannheim, Germany
SimplyBlue SafeStain	LC6060	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit- 10 Rxns	634925	Takara Bio Europe/SAS, Saint-Germain-en-Laye, France
S.O.C. Medium	15544-034	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
Sodium Acetate (3 M), pH 5.5	AM9740	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
Sodium phosphate, monobasic, monohydrate (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	S23185-500.0	RPI, Mt. Prospect, IL, U.S.A.
Sodium phosphate, dibasic, heptahydrate (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O)	S23175- 1000.0	RPI, Mt. Prospect, IL, U.S.A.
Sodium chloride	S7653	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
Sodium hydroxide solution (10.0N)	SS225-1	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
Sodium hypochlorite, 6% (Chlorox® Regular Liquid Bleach, 121 oz)	003-07-0763	Clorox, Oakland, CA, U.S.A.
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	26634	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
SuperScript™ First-Strand Synthesis System	11904018	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System	18091050	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
SYBR™ Safe DNA Gel Stain	S33102	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
T4 DNA Ligase	M0202S	New England Biolabs, Frankfurt, Germany
TALON® Superflow™ 10 mL	28-9574-99	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany
Tetracycline	T7660	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
Thrombin, bovine	T4648	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
Tris Base	BP152-500	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
Tris-HCl	9090.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
TRIzol™ Reagent	15596026	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
Tryptone	BP9726-2	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	AM9937	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
Yeast extract	BP1422-2	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany

Tabelle S3: Antikörper

Antibodies	Cat#	Source
Alexa Fluor® 594 goat anti-rat IgG (H+L)	A11007	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, U.S.A.
Anti-HA High Affinity from rat IgG1 (clone 3F10)	11867423001	Roche, Mannheim, Germany
Anti-HA-Peroxidase, High Affinity from rat IgG1 (clone 3F10)	12013819001	Roche, Mannheim, Germany
Anti-M13, HRP Conjugate, Monoclonal	27-9421-01	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany
TaqStart® Antibody	639251	Takara Bio Europe/SAS, Saint-Germain-en-Laye, France

Tabelle S4: Kits

Name	Cat. no.	Source
Anti-Desmoglein 3 ELISA (IgG)	EA1496 G	EUROIMMUN, Luebeck, Germany
Anti-Desmoglein 1 ELISA (IgG)	EA1495 G	EUROIMMUN, Luebeck, Germany
Mesacup-2 Desmogl.DSG3 ELISA Kit	7885E	MBL, Nagoya, Japan
Mesacup-2 Desmogl.DSG1 ELISA Kit	7880E	MBL, Nagoya, Japan
Monkey Esophagus Slides	5308/5301	Scimedx, Dover, NJ, U.S.A.
Nextera Index Kit	FC-121-1012	Illumina®, Munich, Germany
PureLink™ PCR Purification Kit	K3100-01	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, U.S.A.
QIAEX II Gel Extraction Kit	20021	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
QIAprep Spin Miniprep Kit	27104	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
QIAquick PCR Purification Kit	28106	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
RNeasy Midi Kit	75142	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
TOPO™ TA Cloning™ Kit	K457501	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany

Tabelle S5: Lösungen (kommerziell)

Name	Cat. no.	Source
DPBS, no calcium, no magnesium, 1x	14190094	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
DPBS, calcium, magnesium, 10x	14080048	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
Laemmli Sample Buffer, 4x	1610747	Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany
UltraPure™ TAE Buffer, 10x	15558026	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
Tris Buffered Saline (TBS), 10x	1706435	Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany

Tris/Glycine/SDS, 10x	1610732	Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany
UltraPure™ TAE Buffer, 10x	15558026	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany

Tabelle S6: Lösungen (selbst hergestellt)

Name	Chemical composition
Reconstitution/blocking buffer (for precipitated phage, also good for blocking IF slides)	5 mL 10x TBS from Bio-Rad 0.5 g BSA 25 µL 2 M CaCl ₂ Add 45 mL MilliQ water. Sterile filter and store at 4°C.
3% milk (blocking solution for phage display)	6 g blotting-grade blocker Bring to 200 mL with 1x TBS. Store at 4°C. Prevent contamination with phage during preparation!
10% milk (blocking solution for phage display)	10 g blotting-grade blocker Bring to 100 mL with 1x TBS. Store at 4°C. Prevent contamination with phage during preparation!
5x PEG/NaCl (for phage precipitation)	300 mL MilliQ water 75 g NaCl 100 g PEG-8000 Mix with heat until homogeneous (do not boil!), adjust to 500 mL with MilliQ water, autoclave, cool after autoclaving by continued stirring, aliquot in 40 mL aliquots in 50 mL Falcons. Store at RT. Prevent contamination with phage during preparation!
76 mM citric acid buffer, pH 2.0	1.46 g of citric acid Dissolved in 100 mL MilliQ water. Check pH! Sterile filter, store at RT.
0.1 M glycine buffer, pH 2.5	0.75 g of glycine Dissolved in 100 mL MilliQ water. Adjust pH to 2.5 with concentrated HCl. Sterile filter, store at RT.
2 M TRIS (unbuffered), pH 11	24.2 g TRIS Bring to 100 mL with MilliQ water. Check pH! Sterile filter, store at RT.
LB Agar/Carbenicillin (for plates)	40 g LB Agar Dissolved in 1 L MilliQ water. Autoclaved, cooled down (60°C), and supplemented with Carbenicillin. Pipetted warm into sterile 10 cm Petri dishes and allowed to solidify. Stored at 4°C.
LB broth, Miller (for glycerol stocks)	25 g LB broth, Miller Dissolved in 1 L MilliQ water. Autoclaved, stored at 4°C. For glycerol stocks, combine LB 70:30 with glycerol for mol. biology (30% (v/v) glycerol). Then prepare final glycerol stock with bacterial culture 50:50 (15% (v/v) glycerol). Store glycerol stock at -80°C.
50P/300N buffer	2.92 g NaH ₂ PO ₄ (monohydrate) 7.73 g Na ₂ HPO ₄ (heptahydrate) 17.53 g NaCl Adjusted pH to 7.0 in about 975 mL of MilliQ water. After pH is correct, fill up to 1 L with MilliQ water.
Imidazole buffer	10.21 g imidazole Dissolved in 500 mL of above 50P/300 N buffer. Correct pH again! Store away from light, at RT.
SB medium	30 g tryptone 20 g yeast extract 10 g MOPS Adjusted pH to 7.0 in 750 mL MilliQ water. When pH correct, fill up to 1 L total volume with MilliQ water. Autoclave, keep at 4°C until use. Check for visible growth of contaminants before use!
STLE (for mol. biol./gel electrophoresis)	1.5 mL of 1 M Tris pH 8.0 30 µL of 500 mM EDTA 2.5 mL of 3 M NaCl Adjust volume to 150 mL with MilliQ water, sterile filter, store in 50 mL (or smaller) aliquots at RT.
Washing buffer	50 mL 10x TBS 250 µL 2 M CaCl ₂ 500 µL Tween 20 (0.1%) Add 450 mL MilliQ water. Sterile filter and store at RT.
Tetracycline stock (10 mg/mL)	0.5 g tetracycline 50 mL 70% ethanol for mol. biol. Sterile filter, aliquot, store at -20°C.
Carbenicillin stock (100 mg/mL)	2.5 g carbenicillin 25 mL MilliQ water Sterile filter, aliquot, store at -20°C.
Kanamycin stock (25 mg/mL)	1.25 g kanamycin 50 mL MilliQ water Sterile filter, aliquot, store at -20°C
1M IPTG	2.38 g IPTG

	Bring to 10 mL with MilliQ water Sterile filter, aliquot, store at -20°C.
--	------------------------------------------------------------------------------

Tabelle S7: Plasmide, Bakterienstämme

Name	Source
pComb3X phage display vector (phagemid)	Scripps Institute, La Jolla, CA, U.S.A. (via MTA)
TOP10F' <i>E.coli</i> strain (Cat#C303003)	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, U.S.A.
VCSM13 Interference Resistant Helper Phage (Cat#200251)	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.
XL1-Blue <i>E.coli</i> strain (Cat#200228)	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.
ER2738 <i>E.coli</i> strain (Cat#60522-2)	Lucigen, Middleton, WI, U.S.A.

Tabelle S8: Verbrauchsmaterialien

Type of article	Source
Amicon Ultra-15 centrifugal filter (10 KDa)	Merck, Darmstadt, Germany
Amicon Ultra-15 centrifugal filter (3 KDa)	Merck, Darmstadt, Germany
Calibrated Plastic Inoculation Loops	COPAN innovation, Brescia, Italy
Corning® Disposable Erlenmeyer Flask (125 mL, 250 mL, 500 mL, 1 L)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
Econo-Pac® Chromatography Columns, 1.5x12 cm, 20 mL bed volume	Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany
Cuvettes for Electroporation, 0.2 cm electrode gap (#1652082)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany
Cryotubes, 2 mL, sterile	Denville, Saint-Laurent, QC, Canada
DNA LoBind Tubes (1.5 mL; 2 mL)	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Falcon tubes (15 mL; 50 mL)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
Millex-HV Sterile Syringe Filter, 0.45 µm, PVDF, 33 mm	Merck Millipore, Darmstadt, Germany
Parafilm	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Germany
Pipette filter tips (10 µL; 20 µL; 100 µL; 200 µL; 1000 µL)	Denville, Saint-Laurent, QC, Canada
Petri dishes, polystyrene, sterile, 100 mm x 20 mm	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
Protein LoBind Tubes (1.5 mL; 2 mL)	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Razor blade	PLANO, Wetzlar, Germany
Reaction tubes (1.5 mL; 2 mL)	Sarstedt AG&Co., Nuembrecht, Germany
Serological pipettes (5 mL; 10 mL; 25 mL; 50 mL)	Sarstedt AG&Co., Nuembrecht, Germany
Spectra/Por® 1 dialysis tubing, MWCO 6000-8000	Spectrum Laboratories, via: VWR, Hannover, Germany
Steriflip-GP Sterile Centrifuge Tube Top Filter Unit, 0.22 µm	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany

Appendix III – Geräte

Spezielle Geräte, welche allein an spezialisierten Cores vorhanden waren (z. B. Illumina® MiSeq-NGS-Sequenzierer oder Thermo Fisher Scientific Q Exactive Plus-Massenspektrometer) sind hier nicht aufgeführt.

Tabelle S9: Geräte

Equipment	Supplier
Accu-jet pro pipette	BRAND GmbH, Wertheim, Germany
Analytical scale ABS/ABJ-BA-def-1019	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Germany
Benchtop microcentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
BioPhotometer plus	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Centrifuge 5424R	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Criterion™ Vertical Electrophoresis Cells	Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany
Cryostat CM3050 S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany
Electroelution system, Whatman™ EluTrap™ (#10447705; Sigma-Aldrich Z698482)	Whatman (discontinued)
Erlenmeyer Flasks, glass	VWR International GmbH, Darmstadt, Germany
Freezers -20°C	Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Germany
Freezers -80°C	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Germany
Gel Documentation Systems	Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany
High-Speed centrifuge Sorvall Lynx 4000	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Germany
Horizontal Electrophoresis Systems	Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany
Incubator	VWR International GmbH, Darmstadt, Germany
Infinite 200 PRO M ELISA reader	TECAN, Männedorf, Switzerland
Keyence microscope BZ-9000E	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Germany
Magnetic hotplate stirrer VMS-C4	VWR International GmbH, Darmstadt, Germany
MicroPulser Electroporator (#1652100)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany
Microwave: 700 & Grill	Severin, Sundern, Germany
Milli-Q® Integral 15 Water Purification System	Merck Millipore, Darmstadt, Germany
NanoDrop 2000c spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Germany
pH meter HI208	HANNA instruments, Vöhringen, Germany
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany
Refrigerators 4°C	Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Germany
Shaker incubator I24	New Brunswick (now Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
T100 thermal cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany
Thermocycler TPersonal combi	Biometra (now Analytik Jena, Jena, Germany)
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Transferpette S (10 µL, 100 µL, 1000 µL)	BRAND GmbH, Wertheim, Germany
Transilluminator, blue LED (for SYBR)	IO Rodeo, Pasadena, CA, U.S.A.
Transilluminator, 302/365 nm (LM26)	UVP (now Analytik Jena, Jena, Germany)
UVC/T-M-AR DNA/RNA UV-cleaner hood	BioSan, Riga, Latvia
Vacuum Concentrator SC110A SpeedVac Plus	Savant (now Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Germany)
Vortex devices	Vortex-Genie® 2-Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, U.S.A.

Appendix IV – Phagen-Display-Klonierungen und Transformation von *E.coli*

Alle Protokolle basieren auf dem Phagen-Display-Protokoll von Barbas et al. (115). Die nachfolgend exemplarisch gezeigten 16 Protokolle stellen eine Auswahl der wichtigsten Protokolle dar, welche zur Klonierung einer Phagen-Bibliothek benötigt werden. Weiterführende Angaben finden sich in Referenzen (16, 56, 115).

Für die Klonierungen benötigte Primer sind im folgenden aufgelistet. Außer den letztgenannten Sequenzierungsprimern sind alle Primer in HPLC-Qualität zu beziehen:

Tabelle S10: Primer für Phagen-Display

Primer ID	Site	Purpose	Primer Sequence (5' to 3')
HSCVH1-FL	Forward	V _H	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGT GGGCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
HSCVH2-FL	Forward	V _H	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGT GGGCAGATCACCTTGAAGGAGTCTGG
HSCVH35-FL	Forward	V _H	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGT GGGGAGGTGCAGCTGGTGSAGTCTGG
HSCVH3a-FL	Forward	V _H	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGT GGGGAGGTGCAGCTGKTGGAGTCTG
HSCVH4-FL	Forward	V _H	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGT GGGCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGG
HSCVH4a-FL	Forward	V _H	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGT GGGCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGG
HSCG1234E	Reverse	V _H	CCTGGCCGGCCTGGCCGCTAGTGACCGATGGGCCCTTGGTGGARGC
HSClam1a	Forward	V _λ	GGGCCAGGCGCCGAGCTCGTGBTGACGCAGCCGCCCTC
HSClam1b	Forward	V _λ	GGGCCAGGCGCCGAGCTCGTGCTGACTCAGCCACCCTC
HSClam2	Forward	V _λ	GGGCCAGGCGCCGAGCTCGCCCTGACTCAGCCTCCCTCCGT
HSClam3	Forward	V _λ	GGGCCAGGCGCCGAGCTCGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTC
HSClam4	Forward	V _λ	GGGCCAGGCGCCGAGCTCGTGCTGACTCAATCGCCCTC
HSClam6	Forward	V _λ	GGGCCAGGCGCCGAGCTCATGCTGACTCAGCCCCACTC
HSClam78	Forward	V _λ	GGGCCAGGCGCCGAGCTCGTGGTGACYCAGGAGCCMTC
HSClam9	Forward	V _λ	GGGCCAGGCGCCGAGCTCGTGCTGACTCAGCCACCTTC
HSClam10	Forward	V _λ	GGGCCAGGCGCCGAGCTCGGGCAGACTCAGCAGTCTC
HSCJlam1236	Reverse	V _λ	GGAAGATCTAGAGGAACCACCGCCTAGGACGGTCASTTTGGTSSC
HSCJlam57	Reverse	V _λ	GGAAGATCTAGAGGAACCACCGCCGAGGACGGTCACTSGGTSSC
HSCJLam4	Reverse	V _λ	(Not used; pseudogene-related)
HSCK1-F	Forward	V _κ	GGGCCAGGCGCCGAGCTCCAGATGACCCAGTCTCC
HSCK24-F	Forward	V _κ	GGGCCAGGCGCCGAGCTCGTGATGACYCAGTCTCC
HSCK3-F	Forward	V _κ	GGGCCAGGCGCCGAGCTCGTGWGACRCAGTCTCC
HSCK5-F	Forward	V _κ	GGGCCAGGCGCCGAGCTCACACTCACGCAGTCTCC
HSCJK14o-B	Reverse	V _κ	GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTGATYTCCACCTTGGTCCC
HSCJK2o-B	Reverse	V _κ	GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC
HSCJK3o-B	Reverse	V _κ	GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTGATATCCACTTTGGTCCC
HSCJK5o-B	Reverse	V _κ	GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTAATCTCCAGTCTGTCCC
RSC-F	Forward	Overlap	GAGGAGGAGGAGGAGGAGGCGGGCCAGGCGCCGAGCTC
RSC-E	Reverse	Overlap	GAGGAGGAGGAGGAGGAGCCTGGCCGGCCTGGCCGCTAGTG
ompseq	Forward	Sequencing	AAGACAGCTATCGCGATTGCAG
dpseq	Reverse	Sequencing	AGAAGCGTAGTCCGGAACGTC

Protokoll 2: V_λ-PCR from cDNA (no library barcoding of variable light chains)

V_λ-PCR: 18 reactions à 2 µl cDNA = 36 µl needed + tolerance (2 µl)

11 µl Taq + 11 µl anti-Taq, mix, let at RT for 5'

Prepare 20x MM (without primers and cDNA) as follows (in 2.0 ml Eppendorf tube)

dH2O	1604 µl	(20x 80.2 µl)
10x PCR buffer	200 µl	(20x 10 µl)
25 mM dNTP	16 µl	(20x 0.8 µl)
Taq/anti-Taq	20 µl	(20x 1.0 µl)
Total vol.	1840 µl	(20x 92 µl)

Transfer 92 µl of MM to tube# 0 (neg. control), add 2 µl dH2O (instead of cDNA) and 3 µl of 5' HSClam1a-FL and 3' HSCJlam1236 primer (all at 20 µM).

To remaining 1748 µl of MM (19x MM), add 38 µl of cDNA (19x 2 µl cDNA), put on ice

Pipet 3 µl of reverse primer HSCJlam1236 in first 9 tubes,
pipet 3 µl of reverse primer HSCJlam57 in next 9 tubes

Aliquot 94 µl of 1786 µl MM-cDNA-mix to 18 tubes labelled 1 to 18 (change pipet tip every time for the first nine tubes, then keep tip with the 10th tube because of different reverse primer in tube – avoid cross-contamination with the two different reverse primers!)

Add 3 µl of 5' forward primer (all at 20 µM) per tube as follows:

tube #	5' primer	3' primer	description
0	HSClam1a	HSCJlam1236	negative control
1	HSClam1a	HSCJlam1236	
2	HSClam1b	HSCJlam1236	
3	HSClam2	HSCJlam1236	
4	HSClam3	HSCJlam1236	
5	HSClam4	HSCJlam1236	
6	HSClam6	HSCJlam1236	
7	HSClam78	HSCJlam1236	
8	HSClam9	HSCJlam1236	
9	HSClam10	HSCJlam1236	
10	HSClam1a	HSCJlam57	
11	HSClam1b	HSCJlam57	
12	HSClam2	HSCJlam57	
13	HSClam3	HSCJlam57	
14	HSClam4	HSCJlam57	
15	HSClam6	HSCJlam57	
16	HSClam78	HSCJlam57	
17	HSClam9	HSCJlam57	
18	HSClam10	HSCJlam57	

PCR program

5' @ 94°C, then 30 cycles of

15" @ 94°C
15" @ 56°C
90" @ 72°C

10' @ 72°C

∞ @ 4°C (until PCR products are put in 4°C freezer)

Evaluate PCR results by gel electrophoresis

1.5-2% low-melt agarose gel, 10 µl of reaction vol. + 2 µl of 6x dye, low-mass-standard, 100 V, 60-90 min

Nota bene: Note that reverse primer HSCJLam4 is not used due to the relatedness to a pseudogene.

Repeat this PCR for 1 more time to obtain enough V_L-PCR material.

Protokoll 3: V_K-PCR from cDNA (no library barcoding of variable light chains)

V_K-PCR: 16 reactions à 2 µl cDNA = 32 µl needed + tolerance (2 µl) = 34 µl required

10 µl Taq + 10 µl anti-Taq, mix, let at RT for 5'

Prepare 18x MM (without primers and cDNA) as follows:

nucl.-free water H2O	1443.6 µl	(18x 80.2 µl)
10x PCR buffer	180 µl	(18x 10 µl)
25 mM dNTP	14.4 µl	(18x 0.8 µl)
Taq/anti-Taq	18 µl	(18x 1.0 µl)
Total vol.	1656 µl	(18x 92 µl)

Transfer 92 µl of MM to tube# 0 (neg. control), add 2 µl dH2O (instead of cDNA) and 3 µl of 5' HSCK1-F and 3' HSCJK14o-B (all at 20 µM).

To remaining 1564 µl of MM (17x MM), add 34 µl of cDNA (17x 2 µl cDNA)

Add 3 µl of the respective reverse primer to the 4x 4 tubes (HSCJK14o-B, HSCJK2o-B, HSCJK3o-B, HSCJK5o-B).

Aliquot 94 µl of 1598 µl MM-cDNA-mix to 16 tubes labelled 1 to 16 (change pipet tip every time for the first 12 tubes, then keep tip with the 13th tube because of different reverse primer in tube – avoid cross-contamination with the two different reverse primers!)

Add 3 µl of the respective forward primer (all at 20 µM) per tube as follows:

tube #	forward primer	reverse primer	description
0	HSCK1-F	HSCJK14o-B	<u>negative control</u>
1	HSCK1-F	HSCJK14o-B	
2	HSCK24-F	HSCJK14o-B	
3	HSCK3-F	HSCJK14o-B	
4	HSCK5-F	HSCJK14o-B	
5	HSCK1-F	HSCJK2o-B	
6	HSCK24-F	HSCJK2o-B	
7	HSCK3-F	HSCJK2o-B	
8	HSCK5-F	HSCJK2o-B	
9	HSCK1-F	HSCJK3o-B	
10	HSCK24-F	HSCJK3o-B	
11	HSCK3-F	HSCJK3o-B	
12	HSCK5-F	HSCJK3o-B	
13	HSCK1-F	HSCJK5o-B	
14	HSCK24-F	HSCJK5o-B	
15	HSCK3-F	HSCJK5o-B	
16	HSCK5-F	HSCJK5o-B	

PCR program

5' @ 94°C, then 30 cycles of

15" @ 94°C
15" @ 56°C
90" @ 72°C

10' @ 72°C

∞ @ 4°C (until PCR products are put in 4°C freezer)

Evaluate PCR results by gel electrophoresis

1.5-2% low-melt agarose gel, 10 µl of reaction vol. + 2 µl of 6x dye, low-mass-standard, 100 V, 60-90 min

Repeat this PCR for 1 more time to obtain enough V_K-PCR material.

Protokoll 4: Overlap PCR of V_H and V_λ (2nd round PCR)

Gel purified V_H-PCR products: 35.5 ng/µl, stock vol. 168.2 µl (after test PCR); 100 ng = 2.8 µl

Gel purified V_λ-PCR products: 14.1 ng/µl, stock vol. 128.75 µl (after test PCR); 100 ng = 7.1 µl

5.5 µl Taq + 5.5 µl anti-Taq, mix, let at RT for 5'

Prepare 10x MM (with primers, but without PCR-DNA; for 9 reactions) as follows:

dH2O	723 µl	(10x 72.3 µl)
10x PCR buffer	100 µl	(10x 10 µl)
25 mM dNTP	8 µl	(10x 0.8 µl)
V _H -DNA (100 ng)	---	(10x ---)
V _λ -DNA (100 ng)	---	(10x ---)
RSC-F (20 µM)	30 µl	(10x 3 µl)
RSC-E (20 µM)	30 µl	(10x 3 µl)
Taq/anti-Taq	10 µl	(10x 1 µl)

Total vol. 901 µl (10x 90.1 µl)

Transfer 90.1 µl of MM to tube #0 (neg. control), add 9.9 µl dH2O (instead of PCR-DNA).

To remaining 810.9 µl of MM (9x MM), add 25.2 µl of V_H-DNA (894.6 ng) and 63.9 µl V_λ-DNA (900.99 ng), making a total vol. of 900 µl (9x MM).

Aliquot 100 µl of this MM (with DNA and primers) to nine PCR-tubes, labelled #1-9

PCR program

5' @ 94°C, then 25 cycles of

15" @ 94°C
15" @ 56°C
120" @ 72°C

10' @ 72°C

∞ @ 4° C (until PCR products are put in 4° C freezer)

Evaluate PCR results by gel electrophoresis

1.5-2% low-melt agarose gel, 10 µl of reaction vol. + 2 µl of 6x loading dye, low-mass std., 100 V, 80 min

Repeat this PCR for 2-4 more times to obtain enough material.

Protokoll 5: Overlap PCR of V_H and V_κ (2nd round PCR)

Gel purified VH-PCR products: 35.5 ng/μl, stock vol. 110.8 μl (3.9 μg); 100 ng = 2.8 μl
Gel purified Vκ-PCR products: 10.4 ng/μl, stock vol. 185.9 μl (1.9 μg); 100 ng = 9.6 μl

5.5 μl Taq + 5.5 μl anti-Taq, mix, let at RT for 5'

Prepare 10x MM (with primers, but without PCR-DNA) as follows:

dH ₂ O	698 μl	(10x 69.8 μl)
10x PCR buffer	100 μl	(10x 10 μl)
25 mM dNTP	8 μl	(10x 0.8 μl)
VH-DNA (100 ng)	---	(10x ---)
Vκ-DNA (100 ng)	---	(10x ---)
RSC-F (20 μM)	30 μl	(10x 3 μl)
RSC-E (20 μM)	30 μl	(10x 3 μl)
Taq/anti-Taq	10 μl	(10x 1 μl)

Total vol. 876 μl (10x 87.6 μl)

Transfer 87.6 μl of MM to tube #0 (neg. control), add 12.4 μl dH₂O (instead of PCR-DNA).

To remaining 788.4 μl of MM (9x MM), add **25.2 μl of VH-DNA** (894.6 ng) and **86.4 μl Vκ-DNA** (898.6 ng), making a total vol. of 900 μl (9x MM).

Aliquot 100 μl of this MM (with DNA and primers) to 9 PCR-tubes, labelled #1-9

PCR program

5' @ 94°C, then 25 cycles of
15" @ 94°C
15" @ 56°C
120" @ 72°C
10' @ 72°C
∞ @ 4°C (until PCR products are put in 4°C freezer)

Repeat this PCR for 2-4 more times to obtain enough material.

Protokoll 6: Prepare ethanol precipitation of PCR products from V_H/V_λ/V_κ/Overlap-PCRs

- After evaluation of PCR products by gel electrophoresis, pool PCR reactions
- Separate to multiples of 360 μl (in 1.7 ml Eppendorf tubes)
- Then add 2 μl (40 μg) Glycogen and 1/9th of vol. 3M NaOAc (pH 5.2; 40 μl), making a total vol. of about 400 μl per Eppendorf tube
- Then add 2.5x vol. 100% ethanol (1000 μl) and mix; total vol. is about 1400 μl per tube
- Store @ -80°C until subsequent ethanol precipitation

Protokoll 7: Ethanol precipitation of PCR products

Take prepared and pooled PCR products (with Glycogen, NaOAc and 100% EtOH), out of -80°C freezer, thaw on wet ice (4°C) and vortex briefly, then

- spin at 13'400 rpm and 4°C for 15 min
- Aspirate sup
- Wash pellet with 600 μl 70% EtOH

- Spin again at same conditions as above, but for 10 min only
- Aspirate sup
- Buzz down and remove remaining sup
- Spin at medium heat in SpeedVac for about 80 s (**do NOT overheat and overdry; be careful with tube with dried DNA for not to loose dried DNA!**), alternatively air dry with care (clean room conditions!)
- Resuspend dried DNA with nuclease-free water (vol. depending on pellet size; e.g., put 120 μ l water in first tube, resuspend and let sit for a few minutes, then transfer this solution into next tube, and so on)
- Mix well, buzz down, check actual final vol. and take out 4 μ l for subsequent DNA quantification by gel (not by other means!)
- Store final PCR product (washed, precipitated, concentrated) at -80°C freezer until subsequent quantification and gel purification

Protokoll 8: Gel quantification of PCR products before subsequent gel purification

- Preparation of a 2%-SeaPlaque low melt gel, 24 wells
- Take 4 μ l aliquots of PCR pools (ethanol precipitated before) out of -80°C freezer, thaw on wet ice (4°C)
- Dilute all mixes 1:10 (2 μ l of respective aliquot with PCR product + 18 μ l STLE), keep remaining 2 μ l of aliquot for additional measurements on ice/freeze again
- Then prepare the following 4 dilutions for all 3 PCR product mixes:
 - 1 μ l of 1:10 dil. DNA + 4 μ l STLE + 1 μ l 6x loading dye
 - 2 μ l of 1:10 dil. DNA + 3 μ l STLE + 1 μ l 6x loading dye
 - 3 μ l of 1:10 dil. DNA + 2 μ l STLE + 1 μ l 6x loading dye
 - 5 μ l of 1:10 dil. DNA + 0 μ l STLE + 1 μ l 6x loading dye
- Prepare 2 sets of low mass DNA standards:
 - 1 μ l low mass DNA standard + 4 μ l STLE + 1 μ l 6x loading dye
 - 2 μ l low mass DNA standard + 3 μ l STLE + 1 μ l 6x loading dye
 - 3 μ l low mass DNA standard + 2 μ l STLE + 1 μ l 6x loading dye
 - 4 μ l low mass DNA standard + 1 μ l STLE + 1 μ l 6x loading dye
- Load low melt gel in the following order (from left to right):
 - 4 wells with low mass DNA std (4 μ l, 3 μ l, 2 μ l, 1 μ l)
 - 4 wells with PCR pool 1 (e.g., VH-mix) (1 μ l, 2 μ l, 3 μ l, 5 μ l)
 - 4 wells with PCR pool 2 (e.g., VL-mix) (1 μ l, 2 μ l, 3 μ l, 5 μ l)
 - 4 wells with PCR pool 3 (e.g., VK-mix) (1 μ l, 2 μ l, 3 μ l, 5 μ l)
 - 4 wells with low mass DNA std (1 μ l, 2 μ l, 3 μ l, 4 μ l)
- Run the gel at 100 V for 80 min (good separation of bands required)
- Capture images of gel, print, scan
- Using Image J according to handbook (see copies: Analyze > Gels > Select First Lane (pretend horizontal lane!), then Analyze > Gels > Plot Lanes; then paint lines under each peak and measure area with wand tool, copy "OD values" (AUC) to Excel
- Then calculate standard curves for selected band and use manufacturer's data on masses of bands of low mass DNA standard to calculate trend line in Excel; calculate masses of diluted DNA probes, go back and consider volumes and dilutions (here: 6 μ l vol. on gel; 1/60, 1/30, 1/20 and 1/12 dilution of DNA); then calculate mean of concentrations and refer to stock volume (here: 100 μ l and 120 μ l) to calculate total yield **before** subsequent gel purification.

Protokoll 9: PCR DNA gel purification in two lanes of 2 % gel (PCR products from previous EtOH precipitation)

Take about 3 µg DNA per broad lane (40 mm long, 1 mm thick, about 5 mm deep) in 2% gel, 3 µg should be in about 90 µl vol.

- Make 2% SeaPlaque low melt DNA gel with 1x 2 broad lanes (for DNA from PCR, 40x1x5 mm) and 2 small lanes (for standard); alternatively commercial precasted 1-3% gels can be used
- Prepare sample as follows:
 - Total vol. 180 µl (2 lanes à 90 µl with 3 µg DNA each) = 25.3 µl VH-PCR-mix + 124.7 µl STLE + 30 µl 6x loading dye (blue, from Steve's lab, self-made)
 - Load to gel, 90 µl per lane (2 times)
- Load low mass DNA standards, 4 µl per lane (total vol. 6 µl per lane: 4 µl low mass DNA std. + 1 µl STLE + 1 µl 6x loading dye)
- Run: 100 V, 2 h (starting with 400 mA, according to machine)
- Take photo (**very brief exposure to UV light only!**), cut out bands from gel (as fast and as precise as possible, but with little safety margin around desired band) and put these into 50 ml Falcon tube
- Weigh cutted bands and calculate needed QG buffer for purification with QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kit (Cat#28704).
- Perform gel purification according to manufacturer's guideline
- Prepare ethanol precipitation as outlined above (Protokoll 7)
- Store at -80°C until subsequent ethanol precipitation and gel quantification or proceed directly to ethanol precipitation (after => 15 min on dry ice)
- Perform gel quantitation as outline above (Protokoll 8) and calculate yield of gel purification; should be in the range 20-50% of input DNA

Protokoll 10: Sfi-I digest of gel purified PCR overlap products (after gel purification)

1 µg DNA requires 36 U Sfi-I (valid for PCR DNA only; for vector DNA take 6 U per µg)

- When setting up, add in this order:
1. Water
 2. 10x buffer M
 3. DNA, then vortex and spin down
 4. Add Sfi-I enzyme, then mix with pipet

	e.g., VH:Vk ≈ 55,3 µg/µl; take 6.8 µg
Nuclease-free water	50.9 µl
10x buffer M	20 µl
DNA, gel purified	123 µl
Sfi-I (40 U/µl)	6.1 µl
Total	200 µl

Incubate @ 50° C water bath for 5 hours

Then clean up Sfi-I-digested PCR overlap DNA as follows:

- Bring vol. to 360 µl by adding nuclease free water
- Spin 1 tube with 1 ml of **Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1)** for 2 min (at max. speed, here 13,400 rpm; prepare balance) and add 360 µl from this tube to the respective digestion tube
- Shake 30 s, spin 2 min in table top centrifuge (13,400 rpm; prepare balance)
- Transfer the aqueous layer (top layer, with DNA!) to fresh tube
- Add 360 µl **Chloroform** into the fresh tube with the aqueous layer from the step before
- Shake 10 s, spin 2 min in table top centrifuge (balance!)
- Transfer the aqueous layer (top layer, with DNA!) to fresh tube, vol. recovered: _____ µl
- Adjust final volume to 360 µl with nuclease-free water

- Add 2 µl glycogen, 40 µl 3 M NaOAc (1/9th of tot. vol.) pH 5.2 and 1 ml 100% EtOH, split to two tubes with 700 µl each
- Vortex, incubate @ -80°C O/N
- Ethanol precipitate
- Gel purify, then gel quantitate (no gel quantitation before gel purification needed, because Phenol/Chloroform extraction usually is very efficient with little loss)

Protokoll 11: Sfi-I digest of pComb3X-SS vector (obtained from Barbas lab, Scripps Inst.)

1 µg vector DNA requires 6 U Sfi-I (valid for vector DNA only; for PCR DNA take 36 U per µg!), 36 µg requires 216 U, Sfi-I is at 40 U/µl in stock (required vol. is 5.4 µl)

Vector DNA conc. is 3.97 µg/µl, so 36 µg equal 9.1 µl

When setting up, add in this order:

1. Water
2. 10x buffer M
3. Vector DNA, then vortex and spin down
4. Add Sfi-I enzyme, then mix with pipet

	pComb3X ≈ 36 µg (in 9.1 µl)
Nuclease-free water	309.5 µl
10x buffer M	36 µl
DNA (vector)	9.1 µl
Sfi-I (40 U/µl)	5.4 µl
Total	360 µl

Incubate @ 50° C water bath for 5 hours

Then clean up Sfi-I-digested PCR overlap DNA as follows:

- Bring vol. to 360 µl by adding nuclease free water, if required
- Spin 1 tube with 1 ml of **Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1)** for 2 min (at max. speed, here 13,400 rpm; prepare balance) and add 360 µl from this tube to the respective digestion tube
- Shake 30 s, spin 2 min in table top centrifuge (13,400 rpm; prepare balance)
- Transfer the aqueous layer (top layer, with DNA!) to fresh tube
- Add 360 µl **Chloroform** into the fresh tube with the aqueous layer from the step before
- Shake 10 s, spin 2 min in table top centrifuge (balance!)
- Transfer the aqueous layer (top layer, with DNA!) to fresh tube, vol. recovered: _____ µl
- Adjust final volume to 360 µl with nuclease-free water
- Add 2 µl glycogen, 40 µl 3 M NaOAc (1/9th of tot. vol.) pH 5.2 and 1 ml 100% EtOH, split to two tubes with 700 µl each
- Vortex, incubate @ -80°C O/N
- Precipitate, reconstitute, proceed to gel separation with subsequent electroelution as shown in Protokoll 12

Protokoll 12: Electroelution (EE) of Sfi-I-digested pComb3X-SS vector

Nota bene: It is assumed, that the yield of clean-up and ethanol precip. is 100 % (36 µg); so the concentration is 360 ng/µl (36 µg in 100 µl). For check of digestion, 2.1 µl have been taken from 100 µl, so about 98 µl left (with 35.3 µg).

- Prepare 1 % preparative gel with ethidium bromide (2 µl in 110 ml TAE)
- Use thin broad lane comb
- Run 1 kb ladder (Agilent Cat# 201115) alongside with Sfi-I digested vector (10 µl + 2 µl 6x dye)

- Aim to load each well with 2.5 µg (7 µl at this concentration), at a vol. of 30 µl for each lane (total vol. 8x 30 µl = 240 µl):
 - Take 8x 7 µl = 56 µl (with 20 µg DNA) out of 98 µl stock
 - Bring to 200 µl by adding 144 µl STLE (sterile filtered)
 - Add 6x dye (40 µl)
- Load each of the 8 lanes with 30 µl of DNA-dye-STLE-mix
- Load standard in most distant lane
- Run gel for 3 h @ 110 V, take quick look with UV and take photo (Do NOT contaminate gel with DNA stuff sticking inside of UV chamber! Prevention by plastic wrap!)
- Cut digested (double-cut) pComb3X out (@3400 bp) on UV table (Do prevent contamination of gel by plastic wrap and prior bleaching!), collect in 50 ml Falcon, and subject this to EE
- Cut double-cut stuffer fragment (@1600 bp), put into 50 ml Falcon, and freeze @-20°C until gel purification (GP), if needed, OR just cool when GP is performed on same day
- **In the meantime (after about 2 h of gel electrophoresis)** prepare Whatman EE system:
 - Carefully wash and bleach and rinse system (bleach with paper towel, rinse with deionized water, dry with paper towel)
 - Prepare 1.6 liters of 1x TAE in graduated cylinder (about 1.2 liters needed)
 - Set up Whatman device as stated in manual (outer membranes are BT1, inner membrane is BT2; wet membranes in 1x TAE and do not let them dry out!)
 - Form small trap between BT2 and BT1 membranes on the right (+ side)
 - Insert gel slices into the large elution chamber in between left BT1 membrane and BT2. Stack slices directly in front of BT2 membrane!
 - Fill all chambers equally with 1x TAE until gel slices are covered (about 1.2 liter 1x TAE needed)
 - Run at 150 V (run current in correct orientation!) for 90 min, then collect eluate from trap every 30 min for a total time of 3 h (total 4 collections).
 - IMPORTANT: Switch off current before collection!
 - Before last (4th) collection, **reverse current flow for 30 s at 200 V**, then collect last eluate!
 - After every collection of eluate, refill trap with appropriate amount of 1x TAE
 - Yields of eluate collection:

1 st	90 min	1635 µl
2 nd	120 min	1780 µl
3 rd	150 min	950 µl
4 th	180 min (+revers.)	1200 µl
 - Calculate pooled eluate (collected in 50 ml Falcon on 4°C wet ice; total 5565 µl) and divide to 16x 2ml Eppendorf tubes (with 347.8 µl each), then add 1/9th of 3 M NaOAc pH 5.2 (38.6 µl), 2 µl glycogen, 2.5x of tot. vol. 100 % EtOH (for mol. biol., Sigma; 996 µl), put at -80°C O/N
 - Ethanol precipitate and gel quantitate with 1 kb DNA ladder with known concentrations for each band (Agilent Cat #201115), use 500 ng, 350 ng, 125 ng of ladder
 -
 -

Protokoll 13: Large ligation of Sfi-I-cut & gel purified VH-Vκ and VH-Vλ PCR overlap products into linearized pComb3X vector

Sfi-I-cut and gel purified VH-Vλ: 1.40 µg in 50 µl stock (28 ng/µl)
 Sfi-I-cut and gel purified VH-Vκ: 1.57 µg in 105.8 µl stock (14.8 ng/µl)

Sfi-I-cut and electroeluted pComb3x - EE1: 4.4 µg in 119.5 µl stock (36.8 ng/µl)
 Sfi-I-cut and electroeluted pComb3x - EE2: 4.9 µg in 100.2 µl stock (49 ng/µl)

(Numbers above are after test ligation and before large ligation; ratios below stem from test electroporations to determine highest yield of transformants)

Tube#	VH-Vλ
Ratio	1:3
Nuclease free water	103.5 µl
10x ligation buffer	20 µl
Vector (1.4 µg)	29 µl
VH-Vλ insert	1.05 µg (37.5 µl)
T4 DNA ligase	10 µl
Total	200 µl

Tube#	VH-Vκ
Ratio	1:2
Nuclease free water	93.7 µl
10x ligation buffer	20 µl
Vector (1.4 µg)	29 µl
VH-Vκ insert	0.7 µg (47.3 µl)
T4 DNA ligase	10 µl
Total	200 µl

Split 200 µl to 2x 100 µl (in PCR tubes) and put into PCR machine. Apply the following incubation scheme:

20°C for 18 h
 70°C for 10 min („heat kill“ of ligase)
 4°C for ∞

Prepare ethanol precipitation (for each ligation reaction of 100 µl take 98 µl of reaction vol. + 2 µl Glycogen + 11.1 µl NaOAc + 282.8 ml EtOH, 100%) and store @ -80°C until **ethanol precipitation is performed (just prior to large scale electroporation)**:

Spin @ 13,400 rpm for 15 min, remove supernatant
 Wash with 600 µl of freshly made 70% EtOH
 Spin @ 13,400 rpm for 10 min, remove supernatant
 Buzz down, remove rest of sup.
 Dry @ speedvac @ medium heat for ca. 80-90 s (according to pellet size, do not overdry pellet!)
 Resuspend DNA of each lig. reaction vol. (98 µl) in 10 µl of nuclease-free water
 Ensure solving of DNA pellet
 Put ligation product on ice, ready for electroporation

Nota bene: Ratios of vector:insert relate to molecular size (vector: about 3400 bp; insert: about 800 bp; so ratio of vector to insert is about 1:4). This means, that 140 ng vector and 105 ng insert (140/105=1.33) relates to a ratio of 1:3 for ligation purposes.

Take 2 µl of each test ligation (4 µl for each lambda and kappa), freeze at -20°C and run later on on 1% SeaKem Gold agarose gel for 90 min (take appropriate mol. weight standard!), take photo and check ligations optically on print-out.

Protokoll 14: Electroporation of final ligation products (vector with inserts) into electro-competent XL-1 blue E. coli

Requirements

6 % bleach (clean all surfaces, pipets, electroporation device)
 XL1-Blue Electroporation-Competent Cells (4 tubes + 1 as reserve; Lot#0006164574, Agilent)
 Precipitated and washed ligated vectors

VH-Vλ-pComb3X, ligated, ratio 1:3	10 µl
VH-Vκ-pComb3X, ligated, ratio 1:2	10 µl

SOC medium (sterile)

6x LB plates + 100 µg/ml Carbenicillin (Sigma), labelled

VH-Vκ: 5 µl, 0.5 µl, 0.05 µl; VH-Vλ: 5 µl, 0.5 µl, 0.05 µl

Electroporation system (Bio-Rad MicroPulser, Cat# 1652100)

0.2 cm electroporation cuvettes (Bio-Rad, Cat# 1652082)

SB medium (sterile)

Falcon tubes (15 ml, 50 ml), Eppendorf tubes (1.5 ml)
 Pipet tips suitable for cuvettes (long tips, 200 μ l)
 2 ml serological pipets + pipet aid
 Ice
 Dry ice
 L-shaped loops (for scratching out bacteria), turn table
 2 timers (4x 60 min pre-set)
 Incubator (at 37°C)
 Shaking incubator (at 37°C, 225-250 rpm)
 Carbenicillin (C) stock with 100 mg/ml
 Tetracyclin (T) stock with 10 mg/ml (in 70% EtOH)
 Kanamycin (K) stock with 25 mg/ml

Preparations

1. 8x 1.5 ml tubes: κ : 50 μ l, 5 μ l, 0.5 μ l, 0.05 μ l; λ : 50 μ l, 5 μ l, 0.5 μ l, 0.05 μ l
2. Store one tube of electrocomp. XL1-blue cells on dry ice for each ligation reaction
3. Add 3 ml of SOC medium to 15 ml labelled Falcon for each ligation reaction (4) and hold at 37°C (incubator)
4. Labelled 50 ml Falcon tubes, one for each ligation reaction (κ 1, κ 2, λ 1, λ 2)
5. Transfer 45 ml (with serological pipet) of sterile SB into 50 ml tube and sit on RT
6. Precool cuvettes on ice, one for each ligation reaction
7. Turn electroporation device on, set "bacteria" and "Ec2"
8. Set timer(s) to 60 min, one for each ligation reaction
9. Put labelled LB plates into incubator (at 37°C), 3-4 for each ligation reaction
10. WORK FAST (otherwise cells will die)

Electroporation

- thaw electrocompetent XL-1 blue E. coli cells for 1 min
- add 5 μ l of ligation into one tube of XL1-blue E. coli competent cells
- using p200 μ l pipet tip stir and gently mix
- pipet up DNA/XL1-cells with p200
- transfer DNA/XL1-cells into cuvette (without airbubbles!)
- tap down the cuvette and wipe the outside of cuvette thoroughly
- place holder into position
- place cuvette into holder
- slide holder all way into place
- ensure "Ec2" program, press pulse button, wait and record time and voltage
- remove the cuvette from holder
- add 1 ml of prewarmed SOC medium to cuvette with 2 ml serol. pipet
- draw off the fluid from cuvette and place into 50ml tube
- repeat add 1ml of SOC two more time
- place falcon tube (with 3 ml of electroporated cells in SOC) into incubator (**250 rpm**, 37°C), start 1 hour timer
- set up for next electroporation (κ 1, κ 2, λ 1, λ 2)
- Time constants: λ : 4.7 ms, 4.3 ms; κ : 4.4 ms, 4.5 ms (all @2.5 kV)
- After 1 hr incubation, add 10 ml of **SB/C/T (45 ml SB/11.7 μ l C/58.5 μ l T)** to each tube
- remove 50 μ l of culture from κ 1 and κ 2, transfer to labeled κ 50 μ l tube (combine 50 μ l aliquots for titering of cfus); remove 50 μ l of culture from λ 1 and λ 2, transfer to labeled λ 50 μ l tube (combine 50 μ l aliquots for titering of cfus)
- Incubate the 13ml cultures @37°C & **300 rpm** for 1 hour (increase of rpm from 250 here!)
- Titer at 5 μ l, 0.5 μ l, 0.05 μ l for κ and λ (prepare serial dilutions as follows: 2x50 μ l of cultures into first tube, transfer 20 μ l of first tube to second tube with 180 μ l of prewarmed SB medium, gently vortex; transfer 20 μ l of second tube to third tube with 180 μ l SB medium, gently vortex; transfer 20 μ l of third tube to fourth tube with 180 μ l SB medium (1:1=50 μ l, 1:10=5 μ l, 1:100=0.5 μ l, 1:1000=0.05 μ l)
- Plate dilutions onto LB/Carbenicillin plates, incubate after 10 min incubation (upside-up) @37°C O/N (upside-down)
- Add **3.9 μ l of Carbenicillin** stock into each tube

- Incubate @37°C & 300 rpm for 1 hour, prepare 2x 500 ml flask: κ and λ, transfer 100 ml of sterile SB into each flask, add antibiotics later on
- Combine κ1+κ2 and λ1+λ2 in one 50 ml falcon tube (with serol. pipet)
- Add 10¹² VCSM13 helper phage to each 26 ml of combined culture
- Incubate for 15min @RT without shaking (adherence of phages to cells)
- Add each 26 ml culture to **100 ml SB/C/T (100 ml SB/50 μl C/100 μl T)**
- Incubate @37°C & 300 rpm for 2 hours
- Add **355 μl Kanamycin** to each 126.72 ml of culture (final concentration of K = 70 μg/ml)
- Incubate @30°C & 300 rpm O/N – here: 16 h 30 min
- On the next morning, prepare P0 phage harvest and take plates out of incubator, seal with parafilm and put to 4°C freezer until counting the colonies on the plate and calculation of cfus
- Repeat for a second time for each VH:VK and VH:VL overlap-containing pComb3X vector preparations

Counting plates

	5 μl	0.5 μl	0.05 μl
κ	TMTC	TMTC	1440
λ	TMTC	TMTC	1160

κ transformants = (1440 cfu/ 0.05 μl) x 26'000 μl = 7.49 x 10⁸

λ transformants = (1160 cfu/ 0.05 μl) x 26'000 μl = 6.03 x 10⁸

Protokoll 15: Phage harvest (VH-VK and VH-VL phage) from electroporations

- Switch on ultracentrifuges early and let cool down to 4°C, put needed SLA-1000 Sorvall rotor at 4°C
- Transfer 126 ml of κ culture to 3x 50 ml tubes
- Transfer 126 ml of λ culture to 3x 50 ml tubes
- Spin @FX6100 rotor for 15 min at 4°C and 6000x g
- Label and freeze cell pellets @-20°C
- Transfer cultures to 4x high speed centrifuge tubes, adjust volume for centrifugation
- Spin @Sorvall GD34 for 15 min at 4°C and 15'000 g
- Transfer the supernatants to large centrifuge tubes (here: total vol. 121.5 ml for both VH-VK and VH-VL)
- Add ¼ vol. 5x PEG (30.4 ml to each tube) and incubate on ice with shaking for 30 min (total vol. 150 ml)
- Spin @Sorvall SLA-1500 for 30 min (or longer) at 4°C and 15'000 g, no brake (or very little)
- Aspirate the supernatants carefully without touching the phage “pellet” (smear on inside of tube) with vacuum aspirator (add sodiumhypochlorite to aspirate later on, final conc. 0.5-1%)
- Let tube sit on ice while phage “pellets” face up for 10min
- Aspirate remaining supernatants
- Add 2 ml of 1% BSA/TBS into each large tube and resuspend phage “pellet” by shaking on bench top for 30 min (do not use pipet and do not let dissolved phage get into top of tube!)
- Transfer phage into clearly labeled Eppendorf tubes
- Spin for 5 min @RT and 13'400 rpm
- Transfer to a new, clearly labeled Eppendorf tube and save it @4°C – these P0 phage preps are very valuable and must never be disposed! They represent the immortalized antibody repertoire of that individual! At 4°C these phage preps survive for decades! For panning purposes however always reamplify phage preps, because scFvs on pIII coat protein may be cut off in P0 phage pools over time.
- Proceed to titrating of phage (input phage titers to first panning/selection on antigen)

Protokoll 16: Input titering of pooled VH-VK A and B phage & pooled VH-VL A and B phage (A and B stand for the large electroporations 1 and 2 with subsequent phage harvests)

- prepare 3x 50 ml tube with **10 ml SB/10 µl T** (when preparing XL-1 cells, always add T=Tetracycline!)
- Label tube with 6 µl, 3 µl, 1 µl
- plate 6 µl, 3 µl and 1 µl of XL1-blue electrocomp. E.coli in tube
- incubate @37°C & 300 rpm for 2 hour (or longer as needed; 6 µl dil. was @OD600=0.5 after 3 h 10 min)
- Check OD600=0.5 (with cuvette and optical reader)
- Pool 50 µl of κ a and 50 µl of κ b in one tube
- Pool 50 µl of λ a and 50 µl of λ b in one tube
- Set up 12x 1.7 ml Eppendorf tubes, use 2 µl of stock phage from λ and κ, make dilutions with SB medium: Prepare dilutions: 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ (**2 µl + 198 µl; 2 µl + 198 µl; 2 µl + 198 µl; 20 µl + 180 µl; 20 µl + 180 µl; 20 µl + 180 µl**)
- Take 2 µl from 10⁻⁶; 10⁻⁷; 10⁻⁸; 10⁻⁹ P0 phage dilution and add to a 1.7 ml Eppendorf tube containing 100 µl of XL1-blue cells @OD600=0.5, mix by mild vortexing and incubate @RT for 15 min (no shaking!)
- after 15 min incubation @RT, proceed to plate phage infected culture on LB/Carb plates as follows:
- Take 51 µl of infected cells culture from tube labeled:
pooled κ: 10⁻⁷; 10⁻⁸; 10⁻⁹ and
pooled λ: 10⁻⁷; 10⁻⁸; 10⁻⁹
- Disperse 51 µl of culture across the surface of plate
- Let plates sit upside-up for 5-10 min @RT
- Transfer plates to 37°C incubator, placing plates upside-down on incubator O/N
- Remove plates in next morning, count colonies to determine phage titer

Pool λ	10 ⁻⁷	TMTC
	10 ⁻⁸	434
	10 ⁻⁹	48

Pool κ	10 ⁻⁷	TMTC
	10 ⁻⁸	362
	10 ⁻⁹	43

Phage (input) titer	λ	4.57 x10 ¹⁰ cfu/µl
	κ	3.96 x10 ¹⁰ cfu/µl

Input phage number

190 µl of λ + 210 µl of κ = 400 µl with 17.0 x10¹² P0 phages
 400 µl + 171.4 µl 10% milk (in 1x TBS/1mM CaCl₂) = 571.4 µl
 Use of 400 µl of this preparation means dilution of 0.7
Input phage of 17.0 x10¹² x0.7 = 11.9 x10¹² P0 Φ to first panning

Appendix V – Selektion antigenspezifischer Phagen mittels Phagen-Displays

Alle Protokolle basieren auf dem Phagen-Display-Protokoll von Barbas et al. (115). Die nachfolgend exemplarisch gezeigten 4 Protokolle stellen eine Auswahl der wichtigsten Protokolle dar, welche zur Selektion antigenspezifischer Phagenklone benötigt werden. Weiterführende Angaben finden sich in Referenzen (16, 56, 115).

Protokoll 1: Panning 1 of mixed pooled VH-VK & pooled VH-VL (mix equally according to titers)

- Start XL1-cell culture from frozen aliquots of cells:
 - Set up 3x 50 ml falcon tubes; place 12 ml of SB with 12 µl Tetracycline
 - Place 1 µl; 2 µl and 5µl XL1-cells @37°C & 300 rpm
- Allow wells and liquids come to RT for 20 min
- Break off 4 wells from a MBL Mesacup Dsg3 ELISA kit microwell strip
- Fill the wells with 380 µl of 3% milk (in 1x TBS/1mM CaCl₂), cover the wells, and let block @RT for 1 h
- Combine 400 µl P0 Φ with 171.4 µl of 10% milk (in 1x TBS/1mM CaCl₂) for a final concentration of 3% milk with P0 Φ, block the phage-milk-mix @RT for 1 h
- shake out the blocking buffer from wells
- wash the wells with 2x 188 µl sterile filtered 1x TBS/0.1% Tween 20/1mM CaCl₂ (for 3 times)
- rap out the remaining washing buffer
- add 100 µl of the blocked P0 phage to each well for panning, prevent formation of airbubbles while pipetting!
- cover the wells and incubate @RT for 2 h
- shake out the phage (AVOID CONTAMINATION WITH PHAGE AT ANY TIME!)
- fill the wells (with multichannel pipet) with 2x188 µl 1x TBS/0.1% Tween 20/1mM CaCl₂ (AVOID CONTAMINATION WITH PHAGE AT ANY TIME!)
- gently pipet washing buffer up and down 5 times, then let sit for 5min (AVOID CONTAMINATION WITH PHAGE AT ANY TIME!)
- shake out washing buffer
- **repeat the wash process 5 times for the first panning (increase to 10 from second panning on)**
- rap out remaining washing buffer
- add 100 µl of 76 mM Citric Acid (pH 2.2) to each well for elution, incubate elution buffer @RT for 10 min
- pipet the elution buffer up and down 10x vigorously (DO NOT CONTAMINATE PIPET WITH PHAGE!)
- transfer (and pool) the elution to a 50 ml falcon tube with 36 µl of 2 M unbuffered TRIS base (neutralized phage can then stay in 4°C, if cells not ready)
- add 10 ml of XL1-cells with OD=1.0 to eluted and neutralized phage
- incubate @RT for 15 min, do not shake!
- pour culture into a 125 ml Erlenmeyer flask
- add 10 ml of prewarmed SB/Carb/Tetrac (**15ml of SB/6 µl C/15 µl T**) to falcon which has been used for culture, then transfer 10 ml to Erlenmeyer
- remove 100 µl of 20 ml tot. vol. for titering the elute subsequently
- incubate @37°C & 300 rpm for 1 h
- after 1 h, add 6 µl Carbenicillin to culture and incubate @37°C & 300 rpm for 1h
- after 1h, add 10¹² helper phage (290 µl of 01-31-13 stock)
- incubate @RT for 15 min
- transfer total culture vol. of about 21 ml to 100 ml SB/C/T (**100 ml SB/50 µl C/100 µl T**) in 500 ml Erlenmeyer flask
- incubate @37°C & 300 rpm for 2 h
- add 341 µl of Kanamycin to culture (final conc. = 70 µg/ml)
- incubate @30°C & 300 rpm O/N (here: 15 h)

Titer the cultured eluate on 4 LB/Carb plates at 50 µl; 5 µl; 0.5 µl and 0.05 µl (make serial 1 to 10 dilutions with 20 µl of culture + 180 µl of SB; then plate 50 µl of each dilution onto plates). This is the output phage titer from the first panning (P1 Φ).

50 µl	TMTC
5 µl	TMTC
0.5 µl	221 cfu
0.05 µl	14 cfu

$221 \text{ cfu} \times (1/0.5 \text{ µl}) \times 20'436 \text{ µl} = 9 \times 10^6$ transformants from first panning (P1 Φ)

Proceed to phage harvest from panning 1 as described above in Appendix IV, Protokoll 15. Then continue with phage input titering as described above in Appendix IV, Protokoll 16. Then proceed with next round of panning; increase wash steps to 10 washes beginning with panning 2. Always titer before and after panning (output/input titering), as shown above. Usually, for immobilized antigens, 2-4 panning rounds suffice. Exert extreme caution regarding phage crosscontamination of experiments and between panning rounds. After 2-4 panning rounds, perform anti-M13-ELISA to check for increase in specific binding of polyclonal phage pools towards antigen of choice.

Protokoll 2: P0, P2-P4 polyclonal anti-M13-HRP Φ ELISA

- Prepare 1:1000 and 1:5000 dilution of polyclonal phage pools in 3% milk/TBS
 - Prepare 1:100 dilution first (2 µl + 98 µl), then take 100 µl of 1:100 and add to 900 µl (resulting in 1:1000). Take 200 µl out of 1:1000 and add to 800 µl (resulting in 1:5000). Prepare these dilutions for each phage panning (P0, P2, P3, P4; you will need 4x3 1.7 ml Eppendorf tubes)
- Block Dsg3 and Dsg1 ELISA wells with 380 µl 3% milk/TBS for 1 h
- Dump out blocking buffer from ELISA wells
- Wash the wells with 0.1% Tween 20/TBS/1 mM CaCl₂ for 3 times (2x185 µl x3)
- Add 100 µl of phage dilutions as indicated below

	Dsg3	Dsg3	Dsg1	Dsg1	BP230	BP230
PV3a P0	1:1000	1:5000	1:1000	1:5000	1:1000	1:5000
PV3a P2	1:1000	1:5000	1:1000	1:5000	1:1000	1:5000
PV3a P3	1:1000	1:5000	1:1000	1:5000	1:1000	1:5000
PV3a P4	1:1000	1:5000	1:1000	1:5000	1:1000	1:5000
Background	3% milk	-	3 % milk	-	3% milk	-

- Incubate @RT for 2 h
- Dump phage out (AVOID CONTAMINATION WITH PHAGE AT ALL TIMES!)
- Wash the wells with 0.1% Tween 20/TBS/1 mM CaCl₂ for 6 times (2x185 µl x6)
- Add 100 µl of 1:5000 diluted anti-M13-HRP (GE Healthcare, Cat# 27-9421-01) to each well (10 ml TBS/1% BSA/1 mM CaCl₂ + 2 µl anti-M13-HRP), incubate @RT for 1 h
- Dump out liquids
- Wash the wells with 0.1% Tween 20/TBS/1 mM CaCl₂ for 6 times (2x185 µl x6)
- Add 100 µl freshly prepared ABTS to each well (one 50 mg tablet into 5 ml buffer gives a 10x solution; dilute this 10x ABTS to 1x ABTS by taking out 1 ml 10x ABTS and add to 9 ml buffer)
- Incubate @RT and protected from light!
- Measure OD @30 min, 45 min, 60 min, 90 min @λ=405-490 nm and prepare Excel file with graphs

Protokoll 3: Preparation of monoclonals for subsequent plasmid DNA isolation and monoclonal phage preparation

Pick up monoclonal colonies

- Combine 40 ml SB + 20 µl Carbenicillin (C) + 40 µl Tetracycline (T) in 50 ml Falcon tube, prepare 2 sets
- Split 2x 40 ml SB + C + T to 8x 50 ml Falcon tubes with 10 ml each
- Pick up a single, isolated bacterial colony from a P4 output titering plate (here: 0.005 dilution plate from P4, colonies marked by orange marker on plate plastic), either with sterile loop or sterile filter tips for pipetting (sitting on pipet)
- Place the colony into one of the aliquots of 10 ml SB + C + T, repeat for 7 more colonies, and let grow O/N @37°C and 225 rpm

Next day:

Glycerol stock, dilution of O/N culture, cell pellets for DNA prep

- Label 8 cryovial tubes PV3a 4-1 to 4-8, aliquot 500 µl of 30 % Glycerol (sterile filtered, in LB), and add 500 µl of O/N culture to the labeled tube
- Store @-80°C indefinitely (backup)
- Prepare 1 set of 15 ml Falcons, labeled with 4-1 to 4-8 and PV3a
- Transfer 3 ml of remaining approx. 9.5 ml to 15 ml Falcons and spin @4'000 g and 4°C for 15 min; alternatively use 2.0 mL Eppendorf tubes and spin down culture here, if needed for 2x, or more times
- Aspirate off the supernatant and put the cell pellets into labeled plastic bag, seal bag, and freeze @-20°C for DNA prep (miniprep procedure)

If desired: Prepare Φ monoclonals from glycerol stock (see Protokoll 4 below)

Protokoll 4: Φ monoclonals for monoclonal phage testing (e.g., by anti-M13-ELISA on antigen)

Pick up monoclonal colonies (described here for 4 monoclonal phages)

- Combine 40 ml SB + 20 µl Carbenicillin (C) + 40 µl Tetracycline (T) in 1x 50 ml Falcon tube
- Split 40 ml SB + C + T to 4x 50 ml Falcon tubes with 10 ml each
- Thaw monoclonal glycerol stock, dip loop into it and subsequently dip loop into prepared SB+C+T
- Let grow O/N @30°C and 300 rpm in incubator (little turbidity after 18 h, good turbidity after 21 h incubation)

Next day:

Glycerol stock, dilution of O/N culture, cell pellets for DNA prep. and Φ prep.

- Label 4 additional cryovial tubes, aliquot 500 µl of 30 % Glycerol (sterile filtered, in LB), and add 500 µl of O/N culture to the labeled tube, store @-80°C
- In 4 Erlenmeyer flasks (125 ml) combine 33 ml SB with 16.5 µl C and 33 µl T
- Add 330 µl of respective O/N culture in each tube (resulting in a 1:100 dil.)
- Place in incubator @37°C and 300 rpm until OD is about 0.3 (takes about 3-5 h)
- From remaining culture, take out 4.5 ml and transfer to 15 ml Falcon, spin @4'000 g and 4°C for 15 min; alternatively use 2.0 mL Eppendorf tubes and spin down culture here, if needed for 2x, or more times
- Aspirate off the supernatant and put cell pellets into labeled plastic bag, seal bag, and freeze @-20°C for DNA prep. (i.e., miniprep procedure – if at all desired for 2nd sequence check)

- When culture in 125 ml Erlenmeyer flasks reach OD of about 0.3, add 2.5×10^{11} VCSM13 helper phage to each flask, incubate without shaking for 15 min @37°C (in incubator), then incubate @37°C and 300 rpm for 2 h
- Add **92 µl of Kanamycin (K) to 32 ml flasks** (flasks which has been taken for OD measurements) and add **95 µl of K to 33 ml flasks** (final concentration of K of about 70 µg/ml), incubate @30°C and 300 rpm O/N

Next day:

Harvest Φ

- Transfer the culture from the 125 ml flasks to 50 ml Falcon tubes, spin @6'000 g and 4°C for 15 min
- Transfer the supernatant to high speed centrifuge tubes, spin @Sorvall @15'000 g and 4°C for 15 min, discard cell pellet
- Transfer supernatant from each tube to new (and clear!) high speed centrifuge tube (25 ml vol.)
- Add ¼ vol. (6.25 ml) of 5x PEG to each tube, mix well by inverting
- Allow to rock on ice for >=30 min
- Spin @Sorvall @15'000 g and 4°C for 36 min (brake off!)
- Aspirate the supernatant with sterile glass pipette and vacuum (hood)
- Drain with pellet up and tubes at an angle for 10 min (on ice)
- Aspirate all remaining supernatant and resuspend the pellet in 500 µl of 1 % BSA/TBS, allow tubes rocking (@RT) and tubes at angle (pellets down) for 0.5-1 h (do not pipette up and down!)
- Use 2 ml pipet to transfer the suspension into 1.7 ml Eppendorf tube
- Spin @RT and 13'400 rpm in bench top centrifuge for 5 min
- Transfer supernatant into new 1.7 ml Eppendorf tube and store clearly labeled @4°C until monoclonal anti-M13 phage ELISA – these are phage monoclonals

Appendix VI – Isolation monoklonaler Plasmid-DNA, Produktion monoklonaler Antikörperfragmente

Alle in dieser Dissertationsschrift gezeigten monoklonalen Antikörper sind bis auf die cDNA-Ebene charakterisiert worden. Die vollständigen Sequenzen der monoklonalen Antikörper werden hier auf Grund laufender Patentierungsverfahren nicht gezeigt, können jedoch beim Promovenden (zu Forschungszwecken) erfragt werden. Die vollständigen Sequenzen der hier durch den Promovenden mittels LCS-APD erhaltenen Antikörper GB4P4-7 und GB8P3-8 aus Panel sind im Supplement der Referenz (111) gezeigt.

Protocol 1: QIAGEN miniprep plasmid DNA purification of antibody phage display-derived monoclonals

Take one set of 8 cell pellets in 15 ml Falcon tubes (3 ml)/2 mL Eppendorf tubes out of -20°C freezer (see Appendix V) and

- re-suspend each bacterial cell pellet with 250 µl of provided **P1 buffer**
- Transfer cell suspension to 1.7 ml Eppendorf tubes, if working with Falcon tubes
- Add 250 µl of **P2 buffer**, invert tubes approx. 5x to mix
- Add 350 µl of **N3 buffer** and mix immediately by inverting the tubes approx. 5x
- Spin @13'000 rpm for 10 min in tabletop centrifuge
- Transfer supernatant into new 1.7 ml tube

- Add 2 µl of glycogen and 600 µl Isopropanol (resulting in 0.7x vol.) to each tube, vortex
- Incubate @-80°C for 15 min (or longer, if interruption desired, or O/N)
- Spin tubes @13'000 rpm for 15 min
- Aspirate and discard supernatant, let tubes air dry for a couple of minutes
- Dissolve whitish DNA pellet in 100 µl of nuclease-free water

- Add 500 µl of **buffer PB** to each tube, vortex and spin down briefly
- Apply each 600 µl of PB buffer-DNA-mix to a spin column
- Spin for 1 min @13'000 rpm
- Discard flow through
- Add 750 µl of **buffer PE** to each column and spin @13'000 rpm for 1 min
- Discard the flow through
- Spin column dry for 1 min @13'000 rpm
- Transfer the column to fresh 1.7 ml Eppendorf tube (without lid)
- Add **50 µl elution buffer EB** to center of filter of each column
- Incubate @RT for 1 min
- Spin @13'000 rpm for 1 min to elute
- Collect DNA and transfer to a fresh and clearly labeled 1.7 ml Eppendorf tube
- Determine DNA concentration, using nanodrop and 2 µl of undiluted sample, buffer EB as blank solution, print results and absorbance graphs of all probes

- Prepare premixed DNA template for sequencing: Final vol. is 9 µl; depending on DNA concentration (should be 200-300 ng/µl) take 1 µl of DNA, 1 µl of 4 µM primer and adjust to 9 µl final vol. with nucl.-free water. To allow for re-sequencing, do prepare double amount (final 18 µL). Forward sequencing through insert via ompseq primer, reverse sequencing through insert via dpseq primer (see Appendix IV for primer sequences)
- Pipet into microtube-strips (0.2 ml) for sequencing, prepare premixed DNA sequencing request form (www.research.chop.edu/cores/napcore); print 2x, one for napcore, one for own documents, bring personally to Room 906 in CHOP Abramson Research Bldg.

Protocol 2: Expression of soluble scFv Antibody fragments in E.coli

Day 1: Transform TOP10F' cells with purified plasmid (after following the entire QIAGEN miniprep procedure, including the spin column steps!) as follows

1. Thaw one 50 µl vial of TOP10F' one shot cells (blue cap; Invitrogen Cat#C303003) on ice
2. Add 5 µl of plasmid (in -20°C) directly to the vial and mix by gently tapping the tube (do not mix by pipetting up and down; prevent contamination with plasmid!) and incubate cells with plasmid on ice for 15 min
3. Incubate for 30 seconds (no longer!) in 42°C water bath, then quickly place on ice.
4. Add 250 µl of prewarmed SOC medium (37°C incubator) to vial. Place vial at an angle of about 30° in shaker incubator (at 37°C; fix with tape on shaking platform). Shake for 1 h at 250 rpm.
5. Then spread 50 µl of at least a 1:10 and a 1:1000 dilution (not a typo! For bad producers, you need 1:10, for good/very good producers, you will need the 1:1000 dilution) (made with prewarmed SOC) on LB/Carbenicillin plates (Sigma, precasted; or self-made LB/C plates). Incubate plates for 15 min with upside up, then turn plates and incubate O/N with upside down until next morning. To prevent overgrowth of colonies, put plates at 4°C until needed (here: from noon until 4 pm).

Day 2: Make starter culture from LB/C plate or glycerol stock

1. Around 4 pm, pick one single colony from the plate (alternatively, take TOP10F' glycerol stock which already had been sequence-confirmed), culture in 25ml SB/CB (25 ml SB+25µl of 1000x CB stock) + 500ul of 1M MgCl₂ in 125 ml Erlenmeyer flask with 0.2µm vent cap, incubate in 30C, O/N

Day 3: Grow larger cultures (here: 1,000 mL; 2x 500 ml each) and prepare glycerol stock

1. Make new Top 10 F' glycerol stock: 500ul of culture + 500ul of 30% glycerol/LB and save it at -80°C indefinitely (backup)
2. Dilute the culture 2x 1 to 100 in 500 ml SB/CB (500 ml SB/500 µl 1000x CB + 5 ml of starter culture) + 10 ml of 1M MgCl₂, culture at 37C/300rpm for 3-4 hours, until OD₆₀₀ = 0.8-1.0
3. Then add 1M IPTG 1 to 1000 into 500 ml culture (500 µl; final conc. 1 mM), incubate the culture at 30C /250 rpm overnight

Day 4: Harvest and freeze pellets, extract protein on same day or after a break

1. Pour the cultures into 500ml centrifuge bottles, spin 8'000g x 30 min to pellet bacteria, save the supernatant at 4°C (take a new, autoclaved 1L bottle)
2. Freeze pellets at -20°C (*break here, if wanted*)
3. Resuspend all 2 pellets in total 100 ml of 1X (10 ml of 10x + 90 ml of ddH₂O) fastbreak lysis buffer (combine pellets into one 500 ml centrifuge bottle), make sure all pellet is completely in solution (help with serological pipet and pipet aid). Add 100 ul of DNase I to 500 ml bottle (containing both pellets).
4. Incubate with shaking for 1 hour at RT on a shaking platform
5. Transfer the lysis solution into 50 ml Falcon tube and spin in Lynx high-speed centrifuge at 15'000 g for 15 min at 4°C. Repeat in new Falcon tubes once more.
6. In the meantime, wash Talon Resin (gently bring beads into solution in stock!) with 50P/300N buffer 3x (here, for 1,000 ml cultures, I use 4 ml, distribute resin to 4x 2 ml protein low bind Eppendorf tubes; wash 3x with 1 ml each; spin @ 800 g for 2 min each, DO NOT TOUCH THE BEADS SPUN DOWN WITH PIPETTE/DO NOT SUCK AWAY BEADS by pipetting away the supernatant/wash buffer)
7. Fill sups from 2x high-speed centrifuging into 2 new 50 ml Falcon tubes

Talon beads purification

1. After washing the beads (see above) mix the beads with lysates in 50ml Falcon tubes (50 ml lysate + 2 ml beads (in solution)), add imidazole from 300 mM stock (in 50P/300N) to a

final concentration of 10 mM imidazole in 50 ml (here: 1,666 μ l), incubate the lysate / beads in rotator at RT for ~1 hour

2. Pre-wash the new BioRad column once with 10 ml 50P/300N, load the column with lysate / beads mixture and collect the passthrough; apply passthrough on column once more; save passthrough at 4°C (DO NOT DISPOSE!)
3. Wash the column with 10 ml of 50P/300N for 3 times (put 20 ml into original Falcon tubes from rotating to get every bead out of it; then wash directly with the last 10 ml from the 50P/300N stock)
4. Elute each scFv with 1.5 ml of 300mM imidazole/50P/300N for 10 times into 2 ml protein low-bind Eppendorf tubes (use yellow stop cock for column!).

SDS-Gel (same or next day: Day 5)

1. Take a 18-well SDS-gel (345-0033, BioRad Criterion)
2. Load with marker (6 μ l), BSA standard (0.2 μ g, 0.5 μ g, 1 μ g, 2 μ g), elutes 1 to 3: 15 μ l (+15 μ l SB/b-ME) each; run @ 200 V for 55 min
3. Wash the SDS-gel with water for 5 min x 3
4. Add simple blue staining solution and stain the gel in RT for 1 hour
5. Distain the Gel with MilliQ water O/N

Dialysis of scFv

1. Dialyse the elution(s) (take elution with highest yield only; do not always pool all elutes!) against 1 l PBS for 4x, store scFv at -80°C if concentration is around 1 μ g/ μ l; if not, consider concentration (CAVE: High loss of protein possible!) – for concentration, do use Amicon 3K (or 10K) Dalton Ultra centrifuge spin filters
2. Apply scFv to downstream applications (IF, organ culture, dispase assay, ELISA/competition ELISA, ...)

Appendix VII – Validierung monoklonaler Antikörperfragmente

Das Protokoll zur Durchführung des anti-M13-ELISAs zum Nachweis polyklonaler/monoklonaler Phagen findet sich in Appendix V. Da dieser ELISA nur während der Phagenselektion von Relevanz ist, wird er hier nicht gesondert aufgeführt. Nachfolgende Protokolle beziehen sich auf die Validierung des scFv-Fragments allein, ohne Phagenpartikel.

Protokoll 1 (anti-HA-ELISA auf kommerziell erhältlichen ELISA-Platten):

Anti-HA-ELISA for detection of antigen-bound scFvs

Use multi-channel pipet especially for the last steps (substrate & stop). Only use MilliQ water for all purposes having to do with proteins (as in cell culture)!

1. Prepare self-made dilution buffer (50 mL):

5 ml	10x TBS (BioRad)
45 ml	MilliQ water
0.5 g	BSA (e.g., from Sigma, Cat# A7906; stored @4°C fridge)
25 µl	2 M CaCl ₂
Sterile filter (important!) and save at 4°C fridge	

2. Prepare self-made wash buffer (500 mL):

50 ml	10x TBS (BioRad)
450 ml	MilliQ water (see up for comment)
Take out 750 µl of 1x TBS mixture, then add	
250 µl	2 M CaCl ₂
500 µl	Tween 20 (very thick to pipet, pipet very slowly to get all 500 µL out of pipet tip and into solution!)
Sterile filter (important!), store at RT	

3. Prepare dilutions of scFv in self-made dilution buffer (e.g., 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000)
4. Load on Dsg3 wells from EUROIMMUN (100 µL of dilution each), wells must be from same LOT (control antigens for testing in same experiment may be Dsg1, BP180, BP230), incubate 60 min at RT; in last 10 min of this incubation time, prepare 1:1.000-dilution of anti-HA-HRP (Roche), in self-made dilution buffer, and keep on ice until needed in step 6
5. 3x wash with self-made wash buffer, each time wash with 360 µL (multi-channel pipet!); after disposing liquids into sink, rap out plate each time for 4-5 times on paper towels (upside-down)
6. Pipet 100 µL of anti-HA-HRP-dilution into each well, incubate 60 min at RT
7. 3x wash as in step 5
8. Pipet with multi-channel pipet 100 µL of substrate into each well (black bottle from EUROIMMUN kit)
9. Stop with 100 µL of stop-solution, pipetted with multi-channel pipet (important – stop all wells at same time).
10. Read out at 450 nm wavelength

Protokoll 2 (anti-HA-Immunfluoreszenz, z. B. auf Affenösophagussubstrat oder normaler, humaner Haut):

Anti-HA-Immunofluorescence microscopy of soluble scFvs on tissue substrate

Store slide away from direct light at all times (prepare box with wet paper inside and protective aluminium foil on the outside).

6. Prepare washing buffer (1 L with 100 ml 10x TBS from BioRad, Cat#1706435, 500 µl of 2M CaCl₂, 900 ml MilliQ, add Tween 20 to final conc. of 0.1%)
7. Prepare blocking buffer (Washing buffer with 1% BSA: 0.5 g of bovine albumin (Sigma, Cat# A-7906), add washing buffer to final vol. of 50 ml, sterile-filter sol. with 0.22 µm Steriflip)
8. Wash slide with washing buffer (3 min, 2x; in slide container, on rotating table)
9. Vacuum wells dry
10. Block wells with 35 µl blocking buffer per well for ~30 min
11. In the meantime, prepare samples (dilute with blocking buffer from above; prepare dilution series, e.g. 1:400, 1:800, 1:1.6k, 1:3.2k, 1:6.4k, 1:12.8k); include positive and negative controls on same slide, if available
12. After ~30 min blocking, vacuum wells and apply samples (scFv, syn. first antibody), incubate O/N at 4°C or for 60 min at RT
13. Wash with washing buffer 3 min 3x (Do not put entire slide into washing container! Wash every well separately by applying 35 µl of washing buffer on each well, with new tip for each well!) During washes, prepare secondary antibody (Anti-HA High Affinity, Rat monoclonal antibody, clone 3F10, Roche, Cat#13500600) in 1:100 dilution (in blocking buffer)
14. Apply 35 µl of anti-HA 1:100 onto each well (new tips!), incubate 60 min
15. In the meantime, prepare tertiary antibody (Invitrogen Alexa Fluor 594 goat anti-rat IgG H+L, Cat#A-11007) as follows: Resuspend antibody with pipet, gently vortex a few time, spin for 5 min at 8'000 rpm (purpose: get rid of bright clumps of dye on slide), then take out required vol. to prepare a 1:200 dilution in blocking buffer; keep protected from light at all times (aluminium foil) and keep on wet ice
16. Vacuum away the secondary antibody, wash 3x 3 min with washing buffer (individual washing of all wells), apply tertiary antibody (35 µl for each well) and incubate for 30 min.
17. Vacuum away the tertiary antibody, wash 3x 3 min with washing buffer (individual washing of all wells), do NOT rise in 95% EtOH.
18. Mount slide (use very little mounting medium), then cover slide with glass coverslip and immediately analyse at fluorescence microscope (keep slide in box at all times not needed); save images made also on own PC

Appendix VIII – Hochdurchsatzsequenzierung des V_H-Antikörperrepertoires

Patient's PV3 pan-IgG V_H repertoire was sequenced at time points PV3 and PV3a using Illumina® MiSeq 300-bp paired-end next-generation sequencing (Institute for Genome Sciences, University of Maryland). Protocols were originally established and shared from the laboratory of Aimee S. Payne, MD, PhD, and the amplicon was prepared with help from Christoph T. Ellebrecht, MD (both Dept. of Dermatology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, U.S.A.).

Primer sequences are shown below. Total RNA was isolated from peripheral blood mononuclear cells collected from 50-60 ml of blood using RNeasy Midi Kit (Qiagen) as previously described (protocol 9.2 in ref. (115)). cDNA was synthesized from 1-5 µg of RNA using a SuperScript IV RT kit with an oligo-dT primer (Invitrogen). For patient PV3 pan-IgG V_H repertoires were PCR-amplified using primer sets slightly modified from those previously described (115), containing a 6-nt barcode. All PCR reactions were carried out using NEB Q5 DNA Polymerase and products were purified using QIAGEN QIAquick PCR purification kit (111).

During the first round PCR, the transposase sequences were attached by primers carrying Illumina®-specific overhangs on both the forward and the reverse primer: For each of the 6 possible combinations of forward/reverse primers, five reactions of 50 µL each were prepared (49 µL master mix, 1 µL template or water). For a master mix of 6x49 µL, 7.5 µL of each 5' and 3' primer (at 20 µM stock concentration) were combined with 6 µL dNTP (at 25 mM stock concentration), 3 µL Q5 polymerase (NEB), 210 µL nuclease free water, and 60 µL 5x Q5 buffer (NEB) for a total of 294 µL. After removing 49 µL for the negative control, 5x 1 µL template cDNA was added to the remaining 245 µL. These were split up to 5x 50 µL and cycled as follows: 98°C for 1', then 12 cycles of 98°C 5", 64°C 15", 72°C 35". Then 72°C for 2' and hold at 4°C. All 30 PCR reactions were PCR purified in 6 pools (of each 5 reactions), then from each of the 6 pools 500 ng were combined for a final pool of amplicons, containing 3 µg of PCR product from the first round PCR. Second round PCR attaches Illumina® barcoded adaptors (indices i5 and i7 for multiplexing of sequencing samples; Nextera Index Kit, FC-121-1012, Illumina®) and flow-cell binding sites P5 and P7. For NGS library PV3, indices were i5=S501 and i7=N701. For NGS library PV3a, indices were i5=S501 and i7=N706. For a total of three reactions of 50 µL each, a 4x master mix was prepared as follows: 5' index primer and 3' index primer 20 µL each (stock concentration proprietary), 4 µL dNTP (at 25 mM stock concentration), 2 µL Q5 polymerase (NEB), 108 µL nuclease-free water, 40 µL 5x Q5 buffer (NEB) for a total of 194 µL. After removing 48.5 µL for the negative control, 3x 1.5 µL template from first round PCR (adjusted to 1 ng/µL) is added. After split to 3x 50 µL, samples are cycled as follows: 98°C for 1', then 12 cycles of 98°C 5", 64°C 15", 72°C 20", then 72°C for 2', then hold at 4°C. After gel purification of the final amplicon from an 1.5% agarose gel (stained with SYBR green, S33102 from Invitrogen; loading buffer without SDS, e.g., B7025S from NEB), additional Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter) purification is recommended (as per recommendations of the manufacturer). Final sample was shipped on dry ice to the University of Maryland, Baltimore, MD, U.S.A..

Tabelle S11: Primer für Hochdurchsatzsequenzierung

Primer ID	Primer Sequence (5' to 3')
VH1_miseq	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAGGTGCAGCTGGTGCAGTC
VH2_miseq	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAGATCACCTTGAAGGAGTC
VH35_miseq	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAGGTGCAGCTGGTGSAGTC
VH3a_miseq	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAGGTGCAGCTGKTGGAGTC
VH4_miseq	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAGGTGCAGCTGCAGGAGTC
VH4a_miseq	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAGGTGCAGCTACAGCAGTG
Miseq-panIgG-rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGXXXXXXGACSGATGGGCCCTTGGTGGARGC
S501 (i5)	(proprietary; can be obtained from Illumina® upon request)
N701 (i7)	(proprietary; can be obtained from Illumina® upon request)
N706 (i7)	(proprietary; can be obtained from Illumina® upon request)

Blue: overhang adaptors 5'; green: overhang adaptor 3'; orange: Illumina® indices i5/i7; red: internal, antibody phage display-related barcode for patient PV3a (here: library signature "E"=GCTAGT)

Appendix IX – Affinitätsaufreinigung Desmoglein 3-spezifischer Autoantikörper aus Serum

Protokoll 1 (mittels eigener Herstellung einer Desmoglein 3-Säule):

Affinity purification of Dsg3-specific antibodies from PV patients' plasma/serum for LC-MS/MS (here: AP2 of PV3a)

DAY 1: Clot plasma/'convert' to 'serum'

1. Take plasma (stored in low-bind Eppendorf tubes!) out of -80°C.
2. Thaw 3 ml of plasma on wet ice. Add 20 µl of 2 M CaCl₂ per 1ml of plasma (60 µl for 3 ml). Incubate at 37°C in water bath for 2 h. If no clots form, add bovine thrombin (Sigma T4648; at -20°C; for undiluted PV3a plasma, add 65 U per 1.5 ml; 130 µl of stock in brown vial [50 U/100 µl]; for PV1a 1:2-diluted plasma, just add 2 M CaCl₂). Keep 'serum' at 4°C O/N, no matter what was added to induce clotting (settling of clots O/N is important).
3. In 5 l plastic beaker, prepare 5 l of 1x DPBS (Add 500 ml of 10x DPBS/Ca²⁺Mg²⁺ to 4.5 l of MilliQ ddH₂O, remove ~3.5 ml and add ~3.5 ml of 10 N sodium hydroxide under continuous pH control; adjust to final pH of ~7.2; rinse pH meter thoroughly before putting it into the DPBS!) and store at 4°C O/N. Take out 2x 50 ml aliquots for washing purposes on Day 3 (and for control beads on Day 2) and store at 4°C.

DAY 2: Dialyze 'serum' and conjugate recombinant Dsg3EHis to NHS-activated agarose beads

1. Soak 8 kDa dialysis membrane in MilliQ ddH₂O for 30 min in a 1 l plastic beaker at RT. Rinse membrane thoroughly with MilliQ ddH₂O within this beaker. Precool centrifuge to 4°C.
2. Spin 'serum' (from treatment with CaCl₂, or CaCl₂ + bovine thrombin; thrombin-treatment may lead to 'gel-like' appearance of plasma – this is normal) at 8,000 rpm for 5 min at 4°C. Collect supernatant directly in 5 ml syringe (with Millex-HV 0.45 µm PVDF syringe filter), sitting on low-bind 2.0 ml tubes (have 3 tubes with 2.0 ml vol. ready), and pass it through; get every tiny rest out of filter. Save very small aliquot in low-bind tube for ELISA (~10-20 µl).
3. Dialyze against 1x DPBS/Ca²⁺Mg²⁺, pH ~7.2 (prepared on Day 1) in 1 l plastic beaker with stir bar in cold room (4x ~1 l; 1st for 3 h; 2nd for 4 h; 3rd O/N; on the next day: 4th for 4 hr).
4. Warm up dry NHS-activated beads (Pierce 26197) to RT (this is very important!). Prepare
 - a. Dsg3-beads (labeled D3): Weigh ~3.8 mg of dry beads in **1.5 ml (!) low-bind tube** (do not use 2.0 ml low-bind tubes!). Load these 3.8 mg with 1250 µl of ~0.2 µg/µl Dsg3EHis (~250 µg, obtained from Sf9 insect culture supernatants, expressed by Ms. Chenyan Lin) and rotate end-to-end O/N (for exactly 20 h).
 - b. Control beads I (labeled CI): Weigh same amount as in 4a., add to 1.5 ml low-bind tube and add 1.25 ml of sterile-filtered 0.5% BSA/1x DPBS/Ca²⁺Mg²⁺ (prepared aliquot at 4°C fridge); incubate as in 4a.
 - c. Control beads II (CII): Weigh same amount as in 4a., add to 1.5 ml low-bind tube and add 1.25 ml of sterile-filtered 1x DPBS/Ca²⁺Mg²⁺ (prepared on Day 1); incubate as in 4a.

DAY 3: Pull-down of Dsg3-specific antibodies from 'serum' by Dsg3EHis-conjugated beads

1. Spin beads after 20 h incubation at 4°C at 1,000 g for 1 min at RT. Remove and save the Dsg3-EHis supernatant (in a low-bind tube). Quickly wash beads twice with 1 ml of sterile-filtered 1x DPBS/Ca²⁺Mg²⁺ (pH ~7.2; prepared on Day 1).
2. Add 1 ml of sterile-filtered 1 M TRIS pH 7.4, rotate end-to-end for 1 h at RT ('quenching' of beads with amines). Spin at 1,000 g for 1 min, discard supernatant. Quickly wash beads once with 1 ml of sterile-filtered 1x DPBS/Ca²⁺Mg²⁺. Keep beads in 1x DPBS/Ca²⁺Mg²⁺ on ice until plasma is ready (this equals to a 2nd wash upon spin down of beads prior to addition of 'serum').
3. Collect 'serum' (dialyzed for 4 h in the 4th dialysis-step) directly into 5 ml syringe (with Millex-HV 0.45 µm PVDF syringe filter), sitting on low-bind 2.0 ml tubes (have 3 tubes with 2.0 ml vol. ready), and pass it through (2nd filtering); get every tiny rest out of filter. Save small aliquot of dialyzed and filtered 'serum' in low-bind tube for ELISA (~10-20 µl). *Note:*

Vol. increased from ~3.0 ml to ~3.5 ml. For this testing with 2 controls (BSA- and DPBS-controls), combine 3.5 ml clotted/filtered/dialyzed serum with ~400 µl of serum treated the same way from first aff.-purif. of PV3a to reach 3.9 ml needed.

4. Add ~1,300 µl of dialyzed 'serum' to prepared beads. Rotate end-to-end at 4°C O/N, for exactly 24 h (earlier test-incubation for 2 h at RT gave no good results!).

DAY 4: Elute Dsg3-specific antibodies from Dsg3EHis-conjugated beads

1. Spin beads at 1,000 g for 1 min at RT. Remove and save the supernatant ("flow-through" of D3-beads, CI-beads, CII-beads). Wash one time 7 min with 1 ml of ice-cold 1x DPBS/Ca²⁺Mg²⁺, pH ~7.2 (1x DPBS without additional NaCl salt), then 2x 5 min with 1 ml of ice-cold 1x DPBS/Ca²⁺Mg²⁺ + *extra 500 mM NaCl* (higher salt to get rid of unspecific binding) (save these first 3 washes in 1.5 + 2.0 ml low-bind tubes), then wash two more times (for a total of 5 washes) 7 min with 1 ml of ice-cold 1x DPBS/Ca²⁺Mg²⁺, pH ~7.2 (1x DPBS without additional NaCl salt)
2. Elute 3 times:
 - a. First two elutions in each 150 µl of 0.1 M glycine-HCl, pH ~2.2 (at RT), help by gently tapping for 5 min, then spin down beads at 1,000 g for 1 min and transfer 150 µl supernatant to 1.5 ml low-bind tube with 3.9 µl of 2 M TRIS pH ~10.9 already sitting in it (immediate neutralization).
 - b. Last (third) elution in 150 µl of 0.1 M glycine-HCl, pH ~1.8 (at RT), help by gently tapping for 5 min, then spin down beads at 1,000 g for 1 min and transfer 150 µl supernatant to 1.5 ml low-bind tube with 6.3 µl of 2 M TRIS pH ~10.9 already sitting in it (immediate neutralization).
 - c. Store elutes on wet ice
3. Do reducing SDS-gel with ~30 µl of elutes (+ 10 µl of 4x Laemmli sample buffer with βME) and appropriate human IgG standard for quantification; verify Dsg3-reactivity of elutes by ELISA (test aliquots of serum before and after dialysis, flow-throughs or control- and D3-beads, and all elutes from control- and D3-beads).
4. If concentrations acceptable, prepare reducing SDS-gel for LC-MS/MS on same day, if protein-sequencing from gel is desired.
5. Send samples to LC-MS/MS (either in reducing SDS-gel, or, unreduced in solution) on same or next day (store SDS-gel designated for LC-MS/MS and elutes at 4°C). If LC-MS/MS is not planned on next day, store elutes long-term at -80°C.

Required reagents and materials:

- Eppendorf low-bind 1.5 ml and 2.0 ml tubes for proteins
- 5 l of 1x DPBS/Ca²⁺Mg²⁺, pH ~7.2
- 2x (or more) 50 ml of 1x DPBS, with Ca²⁺ and Mg²⁺, pH ~7.2 (taken from the 5 l above; sterile-filtered); take one of those 50 ml aliquots and add 1.46 g of NaCl to a final (additional) concentration of 500 mM NaCl in 1x DPBS (this changes the pH slightly to pH ~6.9; not further adjusted here)
- 1x 20 ml of 0.5% BSA/1x DPBS (prepared with 1x DPBS from above)
- 2 M CaCl₂ aliquots (stored at -20°C)
- Regenerated cellulose dialysis membrane (Spectra/Por 6, MWCO 8kDa)
- Pierce NHS-activated agarose dry resin
- Purified Dsg3EHis (purified from baculovirus-supernatant, dialyzed against 1x DPBS/Ca²⁺Mg²⁺, pH ~7.2)
- Bovine thrombin (1000 U/vial, resuspended in 2 ml of MilliQ ddH₂O/0.01% BSA, resulting in 50 U/100 µl; resuspended solution stored in original vial at -20°C)

Protokoll 2 (Bezug fertig konjugierter Desmoglein 3-Säulenmatrix von EUROIMMUN):

Affinity purification of Dsg-specific antibodies with EUROIMMUN Dsg-matrix

Day 1: Clot plasma/'convert' to 'serum', if no serum is available (with serum, directly proceed to Day 3)

1. Take desired amount of plasma (stored in low-bind Eppendorf tubes!) out of -80°C and thaw on wet ice.
2. Add 20 µl of 2 M CaCl₂ per 1ml of plasma (60 µl for 3 ml). Incubate at 37°C in water bath for 2 h.
3. If no clots form, add bovine thrombin (resuspended enzyme [resuspended with MilliQ water/0.01% BSA for a final conc. of 50 U/100 µl; Sigma T-4648] at -20°C stable for >3 months as tested from myself; amounts needed are as follows: for undiluted PV3a plasma, add 65 U per 1.5 ml; for PV1a 1:2-diluted plasma, just add 2 M CaCl₂).
4. Keep 'serum' at 4°C O/N, no matter what was added to induce clotting (settling of clots and termination of clot reaction O/N is important).
5. In 5 l plastic beaker, prepare at least 4 L of 1x TBS (25 mM TRIS, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂); for 4 L, combine the following: 12.12 g TRIS (Sigma 252859), 35 g NaCl, solve in 3.8 L MilliQ water, add 10 ml of 2 M CaCl₂ stock; then adjust, under continuous stirring, from pH ~9.6 to final pH of 7.4 (10 N HCl, about 7 ml required), add MilliQ water up to 4 L final vol.), store at 4°C

Day 2: Dialyze plasma

1. Soak dialysis membrane (Spectra/Pore, MWCO 8kD, Part# 132586; size no. 6) in MilliQ ddH₂O for 30 min in a 1 l plastic beaker at RT. Rinse membrane thoroughly with MilliQ ddH₂O within this beaker. Precool centrifuge to 4°C.
2. Spin 'serum' (from treatment with CaCl₂, or CaCl₂ + bovine thrombin; thrombin-treatment may lead to 'gel-like' appearance of plasma – this is normal) at 8,000 rpm for 5 min at 4°C. Collect supernatant directly in 5 ml syringe (with Millex-HV 0.45 µm PVDF syringe filter; Cat# SLHV033RS), sitting on low-bind 2.0 ml tubes (have enough tubes ready), and pass it through; get every tiny rest out of filter. Save very small aliquot in low-bind tube for ELISA (~10 µl).
3. Transfer to soaked and rinsed dialysis membrane (closed on one end with 2 clips!), then try to get out as much air as possible and close other end with 2 clips as well
4. Dialyze against TBS at 4°C; 4x for ~3h, last of the 4 dialyses may also be O/N

Day 3: Pull-down and elution of Dsg3-specific antibodies from plasma/serum

1. Collect dialysed plasma from 4x dialysis in low-bind tubes, save small aliquot for ELISA testing
2. Mix matrix well (flip in your hands), then pipet 250 µl of slurry into 1 ml of TBS (from above stock) into 1.5 ml low-bind tube. Pipet up and down to get out all beads from pipet tip; if 2nd aff.-purif. (AP) is desired, prepare 2nd tube here and keep on ice until needed
3. Spin tube @ 500 g for 2 min, pipet out supernatant (=1st wash), then wash two more times with 1 ml of 1x TBS from stock above (get sodium azide out of beads slurry)
4. Then add 1 ml of 1:1 diluted plasma (which has been clotted, filtered, dialysed before); alternatively, if available, add 1:1 diluted serum (no dialysis required); dilute in TBS from stock above [actual input is 500 µl]
5. Incubate end-to-end for 30 min at RT
6. Spin at 500 g for 2 min, collect supernatant (save small aliquot, if 2nd AP follows, where supernatant from 1st AP is applied to 2nd batch of (fresh) washed slurry; see above), then wash beads 5x with 1 ml TBS from stock above; incubate for 5 min with every wash and then spin down at 500 g, 2 min; collect all washes in Eppendorf tubes
7. After 5th wash, elute with 150 µl 0.1 M glycine-HCl, pH 2.2 for 3 times (each time, tap for 5 min, then spin down beads with every elution); collect each 150 µl of elute in low-bind tube with 5 µl 2 M TRIS, pH 10.9 pre-added to it; immediate neutralization upon adding the elute should result in pH ~7.4 (check before!)

8. If desired, work on 2nd AP as detailed above for 1st AP
9. Store all elutes and saved aliquots with original plasma, dialyzed plasma, 1:1 diluted plasma, supernatants at 4°C; better do NOT freeze elutes (temperature-dependent changes of pH, ...) and submit ASAP to LC-MS/MS (best: same/next day)
10. Do ELISA and SDS-gel to confirm successful AP: Do reducing SDS-gel with ~20-30 µl of elutes (+ 10-20 µl of normal or 4x Laemmli sample buffer with βME) and appropriate human IgG standard for quantification; verify Dsg3-reactivity of elutes by ELISA (test aliquots of serum before and after dialysis, flow-throughs or control- and D3-beads, and all elutes from control- and D3-beads).
11. If concentrations acceptable, prepare reducing SDS-gel for LC-MS/MS on same day, if protein-sequencing from gel is desired. For all steps related to the final SDS-gel for LC-MS/MS **ONLY USE MILLIQ water!**

Protokoll 3 (Einbezug des Durchflusses in LC-MS/MS-Experimente, Aufreinigung mittels Protein G):

120 µl to 500 µl of serum was diluted 2-fold with 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.2 (TBS) + 10mM CaCl₂ and then incubated with 500µl of Dsg3- or Dsg1-conjugated matrix (Euroimmun) by end-to-end rotation for 40 min at RT. The slurry was then centrifuged at 500 g for 1 min. The matrix and the supernatant (flow-through) were collected for separate processing. The matrix was washed 6 times with TBS + 5mM CaCl₂. 100 µl of 4x Laemmli sample buffer (Bio-Rad) + 10% β-ME was then added to the washed matrix and incubated at 90°C for 3 min. The matrix was centrifuged and the supernatant was saved as the "bound" sample. The flowthrough from the Dsg3 or Dsg1 matrix was incubated with 300 µl of Protein G-agarose (Pierce) for 1 hr. Protein G-agarose was then washed 6 times with TBS + 5mM CaCl₂. One ml of 2x Laemmli sample buffer + 10% β-ME was then added to the washed agarose and incubated at 90°C for 3 min. The Protein G-agarose was centrifuged and the supernatant was saved as unbound sample. The unbound sample was diluted with 1x sample buffer to adjust its ab concentration to approximate that of the bound sample, as determined by their Coomassie blue-stained 50 kD band intensities on SDS-PAGE. Similar amounts of bound and unbound samples were loaded onto 4-12% Tris-HCl CRTGELS (Bio- Rad) and separated by SDS-PAGE. After electrophoresis, the gel was stained with SimplyBlue SafeStain (Invitrogen) (111).

Appendix X – LC-MS/MS von Antikörperschwerketten

LC-MS/MS analysis was performed by Hsin-Yao Tang, PhD, and Thomas Beer at the Wistar Proteomics & Metabolomics Facility (Philadelphia, PA, U.S.A.) using a Q Exactive Plus mass spectrometer (Thermo Scientific) coupled with a Nano-ACQUITY UPLC system (Waters). All LC-MS/MS samples were prepared in three or four technical replicates both for bound and unbound samples. Technical replicates included at least one repeat of the affinity chromatography and at least one repeat in LC-MS/MS of the abs from the same affinity chromatography run.

The heavy chain bands (approximately 50 kDa) of the bound and unbound samples were cut out from the gel and processed in parallel. Samples were reduced, alkylated, and digested overnight with 0.02 µg/µL modified trypsin (Promega, Madison, WI, U.S.A.) as previously described (175).

For LC-MS/MS samples were injected onto a UPLC Symmetry trap column (180 µm i.d. x 20 mm packed with 5 µm C18 resin; Waters), and tryptic peptides were separated by RP-HPLC on a BEH C18 nanocapillary analytical column (75 µm i.d. x 25 cm, 1.7 µm particle size; Waters) using a gradient formed by solvent A (0.1% formic acid in water) and solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile). Peptides were eluted at 200 nL/min for 5-30% B over 75 min, 30-80% B over 5 min, constant 80% B for 10 min before returning to 5% B over 1 min. A 30-min blank gradient was run between sample injections to minimize carryover. Eluted peptides were analyzed by the mass spectrometer set to repetitively scan m/z from 400 to 2000. The full LC-MS/MS scan was collected at 70,000 resolution followed by data-dependent MS/MS scans at 17,500 resolution on the 20 most abundant ions exceeding a minimum threshold of 10,000. Peptide match was set as preferred, exclude isotopes option and charge-state screening were enabled to reject singly and unassigned charged ions.

The table shown in **Panel 7** (D; Ergebnisse) referred to below shows the number and characterization of peptides identified by matching to a database comprising the sequences around the H-CDR3 regions. Similar numbers of peptides were identified from bound and unbound samples at 1% FDR. These peptides were ultimately further subjected to additional filters (PEP≤0.01, Score ≥70, mass error PPM ≤1.5) and strict criteria specified in **Appendix XI**.

As shown in **Panel 8** (B; Ergebnisse) a stable isotopically labeled CDR3 peptide was used to confirm CDR3 peptide identification by the PSM criteria described above. The heavy peptides was synthesized with a heavy label on arginine [¹³C₆ ¹⁵N₄] (AQUA QuantPro, Pierce Biotechnology). The heavy peptide was spiked into a tryptic digest of the PV3a anti-Dsg3 bound (unlabeled) sample and analyzed by LC-MS/MS as described above. MS/MS spectra comparison and extracted ion chromatograms were performed with Xcalibur Qual Browser (Thermo Scientific) and Skyline software (MacCoss Lab, University of Washington, Seattle, WA, U.S.A.) (111).

Appendix XI – Bioinformatische Auswertung und Korrelation der LC-MS/MS-Daten mit genetischen Sequenzdaten

All bioinformatic analyses from below were performed by Qi Zheng, PhD, and Hsin-Yao Tang, PhD, developed with advice and significant scientific input from Christoph M. Hammers, MD, Christoph T. Ellebrecht, MD, Aimee S. Payne, MD, PhD, John R. Stanley, MD, and Jing Chen, PhD.

All sequences from two sequencing platforms (Illumina and Sanger for Antibody Phage Display clones) from each patient were combined to construct the reference databases used to analyze LC-MS/MS spectra for subsequent analysis. A customized pipeline to build the antibody reference databases for LC-MS/MS from raw FASTQ reads called by the Illumina NGS instrument was implemented, see bioinformatics analysis parameters table below and in reference (111).

Tabelle S12: Bioinformatische Parameter der Datenanalyse

Method section	Step/Procedure	Program (version)	Detailed parameters	Notes
MS reference database construction	Paired-end read assembly	Pear (v0.9.6)	-v 15 -q 30 -n 300 -m 500	Quality trimming (-q 30) applied prior to assembly
	IGH sequence prediction	IMGT/HighV-QUEST	Species: human; Locus: IGH; Single individual: yes; 5' excluded nucleotides: 20	URL: http://www.imgt.org/HighV-QUEST/login.action
	H-CDR3 clustering	In-house Perl script with Algorithm::Cluster module	Distance metric: editing (Levenshtein) distance; Linkage method: average (UPGMC)	
	In-silico trypsin digestion	In-house Perl script	Pattern: /[KR](?:[^\P])?/	Amino acid K or R followed by an optional non-P residual
MS spectrum data analysis	Initial PSM	MaxQuant (1.5.2.8)	Decoy: revert; special AAs: KR; PSM FDR: 0.01	
	Per-peptide MaxQuant data summarization across replicate experiments	In-house Perl script	Summarized features: Proteins, Charges, Max Mass Err ppm, Max Mass Err Da, Min PEP, Scan IDs, Max score, Total intensity, etc.	Score: peptide identification score by MaxQuant; PEP: Posterior Error Probability
	Within replicate MS intensity normalization	In-house Perl script	Constant normalization	Normalization constants were determined according to the experiment with largest total intensity
	PSM filters	In-house Perl script	unique CDR3 count = 1; Min PEP ≤ 0.01 ; Max score ≥ 70 ; Max Mass Err ppm ≤ 1.5 ; CDR3 5' cover ≥ 2 AAs	CDR3 5' invariant AAs are not sufficient to determine a PSM
	Reproducibility filters	In-house Perl script	Present in all "bound" replicates but absent in all "unbound" replicates	Different time points processed independently
Signature construction & expression analysis	PSM Re-clustering	In-house Perl script	Distance metric: editing (Levenshtein) distance; Linkage method: single	"single" linkage suitable for already clustered H-CDR3 sequences
	Cross time intensity re-normalization	In-house Perl script	Constant normalization	Normalization constants were calculated only with PSMs in the "strict" list
	Heatmap generation and p-value calculation	In-house R script with "gplots" package	Heatmap based on log ₁₀ -transferred spectrum intensity; p-values by χ^2 -test	Zero (0) intensities that would cause negative infinity were filled by the square-root of the observed min intensity of that sample, rounded to the nearest integers on log ₁₀ -scale

In essence, this bioinformatic procedure includes: 1) Pre-processing: for Illumina MiSeq PE reads, the forward and reverse reads were assembled/merged using PEAR (v0.9.6) (176); 2) NR-tag reduction: identical reads after assembly/VH extracting were collapsed to non-redundant tags (NR-tags) for time and space efficiency, but the original count of the NR-tags were retained for all abundance calculations, so we will use the terms “read” and “NR-tag” interchangeably hereafter. 3) Antibody sequence prediction: All NR-tags were subjected for human IGH sequence prediction using the IMGT/HighV-QUEST (IMGT) online tool (116), then the IMGT predicted CDR3 AA results were filtered to retain only “productive” hits. 4) CDR3 clustering: The IMGT predicted VH AA sequences were hierarchically clustered into groups, defined as VH sequences of same V and J gene family, same length of CDR3, and within 20% editing distance for the CDR3 sequences, using customized Perl script and a centroid (UPGMC) linkage function implemented in the Algorithm::Cluster module. VH tags with more than one V and/or J gene assignment by IMGT were assigned to all combinations of the predicted V and J genes and processed independently. This clustering step serves mainly for easier interpretation of the IMGT predicted results and further clonotype analysis. 5) Generating the theoretical peptide sequences for LC-MS/MS searches for CDR3 regions: All VH reads in each CDR3 cluster were concatenated to IgG CH regions, then in-silico digested by trypsin to generate short peptides suitable for MS spectrum searches. We retained in the reference database up-to 1 trypsin cleavage site both upstream and downstream of the CDR3 regions. 6) Post processing: The sequences of one set of the known human CH regions as well as APD validated sequences from each patient, if available, were appended to each database. The CH regions were appended to facilitate accurate LC-MS/MS matching by MaxQuant software (see below) because there is increased accuracy of H-CDR3-specific peptide matching if the LC-MS/MS spectra of the CH regions of the VH chains have relevant matches in the reference database.

The LC-MS/MS data for each patient were analyzed using MaxQuant 1.5.2.8 software (177) against the patient-specific reference database described above and appended with a contaminants protein list. All bound and unbound LC-MS/MS replicate experiments of a same sample were searched together using MaxQuant’s “Match Between Runs” option. After initial search parameters, a set of universal MS spectrum match filters were applied to the representative PSMs for all samples, including an unambiguous one-peptide-one-CDR3 relationship and other MaxQuant specific criteria (PEP % 0.01, score R 70, mass error PPM % 1.5). At last, for most analyses, we applied a strict filter defined as only H-CDR3s found in all of three or four bound technical replicates but never in three or four unbound technical replicates.

To identify H-CDR3s of anti-Dsg abs, initial search parameters used were full trypsin specificity with up to two missed cleavages, static carboxamidomethylation of cysteine, variable oxidation of methionine and deamidation of asparagine, match between runs option enabled and false discovery rate (based on reversed sequence database as the Decoy Database) set at 1%. These initial data were first reformatted to per unique-peptide ordinated format, where all the auxiliary information was provided, including sequences, charges, modifications, mass errors, matching qualities, and total intensity over all matched spectrums. The intensity of all peptides was subsequently normalized within replicate experiments based on per-experiment total peptide intensity.

To determine ab clonotypes and their associated VH and JH genes we had to reconcile the few instances in which IMGT assigned more than one VH and/or JH genes to a given H-CDR3. The final VH and VJ assignment was determined by picking the VH tag coming from the H-CDR3 cluster with the most NGS reads. To determine the final clonotype lists and the intensities of clonotype expression at each time point, we performed a second round hierarchical clustering (supercluster) of the LC-MS/MS identified H-CDR3s using the same criteria as for the initial clustering except for not requiring the same V and J family constraint and using a single linkage instead of UPGMC function.

The matching between APD and LC-MS/MS clonotypes was done solely based on H-CDR3 sequence similarity (i.e., APD and LC-MS/MS H-CDR3 with 80% similarity were considered to be the same clonotype).

An initial Python script to concatenate antibody phage display-derived V_H/V_L sequences to Ig C_H/C_L regions of different isotypes was programed by Christoph M. Hammers, MD, and Alexander Radebach as given below:

```
# -*- coding: utf-8 -*-  
  
import numpy as np
```

```

import itertools as it

# Load original files
hcvr = np.loadtxt("/Users/cmh2012/Desktop/VH/PV3a_VH.txt", dtype="string", delimiter=";")
hccr = np.loadtxt("/Users/cmh2012/Desktop/VH/HC_CH1.txt", dtype="string", delimiter=";")
lcvr = np.loadtxt("/Users/cmh2012/Desktop/VL/PV3a_VL.txt", dtype="string", delimiter=";")
lccr = np.loadtxt("/Users/cmh2012/Desktop/VL/LC_CH1.txt", dtype="string", delimiter=";")

# Subdivide even and odd lines (i. e., names and sequences)
hcv1 = hcvr[::2]
hcv2 = hcvr[1::2]

hcc1 = hccr[::2]
hcc2 = hccr[1::2]

lcv1 = lcvr[::2]
lcv2 = lcvr[1::2]

lcc1 = lccr[::2]
lcc2 = lccr[1::2]

# Create all combinations of indices
h_combs = list(it.product(np.arange(hcv1.shape[0]), np.arange(hcc1.shape[0])))
l_combs = list(it.product(np.arange(lcv1.shape[0]), np.arange(lcc1.shape[0])))

# Concatenate names and sequences according to indices combinations
h_n = []
h_s = []

l_n = []
l_s = []

for (co1, co2) in h_combs:
    h_n.append(hcv1[co1] + hcc1[co2][1:])
    h_s.append(hcv2[co1] + hcc2[co2])

```

```
for (co1, co2) in l_combs:
    l_n.append(lcv1[co1] + lcc1[co2][1:])
    l_s.append(lcv2[co1] + lcc2[co2])

# Re-unite names and sequences
h = []
l = []

for i in np.arange(len(h_n)):
    h.append(h_n[i])
    h.append(h_s[i])

for i in np.arange(len(l_n)):
    l.append(l_n[i])
    l.append(l_s[i])

# Save to txt files
np.savetxt("/Users/cmh2012/Desktop/VH/HCCombinations_PV3a.txt", h, fmt="%s")
np.savetxt("/Users/cmh2012/Desktop/VL/LCCombinations_PV3a.txt", l, fmt="%s")
```

Danksagung

Ich danke recht herzlich allen Kollegen, Freunden, Bekannten und Familienmitgliedern, die mich auf dem Weg zu dieser naturwissenschaftlichen Promotion begleitet, vielfältig unterstützt, beraten und gefördert haben; namentlich sind dies insbesondere Herr Prof. Dr. Detlef Zillikens, Herr Prof. Dr. John R. Stanley, Frau Prof. Dr. Aimee S. Payne, Herr Prof. Dr. Donald L. Siegel, Herr Dr. Hsin-Yao Tang, Herr Dr. Qi Zheng, Herr Dipl.-Ing. Alexander Radebach, Herr Dr. Christoph T. Ellebrecht, Frau Dr. Jing Chen, Frau Dr. Chenyan Lin, Herr Dr. Xuming Mao, meine Eltern Matthias und Kirsten Hammers, sowie meine Frau Dr. Ann-Kathrin Hammers.

Lebenslauf

Der detaillierte Lebenslauf ist aus Datenschutzgründen nicht in der digitalen Version dieser Dissertationsschrift enthalten, jedoch auf Nachfrage beim Promovenden erhältlich (E-mail hammers@web.de).

Ein Onlineprofil zum Promovenden ist bei LinkedIn einsehbar.